

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

«Ο ρόλος της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LON στον ρυθμό
ανάπτυξης, γήρανσης και απόκρισης σε στρες στο νηματώδη
C.elegans»

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ Δ.ΤΡΙΓΑΖΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΘΗΝΑ, 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

**«Ο ρόλος της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LON στον
ρυθμό ανάπτυξης, γήρανσης και απόκρισης σε στρες στο
νηματώδη *C.elegans*»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ Δ.ΤΡΙΓΑΖΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2017

Ρήγας Σταμάτιος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

**«Ο ρόλος της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LON στον
ρυθμό ανάπτυξης, γήρανσης και απόκρισης σε στρες στο
νηματώδη *C.elegans*»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ Δ.ΤΡΙΓΑΖΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ρήγας Σταμάτιος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Πόπη Συντυχάκη, Ερευνήτρια Γ' ΙΙΒΕΑΑ (Μέλος)

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής (Μέλος)

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με Γενική Συνέλευση του τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 27/11/17, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη, ομοιόσταση και επιβίωση ενός οργανισμού είναι η συνεχής επιτήρηση της ποιότητας του πρωτεόματός του. Διαταραχές στους μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών εκτός αλλά και εντός των μιτοχονδρίων μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τον κυτταρικό μεταβολισμό και να προκαλέσουν διαβήτη, καρκίνο και νευροεκφυλιστικές παθήσεις στον άνθρωπο. Ειδικά, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στη γήρανση και σε συνοδούς νόσους, καθώς η βιογένεση και λειτουργία των μιτοχονδρίων εξασθενούν με την ηλικία. Στους βασικούς «φύλακες» του μιτοχονδριακού πρωτεόματος ανήκουν σύμπλοκα πρωτεασών που στοχεύουν και αποικοδομούν τις οξειδωμένες πρωτεΐνες ή απομακρύνουν ασταθείς πρωτεΐνες με μη σωστή αναδίπλωση, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σχηματισμό συσσωματωμάτων στα μιτοχόνδρια, παρεμβαίνοντας με τη σειρά τους στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Μια ιδιαίτερα συντηρημένη εξελικτικά μιτοχονδριακή πρωτεάση είναι η AAA+ πρωτεάση Lon που δρα στη διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής μήτρας, την ενίσχυση της μιτοχονδριακής βιογένεσης, την καταστολή της αυτοφαγίας των υπεροξυσωμάτων και της μιτοφαγίας καθώς και τον έλεγχο της ποιότητας του μιτοχονδριακού DNA. Παρότι η μείωση της δράσης της πρωτεάσης Lon σε κάποιους οργανισμούς έχει συσχετιστεί με φαινότυπους σχετικούς με τη γήρανση και τον καρκίνο, υπάρχουν ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τη λειτουργία της, ενώ ελάχιστες είναι οι *in vivo* μελέτες που έχουν διεξαχθεί γύρω από αυτή. Η παρούσα μελέτη, επικεντρώνεται στη διαλεύκανση του ρόλου της μιτοχονδριακής πρωτεάσης Lon στην ανάπτυξη, τη γήρανση και την απόκριση σε στρες, στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* που αποτελεί ιδανικό πειραματικό σύστημα σε αυτά τα πεδία. Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση της έλλειψης του γονιδίου *lonp-1* στο ρυθμό ανάπτυξης, τις φυσιολογικές λειτουργίες και τη διάρκεια ζωής των σκουληκιών σε κανονικές αλλά και σε συνθήκες στρες που μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Παράλληλα, ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης γνωστών γονιδίων απόκρισης στο στρες και η μορφολογία των μιτοχονδρίων στους διάφορους ιστούς των μεταλλαγμένων νηματωδών. Τέλος, η δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *C.elegans*, τα οποία εκφράζουν Lon πρωτεάσες από διαφορετικούς οργανισμούς, στοχεύει στη διερεύνηση του επιπέδου ομοιότητας αυτών των πρωτεασών σε λειτουργικό επίπεδο, μέσω της αποκατάστασης παθολογικών φαινοτύπων που παρουσιάζουν τα μεταλλάγματα *lonp-1*, όπως ο αργός ρυθμός ανάπτυξης και η μειωμένη διάρκεια ζωής.

Λέξεις κλειδιά: γήρανση, *C.elegans*, μιτοχόνδρια, πρωτεάσες, πρωτεάση Lonp-1, διάρκεια ζωής, πρωτέωμα, μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, μιτοχονδριακό στρες.

ABSTRACT

An important factor in the development, homeostasis and survival of an organism is the continuous monitoring of the quality of its proteome. Disturbances in protein quality control mechanisms outside but also within mitochondria can dramatically affect cellular metabolism and cause diabetes, cancer and neurodegenerative diseases in humans. Specifically, mitochondrial dysfunction is thought to contribute significantly to aging and concomitant diseases, as the biogenesis and function of mitochondria diminish with age. The key "guardians" of the mitochondrial proteome include complexes of proteases that target and degrade oxidized proteins or remove unstable proteins that are not properly folded, which could lead to aggregate formation in mitochondria, thereby interfering with normal cellular function. A highly conserved evolutionary mitochondrial protease is the AAA + Lon protease that acts to maintain mitochondrial matrix homeostasis, enhance mitochondrial biogenesis, suppress peroxidase autophagy and mitophagy, and control mitochondrial DNA quality. Although the reduction in Lon protease activity in some organisms has been associated with aging and cancer phenotypes, there are still many unanswered questions about its function, with few *in vivo* studies being conducted around it. The present study focuses on elucidating the role of Lon mitochondrial protease in growth, aging and stress response, the *Caenorhabditis elegans* nematode which is an ideal experimental system in these fields. In particular, the effect of the lack of the *lonp-1* gene on the growth rate, physiological functions, and lifespan of worms in both normal and stress conditions that may cause damage to mitochondrial proteins has been investigated. At the same time, the pattern of expression of known stress response genes and the morphology of mitochondria in various tissues of mutant nematodes was tested. Finally, the generation of *C.elegans* transgenic strains, which express Lon proteases from different organisms, aims to investigate the level of similarity of these proteases at the functional level by restoring pathological phenotypes presenting the *lonp-1* mutants, such as slow growth rate and reduced lifespan.

Key words: aging, *C.elegans*, mitochondria, proteases, Lonp-1 protease, lifespan, proteome, mitochondrial dysfunctions, mitochondrial stress.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής της Γήρανσης του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών υπό την καθημερινή επίβλεψη της Δρ. Πόπης Συντυχάκη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
A.1. Η γήρανση	9
A.1.1. Χαρακτηριστικά της γήρανσης.....	9
A.1.2. Μηχανισμοί Γήρανσης	14
A.2. Η πρωτεόσταση.....	24
A.2.1. Το δίκτυο πρωτεόστασης (ΔΠ).....	24
A.3. Οι Πρωτεάσες Lon.....	31
A.3.1. ATP εξαρτώμενες πρωτεάσες-Η πρωτεΐνη Lon ως μία ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση	31
A.3.2. Δομή και εξέλιξη της πρωτεάσης Lon	32
A.3.3. Lon πρωτεάση- ένα πολυλειτουργικό ένζυμο	34
A.3.4. Έκφραση και επίπεδα δραστηριότητας της Lon στα γηρασμένα κύτταρα.....	37
A.3.5. Σύνδεση της Lon με γενετικές ασθένειες και τον καρκίνο	39
A.4. Ο νηματώδης <i>C.elegans</i>	41
A.4.1. Ανατομία του <i>C. elegans</i>	44
A.4.2. Ο κύκλος ζωής του <i>C. elegans</i>	49
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
B.1. Πλασμίδια και φορείς κλωνοποίησης.....	57
B.2. Μοριακές Κατασκευές	58
B.3. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων.....	59
B.3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	59
B.3.2 Απομόνωση ολικού RNA	59
B.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	60
B.4.1. Πολυμεράση και εκκνητές	60
B.4.2. Σύνθεση cDNA και ποσοτική RT-PCR.....	61

B.4.3. PCR σε ολόκληρους νηματώδεις.....	62
B.5. Χειρισμοί βακτηριακών στελεχών.....	62
B.5.1. Καλλιέργεια και αποθήκευση βακτηριακών στελεχών	62
B.5.2. Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	63
B.5.3. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	64
B.5.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	64
B.6. Χειρισμοί στελεχών <i>C. elegans</i>	65
B.6.1. Καλλιέργεια, αποθήκευση και ψύξη στελεχών <i>C. Elegans</i>	65
B.6.2. Κατεργασία με αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη.....	67
B.6.3. Παραγωγή αρσενικών ατόμων.....	67
B.6.4. Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών με τη μέθοδο των μικροενέσεων.....	68
B.6.5. Διασάυρωση στελεχών <i>C.elegans</i>	69
B.6.6. Στελέχη <i>C.elegans</i>	69
B.6.7. Δοκιμασία προσδιορισμού διάρκειας ζωής.....	70
B.6.8. Δοκιμασίες στρες για έλεγχο και ποσοτικοποίηση φθορισμού	71
B.7. Μικροσκοπία.....	72
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
Γ.1. Δομή και έκφραση του γονιδίου <i>lonp-1</i> του <i>C. elegans</i>	73
Γ.2. Χαρακτηρισμός του <i>lonp-1</i> μεταλλάγματος στον <i>C. elegans</i>	74
Γ.2.1. Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης και γονιμότητας του μεταλλάγματος <i>lonp-1</i>	77
Γ.2.2. Προσδιορισμός της διάρκειας ζωής του στελέχους <i>lonp-1</i> και της επιβιώσής του σε στρες	78
Γ.2.3. Μελέτη της μορφολογίας μιτοχονδρίων στο στέλεχος <i>lonp-1</i>	79
Γ.3. Μελέτη συμπλήρωσης των φαινοτύπων <i>lonp-1</i> με τη χρήση διαγονιδίων.....	81
Γ.3.1. Κατασκευή των διαγονιδίων και διαγονιδιακών στελεχών νηματωδών που υπερεκφράζουν την ενδογενή και την ομόλογη ανθρώπινης LON	82
Γ.3.2. Μελέτη της λειτουργικότητας των διαγονιδίων έκφρασης του ενδογενούς και ανθρώπινου γονιδίου LON στο νηματώδη	85
Γ.4. Ενεργοποίηση του UPR ^{mt} στα <i>lonp-1</i> άτομα – Διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ UPR ^{mt} και κυτταροπλασματικής απόκρισης στο θερμικό στρες	89
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	93
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	98

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Η γήρανση

Η γήρανση αποτελεί ένα θέμα που έχει απασχολήσει πληθώρα φιλοσόφων και επιστημόνων κατά το ρου της ανθρώπινης ιστορίας. Γιατί γερνούν οι οργανισμοί; Τι καθορίζει το ρυθμό με τον οποίο γερνούν; Είναι η πορεία της αναπόφευκτη; Υπάρχει τρόπος να την καθυστερήσουμε ή ακόμα και να την αποφύγουμε; Αυτά και πολλά άλλα ερωτήματα έχουν αποτελέσει αντικείμενο της διανόησης και της επιστήμης για χιλιάδες χρόνια. Οι απαντήσεις ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τη σκοπιά από την οποία εξετάζει κανείς το θέμα. Ακόμα και ο ίδιος ο ορισμός της γήρανσης αποτελεί ένα δύσκολο εγχείρημα. Στη ευρεία της έννοια η γήρανση περιλαμβάνει όλες τις αλλαγές που συμβαίνουν στην πορεία της ζωής ενός ατόμου, μια πορεία που μπορεί να προσεγγιστεί από πολλές πλευρές, όπως της φιλοσοφίας, της ψυχολογίας, της κοινωνιολογίας και φυσικά της βιολογίας, οδηγώντας έτσι σε πολλούς διαφορετικούς ορισμούς.

Η βιολογική γήρανση ορίζεται ως η προοδευτική παρακμή των φυσιολογικών λειτουργιών ενός οργανισμού, η οποία με την ηλικία οδηγεί στη μείωση της γονιμότητας, την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης παθολογιών και τελικώς στο θάνατο. Η μεγάλη πρόοδος που έχει σημειωθεί στην υγειονομική περίθαλψη στις σύγχρονες κοινωνίες, η οποία έχει οδηγήσει σε αυξημένη επιβίωση των ανθρώπων σε μεγάλη ηλικία, σε συνδυασμό με μελέτες και παρατηρήσεις σε οργανισμούς μοντέλα, έχουν συμβάλλει τα μέγιστα στον καθορισμό και την περιγραφή των βασικών χαρακτηριστικών της γήρανσης. Η αναγνώριση και η μελέτη των χαρακτηριστικών αυτών αποτελεί ένα βήμα εξαιρετικής σημασίας προκειμένου όχι μόνο να κατανοήσουμε αλλά και να σχεδιάσουμε επεμβάσεις με σκοπό την καταπολέμηση της γήρανσης. Ακολουθεί μια σύντομη αναφορά των βασικών, ευρέως αποδεκτών, χαρακτηριστικών της γήρανσης.

A.1.1. Χαρακτηριστικά της γήρανσης

Λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας, αλλά και της ποικιλομορφίας που παρουσιάζει το φαινόμενο της γήρανσης από τους μονοκύτταρους οργανισμούς μέχρι τους πλέον πολύπλοκους ανώτερους ευκαρυώτες, η εύρεση καθολικών χαρακτηριστικών της αποτελεί ένα δύσκολο εγχείρημα. Η πλέον επιτυχημένη απόπειρα έγινε πρόσφατα, εστιάζοντας κυρίως στη γήρανση των θηλαστικών, λαμβάνοντας όμως υπ' όψη κατά το δυνατό και σημαντικά δεδομένα που έχουν προκύψει από μελέτες σε κατώτερους οργανισμούς μοντέλα[1]. Από την προσέγγιση αυτή προέκυψαν εννέα ευρέως αποδεκτά χαρακτηριστικά της γήρανσης (εικόνα A1). Στην πλειοψηφία τους τα χαρακτηριστικά αυτά πληρούν τρία βασικά κριτήρια: (1) εκδηλώνονται κατά το φυσιολογικό γήρας, (2) η επιδείνωσή τους σε πειράματα επιταχύνει τη γήρανση ενώ (3) η βελτίωσή τους καθυστερεί τη γήρανση και επομένως να αυξάνει τη διάρκεια της ζωής. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: Πρωτογενή, ανταγωνιστικά και ολιστικά χαρακτηριστικά. Τα πρωτογενή χαρακτηριστικά έχουν καθαρά αρνητικό χαρακτήρα, εμφανίζονται με στοχαστικό τρόπο σε κύτταρα, ιστούς ή όργανα και μπορούν να θεωρηθούν ως η αρχική

ώθηση στην πορεία της γήρανσης. Τα ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά αν και είναι αρχικά ευεργετικά, αποκτούν προοδευτικά αρνητικό χαρακτήρα, σε μια διαδικασία που προωθείται και επιταχύνεται από τα πρωτογενή. Τέλος, τα ολιστικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται όταν οι βλάβες που συσσωρεύονται από τα πρωτογενή και ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά δεν μπορούν πλέον να αντισταθμιστούν και να αντιμετωπιστούν από τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς και αποτελούν τους τελικούς υπαίτιους για την εμφάνιση των φαινοτύπων της γήρανσης.



Εικόνα A1| Τα χαρακτηριστικά της γήρανσης. Στην εικόνα παρουσιάζονται επιγραμματικά τα εννέα ευρέως αποδεκτά χαρακτηριστικά της γήρανσης.

Τροποποιημένο από Lopez-Otin, C. *et al.* Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.

A.1.1.1. Πρωτογενή Χαρακτηριστικά

I. Γονιδιωματική Αστάθεια

Η συσσώρευση βλαβών τόσο στο πυρηνικό (μεταλλάξεις, ανευπλοειδίες κ.α.), όσο και στο μιτοχονδριακό DNA με το πέρασ της ηλικίας αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο φαινόμενο που έχει συσχετιστεί με τη γήρανση. Οι αλλοιώσεις αυτές οφείλονται σε μια πληθώρα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων που δρουν απευθείας πάνω στο DNA, αλλά και σε τροποποιήσεις στην αρχιτεκτονική δομή του πυρήνα που παρατηρούνται σε γερασμένα άτομα [2-4]. Ελαττώματα στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA έχουν βρεθεί να προκαλούν αύξηση στο ρυθμό της γήρανσης σε ποντίκια [2, 5, 6], ενώ αποτελούν και χαρακτηριστικό πολλών ανθρώπινων συνδρόμων πρόωρης γήρανσης [7]. Ταυτόχρονα, η ενίσχυση του μηχανισμού που εξασφαλίζει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων έχει βρεθεί να επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής σε ποντίκια, υποδεικνύοντας ότι η ενίσχυση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA οδηγεί πράγματι στην καθυστέρηση της γήρανσης [8].

II. Φθορά τελομερών

Μια ειδική υποκατηγορία βλαβών του DNA αφορά στα τελομερή, τα οποία είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στη φθορά με την ηλικία για δύο βασικούς λόγους. Πρώτον, οι DNA πολυμεράσες, που είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή του DNA, αδυνατούν να αντιγράψουν μέχρι το πέρασ τους γραμμικά μόρια DNA. Η λειτουργία αυτή επιτελείται από την εξειδικευμένη πολυμεράση γνωστή ως τελομεράση, η οποία όμως δεν εκφράζεται στην πλειοψηφία των σωματικών κυττάρων, με αποτέλεσμα το μήκος των τελομερών να μειώνεται σε κάθε κύκλο αντιγραφής [9]. Δεύτερον, τα τελομερή καλύπτονται από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο γνωστό ως σελτερίνη, προκειμένου να αποφευχθεί η σύνδεση των χρωμοσωμάτων μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να μην είναι προσβάσιμα στους βασικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης [10]. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που φέρουν κοντύτερα ή μακρύτερα τελομερή από τα φυσιολογικά άτομα εμφανίζουν μειωμένη ή αυξημένη διάρκεια ζωής αντίστοιχα [11-14], ενώ η ενεργοποίηση της τελομεράσης σε μεγάλη ηλικία μπορεί να αναστρέψει την πρόωρη γήρανση ποντικών με κοντά τελομερή [15]. Αντίστοιχα, πρόωρη γήρανση έχει παρατηρηθεί και σε μοντέλα με φυσιολογικό μήκος τελομερών που φέρουν έλλειψη συστατικών της σελτερίνης [16].

III. Επιγενετικές τροποποιήσεις

Ο αριθμός και η φύση των επιγενετικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν σε όλα τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της ζωής είναι μεγάλος και περιλαμβάνει αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών και αναδιάταξη της χρωματίνης [17]. Η αυξημένη ακετυλίωση της ιστόνης H4K16 και τριμεθυλίωση της ιστόνης H4K20 ή H3K4, καθώς και η μειωμένη μεθυλίωση της ιστόνης H3K9 ή η τριμεθυλίωση της ιστόνης H3K27 αποτελούν επιγενετικά σημάδια που σχετίζονται με τη γήρανση [18, 19]. Επιπλέον η έλλειψη συστατικών των συμπλόκων μεθυλίωσης της ιστόνης H3K4 και H3K27 έχει βρεθεί

να αυξάνει τη διάρκεια ζωής στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και τη μύγα *Drosophila melanogaster* αντίστοιχα [20, 21]. Ομοίως, μεταλλαγμένα ποντίκια με έλλειψη της εξαρτώμενης από NAD⁺ αποακετυλάσης ιστονών SIRT6 εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό γήρανσης, ενώ αρσενικά ποντίκια που την υπερεκφράζουν ζουν περισσότερο [22, 23].

IV. Απώλεια πρωτεόστασης

Όλα τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου προκειμένου να διατηρούν τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητα του πρωτεόματός τους. Οι μηχανισμοί αυτοί δρουν σε δύο επίπεδα: τη διασφάλιση του σωστού διπλώματος των πρωτεϊνών, κυρίως μέσω της δράσης των μοριακών συνοδών/πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Chaperones/Heat Shock Proteins) και την καταστροφή πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα και το λυσόσωμα. Η δυνατότητα όμως των κυττάρων να ελέγχουν το πρωτεόμα τους φαίνεται να διαταράσσεται με την ηλικία και τόσο η ίδια η γήρανση, όσο και πολλές ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες έχουν συνδεθεί με την απώλεια της πρωτεόστασης [24-26]. Πράγματι, η επαγόμενη από στρες σύνθεση των μοριακών συνοδών φθίνει σημαντικά με την αύξηση της ηλικίας [27], ενώ δεδομένα από οργανισμούς μοντέλα υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση ή η έλλειψή τους οδηγεί σε αύξηση ή σε μείωση της διάρκειας ζωής αντίστοιχα [28-30]. Παράλληλα, κατά το γήρας φθίνει και η ενεργότητα των δύο βασικών συστημάτων πρωτεόλυσης: του πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας [31, 32]. Η ενεργοποίηση είτε του ενός είτε του άλλου πρωτεολυτικού μηχανισμού έχει βρεθεί να επαρκεί για να προκαλέσει την αύξηση της διάρκειας ζωής σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα [33, 34].

A.1.1.2. Ανταγωνιστικά Χαρακτηριστικά

I. Απορρύθμιση της αντίληψης θρεπτικών

Στην πλειοψηφία τους οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν διάφορα συστήματα προκειμένου να αντιλαμβάνονται τα επίπεδα πρόσληψης βασικών θρεπτικών (π.χ. γλυκόζη) και να ανταποκρίνονται σε αυτά ρυθμίζοντας ανάλογα το μεταβολισμό τους. Μερικά από τα κυριότερα τέτοια συστήματα είναι αυτά του μονοπατιού της ινσουλίνης και του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα IGF-1 (Insulin/Insulin like growth factor 1 signaling – ISS), της κινάσης TOR, της εξαρτώμενης από AMP κινάσης (AMPK) και των σιρτουϊνών (βλ. §A.1.3. Μηχανισμοί γήρανσης) [35]. Τα δεδομένα που έχουν συσσωρευτεί από μελέτες σε οργανισμούς μοντέλα δείχνουν πως η προώθηση αναβολικών διεργασιών μέσω της σηματοδότησης επαρκείας θρεπτικών επιταχύνει τη γήρανση, ενώ η μειωμένη σηματοδότηση διαθεσιμότητας θρεπτικών αυξάνει τη διάρκεια της ζωής [36]. Επιπλέον, η προσομοίωση της κατάστασης μειωμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών μέσω της χρήσης φαρμακολογικών παραγόντων, όπως η ραπαμυκίνη, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής σε ποντίκια [37].

II. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Η παρακμή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων θεωρείται ως ένας από τους βασικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην εμφάνιση της γήρανσης [38]. Καθώς τα κύτταρα γερνούν, η αποτελεσματικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια μειώνεται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαρροή ηλεκτρονίων (και κατ' επέκταση οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου – Reactive Oxygen Species/ROS) και να μειώνεται η παραγωγή ATP [39]. Η σύνδεση όμως της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων με την αύξηση των ROS και τη γήρανση δεν είναι τόσο ευθυτενής όσο πιστευόταν κάποτε. Υπάρχουν πλέον δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS όχι μόνο δεν επιταχύνουν τη γήρανση, αλλά την καθυστερούν, πιθανώς λειτουργώντας ως σήμα για την ενεργοποίηση μηχανισμών επιβίωσης κάτω από στρες [40-42]. Πέρα από ένα κατώφλι όμως ο ρόλος τους αλλάζει και τελικώς προκαλούν την επιδείνωση της γήρανσης [43]. Ακόμα, μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων χωρίς να προκαλούν αύξηση των ROS έχουν βρεθεί να αυξάνουν το ρυθμό της γήρανσης [43-45]. Από την άλλη πλευρά, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων κατά τη γήρανση έχει συνδεθεί και με το φαινόμενο της όρμησης, καθώς μικρού βαθμού δυσλειτουργία μπορεί να αυξάνει τη διάρκεια ζωής χάρη σε μία τέτοιας φύσεως απόκριση [46].

III. Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση ορίζεται ως η μόνιμη παύση του κυτταρικού κύκλου, που συνοδεύεται από χαρακτηριστικές φαινοτυπικές αλλαγές [47]. Η κυτταρική γήρανση προκύπτει ως απόκριση σε αλλαγές που εμφανίζονται προοδευτικά κατά τη γήρανση, με κυριότερα τη μείωση των τελομερών, τη συσσώρευση βλαβών στο DNA και την αποκαταστολή του γενετικού τόπου *INK4/ARF* [48, 49]. Ο βασικός λόγος ύπαρξης του εν λόγω μηχανισμού είναι η αποτροπή του πολλαπλασιασμού κυττάρων που φέρουν βλάβες και η επαγωγή της απομάκρυνσής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Από αυτή την οπτική, η κυτταρική γήρανση συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στη διατήρηση ιστών και οργανισμών σε καλή κατάσταση με το πέρασμα του χρόνου και στην αποφυγή της ογκογένεσης, η εμφάνισή της όμως καθιστά απαραίτητη την ύπαρξη ενός αντισταθμιστικού μηχανισμού κινητοποίησης προγονικών κυττάρων, προκειμένου να παραχθούν νέα κύτταρα που θα αντικαταστήσουν αυτά που απομακρύνονται. Η αύξηση του αριθμού των γερασμένων κυττάρων που παρατηρείται με την ηλικία πιθανώς να οφείλεται στη μειωμένη δυνατότητα απομάκρυνσης ή αντικατάστασής τους, οδηγώντας τελικά στην επιδείνωση της γήρανσης. Επιπλέον, οι μεγάλες αλλαγές που έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνουν στο εκκριτικό προφίλ των γερασμένων κυττάρων, το οποίο είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένο σε προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, ενδεχομένως να συμβάλει περαιτέρω στην πρόοδο της γήρανσης [47, 50].

A.1.1.3. Ολιστικά Χαρακτηριστικά

I. Εξάντληση των βλαστοκυττάρων

Η παρακμή του αναγεννητικού δυναμικού των ιστών αποτελεί ένα από τα πιο ξεκάθαρα χαρακτηριστικά της γήρανσης [51]. Αν και η αναπαραγωγή των βλαστοκυττάρων είναι απαραίτητη για τη διατήρηση ενός οργανισμού, η υπέρμετρη αναπαραγωγή τους μπορεί να αποβεί καταστροφική λόγω της εξάντλησης του δυναμικού του αντίστοιχου θώκου. Η σημασία της διατήρησης των βλαστοκυττάρων σε αδρανή κατάσταση προκειμένου να διασφαλιστεί η λειτουργικότητά τους σε βάθος χρόνου έχει υποδειχθεί από πειράματα σε οργανισμούς μοντέλα, στα οποία η διαταραχή της αδράνειάς τους είχε ως αποτέλεσμα την ταχεία εξάντληση του αναπαραγωγικού δυναμικού του θώκου και την πρόωρη εμφάνιση της γήρανσης [52-55]. Η πιθανότητα της αντιστροφής της γήρανσης μέσω της αναγέννησης του αναπαραγωγικού δυναμικού των βλαστοκυττάρων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προοπτική που έχει αρχίσει να διαφαίνεται [56].

II. Τροποποίηση της διακυτταρικής επικοινωνίας

Πέρα από τις κυτταρικά αυτόνομες αλλαγές που παρατηρούνται, η γήρανση συνοδεύεται και από τροποποιήσεις στη διακυτταρική επικοινωνία μέσω ενδοκρινικής, νευρικής και νευροενδοκρινικής σηματοδότησης [57, 58]. Γενικά κατά τη γήρανση παρατηρείται απορρύθμιση των ορμονικών μονοπατιών (π.χ. της ινσουλίνης και του IGF), αύξηση της φλεγμονής, μείωση της ανοσοεπιτήρησης έναντι παθογόνων και γερασμένων ή προκαρκινικών κυττάρων, καθώς και αλλαγές στο περικυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον που επηρεάζουν το βαθμό της γήρανσης των κυττάρων [59-61]. Η στενή σύνδεση της σηματοδότησης της φλεγμονής με τη γήρανση αναδεικνύεται από το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, κύριου ρυθμιστή της φλεγμονής, η υπερενεργοποίηση του οποίου αποτελεί βασικό γνώρισμα της γήρανσης, ενώ η γενετική ή φαρμακολογική παρεμπόδισή του αποτρέπει την εμφάνιση ηλικιοεξαρτώμενων χαρακτηριστικών σε μοντέλα πρόωρης γήρανσης ποντικών [62-64]. Πέρα από τη φλεγμονή, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η ηλικιοεξαρτώμενη φθορά ενός ιστού μπορεί να προκαλέσει αντίστοιχες αλλαγές σε άλλους ιστούς χρησιμοποιώντας άλλους μηχανισμούς, ενώ έχει παρατηρηθεί και η μετάδοση της κυτταρικής γήρανσης από γερασμένα κύτταρα στα γειτονικά τους [64]. Επιπλέον, στοχευμένες τροποποιήσεις που επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής σε έναν ιστό έχουν βρεθεί να επιβραδύνουν το ρυθμό της γήρανσης άλλων ιστών σε οργανισμούς μοντέλα [14, 65-67].

A.1.2. Μηχανισμοί Γήρανσης

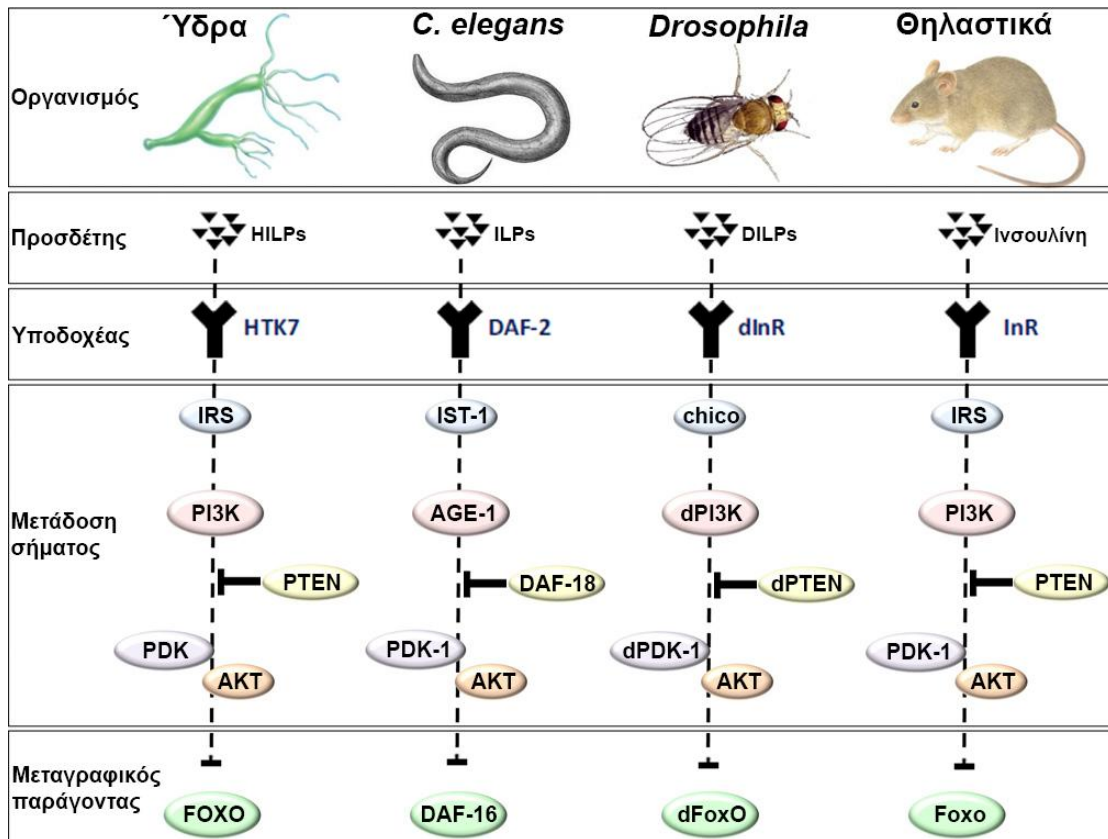
A.1.2.1. Η σηματοδότηση της ινσουλίνης και του IGF-1

Πολλές από τις παρεμβάσεις που αποσκοπούν στη μακροβιότητα αφορούν σε ενδοκρινικά ή νευροενδοκρινικά μονοπάτια μετάδοσης σήματος, υπεύθυνα για τον συντονισμό του μεταβολισμού με περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών και το στρες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μονοπάτι της ινσουλίνης και του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), που εμφανίζεται εξελικτικά συντηρημένο από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο και η λειτουργία του

έχει συσχετιστεί με το ρυθμό της γήρανσης στο νηματώδη, την μύγα, τα ποντίκια και τον άνθρωπο (εικόνα A2) [68-72].

Η πρώτη σύνδεση του μονοπατιού της ινσουλίνης με τη διάρκεια της ζωής προέκυψε από μελέτες στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, όπου μεταλλάξεις στα γονίδια *age-1* και *daf-2*, που κωδικοποιούν για συστατικά του μονοπατιού, βρέθηκαν να διπλασιάζουν τη διάρκεια ζωής του ζώου [69]. Το γονίδιο *daf-2* κωδικοποιεί για τον μοναδικό υποδοχέα ινσουλίνης/IGF-1 του νηματώδους, ομόλογο με τους υποδοχείς ινσουλίνης και IGF-1 των θηλαστικών [73], ο οποίος αναγνωρίζει ως προσδέτες τουλάχιστον 40 ινσουλινόμορφα πεπτίδια, που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμά του και δρουν είτε ως αγωνιστές, είτε ως ανταγωνιστές του υποδοχέα, καθορίζοντας το βαθμό ενεργοποίησης του μονοπατιού ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως η διαθεσιμότητα της τροφής και οι συνθήκες ανάπτυξης [74, 75]. Η πρόσδεση ενός αγωνιστή προκαλεί την ενεργοποίηση της επικράτειας κίνησης του υποδοχέα DAF-2 και έναρξης μιας αλληλουχίας φωσφορυλίσεων (μέσω των κινασών AGE-1/PI3K, PDK-1, SGK-1, AKT-1 και AKT-2), που καταλήγει στον μεταγραφικό παράγοντα DAF-16/FOXO, ομόλογου της οικογένειας των FOXO μεταγραφικών παραγόντων των θηλαστικών, η δράση του οποίου είναι απαραίτητη για τη μακροβιότητα των *daf-2* μεταλλαγμένων ατόμων [69, 76-80]. Όσο η φωσφορυλίωσή του διατηρείται, ο DAF-16/FOXO παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα, η παρεμπόδιση όμως της σηματοδότησης του μονοπατιού ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων ή γενετικών τροποποιήσεων οδηγεί στην αποφωσφορυλίωσή του και την μετατόπισή του στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί ή καταστέλλει τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων. Οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των στόχων του DAF-16/FOXO επηρεάζουν βασικές πλευρές της βιολογίας του νηματώδους όπως το μεταβολισμό, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, την απόκριση στο στρες και την ανοσολογική απόκριση, οδηγώντας τελικά στην μακροβιότητα [81, 82]. Στα σπονδυλωτά, που διαθέτουν ξεχωριστούς υποδοχείς για την ινσουλίνη και για τον IGF-1, η ρύθμιση του μεταβολισμού διαμεσολαβείται κυρίως από τη δράση του υποδοχέα της ινσουλίνης, ενώ η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή από τον υποδοχέα του IGF-1 [83, 84]. Εντούτοις οι δύο υποδοχείς μοιράζονται κοινά καταροϊκά συστατικά και η δράση και των δύο εμπλέκεται με τη μακροβιότητα [71, 85].

Η σηματοδότηση της ινσουλίνης και του IGF-1 φαίνεται να μην περιορίζεται στα αυτόνομα πλαίσια ενός κυττάρου. Γενετικά μωσαϊκά *C. elegans*, τα οποία φέρουν έλλειψη του υποδοχέα DAF-2 σε ένα από τα δύο κύτταρα, κατά το στάδιο των δύο κυττάρων, είναι μακρόβια [86], υποδεικνύοντας πως τα κύτταρα που φέρουν την έλλειψη στέλνουν κάποιο σήμα μακροβιότητας σε κύτταρα αγρίου τύπου. Ένας από τους ιστούς που φαίνεται να έχει την ικανότητα να στέλνει τέτοια σήματα είναι το έντερο που λειτουργεί και ως λιπώδης ιστός του νηματώδους. Αυξημένη ενεργότητα του DAF-16/FOXO στο λιπώδη ιστό του σκουληκιού και της *Drosophila* αρκεί για να αυξήσει τη διάρκεια ζωής τους [70, 87, 88], ενώ έλλειψη του υποδοχέα της ινσουλίνης στο λιπώδη ιστό είναι ικανή να προκαλέσει αυξημένη μακροβιότητα σε ποντίκια [85]. Αντίστοιχη δυνατότητα αποστολής σημάτων που καθορίζουν τη διάρκεια της ζωής μέσω της δράσης του μονοπατιού της ινσουλίνης φαίνεται να διαθέτει και το νευρικό σύστημα, καθώς η αποκατάσταση της λειτουργίας του υποδοχέα DAF-2 αποκλειστικά στον ιστό αυτό οδηγεί στην απώλεια της μακροβιότητας *daf-2* μεταλλαγμένων ατόμων [67]. Επιπλέον, πολλά στελέχη του νηματώδη με μεταλλαγές σε αισθητήριους νευρώνες είναι μακρόβια, με την παρατηρούμενη επέκταση της ζωής να

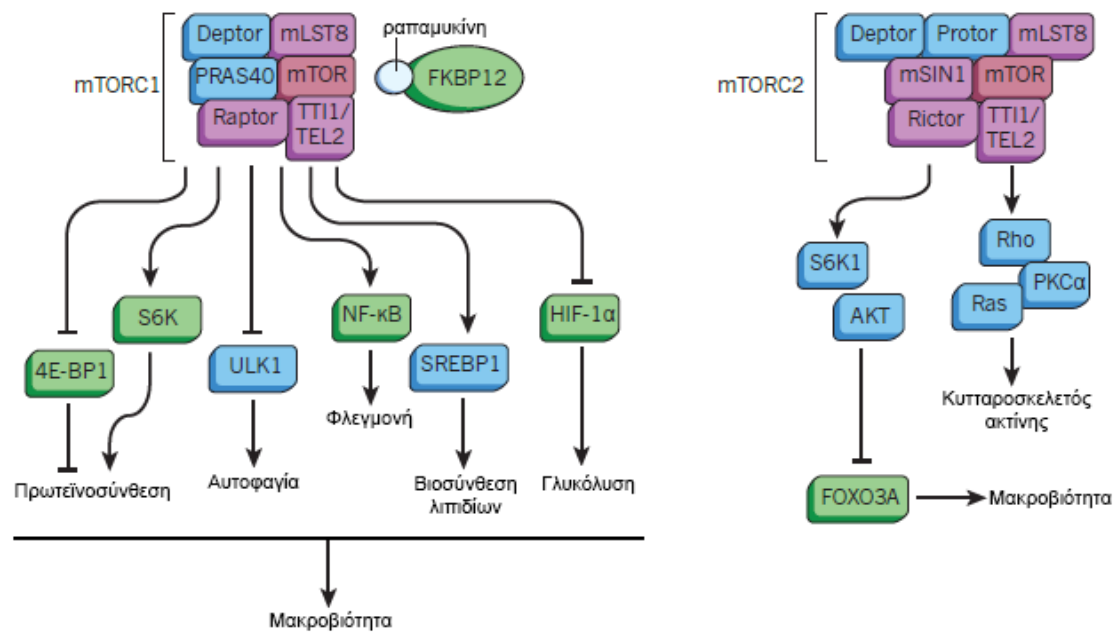


Εικόνα A2 | Εξελικτική συντήρηση του μονοπατιού της ινσουλίνης. Παρουσιάζονται τα βασικά συστατικά του μονοπατιού στην ύδρα, τον *C. elegans*, τη *D. melanogaster* και τα θηλαστικά. Αν και στους κατώτερους οργανισμούς τα περισσότερα συστατικά κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο, στα θηλαστικά υφίστανται περισσότεροι αντιπρόσωποι για το κάθε συστατικό, με εξαίρεση το PTEN.

Τροποποιημένο από Martins, R. *et al.* Aging Cell, 2016. 15(2): p. 196-207.

εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον DAF-16/FOXO και να συνδέεται με τον πυρηνικό εντοπισμό του [89-91], ενώ πολλοί αισθητήριοι νευρώνες έχουν βρεθεί να παράγουν ινσουλινόμορφα πεπτίδια, τουλάχιστον κάποια από τα οποία έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τη μακροβιότητα [74, 75, 81].

Πέρα από τον DAF-16/FOXO, σημαντικό ρόλο στη μακροβιότητα μέσω της δράσης του μονοπατιού της ινσουλίνης διαδραματίζει και ο μεταγραφικός παράγοντας απόκρισης στο θερμικό σοκ HSF-1 [92, 93]. Όπως και ο DAF-16/FOXO, ο HSF-1 καθυστερεί τη γήρανση μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων γονιδίων μακροβιότητας, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν για μικρές πρωτεΐνες θερμικού πλήγματος (Heat-Shock Proteins, HSPs) [92]. Από την άλλη πλευρά, η μετατόπιση του DAF-16/FOXO στον πυρήνα μπορεί να επαχθεί και ανεξάρτητα από το μονοπάτι της ινσουλίνης, μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασής του με κεντρικούς ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης και της απόκρισης στο στρες όπως οι κινάσες p38 και JNK, παρέχοντας ένα σύνδεσμο των μονοπατιών αυτών με τη μακροβιότητα [94, 95]. Επιπλέον, κινάσες εκτός του μονοπατιού όπως η AMPK, η p38 MAPK και κινάσες της σηματοδότησης RAS έχουν βρεθεί να απαιτούνται εν μέρει για την μακροβιότητα των *daf-2* μεταλλαγμάτων, υποδεικνύοντας πως η τελική απόκριση του οργανισμού στις αλλαγές του περιβάλλοντος προκύπτει από τη σύγκλιση πολλών συνιστωσών [96-98].



Εικόνα Α3| Τα δύο σύμπλοκα της TOR αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά και ρυθμίζουν διαφορετικές λειτουργίες. Τα συστατικά και οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων που παρουσιάζονται αφορούν σε ποντίκια, αλλά η σύσταση και η λειτουργία τους είναι ανάλογη και σε άλλους οργανισμούς.

Τροποποιημένο από Johnson, S.C. *et al.*. Nature, 2013. 493(7432): p. 338-45.

A.1.2.2. Το μονοπάτι της TOR

Η κινάση TOR, που οφείλει το όνομά της στην ουσία ραπαμυκίνη (στόχος της ραπαμυκίνης/Target of Rapamycin – TOR) είναι μια αυστηρά συντηρημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης, που παίζει κεντρικό ρόλο στην αντίληψη της διαθεσιμότητας θρεπτικών από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και την απόκρισή σε αυτή. Η TOR αποτελεί κεντρικό συστατικό δύο ξεχωριστών πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, των TORC1 (TOR Complex 1: TOR, GβL, Raptor, Deptor) και TORC2 (TOR Complex 2: TOR, Rictor, GβL, Sin1, PRR5/Protor-1, Deptor), που διαφέρουν στην ευαισθησία τους στην ραπαμυκίνη, στα αναροϊκά σήματα που ενσωματώνουν, στα υποστρώματα που ρυθμίζουν και στις βιολογικές διαδικασίες που ελέγχουν (εικόνα Α3) [99]. Το σύμπλοκο TORC2, το λιγότερο μελετημένο από τα δύο, δεν είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη, ενεργοποιείται εμμέσως από αυξητικούς παράγοντες μέσω της συσχέτισής του με τα ριβοσώματα και ρυθμίζει την οργάνωση του κυτταροσκελετού, την πρωτεϊνوسύνθεση, την αυτοφαγία και τον μεταβολισμό [100, 101]. Το σύμπλοκο TORC1 είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη, η ενεργότητά του ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες και ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς αντίληψης θρεπτικών και ενεργειακής κατάστασης (π.χ. τη δράση της κινάσης AMPK και τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων) και η ενεργοποίησή του προωθεί την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μέσα από διαδικασίες όπως η προώθηση της μετάφρασης

των mRNA και της βιοσύνθεσης λιπιδίων, η καταστολή της αυτοφαγίας και η αύξηση της λειτουργίας και του αριθμού των μιτοχονδρίων [102-106].

Η αρχική συσχέτιση της TOR με τη γήρανση προέκυψε από μελέτες στη ζύμη που έδειξαν ότι η έλλειψη ενός βασικού της στόχου, του Sch9 (ομόλογου στη ζύμη της κινάσης S6K) έχει σαν αποτέλεσμα το διπλασιασμό της χρονολογικής διάρκειας ζωής (ο χρόνος που μπορούν τα κύτταρα να παραμείνουν ζωντανά σε στατική φάση) [107]. Ακολούθησαν μελέτες στο νηματώδη *C. elegans* και τη μύγα *D. melanogaster* που έδειξαν ότι η δράση της TOR επιδρά αρνητικά στη διάρκεια ζωής, καθώς και μελέτες σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα που συνέδεσαν τη χορήγηση ραπαμυκίνης με την αύξηση της διάρκειας ζωής [37, 108-112], καθιερώνοντας την κινάση TOR και πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο TORC1, ως έναν εξελικτικά συντηρημένο ρυθμιστή της μακροβιότητας. Παρόλα αυτά, λόγω της ευρύτητας του δικτύου και του φάσματος των λειτουργιών που επηρεάζονται από τη δράση της TOR, η αποκάλυψη λεπτομερειών για τους μηχανισμούς που διαμεσολαβούν την επίδρασή της στη διάρκεια ζωής αποτελεί μία δύσκολη αποστολή. Επιγραμματικά αναφέρονται ως υποψήφιοι ο έλεγχος του ρυθμού της πρωτεϊνοσύνθεσης, η ρύθμιση της αυτοφαγίας, η βελτίωση της απόκρισης στο στρες, ο έλεγχος της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, η ρύθμιση των επιπέδων της φλεγμονής και η διατήρηση των βλαστοκυττάρων [113].

A.1.2.3. Σιρτουΐνες

Οι σιρτουΐνες συγκροτούν μια οικογένεια ενζύμων, η δράση των οποίων εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD^+) και καταλύουν τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών, με πρωτεύουσα τροποποίηση την αποακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης [114]. Αναγνωρίζουν σαν υπόστρωμα μια ποικιλία πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων είναι και οι ιστόνες. Οφείλουν το όνομά τους στην ομολογία τους με την πρωτεΐνη της ζύμης SIR2 (**Silent Information Regulator 2**), η υπερέκφραση της οποίας έχει βρεθεί να διπλασιάζει την αντιγραφική διάρκεια ζωής του ζυμομύκητα (replicative lifespan, ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων που δύναται να κάνει ένα κύτταρο) [115]. Την ανακάλυψη αυτή ακολούθησαν μελέτες στο νηματώδη και τη μύγα που υπέδειξαν ότι αυξημένη έκφραση των ορθόλογων στους οργανισμούς αυτούς γονιδίων (*sir-2.1* και *dSir2* αντίστοιχα) οδηγεί επίσης σε αύξηση της διάρκειας ζωής [116, 117]. Τα αποτελέσματα αυτά όμως τέθηκαν υπό αμφισβήτηση από μεταγενέστερα ευρήματα που απέδωσαν την παρατηρούμενη μακροβιότητα στους δύο αυτούς οργανισμούς κυρίως σε διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν και όχι στην υπερέκφραση της σιρτουΐνης [118]. Παρόλα αυτά η υπερέκφραση του γονιδίου *sir-2.1* φαίνεται τελικά να προωθεί σε κάποιο βαθμό, έστω και μικρό, τη μακροβιότητα του νηματώδους, ιδιαίτερα σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών ασθενειών [119].

Όσον αφορά στις σιρτουΐνες των θηλαστικών, η δράση κάποιων εκ των επτά παράλογων γονιδίων σιρτουϊνών που διαθέτουν, έχει συσχετιστεί με την πρόληψη διαφόρων χαρακτηριστικών της γήρανσης [114, 120]. Η ολική υπερέκφραση της SIRT1, που εμφανίζει τη μεγαλύτερη ομολογία με την Sir2 των κατώτερων οργανισμών, έχει βρεθεί να βελτιώνει πολλές πλευρές της υγείας κατά τη γήρανση, ενώ η υπερέκφρασή της μόνο στον εγκέφαλο του ποντικού οδηγεί στην αύξηση της διάρκειας ζωής [121, 122]. Αντίστοιχα, ανεπάρκεια ή υπερέκφραση της SIRT6 επιταχύνει ή καθυστερεί αντίστοιχα τη γήρανση διαγονιδιακών

ποντικών, ενώ η μιτοχονδριακή SIRT3 φαίνεται να διαμεσολαβεί κάποια από τα ευεργετικά αποτελέσματα του διαιτητικού περιορισμού στον οργανισμό (βλ. παρακάτω), μέσω της αποακετυλίωσης μιτοχονδριακών πρωτεϊνών [22, 23, 123]. Λόγω της λειτουργίας των σιρτουϊνών ως αποακετυλάσες ιστονών, η μείωση της γονιδιωματικής αστάθειας κατέχει δεσπόζουσα θέση μεταξύ των πιθανών μηχανισμών που διαμεσολαβούν τη σχέση τους με τη μακροβιότητα [124, 125]. Εντούτοις, η δράση τους έχει βρεθεί ότι επηρεάζει και άλλες λειτουργίες που πιθανώς να συμβάλουν στον καθορισμό της διάρκειας της ζωής, όπως τη ρύθμιση του μεταβολισμού από την SIRT1 και την SIRT3, η σηματοδότηση του NF-κΒ και η ομοιόσταση της γλυκόζης από την SIRT6 και η βελτίωση του αναγεννητικού δυναμικού των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων από την SIRT3 [126-129].

Δεδομένου ότι η αύξηση της ηλικίας έχει βρεθεί να συνοδεύεται από μία χαρακτηριστική πτώση των επιπέδων NAD⁺ στον οργανισμό, η οποία πιθανώς να αποτελεί και μία από τις βασικές αιτίες της γήρανσης, οι σιρτουϊνες έχουν αποτελέσει ένα δημοφιλή στόχο για την ανάπτυξη φαρμακολογικών παρεμβάσεων που αποσκοπούν στην καθυστέρηση του γήρατος [130]. Ιδιαίτερα διαδεδομένη στρατηγική αποτελεί η χρήση ενεργοποιητών των σιρτουϊνών (π.χ. ρεσβερατρόλη) η οποία έχει αποδώσει κάποια αποτελέσματα σε οργανισμούς μοντέλα [131, 132], ενώ πολλά υποσχόμενη φαίνεται και η απευθείας αύξηση των επιπέδων του NAD⁺ μέσω της χορήγησης πρόδρομων ουσιών (π.χ. νικοτιναμιδο-μονονουκλεοτίδιο – NMN), η οποία έχει βρεθεί να αντιστρέφει φαινότυπους της γήρανσης σε ποντίκια μέσω της δράσης της SIRT1 [133].

A.1.2.4. Η κινάση AMPK

Η ενεργοποιούμενη από AMP κινάση AMPK (AMP-activated protein kinase) αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή της ενεργειακής ομοιόστασης των κυττάρων, καθώς συντονίζει τη δράση διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών ως απόκριση στις αλλαγές της αναλογίας AMP:ATP, ενός βασικού κυτταρικού δείκτη διαθεσιμότητας ενέργειας. Η ενεργοποίησή της έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση καταβολικών διαδικασιών που παράγουν ATP και την καταστολή αναβολικών διαδικασιών που καταναλώνουν ATP, είτε άμεσα μέσω της απευθείας φωσφορυλίωσης συστατικών των υπεύθυνων μονοπατιών, είτε έμμεσα μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης [134]. Η υπερέκφραση της AMPK στο νηματώδη οδηγεί σε αύξηση της διάρκειας της ζωής, ενώ η ενεργοποίησή της στους νευρώνες ή στο έντερο της μύγας έχει βρεθεί να καθυστερεί τη γήρανση όλου του οργανισμού [96, 135]. Επιπλέον, η φαρμακολογική ενεργοποίησή της μέσω της χορήγησης φενφορμίνης ή μετφορμίνης αυξάνει τη διάρκεια ζωής του νηματώδη, αλλά και του ποντικού [136-138], ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι η μετφορμίνη, που αποτελεί ένα δημοφιλές αντιδιαβητικό φάρμακο, πιθανώς να προωθεί τη μακροβιότητα και σε ανθρώπους [139].

A.1.2.5. Διαιτητικός Περιορισμός

Ως διαιτητικός περιορισμός (Dietary Restriction – DR) ορίζεται η μείωση της πρόσληψης ενός ή περισσότερων συστατικών της τροφής από έναν οργανισμό, χωρίς όμως την πρόκληση υποσιτισμού. Η πιο διαδεδομένη παραλλαγή του αφορά στην μείωση της ποσότητας των θερμίδων που προσλαμβάνονται από τον οργανισμό, χωρίς την έλλειψη βασικών θρεπτικών συστατικών, γνωστή με τον όρο θερμιδικός περιορισμός (Caloric Restriction – CR). Ο θερμιδικός περιορισμός αποτελεί την πλέον καθιερωμένη και

αξιόπιστη παρέμβαση που οδηγεί στην καθυστέρηση της γήρανσης. Αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1935 ως αποτέλεσμα πειραμάτων σε αρουραίους και από τότε έχει επιβεβαιωθεί ότι ισχύει σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, από τη ζύμη έως τα πρωτεύοντα θηλαστικά [140, 141]. Μερικές άλλες μορφές διαιτητικού περιορισμού που έχουν βρεθεί να καθυστερούν τη γήρανση αφορούν σε παραλλαγές στρατηγικών διαλείπουσας νηστείας, στη μειωμένη πρόσληψη πρωτεϊνών ή κάποιων αμινοξέων, χωρίς μείωση των συνολικών θερμίδων και στον περιορισμό του ημερήσιου χρόνου σίτισης [142].

Η επίδραση του διαιτητικού περιορισμού στον οργανισμό, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η καθυστέρηση της γήρανσης φαίνεται να είναι πολυσχιδής καθώς η εφαρμογή του σε οργανισμούς μοντέλα έχει βρεθεί να αυξάνει τη δυνατότητα των κυττάρων να επιδιορθώσουν βλάβες στο DNA, να καθυστερεί την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος με την ηλικία και να μειώνει την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, ενώ έχει συσχετιστεί και με βελτιωμένη αποδοτικότητα του μεταβολισμού της γλυκόζης και αλλαγές στο ενδοκρινικό σύστημα σε ανθρώπους [143-147]. Παρά όμως την καλά εμπεριστατωμένη επίδρασή του στη διάρκεια ζωής, οι μοριακοί μηχανισμοί που διαμεσολαβούν τη δράση του διαιτητικού περιορισμού δεν είναι ξεκάθαροι. Η δυσκολία στην αποκάλυψή τους πιθανώς να πηγάζει από τις διαφορές στα πρωτόκολλα και τις στρατηγικές που εφαρμόζονται μεταξύ των διαφόρων μοντέλων, με αποτέλεσμα την εξαγωγή συχνά αντιφατικών συμπερασμάτων. Σε κάθε περίπτωση, βασικοί υποψήφιοι είναι οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην αντίληψη της διαθεσιμότητας θρεπτικών και της ενεργειακής κατάστασης και την απόκριση σε αυτή, με κυριότερους το μονοπάτι της ινσουλίνης και του IGF-1, το μονοπάτι της TOR, την κινάση AMPK και τις εξαρτώμενες από NAD^+ σιρτουΐνες [35].

A.1.2.6. Μιτοχόνδρια και ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS)

Η δράση των μιτοχονδρίων είναι στενά συνδεδεμένη με την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), λόγω της φύσεως των μεταβολικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε αυτά, ενώ η παρακμή της λειτουργίας τους με το πέρασμα της ηλικίας, που συνοδεύεται από αύξηση της παραγωγής ROS, αποτελεί ένα καλά εμπεριστατωμένο φαινόμενο και θεωρείται ως ένας από τους βασικούς παράγοντες που συμβάλουν στην εμφάνιση του γήρατος. Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχει συσχετιστεί με μια ευρεία γκάμα διαδικασιών που σχετίζονται με τη γήρανση και με ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες, όπως η φλεγμονή, η εξάντληση των βλαστοκυττάρων, η κυτταρική γήρανση κ.α. [38]. Αν και η δράση των ROS θεωρούταν για χρόνια καταστροφική για τα κύτταρα, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το μιτοχονδριακό στρες και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου επάγουν τη δράση προστατευτικών μηχανισμών οδηγώντας σε μία ευεργετική για τα κύτταρα απόκριση (βλ. χαρακτηριστικά της γήρανσης). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την παρατήρηση ότι χορήγηση μικρών δόσεων rapamut, το οποίο προκαλεί την παραγωγή υπεροξειδίου, επαρκεί για να προκαλέσει την αύξηση της διάρκειας ζωής του νηματώδους [41]. Η εκτεταμένη όμως παραγωγή ROS και κατ' επέκταση το εκτεταμένο μιτοχονδριακό στρες, αποβαίνει τελικώς καταστροφική για τον οργανισμό [43].

Δεδομένα από διάφορους οργανισμούς μοντέλα συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η μείωση των επιπέδων της αναπνοής στα μιτοχόνδρια, κυρίως μέσω γενετικών τροποποιήσεων που επηρεάζουν τη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής [148]. Δημοφιλέστεροι μεταξύ των

μηχανισμών που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη σχέση αυτή είναι η γενική παθητική μείωση του μεταβολισμού λόγω της μειωμένης αναπνοής, η επαγωγή κυτταρικών αποκρίσεων λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS και η σηματοδότηση από τα μιτοχόνδρια προς τον πυρήνα, με αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων [148]. Σε μοριακό επίπεδο, σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος φαίνεται να διαδραματίζουν η κινάση AMPK, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1, η πρωτεΐνη ομοιοακολουθίας CEN-23 και η απόκριση σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου [65, 149-151]. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα συμβάλει αποφασιστικά στην προσπάθεια σχεδιασμού παρεμβάσεων που αποσκοπούν στην καλύτερη λειτουργία των μιτοχονδρίων με το πέρασμα της ηλικίας, προκειμένου να καταπολεμηθεί η γήρανση. Προς το παρόν οι σχετικές απόπειρες εστιάζουν στην ανάπτυξη φαρμακολογικών παρεμβάσεων και μικρών μορίων που επάγουν τη βιογένεση των μιτοχονδρίων ή τη μιτοφαγία καθώς και στην ανάπτυξη μεθόδων αύξησης των επιπέδων NAD^+ , που φαίνεται να αποκαθιστά τη λειτουργία γερασμένων μιτοχονδρίων [133, 152, 153].

A.1.2.7. Τελομερή

Λόγω της παρατηρούμενης μείωσης του μήκους των τελομερών με την ηλικία, η οποία αποτελεί και μία από τις βασικές αιτίες εμφάνισης της κυτταρικής γήρανσης (βλ. χαρακτηριστικά της γήρανσης), η ενεργοποίηση της τελομεράσης έχει αποτελέσει ένα δελεαστικό στόχο για θεραπείες που αποσκοπούν στην καταπολέμηση της γήρανσης. Πράγματι, γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που εκφράζουν τελομεράση αργούν να εμφανίσουν συμπτώματα της γήρανσης, ενώ η ενεργοποίηση της τελομεράσης σε μεγάλη ηλικία μπορεί να αναστρέψει βασικά χαρακτηριστικά της γήρανσης [15, 154]. Βασική παρενέργεια όμως της παρουσίας ενεργής τελομεράσης είναι η αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης όγκων, κάτι που απαιτεί επιπλέον γενετικές τροποποιήσεις προκειμένου να αποτραπεί η εμφάνισή τους [14]. Επιπλέον, δεδομένα από το νηματώδη δείχνουν ότι το μήκος των τελομερών δεν επηρεάζει τη διαδικασία της γήρανσης σε τελικώς διαφοροποιημένα, μετα-μιτωτικά κύτταρα, όπως αυτά του *C. elegans* [155]. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι η προκαλούμενη σε άλλους οργανισμούς μακροβιότητα μέσω της έκφρασης της τελομεράσης σχετίζεται κυρίως με τη διατήρηση της δυνατότητας πραγματοποίησης κυτταρικών διαιρέσεων, που πιθανώς αυξάνει το αναπαραγωγικό δυναμικό των βλαστοκυττάρων και όχι με αλλαγές στη λειτουργία του οργανισμού, που μετατοπίζουν τη φυσιολογία σε μία κατάσταση προστασίας και συντήρησης.

A.1.2.8. Σηματοδότηση από το αναπαραγωγικό σύστημα

Σύμφωνα με τη θεωρία του φθαρτού σώματος, οι οργανισμοί παραμελούν τη συντήρηση των κυττάρων τους προκειμένου να εξοικονομήσουν ενέργεια και να τη διαθέσουν στην αναπαραγωγή. Παρόλο που η σχέση αυτή μεταξύ αναπαραγωγής και μακροβιότητας δεν είναι απόλυτη, υπάρχουν πράγματι ενδείξεις ότι το αναπαραγωγικό σύστημα είναι ικανό να επηρεάσει σε κάποιο βαθμό το ρυθμό της γήρανσης. Η καλύτερα μελετημένη περίπτωση ρύθμισης της διάρκειας ζωής από το αναπαραγωγικό σύστημα του οργανισμού είναι αυτή του νηματώδους *C. elegans*, όπου η απομάκρυνση της γαμετικής σειράς των κυττάρων οδηγεί σε αύξηση της διάρκειας ζωής. Αντίθετα η απομάκρυνση ολόκληρου του αναπαραγωγικού του συστήματος δεν έχει καμία επίδραση στο ρυθμό

γήρανσης, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός ενεργού μηχανισμού σηματοδότησης από τα σωματικά κύτταρα της γονάδας που ρυθμίζει τη μακροβιότητα [156]. Η ύπαρξη μίας αντίστοιχης σχέσης μεταξύ αναπαραγωγής και γήρανσης στη μύγα υποδηλώνει ότι ο εν λόγω μηχανισμός ρύθμισης είναι εξελικτικά συντηρημένος και πιθανώς αποσκοπεί στο συντονισμό των δύο, προκειμένου η φθορά της γήρανσης να εμφανιστεί μετά το πέρας της αναπαραγωγής [157]. Επιπλέον παραδείγματα υπάρχουν και από μελέτες σε θηλαστικά, όπως η παρατήρηση ότι η μεταμόσχευση ωοθηκών νεαρών ποντικών σε γερασμένα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής των δεκτών [158].

A.1.2.9. Πρωτεϊνοσύνθεση και πρωτεόσταση

Η πρωτεϊνοσύνθεση αποτελεί μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα, η οποία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε όλες τις βιολογικές διεργασίες. Πληθώρα μελετών έχει αναδείξει μια εξελικτικά συντηρημένη σχέση μεταξύ της πρωτεϊνοσύνθεσης και της γήρανσης, καθώς γενετικές παρεμβάσεις που στοχεύουν σε βασικά συστατικά της μεταφραστικής μηχανής, όπως οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης ή οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες και οδηγούν στην πτώση των ολικών επιπέδων παραγωγής νέων πρωτεϊνών, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής και της ανθεκτικότητας στο στρες, σε μία ευρεία ποικιλία οργανισμών μοντέλων [159, 160]. Επιπλέον πολλά συστατικά της μεταφραστικής μηχανής αποτελούν στόχους μονοπατιών που ενσωματώνουν περιβαλλοντικά ερεθίσματα προκειμένου να ρυθμίσουν τη λειτουργία του οργανισμού και κατ' επέκταση τη μακροβιότητα, όπως αυτά της ινσουλίνης και του IGF-1 και της κινάσης TOR, παρέχοντας παράλληλα μία σύνδεση μεταξύ των περιβαλλοντικών συνθηκών και της λειτουργίας της πρωτεϊνοσύνθεσης [161-163]. Πράγματι, τα ολικά επίπεδα της πρωτεϊνοσύνθεσης έχουν βρεθεί να μειώνονται ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως η έλλειψη θρεπτικών και το στρες, μία απόκριση που πιθανώς αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης των κυττάρων και των οργανισμών κάτω από μη ευνοϊκές συνθήκες, χάρη στην επακόλουθη εξοικονόμηση ενέργειας και την προώθηση της παραγωγής συγκεκριμένων πρωτεϊνών ανθεκτικότητας στο στρες, ενώ ένας αντίστοιχος μηχανισμός φαίνεται να συμβάλει και στη μεταβολική ευεξία και τη μακροβιότητα που προκαλείται από το διαιτητικό περιορισμό [164, 165].

Από την άλλη πλευρά, η γήρανση συνοδεύεται από μια χαρακτηριστική πτώση των επιπέδων της πρωτεϊνοσύνθεσης, ένα φαινόμενο που εμφανίζεται συντηρημένο κατά την εξέλιξη, καθώς τόσο η ενεργότητα βασικών μεταφραστικών παραγόντων, όσο και ο αριθμός των ριβοσωμάτων και των πολυσωμάτων, έχουν βρεθεί να φθίνουν με το πέρας της ηλικίας σε πολλούς οργανισμούς μοντέλα [166-170]. Παρόλα αυτά, η φυσιολογική σημασία της ελαττωμένης παραγωγής πρωτεϊνών κατά τη γήρανση δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί αν πρόκειται για μία αιτία που συμβάλει στην εμφάνιση ηλικιοεξαρτώμενων φαινοτύπων ή για μία προσαρμογή/απόκριση των κυττάρων σε άλλες αλλαγές που προκύπτουν με το πέρας της ηλικίας, όπως π.χ. η μείωση της παραγωγής ενέργειας και η αύξηση των ενεργών ριζών οξυγόνου (και κατ' επέκταση του οξειδωτικού στρες) λόγω της παρακμής της λειτουργίας των μιτοχονδρίων.

Πρόσφατα δεδομένα από το νηματώδη *C. elegans* υποδεικνύουν ότι πέρα από τη μειωμένη λειτουργία της μεταφραστικής μηχανής, κατά τη γήρανση φαίνεται να φθίνουν και οι μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μια προοδευτική και ηλικιοεξαρτώμενη απώλεια της ισορροπίας του πρωτεόματος των κυττάρων, με κάποιες πρωτεΐνες να υπερ- και άλλες να υποεκπροσωπούνται [171, 172]. Η εκτεταμένη αυτή αποδιοργάνωση του πρωτεόματος φαίνεται να συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην απώλεια της πρωτεόστασης των κυττάρων και στη συσσώρευση αδιάλυτων πρωτεϊνικών συμπλόκων που παρατηρείται με την ηλικία, καθώς η υψηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών έχει βρεθεί να προωθεί τη συσσωμάτωσή τους σε αδιάλυτες και συχνά τοξικές για τα κύτταρα δομές, ανεξάρτητα από την εγγενή τους τάση προς συσσωμάτωση [173]. Προκειμένου να διατηρήσουν την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα του πρωτεόματός τους και να αποφύγουν φαινόμενα πρωτεοτοξικότητας, που προκύπτουν από την εκτεταμένη μη αναδίπλωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών, τα κύτταρα διαθέτουν ένα δίκτυο μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου. Σε πρώτο επίπεδο, οι μηχανισμοί αυτοί προωθούν την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και την αποτροπή του σχηματισμού τοξικών συσσωματωμάτων, κυρίως μέσω της δράσης των μοριακών συνοδών του κυτταροπλάσματος και των οργανιδίων [26, 174]. Στο επόμενο επίπεδο, πρωτεΐνες που έχουν υποστεί ανεπανόρθωτες βλάβες ή είναι πλέον περιττές για το κύτταρο αποικοδομούνται μέσω της δράσης δύο μηχανισμών: του συστήματος της ουβικουϊτίνης και του πρωτεασώματος, η αποτελεσματική πρωτεολυτική δράση του οποίου εξαρτάται από την παρουσία ATP, και του μονοπατιού της αυτοφαγίας και του λυσοσώματος, το οποίο διαθέτει την ικανότητα αποικοδόμησης κατεστραμμένων πρωτεϊνών και ολόκληρων οργανιδίων, παρέχοντας προστασία και δομικά συστατικά στα κύτταρα κάτω από συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας ενέργειας και στρες [175, 176]. Η δυνατότητα όμως αυτών των μηχανισμών φαίνεται να εξαντλείται κάτω από ιδιαίτερα απαιτητικές συνθήκες, όπως το στρες, η γήρανση και διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με αποτέλεσμα την εκτενή και συνήθως μη αντιστρεπτή συσσωμάτωση του πρωτεόματος [171, 177]. Μάλιστα, δεδομένα από το νηματώδη υποδεικνύουν ότι η κατάρρευση της πρωτεόστασης αποτελεί ένα γεγονός που ξεκινά από νωρίς στη ζωή, αμέσως μετά το πέρας της ανάπτυξης του οργανισμού και χειροτερεύει προοδευτικά με την ηλικία [178]. Γενετικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν απευθείας συστατικά των προστατευτικών αυτών μηχανισμών και ενισχύουν ή καταστέλλουν τη λειτουργία τους έχουν να βρεθεί να αυξάνουν ή να μειώνουν τη διάρκεια ζωής αντίστοιχα (βλ. χαρακτηριστικά της γήρανσης), ενώ πολλές τροποποιήσεις στη λειτουργία γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στη μακροβιότητα έχουν ως αποτέλεσμα την καλύτερη διατήρηση της πρωτεόστασης κατά τη γήρανση [92, 171, 177].

Η μείωση των επιπέδων της πρωτεϊνοσύνθεσης, που παρατηρείται κατά τη γήρανση και υπό συνθήκες στρες, θα μπορούσε επομένως να αποτελεί μία προστατευτική προσαρμογή των κυττάρων, προκειμένου να ελαφρύνουν το πρωτεϊνικό τους φορτίο και να αποφύγουν την κυτταροτοξική δράση που προκαλείται από τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων και συσσωματωμένων πρωτεϊνών. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την απευθείας σύνδεση που έχει παρατηρηθεί μεταξύ των επιπέδων λειτουργίας της μεταφραστικής μηχανής και της κατάστασης του πρωτεόματος των κυττάρων, μέσω της δράσης της μοριακής συνοδού NAC (**N**ascent polypeptide-**A**ssociated **C**omplex). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η NAC συνδέεται στα ριβοσώματα, όπου προωθεί τη μετάφραση και την αναδίπλωση των

νεοσύστατων πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Όταν όμως η πρωτεόσταση διαταράσσεται, η NAC δεσμεύεται ως μοριακή συνοδός σε πρωτεϊνικά συσσωματώματα, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της παραγωγής νέων πρωτεϊνικών μορίων, ενώ επιπλέον, η μετατόπισή της από τα ριβοσώματα σε πρωτεϊνικά συσσωματώματα παρατηρείται φυσιολογικά κατά τη γήρανση και υπό συνθήκες στρες [179].

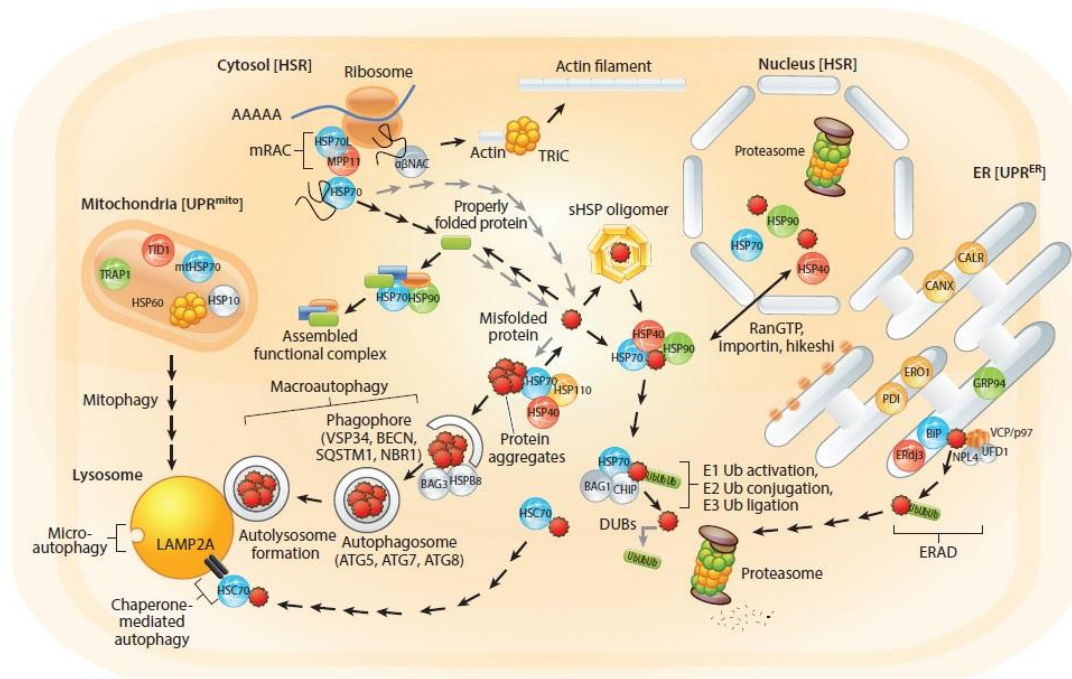
A.2. Η πρωτεόσταση

Η ακεραιότητα του πρωτεόματος διατηρείται από το δίκτυο της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (πρωτεόσταση), ένα πολυδιαμερισματικό σύστημα που συντονίζει την πρωτεϊνική σύνθεση, αναδίπλωση, αποσυσσωμάτωση και αποδόμηση. Παρά τους κοινούς παράγοντες που απαιτούνται για τη σύνθεση και τη συντήρηση των πρωτεϊνών, η έκφραση πολλών συστατικών του δικτύου της πρωτεόστασης προσαρμόζεται στις συγκεκριμένες πρωτεϊνικές απαιτήσεις διαφόρων κυττάρων και ιστών. Επιπλέον, η δραστηριότητα του δικτύου πρωτεόστασης (ΔΠ) μπορεί να μεταβληθεί μόνιμα ή παροδικά με την ανάπτυξη, τη γήρανση, αλλοιώσεις της φυσιολογίας ή έκθεση σε περιβαλλοντικό στρες. Καθώς, λοιπόν, αλλάζει η δραστηριότητα του ΔΠ, τόσο αλλάζει και η ικανότητα των κυττάρων να αντισταθμίσει τη συσσώρευση λανθασμένων και κατεστραμμένων πρωτεϊνών. Επομένως, οι χρονικές και χωρικές διακυμάνσεις στο ΔΠ θα μπορούσαν να έχουν βαθιές συνέπειες για την παρουσίαση και την πρόοδο κάποιας ασθένειας[25].

A.2.1. Το δίκτυο πρωτεόστασης (ΔΠ)

Η πρωτεόσταση επιτυγχάνεται με τη συντονισμένη δράση πολλών πρωτεϊνών. Όπως προαναφέρθηκε, το ΔΠ χαρακτηρίζεται ως ένα πρωτεϊνικό δίκτυο με άμεσο ρόλο στην πρωτεϊνική σύνθεση, αναδίπλωση, αποσυσσωμάτωση ή αποδόμηση. Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει τη μεταφραστική μηχανή, μοριακούς συνοδούς (chaperones), βοηθητικές πρωτεΐνες των τσαπερονών (cochaperones), το σύστημα ουμπικουιτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system-UPS) και το μηχανισμό αυτοφαγίας (Εικόνα A1) [25]. Αν και σημαντικά για την λειτουργία του ΔΠ, μεταγραφικοί παράγοντες, τροποποιητές χρωματίνης, οδοί σηματοδότησης, δομικοί και μεταβολικοί παράγοντες, γενικοί μηχανισμοί εισαγωγής/εξαγωγής και ρυθμιστές των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, θεωρούνται βοηθητικά αλλά δευτερεύοντα στοιχεία του ΔΠ. Ομοίως, τα μονοπάτια απόκρισης στο στρες, όπως η απόκριση στο θερμικό στρες (HSR) [180] και τα μονοπάτια unfolded protein response (UPR) [181], θεωρούνται ζωτικής σημασίας τροποποιητές της σύστασης του ΔΠ, αντί για άμεσους συντελεστές αυτού. Το ΔΠ εκτείνεται σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα και είναι απαραίτητο και αναπόσπαστο για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την υγεία των οργανισμών [25]. Εντός του κυττάρου, υπάρχουν υποδικτυακά διαμερίσματα του ΔΠ που είναι μοναδικά προσαρμοσμένα τόσο στις συγκεκριμένες βιοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες του πρωτεόματος που συναντούν όσο και στα κυτταρικά περιβάλλοντα στα οποία βρίσκονται [182]. Είναι σημαντικό ότι αυτά τα

υποδίκτυα συνεργάζονται ουσιαστικά για την παρακολούθηση και διατήρηση της πρωτεόστασης σε ολόκληρο το κύτταρο[182].

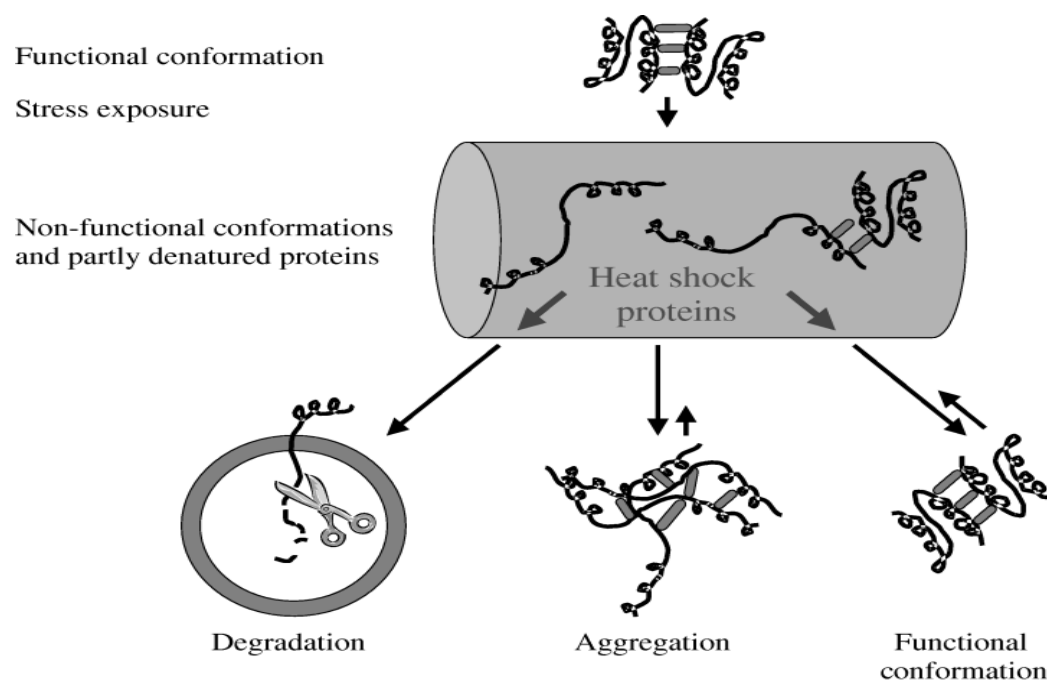


Εικόνα A4 | Επισκόπηση του Δικτύου Πρωτεόστασης (ΔΠ) . Το ανθρώπινο ΔΠ πρέπει να εξασφαλίζει τη σταθερότητα των πρωτεϊνών σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα . Μοριακοί συνοδοί των HSP70 (μπλε σφαίρες), HSP40/DNAJ (κόκκινες σφαίρες) και οικογένειες HSP90(πράσινες σφαίρες) βρίσκονται σε όλα τα βασικά κυτταρικά διαμερίσματα και συνεργάζονται με cochaperones (γκρίζες σφαίρες) για την προώθηση της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων, την συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων, την αναδίπλωση των μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (οδοντωτές κόκκινες σφαίρες) ή την αποδόμηση των τελικώς μη ορθώς αναδιπλωμένων υποστρωμάτων από το πρωτεάσωμα. Τα ομοολιγομερή των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (sHSPs) δεσμεύουν τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και τις διατηρούν σε καταστάσεις κατάλληλες για το μηχανισμό των HSP70. Εάν η αναδίπλωση δεν είναι επιτυχής, η συνεργασία με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων Bcl2-associated athanogene 1 (BAG1) και της E3 ubiquitin ligase C terminus of HSC70-interacting protein (CHIP), μπορεί να κατευθύνει τα υποστρώματα στο πρωτεάσωμα. Η οικογένεια των HSP60 τσαπερονών είναι βασική για την μιτοχονδριακή πρωτεόσταση (σε συνδυασμό με το «καπάκι» της cochaperone HSP10) και για την αναδίπλωση κυτταροσκελετικών συστατικών μέσω του συμπλόκου δακτυλίου TCP-1 (TRiC). Ορισμένες τσαπερόνες ή cochaperones εκτελούν διαμερισματο-εξειδικευμένες λειτουργίες (πορτοκαλί σφαίρες). Για παράδειγμα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), η πρωτεΐνη δισουλφιδική ισομεράση (PD1) και η ER οξειδορεδοουκτίνη 1 (EPO1) συνεργάζονται για την προώθηση του σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού, ενώ η καλνεξίνη (CANX) και η καλρετικουλίνη (CALR) δημιουργεί ασβεστιο-εξαρτώμενη αναδίπλωση των υποστρωμάτων. Κατά την εσφαλμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών συγκεκριμένοι οδοί απόκρισης στο στρες, όπως η απόκριση στο θερμικό στρες (HSR) και το unfolded protein response του ενδοπλασματικού δικτύου (UPRER) και του μιτοχονδρίου (UPRmito), μπορούν να ενισχύσουν τα επίπεδα των τσαπερονών. Επίσης, οι λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα, που μπορεί να είναι επιβλαβή για τα κύτταρα. Το HSP110 συνεργάζεται με το HSP70/HSP40 για να λειτουργήσει ως σύμπλοκο αποσυσσωμάτωσης. Εναλλακτικά, μεγάλα συσσωματώματα μπορούν να αποικοδομηθούν από το λυσοσώμα μέσω αυτοφαγίας. Μία τροποποίηση αυτού του μονοπατιού (μιτοφαγία) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση παλαιών ή κατεστραμμένων μιτοχονδρίων. Τα γκρι βέλη υποδεικνύουν μονοπάτια που θα πρέπει να εμφανίζονται μόνο σε χαμηλά επίπεδα στα υγιή κύτταρα.

A.2.1.1. Μοριακοί συνοδοί (Molecular chaperones)

Οι μοριακοί συνοδοί είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών που λειτουργούν στην ελαχιστοποίηση των προβλημάτων που προκύπτουν όταν άλλες πρωτεΐνες βρίσκονται σε μη φυσιολογικές διαμορφώσεις. Τα τσαπερόνια είναι υπεύθυνα για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, τη συναρμολόγηση, τη μετατόπιση και την αποδόμηση σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Ακόμα σταθεροποιούν πρωτεΐνες και μεμβράνες και μπορούν να βοηθήσουν στην πρωτεϊνικά επαναδίπλωση κάτω από στρεσογόνες καταστάσεις (Εικόνα A5).

Οι HSPs λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί, δηλαδή αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες και έτσι ελαχιστοποιούν την πιθανότητα οι πρωτεΐνες αυτές να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους με τρόπο “ανάρμοστο”. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αναγνωρίζουν και συνδέονται με πρωτεΐνες που δεν έχουν φυσιολογική διαμόρφωση, είτε εξαιτίας πρωτεϊνικής μετουσίωσης λόγω στρες, είτε επειδή τα πεπτίδια από τα οποία αποτελούνται δεν έχουν πλήρως συντεθεί. Επίσης λειτουργούν ως συνοδοί για την τοποθέτηση των πρωτεϊνών στο κατάλληλο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Τυπικά, σχηματίζουν ολιγομερή, τα οποία διατηρούν τις πρωτεΐνες πελάτες σε κατάσταση δεκτική για αναδίπλωση αποτρέποντας το σχηματισμό λανθασμένης τριτοταγούς δομής. Ταυτόχρονα, ελαχιστοποιούν την συσσώρευση των πρωτεϊνών που διαθέτουν μη φυσιολογικές διαμορφώσεις, εξαιτίας λανθασμένης αναδίπλωσης, μέσω αποδόμησης και αποβολής από το κύτταρο [183].



Εικόνα A5 | Η κυτταρική λειτουργία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Η κυτταρική λειτουργία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Η μοίρα των πρωτεϊνών με μη λειτουργικές διαμορφώσεις μετά από την έκθεση στο στρες μπορεί να είναι είτε η εκ νέου απόκτηση της λειτουργικής της διαμόρφωσης, είτε η δημιουργία συσσωματωμάτων με άλλες μη ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, είτε η αποδόμησή τους. Οι Hsps παίζουν βοηθητικό ρόλο στη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση των περισσότερο λειτουργικών πρωτεϊνών ή προς την αποδόμηση των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη.

Πέντε σημαντικές οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ δρουν ως τσαπερόνες:

Οι Hsp70 (DnaK), οι τσαπερονίνες (GroEL και Hsp60), οι Hsp90, οι Hsp100 (Clp) και η οικογένεια των smallHsp (sHsp). Εκτός από τις παραπάνω υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες με λειτουργία τσαπερόνης, όπως οι ισομεράσες δισουλφιδίου και οι καλεξίνες/καλρετικουλίνες, οι οποίες υποβοηθούν στην πρωτεϊνική αναδίπλωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Εκτενώς έχουν μελετηθεί οι παρακάτω τύποι μοριακών συνοδών:

Το σύστημα HSP70, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες HSP70 και HSP40 ή από τις HSP70 και τις GrpE (στο *E.coli*) ή HSP110 (στους ευκαρυώτες). Στην πρώτη περίπτωση, η HSP40 φαίνεται να αποτελεί το αρχικό υπόστρωμα της HSP70 διεγείροντας την ATPάση της HSP70. Για πορείες που περιλαμβάνουν μη ειδική δίπλωση και αναδίπλωση πρωτεϊνών, η HSP40 είναι ένα επίμηκες σχήματος V διμερές που με την χαρακτηριστική δομή έλικας J, που ενεργοποιεί την ATPάση της HSP70 με σύνδεση στην εσωτερική περιοχή σύνδεσης 23,24. Στην δεύτερη περίπτωση, οι GrpE ή HSP110, αλληλεπιδρούν κοντά στην είσοδο της νουκλεοτιδικής σχισμής της HSP70 για τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP και τη δέσμευση των υδρόφοβων τμημάτων των αδίπλωτων πολυπεπτιδικών αλυσίδων [184-186].

Το σύστημα τσαπερονίνης που αποτελείται από 14 υπομονάδες της GroEL και 7 υπομονάδες της GroES. Οι GroEL αντιστοιχούν στις HSP60 και οι GroES στις HSP10. Για τη λειτουργία αυτού του συμπλόκου απαιτείται ATP. Η GroEL, αποτελεί μία κυλινδρική δομή με ένα κεντρικό κανάλι στο οποίο δεσμεύονται νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια, και η GroES κλείνει το ένα άκρο του κυλίνδρου της GroEL έχοντας ένα σχήμα “τρούλου”. Έτσι, το σύμπλοκο GroEL-GroES δεσμεύει και απελευθερώνει νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια σε ένα κύκλο που εξαρτάται από το ATP.

Το σύστημα HSP90-HSP70, το οποίο προωθεί την πρωτεϊνική δίπλωση και αναδίπλωση στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η HSP70 λειτουργεί κατά την βασική αναδίπλωση πολυπεπτιδίων με λανθασμένη λειτουργική δίπλωση, καθώς εξέρχονται από το ριβόσωμα. Στη συνέχεια τα πολυπεπτίδια αυτά μεταφέρονται στην HSP90, η οποία διευκολύνει τα επόμενα στάδια αναδίπλωσης των πολυπεπτιδίων ή διατηρεί τις πρωτεΐνες στόχους σε κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση, έως ότου να σταθεροποιηθούν μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα στοιχεία του μονοπατιού (client proteins) [187, 188].

A.2.1.2. Οι οδοί απόκρισης στο στρες αλλάζουν τη σύσταση του ΔΠ

Η σύσταση του ΔΠ χαρακτηρίζεται από υψηλή δυναμική; τα επίπεδα των μοριακών συνοδών, των cochaperones και των πρωτεασωμικών υπομονάδων μπορούν να αυξηθούν σε συγκεκριμένα διαμερίσματα του κυττάρου ή σε ολόκληρο το κύτταρο, ώστε να προσδώσουν επιπλέον προστασία ενάντια στην επιβλαβή και χρόνια λανθασμένη

πρωτεϊνική αναδίπλωση στο κύτταρο [25]. Η πλαστικότητα του ΔΠ παρέχεται με ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, με ευαισθησία στο στρες, οι οποίοι έχουν συγκεκριμένους και συμπληρωματικούς μεταγραφικούς στόχους. Μολονότι ένας αριθμός οδών απόκρισης στο στρες μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την πρωτεόσταση, τη γήρανση και την πορεία ορισμένων ασθενειών, οι σημαντικότερες από αυτές τις οδούς είναι τρεις. Η απόκριση στο θερμικό στρες (Heat Shock Response-HSR), η οποία ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες θερμικού στρες (Heat Shock Factors-HSFs) και ενισχύει τον κυτταροπλασματικό/πυρηνικό βραχίονα του ΔΠ [180], το unfolded protein response του ενδοπλασματικού δικτύου (UPR^{ER}) και το unfolded protein response των μιτοχονδρίων (UPR^{mt}). Οι δύο τελευταίες οδοί, ανταποκρίνονται στην εσφαλμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών μέσω των μεταγραφικών παραγόντων XBP1, ATF6, ATF4 στο UPR^{ER} και μέσω του ATFS1 στο UPR^{mt} [180, 181, 189].

A.2.1.3. The mitochondrial Unfolded Protein Response(UPR^{mt})

Η παρουσία μιας ξεχωριστής παλινδρομικής απόκρισης, που ονομάζεται μιτοχονδριακό στρες ή unfolded protein response (UPR^{mt}), προτάθηκε από την επαγωγή πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών τσαπερονών και πρωτεασών κατά τη διάρκεια του μιτοχονδριακού στρες, που προκαλείται από τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων ή λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών εντός της μιτοχονδριακής μήτρας [190, 191].

Μια παρόμοια απόκριση αργότερα τεκμηριώθηκε στο *C.elegans*, η οποία επίσης ενεργοποιήθηκε από διάφορες καταστάσεις που προκαλούν μιτοχονδριακό στρες, συμπεριλαμβανομένης της εξάντλησης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος [192], των γονιδίων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) [65], της εξάντλησης των μιτοχονδριακών πρωτεασών [193], και των αντιδραστηρίων που δημιουργούν υψηλά επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) [194]. Η φυσιολογική σημασία του UPR^{mt} αποδεικνύεται, καθώς οι σκώληκες που στερούνται UPR^{mt} σηματοδοτικών συστατικών, έχουν μειωμένη ανάπτυξη και επιβίωση κατά τη διάρκεια καταστάσεων που διαταράσσουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία [193, 194].

Πρόσφατα πειράματα μικροσυστοιχίας έδειξαν ένα πολύ ευρύτερο πεδίο μεταγραφής κατά το UPR^{mt}, επιπλέον των γνωστών πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών μοριακών συνοδών και πρωτεασών, που προάγουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών ή την αποδόμηση των ελαττωματικών πρωτεϊνών μέσα στα καταπονημένα μιτοχόνδρια [195]. Επιπρόσθετα, το UPR^{mt} περιλαμβάνει μηχανισμούς καθαρισμού των ROS, γονίδια μιτοχονδριακής σχάσης, γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση ουμπικινόνης, στη βιογένεση συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου, καθώς και στη γλυκόλυση [193]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι εκτός από την προώθηση της ομοιόστασης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, το UPR^{mt} επίσης προσαρμόζει το μεταβολισμό για να επιτρέψει στο κύτταρο να αντέξει καλύτερα το μιτοχονδριακό στρες.

A.2.1.3.1. Το μονοπάτι ATFS-1

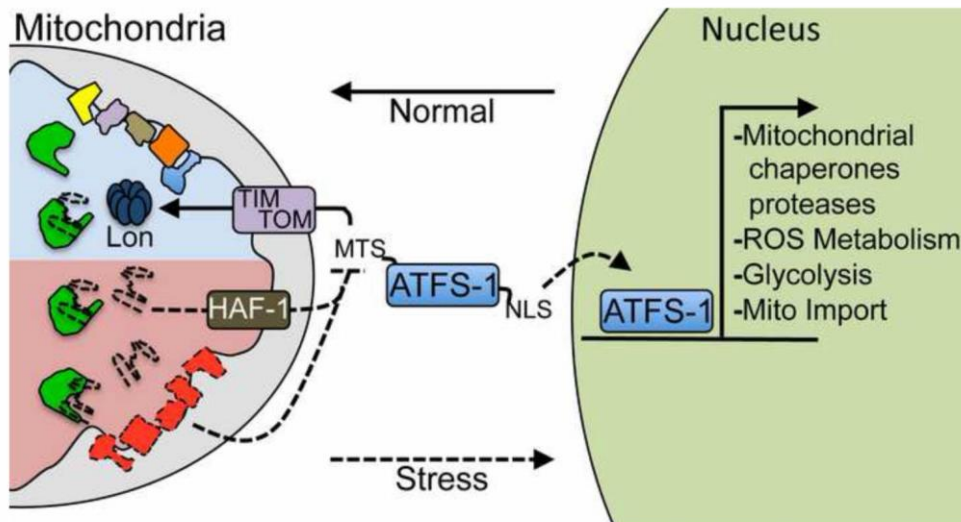
Τουλάχιστον δύο ξεχωριστά μονοπάτια έχουν προταθεί να συνδέουν το μιτοχονδριακό στρες με την πρωτεοστατική απόκριση στους νηματώδεις: η απόκριση

εξαρτώμενη από τον bZip μεταγραφικό παράγοντα ATFS-1 (γνωστός και με το όνομα του γονιδίου του ZC376.7)[194], και το μονοπάτι που εμπλέκεται η κινάση GCN-2 [196].

Ο ATFS-1 εμπεριέχει ένα πυρηνικό σινιάλο τοποθέτησης, άλλα επίσης, και σήματα εξόδου από τον πυρήνα και μιτοχονδριακής τοποθέτησης. Ως επακόλουθο, φυσιολογικά μπορεί να εξαχθεί από τον πυρήνα και να εισαχθεί εντός των μιτοχονδρίων, όπου και αποδομείται από την πρωτεάση Lon [193]. Όταν η εισαγωγή του ATFS-1 στα μιτοχόνδρια αποτρέπει από το μιτοχονδριακό στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας εισέρχεται στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει το μιτοχονδριακό UPR. Η μεταγραφική επαγωγή των UPR^{mt} γονιδίων από τον ATFS-1 εξαρτάται από την ουμπικουιτίνη-όμοια πρωτεΐνη UBL-5 και την ομοιοδομική πρωτεΐνη DVE-1: πιο συγκεκριμένα, το μιτοχονδριακό στρες αυξάνει την έκφραση του UBL-1 και προωθεί την πυρηνική μετατόπιση, όπου διμερίζεται με την DVE-1 [197, 198]. Όταν ο ATFS-1 και το διμερές UBL-DVE βρίσκονται στον πυρήνα επάγουν την έκφραση των μοριακών συνοδών, αλλά άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών δεν έχει περιγραφεί μέχρι τώρα.

Η μιτοχονδριακή τοποθέτηση του ATFS-1 σε φυσιολογικές συνθήκες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι οποίοι, συγκλίνουν στην μιτοχονδριακή μηχανή εισαγωγής. Η μείωση της αποτελεσματικής εισαγωγής του συμπλόκου TIM23 στον *C.elegans* και στα ανθρώπινα κύτταρα, με RNAi είτε της TIM17 είτε της TIM23, ενεργοποιούν το UPR^{mt} με μη εξαρτώμενο τρόπο [193, 199]. Η μιτοχονδριακή εισαγωγή είναι επίσης ευαίσθητη στην ηλεκτροχημική δυνατότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης [200], προτείνοντας ένα μηχανισμό, όπου η δεισλιειτουργία της ETC ενεργοποιεί το UPR^{mt}. Όμως, η άμεση μεμβρανική αποπόλωση με χρήση δινιτροφαινόλης δεν ενεργοποιεί το UPR^{mt} [192]. Από την άλλη, η αποτροπή της εισαγωγής μέσω οξειδωτικού στρες του μιτοχονδρίου, έχει αναφερθεί [201], και ο χειρισμός με paraquat επάγει τις μιτοχονδριακές τσαπερόνες [193].

Η πυρηνική επανατοποθέτηση του ATFS-1 κατά τη διάρκεια του στρες απαιτεί τον μεμβρανικό μεταφορέα HAF-1, και έχει προταθεί ότι μία εκροή αποδομημένων πεπτιδίων μέσω του HAF-1 αποτρέπει την μιτοχονδριακή εισαγωγή του ATFS-1 [193, 194]. Επίσης, τόσο ο HAF-1 και η πρωτεάση CLPP-1 έχουν βρεθεί να απαιτούνται για την πυρηνική τοποθέτηση του σεσημασμένου με GFP ATFS-1, όταν το UPR^{mt} επάχθηκε με μείωση της έκφρασης του γονιδίου *hsp-6* και με την προώθηση της εκροής πρωτεϊνών μέσω του HAF-1, από την πρωτεάση CLPP-1 [194]. Παρ'όλα αυτά, οποιαδήποτε επιστατική σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών δεν έχει αποδειχθεί.



Εικόνα A6 | Το μιτοχονδριακό Unfolded Protein Response (UPR^{mt})

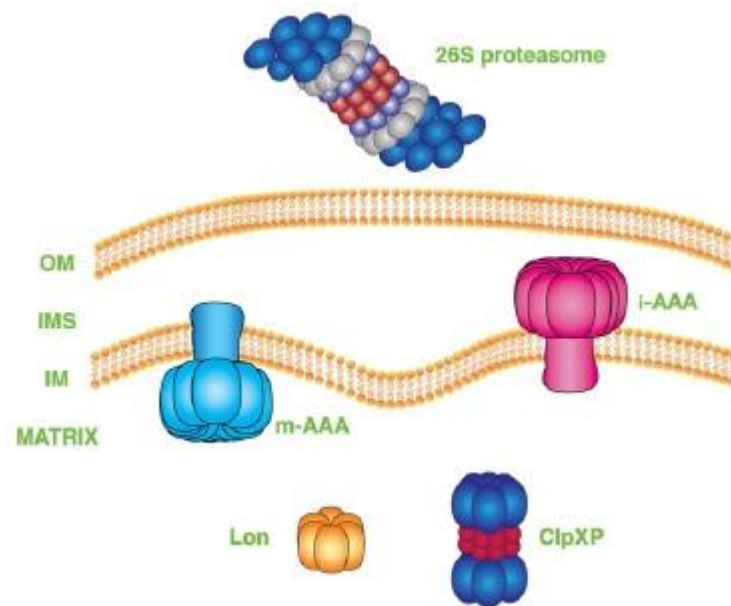
Μια απεικόνιση του μηχανισμού σηματοδότησης που ρυθμίζει την επαγωγή του Unfolded Protein Response, όπως διευκρύνεται στο *C.elegans*. Το UPR^{mt} ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας ή στρες, με αποτέλεσμα τη μεταγραφική ρύθμιση των προστατευτικών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδριακών μοριακών συνοδών και πρωτεασών, εκείνων, που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), της γλυκόλυσης και του μηχανισμού μιτοχονδριακής εισαγωγής πρωτεϊνών. Το κύτταρο καθορίζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία και όταν χρειάζεται, επάγει το UPR^{mt}, ελέγχοντας την αποτελεσματικότητα πρωτεϊνικής εισαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα ATFS-1. Απουσία μιτοχονδριακού στρες, το *atfs-1* μεταφράζεται και εισάγεται αποτελεσματικά στα μιτοχόνδρια μέσω της μιτοχονδριακής αλληλουχίας στόχευσης (MTS), όπου το ATFS-1 αποδομείται από την πρωτεάση Lon. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, η γενική αποτελεσματικότητα εισαγωγής πρωτεϊνών μειώνεται επιτρέποντας ένα ποσοστό ATFS-1 να συσσωρευτεί στο κυτταρόπλασμα. Επειδή ο ATFS-1 έχει επίσης μία ακολουθία πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μεταφέρεται στο πυρήνα όπου επάγει το UPR^{mt}. Η μιτοχονδριακή εισαγωγή, μπορεί να επιβραδυνθεί με εκροή πεπτιδίων μέσω του μεταφορέα HAF-1, η οποία συμβαίνει όταν η ικανότητα δράσης των μοριακών συνοδών (πράσινο) ξεπεραστεί από τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (διακεκομμένες γραμμές). Όλα αυτά οδηγούν στην επαγωγή του UPR^{mt} για τη διατήρηση της οργανισιακής ομοιόστασης.

Τροποποιημένο από Haynes et al., Trends Cell Biol, 2013, 23(7): p 311-318

A.3. Οι Πρωτεάσες Lon

A.3.1. ATP εξαρτώμενες πρωτεάσες-Η πρωτεΐνη Lon ως μία ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση

Η ATP-εξαρτώμενη Lon πρωτεάση είναι υψηλά συντηρημένη κατά μήκος όλων των φυλογενετικών βασιλείων από τα αρχαία και τους μύκητες, μέχρι τα θηλαστικά. Η κατανόηση της μιτοχονδριακής Lon, βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε μελέτες που χρησιμοποιούνταν η ζύμη και άλλα ζωικά κυτταρικά συστήματα, τα οποία μαζί υπέδειξαν ότι η Lon προάγει την κυτταρική επιβίωση κατά τη διάρκεια υποξίας, οξειδωτικού στρες και στρες του ενδοπλασματικού δικτύου [202-204]. Στη ζύμη, η Lon και η m-AAA είναι οι μόνες ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες μέσα στην μιτοχονδριακή μήτρα, σε αντίθεση με τα μεταζώα, όπου παρούσα είναι και η ClpXP (Εικόνα A7). Μαζί παρέχουν ένα ολοκληρωμένο σύστημα επιτήρησης, το οποίο παρακολουθεί τον μιτοχονδριακό ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών. Όμως, οι ξεχωριστές τους λειτουργίες δεν σημαίνει απαραίτητα ότι είναι και συνεργιστικές. Πρόσφατη δουλειά υποστηρίζει, ότι η Lon και η ClpXP πιθανόν λειτουργούν σε διαφορετικά μονοπάτια κατά τη διάρκεια των προσαρμοστικών αποκρίσεων στο κυτταρικό στρες [194, 198, 202-205]. Επιπλέον, σε κύτταρα *Drosophila*, έχει αποδειχθεί, ότι η Lon αποδομεί τον μιτοχονδριακό μεταγραφικό παράγοντα A (TFAM), ο οποίος αποτελεί έναν ρυθμιστή του μεταβολισμού του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) [206].



Εικόνα A7 | ATP-εξαρτώμενες πρωτεολυτικές μηχανές στα κύτταρα μεταζώων. Το 26S πρωτεάσωμα είναι η μόνη μη μιτοχονδριακή ενεργειοεξαρτώμενη πρωτεάση στα ζωικά κύτταρα, η οποία λειτουργεί στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Οι i-AAA και m-AAA είναι διαμεμβρανικές πρωτεάσες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IM), με τις καταλυτικές τους περιοχές για την υδρόλυση του ATP και την πρωτεόλυση εντός του διαμεμβρανικού χώρου και της μήτρας, αντίστοιχα. Η Lon και η ClpXP είναι διαλυτές πρωτεάσες εντός της μήτρας.

Venkatesh, S., et al., *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1823**(1): p. 56-66.

Η Lon διακρίνεται από την απλοϊκότητά της ως διαλυτή και ομοολιγομερές μονού δακτυλίου [207]. Σε αντίθεση, άλλες AAA⁺ πρωτεάσες, όπως το 26S πρωτεάσωμα, οι HslUV και οι FtsH-όμοιες πρωτεάσες, είναι πιο πολύπλοκες μιας και διαθέτουν πολλαπλά υποσυστήματα ή είναι ενσωματωμένες σε μεμβράνες [208, 209]. Η Εικόνα Α7 παρουσιάζει τις ATP-εξαρτώμενες πρωτεολυτικές μηχανές εντός των κυττάρων μεταζώων. Στο κυτταρόπλασμα και των πυρήνα των ανώτερων ευκαρυωτών, το 26S πρωτεάσωμα αποτελεί την πιο περίπλοκη AAA⁺ πρωτεάση, αποτελούμενη από το κεντρικό τμήμα της 20S πρωτεάσης και από δύο 19S ρυθμιστικά καπάκια. Ο 20S πυρήνας, αποτελείται από τέσσερα το ένα πάνω στο άλλο επταμερή δακτυλίδια, τα οποία σχηματίζουν μία πρωτεολυτική κάμαρα που θυμίζει βαρέλι, όπου στα δύο άκρα του είναι συνδεδεμένα τα 19S ρυθμιστικά καπάκια. Η ClpXP στη μιτοχονδριακή μήτρα είναι ένα διαλυτό ένζυμο, όπου οι δράσεις πρωτεάσης και ΑΤΡάσης βρίσκονται σε ξεχωριστά δομικά υποσυμπλέγματα. Η ClpP αποτελείται από ίδιες υπομονάδες συναρμολογημένες σε δύο στοιβαγμένους επταμερείς δακτυλίου, που σχηματίζουν ένα χωριστό πρωτεολυτικό θάλαμο, ο οποίος καλύπτεται σε κάθε άκρο του με έναν εξαμερικό δακτύλιο υπομονάδων ΑΤΡάσης ClpX [210]. Στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη τα m-AAA και i-AAA αποτελούν διαμεμβρανικά σύμπλοκα, τα οποία εκθέτουν καταλυτικές δομές με αντίθετη κατεύθυνση, είτε στην μήτρα είτε στον διαμεμβρανικό χώρο, αντίστοιχα [211]. Στους ανθρώπους, η m-AAA βρίσκεται τόσο ως ομοολιγομερές AFG3L2 υπομονάδων, όσο και ως ετεροολιγομερές AFG3L2 και παραπλάγιων υπομονάδων. Η i-AAA αποτελείται από YMEL1 υπομονάδες. Παρ'όλα αυτά, η ακριβής δομή και στοιχομετρία των υπομονάδων σε αυτά τα σύμπλοκα είναι άγνωστα.

A.3.2. Δομή και εξέλιξη της πρωτεάσης Lon

Στη βάση ομολογίας της αλληλουχίας και της δομής, οι πρωτεάσες Lon μπορούν να χωριστούν σε δύο υποοικογένειες: τις LonA (βρίσκονται στα βακτήρια και στους ευκαρυώτες) και τις LonB (βρίσκονται στα αρχαία). Οι πρωτεάσες LonA συγκροτούνται από τρεις λειτουργικές περιοχές: την Ν-τελική περιοχή, που εμπλέκεται στην σύνδεση υποστρώματος, την κεντρική AAA⁺ περιοχή και την C-τελική περιοχή (Ρ περιοχή), η οποία περιέχει την καταλυτική δυάδα σερίνης-λυσίνης (Ser-Lys) της πρωτεολυτικής δράσης; οι LonB πρωτεάσες αποτελούνται από μία ΑΤΡάση και δομή πρωτεάσης και μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή η οποία αγκυρώνει την πρωτεΐνη στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης [207, 212].

Η Lon είναι υψηλά συντηρημένη κατά μήκος της εξέλιξης, και τα ομόλογά της έχουν βρεθεί σε όλα τα βασίλεια [213]. Ο υψηλός βαθμός συντήρησης υποδεικνύει, ότι η παρουσία της είναι βασική για την κυτταρική επιβίωση: η αποσιώπησή της οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο *in vitro*, και η knock-out απώλεια λειτουργίας της είναι σε εμβρυονικό επίπεδο θανατηφόρα στα ποντίκια. Στα ευβακτήρια, μέλη της οικογένειας Lon είναι παρόντα ως διαλυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, στα αρχαία συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη και στους ευκαρυώτες τοποθετούνται στα μιτοχόνδρια και στα περοξισώματα [214].

Η πρώτη πρωτεάση Lon αναγνωρίστηκε στο *Escherichia coli*, ως μία ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση με φόρμα της καταλυτικής δυάδας Ser-Lys, και ονομάστηκε "La" επειδή τα μεταλλάγματα του *E.coli* με έλλειψη του *lon* γονιδίου είχαν την τάση να είναι πιο

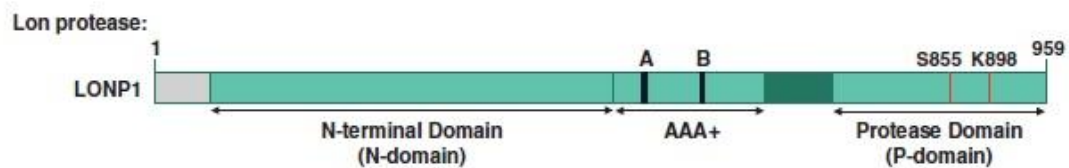
μακρόστενα σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου, κάτω από UV ακτινοβολία [215]. Αυτή η πρωτεΐνη αποδομεί μη ορθώς αναδιπλωμένες ή μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, εμπλέκεται στην αντίσταση στην ακτινοβολία, στον κυτταρικό διπλασιασμό, στην νηματοποίηση, στην παραγωγή καψιδικών πολυσακχαριτών και στην επιβίωση κάτω από συνθήκες αστίας. Επίσης, αποδομεί επιλεκτικά κάποιες μικρής διάρκειας ζωής ρυθμιστικές πρωτεΐνες και συνδέονται με το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες [216]. Η κρυσταλλική δομή της βακτηριακής πρωτεάσης Lon δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμα; όμως, η τρισδιάστατη δομή τόσο της N-τελικής (αμινοξέα 8-117) όσο και της AAA+ περιοχής από την βακτηριακή Lon έχουν αποκτηθεί επιτυχώς [217]. Στο *E.coli*, η Lon σχηματίζει ένα ολιγομερές έξι ή δώδεκα υπομονάδων και δημιουργεί μία δομή δαχτυλιδιού με μία κεντρική κοιλότητα, η οποία θυμίζει τη μορφή του 26S πρωτεασώματος [218].

Στους ευκαρυώτες δύο πρωτεάσες Lon είναι παρούσες: η μιτοχονδριακή και η περιξοσωματική μορφή, οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Η μιτοχονδριακή πρωτεάση Lon κωδικοποιείται από το πυρηνικό γονιδίωμα [219] και, μετά από την μετάφραση σε μία πρόδρομη μορφή που μεταφέρει και την αλληλουχία μιτοχονδριακής σήμανσης στο N-τελικό άκρο, εισάγεται μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα όπου το MTS αποκόπτεται και η πρωτεΐνη μετατρέπεται στην ώριμη κατάστασή της. Η ευκαρυωτική Lon μοιράζεται την πλειοψηφία των χαρακτηριστικών της βακτηριακής, όπως τον ολιγομερισμό σε μορφή σχήματος δαχτυλίου [220], την ικανότητα να δένεται με το DNA, τον βασικό ρόλο στον πρωτεϊνικό ποιοτικό έλεγχο και την προστασία από τα πρωτεϊνικά μιτοχονδριακά συσσωματώματα που επάγονται εξαιτίας του στρες [213, 221].

Η ανθρώπινη μιτοχονδριακή πρωτεάση Lon κωδικοποιείται από το γονίδιο LONP1, το οποίο έχει μήκος περίπου 29.000 ζεύγη βάσεων. Το κύριο μετάγραφο του LONP1, έχει μήκος περίπου 3.4Kb, ενώ δύο εναλλακτικά μετάγραφα κωδικοποιούν ισομορφές της Lon με πιο κοντές N-τελικές κωδικές περιοχές. Η Lon παράγεται ως μία πρόδρομη πρωτεΐνη (preproteine) 959aa με ένα μιτοχονδριακό σινιάλο τοποθέτησης (MTS) που οδηγεί την πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια [219]; το ώριμο ένζυμο είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 100kDa [222]. Η Lon εντοπίζεται κυρίως στην μήτρα ως διαλυτή πρωτεΐνη, ενώ ένα μικρό τμήμα συνδέεται με νουκλεοειδή στην εσωτερική μεμβράνη [223]. Η τρισδιάστατη μορφή της καταλυτικής περιοχής της ανθρώπινης Lon είναι όμοια με αυτές που έχουν παρατηρηθεί σε άλλα είδη [220]. Δεδομένα της κρυσταλλικής δομής υποστηρίζουν, ότι η ανθρώπινη Lon σχηματίζει εξαμερή, όπου είναι η πλήρως δραστική μορφή του ενζύμου. Η Lon εκφράζεται παντού στους ανθρώπινους ιστούς και όργανα, είναι παρούσα σε υψηλά επίπεδα στο συκώτι, στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στον πλακούντα και σε χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα στα νεφρά, τους πνεύμονες, το πάγκρεας και τα κύτταρα ανοσίας [219].

Επιστρέφοντας στη δομή της ανθρώπινης LONP1, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, περιέχει την αμινο-τελική περιοχή (N-domain) που χρειάζεται για την αναγνώριση του υποστρώματος, την περιοχή AAA+ ATPάσης και την περιοχή σερίνης πρωτεάσης (P-domain), που περιλαμβάνει και την καταλυτική δυάδα σερίνης-λυσίνης (Εικόνα A8) [219, 221]. Αν και η δομή μιας ακέραιας πρωτεάσης Lon θηλαστικών δεν έχει αναφερθεί ακόμα, κρυσταλλοποιημένα θραύσματα P-περιοχών της ανθρώπινης LONP1 είναι εξαμερή και ανασυνδυασμένες πλήρους μήκους υπομονάδες LONP1 συναρμολογούν

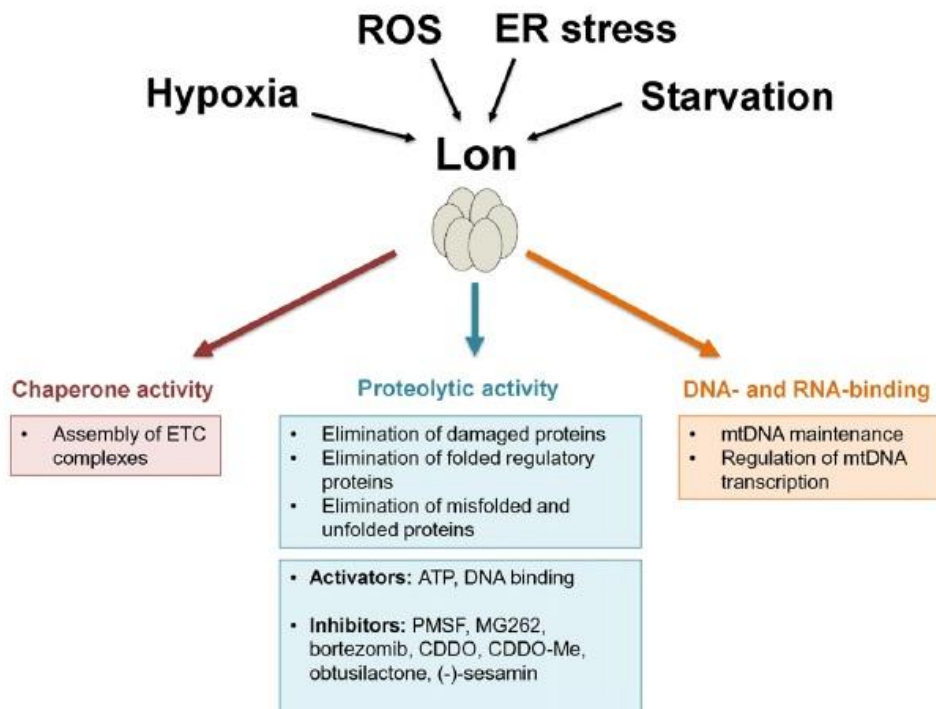
εξαμερή σε διάλυμα [220]. Στοιχεία μπορούν να ληφθούν από τη διαλυμένη δομή της πλήρους πρωτεΐσης Lon στο αρχαίο *Thermococcus onnurineus*, η οποία επίσης συναρμολογείται ως εξαμερές. Αυτή η κρυσταλλική δομή υποδηλώνει ότι οι περιοχές P της κάθε υπομονάδας σχηματίζουν ένα θάλαμο τύπου μπολ με ένα καπάκι που σχηματίζεται από τους τομείς AAA+, έτσι ώστε τα υποστρώματα και τα προϊόντα αποικοδόμησης εισέρχονται και εξέρχονται από τον πρωτεολυτικό θάλαμο μέσω αντίθετων αξονικών πόρων [224].



Εικόνα A8 | Δομική οργάνωση της ανθρώπινης πρωτεΐσης LONP1. Με γκρι χρώμα υποδεικνύεται η μιτοχονδριακή αλληλουχία τοποθέτησης (MTS), τα καταλυτικά αμινοξικά κατάλοιπα υποδεικνύονται με κόκκινο χρώμα και έχουν ένδειξη τοποθέτησης. Τέλος τα μοτίβα Walker A και B , υποδεικνύονται ως A και B για τη σύνδεση και την υδρόλυση του ATP, αντίστοιχα.

Τροποποιημένο από CA Goard and AD Schimmer, *Oncogene advance*, 2013, doi:10.1038/onc.2013.228

A.3.3. Lon πρωτεάση- ένα πολυλειτουργικό ένζυμο

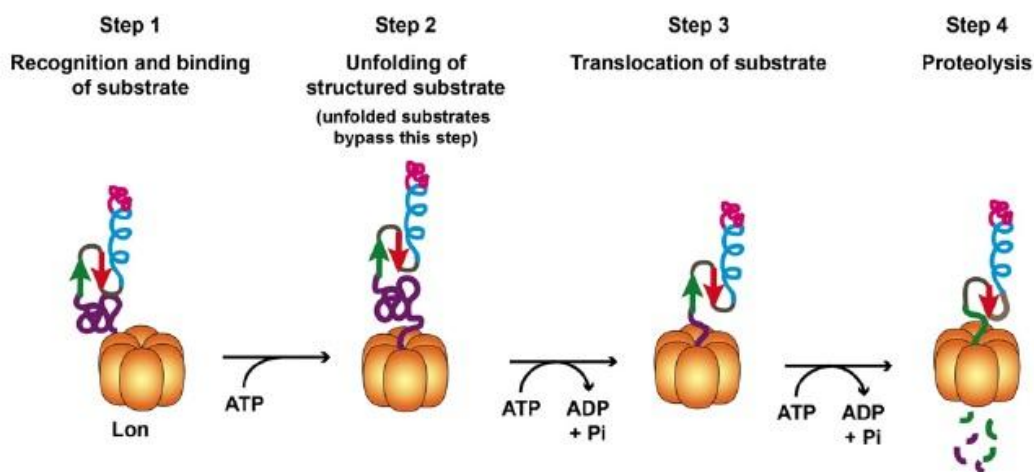


Εικόνα A9 | Οι λειτουργίες της πρωτεΐσης Lon σε ανθρώπινα μιτοχόνδρια. Υποδεικνύονται οι στρεσογόνοι παράγοντες που μπορούν να διαμορφώσουν την έκφραση της Lon, καθώς και τα μόρια που είναι ικανά να διεγείρουν ή να αναστείλλουν την πρωτεολυτική δραστηριότητα της Lon.

A.3.3.1. Πρωτεολυτική δράση

Η πρωτεολυτική δραστηριότητα της Lon έχει διατηρηθεί κατά μήκος της εξέλιξης, και στα θηλαστικά είναι βασική για την διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και ακαιρεότητας, μέσω της εξάλειψης κατεστραμμένων πρωτεϊνών από το οξειδωτικό στρες, ή/και μέσω της επιλεκτικής αποδόμησης πρωτεϊνών «κλειδιών», κατά την απόκριση σε πολλαπλά στρες και μεταβολικές αλλαγές [213]. Η πρωτεολυτική δράση κατέχει ρόλο σε διάφορα στάδια στην απόκριση στο στρες [225]. Αν και η Lon δεν μπορεί να θεωρηθεί ακόμα ως «παίχτης κλειδί» στο UPR^{mt}, μία πρόσφατη πολυεπίπεδη γενετική και πρωτεωμική ανατομή της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στο πρωτέωμα συκωτιού από ποντίκια, αποκάλυψε ότι η έκφραση της Lon συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 60kDa (HSPD1), την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 10 kDa (HSPE1), την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 kDa (HSPA9) και την CLPP, οι οποίες όλες εμπλέκονται στο UPR^{mt} [226].

Το γενικό πρότυπο της ATP-εξαρτώμενης πρωτεόλυσης από την Lon περιέχει τα παρακάτω στάδια (Εικόνα A10): 1) Η αμινοτελική περιοχή και η AAA+ δομή του ολοενζύμου αναγνωρίζει πρώτα και δεσμεύει έναν συγκεκριμένο προσδιοριστή ή θέση αναγνώρισης ενός πρωτεϊνικού υποστρώματος κατά ATP-εξαρτώμενο τρόπο. 2) Η σύνδεση και η υδρόλυση του ATP, οδηγούν σε διαμορφωτικές αλλαγές στο ενζυμικό σύμπλοκο και «ξεδιπλώνονται» τα πολυπεπίδια του υποστρώματος. 3) Εξουσιοδοτείται η μετατόπιση των μετουσιωμένων υποστρωμάτων εντός του πρωτεολυτικού θαλάμου, ο οποίος απομονώνεται από το υδατικό περιβάλλον. 4) Αφού το ξεδιπλωμένο υπόστρωμα είναι προσβάσιμο στις πρωτεολυτικές δραστηριότητες, λαμβάνει χώρα η διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών.



Εικόνα A10 | Γενικό πρότυπο αναγνώρισης και αποδόμησης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων από την πρωτεάση Lon.

Τροποποιημένο από Venkatesh, S., et al., Biochim Biophys Acta, 2012. 1823(1): p. 56-66.

A.3.3.2. Δράση μοριακού συνοδού (*Chaperone activity*)

Οι μοριακοί συνοδοί ουσιαστικά δρουν σε *de novo* αναδιπλωμένες πρωτεΐνες ή για να αναδιπλώσουν τις λανθασμένα πτυχωμένες πρωτεΐνες στην φυσική τους κατάσταση [227]. Η Lon συγχωνεύει τις πρωτεολυτικές και τις τσαπερονιακές δράσεις σε μία απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα, αλλά ενώ η πρωτεολυτική δραστηριότητα περιορίζεται στην περιοχή P, η δραστηριότητα πρόσδεσης προκαλείται από τον τομέα δέσμευσης ATP και τον τομέα N-τελικό τομέα. Οι λειτουργίες τσαπερόνης της Lon εμπλέκονται στη συναρμολόγηση συμπλοκών μιτοχονδριακής μεμβράνης σε ζυμομύκητες και σε ανθρώπους και τουλάχιστον σε ζυμομύκητες αυτές οι λειτουργίες διατηρούνται μετά την απενεργοποίηση της πρωτεολυτικής θέσης και εμποδίζονται όταν μεταλλάσσεται η θέση σύνδεσης ATP [228, 229]. Οι στόχοι της δραστηριότητας της Lon ως τσαπερόνη δεν είναι ακόμη γνωστοί. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας μια πρωτεωμική προσέγγιση, μια από τις πρώτες προσπάθειες για την ταυτοποίηση τέτοιων στόχων δημιούργησε έναν κατάλογο 76 υποψήφιων πρωτεϊνών που στο τέλος επιτράπη να ταυτοποιηθούν ως συνεργάτες δεσμεύσεως Lon η NADH αφυδρογονάση ουβικινόνη πρωτεΐνη σιδήρου-θείου 8 (NDUFS8), η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 (Hsp60) και η mtHsp70 [230]. Παρ' όλα αυτά, το αν η Lon βοηθά ή όχι την αναδίπλωση ή / και την επανααναδίπλωση αυτών των πρωτεϊνών παραμένει ασαφής.

A.3.3.3. Η Lon ως πρωτεΐνη σύνδεσης στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Μαζί με τις πρωτεολυτικές και τις τσαπερονιακές δραστηριότητες, η ικανότητα της Lon να δεσμεύει το mtDNA διατηρείται από τα βακτήρια στα μιτοχόνδρια θηλαστικών [231, 232]. Η Lon του *E.coli* δεσμεύει το μονόκλωνο DNA (ssDNA) και RNA (ssRNA) και το δίκλωνο DNA (dsDNA) με μη ειδικό τρόπο, και αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύει την δράση της ATPάσης της Lon, αλλά και τις πρωτεολυτικές δραστηριότητες [215, 231, 233, 234]. Σε αντίθεση με την βακτηριακή Lon, η ανθρώπινη Lon συνδέεται ειδικά με το ssDNA. Συγκεκριμένα, δεσμεύει αλληλουχίες που περιέχονται στον υποκινητή ελαφριάς αλυσίδας (LSP) του μη κωδικοποιούμενου DNA και στον υποκινητή βαριάς αλυσίδας (HSP) του κωδικοποιούμενου DNA, οι οποίες είναι και οι δύο θέσεις όπου αρχίζει η αντιγραφή και η μεταγραφή του mtDNA [232]. Οι μελέτες ανοσοκατακρήμνισης αποκάλυψαν επίσης ότι η Lon αλληλεπιδρά με την Twinkle, την πολυμεράση γ και την TFAM, τα οποία αποτελούν μείζονα συστατικά των νουκλεοσιδίων mtDNA, με την μιτοχονδριακή πρωτεΐνη θερμικού σοκ-70 (mtHSP70) και με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ-60 (Hsp60), η οποία κατέχει ρόλο στον μεταβολισμό του mtDNA [230, 235]

Αν και έχει αποδειχθεί η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της Lon και αυτών των πρωτεϊνών, η λειτουργική έκβαση τέτοιων αλληλεπιδράσεων είναι ακόμη άγνωστη για όλες σχεδόν τις πρωτεΐνες, εκτός από την TFAM, η οποία είναι η κύρια πρωτεΐνη πακεταρίσματος του mtDNA και ο σημαντικότερος ρυθμιστής της μεταγραφής του mtDNA [236, 237]. Παρόλο που υπάρχουν βεβαιότητες ότι η Lon έχει κάποιο ρόλο στη διατήρηση του mtDNA και στη ρύθμιση του αριθμού αντιγράφων του, η ακριβής λειτουργία

εξακολουθεί να παραμένει ασαφής. Για παράδειγμα, ένα κρίσιμο σημείο είναι να διασαφηνιστεί αν η Lon έχει άμεσο ρόλο στην αντιγραφή και / ή στη μεταγραφή του mtDNA ή δρα για να αποικοδομήσει και να ρυθμίσει πρωτεΐνες που σχηματίζουν νουκλεοειδή [238].

A.3.4. Έκφραση και επίπεδα δραστικότητας της Lon στα γηρασμένα κύτταρα

Η πρώτη σύνδεση του *Lon* mRNA με την γήρανση έγινε σε μία μελέτη του σκελετικού μυ σε γηρασμένα ποντίκια, όπου παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα σταθερής κατάστασης του *Lon* mRNA ήταν περίπου τέσσερις φορές χαμηλότερα στα ποντίκια ηλικίας 30 ημερών σε σχέση με τα νεαρά ποντίκια. Αυτή η διαφορά εμποδίστηκε ολοκληρωτικά σε συγχρονισμένα ηλικιακά άτομα κάτω από θερμιδικό περιορισμό [239]. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν πενταπλάσια μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης αλλά της προτεολυτικής της δραστικότητας στα γηρασμένα άτομα ποντικών, σε αντίθεση με τα νεαρά. Επίσης τα γηρασμένα ποντίκια παρουσίασαν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (οξειδωμένες πρωτεΐνες) και συγκεκριμένα οξειδωμένη μιτοχονδριακή ακονιτάση, πιθανότατα ως επίπτωση της ελαττωμένης ικανότητας της Lon να αποδομεί οξειδωμένες πρωτεΐνες [240].

Παρόμοια, μελέτη ετερόζυγων ποντικών (γηρασμένων και νεαρών) για την μιτοχονδριακή MnSOD(-/+), τα οποία υπέφεραν από εκτεταμένη οξειδωτική καταπόνηση, ως αποτέλεσμα 50% μειωμένης περιεκτικότητας σε MnSOD, παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα πρωτεϊνικά Lon επίπεδα, σε σχέση με τα ζώα αγρίου τύπου (MnSOD +/-) [240]. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η έκφραση της Lon φθίνει με το χρόνο. Ακόμα πειράματα υπέκφρασης της Lon (μέσω ολιγονουκλεοτιδικής σίγησης) είχαν ως αποτέλεσμα απώλεια της μιτοχονδριακής λειτουργίας, μειωμένη μιτοχονδριακή βιογένεση, και τελικά κυτταρικό θάνατο [241]. Όταν αυτά τα κύτταρα μελετήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία, παρατηρήθηκε μία ποικιλία μορφολογικών φαινοτύπων όπως: γιγάντια μιτοχόνδρια με μεγάλα άδεια κενοτόπια, μιτοχόνδρια γεμάτα ηλεκτρονιακά σωμάτια εγκλεισμού και μικροσκοπικά μιτοχόνδρια. Αυτοί οι παθολογικοί φαινότυποι είναι όμοιοι με αυτούς που παρατηρούνται σε γηρασμένους ιστούς, υποστηρίζοντας ότι υπέκφραση της Lon μπορεί να συμβάλει στη διαδικασία της γήρανσης.

Για την εξέταση των επιπτώσεων της γήρανσης στη μήτρα των μιτοχονδρίων στο συκώτι, η αναπνευστική δραστηριότητα και η δραστηριότητα της Lon μετρήθηκαν σε αρουραίους ηλικίας δέκα και εικοσιεπτά μηνών. Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη κατανάλωση του οξυγόνου μεταξύ γηρασμένων και νέων αρουραίων. Επιπλέον, η δραστηριότητα της Lon διεγερόμενη από το ATP παρέμεινε ίδια, όμως η συνολική δραστηριότητα της Lon μειώθηκε περίπου 2.5 φορές στο γηρασμένο συκώτι. Τέλος τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Lon στην μιτοχονδριακή μήτρα δεν μειώθηκαν στον γηρασμένο ιστό [242]. Κάποιες πιθανές εξηγήσεις για αυτή την μείωση στη δράση, παρά τα σταθερά πρωτεϊνικά Lon επίπεδα είναι οι παρακάτω. Πρώτον, η αποδόμηση της Lon ίσως να μειώνεται με αποτέλεσμα την συσσώρευση ανενεργής Lon εντός του κυττάρου. Η ύπαρξη της ανενεργής Lon μπορεί να εμποδίζει την έκφραση νέας Lon. Δεύτερον, τα γηρασμένα μιτοχόνδρια παράγουν περισσότερα οξειδωτικά και λιγότερο ATP, το οποίο χρειάζεται από την Lon για την πρωτεόλυση αλλά όχι για την σύνδεση του υποστρώματος [243]. Τρίτον,

μελέτες στα γηρασμένα μιτοχόνδρια της οικιακής μύγας έδειξαν μία συσώρευση οξειδωτικά τροποποιημένων πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή μήτρα. Κατεστραμμένες πρωτεΐνες μπορούν να συνδεθούν στην Lon και να μπλοκάρουν την αποδόμηση άλλων πρωτεϊνών (είτε ανταγωνιστικά είτε αμετάτρεπτα). Ένα παρόμοιο φαινόμενο έχει προταθεί για το πρωτεάσωμα, κατά το οποίο αυξανόμενα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων μπορούν να συνδεθούν και σταδιακά να εμποδίσουν την δράση του, συμβάλλοντας σε περαιτέρω συσώρευση οξειδωτικά κατεστραμμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων [244]. Τέλος, η Lon μπορεί να είναι από μόνη της ευαίσθητη στα αυξανόμενα επίπεδα του οξειδωτικού στρες που συμβαίνει στα γηρασμένα κύτταρα, έτσι να τροποποιείται δομικά και τελικά να υφίσταται σημαντική μείωση στη δραστηριότητα.

Επίσης, φαίνεται ότι η ικανότητα της πρωτεάσης Lon φθίνει με το χρόνο, και προκειμένου να διατηρήσει το ίδιο επίπεδο δραστηριότητας όπως στα νεαρότερα κύτταρα, απαιτείται αυξημένο επίπεδο έκφρασης, ώστε να διαχειριστεί την πρωτεϊνική οξείδωση σε ιστούς όπως η καρδιά, η οποία υφίσταται υψηλή οξειδωτική καταπόνηση. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η δραστηριότητα της Lon φθίνει με το χρόνο, και αυτό ίσως επηρεάσει την ικανότητα των γηρασμένων μιτοχονδρίων να αντιδράσουν σε επιπρόσθετο στρες. Το επίπεδο αυτού του προβλήματος φαίνεται να ποικίλει από όργανο σε όργανο [245].

Η πρωτεάση Lon των θηλαστικών διεγείρεται από το ATP, όμως, ένα μικρό επίπεδο αποδόμησης συμβαίνει δίχως ATP [223, 242]. Η υποψία ότι η Lon θα μπορούσε να αποδομήσει φυσικές λειτουργικές πρωτεΐνες, εμφανίζει ένα πιθανό κίνδυνο, επειδή οι φυσικές πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν εκτεταμένη αποδόμηση στη μήτρα. Ένας μηχανισμός ελέγχου της εκτεταμένης αποδόμησης από τη Lon θα μπορούσε να είναι μέσω ρύθμισης της έκφρασής της.

Από τη στιγμή που η Lon είναι πολυλειτουργική, είναι δύσκολο να καθοριστεί αν η πρωτεολυτική της δράση μπορεί να επηρεαστεί εξαιτίας ενός συμβιβασμού της διατήρησης της αναπνοής στα μιτοχόνδρια των γηρασμένων κυττάρων. Εφόσον κάτι τέτοιο συμβαίνει, αυτό θα μπορούσε να υπονοεί ότι η Lon αλλάζει την λειτουργία της από αυτή της πρωτεάσης σε μία πιο σημαντική λειτουργία ως τσαπερόνη ώστε να επιτρέψει την σωστή συναρμολόγηση των συμπλόκων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Έτσι, μία ομάδα [229] που εξέταζε τις υπομονάδες IV, V, και VI της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, έδειξε ότι η λειτουργία της Lon ως τσαπερόνη όχι μόνο διατηρήθηκε αλλά ενισχύθηκε, έπειτα από απενεργοποίηση της πρωτεολυτικής της περιοχής. Επιπρόσθετα, έδειξε πως αν και οι δραστηριότητες ATPάσης και πρωτεόλυσης είναι συζευγμένες, οι δύο περιοχές μπορούν να λειτουργήσουν αυτόνομα η μία από την άλλη μέσω της έλφρασης της κάθε περιοχής ως δύο ξεχωριστές πρωτεΐνες.

A.3.5. Σύνδεση της Lon με γενετικές ασθένειες και τον καρκίνο

Μαζί με τις ClpXP, m-AAA και i-AAA, η Lon είναι ένα από τα βασικά ένζυμα με πρωτεολυτική δραστηριότητα, όπου δρά στην μιτοχονδριακή μήτρα. Πολύ πρόσφατα, μεταλλάξεις στο γονίδιο *lonp1* έχουν χαρτογραφηθεί και έχουν αναγνωρισθεί ως υπεύθυνες για το εγκεφαλικό, οφθαλμικό, οδοντικό, ωοθηλακικό, σκελετικό (CODAS) σύνδρομο. Το CODAS αποτελεί μία πολυσυστημική αναπτυξιακή ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από μία ευρεία ποικιλία κλινικών συμπτωμάτων συμπεριλαμβανοντας υποτονία, πτώση, καθυστέρηση στις κινήσεις, απώλεια ακοής, μεταγεννητικό καταρράκτη και σκελετικές και οδοντικές ανωμαλίες [246, 247]. Έντεκα παρανοηματικές μεταλλάξεις και μία μη νοηματική μετάλλαξη αναγνωρίστηκαν σε έντεκα ασθενείς. Η πλειοψηφία αυτών των μεταλλαγών τοποθετούνται στην AAA+ περιοχή, και οδηγούν σε αμινοξικές υποκαταστάσεις. *In vitro* ανάλυση των παραλλαγών της Lon αποκάλυψαν ότι: i) η πρωτεολυτική δραστηριότητα της Lon διατηρείται για συγκεκριμένο υπόστρωμα της Lon, αλλά όχι για κάποιο άλλο, ii) η τοποθέτηση παραμένει μιτοχονδριακή και iii) η ικανότητα σχηματισμού ομοολιγομερών καταστέλλεται [247].

Για την καλύτερη κατανόηση των επιπτώσεων των Lon μεταλλαγών *in vivo*, δημιουργήθηκαν CODAS κυτταρικές σειρές λεμφοβλαστών. Σε τέτοια κύτταρα, ενώ ο αριθμός αντιγράφων του mtDNA δεν άλλαξε, η μιτοχονδριακή υπερδομή ήταν ανώμαλη, δείχνοντας συσσωματωποιημένα κοκκία και μείωση της μέγιστης κατανάλωσης οξυγόνου. Πρόσφατα, μια κλινική κατάσταση, η οποία μοιράζεται σκελετικές εκφάνσεις του συνδρόμου CODAS περιγράφηκε, η οποία κατάσταση συμπεριλαμβάνει μια περίπλοκη μίξη συμπτωμάτων που συγκεντρώθηκαν στο περιφραστικό όνομα επιφυσικό, σπονδυλικό, αυτί, μύτη, συν συναφή ευρήματα (EVEN-PLUS) σύνδρομο [248]. Τρεις στους τρεις ασθενείς είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο της heat shock 70kDa protein 9 (HSPA9), που κωδικοποιεί για την μιτοχονδριακή τσαπερόνη HSPA, γνωστή και ως μορταλίνη ή GRP75. Το γεγονός ότι μεταλλαγές σε δύο διαφορετικές πρωτεΐνες όπως η Lon και η HSPA9, συνδέονται με παρόμοιους φαινοτύπους, υποστηρίζει ότι αυτά τα δύο μόρια πιθανόν συνδέονται λειτουργικά στο δίκτυο μιτοχονδριακών τσαπερονών-πρωτεασών, και ότι μία νέα οικογένεια ασθενειών, γνωστή ως μιτοχονδριακές τσαπερονοπάθειες παρουσιάζεται και πρέπει να χαρακτηριστεί περαιτέρω.

Η Lon δεν είναι μια ογκοπρωτεΐνη *stricto sensu*. Όμως, αρκετές σειρές ενδείξεων περιγράφουν τη Lon ως μία πρωτεΐνη εμπλεκόμενη σε μεγάλο βαθμό στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό που παρατηρείται κατά τους νεοπλασμούς. Πρώτον, υπερέκφραση της Lon πρωτεάσης έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους ανθρώπινου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του κακοήθους λεμφώματος Β-κυττάρων και επιθηλιακού μαστού, καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, μη μικροκυτταρικών καρκινικών κυττάρων πνεύμονος, κυττάρων καρκίνου της ουροδόχου κύστης, καρκίνου από πλασματικά πλακώδη κύτταρα και του μεταστατικού καρκίνου στον προστάτη [228, 249-253].

Δεύτερον, η πρωτεάση Lon παίζει βασικό ρόλο στη διαδικασία κυτταρικής προσαρμογής σε περιβάλλον υποξίας, μία κατάσταση που παρατηρείται συχνά σε συμπαγείς όγκους [254]. Η έκφραση του γονιδίου *lonp1* επάγεται κατά την απόκριση στην υποξία, μέσω του HIF-1α, ενός master regulator της ομοιόστασης οξυγόνου, ο οποίος συνδέεται στον υποκινητή του *lonp1* γονιδίου [203, 204]. Πολλές HIF-1α περιοχές σύνδεσης

έχουν εντοπιστεί στην 5'-πλευρική περιοχή του ανθρώπινου *Lonp1* γονιδίου στις θέσεις -29, -67, -192 και -506 από το σημείο έναρξης της μεταγραφής [203]. Κατά την υπερέκφραση από τον HIF-1α, η Lon πρωτεάση αποδομεί την υπομονάδα 4-1 της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX4-1), και επιτρέπει την συναρμολόγηση της εναλλακτικής υπομονάδας COX4-2, η οποία με τη σειρά της, προσδίδει βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα (σε καταστάσεις χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου) και προσαρμόζει τα καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες υποξίας [203, 255]. Η υποξία οδηγεί στην υπερέκφραση της Lon σε διάφορες κυτταρικές σειρές στους ανθρώπους, όπως στην μιννοκυτταρική οξεία μυελογενή λευχαιμία (THP-1), στα καρδιομυοκύτταρα, στα εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα (293T), στα κύτταρα του ραβδομυοσάρκωματος και στα νεφρικά καρκινικά κύτταρα (RCC4) [203, 251, 255-257]. Επιπλέον, η υπερέκφραση της Lon μπλοκάρει την συναρμολόγηση του συμπλόκου I σε κύτταρα μελανώματος, προκαλώντας υπερέκφραση των NDUFB6, 8, 10 και 11, και υπέκφραση των NDUFV1, NDUFV2, NDFUS3 και NDFUS7. Αυτές οι αλλαγές, οδηγούν στην μείωση της αναπνοής μέσω του συμπλόκου I, και μία γενική μείωση της αναπνοής και αύξηση της γλυκόλυσης. *In vivo*, η υπερέκφραση της Lon ευνοεί τη γλυκόλυση, διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό και τη δυνατότητα μεταφοράς και σχηματισμού μετάστασης των κυττάρων μελανώματος στα γυμνά ποντίκια [258].

Τρίτον, μοντέλα ποντικών Lon +/-, στα οποία η έκφραση της Lon είναι η μισή, έχουν χαρακτηριστεί από μία μειωμένη τάση ανάπτυξης καρκίνου, και από μεγαλύτερη αντοχή σε καρκινογενείς ουσίες, σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Αναλόγως, η αύξηση των Lon αποσιωπημένων καρκινικών κυττάρων μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τα control κύτταρα, όπου τα κύτταρα που υπερεκφράζαν Lon μεγάλωναν πιο γρήγορα [258].

Τέταρτον, κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν ένθερμα, ότι υψηλότερη έκφραση της Lon συνδέεται με υψηλότερη επιθετικότητα διαφόρων τύπου καρκίνου και με χαμηλή επιβίωση των ασθενών. Όντως, χαμηλή επιβίωση των ασθενών έχει παρατηρηθεί στο μεταστατικό μελάνωμα, στο οποίο τα ποσοστά έκφρασης της Lon ήταν υψηλά. Σε συμφωνία με την παραπάνω παρατήρηση, υπερέκφραση της Lon στο μελάνωμα αύξησε τον σχηματισμό της πειραματικής μετάστασης, ενώ μείωση της έκφρασης της Lon μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετάσταση του καρκίνου του πνεύμονα [258]. Επίσης, η αναδρομική ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε καρκινικούς ιστούς της ουροδόχου κύστης, ενσωματωμένους σε παραφίνη, έδειξε ότι ασθενείς με υψηλά ποσοστά έκφρασης της Lon είχαν μικρότερους γενικούς ρυθμούς επιβίωσης από εκείνους με χαμηλή έκφραση της Lon [252].

Πέμπτον, ουσίες ικανές να καταστείλουν την δράση πρωτεάσης της Lon, έχουν την δυνατότητα να καθυστερήσουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Μέχρι σήμερα, λίγα μόρια που στοχεύουν την δραστηριότητα πρωτεάσης της Lon είναι γνωστά. Τέτοια μόρια είναι τα MG132 και η *clastro*-lactacystin-lactone (cLL), τα οποία αποτελούν αναστολείς του πρωτεασώματος, όπου μπορούν να δράσουν εν μέρει και στην πρωτεάση Lon [259]. Άλλα, όπως, το συνθετικό τριτερπενοειδές CDDO και ο παράγωγος μεθυλεστεράς (Me-CDDO), είναι πιο ειδικά για την πρωτεάση Lon. Τα δύο τελευταία μόρια, μπλοκάρουν την δράση της Lon σε B κύτταρα λεμφώματος, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο απόπτωσης, αντίστοιχο με αυτόν που παρατηρήθηκε στα κύτταρα με μειωμένη έκφραση της Lon [250]. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να παρατηρηθεί και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές,

συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου RKO και των κυττάρων HepG2 του ηπατοκαρκινώματος, αλλά δεν υπάρχει σε φυσιολογικά κύτταρα όπως οι ινοβλάστες, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην αναστολή της Lon, από τα κανονικά μη μετασχηματισμένα κύτταρα [249].

Αν και ο ρόλος της πρωτεάσης Lon στην καρκινογένεση έχει μερικώς διαφωτιστεί, ορισμένες πτυχές παραμένουν να διευκρινιστούν. Συγκεκριμένα, δεν είναι σαφές ποια είναι, μεταξύ των διαφόρων λειτουργιών της πρωτεάσης Lon, εκείνη που ευνοεί την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των όγκων. Επειδή είναι πολύ δύσκολο να αναλυθούν ξεχωριστά οι λειτουργίες της Lon, οι επιδράσεις της υψηλότερης έκφρασής της και οι συνέπειες της σε επίπεδο οργανιδίων και κυττάρων στα καρκινικά κύτταρα απέχουν πολύ από το να είναι σαφείς. Μέχρι στιγμής, οι μεταβολές που παρατηρούνται στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την Lon υποδεικνύουν ότι εξέχοντα ρόλο διαδραματίζουν οι πρωτεολυτικές και οι λειτουργίες τσαπερόνης της Lon, ενώ οι λειτουργίες που σχετίζονται με τη ρύθμιση του mtDNA είναι λιγότερο σχετικές.

A.4. Ο νηματώδης *C.elegans*

Ο *Caenorhabditis elegans*, ή εν συντομία *C. elegans*, είναι ένας μικροσκοπικός μη παρασιτικός σκώληκας που τρέφεται με μικροοργανισμούς, ως επί το πλείστον βακτήρια. Ταξινομικά, ανήκει στο φύλο των Νηματωδών, το οποίο με τη σειρά του αποτελεί κλάδο του υπερφύλου των Εκδυσόζων, χαρακτηριστικό γνώρισμα των οποίων αποτελεί η αλλαγή του εξωτερικού περιβλήματος του ζώου μέσω της διαδικασίας της έκδυσης. Εμφανίζει επομένως μεγαλύτερη συγγένεια με τη μύγα *Drosophila* και με τα υπόλοιπα έντομα, πάρα με άλλες ομάδες σκουληκιών, όπως οι γαιοσκώληκες. Πληθυσμοί του νηματώδους *C. elegans* έχουν βρεθεί και απομονωθεί κυρίως από ανθρωπογενή περιβάλλοντα, με αποτέλεσμα η φυσιολογική οικολογία του να παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Γενικά, περιβάλλοντα πλούσια σε βακτήρια, όπως φρούτα και φυτά σε αποσύνθεση, φαίνεται να αποτελούν ιδανικά οικοσυστήματα για την ανάπτυξή του.

Ο *C. elegans* πρωτοχρησιμοποιήθηκε ως πειραματόζωο σε μελέτες βιολογίας στις αρχές της δεκαετίας του 1970 από τον Sydney Brenner, ως ένα νέο μοντέλο για τη διαλεύκανση ερωτημάτων στο πεδίο της αναπτυξιακής βιολογίας και της νευροβιολογίας. Έκτοτε, έχει αναδειχθεί ως ένας από τους πλέον διαδεδομένους οργανισμούς μοντέλα, που χρησιμοποιείται από χιλιάδες εργαστήρια ανά τον κόσμο, για μελέτες σε πολλαπλά πεδία της βιολογικής έρευνας, όπως της κυτταρικής βιολογίας, της νευροβιολογίας, της γονιδιωματικής, της αναπτυξιακής βιολογίας και της γήρανσης, ενώ έχει αποτελέσει το μέσο για την επιτέλεση πολλών κομβικών ανακαλύψεων στο χώρο της βιολογίας. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η περιγραφή του μηχανισμού της απόπτωσης [260, 261], η εύρεση των πρώτων μεταλλαγών που ρυθμίζουν τη διάρκεια της ζωής [69, 262], η ανακάλυψη των πρώτων miRNA και του μηχανισμού RNA παρεμπόδισης (RNAi) [263, 264] και η εισαγωγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) ως μάρτυρα της γονιδιακής έκφρασης και του εντοπισμού πρωτεϊνών σε ζωντανούς οργανισμούς [265]. Επιπλέον, ο *C. elegans* αποτέλεσε τον πρώτο και μοναδικό μέχρι σήμερα πολυκύτταρο οργανισμό με πλήρως χαρακτηρισμένη κυτταρική γενεαλογία, τον πρώτο οργανισμό με πλήρως διαμορφωμένο

χάρτη διασυνδέσεων του νευρικού του συστήματος, καθώς και το πρώτο μετάζωο με πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα.

Μεταξύ των πλεονεκτημάτων που κατέστησαν το νηματώδη ένα τόσο διαδεδομένο οργανισμό μοντέλο συγκαταλέγονται το μικρό του μέγεθος, που φτάνει το πολύ το 1 χιλιοστό στα ενήλικα άτομα, ο μικρός χρόνος γενιάς, που προσεγγίζει τις τρεις ημέρες (βλ. §Α.4.2. Κύκλος ζωής του *C. elegans*) και η ευκολία της καλλιέργειας και της διατήρησής του στο εργαστήριο, παρέχοντάς του βακτήρια *E. coli* ως μοναδική τροφή, σε πιάτα με άγαρ, ή σε υγρές καλλιέργειες, σε ένα εύρος θερμοκρασιών 12°C-25°C. Τα άτομα του *C. elegans* είναι στη συντριπτική τους πλειοψηφία ερμαφρόδιτα (XX) και το καθένα διαθέτει τη δυνατότητα παραγωγής περίπου 300 απόγονων μέσω αυτογονιμοποίησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν σχετικά εύκολη την παραγωγή και τη διατήρηση μεγάλων και συγχρονισμένων πληθυσμών ισογενετικών ατόμων στο εργαστήριο, σε μικρό χώρο και με μικρό κόστος, ξεπερνώντας μάλιστα το πρόβλημα της ενδογαμίας που συνοδεύει τη διατήρηση ισογενετικών πληθυσμών αμφιγονικών οργανισμών μοντέλων και μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή καχεκτικών ατόμων, καθιστώντας αδύνατη τη μελέτη ποσοτικών φαινοτύπων, όπως η διάρκεια ζωής. Ταυτόχρονα, η τυχαία εμφάνιση αρσενικών (XO) σε ποσοστό περίπου 0,1%, λόγω του μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση, καθιστά εύκολη την παραγωγή διπλά μεταλλαγμένων στελεχών μέσω γενετικών διασταυρώσεων.

Πέραν της ευκολίας στην εργαστηριακή πρακτική όμως, η αυτογονιμοποιούμενη ερμαφρόδιτη φύση του και ο μικρός χρόνος γενιάς, καθιστούν το *C. elegans* ιδανικό μοντέλο και για την εφαρμογή τεχνικών τόσο πρόσθιας, όσο και ανάστροφης γενετικής ανάλυσης (forward/reverse genetics), καθώς διευκολύνουν σημαντικά την απομόνωση ατόμων που φέρουν νέες μεταλλαγές σε ομοζυγωτία μετά από τυχαία μεταλλαξογένεση, με χρήση χημικών ή ακτινοβολίας, ή κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση, π.χ. μέσω του πρόσφατα αναπτυσσόμενου σε σκουλήκια συστήματος CRISPR/CAS [266]. Ένα από τα μεγαλύτερα ίσως πλεονεκτήματα του νηματώδους, σε σχέση με άλλους διαδεδομένους οργανισμούς μοντέλα, αποτελεί η ευκολία στην εφαρμογή RNA παρεμπόδισης (RNAi), δηλαδή της χρήσης δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) προκειμένου να προκληθεί η αποσιώπηση του επιθυμητού γονιδίου. Η αποσιώπηση μέσω RNAi στον *C. elegans* μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους, όπως η απευθείας ένεση dsRNA, ή κατασκευών DNA που παράγουν dsRNA υπό τον έλεγχο υποκινητών του σκώληκα, τον εμποτισμό των ατόμων σε διάλυμα dsRNA, ή την κατανάλωση βακτηρίων *E. coli* που παράγουν το επιθυμητό dsRNA [267]. Λόγω της ευκολίας της, αλλά και της αποτελεσματικότητάς της, η τελευταία τεχνική αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μέθοδο για την επαγόμενη από RNAi αποσιώπηση, ενώ η ύπαρξη εμπορικά διαθέσιμων βακτηριακών βιβλιοθηκών που παράγουν dsRNA έναντι του συνόλου σχεδόν του γονιδιώματος, έχει καταστήσει τη διεξαγωγή γενετικών σαρώσεων κοινή και εύκολη εργαστηριακή πρακτική.

Από την άλλη πλευρά, η δυνατότητα μετασχηματισμού του νηματώδους μέσω μικροένεσης του επιθυμητού DNA στο συγκύτιο του άπω βραχίονα της γονάδας του (βλ. ανατομία του *C. elegans*) και η επακόλουθη ενσωμάτωσή του στον πυρήνα ενός ποσοστού των υπό ανάπτυξη γαμετών, καθιστά σχετικά γρήγορη και τη δημιουργία νέων διαγονιδιακών στελεχών, ενώ οι διάφορες παραλλαγές της τεχνικής αυτής που έχουν αναπτυχθεί, παρέχουν μεγάλη ευελιξία στο τελικό αποτέλεσμα. Η κλασική τεχνική

μετασηματισμού οδηγεί στη δημιουργία μεγάλων εξωχρωμοσωμικών συστοιχιών DNA, οι οποίες φέρουν πολλαπλά αντίγραφα του εισαγόμενου τμήματος DNA και κληρονομούνται σε μεγάλο βαθμό στις κυτταρικές διαιρέσεις, καθώς ομοιάζουν με τα ολοκεντρικά χρωμοσώματα του νηματώδους και αναγνωρίζονται από τη μιτωτική άτρακτο. Η μέθοδος αυτή οδηγεί συνήθως στην ισχυρή υπερέκφραση των εισαγόμενων διαγονιδίων, αλλά και στην εμφάνιση μωσαϊκισμού στα διαγονιδιακά άτομα, λόγω της μη κληρονόμησης της συστοιχίας σε όλες τις κυτταρικές διαιρέσεις και τη σίγαση του διαγονιδίου, κυρίως στη γονάδα, αλλά και σε άλλους ιστούς του ζώου [268, 269]. Το φαινόμενο του μωσαϊκισμού μπορεί να περιοριστεί προκαλώντας την ενσωμάτωση της εξωχρωμοσωμικής συστοιχίας στο γονιδίωμα μέσω της ακτινοβόλησης με ακτίνες γ ή υπεριώδη ακτινοβολία. Αντίθετα, μια ευρέως διαδεδομένη παραλλαγή της τεχνικής αυτής χρησιμοποιεί στελέχη που φέρουν ενσωματωμένο σε γνωστά σημεία στο γονιδίωμά τους το μεταθετό στοιχείο *Mos1* της μύγας *Drosophila*, προκειμένου να κατευθύνει την ενσωμάτωση ενός μόνο αντίγραφου του διαγονιδίου στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο, ενώ πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί και πρωτόκολλα που επιτρέπουν τη στόχευση οποιασδήποτε περιοχής του γονιδιώματος και την εισαγωγή ενός αντιγράφου της επιθυμητής αλληλουχίας σε αυτή, χρησιμοποιώντας το σύστημα CRISPR/CAS [266, 270, 271].

Το γονιδίωμα του *C. elegans* αποτελείται από περίπου 100Mb, οργανωμένο σε πέντε ζεύγη αυτοσωμικών (I-V) και ένα φυλετικών (X) ολοκεντρικών χρωμοσωμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν περίπου 20.000 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Από αυτά, τουλάχιστον το 38% προβλέπεται ότι έχει κάποιο ορθόλογο στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ και αντίστροφα, το 60%-80% των γονιδίων του ανθρώπου έχει κάποιο ορθόλογο στο γονιδίωμα του *C. elegans* [272, 273]. Τα γονίδια του νηματώδους εμφανίζουν τυπική ευκαρυωτική δομή, με 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές και ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης αποτελούμενα από ιντρόνια και εξώνια, αλλά έχουν γενικά μικρότερο μέγεθος (3kb κατά μέσο όρο), κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους της πλειοψηφίας των ιντρονίων [274]. Ένα μικρό ποσοστό των γονιδίων του νηματώδους (περίπου 15%) είναι οργανωμένο σε οπερόνια, τα οποία όμως διαφέρουν από αυτά των βακτηρίων καθώς μετά την επεξεργασία τους οδηγούν στην παραγωγή ξεχωριστών μορίων mRNA [275]. Επιπλέον, αν και παραδοσιακά οι νηματώδεις θεωρείται ότι στερούνται λειτουργικής μεθυλίωσης, πρόσφατα δεδομένα έχουν αποκαλύψει ότι το DNA του *C. elegans* εμφανίζει κάποιο βαθμό μεθυλίωσης, έστω και μειωμένο σε σχέση με άλλους ευκαρυώτες [276]. Ο ομοιότητες αυτές, τόσο στη δομή, όσο και στη λειτουργία του γονιδιώματος του νηματώδους με αυτό των ανώτερων ευκαρυωτών, καθιστούν το νηματώδη ένα ενδεδειγμένο μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας των μετάρων, παρά τη μεγάλη εξελικτική απόσταση που τον χωρίζει από τα θηλαστικά και τον άνθρωπο.

Πέρα από τα πολλαπλά του πλεονεκτήματα στις γενετικές μελέτες, ο *C. elegans* διαθέτει και επιπλέον χαρακτηριστικά που τον καθιστούν ένα εξαιρετικά ισχυρό μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας των ευκαρυωτών, το σημαντικότερο εκ των οποίων είναι η διαφάνεια του σώματός του. Το χαρακτηριστικό αυτό επιτρέπει την απευθείας παρατήρηση της ανάπτυξης και την επίδραση που έχουν σε αυτή διάφορες μεταλλαγές ή περιβαλλοντικοί παράγοντες στο επίπεδο του κυττάρου, αλλά εντός του πλαισίου ενός ζωντανού οργανισμού, καθώς και το χαρακτηρισμό κυτταρικών και υποκυτταρικών δομών, με τη χρήση απλής μικροσκοπίας Nomarski/DIC (Differential Interference Contrast).

Επιπλέον, καθιστά δυνατή τη χρήση φθορίζοντων μορίων για τη σήμανση ιστών, κυττάρων ή πρωτεϊνών και την παρατήρηση της συμπεριφοράς τους στα πλαίσια ενός ζωντανού οργανισμού, βοηθώντας σημαντικά στη διαλεύκανση αναπτυξιακών διαδικασιών, κυτταρικών λειτουργιών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Χάρη στο χαρακτηριστικό αυτό, τόσο η ανατομία του νηματώδους, όσο και η γενεαλογία όλων των κυττάρων έχει διαλευκανθεί πλήρως και έχει βρεθεί να παρουσιάζει ελάχιστη ποικιλομορφία στα πλαίσια ενός ισογενετικού πληθυσμού, διευκολύνοντας στο μέγιστο τις μελέτες αναπτυξιακής βιολογίας [277]. Ένα ενήλικο ερμαφρόδιτο άτομο του νηματώδους διαθέτει 959 μεταμιτωτικά κύτταρα, τα οποία, παρά την απλότητα του οργανισμού, είναι οργανωμένα σε σαφώς καθορισμένους ιστούς. Ακολουθεί μία σύντομη περιγραφή της βασικής ανατομίας του νηματώδους.

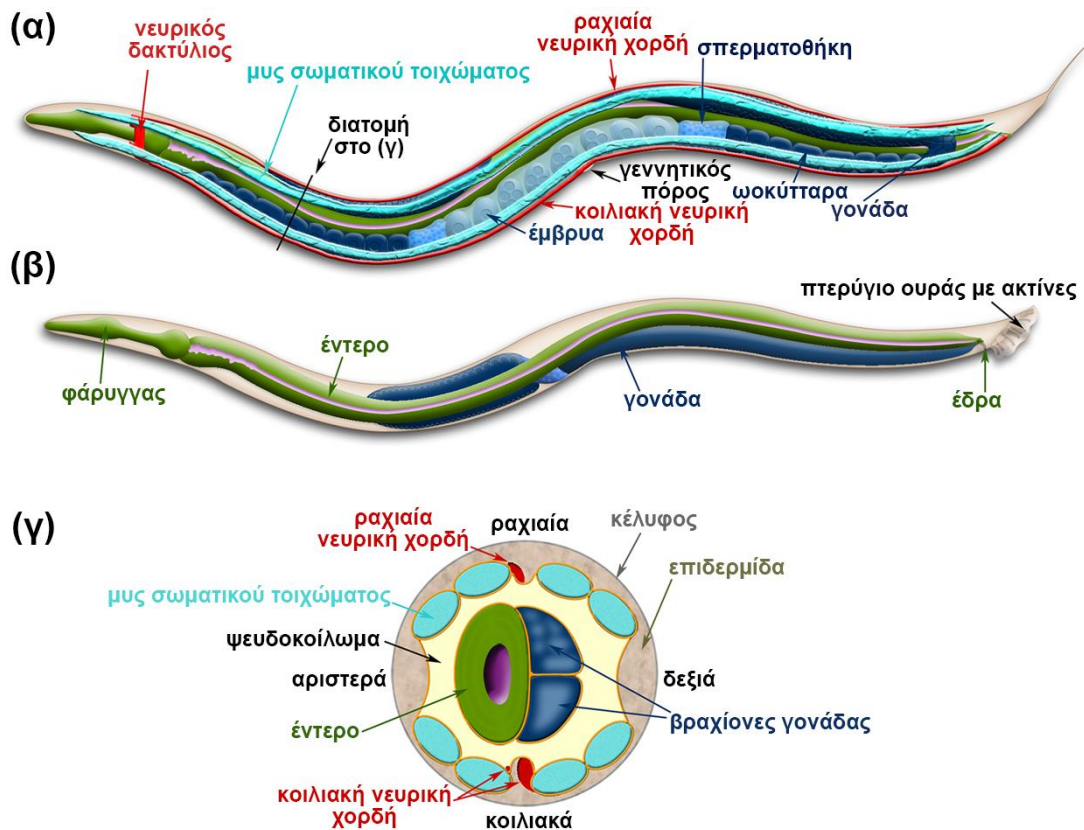
A.4.1. Ανατομία του *C. elegans*

Ομοιάζοντας με τους υπόλοιπους νηματώδεις, ο *C. elegans* διαθέτει ένα μονοκόμματο κυλινδρικό σώμα, που καταλήγει σε κωνικό σχήμα στις δύο του άκρες, ενώ η οργάνωση του σώματός του προσομοιάζει με δύο ομόκεντρους, αμφίπλευρα συμμετρικούς σωλήνες, οι οποίοι διαχωρίζονται μεταξύ τους από το γεμάτο με υγρό ψευδοκοίλωμα. Ο εξωτερικός σωλήνας, γνωστός και ως σωματικό τοίχωμα, αποτελείται από το κέλυφος, την επιδερμίδα (συχνά αποκαλούμενη και υποδερμίδα), το εκκριτικό σύστημα, τους νευρώνες και τους μυς, ενώ ο εσωτερικός από τον φάρυγγα, το έντερο και τη γονάδα στα ενήλικα άτομα (Εικόνα A11). Επιπλέον, ο *C. elegans* διαθέτει τρία ζεύγη κυττάρων μέσα στο ψευδοκοίλωμα, τα κοιλωματοκύτταρα, τα οποία λειτουργούν ως καθαριστές της σωματικής κοιλότητας [278]. Τα κύτταρα αυτά συμπεριφέρονται παρόμοια με τα μακροφάγα των θηλαστικών, αν και βρίσκονται σε σταθερές θέσεις, εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα ενδοκύτωσης και η λειτουργία τους θεωρείται ότι συνίσταται στην απομάκρυνση διαφόρων υλικών από το ψευδοκοίλωμα του οργανισμού.

Το κέλυφος του *C. elegans* συνιστά ένα προστατευτικό στρώμα εξειδικευμένης εξωκυττάριας ουσίας, που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο, λιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες και καθορίζει το σχήμα του οργανισμού, μέσω συνδέσεων με την επιδερμίδα και τους μυς. Το κέλυφος αυτό περιβάλλει το ζώο, καλύπτοντας εσωτερικά τον φάρυγγα και την έδρα, ενώ διαθέτει συγκεκριμένα ανοίγματα που επιτρέπουν την επικοινωνία των εσωτερικών συστημάτων με το περιβάλλον, όπως ο εκκριτικός πόρος, ο γεννητικός πόρος, καθώς και ανοίγματα στην κεφαλή και την ουρά του ζώου, μέσω των οποίων προσλαμβάνουν ερεθίσματα πολλοί αισθητήριοι νευρώνες. Η εξωκυττάρια ουσία που σχηματίζει το κέλυφος εκκρίνεται από τα υποκείμενα επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας, τα οποία υφίστανται μια σειρά συντήξεων κατά την ανάπτυξη, δημιουργώντας ένα μεγάλο κύριο συγκύτιο στο κέντρο του νηματώδους (hyr7), πέντε μικρότερα συγκύτια στο κεφάλι (hyr1-5) και τρία μονοπυρινικά κύτταρα (hyr8,9,11) παρακείμενα σε ένα ακραίο συγκύτιο στην ουρά (hyr10) [279]. Στις δύο πλάγιες πλευρές του ζώου βρίσκεται ενσωματωμένη πάνω στο συγκύτιο μια σειρά εξειδικευμένων επιδερμικών κυττάρων, τα κύτταρα ραφής (Seam cells), τα οποία εμφανίζουν ένα πρότυπο διαιρέσεων ανάλογο με αυτό των βλαστικών κυττάρων κατά τη μετα-εμβρυϊκή ανάπτυξη (βλ. §A.4.2. Κύκλος ζωής του *C. elegans*) και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία εξειδικευμένων δομών πτερυγίου στο κέλυφος των ενήλικων ατόμων (Alae). Μία επιπλέον κατηγορία επιθηλιακών κυττάρων συνιστούν τα

κύτταρα διεπαφής (Interfacial cells), τα οποία εντοπίζονται σε σημεία επαφής της επιδερμίδας με τους υποκείμενους ιστούς και συχνά αποτελούν δομικά και λειτουργικά ενδιάμεσα μεταξύ των δύο διαφορετικών τύπων ιστών, διευκολύνοντας την αλληλεπίδρασή τους [279]. Πέρα από τη μηχανική υποστήριξη και την παθητική παροχή ενός φραγμού που αποτρέπει τη μόλυνση από παθογόνα, η επιδερμίδα διαδραματίζει και ενεργό ρόλο στη φυσιολογία του νηματώδους, συμμετέχοντας σε διαδικασίες όπως η ενδοκρινική σηματοδότηση, η αποθήκευση λιπών, η ομοιόσταση ιόντων, η ανάπτυξη και η λειτουργία του νευρικού συστήματος [279].

Εσωτερικά της επιδερμίδας, εντοπίζονται 95 ρομβοειδή κύτταρα των μυών του σωματικού τοιχώματος, διατεταγμένα ως εναλλάξ ζεύγη σε τέσσερις σειρές, δύο ραχιαίες και δύο κοιλιακές, που διατρέχουν το σώμα σε όλο του το μήκος και διαχωρίζονται από την επιδερμίδα με μία βασική μεμβράνη. Η συγχρονισμένη σύσπαση και χαλάρωση των μυϊκών αυτών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη χαρακτηριστική κυματοειδή κίνηση του *C. elegans*. Οι μύες του νηματώδους είναι γραμμωτοί και κάθε κύτταρο αποτελείται από πολλά σαρκομερίδια, αλλά σε αντίθεση με τους μύες των σπονδυλόζων, δεν προέρχονται από σύντηξη κύτταρων, με αποτέλεσμα να διαθέτουν ένα μόνο πυρήνα [280]. Το πρότυπο της νεύρωσης των μυών είναι επίσης ασυνήθιστο, καθώς τα μυϊκά κύτταρα δημιουργούν προεκβολές προς τη ραχιαία και την κοιλιακή νευρική χορδή, προκειμένου να δεχτούν συνάψεις από τους διερχόμενους άξονες των κινητικών νευρώνων, αντί για τη συνήθη προεκβολή αξόνων από τους νευρώνες προς τα μυοκύτταρα [281].



Εικόνα A11 | Ανατομία του *C. elegans*. (α) Πλευρική όψη των κύριων ανατομικών χαρακτηριστικών ερμαφρόδιτου ατόμου. Περιλαμβάνονται μόνο οι δύο από τις τέσσερις σειρές μυϊκών κυττάρων (β) Πλευρική όψη των κύριων ανατομικών χαρακτηριστικών αρσενικού ατόμου. Το νευρικό σύστημα και οι μυς παραλείπονται, αποκαλύπτοντας πιο καθαρά το έντερο και τον φάρυγγα. (γ) Διατομή της εμπρόσθιας περιοχής ερμαφρόδιτου ατόμου. Η ακριβής περιοχή σημειώνεται με μαύρη γραμμή στο (α).

Τροποποιημένο από Corsi, A.K. *et al.* Genetics, 2015. 200(2): p. 387-407.

Όσον αφορά στο νευρικό σύστημα, ο νηματώδης διαθέτει 302 νευρώνες, που ανήκουν σε δύο ξεχωριστά και ανεξάρτητα μεταξύ τους συστήματα: ένα μεγάλο, σωματικό νευρικό σύστημα, αποτελούμενο από 282 νευρώνες) και ένα μικρό φαρυγγικό νευρικό σύστημα, αποτελούμενο από 20 νευρώνες, με μοναδική σύνδεση μεταξύ των δύο συστημάτων ένα ζεύγος διάμεσων νευρώνων [277, 282-284]. Τα δύο αυτά συστήματα διαφέρουν στην τοπολογία τους, καθώς οι σωματικοί νευρώνες και οι αποφυάδες τους εντοπίζονται κυρίως μεταξύ της επιδερμίδας και των μυών και μοιράζονται με την επιδερμίδα τη βασική μεμβράνη που τους χωρίζει από τους μυς, ενώ αντίθετα οι φαρυγγικοί νευρώνες βρίσκονται μεταξύ των μυών του φάρυγγα και δε διαχωρίζονται με κάποια δομή από αυτούς. Με βάση τη λειτουργία τους, οι νευρώνες του *C. elegans* δύναται να χαρακτηριστούν ως κινητικοί, αισθητήριοι, διάμεσοι ή πολυτροπικοί, με τους τελευταίους να επιτελούν λειτουργίες που εμπίπτουν σε παραπάνω από μία κατηγορίες. Επιπλέον, ο νηματώδης διαθέτει και αρκετά υποστηρικτικά κύτταρα, παρόμοια με τα κύτταρα γλοίας, τα οποία συσχετίζονται κυρίως με αισθητήριους νευρώνες [285]. Η πλειονότητα των σωμάτων των νευρικών κυττάρων απαντάται σε αμφίπλευρα συμμετρικά ζεύγη και εντοπίζεται ομαδοποιημένη σε γάγγλια στο κεφάλι, την κοιλιακή νευρική χορδή και την ουρά, ενώ οι περισσότεροι νευρώνες εμφανίζουν απλή δομή με μία ή δύο μονοκόμματα

αποφυάδες να εξέρχονται από το σώμα και να ακολουθούν σχεδόν πανομοιότυπη τροχιά μεταξύ των διαφορετικών ατόμων, με εξαίρεση λίγα κύτταρα που εμφανίζουν περίπλοκες διακλαδώσεις των αποφυάδων τους [286]. Παρόλο που υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες οι αποφυάδες των νευρώνων του νηματώδους χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για την πρόσληψη ερεθισμάτων (δενδρίτες) ή για τη μετάδοσή τους (νευράξονες), στις περισσότερες περιπτώσεις δεν μπορούν να διαχωριστούν σε δενδρίτες και νευράξονες, όπως στα σπονδυλόζωα, καθώς αποτελούν τόσο δέκτες, όσο και δημιουργούς συνάψεων και αναφέρονται ως νευρίτες. Ως συνέπεια, οι συνδέσεις μεταξύ τους δημιουργούνται κυρίως *en passant*, δηλαδή πλευρικές, καθώς οι νευρίτες περνούν ο ένας δίπλα από τον άλλο και όχι μέσω τελικών νευραξονικών απολήξεων, όπως συμβαίνει στο νευρικό σύστημα των σπονδυλόζωων [281]. Συνολικά, οι νευρώνες του νηματώδους δημιουργούν πάνω από 7.000 χημικές συνάψεις και χασμοσυνδέσμους, χρησιμοποιώντας πολλούς από τους πλέον κοινούς νευροδιαβιβαστές, όπως η ακετυλοχολίνη, το γλουταμικό, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη [281, 287].

Γενικά, η λειτουργία του νευρικού συστήματος παρέχει στο νηματώδη τη δυνατότητα αντίληψης μίας ευρείας ποικιλίας ερεθισμάτων από το περιβάλλον του (π.χ. μηχανικά ερεθίσματα, χημικά, οσμές, θερμότητα, φως, διαθεσιμότητα οξυγόνου) και την απόκριση σε αυτά, μέσω της εκδήλωσης απλών και σύνθετων συμπεριφορών, όπως ο χημειοτακτισμός, ο θερμοτακτισμός, η μνήμη και μάθηση, και η αποφυγή τοξικών ή βλαβερών ουσιών και παθογόνων οργανισμών. Παράλληλα, η έντονη νευροενδοκρινική δραστηριότητα που παρατηρείται στο νηματώδη, συμβάλλει στη ρύθμιση πολλών πλευρών της φυσιολογίας ολόκληρου του οργανισμού, ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα της τροφής και ο υπερπληθυσμός. Παρά τις όποιες παρατηρούμενες μικροδιαφορές, οι βασικές αρχές της οργάνωσης, της λειτουργίας και της διαφοροποίησης του νευρικού συστήματος είναι σε μεγάλο βαθμό όμοιες μεταξύ του *C. elegans* και ανώτερων ευκαρυωτών. Αντίθετα όμως, η πολυπλοκότητα του συστήματος και ο αριθμός των κυττάρων αυξάνουν δραματικά σε ανώτερους οργανισμούς, με τη μύγα *Drosophila* να διαθέτει περίπου 100.000, τον ποντικό 71.000.000 και τον άνθρωπο 86.000.000.000 νευρικά κύτταρα, σε σύγκριση με τα 302 νευρικά κύτταρα του νηματώδους. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τον *C. elegans* ιδανικό μοντέλο για μελέτες νευροβιολογίας, που έχει ήδη συμβάλει τα μέγιστα στην ταυτοποίηση γονιδίων και μηχανισμών που εμπλέκονται σε κεντρικές διαδικασίες του νευρικού συστήματος, όπως η δημιουργία και η διαφοροποίηση των νευρώνων, η μετανάστευση πρόδρομων κυττάρων, η δημιουργία συνάψεων, η μετάδοση του σήματος, ο εκφυλισμός των νευρώνων, η αναγέννηση των αποφυάδων και η λειτουργία της γλοίας [288-290]. Παράλληλα έχει αποτελέσει και πολύτιμο εργαλείο στην μελέτη απλών και σύνθετων συμπεριφορών, όπως ο χημειοτακτισμός και ο θερμοτακτισμός, η κοινωνική σίτιση, η συνειρμική ή μη συνειρμική μάθηση και η μνήμη [291, 292].

Η ομάδα των ιστών που εντοπίζονται στο σωματικό τοίχωμα του *C. elegans* ολοκληρώνεται με το εκκριτικό σύστημα, αποτελούμενο από πέντε κύτταρα: το εκκριτικό κύτταρο, το σώμα του οποίου εντοπίζεται στο κεφάλι του νηματώδους και συνδέεται με δύο εκκριτικά κανάλια που διατρέχουν το σώμα του ζώου, σχηματίζοντας το χαρακτηριστικό σχήμα Η, το κύτταρο-αγωγό, το κύτταρο-πόρο και ένα ζεύγος συντηγμένων αδενοκυττάρων. Η λειτουργία του εκκριτικού συστήματος συνίσταται στην οσμορύθμιση

και την απέκκριση αποβλήτων μέσω του εκκριντικού πόρου, ανάλογη με τη λειτουργία των νεφρών των θηλαστικών.

Εσωτερικά του ψευδοκοιλώματος του οργανισμού εντοπίζεται το πεπτικό του σύστημα, αποτελούμενο από το φάρυγγα και το έντερο. Ο φάρυγγας του νηματώδους είναι ένα σχεδόν αυτόνομο όργανο που αποτελείται από 9 επιθηλιακά, 20 μυϊκά, 9 διαχωριστικά κύτταρα συνδετικής φύσης, 20 νευρώνες και 4 αδενοκύτταρα, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον ως μοντέλο για τη μελέτη της οργανογένεσης [293]. Στο πρόσθιο άκρο του συνδέεται με τη στοματική κοιλότητα και στο οπίσθιο με το έντερο, από το οποίο διαχωρίζεται δομικά μέσω 6 κυττάρων που λειτουργούν ως βαλβίδα. Η λειτουργία του φάρυγγα συνίσταται στην άντληση των βακτηρίων από το περιβάλλον, το άλεσμα και τη μεταφορά τους στο έντερο, όπου επιτελείται η πέψη. Η συμπεριφορά άντλησης από το φάρυγγα ρυθμίζεται από εξωτερικά ερεθίσματα, όπως η διαθεσιμότητα και η ποιότητα της τροφής, ενώ αναστέλλεται ως απόκριση στο άγγιγμα [294-296]. Συνδεδεμένο στην οπίσθια πλευρά του φάρυγγα βρίσκεται το έντερο, που στο νηματώδη επιτελεί πολλές λειτουργίες, αντίστοιχες με αυτές διαφόρων οργάνων των ανώτερων ευκαρυωτών, οι κυριότερες από τις οποίες είναι η πέψη της τροφής και η απορρόφηση των θρεπτικών, η σύνθεση και η αποθήκευση μακρομορίων, ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, η επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης σε παθογόνα και η σύνθεση της λεκίθου των ωοκυττάρων [297-299]. Στην οπίσθια άκρη του, το έντερο είναι συνδεδεμένο με την ορθική βαλβίδα, η οποία ελέγχει την αποβολή των περιεχομένων του εντέρου στο περιβάλλον διαμέσου του ορθού και της έδρας. Αποτελείται από 20 πολυπλοειδή επιθηλιακά κύτταρα, τοποθετημένα σε αμφίπλευρα συμμετρικά ζευγάρια, που σχηματίζουν ένα μακρύ σωλήνα γύρο από τον αυλό και διατρέχουν το σώμα του νηματώδους.

Εκτός από το πεπτικό, εσωτερικά του ψευδοκοιλώματος, βρίσκεται και το αναπαραγωγικό σύστημα του *C. elegans*, αποτελούμενο από τη γαμετική σειρά κυττάρων, τη σωματική γονάδα και το σύστημα εναπόθεσης των αυγών. Η σωματική γονάδα εντοπίζεται στο κέντρο του σώματος, παρακείμενη στο έντερο σχηματίζοντας δύο αντικατοπτρικά συμμετρικούς σωλήνες σχήματος U, αποτελούμενους από το κύτταρο του απομακρυσμένου άκρου (Distal Tip Cell) – DTC), το στρώμα της γονάδας, τη σπερματοθήκη, τη βαλβίδα σπερματοθήκης-μήτρας και τη μήτρα. Οι δομές αυτές καλύπτουν, προστατεύουν και σε πολλές περιπτώσεις ρυθμίζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων της γαμετικής σειράς, υπεύθυνα για την παραγωγή τόσο των αρσενικών γαμετών (σπερματοζώα), όσο και των θηλυκών γαμετών (ωοκύτταρα) [300-302]. Τα σπερματοζώα παράγονται κατά το τέταρτο στάδιο προνύμφης της μετα-εμβρυϊκής ανάπτυξης (L4, βλ. §A.4.2. Κύκλος ζωής του *C. elegans*), αποθηκεύονται στη σπερματοθήκη και χρησιμοποιούνται για τη γονιμοποίηση των ωοκυττάρων που παράγονται κατά την ενήλικη ζωή, ως απόκριση στην παρουσία σπερματοζώων [303]. Ο αριθμός των αρσενικών γαμετών αποτελεί επομένως τον παράγοντα που καθορίζει τον αριθμό των απογόνων του νηματώδους. Η γαμετική σειρά των ενήλικων ατόμων εμφανίζει πολικότητα, με το απώτερο άκρο να διατηρεί έναν μитωτικό πληθυσμό κυττάρων και τον πληθυσμό των μειωτικών κυττάρων να εκτείνεται προς το εγγύς άκρο. Τα μειωτικά κύτταρα εμφανίζουν επίσης μια βαθμιδωτή οργάνωση, προχωρώντας στα διαδοχικά στάδια της μείωσης καθώς μετακινούνται προς το εγγύς άκρο της γονάδας. Η ωρίμανση και η γονιμοποίηση των

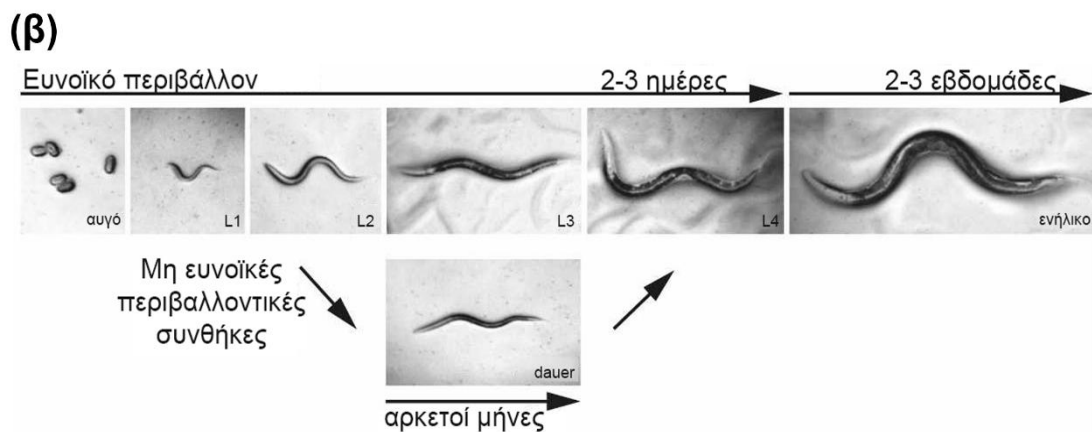
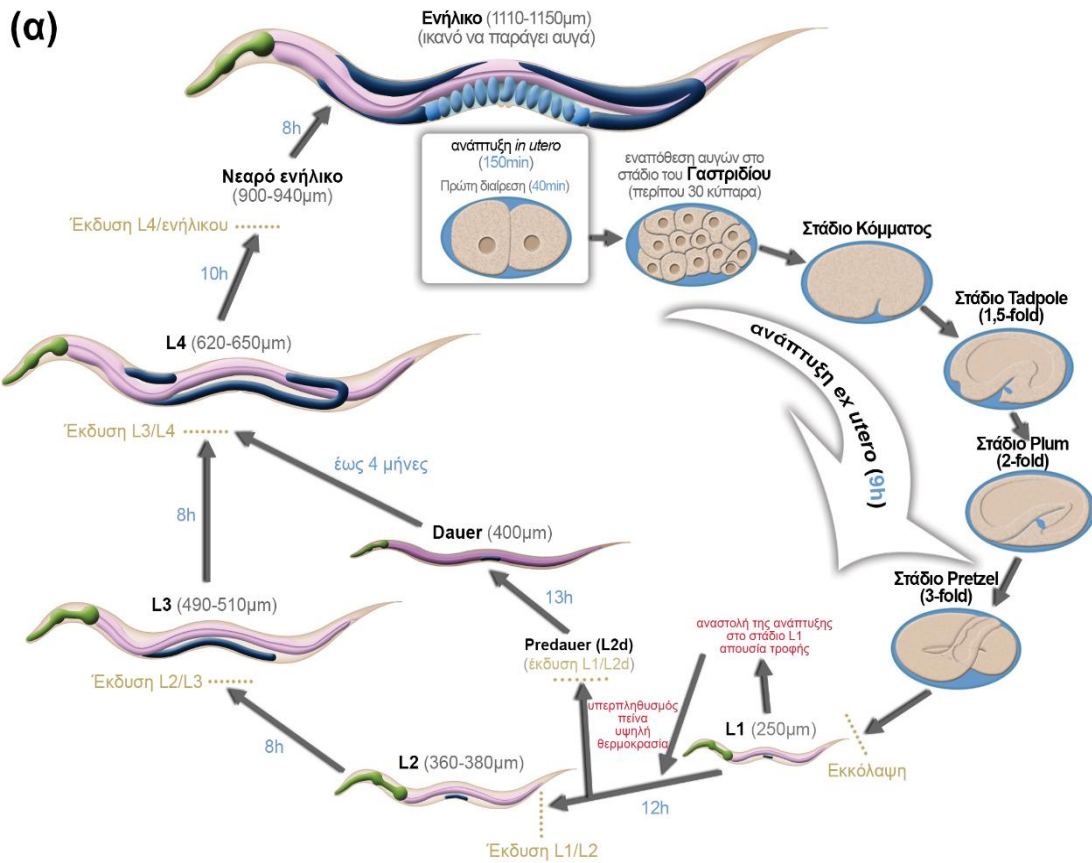
ωοκυττάρων λαμβάνει χώρα στο εγγύς άκρο του στρώματος της γονάδας, όπου έρχονται σε επαφή με τη σπερματοθήκη και ακολουθείται από το πέρασμα του νεοσχηματισμένου εμβρύου στη μήτρα, διαμέσου της βαλβίδας σπερματοθήκης-μήτρας. Η μήτρα του νηματώδους αποτελεί ένα θάλαμο επιθηλιακών κυττάρων μεταξύ των εγγύς βραχιόνων της γονάδας, στην κοιλιακή πλευρά των ατόμων, που μαζί με τον γεννητικό πόρο, τους συσχετιζόμενους μυς και τους υπεύθυνους νευρώνες, συνιστούν το σύστημα εναπόθεσης των αυγών. Η διαφάνεια του σώματος του *C. elegans*, που επιτρέπει την απευθείας παρατήρηση των σταδίων της μείωσης και της γονιμοποίησης, έχει καταστήσει τη γαμετική του σειρά ιδιαίτερα δημοφιλές μοντέλο για τη μελέτη της ανάπτυξης των γαμετών, της γονιμοποίησης, της βιολογίας των βλαστοκυττάρων και της καρκινογένεσης [304]. Επιπλέον, η μελέτη της μορφογένεσης του γεννητικού πόρου έχει προσφέρει πολλά νέα δεδομένα σχετικά με τη λειτουργία μονοπατιών που εμπλέκονται στη χωρική και χρονική ρύθμιση αναπτυξιακών γεγονότων, όπως τα μονοπάτια Notch, EGF, και Wnt [305].

A.4.2. Ο κύκλος ζωής του *C. elegans*

Ο κύκλος ζωής του *C. elegans* περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια: την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη μετα-εμβρυϊκή ανάπτυξη και την ενήλικη ζωή. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη διαρκεί περίπου 12 ώρες στους 20°C και ξεκινά στη μήτρα του μητρικού ατόμου, ακολουθώντας τη γονιμοποίηση, μετά τη γαστριδίωση όμως, στο στάδιο των 30 περίπου κυττάρων, το έμβρυο εναποτίθεται στο περιβάλλον, όπου ολοκληρώνει την ανάπτυξή του. Η ολοκλήρωση της εμβρυϊκής ανάπτυξης ακολουθείται από την εκκόλαψη του αυγού και την ανάδυση από αυτό μίας νεαρής προνύμφης (προνύμφη L1), αποτελούμενης από 558 κύτταρα, η οποία διαθέτει διαμορφωμένους και λειτουργικούς σωματικούς ιστούς, που την καθιστούν ικανή να αναζητήσει και να καταναλώσει τροφή, αλλά δε δύναται να αναπαραχθεί, καθώς δε διαθέτει αναπτυγμένη γονάδα. Η παρουσία της τροφής στο περιβάλλον επάγει την έναρξη του προγράμματος της μετα-εμβρυϊκής ανάπτυξης, περίπου τρεις ώρες μετά την εκκόλαψη, το οποίο εκτυλίσσεται διαμέσου τεσσάρων προνυμφικών σταδίων (L1-L4), προκειμένου να προκύψει το ενήλικο άτομο (Εικόνα A12). Κατά τη διάρκεια του προγράμματος αυτού, 53 κύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται, οδηγώντας στο σχηματισμό της γονάδας και του αναπαραγωγικού συστήματος, αλλά και σε προσθήκες και αναδιοργανώσεις των κυττάρων στην επιδερμίδα, τους μυς και το νευρικό σύστημα. Το τέλος κάθε προνυμφικού σταδίου συνοδεύεται από μία έκδυση, κατά την οποία η επιδερμίδα εκκρίνει ένα νέο κέλυφος και το παλιό αποβάλλεται.

Οι μεταβάσεις του νηματώδους από στάδιο σε στάδιο κατά τη μετα-εμβρυϊκή ανάπτυξη έχουν σχετικά ήπιο χαρακτήρα, καθώς η προνύμφη μεγαλώνει συνεχώς σε μέγεθος, χωρίς μεγάλες αλλαγές στη μορφολογία της. Πριν από κάθε έκδυση παρατηρείται μία περίοδος λήθαργου, κατά την οποία τα άτομα παραμένουν σε μία κατάσταση παρόμοια με τον ύπνο των θηλαστικών, ενώ λαμβάνει χώρα η αλλαγή του κελύφους. Μετά την ολοκλήρωση της έκδυσης, τα άτομα επιστρέφουν στην αναζήτηση και την κατανάλωση τροφής και η ανάπτυξη συνεχίζεται. Μέχρι το τέταρτο προνυμφικό στάδιο (L4), περίπου 400 κύτταρα έχουν προστεθεί στην επιδερμίδα, το νευρικό και το μυϊκό σύστημα, ενώ από την τελευταία έκδυση, στο τέλος του σταδίου αυτού, αναδύεται ένα ενήλικο,

αναπαραγωγικά ώριμο άτομο, μεγέθους περίπου 1 χιλιοστού, αποτελούμενο από 959 σωματικά κύτταρα και πληθώρα γαμετικών κυττάρων. Αν και το ενήλικο άτομο μεγαλώνει περαιτέρω σε μέγεθος στη διάρκεια της ζωής του, τα σωματικά του κύτταρα είναι μεταμιτωτικά και οι μόνες κυτταρικές διαιρέσεις που συμβαίνουν αφορούν στη γαμετική σειρά των κυττάρων. Η διαδικασία της μετα-εμβρυϊκής ανάπτυξης διαρκεί περίπου 2 ημέρες στους 20°C, ο ρυθμός της όμως εξαρτάται σε μεγάλο από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και σχεδόν διπλασιάζεται με μία αύξηση της τάξεως των 10°C. Τα ενήλικα άτομα ξεκινούν να εναποθέτουν αυγά λίγες μόλις ώρες μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξής τους και συνεχίζουν να παράγουν απογόνους για περίπου μία εβδομάδα. Μετά το πέρας της αναπαραγωγικής περιόδου, τα άτομα του νηματώδους συνεχίζουν τη ζωή τους ως μετα-αναπαραγωγικά ενήλικα για δύο με τρεις επιπλέον εβδομάδες. Η συνολική διάρκεια της ενήλικης ζωής του νηματώδους είναι επίσης επιρρεπής σε αλλαγές στη θερμοκρασία, φτάνοντας κατά μέσο όρο τις 18-20 ημέρες στους 20°C, αλλά περίπου τις μισές στους 25°C.



Εικόνα A12 | Ο κύκλος ζωής του *C. elegans* στους 22°C. (α) Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής. Η γονιμοποίηση γίνεται στα 0min. Οι μπλε αριθμοί δίπλα από τα βέλη αντιστοιχούν στο χρονικό διάστημα που τα άτομα παραμένουν σε κάθε στάδιο. Ο χρόνος αυτός εξαρτάται σε μεγάλο από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και σχεδόν διπλασιάζεται με μία αύξηση της τάξεως των 10°C. Το τυπικό μέγεθος των ατόμων αναγράφεται δίπλα σε κάθε στάδιο σε μm. (β) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του νηματώδους σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο, στην κλίμακα του χρόνου.

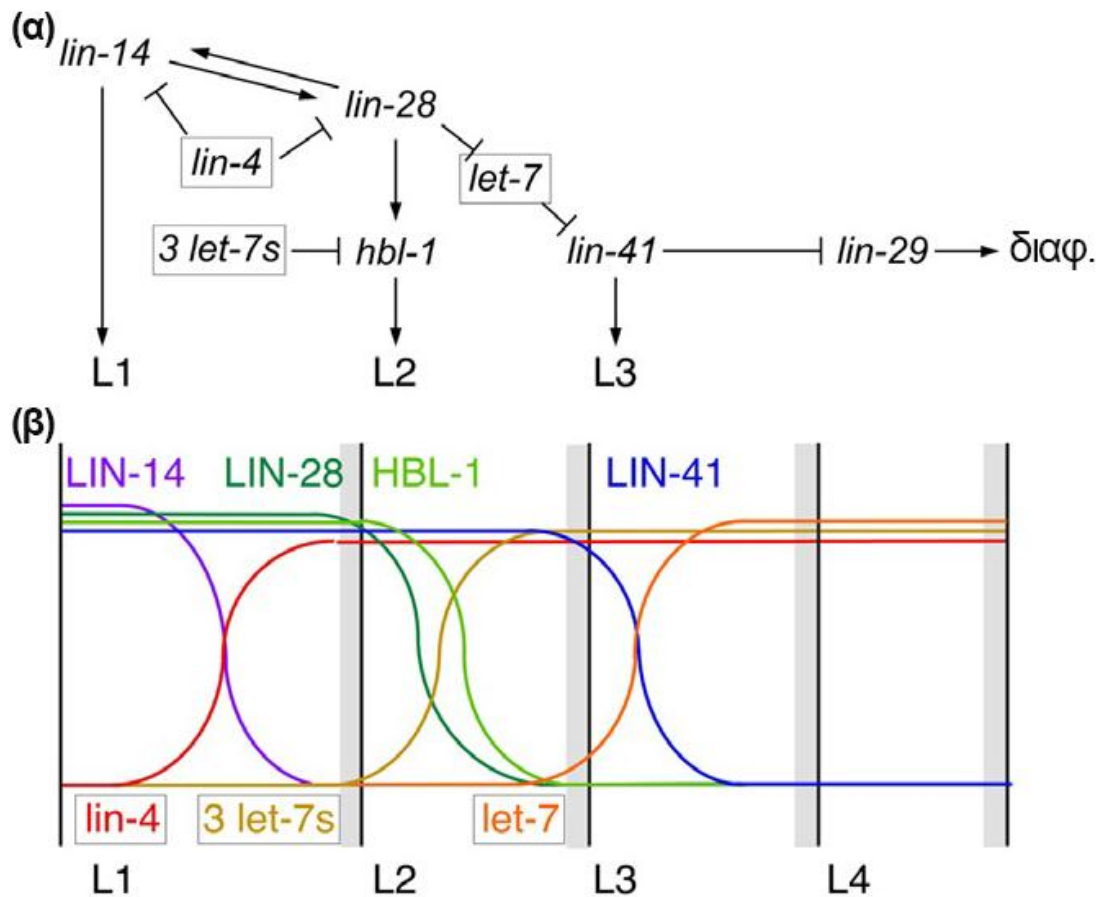
Τροποποιημένο από www.wotmatlas.com και Fielenbach, N. and A. Antebi. Genes Dev, 2008. 22(16): p. 2149-65.

Η εκκόλαψη των αυγών του νηματώδους απουσία τροφής από την άλλη προκαλεί την αναστολή της έναρξης του προγράμματος μετα-εμβρυϊκής ανάπτυξης, έχοντας ως αποτέλεσμα την παύση της ανάπτυξης στο πρώτο προνυμφικό στάδιο L1. Οι προνύμφες αυτές μπορούν να επιβιώσουν υπό αυτές τις συνθήκες για δύο με τρεις εβδομάδες, εμφανίζοντας ταυτόχρονα αυξημένη ανθεκτικότητα στο περιβαλλοντικό στρες, αν και δεν παρουσιάζουν κάποια μορφολογική αλλαγή σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες L1 προνύμφες [306]. Επιπλέον, κάτω από συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας τροφής, υπερπληθυσμού ή αυξημένης θερμοκρασίας, οι νεαρές προνύμφες έχουν τη δυνατότητα

να μεταβούν σε ένα μορφολογικά διακριτό τύπο προνύμφης, την επονομαζόμενη προνύμφη dauer, εξειδικευμένη για μακροχρόνια επιβίωση κάτω από μη ευνοϊκές για την ανάπτυξη, στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες [307]. Η αρχική απόφαση για αυτή τη μετάπτωση λαμβάνεται κατά το πρώτο προνυμφικό στάδιο L1, οι μορφολογικές αλλαγές όμως ουσιαστικά γίνονται αντιληπτές στο δεύτερο προνυμφικό στάδιο, που στην περίπτωση αυτή χαρακτηρίζεται ως L2d. Ανάλογα με τη βελτίωση ή όχι των περιβαλλοντικών συνθηκών, οι προνύμφες L2d είτε επανέρχονται σε φυσιολογική ανάπτυξη, σχηματίζοντας προνύμφες L3, είτε προχωρούν στο σχηματισμό προνυμφών dauer αντίστοιχα. Κατά την παραμονή των ατόμων στο στάδιο dauer η σίτιση αναστέλλεται επ' άοριστο και η κινητικότητα τους είναι σημαντικά μειωμένη. Οι σημαντικότερες μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι η μεγάλη αύξηση της αναλογίας μήκους/πλάτους, που οδηγεί στην παρουσία εξαιρετικά λεπτών ατόμων, ο σχηματισμός ενός ιδιαίτερα παχέος, εξειδικευμένου κελύφους, το σφράγισμα της στοματικής κοιλότητας και η συρρίκνωση του φάρυγγα και του εντέρου. Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες βελτιωθούν, η μορφολογία σταδιακά αποκαθίσταται, τα άτομα αρχίζουν να τρέφονται και τελικά επανέρχονται στη φυσιολογική ανάπτυξη, σχηματίζοντας φυσιολογικές προνύμφες σταδίου L4, μέσα σε λίγες ώρες. Ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των προνυμφών dauer είναι ότι θεωρούνται μη γηράσκουσες, καθώς ο χρόνος που τα άτομα παραμένουν στη μορφή αυτή δεν επηρεάζει τη διάρκεια της ακόλουθης ενήλικης ζωής τους.

Τα αναπτυξιακά γεγονότα που χαρακτηρίζουν τη μετάβαση από το ένα προνυμφικό στάδιο στο επόμενο, συντονίζονται μεταξύ τους, αλλά και με την αντίστοιχη έκδυση, μέσω ενός σύνθετου δικτύου γενετικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες συνιστούν το μονοπάτι των ετεροχρονικών γονιδίων. Τα ετεροχρονικά γονίδια αναγνωρίστηκαν αρχικά μέσω γενετικών σαρώσεων, καθώς μεταλλαγές σε αυτά βρέθηκαν να επηρεάζουν το συγχρονισμό και τη διαδοχή αναπτυξιακών γεγονότων κατά την προνυμφική ανάπτυξη. Οι μεταλλαγές στα γονίδια αυτά κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις μεταλλαγές που προκαλούν πρόωρη ανάπτυξη, κατά την οποία γεγονότα συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων παραλείπονται και αυτές που προκαλούν καθυστερημένη ανάπτυξη, κατά την οποία γεγονότα συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων επαναλαμβάνονται σε μεταγενέστερα στάδια. Η μελέτη της χρονικής ρύθμισης των αναπτυξιακών γεγονότων του νηματώδους εστιάζεται κυρίως στην παρακολούθηση των γενεαλογιών κυττάρων της επιδερμίδας, τα οποία παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο διαίρεσης σε κάθε προνυμφικό στάδιο. Λίγο μετά την εκκόλαψη, κάθε άτομο διαθέτει δύο σειρές πλευρικών κυττάρων ραφής (Seam cells), αποτελούμενες από δέκα κύτταρα η κάθε μία (επονομαζόμενα H0-H2, V1-V6 και T κατά σειρά από την πρόσθια προς την οπίσθια πλευρά). Τα κύτταρα αυτά έχουν βλαστικό χαρακτήρα, καθώς πραγματοποιούν μία ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση σε κάθε προνυμφικό στάδιο (με εξαίρεση το κύτταρο H0), παράγοντας ένα νέο κύτταρο ραφής και ένα κύτταρο που διαφοροποιείται και συντήκεται με το συγκύτιο hyp7. Στην αρχή του σταδίου L2, έξι από τα δέκα κύτταρα πραγματοποιούν μία επιπλέον συμμετρική διαίρεση αυξάνοντας το συνολικό αριθμό των κυττάρων ραφής στα δεκαέξι. Στο τέλος του σταδίου L4, τα κύτταρα ραφής συντήκονται και σχηματίζουν ένα νέο συγκύτιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκκριση των εξειδικευμένων δομών πτερυγίου στο κέλυφος των

ενήλικων ατόμων (Alae). Αντίστοιχα, στην κοιλιακή πλευρά, τρία κύτταρα πρόδρομα του γεννητικού πόρου διαιρούνται στο στάδιο L3, προκειμένου να προκύψουν τα 22 κύτταρα του γεννητικού πόρου. Οι μεταλλαγές σε ετεροχρονικά γονίδια προκαλούν αλλαγές στο χρόνο εκτέλεσης αυτών των αναπτυξιακών γεγονότων, οδηγώντας σε πρόωρους φαινότυπους, όπως η συμμετρική διαίρεση των κυττάρων ραφής στο στάδιο L1, η πρόωρη σύντηξή τους και έκκριση των δομών πτερυγίου στο τέλος του σταδίου L3 και η διαίρεση των πρόδρομων κυττάρων του γεννητικού πόρου στο στάδιο L2, ή σε καθυστερημένους φαινότυπους, όπως η απουσία εκτέλεσης της συμμετρικής διαίρεσης των κυττάρων ραφής, της έκκρισης των δομών πτερυγίου και της δημιουργίας του γεννητικού πόρου [308].



Εικόνα A13| Κύριες αλληλεπιδράσεις του μονοπατιού των ετεροχρονικών γονιδίων. (α) Μοντέλο των κυριότερων γενετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βασικών συστατικών του μονοπατιού. Τα miRNA αναγράφονται σε πλαίσιο. Τα εξειδικευμένα για κάθε στάδιο αναπτυξιακά γεγονότα σημειώνονται με το όνομα του αντίστοιχου προνυμφικού σταδίου. Η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων που συμβαίνει κατά την ενηλικίωση σημειώνεται ως «διαφ.» (β) Αναπαράσταση της αύξησης και της πτώσης των επιπέδων των ώριμων προϊόντων βασικών γονιδίων του μονοπατιού. Η ανάπτυξη ξεκινά με τα miRNA σε καταστολή και η έκφρασή τους επάγεται σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο, προκαλώντας την αποσιώπηση των στόχων τους.

Τροποποιημένο από Rougvie, A.E. and E.G. Moss. *Curr Top Dev Biol*, 2013. **105**: p. 153-80.

Κεντρικό ρόλο στο μονοπάτι των ετεροχρονικών γονιδίων διαδραματίζουν μόρια miRNA, τα οποία λειτουργούν σα διακόπτες, «σβήνοντας» σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία την έκφραση κύριων ρυθμιστών της μοίρας των κυττάρων, προκειμένου η ανάπτυξη να προχωρήσει φυσιολογικά στο επόμενο προνυμφικό στάδιο (Εικόνα A13). Το πιο μελετημένο ζεύγος miRNA/στόχου μεταξύ των ετεροχρονικών γονιδίων είναι αυτό των *lin-4/lin-14*, που ρυθμίζει τη μετάβαση του προτύπου ανάπτυξης από το πρώτο στο δεύτερο προνυμφικό στάδιο (μετάβαση L1-L2). Το γονίδιο *lin-4* κωδικοποιεί για ένα miRNA, η έκφραση του οποίου ξεκινάει από τα μέσα του πρώτου προνυμφικού σταδίου και παραμένει διαρκής [263, 309]. Αντίστοιχα, το γονίδιο *lin-14* κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα, τα επίπεδα του οποίου είναι υψηλά στην αρχή του πρώτου προνυμφικού σταδίου (L1), κάτι που φαίνεται να επαρκεί για προσδώσει στα κύτταρα χαρακτήρα L1, αλλά παρουσιάζουν σημαντική και προοδευτική μείωση κατά την εξέλιξη της ανάπτυξης [310, 311]. Η παρατηρούμενη μείωση οφείλεται στην πρόσδεση του *lin-4* σε συμπληρωματικές με αυτό αλληλουχίες στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του

γονιδίου *lin-14*, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφραστική καταστολή και την αποσταθεροποίηση του μετάγραφου [263, 312, 313]. Η έλλειψη είτε του *lin-4* είτε της 3' αμετάφραστης περιοχής του *lin-14* έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της πρωτεΐνης LIN-14 και την επανάληψη χαρακτηριστικών γεγονότων του σταδίου L1 σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια [263, 311].

Αντίστοιχο ρόλο με το *lin-4*, αλλά σε μεταγενέστερο στάδιο διαδραματίζουν το miRNA *let-7* και τρία συγγενικά του miRNAs, τα *mir-48*, *mir-84* και *mir-241*, αποκαλούμενα συνολικά ως η οικογένεια *let-7* [314, 315]. Τα μέλη της οικογένειας αυτής διαθέτουν σχεδόν ταυτόσημα 5' άκρα και θεωρητικά αναγνωρίζουν τα ίδια mRNA ως στόχους, αν και κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχθεί ακόμα *in vivo*. Τα τρία συγγενικά του *let-7* miRNA παρουσιάζουν σχεδόν πανομοιότυπο πρότυπο έκφρασης, και δρουν πλεονασματικά στο στάδιο L2, προκειμένου να καταστείλουν το γονίδιο *hbl-1*, το οποίο κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα (Hunchback-like) που ελέγχει τη μετάβαση από το δεύτερο στο τρίτο προνυμφικό στάδιο (μετάβαση L2-L3) [315-317]. Το miRNA *let-7* από τη άλλη, συσσωρεύεται αργότερα κατά την ανάπτυξη και έχει ως κύριο στόχο το γονίδιο *lin-41*, το οποίο δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν εμπλέκεται στη μετάβαση από το στάδιο L3 στο L4, ή από το L4 στο ενήλικο [314, 318, 319].

Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις η λειτουργία των ετεροχρονικών γονιδίων συνίσταται στη ρύθμιση αναπτυξιακών γεγονότων συγκεκριμένου σταδίου, πολλές φορές η δράση τους επεκτείνεται και σε περισσότερα του ενός στάδια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα γονίδια *lin-4* και *lin-14*, τα οποία ρυθμίζουν μεν τη μετάβαση από το στάδιο L1 στο L2, η δράση τους όμως επεκτείνεται και σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά γεγονότα, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με ένα επιπλέον ετεροχρονικό γονίδιο, το *lin-28*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μία προσδένουσα RNA πρωτεΐνη, η οποία έχει βρεθεί να επιστρατεύει την πολυμεράση πολυουριδίνης PUP-2 στο πρόδρομο *let-7* pre-miRNA και να εγείρει την αποικοδόμησή του αντί της ωρίμανσης, αποτρέποντας έτσι την αποσιώπηση του γονιδίου *lin-41* [319-322]. Παρόλα αυτά, ο κύριος ρόλος του γονιδίου *lin-28* είναι να προωθεί αναπτυξιακά γεγονότα του σταδίου L2, αποτρέποντας την αποσιώπηση του γονιδίου *hbl-1*, ανεξάρτητα από τη δράση της οικογένειας *let-7*, μέσω ενός μηχανισμού που δεν είναι ξεκάθαρος [319]. Τα επίπεδα του *lin-28* ρυθμίζονται αρνητικά από το *lin-4*, καθώς αποτελεί έναν δευτερεύοντα στόχο του, αλλά θετικά από το *lin-14*, μέσω της αρνητικής ρύθμισης της μεταγραφής των τριών συγγενικών του *let-7* miRNA, τα οποία επίσης στοχεύουν και καταστέλλουν το *lin-28* [323-325]. Ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων αυτών, η συσσώρευση του *lin-4* και η επακόλουθη αποσιώπηση του *lin-14* στο στάδιο L1, επηρεάζουν αναπτυξιακά γεγονότα που συμβαίνουν τόσο στο αμέσως επόμενο στάδιο L2, όσο και σε μεταγενέστερα προνυμφικά στάδια. Ιδιαίτερη περίπτωση μεταξύ των ετεροχρονικών γονιδίων αποτελεί το γονίδιο *lin-42*, τα επίπεδα του οποίου εμφανίζουν μια περιοδική διακύμανση σε κάθε προνυμφικό στάδιο, καθώς βαίνουν διαρκώς αυξανόμενα, φτάνοντας στο μέγιστο λίγες ώρες πριν από κάθε έκδυση και στο ελάχιστο κατά τη διάρκεια αυτής, παρουσιάζοντας δραματική μείωση, ενώ παραμένουν διαρκώς χαμηλά μετά τη μετάβαση από το στάδιο L4 στο ενήλικο [326]. Το παρατηρούμενο πρότυπο έκφρασης έρχεται σε αντίθεση με αυτό των υπόλοιπων ετεροχρονικών γονιδίων, το οποίο ακολουθεί γραμμική πορεία και υποδεικνύει την ύπαρξη πολλαπλών ή επαναλαμβανόμενων λειτουργιών κατά την ανάπτυξη. Μεταλλαγές στο γονίδιο *lin-42*

εμφανίζουν πρόωρη έκκριση του ενήλικου κελύφους στο τέλος του σταδίου L3, ελαττώματα στην έκδυση σε όλα τα προνυμφικά στάδια, καθώς και καθυστερημένη και ασύγχρονη ανάπτυξη, υποδηλώνοντας ότι η κυκλική αύξηση και πτώση των επιπέδων του καθοδηγεί την έναρξη και τη λήξη των κύκλων της έκδυσης [327]. Παράλληλα, η αρνητική ρύθμιση της βιογένεσης των miRNA που επιτελείται από το LIN-42, αποτρέπει την πρόωρη αύξηση των επιπέδων τους και εξασφαλίζει την ορθή χρονικά ρύθμιση κεντρικών ρυθμιστών του μονοπατιού, παρέχοντας ταυτόχρονα ένα μέσο για τον συγχρονισμό των αναπτυξιακών προγραμμάτων με τον κύκλο των εκδύσεων [328-330].

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

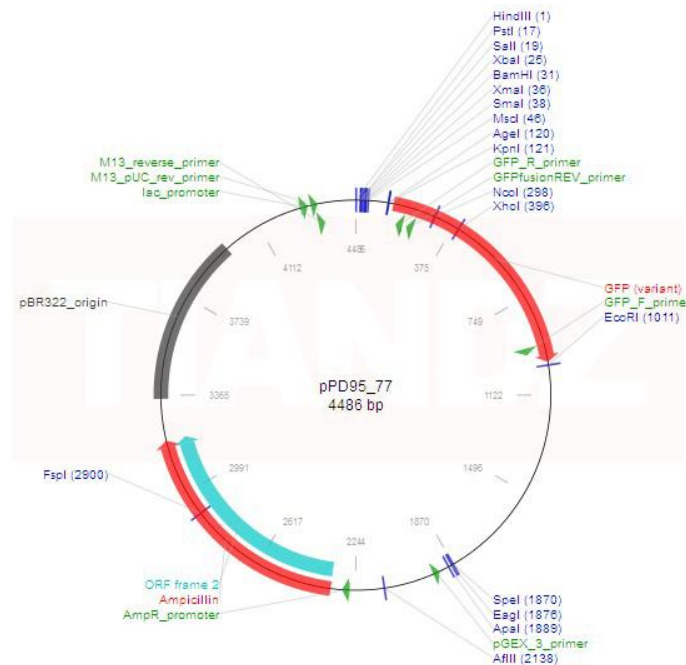
B.1. Πλασμίδια και φορείς κλωνοποίησης

I. pPD95.77

Ο φορέας pPD95.77 (pL4440 - Fire Kit, Addgene) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση γονιδίων του *C. elegans* και το μετασχηματισμό σκουληκιών με μικροένεση. Το πλασμίδιο περιέχει τη αλληλουχία του γονιδίου της *gfp(S65C)* καταροϊκά της αλληλουχίας πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης, με αποτέλεσμα τα διαγονιδιακά άτομα να εκφράζουν την GFP υπό τον έλεγχο οποιουδήποτε υποκινητή έχει κλωνοποιηθεί εκεί, ή την εκάστοτε επιθυμητή πρωτεΐνη σε σύντηξη με την GFP στο C-τελικό της άκρο. Περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη και χρησιμοποιείται ευρέως για το μετασχηματισμό κυττάρων XL1-blue και DH5α (Εικόνα B1).

II. pRF4

Το πλασμίδιο pRF4 χρησιμοποιείται ως συμπληρωματικό πλασμίδιο για το μετασχηματισμό σκουληκιών, μαζί με το εκάστοτε επιθυμητό DNA. Προέρχεται από τον φορέα pBluescript και περιέχει το γονίδιο *rol-6(su1006)* του νηματώδους, που κωδικοποιεί μια μεταλλαγμένη μορφή κολλαγόνου. Όταν εισαχθεί στον *C. elegans* συμπεριφέρεται ως επικρατές και προκαλεί ανωμαλίες στη δομή του κελύφους, με αποτέλεσμα την περιστροφική κυκλική κίνηση του σκώληκα (φαινότυπος roller).



Εικόνα B1 | Ο χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pPD95.77

B.2. Μοριακές Κατασκευές

- ***pPD95.77-P_{Lonp-1}::MS_{Lonp-1}***

Αρχικά έγινε ενίσχυση με PCR του τμήματος του υποκινητή του γονιδίου *Lonp-1* μαζί με το μιτοχονδριακό σινιάλο (MS) από γενωμικό DNA, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές PrCeLon/Frw και CeLonMtLS/Rev XmaI και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPD95.77 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI/XmaI.

- ***pPD95.77-P_{Lonp-1}::MS_{Lonp-1}::CeLon::gfp***

Αφού έγινε ενίσχυση του *CeLon* (2.7 kb) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές CeLon/Frw AgeI και CeLon/Rev AgeI με PCR από γενωμικό DNA, το τμήμα κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο που εμπεριέχει τον υποκινητή με το MS του Lonp-1 ως κομμάτι AgeI. Το πλασμίδιο κόπηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XmaI/AgeI.

- ***pPD95.77-P_{Lonp-1}::MS_{Lonp-1}::HsLon::gfp***

Αφού έγινε ενίσχυση του *HsLon* (2.5 kb) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές HsLon/Frw AgeI και HsLon/Rev AgeI με PCR από γενωμικό DNA, το τμήμα κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο που εμπεριέχει τον υποκινητή με το MS του Lonp-1 ως κομμάτι AgeI. Το πλασμίδιο κόπηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XmaI/AgeI.

- ***pPD95.77-P_{Lonp-1}::MS_{Lonp-1}::AtLon1::gfp***

Αφού έγινε ενίσχυση του *AtLon1* (2.8 kb) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές AtLon1/Frw XmaI και AtLon1/Rev XmaI με PCR από γενωμικό DNA, το τμήμα κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο που εμπεριέχει τον υποκινητή με το MS του Lonp-1 ως κομμάτι XmaI. Το πλασμίδιο κόπηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XmaI/AgeI.

- ***pPD95.77-P_{Lonp-1}::MS_{Lonp-1}::AtLon4::gfp***

Αφού έγινε ενίσχυση του *AtLon4* (2.8 kb) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές AtLon4/Frw XmaI και AtLon4/Rev XmaI με PCR από γενωμικό DNA, το τμήμα κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο που εμπεριέχει τον υποκινητή με το MS του Lonp-1 ως κομμάτι XmaI. Το πλασμίδιο κόπηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XmaI/AgeI.

Για την πέψη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα των εταιριών New England Biolabs και Thermo Scientific. Όπου ήταν απαραίτητο, μετά την ολοκλήρωση της πέψης ακολούθησε καθαρισμός του DNA μέσω κατακρήμνισης με αιθανόλη ως εξής: στο διάλυμα DNA προστέθηκαν 1/10 του όγκου διάλυμα 3M CH₃COONa pH 5,2 και 2,5 όγκοι καθαρής αιθανόλης. Ακολούθησε ανάδευση και ψύξη του διαλύματος στους -80°C για 1-2 ώρες. Μετά την ψύξη το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στις 13.000rpm και στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 1ml παγωμένης 70% αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως, αφαίρεση του

υπερκείμενου, ξήρανση για 10-20 σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιάλυση του ιζήματος στην επιθυμητή ποσότητα απαλλαγμένου από νουκλεάσες, αποστειρωμένου ddH₂O ή διαλύματος TE (συνήθως 30 μl). Στην περίπτωση που ένα προϊόν πέψης έπρεπε να απομονωθεί μεταξύ δύο ή περισσότερων προϊόντων, η πέψη ακολουθήθηκε από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομόνωση και καθαρισμό της επιθυμητής ζώνης με χρήση του συστήματος GeneJet Gel Extraction kit (Thermo Scientific). Η αποφωσφορυλίωση φορέων κλωνοποίησης μετά από πέψη έγινε όπου ήταν απαραίτητο χρησιμοποιώντας αλκαλική φωσφατάση (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase – Thermo Scientific). Για τη σύνδεση γραμμικών τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε λιγάση του φάγου T4 (T4 DNA ligase – Thermo Scientific). Όλες οι μοριακές κατασκευές μετασχηματίστηκαν σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* του στελέχους XL1-blue.

B.3. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

B.3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA, οι νηματώδεις συλλέχθηκαν από τρυβλία NGM με διάλυμα M9 (πίνακας B), μεταφέρθηκαν σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου 1,5ml και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 2000rpm προκειμένου να καθιζάνουν. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα των νηματωδών επαναιωρήθηκε σε καθαρό διάλυμα M9. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η παρουσία βακτηρίων στο διάλυμα έπαψε να είναι αντιληπτή. Μετά από το τελευταίο πλύσιμο, οι νηματώδεις επαναιωρήθηκαν σε 250μl διαλύματος M9, στην οποία προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης για DNA με πρωτεϊνάση K (πίνακας B2). Το μείγμα επώαστηκε στους 65°C μέχρι την πλήρη διάλυση των νηματωδών (μερικές ώρες) και ακολούθησε η προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης:χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1), ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5 λεπτά. Η πάνω φάση μεταφέρθηκε προσεχτικά σε νέο σωληνάκι και σε αυτή προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Το μείγμα αναδεύτηκε καλά, φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στις 13.000rpm για 5 λεπτά και η πάνω φάση μεταφέρθηκε προσεχτικά σε νέο σωληνάκι. Ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa και 2,5 όγκων απόλυτης αιθανόλης, ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύθηκε σε 20-40μl απαλλαγμένου από νουκλεάσες, αποστειρωμένου ddH₂O. Τα απομονωμένα DNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

B.3.2 Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση RNA, ικανός αριθμός (100-300) νηματωδών συλλέχθηκε από τρυβλία NGM με διάλυμα M9, μεταφέρθηκε σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου 1,5ml και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 2000rpm. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα των νηματωδών επαναιωρήθηκε σε καθαρό διάλυμα M9. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η παρουσία βακτηρίων στο διάλυμα έπαψε να είναι αντιληπτή. Μετά το τελευταίο πλύσιμο το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα των νηματωδών ψύχθηκε στους -80°C

για τουλάχιστον 1 ώρα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον ταχύτερο δυνατό χρόνο προκειμένου να αποφευχθεί η αλλοίωση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης των ατόμων λόγω συνθηκών στρες ή/και πείνας. Μετά την ψύξη, 700μl Tri Reagent (Sigma-Aldrich) προστέθηκαν στο παγωμένο ίζημα των νηματωδών, και τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με έμβολο, ασκώντας μηχανική πίεση. Ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 12.000 x g στους 4°C προς απομάκρυνση υπολειμμάτων και θραυσμάτων από την ομογενοποίηση και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ούτως ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος βαθμός διαχωρισμού των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Ακολούθως προστέθηκαν 150μl χλωροφόρμιου, τα δείγματα ανακατεύθηκαν ισχυρά, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε 12.000 x g στους 4°C. Η πάνω φάση (~400μl) μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι, όπου προστέθηκε ίσος όγκος 2-προπανόλης και 1μl Glycogen Blue (15mg/ml - Ambion). Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 12.000 x g στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα πλύθηκε δύο φορές με προσθήκη 700μl παγωμένης 75% αιθανόλης, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 12.000 x g στους 4°C. Μετά το πέρας της τελευταίας φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύθηκε σε 20μl απαλλαγμένου από νουκλεάσες, αποστειρωμένου ddH₂O. Προς διευκόλυνση της επαναδιάλυσης, τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 55°C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των RNA έγινε με χρήση του συστήματος Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen).

B.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

B.4.1. Πολυμεράση και εκκινητές

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (πίνακας B1) διαλύθηκαν σε TE (10mM Tris/1mM EDTA pH 8). Για την ενίσχυση τμημάτων DNA που προορίζονταν για τις κατασκευές για έκφραση στο νηματώδη χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση. Ο καθαρισμός των προϊόντων της κάθε αντίδρασης έγινε χρησιμοποιώντας το σύστημα PCR cleanup kit της Qiagen. Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας υβριδοποίησης κάθε εκκινητή έγινε με βάση τον τύπο $T_m = 69,3 + 0,41(\%GC) - \frac{650}{L}$ (όπου L: μήκος εκκινητή και %GC: το ποσοστό βάσεων γουανίνης/κυτοσίνης του εκκινητή) και προσαρμόστηκε ανάλογα με το εγχειρίδιο της Taq πολυμεράσης.

Πίνακας B1. Εκκινητές PCR που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Εφαρμογή
CeLonMtlS/FRW	TTA TCTAGA ATGTACCGCGCTGGAGC	Ενίσχυση της ακολουθίας του μιτοχονδριακού σιναύλου της <i>CeLon (lonp-1)</i>
CeLonMtlS/REV	CGACCCGGGCTCCTCCCTGAAAATCAATTAATAATC	
CeLon/FRW	TTAACCGGTAATGTACCGCGCTGGAGC	Ενίσχυση και κλωνοποίηση της ακολουθίας <i>CeLon</i> (χωρίς MS)

CeLon/REV	TTAACCGGTGATTGGAAGAGATGCTCGTAGAG	
HsLon/FRW	TTA ACCGGT CC ATGACGATCCCCGATGTGTT	Ενίσχυση και κλωνοποίηση της ακολουθίας HsLon
HsLon/REV	TTA ACCGGT GA CCGTTCACG GCCAGC	
AtLon1/FRW	AAA CCCGGG GT CCCACTAACCTAGGCCT	Ενίσχυση και κλωνοποίηση της ακολουθίας AtLon1
AtLon1/REV	TTTCCCGGGGAGTCTTCTTGTTCATAGCCA	
AtLon4/FRW	AAA CCCGGG GT TCAGCTAACCTCACCTGG	Ενίσχυση και κλωνοποίηση της ακολουθίας AtLon4
AtLon4/REV	AAACCCGGGGAATGGTCATAGCCAAAGGCTAG	
LonDEL/FRW	GTTTTACTCGGGATCTGGTC	Προσδιορισμός γονοτύπου <i>lonp-1</i> (<i>tm5171</i>)
LonDEL/REV	TATTACCGAATCGTCTGCAC	
PrCeLon/FRW	TATCTAGAAGCTGGAGCTGTTGATTTGACAT	Κλωνοποίηση του υποκινητή της <i>lonp-1</i> (μέσα στο οπερόνιο) στον pPD95.77
ama-1/RT1	GCTCCAAATGACCGAAATGT	Ποσοτική RT-PCR
ama-1/RT2	GCCCGGAGGAGATTAACG	
hsp-16.2/RT1	CCATCTGAGTCTTCTGAGATTGTT	Ποσοτική RT-PCR
hsp-16.2/RT2	TACCACTATTTCCGTCCAGC	
hsp-60/RT1	GCGAATCGAGCACATCACCG	Ποσοτική RT-PCR
hsp-60/RT2	CGGTGACACGGTCCTTCTTC	
sod-3/RT1	TCGGTTCCTGGATAACTTG	Ποσοτική RT-PCR
sod-3/RT2	TTGGCAATCTTCCAAATAGCA	
lonp-1/RT1	CATATTCATGTACCCGAAGGAGC	Ποσοτική RT-PCR
lonp-1/RT2	GAAGACTCGTTTTGCTCCGAC	

B.4.2. Σύνθεση cDNA και ποσοτική RT-PCR

Για τον προσδιορισμό της αφθονίας των μεταγράφων mRNA του νηματώδους με ποσοτική RT-PCR, ενήλικα άτομα αφέθηκαν να εναποθέσουν αυγά για 1 έως 3 ώρες και οι απόγονοι καλλιεργήθηκαν στην κατάλληλη θερμοκρασία μέχρι να φτάσουν στο επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο ή την επιθυμητή ημέρα ενήλικης ζωής. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων αποσιώπησης του *lonp-1* τα άτομα αναπτύχθηκαν στους 20°C και συλλέχθηκαν κατά την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Ολικό RNA απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο B.4 και η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας το σύστημα ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). Τουλάχιστον δύο πληθυσμοί καλλιεργήθηκαν και αναλύθηκαν ανεξάρτητα σε κάθε πείραμα. Η ποσοτική RT-PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση του συστήματος SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad) σε μηχάνημα MiniOpticon MJ (Bio-Rad). Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων στο νηματώδη χρησιμοποιήθηκε το

γονίδιο *ama-1*, που κωδικοποιεί για μία υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II, τα επίπεδα έκφρασης της οποίας παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του νηματώδους. Οι σχετικές ποσότητες των mRNA προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο συγκριτικών Ct (Comparative Ct method) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν συγκριτικά με το στέλεχος μάρτυρα. Η απεικόνιση και η στατιστική επεξεργασία (ασύζευκτη ανάλυση t-test) των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism (version 6.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

B.4.3. PCR σε ολόκληρους νηματώδεις

Για την ταυτοποίηση του γονότυπου των ατόμων που προέκυψαν από διασταύρωση στελεχών (βλ. §B.6.7 Διασταύρωση στελεχών *C. elegans*) σε πολλές περιπτώσεις οι αντιδράσεις PCR επιτελέστηκαν σε ολόκληρους νηματώδεις χωρίς να προηγηθεί απομόνωση DNA. Μερικά άτομα του υπό εξέταση στελέχους (1-15) συλλέχθηκαν σε μικρή ποσότητα διαλύματος TE (2,5-5μl) και ψύχθηκαν στους -80°C για τουλάχιστον 30 λεπτά, προκειμένου να διευκολυνθεί η θραύση των ιστών. Ακολούθως προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης με πρωτεΐνάση K (πίνακας B2) και επώαση για 90 λεπτά στους 65°C και 30 λεπτά στους 98°C, προς απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης. Το διάλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε απευθείας ως μήτρα σε αντίδραση PCR.

Πίνακας B2. Σύσταση διαλύματος λύσης για DNA

DNA (2X)	
Συστατικό	Συγκέντρωση
KCl	50mM
Tris-HCl pH 8,3	10mM
MgCl ₂	2,5mM
Triton X-100	0,45%
Tween 20	0,45%
Πριν τη χρήση προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 200μg/mL	

B.5. Χειρισμοί βακτηριακών στελεχών

B.5.1. Καλλιέργεια και αποθήκευση βακτηριακών στελεχών

Τα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό Luria Bertani (LB), παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, το οποίο σε κάθε περίπτωση προστέθηκε μετά την αποστείρωση (πίνακες B3 και B4). Για την παραγωγή στερεού LB, το θρεπτικό μετά την αποστείρωση και την προσθήκη του αντιβιοτικού διαμοιράστηκε σε τρυβλία διαμέτρου

94mm ανά 25ml. Η αποθήκευση βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε υπό τη μορφή στοκ γλυκερόλης. Για την παρασκευή τους 1 όγκος 100% γλυκερόλης προστέθηκε σε 2 όγκους βακτηριακής καλλιέργειας. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και αποθήκευση στους -80°C. Τα αποθηκευμένα βακτηριακά στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμβολιάζοντας μικρή ποσότητα σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης βακτηρίων.

Πίνακας Β3. Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων βακτηρίων

LB		SOC	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)	Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
NaCl	10	Τρυπτόνη	20
Εκχύλισμα ζύμης	5	Εκχύλισμα ζύμης	5
Τρυπτόνη	10	NaCl	0,6
Άγαρ*	15	KCl	0,2
* Προστίθεται μόνο για την παραγωγή στερεού θρεπτικού υποστρώματος		MgCl ₂	1
		MgSO ₄	2,4
		Γλυκόζη	3,6

Πίνακας Β4. Διαλύματα αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό	Διαλύτης	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος(mg/ml)	Συγκέντρωση τελικού διαλύματος(mg/ml)
Αμπικιλίνη	dH ₂ O	200mg/ml	100μg/ml
Τετρακυκλίνη	Αιθανόλη	10mg/ml	10μg/ml
Καναμυκίνη	dH ₂ O	50mg/ml	50μg/ml
Χλωραμφενικόλη	Αιθανόλη	34mg/ml	34μg/ml
Στρεπτομυκίνη	dH ₂ O	200mg/ml	100μg/ml

B.5.2. Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

5ml υγρού θρεπτικού LB εμβολιάστηκαν με μοναδική αποικία του επιθυμητού στελέχους, ή με μικρή ποσότητα από στοκ γλυκερόλης, και επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες, με παράλληλη ανάδευση (220rpm). Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια αυτή

χρησιμοποιήθηκε για εμβολιασμό υγρού LB σε αραιώση 1:100 και επώαστηκε στους 37°C υπό ανάδευση, έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm φτάσει στο 0,4-0,6 (εκθετική φάση ανάπτυξης). Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε πάγο για 10-20 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000rpm για 10 λεπτά, στους 4°C. Μετά από σχολαστική αφαίρεση του υπερκείμενου, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10ml παγωμένου διαλύματος CaCl₂ (50mM CaCl₂/10% v/v γλυκερόλη) και επώαστηκε στον πάγο για τουλάχιστον 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά και επαναδιάλυση (σε επαφή με τον πάγο) του ιζήματος σε 2ml παγωμένου διαλύματος CaCl₂. Το εναιώρημα διαμοιράστηκε σε σωληνάκια ανά 100μl και φυλάχθηκε στους -80°C. Η αποδοτικότητα των κυττάρων μπορεί να ελεγχθεί μέσω του μετασχηματισμού 100μl βακτηρίων με 10pg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA, την επίστρωση σε τρυβλίο με το κατάλληλο αντιβιοτικό και την καταμέτρηση των ανεπτυγμένων αποικιών. Η αποδοτικότητα εκφράζεται σε αριθμό αποικιών/μg DNA (cfu/μg).

B.5.3. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Σε 100μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων προστέθηκαν 100-500ng DNA (ή 8-10μl από αντίδραση λιγάσης). Τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για τουλάχιστον 30 λεπτά. Ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα, επώαση στον πάγο για 2 λεπτά, προσθήκη 1ml διαλύματος SOC (πίνακας B3) και επώαση στους 37°C για 45-60 λεπτά, με ή χωρίς ταυτόχρονη ανακίνηση. Μετά το πέρας της επώασης, 100 μl απλώθηκαν σε τρυβλίο με LB άγαρ που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό. Η περίσσεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 4.000rpm, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl υπερκείμενου και επιστρώθηκε σε δεύτερο τρυβλίο. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες, μετά το πέρας των οποίων ελέγχθηκαν για την παρουσία βακτηριακών αποικιών.

B.5.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA για διεξαγωγή διαγνωστικών πέψεων, ή εκ νέου μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων έγινε με την μέθοδο βρασμού (Boiling-preps). Διάλυμα θρεπτικού LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάστηκε με βακτηριακή αποικία και επώαστηκε για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση 220rpm. Μετά το πέρας της επώασης, τμήμα της καλλιέργειας (~1,5ml) φυγοκεντρήθηκε στις 12.000rpm για 30-60 δευτερόλεπτα. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε σχολαστικά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε πλήρως σε 500μl διαλύματος STET (8% σακχαρόζη/5% Triton X-100/50mM EDTA pH 8/5mM Tris-HCl pH 8). Ακολούθησε προσθήκη 5μl διαλύματος λυσοζύμης (20 mg/ml) και βρασμός για 1 λεπτό. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000rpm για 10 λεπτά, το ίζημα αφαιρέθηκε, και στο υπερκείμενο προστέθηκε ίσος όγκος (~450μl) 2-προπανόλης. Το μείγμα αναδεύτηκε, ψύχθηκε στους -20°C για τουλάχιστον 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13.000rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύθηκε σε ελεύθερο από νουκλεάσες, αποστειρωμένο ddH₂O (συνήθως 50μl). Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας, που προοριζόταν για ένεση σε νηματώδεις, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

B.6. Χειρισμοί στελεχών *C. elegans*

B.6.1. Καλλιέργεια, αποθήκευση και ψύξη στελεχών *C. Elegans*

Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας νηματωδών παρασκευάζονται τα παρακάτω αρχικά διαλύματα:

- **Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα καλίου (K·PO₄) 1M, pH 6,0:** 108,3g KH₂PO₄ και 35,6g K₂HPO₄ διαλύονται σε 1L ddH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται πριν τη χρήση και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Χοληστερόλη 5mg/ml:** Διάλυση σε απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στους 4°C.
- **MgSO₄ 1M:** Διάλυση σε ddH₂O. Αποστειρώνεται πριν τη χρήση και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **CaCl₂ 1M:** Διάλυση σε ddH₂O. Αποστειρώνεται πριν τη χρήση και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Αμπικιλίνη 100mg/ml:** Διάλυση σε αποστειρωμένο ddH₂O. Διατηρείται στους -20°C.
- **Νυστατίνη 100mg/ml:** Διάλυση σε 70% αιθανόλη. Το εναιώρημα που προκύπτει πρέπει να ανακινείται σχολαστικά πριν τη χρήση. Διατηρείται στους 4°C.

Πίνακας B5. Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος NGM

	Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο	Τελική Συγκέντρωση
Α' Προστίθενται πριν από την αποστείρωση	NaCl	3g	50mM
	Πεπτόνη	2,5g ¹	0,25% (w/v)
	Άγαρ	17g	1,7% (w/v)
	Στρεπτομυκίνη ²	0,2g	200μg/ml
Β' Προστίθενται μετά από την αποστείρωση	K·PO ₄ pH 6	25ml	25mM
	Χοληστερόλη	1ml	5μg/ml
	MgSO ₄	1ml	1mM
	CaCl ₂	1ml	1mM
	Νυστατίνη ³	1ml	100μg/ml

¹5-7,5g για την παρασκευή θρεπτικού στοκ
² Αντιβιοτικό. Προστίθεται σε θρεπτικό που προορίζεται για επίστρωση του βακτηριακού στελέχους *E. coli* OP-50
³Μυκητοστατικό. Προστίθεται σε συνδυασμό με την στρεπτομυκίνη σε θρεπτικό που προορίζεται για τρυβλία στοκ

Η σύσταση του θρεπτικού παρουσιάζεται στον πίνακα B5. Ανά λίτρο θρεπτικού προστίθενται τα υλικά του Α' μέρους και μετά την αποστείρωση, εφόσον η θερμοκρασία δεν ξεπερνά τους 55°C, προστίθενται τα υλικά του Β' μέρους. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1L με αποστειρωμένο ddH₂O. Το θρεπτικό μοιράζεται, πριν στερεοποιηθεί, με περισταλτική αντλία σε τρυβλία διαμέτρου 6cm ανά 12ml ή σε τρυβλία 3cm ανά 3ml. Ακολούθως τα

τρουβλία επιστρώνονται με βακτηριακή καλλιέργεια *E. coli*, η οποία αποτελεί την τροφή του νηματώδους. Ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση, επιλέγεται το στέλεχος με το οποίο γίνεται η σίτιση. Για την καθημερινή συντήρηση και ανάπτυξη των σκουληκιών χρησιμοποιείται το στέλεχος OP-50, το οποίο είναι αυξότροφο σε ουρακίλη, αποτρέποντας την υπέρμετρη ανάπτυξη (το θρεπτικό NGM δεν περιέχει πηγή ουρακίλης), ενώ φέρει ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη, η οποία προστίθεται στο θρεπτικό για την αποφυγή μολύνσεων. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης. Εναλλακτικά του OP-50 μπορεί να χρησιμοποιηθεί το στέλεχος HB101, το οποίο φέρει όμοια χαρακτηριστικά.

Η συστηματική ανάπτυξη του νηματώδους γίνεται κατ' επιλογή στους 15°C, 20°C ή 25°C, ενώ η βραχυπρόθεσμη αποθήκευση των στελεχών πραγματοποιείται με εμβολιασμό τρυβλίων στοκ και φύλαξή τους στους 15°C, όπου μπορούν να διατηρηθούν περίπου 70 ημέρες. Μακροπρόθεσμη αποθήκευση στελεχών *C. elegans* μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό τη μορφή παγωμένων στοκ γλυκερόλης. Στην κατάσταση αυτή επιβιώνουν μόνο άτομα σταδίου L1-L2. Για την ψύξη ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: τρυβλία που περιείχαν μεγάλο αριθμό ατόμων στο πρώτο προνυμφικό στάδιο L1 ξεπλύθηκαν με παγωμένο διάλυμα M9 (πίνακας B6) και στο εναιώρημα που προέκυψε προστέθηκε ίσος όγκος παγωμένου διαλύματος ψύξης (πίνακας B6). Το εναιώρημα μοιράστηκε σε ειδικά σωληνάκια (cryotubes) που φυλάχθηκαν στους -80°C. Η καλλιέργεια των διαφόρων στελεχών *C. elegans* στην παρούσα διατριβή έγινε σε θερμοκρασίες μεταξύ 20°C και 27,5°C. Για την ανανέωση των στελεχών, πραγματοποιήθηκε όποτε ήταν αναγκαίο μετεμβολιασμός νέων τρυβλίων, είτε με ασηπτική αποκοπή ενός κομματιού από το άγαρ (chunk) και τοποθέτησή του ανεστραμμένο στην επιφάνεια ενός νέου τρυβλίου, είτε με επιλεκτική μεταφορά μερικών νηματωδών με πεπλατυσμένο πλατινένιο σύρμα (pick). Η απαλλαγή από περιστασιακές μολύνσεις έγινε μέσω της χρήσης αλκαλικού διαλύματος υποχλωρίτη (20% χλωρίνη [5% NaClO]/10% NaOH [5M] ή KOH [5M]) ως εξής: σταγόνες διαλύματος τοποθετήθηκαν στην περιφέρεια απαλλαγμένου από μολύνσεις τρυβλίου NGM και σε κάθε σταγόνα μεταφέρθηκαν 5-10 αναπαραγωγικώς ενεργά άτομα. Οι σταγόνες ανανεώνονταν τακτικά μέχρι την πλήρη αποσύνθεση των σωμάτων και την απελευθέρωση των αυγών. Παρατεταμένη παραμονή των αυγών στο διάλυμα μπορεί να παρεμποδίσει την εκκόλαψή τους. Μετά την εκκόλαψη των αυγών, τα νεαρά άτομα μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο.

Πίνακας B6. Σύσταση διαλυμάτων για την ψύξη του νηματώδους

	Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο	Τελική Συγκέντρωση
Διάλυμα M9	NaCl	5g	86mM
	Na ₂ HPO ₄	6g	42mM
	KH ₂ PO ₄	3g	22mM
	MgSO ₄ 1M*	1ml	1mM
Διάλυμα ψύξης	NaCl	5,85g	100mM
	Γλυκερόλη	300g (-200ml)	30% (w/v)
	K·PO ₄ pH 6*	50ml	50mM

	0,1M MgSO ₄ *	3ml	0,3mM
* Προστίθενται μετά την αποστείρωση			

B.6.2. Κατεργασία με αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη

Για την ανάπτυξη αυστηρά συγχρονισμένων πληθυσμών, τα στελέχη κατεργάστηκαν με αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη (20% χλωρίνη [5% NaClO]/10% NaOH [5M] ή KOH [5M]), το οποίο αποσυνθέτει τα ενήλικα άτομα, άλλα όχι τα αυγά, που προστατεύονται χάρις στο κέλυφός τους. Ενήλικα και αναπαραγωγικώς ενεργά άτομα συλλέχθηκαν με διάλυμα M9 σε σωλήνες των 15ml και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 2000g_{rpm}. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα των νηματώδων επαναιωρήθηκε σε καθαρό M9. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η παρουσία βακτηρίων στο διάλυμα έπαψε να είναι αντιληπτή. Μετά το τελευταίο πλύσιμο το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα των νηματώδων επαναιωρήθηκε σε 5ml αλκαλικού διαλύματος υποχλωρίτη, στο οποίο επώαστηκε μέχρι να επιτευχθεί σχεδόν πλήρης αποσύνθεση των ενήλικων ατόμων (μέγιστο 10 λεπτά), υπό τακτική ανάδευση. Ακολούθως, η αντίδραση τερματίστηκε μέσω της πλήρωσης του σωλήνα με διάλυμα M9 και φυγοκέντρωσης για 1 λεπτό στις 2000g_{rpm}. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των αυγών επαναιωρήθηκε σε καθαρό διάλυμα M9. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες τρεις φορές και το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml διαλύματος M9 και επώαστηκε στους 25°C για 24 ώρες, προκειμένου τα αυγά να εκκολαφθούν απουσία τροφής και οι προνύμφες να αναστείλουν την ανάπτυξή τους στο στάδιο L1. Η επανέναρξη της ανάπτυξης έγινε μεταφέροντας τις προνύμφες σε τρυβλία NGM επιστρωμένα με OP-50 και τα άτομα καλλιεργήθηκαν στην εκάστοτε επιθυμητή θερμοκρασία.

B.6.3. Παραγωγή αρσενικών ατόμων

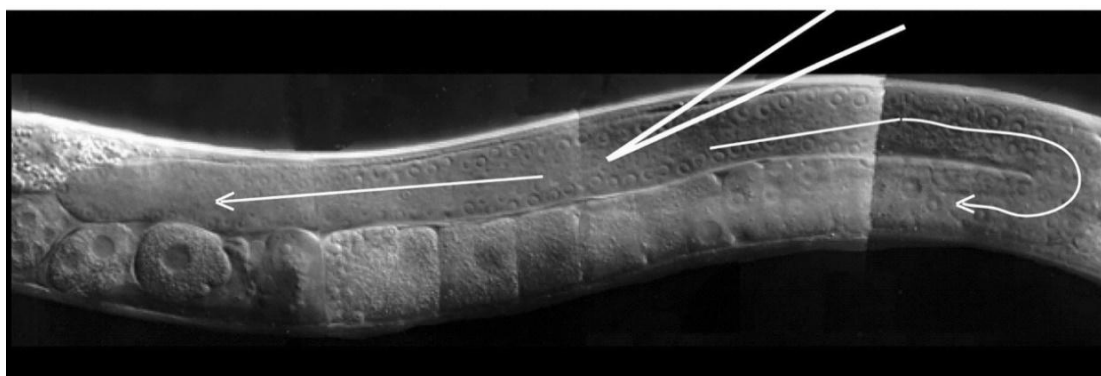
Τα αρσενικά άτομα του νηματώδους (γονότυπος X0) προκύπτουν από το μη διαχωρισμό των φυλετικών αδερφών χρωματίδων κατά τη μείωση και απαντώνται σε πολύ μικρό ποσοστό υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά η συχνότητα παραγωγής τους αυξάνεται υπό συνθήκες στρες. Η διασταύρωση ενός αρσενικού ατόμου με ένα ερμαφρόδιτο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου αριθμού αρσενικών απόγονων (~50%). Η παραγωγή αρσενικών ατόμων στο εργαστήριο πραγματοποιείται με συλλογή των τυχαία παραγόμενων αρσενικών και διασταύρωσή τους με ερμαφρόδιτα άτομα του ίδιου στελέχους. Ο αρχικός αριθμός αρσενικών μπορεί να αυξηθεί μέσω της έκθεσης ερμαφρόδιτων ατόμων προνυμφικού σταδίου L4 στους 30°C για 4-6 ώρες. Οι αρσενικοί απόγονοι μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο με περίσσεια ερμαφρόδιτων L4 του ίδιου στελέχους προκειμένου να εξασφαλιστεί η παραγωγή περισσότερων αρσενικών στην επόμενη γενιά. Τα αρσενικά άτομα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται κανονικά για διασταυρώσεις.

B.6.4. Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών με τη μέθοδο των μικροενέσεων

Η τεχνική μετασηματισμού που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των διαγονιδιακών στελεχών της παρούσας εργασίας είναι η ένεση του επιθυμητού διαλύματος DNA στον απομακρυσμένο βραχίονα της γονάδας (εικόνα B1) [331]. Η περιοχή αυτή είναι ουσιαστικά ένα συγκύτιο που περιέχει πολλούς γεννητικούς πυρήνες, χωρίς συγκροτημένο πυρηνικό φάκελο, γεγονός που επιτρέπει την είσοδο του ενιόμενου DNA και τη διανομή του σε πολλά γεννητικά κύτταρα, κατά την ωρίμανση των γαμετών. Η τεχνική αυτή οδηγεί στη δημιουργία μεγάλων εξωχρωμοσωμικών συστοιχιών DNA, που περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα του επιθυμητού διαγονιδίου και δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα. Ως αποτέλεσμα, τα διαγονιδιακά ζώα παρουσιάζουν μωσαϊκή έκφραση των διαγονιδίων κατά τυχαίο τρόπο. Ενσωμάτωση στο γονιδίωμα μπορεί να επιτευχθεί μέσω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία εντάσεως 300J/cm². Για να αυξηθεί το μέγεθος της εξωχρωμοσωμικής συστοιχίας και η αποτελεσματικότητά της κληρονόμησής της, στο μείγμα των ενέσεων προστίθεται και επιπλέον ουδέτερο DNA. Στην παρούσα διατριβή για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε Generuler 1kb DNA ladder της εταιρίας Thermo Fischer Scientific. Ως συμπληρωματικός φορέας για το μετασηματισμό χρησιμοποιήθηκε, μαζί με το επιθυμητό DNA, το πλασμίδιο pRF4 που φέρει το γονίδιο αναφοράς *rol-6(su1006)*, με αποτέλεσμα τα μετασηματισμένα άτομα να εμφανίζουν το φαινότυπο roller. Εν συντομία, στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται για τη μικροένεση άτομα που φέρουν την έλλειψη της Lon μιτοχονδριακής πρωτεΐσης, και γίνονται ενέσεις με τις μοριακές κατασκευές που παρουσιάζονται στην παράγραφο B.2. Για της μικροενέσεις χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Observer.D1 εφοδιασμένο με συσκευή μικροενέσεων Narishige IM-31. Τα άτομα για τις ενέσεις ακινητοποιήθηκαν μέσα σε σταγόνα Halocarbon oil 700, επιστρωμένη σε λεπτό στρώμα 3% (w/v) αγαρόζης σε dH₂O, πάνω σε καλυπτρίδα διαστάσεων 24mm x 50mm. Η σύσταση των μειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις ενέσεις παρουσιάζονται στον πίνακα B7. Στην παρασκευή των μειγμάτων χρησιμοποιήθηκε νερό για ενέσεις.

Πίνακας B7. Σύσταση μειγμάτων μικροενέσεων

Εξωχρωμοσωμική συστοιχία	
Συστατικό	Συγκέντρωση
Πλασμίδιο pRF4	20ng/μl
DNA ladder	80ng/μl
Επιθυμητό DNA	5ng/μl
Tris-HCl pH 8	10mM
Τελικός όγκος = 25μl	



Εικόνα B1. Η ιδανική θέση για την είσοδο της βελόνας μικροενέσεων. Τα λευκά βέλη απεικονίζουν τη ροή του ενιόμενου διαλύματος.

B.6.5. Διασταύρωση στελεχών *C.elegans*

Οι διασταυρώσεις στελεχών *C. elegans* πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία NGM επιστρωμένα με μικρή ποσότητα βακτηρίων OP-50 σε περιορισμένη έκταση, προκειμένου να αυξηθεί η συχνότητα επαφής των ατόμων. Τα άτομα τοποθετήθηκαν σε αναλογία αρσενικών:ερμαφρόδιτων 4:1-5:1. Τα ερμαφρόδιτα άτομα τοποθετήθηκαν ως προνύμφες σταδίου L3-L4 ώστε να προληφθεί η αυτογονιμοποίηση. Η επιτυχία της κάθε διασταύρωσης διαπιστώθηκε από την παρουσία μεγάλου αριθμού αρσενικών ατόμων στην F₁ γενιά. Ακολούθως απομονώθηκαν ερμαφρόδιτα άτομα της F₁ γενιάς και οι απόγονοι αυτών (F₂). Ο έλεγχος για την ύπαρξη των επιθυμητών μεταλλαγών έγινε πρώτα στα F₁ άτομα για έλεγχο της ετεροζυγωτίας και έπειτα στα F₂ που λήφθηκαν από τους πλυθισμούς που προέκυψαν από τα από τα ετερόζυγα άτομα της F₁, μέσω PCR με τους κατάλληλους εκκινητές και μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης.

B.6.6. Στελέχη *C.elegans*

Το αγρίου τύπου στέλεχος N2 και μερικά μεταλλαγμένα στελέχη αποκτήθηκαν από το Caenorhabditis Genetics Center (CGC, University of Minnesota), που χρηματοδοτείται από το NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Άλλα μεταλλαγμένα στελέχη αποκτήθηκαν από το εργαστήριο Mitani, μέσω του National Bio-Resource Project of the MEXT, Japan. Το σύνολο των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα B8. Οι παρουσιά των μεταλλαγών ανιχνεύθηκε στα άτομα της γενιάς F₂, με PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα B1.

Πίνακας B8. Στελέχη *C.elegans* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή
N2	N2 (Bristol)	Στέλεχος αγρίου τύπου
BRF638	N2; <i>synEx[rol-6(su1006)]</i>	Αγρίου τύπου στέλεχος roller
BRF548	<i>lonp-1 (tm5171)</i>	Μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>lonp-1</i>
BRF611	<i>lonp-1 (tm5171)</i> ; Ex[P _{dcap-1} ::gfp]	Φθορίζων μεταφραστικός μάρτυρας του γονιδίου <i>dcap-1</i> σε <i>lon (tm5171)</i> υπόβαθρο
BRF663	<i>lonp-1 (tm5171)</i> ; Ex[P _{lonp-1} ::lonp-1::gfp; rol-6]	Μιτοχονδριοειδική υπερέκφραση της μεταφραστικής σύντηξης του γονιδίου <i>lonp-1</i> με gfp υπό τον έλεγχο του υποκινητή <i>lonp-1</i> σε <i>lonp-1 (tm5171)</i> γενετικό υπόβαθρο
BRF670	<i>lonp-1 (tm5171)</i> ; Ex[P _{lonp-1} ::Hslon::gfp; rol-6]	Μιτοχονδριοειδική υπερέκφραση της μεταφραστικής σύντηξης του γονιδίου <i>Hslon</i> με gfp υπό τον έλεγχο του υποκινητή <i>lonp-1</i> σε <i>lonp-1 (tm5171)</i> γενετικό υπόβαθρο

BRF674	<i>lonp-1 (tm5171);Ex[P_{lonp-1}::Atlon1::gfp;pRF4]</i>	Μιτοχονδριοειδική υπερέκφραση της μεταφραστικής σύντηξης του γονιδίου <i>Atlon1</i> με <i>gfp</i> υπό τον έλεγχο του υποκινητή <i>lonp-1</i> σε <i>lonp-1 (tm5171)</i> γενετικό υπόβαθρο
BRF675	<i>lonp-1 (tm5171);Ex[P_{lonp-1}::Atlon4::gfp;pRF4]</i>	Μιτοχονδριοειδική υπερέκφραση της μεταφραστικής σύντηξης του γονιδίου <i>Atlon4</i> με <i>gfp</i> υπό τον έλεγχο του υποκινητή <i>lonp-1</i> σε <i>lonp-1 (tm5171)</i> γενετικό υπόβαθρο
CL2070	<i>dvls70[P_{hsp-16.2}::gfp; pRF4]</i>	Φθορίζων μεταγραφικός μάρτυρας του γονιδίου <i>hsp16.2</i> σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο
BRF655	<i>lonp-1 (tm5171); dvls70[P_{hsp-16.2}::gfp; pRF4]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF548 με CL2070 ερμαφρόδιτα
SJ4058	<i>zcls9[P_{hsp-60}::gfp]</i>	Φθορίζων μεταγραφικός μάρτυρας του γονιδίου <i>hsp60</i> σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο
BRF651	<i>lonp-1 (tm5171); zcls9[P_{hsp-60}::gfp]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF548 με SJ4058 ερμαφρόδιτα

B.6.7. Δοκιμασία προσδιορισμού διάρκειας ζωής

Για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής, ικανή ποσότητα ατόμων (τουλάχιστον 100) του τέταρτου προνυμφικού σταδίου (L4) διαμοιράστηκαν σε τρυβλία NGM, στα οποία έχει αναπτυχθεί η επιθυμητή βακτηριακή καλλιέργεια (OP-50). Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν κατά κανόνα 30-40 άτομα και επώαστηκαν στην επιθυμητή θερμοκρασία. Τα άτομα που επιλέχθηκαν για κάθε δοκιμασία αναπτύχθηκαν σε ιδανικές συνθήκες, καθώς καταστάσεις όπως η πείνα ή ο υπερπληθυσμός μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά το αποτέλεσμα. Η ημέρα τοποθέτησης των ατόμων στα τρυβλία σημειώθηκε ως ημέρα 0 και ο πληθυσμός ελεγχόταν καθημερινά για την καταγραφή των θανάτων. Ως νεκρά καταγράφονταν τα άτομα που δεν ανταποκρίνονταν στο άγγιγμα. Άτομα που απομακρύνθηκαν από τη μελέτη για διαφορετικούς λόγους (π.χ. χαμένα ή ξεραμένα άτομα) καταγράφηκαν σε διαφορετική κατηγορία (censored) και συνυπολογίστηκαν στα αποτελέσματα. Οι νηματώδεις μεταφέρονταν σε φρέσκα τρυβλία NGM κάθε δύο ημέρες μέχρι να φτάσουν στην 10 ημερά της ζωής τους και ακολούθως κάθε 4-6 ημέρες, για να αποφευχθούν καταστάσεις πείνας, υπερπληθυσμού, στρες ή κατανάλωσης νεκρών βακτηρίων. Στα πειράματα συμπεριλαμβάνονταν διαγονιδιακά στελέχη που φέρουν ως μάρτυρα συμμετασχηματισμού το διαγονίδιο *rol-6(su1006)*, τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες έφεραν επίσης το διαγονίδιο ώστε όλα τα άτομα να εκδηλώνουν τον φαινότυπο *roller*. Η μέση διάρκεια ζωής αντιπροσωπεύει τη ημέρα κατά την οποία ο αριθμός των θανάτων φτάνει στο 50% του συνόλου του εκάστοτε πληθυσμού. Η μέγιστη διάρκεια ζωής αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των ημερών κατά τις οποίες πεθαίνει το τελευταίο 10% του εκάστοτε πληθυσμού. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (log-rank test) και η απεικόνισή τους (καμπύλες επιβίωσης) έγινε με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism (version 6.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

B.6.8. Δοκιμασίες στρες για έλεγχο και ποσοτικοποίηση φθορισμού

Όλα τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ανθεκτικότητας στο στρες αναπτύχθηκαν και σε ιδανικές συνθήκες και όλα τα στελέχη μελετήθηκαν παράλληλα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα στελέχη CL2070 μαζί με τα BRF655, τα SJ4050 μαζί με τα BRF651 και τα CF1553 σε συνδυασμό με τα BRF671.

Τα παραπάνω ζεύγη στελεχών συγχρονίστηκαν ώστε να υπάρχουν άτομα του ίδιου σταδίου στα πιάτα και δοκιμάστηκαν σε διαφορετικά είδη στρες ανάλογα με τον φθορίζων μεταγραφικό μάρτυρα που περιλαμβάνει στο γονότυπό του το κάθε στέλεχος. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τα πιάτα που τα στελέχη αναπτύσσονταν σε φυσιολογικές συνθήκες.

B.6.8.1. Δοκιμασία θερμικού στρες

Σε θερμικό στρες υποβλήθηκαν τα CL2070 με τα BRF655. Για κάθε στέλεχος μοιράσαμε από 60 άτομα σε δύο πιάτα (30 στο ένα πιάτο και 30 στο άλλο). Το ένα πιάτο από κάθε στέλεχος τοποθετήθηκε στους 20°C, σε φυσιολογικές, δηλαδή, συνθήκες ανάπτυξης, και το δεύτερο πιάτο τοποθετήθηκε για δύο ώρες στους 35 °C. Με το πέρας των δύο ωρών τα πιάτα τοποθετήθηκαν στους 20°C για ανάκαμψη των πληθυσμών. Η μικροσκοπική παρατήρηση για την ένταση του φθορισμού πραγματοποιήθηκε μετά από 24 ώρες.

B.6.8.2. Δοκιμασία οξειδωτικού στρες

Πριν τις δοκιμασίες του οξειδωτικού στρες, τα πιάτα ακτινοβολήθηκαν με UV ακτινοβολία, εντάσεως 1J/cm² δύο φορές, ώστε να να θανατωθούν τα βακτήρια με σκοπό να μην μεταβολήσουν τα χημικά του χειρισμού για το οξειδωτικό στρες.

Εμποτισμός με Αρσενιώδες νάτριο (NaAsO₂ – ACROS)

Η εφαρμογή έγινε απευθείας στα τρυβλία NGM, σε τελική συγκέντρωση 5mM. Σε δύο εμποτισμένα τρυβλία NGM-το ένα με άτομα του στελέχους CF1553, και το άλλο του στελέχους BRF671- προστέθηκαν 30 άτομα ενήλικα μίας ημέρας και μεταφέρθηκαν στους 20°C. Η μικροσκοπική παρατήρηση έγινε 24 ώρες αργότερα.

Εμποτισμός με Βρωμιούχο εθίδιο (EtBr)

Η εφαρμογή έγινε απευθείας στα τρυβλία NGM, σε τελική συγκέντρωση 120μg/mL. Σε δύο εμποτισμένα τρυβλία NGM-το ένα με άτομα του στελέχους CL2070, και το άλλο του στελέχους BRF655- προστέθηκαν 30 άτομα ενήλικα μίας ημέρας και μεταφέρθηκαν στους 20°C. Η μικροσκοπική παρατήρηση έγινε 48 ώρες αργότερα.

B.7. Μικροσκοπία

Η μικροσκοπική παρατήρηση και η ανάλυση του προτύπου φθορισμού έγιναν με αναισθητοποίηση των επιθυμητών ατόμων με λεβαμιζόλη (40mM διαλυμένη σε M9) και την τοποθέτησή τους σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα, επιστρωμένη με ένα λεπτό στρώμα πηκτώματος αγαρόζης 3% σε dH₂O. Η παρατήρηση του φθορισμού και η λήψη φωτογραφιών για τις μοριακές κατασκευές της παρούσας μελέτης έγινε με το σύστημα συνεστιακής μικροσκοπίας λέιζερ Leica TCS SP5 II προσαρμοσμένο σε ορθό μικροσκόπιο DM6000 CFS, χρησιμοποιώντας καταδυτικό φακό 20x. Για τον προσδιορισμό του αντιπροσωπευτικού προτύπου φθορισμού κατά την ιστοειδική έκφραση των διαγονιδιακών ζώων, παρατηρήθηκαν ενήλικα άτομα μιας ημέρας, ενώ οι παράμετροι ρυθμίστηκαν μία φορά για κάθε μοριακή κατασκευή και παρέμειναν σταθερές κατά την παρατήρηση των διαφορετικών σειρών διαγονιδιακών ατόμων. Οι εικόνες φθορισμού για τα εν λόγω διαγονιδιακά άτομα αποτελούν δυσδιάστατες προβολές πολλαπλών οπτικών τόμων. Η μικροσκοπία ορατού φωτός και η λήψη των αντίστοιχων φωτογραφιών έγινε με ορθό μικροσκόπιο Leica DMRA2, χρησιμοποιώντας φακούς 20x.

Όσον αφορά τα διαγονιδιακά στελέχη με τους υποκινητές στρεσογόνων πρωτεϊνικών μαρτύρων συντηγμένους με το γονίδιο της *gfp*, σε γενετικό υπόβαθρο *lonp-1*, οι παράμετροι φωτογράφισης ρυθμίστηκαν ξεχωριστά για το κάθε στέλεχος και παρέμειναν σταθερές για όλα τα άτομα. Για αυτές τις παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκε απλό μικροσκόπιο φθορισμού, και χρήση του φακού 10x.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

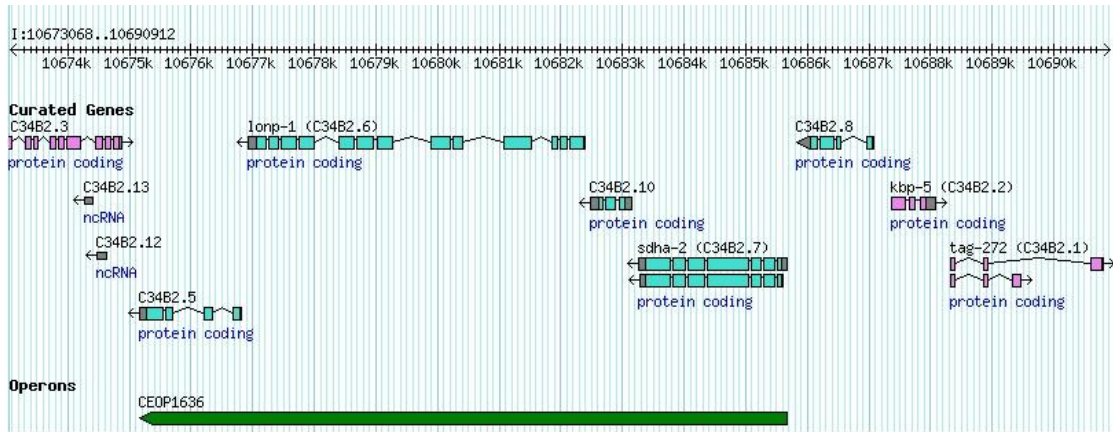
Γ.1. Δομή και έκφραση του γονιδίου *lonp-1* του *C. elegans*

Ανατρέχοντας στην ιστοσελίδα www.wormbase.com μπορεί να βρεθεί το σύνολο της βιολογίας για ότι αφορά τον νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*. Αναζητώντας τα ομόλογα γονίδια για την πεπτιδάση LON στο γονιδίωμα του *C. elegans*, είδαμε ότι έχουν ταυτοποιηθεί δύο μέλη *lonp* γονιδίων, το *lonp-1* και το *lonp-2*. Πιο συγκεκριμένα το *lonp-1* κωδικοποιεί για ένα ομόλογο της Lon μιτοχονδριακής πρωτεάσης (LONP1-lon peptidase 1), ενώ το *lonp-2* κωδικοποιεί για ένα ομόλογο της Lon περοξυσωματικής πρωτεάσης (LONP2-lon peptidase 2).

Το *lonp-1*, εδράζεται στο χρωμόσωμα I και αποτελεί το 3^ο γονίδιο του οπερονίου CEOP1636 (Εικόνα Γ1). Ο νηματώδης σκώληκας *C.elegans* και τα συγγενικά του είδη είναι μοναδικός μεταξύ των μετάρζων με το να έχουν οπερόνια. Περίπου το 15% των γονιδίων του νηματώδους είναι οργανωμένο σε οπερόνια. Τα οπερόνια αποτελούν ρυθμισμένες μονάδες μεταγραφής πολλαπλών γονιδίων, τα οποία όμως διαφέρουν από αυτά των βακτηρίων καθώς μετά την επεξεργασία τους οδηγούν στην παραγωγή ξεχωριστών μορίων mRNA [275]. Πιο συγκεκριμένα, το πολυκιστρονικό πρώιμο αγγελιαφόρο RNA (pre-mRNA, που κωδικοποιεί για πολλαπλά πεπτίδια) υποβάλλεται σε επεξεργασία προς μονοκιστρονικό mRNA. Αυτό συμβαίνει με σχηματισμό του 3' άκρου και trans ματίσματος από το εξειδικευμένο μικρό πυρηνικό σωματίδιο ριβονουκλεοπρωτεΐνης SL2. Παρόλο που έχουν αναφερθεί μόνο 28 οπερόνια, η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος του *C.elegans* αποκαλύπτει πολυάριθμες γονιδιακές ομάδες (gene clusters) [332].

Το μήκος του *lonp-1* είναι 2916 νουκλεοτίδια και η κωδικοποιείσα πρωτεΐνη LONP-1 είναι μήκους 971 αμινοξέων με εκτιμώμενο μοριακό βάρος 108.2 kDa. Η υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης είναι η μιτοχονδριακή μήτρα. Η LONP-1 εκφράζεται σε πλήθος

ιστών, όπως ο φάρυγγας, τα σπλάχνα, οι μύες, η υποδερμίδα και το νευρικό σύστημα, όπως προκύπτει από τη μεταγραφική σύντηξη της πρωτεΐνης με GFP (C34B2.6::*gfp*).



Εικόνα Γ1 | Το οπερόνιο CEOP1636. Το οπερόνιο εδράζεται στο χρωμόσωμα I. Παρατηρείται το γονίδιο *lonp-1* με τα εξώνια και τα ιντρόνια. Πέρα από το *lonp-1*, στο οπερόνιο για πρωτεΐνες κωδικοποιούν και τα C34B2.5, C34B2.10, και C34B2.7 (*sdha-2*).

Τροποποιημένο από www.wormbase.org

Πέρα από το γονίδιο που κωδικοποιεί για την LONP-1, στο οπερόνιο εδράζονται και άλλα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες τα C34B2.5, C34B2.10, C34B2.7 (*sdha-2*) και C34B2.8. Το C34B2.5 κωδικοποιεί για ένα ορθόλογο της ανθρώπινης πρωτεΐνης TTC1 (tetraatricopeptide repeat domain 1), το C34B2.10 για μία από τις δύο μιτοχονδριακές φλαβοπρωτεΐνες υπομονάδες του συμπλόκου II της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (succinate dehydrogenase complex II).

Γ.2. Χαρακτηρισμός του *lonp-1* μεταλλάγματος στον *C. elegans*

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η ευκαρυωτική πρωτεάση Lon λειτουργεί στο σύστημα ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών (Protein Quality Control-PQC system) στα μιτοχόνδρια με πολλαπλές λειτουργίες, και παίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της βιογένεσης και της ομοιόστασης [333]. Τα μιτοχόνδρια ενορρηστρώνουν τη διαδικασία της ζωής των κυττάρων και του θανάτου, εφαρμόζοντας έτσι αποφασιστικό έλεγχο στη σηματοδότηση που οδηγεί στην κυτταρική επιβίωση και ιδιαίτερα στην ενδογενή οδό της απόπτωσης. Έτσι, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα επίπεδα της Lon ρυθμίζουν τις μιτοχονδριακές λειτουργίες που συμβάλλουν στη μοίρα και την επιβίωση των κυττάρων. Πράγματι, υπέκφραση της Lon οδηγεί σε απώλεια

μιτοχονδριακής λειτουργίας, έγκαιρη εμβρυϊκή θνησιμότητα, μειωμένο πολλαπλασιασμό κυττάρων και απόπτωση [228, 241, 334].

Επίσης, η ανεπάρκεια της LONP1 ποντικού επάγει αλλοιώσεις στη μιτοχονδριακή αναπνοή και στο σύστημα OXPHOS. Επιπλέον, η ομόζυγη εξάλειψη του *lonp1* σε ποντίκια προκαλεί πρόωμη εμβρυϊκή θνησιμότητα, ενώ οι ετερόζυγοι ποντικοί παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στον όγκο, πράγμα που αποδεικνύει τον ουσιαστικό ρόλο αυτού του πρωτεολυτικού ενζύμου στη ζωή και τη νόσο [228].

Πέρα από τις πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά των Lon μεταλλαγμάτων στο *E.coli*, στη ζύμη και σε κάποιες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές διαφορετικών ιστών και τύπων (π.χ. καρκινικές σειρές), ελάχιστες είναι οι βιβλιογραφικές πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά της *lonp-1* μεταλλαγής στον νηματώδη σκώληκα *C.elegans*. Έχει αποδειχθεί, ότι απώλεια δραστηριότητας οδηγεί σε προβληματική πρωτεόλυση του ATFS-1 bZip μεταγραφικού παράγοντα που διαμελίζεται μεταξύ του μιτοχονδρίου και του πυρήνα και λειτουργεί ως μέλος του μιτοχονδριακού Unfolded Protein Response (UPR^{mt}) [193]. Έτσι, για το χαρακτηρισμό και μελέτη της έλλειψης της *Lonp-1* πρωτεάσης στον *C. elegans* αγοράστηκε ένα στέλεχος, το tm5171, που αποτελεί ένα μετάλλαγμα του γονιδίου που κωδικοποιεί για την μιτοχονδριακή *lonp-1* του *C.elegans*. Αυτό το στέλεχος δημιουργήθηκε από το National Bioresource Project, στο Τόκιο της Ιαπωνίας, το οποίο αποτελεί μέρος της Κοινοπραξίας International Knockout του *C. Elegans*. Πιο συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από μία διαγραφή 490bp και εισαγωγή 5bp, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα Γ2, που οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου εξαιτίας της δημιουργίας ενός κωδικονίου λήξης στην αμινοξική θέση 151.

red = mutation

yellow = flanking sequence

>tm5171 wild type, with 250 bp flanks

```
aaagggatataatccttttttagattacaataagtttgcgtgctcgagaccgggtatcgtaaatattgaggtacaaatggcta
aataatcgcaacttgatattaccgaatcgtctgcacaatggccatcatcgtagccttcgcttccattattcttgggcaactg
gctctgcaacaacattctcggttcgaaccataataattcctttttctgcttttctccagttgctgatgggtggtgctg
ttctcttcttctcttctggtgctgaaatttctggagccactgaagccactgaaggtgcaagtgagggtggtgatgggtg
tggagtgagtggtgatggtgctgatgctgcacgctttccacgagcacgtcttccattcaatggagtctcattttcgggtg
taatttcgtcaattggttcaagagcacgaattcttcgatgagcactgagtaccagctcaagaacacttccctgatcACGG
ACTTCGATAAATTTGAACGAAAGAACCAGTTGGGTAGACTTCTGATAGAGATGTGATCGITTTCTTCTTTGTTTCTGGAAAA
AAATATACTAATTTGCGCGGGAATTCAAAAATAATTCAGCAATTTTAATCCATTTTTGTTGCAAAATGAAAAAATAC
AAAACAATTTGAAAAAGTGATAAAATTTTAGAAGTTATAGTCGGTATATAGAAGATTGATTTTTTCTGTTAATTTGA
TGATTCCAATAACAAAAATGGTTCCAATCAAAAAATCAGGCAAAAACCTGTAAGAAGCATTTCCTCGGGGAGTACACGAG
CTCCGTATATCAACACATGACTAGTTTTTCGGCGATTGTTCCATTTTAAGTCAAGAAGAGATCCATTCAAAAACACAT
ACTCATCGTCTCTCTTCACAAAAACCTCCAGCATACGGCTGTTTCAGTGAAGCTGTCCCTGATCAGTGTCTTTAAATTG
TCATCTTTCACGATCTGAAATTTAATTTTCAGTTTTCCGCCAAAATACGTTATCTaatctcacatcaactttcttgataa
atcctggaaatagtgatagctgattgatagctaacattgggacatttggcatatcggctggcacttgaatcgggtgacatt
cctccctgaaaaatcaattaaaatcgtcttttaatgactgaaattctaaaaaacttaccaaatcttgtacagttccaatg
agtcacccacagcagattggatcgtcatgagtggaataaaaacctcctttctcctgaatttctgtaattccatagatttc
atcattaaaatcagattgatttctttgagaaaatgtggcaaaagctttgatgctgctgaagcagcggcaagaagccgcgctg
agttgccccgcggagtaaaaaccgctccagcgcggtacatttctggtgaacggggagtaggataggaggattcaagacttc
agaataaaaaagtaaatgtgtcgcattaaaacgtcaataaaaatattaaa
```

>tm5171 tm5171 with 250 bp flanks

```
aaagggatataatccttttttagattacaataagtttgcgtgctcgagaccgggtatcgtaaatattgaggtacaaatggcta
aataatcgcaacttgatattaccgaatcgtctgcacaatggccatcatcgtagccttcgcttccattattcttgggcaactg
gctctgcaacaacattctcggttcgaaccataataattcctttttctgcttttctccagttgctgatgggtggtgctg
ttctcttcttctcttctggtgctgaaatttctggagccactgaagccactgaaggtgcaagtgagggtggtgatgggtg
tggagtgagtggtgatggtgctgatgctgcacgctttccacgagcacgtcttccattcaatggagtctcattttcgggtg
taatttcgtcaattggttcaagagcacgaattcttcgatgagcactgagtaccagctcaagaacacttccctgatcACGG
ACTTCGATAAATTTGAACGAAATGTTTCAGTTTTCCGCCAAAATACGTTATCTaatctcacatcaactttcttgataaatcct
ggaaatagtgatagctgattgatagctaacattgggacatttggcatatcggctggcacttgaatcgggtgacattcctcc
ctgaaaaatcaattaaaatcgtcttttaatgactgaaattctaaaaaacttaccaaatcttgtacagttccaatgagtc
tccacagcagattggatcgtcatgagtggaataaaaacctcctttctcctgaatttctgtaattccatagatttcatcat
taaaatcagattgatttctttgagaaaatgtggcaaaagctttgatgctgctgaagcagcggcaagaagccgcgctg
ccccgcggagtaaaaaccgctccagcgcggtacatttctggtgaacggggagtaggataggaggattcaagacttcagaat
aaaaaagtaaatgtgtcgcattaaaacgtcaataaaaatattaaa
```

Εικόνα Γ2 | Μορφή μεταλλαγής στο γονίδιο *lonp-1*. Η μεταλλαγή tm5171, όπως είναι καταχωρημένη στην wormbase. Η μεταλλαγή χαρακτηρίζεται ως deletion 490bp και insertion 5bp, οδηγώντας σε πλήρη απώλεια λειτουργίας του γονιδίου (knockdown), εξαιτίας της δημιουργίας ενός κωδικονίου λήξης στη θέση 151.

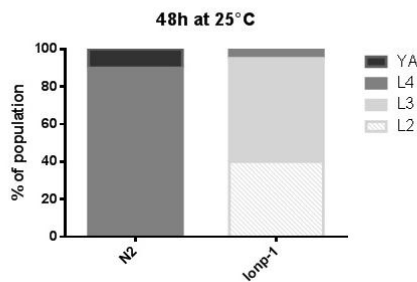
Τροποποιημένο από www.wormbase.org

Καθώς δεν υπήρχε χαρακτηρισμός αυτού του στελέχους στη βιβλιογραφία, προχωρήσαμε στη μελέτη της φυσιολογίας του, αφού πρώτα διασταυρώθηκε 4 φορές με το στέλεχος αγρίου τύπου (N2) στο εργαστήριό μας (για την εξάλειψη τυχόν άλλων μεταλλαγών στο υπόλοιπο γονιδίωμα, λόγω της τυχαίας μεταλλαξογένεσης από όπου προήλθε). Αυτό έγινε μέσω διασταυρώσεων με το στέλεχος N2 και επιλογή της συγκεκριμένης μεταλλαγής (*tm5171*) στους απογόνους της γενιάς F2 με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών PCR (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

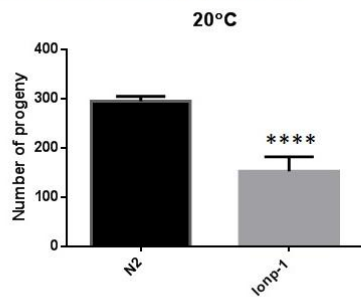
Γ.2.1. Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης και γονιμότητας του μεταλλάγματος *lonp-1*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης των ατόμων του στελέχους. Για το σκοπό αυτό έγινε συγχρονισμός πιάτων με ταυτόχρονη εναπόθεση αυγών αγρίου τύπου και *lonp-1* νηματωδών και μετρήθηκε ο αριθμός των ατόμων κάθε αναπτυξιακού σταδίου έπειτα από 48 ώρες, στους 20°C. Τα ποσοστά που λήφθηκαν δείχνουν μία χαρακτηριστικά σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη των ατόμων του μεταλλαγμένου στελέχους, όπου το σύνολο του πληθυσμού αγρίου τύπου αποτελείται από άτομα κυρίως L4 προνυμφικού σταδίου, ενώ ο πληθυσμός των *lonp-1* νηματωδών αποτελείται κυρίως από L2 και L3 άτομα (Εικόνα Γ3, Α).

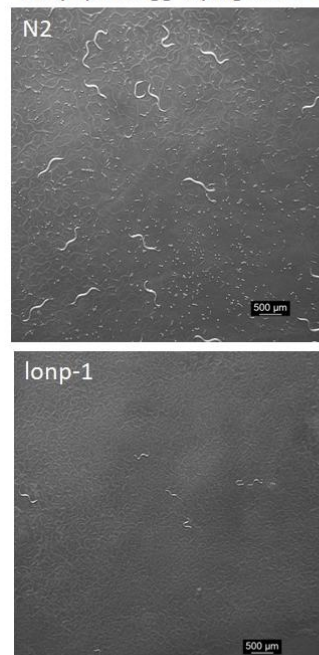
A) Growth rate of *lonp-1(tm5171)* mutant (4xO/C)



B) Brood size of *lonp-1(tm5171)*



C) 4 days post egg-laying at 20°C



Εικόνα Γ3 | Ο ρυθμός ανάπτυξης και ο έλεγχος γονιμότητας των *lonp-1* μεταλλαγμάτων. Α) Διάγραμμα του ρυθμού ανάπτυξης των *lonp-1* ατόμων σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου (N2). Τα προνυμφικά στάδια ανάπτυξης των πληθυσμών εκφράζονται σε ποσοστό επί τοις 100. Β) Διάγραμμα μεγέθους γενιάς όσον αφορά τη γονιμότητα του *lonp-1* μεταλλάγματος. Γ) Φωτογραφίες συγχρονισμένων πληθυσμών αγρίου τύπου και στελέχους *lonp-1*, όπως φαίνονται στο στερεοσκόπιο 4 ημέρες μετά την ταυτόχρονη εναπόθεση αυγών.

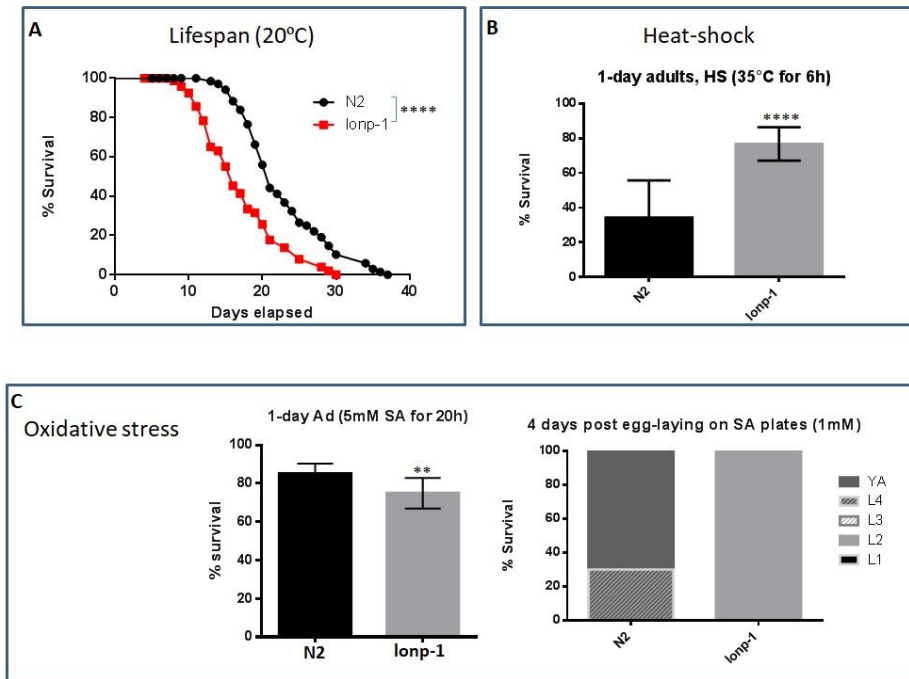
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της γονιμότητας του στελέχους *lonp-1*. Για αυτό το σκοπό, έγινε μελέτη γονιμότητας (fertility assay) βάζοντας συγκεκριμένο αριθμό ενήλικων ατόμων αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων σε OP-50 πιάτα. Τα άτομα αφέθηκαν για ορισμένη χρονική διάρκεια να γεννήσουν και έπειτα αφού απομακρύνθηκαν, μετρήθηκαν οι απόγονοι. Ο αριθμός των απογόνων *lonp-1* ήταν σημαντικά χαμηλότερος από αυτόν των αγρίου τύπου (N2) (Εικόνα Γ3, Β). Παρατηρείται περίπου 50% μικρότερος αριθμός απογόνων στον *lonp-1* πληθυσμό σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται συνδυαστικά και στην φωτογραφία (C) της εικόνας Γ3, σε πληθυσμούς τεσσάρων ημερών από τη στιγμή που αφέθηκαν τα αβγά, στους 20°C.

Γ.2.2. Προσδιορισμός της διάρκειας ζωής του στελέχους *lonp-1* και της επιβίωσής του σε στρες

Η υπερβολική παραγωγή ROS μπορεί να βλάψει τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες [335]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως σε πολλές κυτταρικές σειρές, η διαγραφή της *Lon* σε κύτταρα HeLa οδηγεί σε αύξηση οξειδωτικά τροποποιημένων πρωτεϊνών. Ο τύπος κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα με έλλειψη *Lon* ελέγχεται επίσης από το επίπεδο της εξάντλησης του ATP που προκαλείται από σοβαρά μιτοχονδριακά ελαττώματα τόσο σε λειτουργικό (απώλεια αερόβιας αναπνοή και μεμβρανικό δυναμικό) όσο και σε μορφολογικό επίπεδο, που περιλαμβάνει τη συσσώρευση συσσωματωμένων, οξειδωτικά κατεστραμμένων πρωτεϊνών, όπως η ακονιτάση [223], ή μη συναρμολογημένες υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας [229, 232]. Τέτοια βιβλιογραφικά στοιχεία οδήγησαν στην μελέτη της επιβίωσης των *lonp-1* μεταλλαγμάτων του *C.elegans* σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για το λόγο αυτό πληθυσμοί *lonp-1* και αγρίου τύπου (N2) υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό στρες παρουσία αρσενιώδους νατρίου (sodium arsenite, SA) με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο Β.6.8.2. Τα αποτελέσματα, έδειξαν σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης των *lonp-1* σε σχέση με τον πληθυσμό αγρίου τύπου (Εικόνα Γ4, C). Ταυτόχρονα με τα επίπεδα της επιβίωσης, μελετήθηκε και ο ρυθμός ανάπτυξης του μεταλλάγματος σε μικρότερες συγκεντρώσεις αρσενιώδους νατρίου, όπου παρατηρήθηκε μια πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης πέρα από το δεύτερο λαρβικό στάδιο (L2), στο μέταλλαγμα, σε αντίθεση με το N2 που το 70% των ατόμων είχε ολοκληρώσει την ανάπτυξή του (Εικόνα Γ4, C).

Παράλληλα με την μελέτη των *lonp-1* μεταλλαγμάτων υπό οξειδωτική καταπόνηση πραγματοποιήθηκε μελέτη του εν λόγω πληθυσμού υπό θερμική καταπόνηση. Για αυτό το σκοπό ενήλικα άτομα ηλικίας μίας ημέρας από τον *lonp-1* πληθυσμό υποβλήθηκαν σε θερμικό στρες, τοποθετώντας τους σε θάλαμο με θερμοκρασία σταθερή στους 35 °C για 6 ώρες. Στην αντίστοιχη καταπόνηση υποβλήθηκε και πληθυσμός control (N2). Έπειτα από 16 ώρες μετρήθηκε το ποσοστό επιβίωσης των ατόμων. Εντυπωσιακό αποτέλεσμα αποτελεί η παρατήρηση ότι τα *lonp-1* άτομα ήταν τρομερά ανθεκτικά στην θερμική καταπόνηση με ποσοστό επιβίωσης ~50% υψηλότερο από αυτό των ατόμων αγρίου τύπου (Εικόνα Γ4, B). Καθώς η ανθεκτικότητα σε θερμικό στρες έχει συσχετιστεί σε πολλές περιπτώσεις με αυξημένη διάρκεια ζωής στο νηματώδη, ελέγξαμε αν αυτό ισχύει και στην περίπτωση του *lonp-1* στελέχους.

Το αποτέλεσμα της μελέτης, έδειξε χαρακτηριστικά σημαντική μειωμένη διάρκεια ζωής του πληθυσμού *lonp-1*, σε σύγκριση με τον ηλικιακά συγχρονισμένο πληθυσμό αγρίου τύπου (Εικόνα Γ4, A). Συγκεκριμένα, η τυπική διάρκεια ζωής του *lonp-1* ήταν 16 μέρες στους 20°C, ενώ του αγρίου τύπου ήταν 21 μέρες.



Εικόνα Γ4 | Διάγραμμα μακροζωίας και ποσοστά επιβίωσης στο στρες των *lonp-1* ατόμων. Α) Καμπύλες διάρκειας ζωής του πληθυσμού μελέτης *lonp-1* σε σχέση με τον πληθυσμό αγρίου τύπου. Β) Στήλες ποσοστού επιβίωσης μιας μέρας ενήλικων ατόμων *lonp-1* και N2 σε θερμική καταπόνηση. Γ) Στήλες ποσοστού επιβίωσης στο οξειδωτικό στρες με χρήση 5mM SA για 20 ώρες καθώς και του ποσοστών των διαφόρων προνυμφικών σταδίων έπειτα από τέσσερις μέρες ανάπτυξης σε πιάτα με συγκεντρωση 1mM SA.

Γ.2.3. Μελέτη της μορφολογίας μιτοχονδρίων στο στέλεχος *lonp-1*

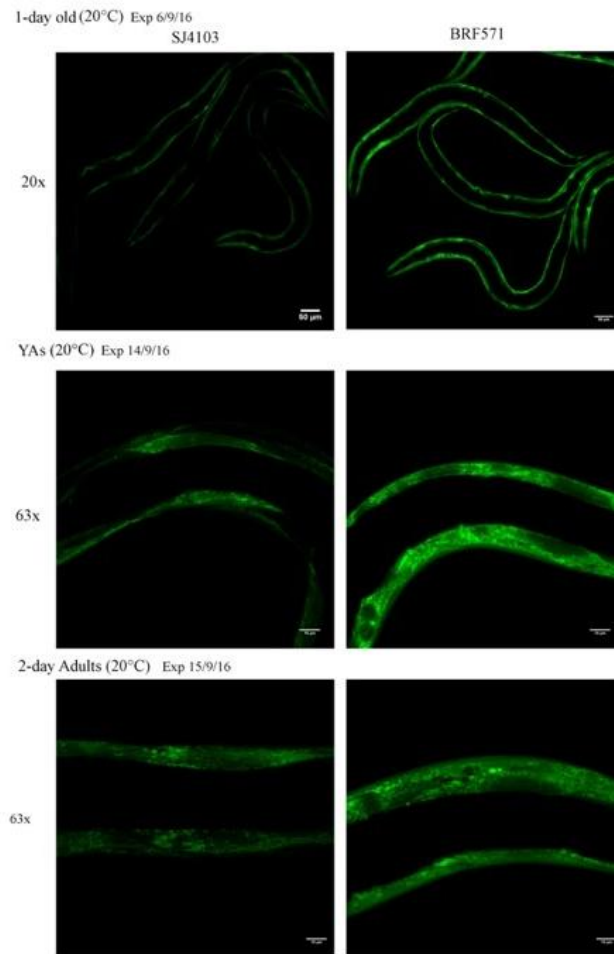
Η υπέκφραση της Lon σε άλλα μοντέλα οργανισμούς με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρουσίασε ένα σύνολο και μια ποικιλία μορφολογικών φαινοτύπων των μιτοχονδρίων, συμπεριλαμβάνοντας γιγάντια μιτοχόνδρια με άδεια μεγάλα κενοτόπια, μιτοχόνδρια με κοκκία συσσωματωμένων οξειδωμένων πρωτεϊνών και μικροσκοπικά μιτοχόνδρια. Αυτοί οι παθολογικοί φαινότυποι είναι παρόμοιοι με αυτούς που παρατηρούνται σε γηρασμένους ιστούς, προτείνοντας ότι η υπέκφραση της Lon πιθανότατα συμβάλλει στην διαδικασία της γήρανσης [336]. Ακόμα η εμφάνιση γιγαντιαίων μιτοχονδριακών σωμάτων μέσα στο κυτταρόπλασμα των ινοβλάστων απώλειας λειτουργίας της Lon WI-38 VA-13 υποδηλώνουν, ότι η έλλειψη διάσπασης και νηματοειδούς ανάπτυξης [337] που χαρακτηρίζουν τα στελέχη ΔLon / La *E. Coli*, μπορεί επίσης να λάβει χώρα στα μιτοχόνδρια αυτών των κυττάρων. Επίσης η μορφολογική εξέταση των *rim1* μιτοχονδρίων ζύμης, αποκάλυψε ότι είχαν μία ανώμαλη μορφολογία. Το σχήμα τους ήταν ασυνήθιστο και ηλεκτρονικά πυκνά σωματίδια εγκλεισμού ήταν συσσωρευμένα στην μήτρα, πιθανότατα αποτελώντας συσσωματώματα μιτοχονδριακών πρωτεϊνών [338]. Ακόμα, μικρογραφίες μετάδοσης ηλεκτρονίων έδειξαν μια παρεκκλίνουσα μιτοχονδριακή μορφολογία με κάποια ομοιότητα με πρώιμα μιτοχόνδρια. Αυτή η ανώμαλη μορφολογία θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα ατελούς βιογένεσης ή

των συνεπειών της συσσώρευσης μη συναρμολογημένων πρωτεϊνικών συμπλοκών [339, 340]. Τέτοιες βιβλιογραφικές αναφορές οδήγησαν στην μελέτη της μορφής και οργάνωσης των μιτοχονδρίων στα μεταλλάγματα *lonp-1* με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό στέλεχος SJ4103, στο οποίο το ενσωματωμένο πλασμίδιο *zcls14 (mgo-3::gfp^{mt})* εκφράζει σταθερά μία μιτοχονδριακά εντοπισμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη με ένα μιτοχονδριακό σινιάλο εισαγωγής στους μύες του αγρίου τύπου (αυτό αποτέλεσε το στέλεχος control). Έπειτα για να μπορέσει να μελετηθεί η οργάνωση των μιτοχονδρίων στο μετάλλαγμα που μας ενδιαφέρει, δημιουργήθηκε μέσω διασταύρωσης του *lonp-1 (tm5171)* με το SJ4103, το στέλεχος BRF571 το οποίο εκφράζει το διαγονίδιο *mgo-3::gfp^{mt}* σε *lonp-1* γενετικό υπόβαθρο. Τα άτομα παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο με χρήση φακού 20x και 63x. Οι ηλικίες παρατήρησης ήταν σταδίου νεαρών ενηλίκων και ενηλίκων μίας και δύο ημερών. Είναι φανερά τα αυξημένα επίπεδα φθορισμού στα *lonp-1* άτομα σε όλες τις μεγενθύνσεις, υποδεικνύοντας μία σταθεροποίηση των επιπέδων της μιτοχονδριακής GFP πρωτεΐνης στους μύες του *lonp-1* στελέχους, σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου τύπου. Ωστόσο, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στο πρότυπο της μορφής που σχηματίζουν τα μιτοχόνδρια στους μύες του νηματώδους. Σημαντική λοιπόν κρίνεται η μελέτη σε επίπεδο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των μιτοχονδρίων στον *C.elegans*, με σκοπό αναγνώριση τυχόν όμοιων φαινοτύπων με αυτούς που έχουν παρατηρηθεί σε υπόλοιπους οργανισμούς .

SJ4103=zcls14[P_{myo-3}::GFP^{mt}]

BRF571=*lonp-1*;zcls14



Εικόνα Γ5 | Μορφολογία μιτοχονδρίων σε *lonp-1* μεταλλάγματα και άτομα αγρίου τύπου. Αριστερή στήλη (control): Άτομα του στελέχους SJ4103 παρατηρημένα με φακό 20x (ενήλικα μίας ημέρας) και με φακό 63x (νεαρά ενήλικα και ενήλικα δύο ημερών). Δεξιά στήλη: Άτομα του στελέχους BRF571 παρατηρημένα με φακό 20x (ενήλικα μίας ημέρας) και με φακό 63x (νεαρά ενήλικα και ενήλικα δύο ημερών).

Γ.3. Μελέτη συμπλήρωσης των φαινοτύπων *lonp-1* με τη χρήση διαγονιδίων

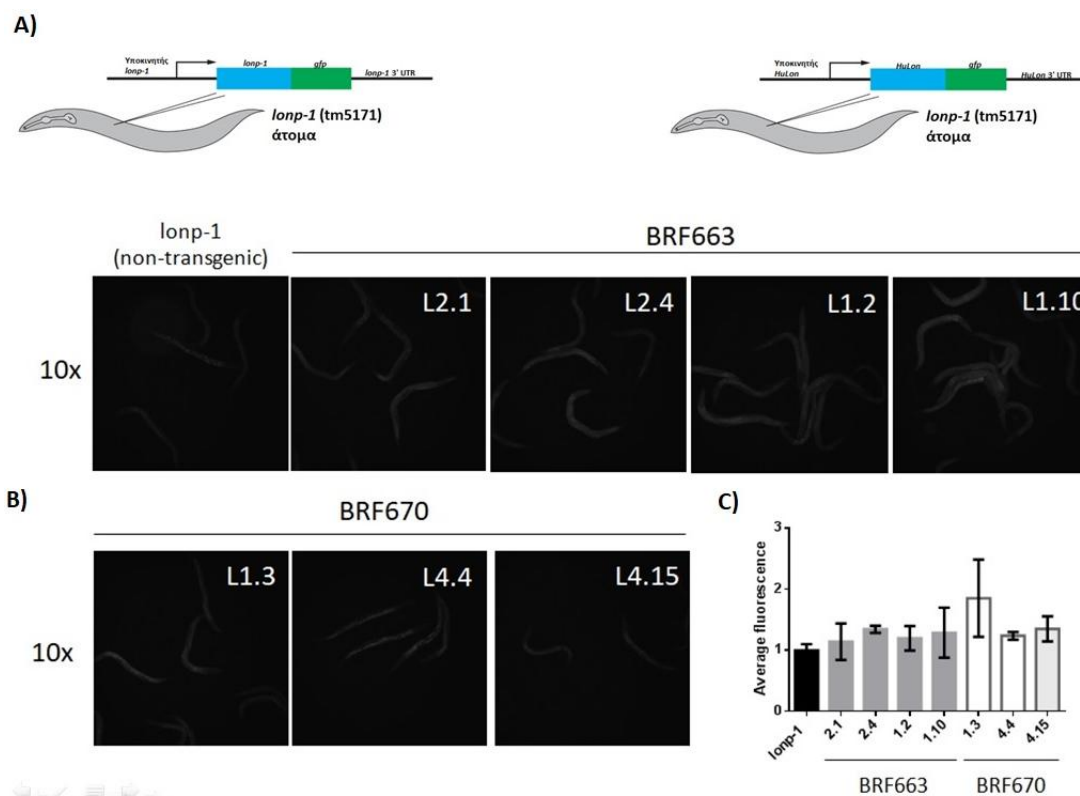
Από τον χαρακτηρισμό του στελέχους απώλειας δράσης του γονιδίου *lonp-1* παρατηρήθηκε πλήθος αρνητικών επιπτώσεων στην ζωή του νηματώδους συμπεριλαμβανομένου, των χαμηλών επιπέδων εναπόθεσης αβγών, την καθυστέρηση στην ανάπτυξη, την μειωμένη διάρκεια ζωής και τα μειωμένα ποσοστά επιβίωσης στο οξειδωτικό στρες. Μεταξύ αυτών εντύπωση προκαλεί η παρατήρηση αυξημένης ανθεκτικότητας στο θερμικό στρες αυτών των μεταλλαγμάτων.

Μία τυπική προσέγγιση σε φαινοτύπους τέτοιων μεταλλαγμάτων, αποτελεί η δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών, που σε υπόβαθρο μεταλλαγμένου συστήματος πραγματοποιείται υπερέκφραση του γονιδίου απώλειας λειτουργίας, με σκοπό τη μελέτη της πιθανότητας επαναφοράς του φαινοτύπου ζώων αγρίου τύπου στα παθολογικά μεταλλάγματα. Όσον αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και το οποίο μελετάται στην εν λόγω εργασία, δηλαδή το γονίδιο *lonp-1*, που κωδικοποιεί για την μιτοχονδριακή Lon πρωτεάση του *C.elegans*, δεν υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία για αυτό το σύστημα. Στο σύστημα της ζύμης παρόλ' αυτά, χρησιμοποιήθηκε αυτή η προσέγγιση σε *pim1Δ* κύτταρα ζύμης, τα οποία χαρακτηρίζονταν από αδυναμία πρωτεόλυσης. Έτσι με τη δημιουργία μίας μοριακής κατασκευής που κωδικοποιεί για το ομόλογο της Pim1 στον άνθρωπο, την μιτοχονδριακή LON πρωτεάση, και χρήση της σε *pim1Δ* κύτταρα ζύμης μελετήθηκε η ικανότητα πρωτεόλυσης συγκεκριμένων στόχων. Αποτέλεσμα ήταν ότι το ανθρώπινο LON είναι σε θέση να υποκαταστήσει εν μέρει το Pim1 *in vivo* και ότι αυτή η ικανότητα εξαρτάται από την πρωτεολυτική καταλυτική θέση του [341]. Τέτοιου είδους προσεγγίσεις για την μελέτη πλήθος βιολογικών ερωτημάτων διευκολύνονται ιδιαίτερα με τη χρήση του νηματώδους μίας και οι τεχνικές παραγωγής διαγονιδίων που υπερεκφράζουν διάφορα γονίδια ή αποσιωπούν άλλα αποτελούν πειράματα ρουτίνας.

Γ.3.1. Κατασκευή των διαγονιδίων και διαγονιδιακών στελεχών νηματωδών που υπερεκφράζουν την ενδογενή και την ομόλογη ανθρώπινης LON

Για την εν λόγω εργασία δημιουργήθηκαν δύο είδη διαγονιδιακών ζώων. Το πρώτο σε *lonp-1* (*tm5171*) υπόβαθρο εκφράζει το ενδογενές γονίδιο *lonp-1* του *C.elegans* και το δεύτερο, στο ίδιο γενετικό υπόβαθρο, εκφράζει το ομόλογο γονίδιο στον άνθρωπο (HuLON). Για το πρώτο διαγονιδιακό στέλεχος ενέθηκε στη γονάδα των *lonp-1* ατόμων, πλασμίδιο το οποίο φέρει την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *lonp-1* σε σύντηξη με την αλληλουχία της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) στο 3' άκρο της ακολουθούμενη από την ενδογενή 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου. Στο 5' άκρο του διαγονιδίου προστέθηκε ο ενδογενής μερικός υποκινητής του *lonp-1*, ο οποίος φέρει και το σινιάλο μιτοχονδριακής τοποθέτησης (MTS). Για το δεύτερο διαγονιδιακό στέλεχος ενέθηκε στη γονάδα των *lonp-1* ατόμων, πλασμίδιο το οποίο φέρει την κωδική αλληλουχία του γονιδίου της ανθρώπινης Lon (HuLon) σε σύντηξη με την αλληλουχία της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) στο 3' άκρο της ακολουθούμενη από την ενδογενή 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου. Στο 5' άκρο του διαγονιδίου προστέθηκε και σε αυτή την περίπτωση ο ίδιος ενδογενής μερικός υποκινητής του *lonp-1*, ο οποίος φέρει το σινιάλο μιτοχονδριακής τοποθέτησης (MTS)(Εικόνα Γ6, Α). Αξίζει να σημειωθεί, ότι λόγω του οπερονίου, δεν είναι γνωστός ο ενδογενής υποκινητής ακριβώς και επομένως έγινε χρήση του εσωτερικού υποκινητή στο οπερόνιο, ο οποίος πιθανώς δεν είναι πλήρως λειτουργικός, για αυτό και τον αναφέρουμε ως «μερικός». Από τη μικροένεση στη γονάδα, έγινε η επιλογή σταθερών σειρών διαγονιδιακών ατόμων. Έτσι πήραμε τέσσερις σειρές από το διαγονίδιο BRF663 (*lonp-1Ex[P_{lonp-1}::LONP-1::GFP]*), τις L1.2, L2.1, L1.10 και L2.4, και από το διαγονίδιο BRF670 (*lonp-1Ex[P_{lonp-1}::HuLON::GFP]*) τρεις σειρές, τις L1.3, L4.4 και L4.15. Η ορθότητα του προτύπου έκφρασης του εκάστοτε διαγονιδίου διαπιστώθηκε με χρήση απλής

μικροσκοπίας φθορισμού (Εικόνα Γ6, Β) και συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού καθώς και με τη χρώση των μιτοχονδρίων με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική mitotracker, που επιτρέπει τη χρώση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων *in vivo*. Η συγχώνευση των φίλτρων έδειξε την κοινή εγκατάσταση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια αναγνωρίζοντας το χαρακτηριστικό μιτοχονδριακό πρότυπο.



Εικόνα Γ6 | Έκφραση των διαγονιδίων *lonp-1::gfp* και *hulon::gfp* υπό τη δράση του ενδογενούς υποκινητή *lonp-1*. Α) Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής που ακολουθήθηκε για την αποκατάσταση της λειτουργίας του γονιδίου *lonp-1*. Ο ενδογενής υποκινητής κλωνοποιήθηκε αναροϊκά του διαγονιδίου *lonp-1::gfp* και οι μοριακές κατασκευές που προέκυψαν ενέθηκαν στη γονάδα μεταλλαγμάτων *lonp-1*. Β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες απλής μικροσκοπίας φθορισμού των διαγονιδιακών ατόμων που εκφράζουν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες *LONP-1::GFP* (BRF663) και *HuLON::GFP* (BRF670). Για την παρατήρηση χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα άτομα μίας ημέρας, καλλιεργημένα στους 20°C. Ο εκάστοτε αριθμός της διαγονιδιακής σειράς αναφέρεται πάνω δεξιά σε κάθε εικόνα. Γ) Κανονικοποιημένος λόγος φθορισμού των διαγονιδιακών σειρών. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς τα άτομα με γενετικό υπόβαθρο *lonp-1* στις 24 ώρες. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των ατόμων.

Αν και με τη τεχνική της μικροένεσης εισάγονται πολλά αντίγραφα του χειμερικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του στα διαγονιδιακά άτομα, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης αυτών των διαγονιδίων ήταν γενικά πολύ χαμηλά. Στις φωτογραφίες των διαγονιδιακών σειρών απλής μικροσκοπίας φθορισμού, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του παρατηρούμενου φθορισμού και παρατηρούνται κοινά επίπεδα για τον φθορισμό όλων των σειρών και των δύο διαγονιδίων με υψηλότερος

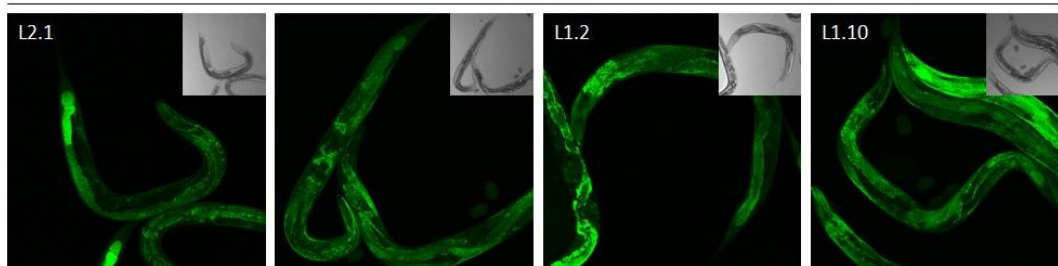
να είναι ο φθορισμός της σειράς 1.3 του στελέχους BRF670 (Εικόνα Γ6, C). Ωστόσο, τα επίπεδα φθορισμού των διαγονιδιακών σειρών είναι πολύ χαμηλά λαμβάνοντας υπόψιν τα εξής πράγματα : πρώτον, τα βασικά επίπεδα φθορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση του λόγου (του μη διαγονιδιακού στελέχους *lonp-1*, όπου δεν εκφράζεται κάποια πρωτεΐνη φθορισμού) είναι πολύ κοντά με τα επίπεδα των διαγονιδιακών σειρών, και δεύτερον, πρώην εργαστηριακά δεδομένα εικόνων απλής μικροσκοπίας φθορισμού με οργανιδιοειδική τοποθέτηση της GFP στα μιτοχόνδρια παρουσίαζαν πολλή υψηλότερη ένταση φθορισμού (SJ4103=zcls14[*P_{myo-3}::GFP^{mt}*]).

Παρόμοιες είναι και οι παρατηρήσεις του φθορισμού με χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και φακών μεγαλύτερης μεγένθυσης. Σε αυτές τις εικόνες παρατηρήθηκε και έντονο το φαινόμενο του χειμερισμού, όσον αφορά την ένταση του φθορισμού, εντός του πληθυσμού της εκάστοτε σειράς(Εικόνα Γ7, A-L1.10). Αυτό βέβαια σε ένα βαθμό αναμένεται, μιας και κάποια αντίγραφα του διαγονιδίου, που βρίσκεται με τη μορφή εξτραχρωμοσώματος, χάνονται τυχαία από κάποια κύτταρα κατά τη διαδικασία διαίρεσής τους. Επίσης, ο υποκινητής που χρησιμοποιείται είναι μερικός με αποτέλεσμα η έκφραση να μην φτάνει τα μέγιστα επίπεδα ή να επηρεάζεται από τον εκάστοτε ιστό και αναπτυξιακό στάδιο, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεταξύ των ζώων κάποια ανομοιομορφία. Ωστόσο, σε φωτογραφίες με χρήση φακού 63x και της φθορίζουσας χρωστικής mitotracker, ταυτοποιήθηκε η τοποθέτηση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, όπως προβλέπεται από το σινιάλο μιτοχονδριακής τοποθέτησης (MTS) του *lonp-1* (Εικόνα Γ7, B).

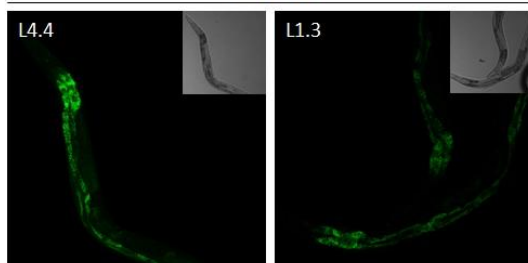
A)

BRF663:*lonp-1*Ex[*P_{lonp-1}::LONP-1::GFP*]-Lines 2.1, 2.4, 1.2 and 1.10
 BRF670:*lonp-1*Ex[*P_{lonp-1}::HuLON::GFP*]-Lines 4.4 and 1.3

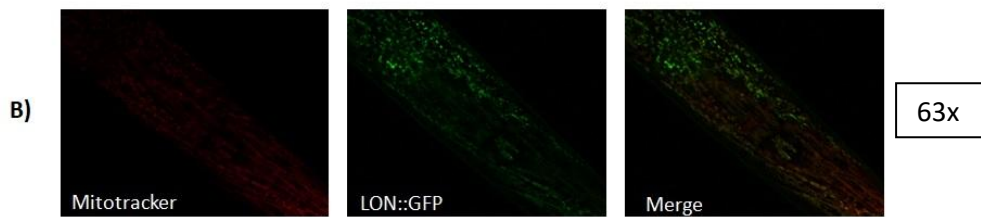
BRF663



BRF670



20x Confocal Images (same settings)

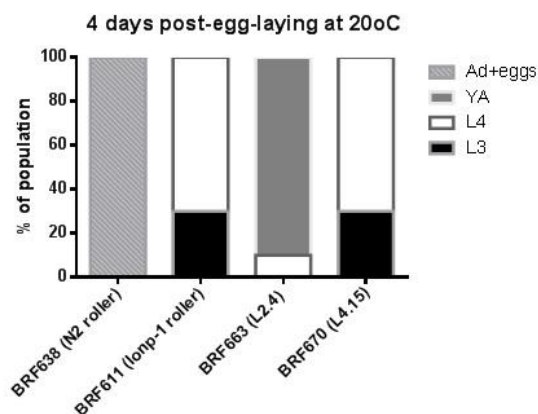


Εικόνα Γ7 | Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού έκφρασης των διαγονιδίων. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού των διαγονιδιακών ατόμων που εκφράζουν τις χμαιρικές πρωτεΐνες *LONP-1::GFP* (BRF663) και *HuLON::GFP* (BRF670). Για την παρατήρηση χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα άτομα μίας ημέρας, καλλιεργημένα στους 20°C. Ο εκάστοτε αριθμός της διαγονιδιακής σειράς αναφέρεται πάνω αριστερά σε κάθε εικόνα. Β) Ταυτοποίηση μιτοχονδριακής τοποθέτησης των χμαιρικών πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια.

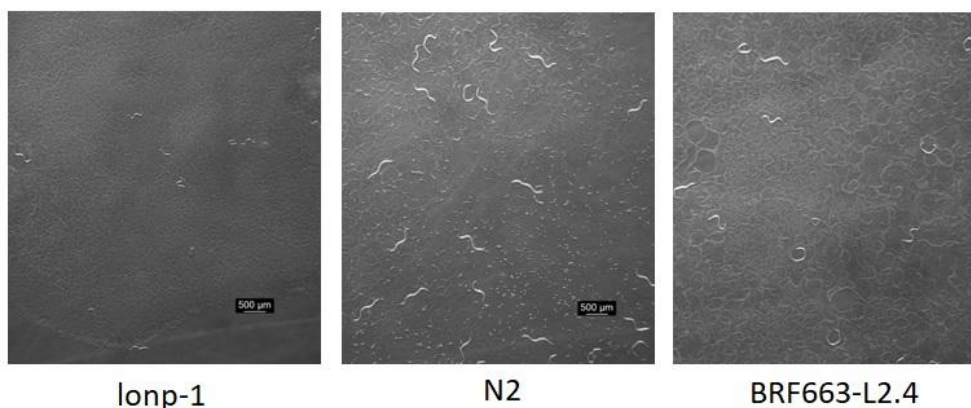
Γ.3.2. Μελέτη της λειτουργικότητας των διαγονιδίων έκφρασης του ενδογενούς και ανθρώπινου γονιδίου LON στο νηματώδη

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος συμπλήρωσης και αποκατάστασης του παθολογικού φαινοτύπου *lonp-1*, από τα διαγονιδιακά στελέχη, όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης. Σε συγχρονισμένους πληθυσμούς, μετά από 4 ημέρες από την εναπόθεση αυγών στα πιάτα μετρήθηκαν τα άτομα στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια για τα στελέχη control (BRF638=N2 roller και BRF611=*lonp-1* roller) και για τα διαγονιδιακά στελέχη επιλέγοντας μία σειρά από το καθένα (BRF663-L2.4 και BRF670-L4.15). Το L2.4 του BRF663 και το L4.15 του BRF670 επιλέχτηκαν επειδή παρουσίαζαν, σε ένα πρώτο επίπεδο, όμοιο πρότυπο φθορισμού και μέσο όρο έντασης αυτού (Εικόνα Γ6, C). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα Γ8. Το σύνολο του πληθυσμού του BRF638 στελέχους αποτελούνταν από ενήλικα άτομα, τα οποία είχαν ήδη γεννήσει ενώ ο πληθυσμός *lonp-1* αποτελείται από ένα ποσοστό περίπου 30% άτομα προνυμφικού σταδίου L3 και άτομα σταδίου L4 σε ποσοστό 70%. Τα αποτελέσματα για τα διαγονιδιακά στελέχη παρουσίασαν μία ταύτιση στο πρότυπο ανάπτυξης του BRF670 με τον πληθυσμό *lonp-1*. Αντίθετα, όσον αφορά το BRF663, παρατηρήθηκε εικόνα ατόμων πολύ πιο κοντά στον BRF638 (N2) πληθυσμό. Συγκεκριμένα ένα 90% του πληθυσμού αποτελούνταν από νεαρά ενήλικα άτομα. Γίνεται κατανοητό λοιπόν, ότι σε επίπεδο ρυθμού ανάπτυξης το διαγονίδιο BRF663 αποκαταστά τον παθολογικό φαινότυπο των *lonp-1* ατόμων, οδηγώντας στο συμπέρασμα λειτουργικότητας της χειμερινής πρωτεΐνης που κωδικοποιεί για την ενδογενή Lon του *C.elegans* (*Lonp-1*). Από την άλλη μεριά, το BRF670, στο οποίο εκφράζεται η ανθρώπινη Lon πρωτεΐνη φαίνεται να μην συμπληρώνει τον φαινότυπο των *lonp-1* όσον αφορά την ανάπτυξη (Εικόνα Γ8, A).

A)



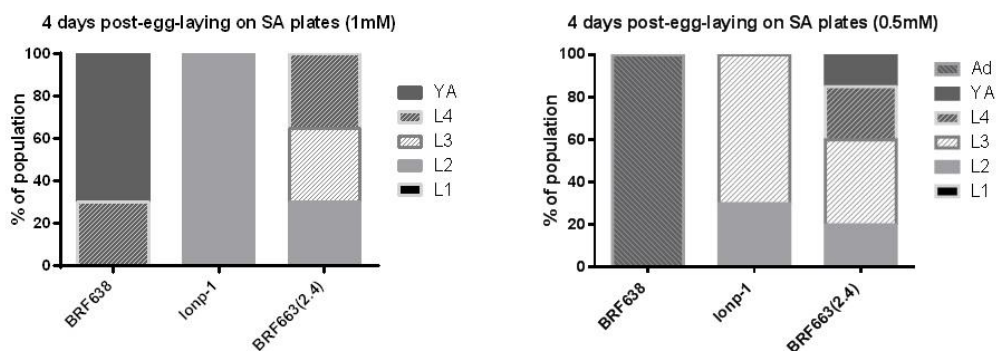
B)



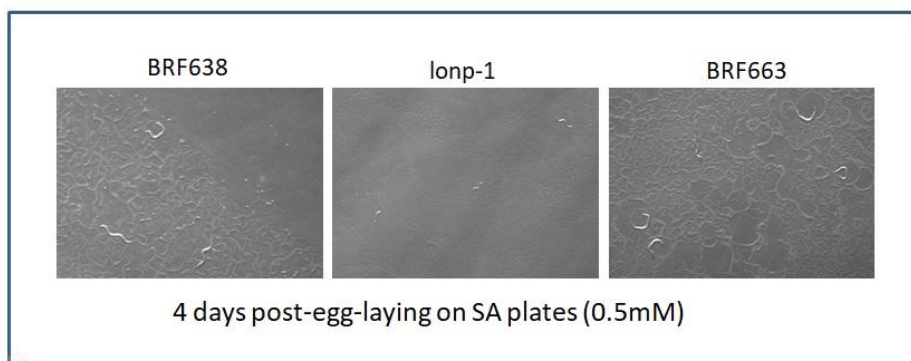
Εικόνα Γ8 | Έλεγχος ρυθμού ανάπτυξης των διαγονιδιακών στελεχών BRF663 και BRF670. A) Διάγραμμα του ρυθμού ανάπτυξης των BRF663-L2.4 και BRF670-L4.15 ατόμων σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου και τα παθολογικά *lonp-1*. Τα στάδια ανάπτυξης των πληθυσμών εκφράζονται σε ποσοστό επί τοις 100. B) Φωτογραφίες συγχρονισμένων πληθυσμών N2 (BRF638), *lonp-1* (BRF611) και BRF663-L2.4, όπως φαίνονται από το στερεοσκόπιο. Παρατηρούνται τα νεαρά ενήλικα άτομα στην φωτογραφία του διαγονιδιακού στελέχους.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ανθεκτικότητας του διαγονιδιακού στελέχους BRF663-L2.4, (το οποίο φαίνεται να αποκαταστά την αργή ανάπτυξη των *lonp-1* ατόμων), για το οξειδωτικό στρες σε δύο συγκεντρώσεις του οξειδωτικού παράγοντα αρσενιώδες νάτριο (SA), μιας και ο παθολογικός *lonp-1* φαινότυπος χαρακτηρίζεται από απουσία ανθεκτικότητας στην οξειδωτική καταπόνηση. Αφού εμποτίστηκαν πιάτα αγαρόζης με δύο συγκεντρώσεις SA 0.5mM και 1mM συγχρονίστηκαν οι πληθυσμοί των στελεχών μαρτύρων (BRF638 και BRF611) και της σειράς L2.4 του BRF663. Μετά από τέσσερις μέρες έγινε έλεγχος του ποσοστού θανάτου των ατόμων των πληθυσμών. Παρατηρήθηκε και στις δύο συγκεντρώσεις SA, ότι τα διαγονιδιακά άτομα *lonp-1* που εκφράζουν το ενδογενές γονίδιο *lonp-1 myo-3::gfp^{mt}* επιβίωναν και αναπτύσσονταν σε μεγαλύτερα αναπτυξιακά στάδια, σε σχέση με τον *lonp-1* πληθυσμό που παρέμενε στάσιμος στο στάδιο L2. Ωστόσο, όπως και στο ρυθμό ανάπτυξης κάτω από κανονικές συνθήκες το διαγονίδιο δεν συμπληρώνει επαρκώς το φαινότυπο του μεταλλάγματος καθώς τα άτομα αγρίου τύπου έχουν αναπτυχθεί ακόμα καλύτερα. Επίσης, ο ρυθμός ανάπτυξης των σκουληκιών είναι αντιστρόφως ανάλογος με τη συγκέντρωση αρσενιώδους νατρίου (Εικόνα Γ9).

A Oxidative stress

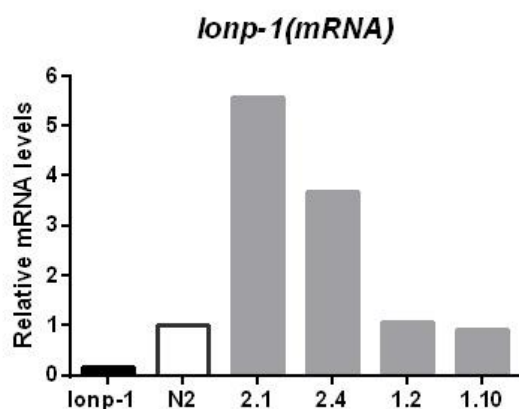


B



Εικόνα Γ9 | Έλεγχος ανθεκτικότητας του διαγονιδίου BRF663-L2.4 σε δοκιμασίες οξειδωτικού στρες. Α) Παρουσίαση του ποσοστού των αναπτυξιακών σταδίων κατά το οξειδωτικό στρες σε δύο συγκεντρώσεις αρσενιώδους νατρίου (SA). Β) Φωτογραφία των πληθυσμών μαρτύρων και του διαγονιδιακού σε πιάτα με συγκέντρωση 0.5mM αρσενιώδους νατρίου, όπως φαίνονται στο στερεοσκόπιο.

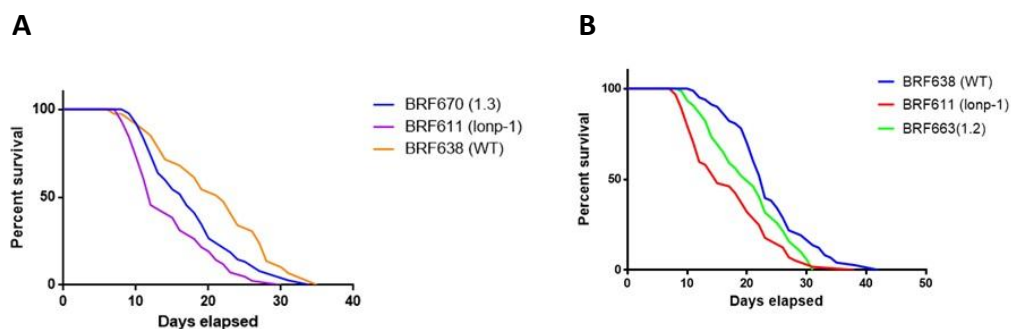
Στη συνέχεια ελέχσαμε τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς LON διαγονιδίου στις διάφορες σειρές διαγονιδιακών ατόμων που πήραμε μετά τις μικροενέσεις. Η ποσοτική qRT-PCR έδειξε μία τεράστια υπερέκφραση του διαγονιδίου στις σειρές 2.1 και 2.4 με αντίθεση τις σειρές 1.2 και 1.10, όπου η υπερέκφραση ήταν στα επίπεδα του πληθυσμού αγρίου τύπου. Αυτή η διαφορά που παρατηρείται στα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου σε επίπεδο μεταγραφημάτων μεταξύ των σειρών, όμως δεν συνάδει με τα ποσοτικοποιημένα επίπεδα



Εικόνα Γ10 | Σχετικά επίπεδα mRNA του γονιδίου lonp-1 στις διαγονιδιακές σειρές του BRF663. Χαρακτηριστικό είναι το ιδιαίτερα υψηλό επίπεδο mRNA στις σειρές 2.1 και 2.4.

φθορισμού των παραγόμενων χειμερινών πρωτεϊνών με τη GFP των αντίστοιχων σειρών (Εικόνα Γ6). Αν και αναφερόμαστε σε επίπεδα πρωτεΐνης και σε επίπεδα mRNAs η τεράστια αυτή υπερέκφραση τουλάχιστον στις σειρές 2.1 και 2.4 θα μας έκανε να αναμένουμε πολύ υψηλότερη ένταση φθορισμού. Φαίνεται λοιπόν ότι πιθανόν κάτι μεσολαβεί σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης *Lonp-1* μειώνονται. Ίσως αυτή η υπερέκφραση είναι τοξική για τον *C. elegans* και αποδομείται άμεσα με αποτέλεσμα να μένουν τα επιθυμητά για τον νηματώδη επίπεδα, ώστε να διατηρήσει την ομοιόστασή του. Πράγματι, η εν λόγω υπόθεση στηρίζεται και από την βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε, ότι υπερέκφραση της ενεργούς Lon πρωτεάσης οδηγεί στο θάνατο μέσω μιας συνδιαστικής δράσης δύο διαφορετικών μονοπατιών, όπου και τα δύο εμπλέκονται στη διαδικασία της μετάφρασης. Ίσως η τοξικότητα στην οποία αναφερόμαστε να αντιστοιχεί σε υπέρμετρη αποδόμηση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος χρειάζεται για την επιμήκυνση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων ή/και τον τερματισμό της ριβοσωμικής ανακύκλωσης [342].

Σε επόμενο επίπεδο μελέτης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες προσδιορισμού διάρκειας ζωής σε μία από τις σειρές των διαγονιδιακών στελεχών για την ενδογενή και ανθρώπινη LON (BRF663 και BRF670, αντίστοιχα), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου Β.6.7. Στα διαγράμματα που παρουσιάζονται, εμφανίζεται ενδιάμεση διάρκεια ζωής των στελεχών BRF670 και BRF663 σε σχέση με τους πληθυσμούς μάρτυρες (BRF611 και BRF638). Φαίνεται να εννοηθεί, ότι ο φαινότυπος βραχύτητας ζωής των μεταλλαγμάτων *lonp-1*, αποκαταστάται μερικώς από τα διαγονίδια *lonp-1::gfp* και *hulon::gfp* (Εικόνα Γ11). Παρουσιάζεται ενδεικτικά μία σειρά για το κάθε διαγονιδιακό στέλεχος.



Εικόνα Γ11 | Η έκφραση των διαγονιδίων *lonp-1::gfp* και *hulon::gfp* βελτιώνει την βραχυβιότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* στους 20°C. Καμπύλες επιβίωσης διαγονιδιακών μεταλλαγμάτων *lonp-1* που εκφράζουν το διαγονίδιο Α) *hulon::gfp* και Β) *lonp-1::gfp*, αντίστοιχα. Παρατηρείται μερική αποκατάσταση στην επιβίωση και στα δύο διαγονιδιακά στελέχη. Ενδεικτικά επιλέχθηκαν η σειρά 1.3 για το στέλεχος BRF670 και η 1.2 για το στέλεχος BRF663. Όλα τα στελέχη συμπεριλαμβανομένων των N2 και *lonp-1* φέρουν το διαγονίδιο *rol-6(su1006)* και εκδηλώνουν το φαινότυπο roller.

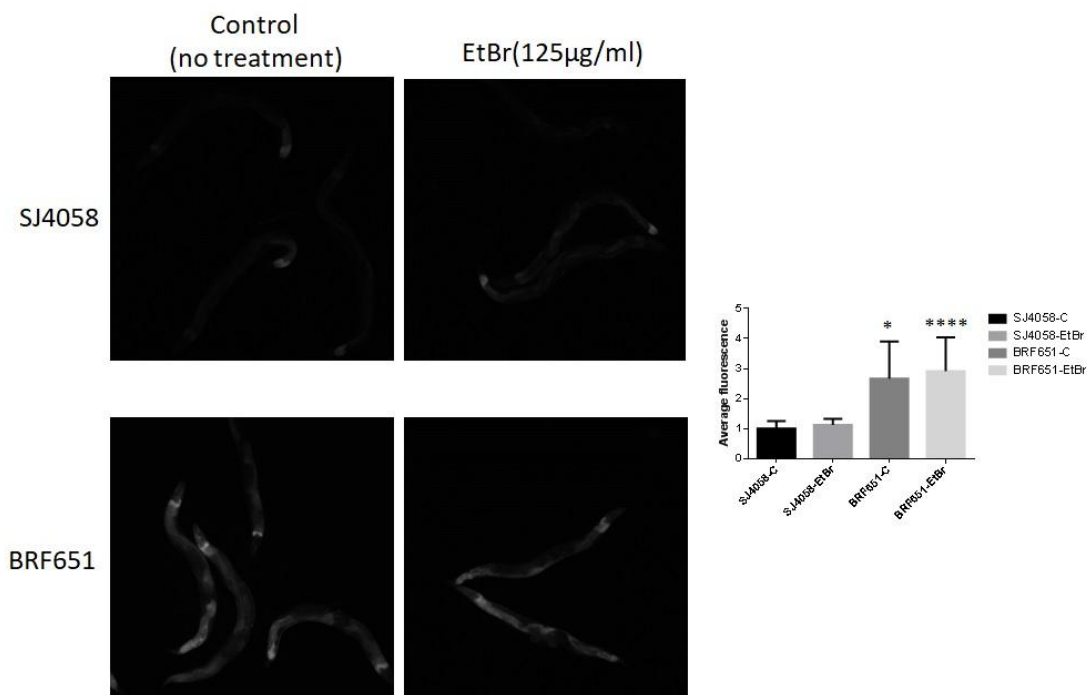
Γ.4. Ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* άτομα – Διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ UPR^{mt} και κυτταροπλασματικής απόκρισης στο θερμικό στρες

Όπως προαναφέρθηκε, η παρουσία μιας ξεχωριστής παλινδρομικής απόκρισης, που ονομάζεται μιτοχondριακό στρες ή unfolded protein response (UPR^{mt}), προτάθηκε από την επαγωγή πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχondριακών τσαπερονών και πρωτεασών κατά τη διάρκεια του μιτοχondριακού στρες, που προκαλείται από τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων ή λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών εντός της μιτοχondριακής μήτρας [190, 191]. Το UPR^{mt} αν και ανιχνεύτηκε αρχικά στα κύτταρα θηλαστικών, το μονοπάτι σηματοδότησης έχει μελετηθεί εκτενέστερα στον *C.elegans*. Στο νηματώδη το UPR^{mt} προκαλείται από πρωτεοτοξικό στρες ως αποτέλεσμα μη σωστά συναρμολογημένων ή/και μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στη μιτοχondριακή μήτρα. Αυτοί οι παράγοντες στρες ενεργοποιούν συγκεκριμένα προγράμματα μεταγραφής, τα οποία γενικά ενεργοποιούν έναν έτοιμο πυρήνα σε απόκριση των μιτοχondρίων με στόχο την προσαρμογή της μιτοχondριακής λειτουργίας στην κατάσταση του στρες.

Η πρωτεάση Lon έχει βασικό ρόλο στο UPR^{mt} μιας και είναι μία από τις δύο πρωτεάσες του μιτοχondρίου με πολυλειτουργικό ρόλο τόσο με πρωτεόλυση των συσσωρευμένων τοξικών πρωτεϊνών, όσο και με τη δράση τσαπερόνης. Έχουν εντοπιστεί 76 πρωτεΐνες οι οποίες είναι εν δυνάμει Lon-συσχετιζόμενες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύστημα των μιτοχondριακών συνοδών, στον κυτταρικό μεταβολισμό και την ενέργεια, στον κυτταρικό θάνατο, αλλά και στην επιβίωση και στη σταθερότητα του mtDNA. Για να διατηρηθεί η ακεραιότητα των μιτοχondρίων, η Lon εκτελεί δραστηριότητα συνοδού για να συνεργαστεί με το σύμπλοκο Hsp60-mtHsp70 και να διατηρήσει την πρωτεϊνική ομοιόσταση στα μιτοχόνδρια κάτω από το στρες. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η mtHsp70 μπορεί να βοηθήσει την τσαπερόνη Lon στις μη ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, για τη διατήρηση των λειτουργιών των μιτοχondρίων στη ζύμη [230]. Η επαγωγή των πυρηνικά-μεταγραφόμενων μιτοχondριακών τσαπερονών Hsp60 και η μιτοχondριακή Hsp70 (*hsp-6* στον *C.elegans*) αποτελούν γονίδια αναφοράς για την UPR^{mt}.

Υπό το πρίσμα της γνώσης της σημασίας της Lon πρωτεάσης στο UPR^{mt} σε συνδυασμό με τη γνώση ότι συνδέεται με τις πρωτεΐνες *hsp-60* και *70*, έγινε έλεγχος για το αν και μόνο η απουσία της Lon στα *lonp-1* άτομα δημιουργεί στρες στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του UPR^{mt}. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε ένα στέλεχος, το BRF651, που σε γενετικό υπόβαθρο *lonp-1* εκφράζει την GFP υπό τη δράση του υποκινητή του *hsp60* (*lonp-1(tm5171); zcls9[P_{hsp-60}::gfp]*). Ως μάρτυρας (αγρίου τύπου) χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος SJ4058=*zcls9[P_{hsp-60}::gfp]*. Τα άτομα παρατηρήθηκαν με απλή μικροσκοπία φθορισμού τόσο υπό κανονικές συνθήκες, όσο και υπό μιτοχondριακό στρες, που προκλήθηκε με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Αν και η Hsp-60 είναι μία πρωτεΐνη θερμικού σοκ επάγεται και από άλλους στρεσογόνους παράγοντες, όπως το μιτοχondριακό στρες [193]. Στηριζόμενοι σε μία δημοσίευση, ελέγξαμε την επαγωγή του διαγονιδίου *P_{hsp-60}::gfp* κατά την ανάπτυξη των νηματωδών σε πιάτα εμποτισμένα με βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 125μg/mL [192].

Από την ποσοτικοποίηση του φθορισμού για τα δύο στελέχη σε φυσιολογικές συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού στο BRF651 σε σχέση με το SJ4058 υψηλότερη από διπλάσια (Εικόνα Γ12). Σε συνθήκες στρες με το βρωμιούχο αιθίδιο ο φθορισμός, αν και αυξήθηκε στους αγρίου τύπου άτομα (πιθανώς λόγω μη επαρκούς επαγωγής του UPR^{mt}), ωστόσο τα επίπεδα στο BRF651 ήταν πάλι υψηλότερα (ίσως και πιο σημαντική αύξηση από αυτή που παρατηρήθηκε στο BRF651 χωρίς την πρόκληση του στρες). Έτσι συμπεραίνουμε ότι η απουσία της Lon είναι από μόνη της ικανή να προκαλέσει έντονο στρες στα μιτοχόνδρια και να ενεργοποιήσει το UPR^{mt}.

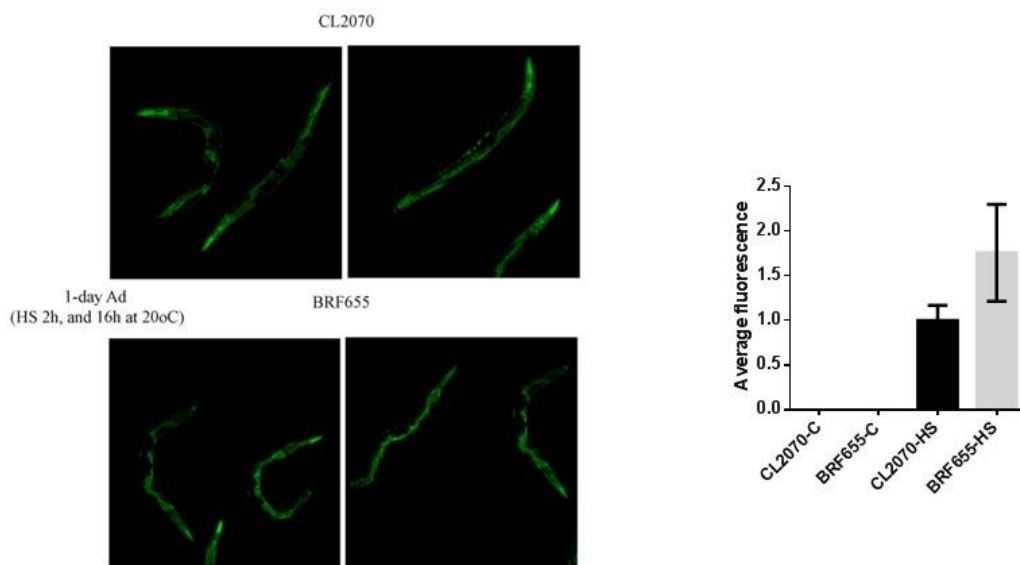


Εικόνα Γ12 | Ποσοτικοποίηση του φθορισμού από την GFP υπό την δράση του υποκινητή P_{hsp-60} σε *lonp-1* άτομα υπό φυσιολογικές και στρεσογόνες συνθήκες. Παρατηρείται στο γράφημα η 100% ενίσχυση της έντασης του φθορισμού στα *lonp-1* άτομα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης επιβεβαιώνοντας την υπόθεση, ότι η έλλειψη της Lon είναι συνθήκη ικανή για μιτοχονδριακό στρες και UPR^{mt} ενεργοποίηση.

Κυτταροπλασματικές HSPs και τσαπερόνες μπορούν να επαχθούν κατά τη διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Συγκεκριμένα, μεταβολές της επεξεργασίας λιπιδίων στα μιτοχόνδρια μέσω γενετικής και φαρμακολογικής αναστολής της δραστηριότητας της καρνιτίνης παλμιτοϋλοτρανσφεράσης (Cpt1), της οδού βιοσύνθεσης της κεραμιδίνης ή της σίγασης λειτουργίας της μιτοχονδριακής συνοδού mtHSP70 (*hsp-6* στον *C. elegans*) σε μοντέλα θηλαστικών και νηματωδών της συσσωμάτωσης πολυγλουταμίνης, έχουν αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν συγχρόνως την UPR^{mt} και την απόκριση θερμικού σοκ (HSR). Στο *C. elegans*, αυτή η διέγερση εξαρτάται εν μέρει από την ενεργοποίηση τόσο του συντελεστή μεταγραφής του παράγοντα HSF-1, όσο και των παραγόντων μεταγραφής UPR^{mt} DVE-1 και ATFS-1. Η ενεργοποίηση αυτού του διπλού κλάδου οδηγεί σε βελτιωμένη κυτταρική πρωτεόσταση, μειωμένη πρωτεοτοξική συσσωμάτωση και, τέλος, μειωμένη μιτοχονδριακή καταστροφή μέσω επαγωγής του

αισθητήρα θερμικού σοκ *hsp-16.2* και άλλων κυτοσολικών συνοδών [343]. Για να ελεγχθεί αν μια επαγωγή του UPR ενός κυτταρικού διαμερίσματος θα μπορούσε επικοινωνήσει τις ανεπιθύμητες επιπτώσεις του στρες σε ένα γειτονικό κυτταρικό διαμέρισμα, μειώθηκε η λειτουργία της *mtHsp70* με RNAi στον *C.elegans* και μελετήθηκε η επαγωγή των διαμερισματοποιημένων υπόλοιπων UPRs. Με χρήση αυτής της προσέγγισης, ανακαλύφθηκε ότι η RNAi σίγηση της μιτοχονδριακής μοριακής συνοδού *Hsp70*, *hsp-6* (*mortalin/Grp75/mtHSP70*), ήταν αρκετή για να αυξήσει τα επίπεδα της *hsp-16.2::GFP* χαρακτηριστικό δείκτη του κυτταροπλασματικού θερμικού στρες [344].

Με τη λογική αυτής της προσέγγισης, θελήσαμε να ελέγχσουμε αν η έλλειψη της *Lonp-1* θα οδηγούσε σε κυτταροπλασματικό στρες, όπως η έλλειψη της *hsp-6*. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε το στέλεχος BRF655, που σε γενετικό υπόβαθρο *lonp-1* εκφράζει την GFP υπό την μεταγραφική δράση του υποκινητή *P_{hsp-16.2}* (*lonp-1(tm5171); dnl570[P_{hsp-16.2::gfp}]*). Σαν στέλεχος control χρησιμοποιήθηκε το CL2070=*dnl570[P_{hsp-16.2::gfp}]*. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε OP-50 πιάτα και μελετήθηκαν για τον φθορισμό στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και έπειτα από θερμικό στρες (Εικόνα Γ13).

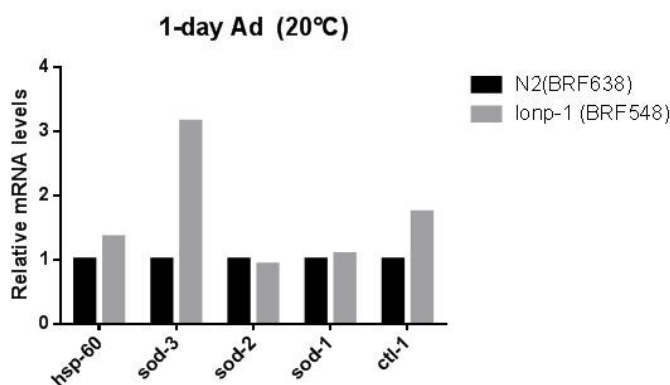


Εικόνα Γ13 | Ποσοτικοποίηση του φθορισμού από την GFP υπό την δράση του υποκινητή *P_{hsp-16.2}* σε *lonp-1* άτομα υπό φυσιολογικές και στρεσογόνες συνθήκες. Τα βασικά επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικές συνθήκες ήταν μηδενικά για αυτό και δεν παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες φωτογραφίες. Ύπο θερμικό στρες, παρατηρείται αύξηση του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα, αλλά ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της έντασης στο BRF655.

Τα επίπεδα φθορισμού σε φυσιολογικές συνθήκες ήταν μηδενικά, δηλαδή τα στελέχη δεν φθόριζαν καθόλου, για αυτό και οι αντίστοιχες φωτογραφίες δεν παρουσιάζονται. Μετά από θερμικό στρες για δυο ώρες στους 35°C και ανάρωση των πληθυσμών για δεκαέξι ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρήθηκε έντονος φθορισμός επιβεβαιώνοντας το κυτταροπλασματικό θερμικό στρες. Ωστόσο, η ένταση του

φθορισμού στο στέλεχος με γενετικό υπόβαθρο *lonp-1* ήταν μεγαλύτερη περίπου 50% σε σχέση με το control στέλεχος, υποδεικνύοντας ότι το κυτταροπλασματικό στρες πιθανόν να εντάθηκε και να επάχθηκε περισσότερο εξαιτίας της απουσίας της μιτοχονδριακής Lon πρωτεάσης, υποστηρίζοντας έτσι ένα σενάριο διασταυρούμενης επικοινωνίας του στρες μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος.

Τέλος, ελέγξαμε σε μεταγραφικό επίπεδο, με RT-qPCR, τα σχετικά ποσοστά mRNA των ενδογενών γονιδίων *hsp-60*, *sod-1*, *sod-2*, *sod-3* και *ctl-1* σε N2 και *lonp-1* μεταλλαγμένα άτομα (Εικόνα Γ14). Τα γονίδια αυτά επάγονται κάτω από UPR^{mt}, θερμικό ή οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, το *hsp-60* κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μάρτυρα για το μιτοχονδριακό UPR, το *sod-2* και *sod-3* για δύο μιτοχονδριακές δισμουτάσες υπεροξειδίου που βοηθούν στην κυτταρική επιβίωση κάτω από συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, το *sod-1* για μία κυτταροπλασματική δισμουτάση υπεροξειδίου και το *ctl-1* για μία από τις τρεις καταλάσες του *C.elegans*, που είναι κυτταροπλασματική, και λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό ένζυμο προστατεύοντας τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Στο πείραμα αυτό, παρατηρείται μία αύξηση της έκφρασης του *hsp-60*, η οποία επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης με το στέλεχος BRF651. Τέλος, σημαντική αύξηση παρατηρείται και στα γονίδια *sod-3* και *ctl-1* τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα αλλά υποδεικνύουν την ύπαρξη κάποιας οξειδωτικής καταπόνησης, εξαιτίας της απουσίας της πρωτεάσης Lonp-1. Αντίθετα, δεν επάχθηκε η άλλη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου *sod-2*, όπως και η κυτταροπλασματική *sod-1*. Πιθανώς αυτό να υποδεικνύει μία εξειδίκευση στην κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες λόγω απουσίας της *lonp-1*. Μία προσέγγιση με έκφραση της GFP υπό την δράση των προαγωγέων των εν λόγω γονιδίων σε άτομα γενετικού υποβάθρου *lonp-1* βρίσκονται υπό πραγματοποίηση από την εργαστηριακή μας ομάδα.



Εικόνα Γ14 | Σχετικά επίπεδα mRNA ορισμένων γονιδίων σε πληθυσμού αγρίου τύπου και *lonp-1*.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η πρωτεάση Lon υπάρχει στα περισσότερα βακτηριακά είδη (πρώτα ταυτοποιήθηκε στην *Escherichia coli*), στα αρχαία και σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα [345]. Τα τελευταία είκοσι χρόνια, έχει παρατηρηθεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ότι η Lon είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής ενεργότητας καθώς επιτελεί διάφορες λειτουργίες όπως αυτή της πρωτεάσης, της μοριακής συνοδού και της προσδενόμενης σε DNA πρωτεΐνης. Ως συνέπεια η Lon: (α) δρα ως την κύρια πρωτεάση για την απομάκρυνση των ασταθών, λόγω μη-σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, (β) στηρίζει την κυτταρική βιωσιμότητα σε συνθήκες υποξίας, πρωτεοτοξικότητας ή οξειδωτικού στρες αποικοδομώντας τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες, και (γ) ρυθμίζει το μεταβολισμό του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), διατηρώντας την ακεραιότητα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Επομένως, η δυσλειτουργία της έχει ολέθριες συνέπειες στη μιτοχονδριακή αναπνοή, την ποσότητα και ποιότητα του mtDNA και τελικά τον κυτταρικό μεταβολισμό από τη ζύμη ως τον άνθρωπο [346]. Πρόσφατα, μεταλλάξεις στο γονίδιο *LonP1* του ανθρώπου, χαρτογραφήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως υπεύθυνες για το πολυσυστημικό αναπτυξιακό νόσημα CODAS που χαρακτηρίζεται από ευρεία ποικιλία κλινικών συμπτωμάτων [246, 247]. Επιπλέον, αρκετές πειραματικές ενδείξεις συνδέουν την πρωτεΐνη Lon με τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού που παρατηρείται στο νεοπλασματικό μετασχηματισμό καθώς: (α) έχει παρατηρηθεί αυξορρύθμιση της Lon σε διάφορους τύπους ανθρώπινου καρκίνου, (β) η Lon παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή του κυττάρου σε υποξικό περιβάλλον, όπως π.χ. σε συμπαγείς όγκους, (γ) υποδιπλασιασμός της έκφρασης της Lon σε μοντέλο ποντικού οδήγησε σε μείωση της τάσης ανάπτυξης καρκίνου και αύξηση της ανθεκτικότητας σε καρκινογόνες ενώσεις, (δ) κύτταρα που υπερπαράγουν τη Lon, αναπτύσσονται πιο γρήγορα, (ε) καρκινοπαθείς με υψηλή έκφραση της Lon παρουσιάζουν συνολικά χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης από εκείνους με μειωμένη έκφραση της Lon, και (στ) ενώσεις ικανές να καταστρέφουν την ενεργότητα της πρωτεάσης Lon, έχουν την ικανότητα να επιβραδύνουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [346]. Τέλος υπό φυσιολογικές συνθήκες, η Lon ρυθμίζει τον καταβολισμό πολλών πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε κύριες μεταβολικές διεργασίες [221, 259, 341].

Ο ρόλος της Lon στην κυτταρική γήρανση έχει δειχθεί στο νηματοειδή ασκομύκητα *Rodospira anserine*, όπου η υπερέκφραση του γονιδίου *PaLon1* επέκτεινε τη διάρκεια ζωής [347] ενώ η έλλειψη του *PaLon1* μείωσε τη διάρκεια ζωής [348]. Αντίστοιχα, η έλλειψη του *Pin1/Lon* στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* οδήγησε σε επιτάχυνση της γήρανσης, συνοδευόμενη από κυτταροπλασματικά συσσωματώματα οξειδωμένων πρωτεϊνών τα οποία ανέστειλαν την πρωτεασωμική ενεργότητα [349]. Μάλιστα, στα μιτοχόνδρια του ζυμομύκητα όπως και σε κύτταρα HeLa η έλλειψη της Lon οδηγεί σε συσώρευση καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών [350, 351]. Σε φυσιολογικά κύτταρα τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών αυξάνονται με την ηλικία, σε αντίθεση με τα επίπεδα και την ενεργότητα της Lon που μειώνονται [240]. Τα μιτοχόνδρια από φυτικούς ή ανθρώπινους ιστούς που στερούνται τη Lon έχουν ανώμαλη μορφολογία και λειτουργία, παρόμοια με αυτά που βρίσκονται σε γηρασμένους ιστούς [241, 340]. Επιπλέον, η έκφραση της Lon ενισχύεται *in vitro* από υποξικές συνθήκες ή από στρες ενδοπλασματικού δικτύου και *in vivo* από εγκεφαλική ισχαιμία [204]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στα ποντίκια τα επίπεδα της Lon μειώνονται κατά το χρόνιο οξειδωτικό στρες ή τη γήρανση και αυτό μπορεί να αποτραπεί με θερμιδικό περιορισμό, μια διατροφική παρέμβαση που επιβραδύνει τη γήρανση σε όλους τους οργανισμούς [239, 352].

Στο νηματώδη *C. elegans* υπάρχει ένα μοναδικό ορθόλογο γονίδιο *lonp-1* (C34B2.6, <http://www.wormbase.org>), αλλά η δομή, έκφραση και λειτουργία του δεν έχουν καθόλου μελετηθεί. Όλες οι βακτηριακές και ευκαρυωτικές πρωτεάσες Lon αποτελούνται από τρεις λειτουργικές περιοχές: τη μακρά αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain) που πιθανότατα αλληλεπιδρά με την κεντρική μονάδα AAA+ (ATPase domain) για τη στόχευση πρωτεϊνών και την καρβοξυτελική πρωτεολυτική (P) περιοχή (C-terminal domain) [345]. Η περιοχή διάκρισης αισθητήρα και υποστρώματος (sensor- and substrate-discrimination domain-SSD) που είναι παρακείμενη της μονάδας AAA+, εμπλέκεται στη ρύθμιση της επιλεκτικής αναγνώρισης υποστρώματος και είναι η πιο μεταβλητή περιοχή μεταξύ των ομόλογων γονιδίων *Lon*, με ποικιλότητα ακόμη και εντός του ίδιου είδους [345]. Η μοριακή μοντελοποίηση των περιοχών SSD της πρωτεάσης σε βακτήριο (*EcLon*), άνθρωπο (*HsLon*), ζυμομύκητα (*PIM1*), *Arabidopsis* (*AtLon1* έως 4) και νηματώδη (*CeLon*) [345] υποδεικνύει ότι όλες έχουν κοινή βασική δομή που υποδηλώνει και συντηρημένες λειτουργίες. Σχετικά με τη λειτουργία της πρωτεάσης *Lonp-1* του *C. elegans* είναι γνωστό ότι αποικοδομεί τον τύπου bZip μεταγραφικό παράγοντα ATSF-1 στη μιτοχονδριακή μήτρα, όπου αυτός εισέρχεται υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας των ζώων. Ωστόσο η έλλειψη της *Lon* δε φαίνεται να επηρεάζει τη μετατόπιση του ATSF-1 στον πυρήνα σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες (Mitochondrial Unfolded Protein Response, UPR_{mt}) και τη δράση του ως προς την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στη μιτοχονδριακή ομοιόσταση και την κυτταρική επιβίωση [193, 353].

Η πρωτεάση *Lon* είναι ένας βασικός ρυθμιστής διάφορων μιτοχονδριακών λειτουργιών σε όλους τους οργανισμούς. Παρά τη σημαντική πρόοδο στη γνώση της βιολογίας της *Lon*, υπάρχουν ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με το ρόλο της. Για παράδειγμα, δεν είναι σαφές ποια είναι η σχετική συνεισφορά των διάφορων δραστηριοτήτων της *Lon* στη μιτοχονδριακή ομοιόσταση των κυττάρων. Η διαλεύκανση αυτού του ερωτήματος θα βοηθούσε πολύ στο σχεδιασμό φαρμάκων για τη στόχευση συγκεκριμένων δράσεων της *Lon*, χωρίς να επηρεάζονται οι υπόλοιπες. Επιπλέον, λίγα είναι γνωστά για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων της *Lon* σε καρκινικά κύτταρα και σε μεγάλο βαθμό άγνωστη παραμένει η ρύθμιση της *Lon* σε μετα- μεταγραφικό επίπεδο. Από την άλλη, τα *in vivo* δεδομένα είναι πολύ περιορισμένα [213] ενώ δεν έχει μελετηθεί ο άμεσος ρόλος της *Lon* στην οργανισμική γήρανση και τα συνοδά νοσήματά της.

Στην εν λόγω μελέτη διερευνήθηκε η άμεση συσχέτιση ή/και η αιτιολογική εμπλοκή της *Lon* στη γήρανση. Αυτό έχει μελετηθεί σε κυτταρικό αλλά όχι σε οργανισμικό επίπεδο *in vivo*, και για αυτό έγινε η προσπάθεια χρησιμοποιώντας το νηματώδη σκώληκα *C.elegans*. Πρόκειται για ένα εξαιρετικό πειραματικό σύστημα για τη μελέτη μοριακών μηχανισμών ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών και κυτταρικών διεργασιών της γήρανσης και συνάμα υπάρχει ένα πλήθος γενετικών και μοριακών εργαλείων για το χειρισμό του.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου στελέχους *C.elegans lonp-1(tm5171)*, το οποίο φέρει μία έλλειψη 490bp και μία προσθήκη 5bp, οι οποίες διατρέχουν τα εξώνια 3-4 του γονιδίου *lonp-1* (C34B2.6). Η πρώτη παρατήρηση βασίζεται στον αργό ρυθμό ανάπτυξης των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τους νηματώδεις αγρίου τύπου, όπου μετά από δύο μέρες ανάπτυξης σε φυσιολογικές συνθήκες, τα άτομα αγρίου τύπου ήταν στην πλειοψηφία τους στο τελευταίο προνομφικό στάδιο σε αντίθεση με τα μεταλλάγματα τα οποία βρίσκονταν ακόμα στη φάση των σταδίων L2 και L3. Το απόλυτα λογικό επακόλουθο αυτής της παρατήρησης είναι ότι τα μεταλλάγματα παρά τον αργό ρυθμό ανάπτυξης δεν είχαν πρόβλημα βιωσιμότητας και συνεπώς ήταν δυνατή η

οργανισμική μελέτη του νηματώδους. Επιπλέον, στα άτομα *lonp-1(tm5171)*, παρατηρήσαμε ότι ο αριθμός των απογόνων μειώθηκε στο μισό σε σχέση με άτομα N2, καθώς αρκετά αυγά δεν εκκολάπτονται μετά την εναπόθεσή τους στο πιάτο, υποδεικνύοντας ένα ρόλο της *Lonp-1* και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη εκτός την προνυμφική. Πιθανώς, λόγω των αναπτυξιακών προβλημάτων η έλλειψη της *Lonp-1* έχει επίπτωση και στο ρυθμό γήρανσης των μεταλλαγμένων ατόμων, καθώς η διάρκεια ζωής τους, μειώθηκε περίπου κατά δέκα ημέρες, σε σχέση με αυτήν του άγριου τύπου (N2).

Ο χαρακτηρισμός συνεχίστηκε δίνοντας φως σε σημεία που αφορούν την αντίσταση και απόκριση των *lonp-1* ατόμων σε διάφορα είδη στρες, μίας και το θερμικό, όπως και το οξειδωτικό στρες οδηγεί τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες σε αστάθεια και οξείδωση, δημιουργώντας δυσμενείς συνθήκες για τα κύτταρα. Πράγματι, στη δοκιμασία οξειδωτικού στρες με αρσενιώδες νάτριο, σε δύο συγκεντρώσεις, παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό επιβίωσης, και ιδιαίτερα στα άτομα που αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση 1mM, θάνατος επερχόταν κίολας από το στάδιο L2, σε σύγκριση με τα N2 άτομα που ο θάνατος επερχόταν σε ηλικία νεαρών ενηλίκων. Η βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρουν την οξείδωση των πρωτεϊνών σε άτομα, στα οποία έχει αποσιωπηθεί η μιτοχονδριακή *Lon* πρωτεάση, τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και σωματιδίων εγκλεισμού και αύξηση των ROS, μιας και η μιτοχονδριακή ομοιόσταση πλήττεται αφού παρουσιάζονται προβλήματα στην δημιουργία των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων [334, 354]. Εντυπωσιακό αποτέλεσμα ήταν η ανθεκτικότητα που παρουσίασαν στο θερμικό στρες τα *lonp-1* άτομα με ποσοστό επιβίωσης σχεδόν 100% υψηλότερο από τα N2 άτομα. Η προσπάθεια κατανόησης της βιολογικής βάσης αυτής της παρατήρησης θα μπορούσε να βασιστεί στη μελέτη των γονιδίων που συνδέονται με τη δράση της *Lon* και επηρεάζονται από αυτή, και αντίστροφα απουσία της *Lon* τη δράση έχει στα αντίστοιχα γονίδια. Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η λήψη μικροσυστοιχιών και η σύγκριση των επιπέδων των γονιδίων που επιλέχθηκαν στα άτομα άγριου τύπου και στα άτομα *lonp-1*. Στη μελέτη αυτή με χρήση ποσοτικής RT-PCR μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα ορισμένων γονιδίων που αποτελούν μάρτυρες του οξειδωτικού στρες και της μιτοχονδριακής απόκρισης σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response-UPR^{mt}). Σε αυτά τα γονίδια συμπεριλαμβάνονται τα *hsp-60* (γονίδιο μάρτυρας του UPR^{mt}), τα γονίδια δισμουτάσης του υπεροξειδίου *sod-1*, *sod-2* και *sod-3* και μίας κυτταροπλασματικής καταλάσης *ctl-1*, που αποτελούν κρίσιμα γονίδια στην ομοιόσταση των ROS στα μιτοχόνδρια. Αύξηση παρατηρήθηκε στα *sod-3* και *ctl-1* υποδηλώνοντας την οξειδωτική καταπόνηση λόγω της απουσίας της *Lon* και μία προσπάθεια του κυττάρου να αντιμετωπίσει αυτή την κατάσταση.

Ωστόσο, κρίνεται σημαντική η δημιουργία στελεχών που θα επάγουν τους μάρτυρες αυτούς συντηγμένους με GFP σε *lonp-1* γενετικό υπόβαθρο, για έλεγχο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο *in vivo*. Η συγκεκριμένη προσέγγιση στη συγκεκριμένη μελέτη ακολουθήθηκε για τα γονίδια *hsp-60* και *hsp-16.2* (γονίδιο μάρτυρας του θερμικού στρες). Σε μεταγραφικό επίπεδο παρατηρήθηκε αύξηση των μεταφράφων του γονιδίου *hsp-60* και το πρότυπο έκφρασης του στελέχους που δημιουργήθηκε με γενετικό υπόβαθρο *lonp-1* και έκφραση της κατασκευής *P_{hsp-60}::gfp* συμφώνησε με τα μεταγραφικά επίπεδα που μετρήθηκαν, μιας και με την ποσοτικοποίηση του φθορισμού σε άτομα που δεν είχαν υποστεί χειρισμό με βρωμιούχο αιθίδιο, υπήρξε αύξηση της έκφρασής της. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η απουσία της μιτοχονδριακής *Lon* είναι ικανή να προκαλέσει στρες και να ενεργοποιήσει το μονοπάτι απόκρισης του UPR^{mt}. Επίσης, τα άτομα *lonp-1* ύπο συνθήκες ανάπτυξης με EtBr, ίσως στρεσάρονται ακόμα περισσότερο, με περαιτέρω πιθανόν ενεργοποίηση της μεταγραφής του προστατευτικού γονιδίου *hsp-60* στον πυρήνα μέσω του μονοπατιού του ATFS-1. Δεδομένου ότι η απώλεια της ομοιόστασης

σε ένα οργανίδιο έχει επιβλαβείς συνέπειες για τη λειτουργία όλων των υπομονάδων στο κύτταρο, κάθε οργανίδιο παραμένει εξαρτώμενο από την κατάλληλη λειτουργία κάθε άλλου οργανιδίου για την διατήρησή της. Σε μια τέτοια ρύθμιση, η διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ διαμερισμάτων είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της κυτταρικής ομοιόστασης [355]. Υπό το πλαίσιο αυτό ελέγχθηκε και το πρωτεϊνικό επίπεδο της Hsp-16.2 μέσω της κατασκευής $P_{hsp-16.2}::gfp$ σε *lonp-1* γενετικό υπόβαθρο, όπου κάτω από τη δράση θερμικού στρες αυξήθηκαν τα επίπεδα του φθορισμού παραπάνω από αυτά του αγρίου τύπου. Αν και σε άλλες περιπτώσεις κάποιες βασικές πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά το μιτοχονδριακό UPR όπως η Hsp-6 (Hsp70), η έλλειψη τους είναι ικανή να προκαλέσει κυτταροπλασματικό στρες [344], η απώλεια της μιτοχονδριακής Lon δεν είναι από μόνη της ικανή συνθήκη να επάγει το κυτταρικό στρες, μιας και στα άτομα *lonp-1* τα επίπεδα της $Hsp-16.2::GFP$ ήταν μηδενικά. Γίνεται κατανοητό λοιπόν ότι αν και το κυτταρόπλασμα στρεσάρεται περισσότερο σε αυτά τα άτομα αυτό επιτυγχάνεται συνδυαστικά με τη θερμική καταπόνηση (μιας και η Hsp-16.2 αποτελεί πρωτεΐνη δείκτη της κυτταροπλασματικής θερμικής καταπόνησης). Ενδιαφέρουσα μελλοντική προσέγγιση αποτελεί και ο έλεγχος των επιπέδων καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στο μεταλλάγμένο στέλεχος *lonp-1*, κάτω από κανονικές ή στρες συνθήκες.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η προσέγγιση αναστροφής του παθολογικού φαινοτύπου *lonp-1* σε φυσιολογικό φαινότυπο με χρήση διαγονιδιακών στελεχών, τα οποία εκφράζουν την Lon του νηματώδους συντηγμένη με την GFP και την ομόλογη Lon του ανθρώπου, επίσης συντηγμένη με την GFP (BRF663 και BRF670, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας φθορισμού στις σειρές που λήφθηκαν παρουσίασαν ένα πρότυπο φθορισμού χειμερινό σε ορισμένες σειρές με μέσα επίπεδα φθορισμού όμως παρόμοιο για όλα τα άτομα. Ο χειμερισμός αυτός βέβαια σε ένα βαθμό αναμένεται, μιας και κάποια αντίγραφα του διαγονιδίου, που βρίσκεται με τη μορφή εξτραχρωμοσώματος χάνονται τυχαία από κάποια κύτταρα κατά τη διαδικασία διαίρεσής τους. Επίσης, ο υποκινητής που χρησιμοποιείται είναι μερικός με αποτέλεσμα η έκφραση να μην φτάνει τα μέγιστα επίπεδα ή να επηρεάζεται από τον εκάστοτε ιστό και αναπτυξιακό στάδιο, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεταξύ των ζώων κάποια ανομοιομορφία. Με βάση την βιβλιογραφία ο φθορισμός σε αντίστοιχα διαγονίδια είναι πολύ πιο έντονος από αυτόν που παρατηρήσαμε κάτι που δεν συνάδει επίσης, και με τα ποσοστά έκφρασης του *lonp-1* σε μεταγραφικό επίπεδο, τα οποία στις σειρές του BRF663 ήταν πολύ υψηλά. Η υπερέκφραση βέβαια τέτοιων κατασκευών με την μικροένεση, οδηγεί σε τοξικά αποτελέσματα ορισμένες φορές όπως έχει παρατηρηθεί [342]. Ίσως λοιπόν, τα κύτταρα να αποδομούν άμεσα την περίσσεια των διαγονιδιακών μεταγράφων και να διατηρούνται επίπεδα τα οποία δεν εκδηλώνουν τοξικότητα στα κύτταρα. Κρίνεται αναγκαίο σε επόμενα πειράματα η χρήση πιθανόν κάποιων western με χρήση αντισωμάτων για την GFP για επαλήθευση ή απόρριψη των υποθέσεων αυτών. Παρόλ'αυτά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν την τοποθέτηση των διαγονιδίων στα μιτοχόνδρια, όπως φάνηκε με τη χρήση της χρωστικής MitoTracker. Ο έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης έδειξε για το στέλεχος BRF663 μερική αποκατάσταση του αργού ρυθμού ανάπτυξης των *lonp-1* ατόμων, αλλά δεν παρατηρήθηκε το ίδιο για τα BRF670 των οποίων ο αναπτυξιακός φαινότυπος ομοιάζε στα *lonp-1*. Ωστόσο, σε επίπεδο ρυθμού γήρανσης, τα πειραματικά αποτελέσματα στον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής έδειξαν ένα κοινό πρότυπο και για τα δύο στελέχη, ενός ενδιάμεσου φαινοτύπου μεταξύ *lonp-1* και N2 ατόμων. Δηλαδή, παρουσιάζουν μια μερική αποκατάσταση της βραχυβιότητας των *lonp-1* ατόμων. Αν και η συντήρηση των Lon πρωτεασών είναι μεγάλη στην πλειοψηφία των οργανισμών, οι πιθανοί λόγοι απουσίας πλήρους αποκατάστασης του παθολογικού φαινοτύπου είναι ο μερικός υποκινητής που χρησιμοποιήθηκε, η αποσίωψη των διαγονιδίων από ενδογενείς μηχανισμούς RNAi σίγησης (σύμπλοκα RISK), καθώς επίσης και το γεγονός, ότι τα διαγονίδια αυτά δεν

εκφράζονται στη βλαστική σειρά κυττάρων (τα γεννητικά κύτταρα) με αποτέλεσμα να επηρεάζονται διάφορες φυσιολογικές διεργασίες στα σωματικά κύτταρα που επάγονται από σηματοδοτικά μονοπάτια της γονάδας. Στη συνέχεια, ο έλεγχος της ανθεκτικότητας του διαγονιδιακού στελέχους BRF663 στο οξειδωτικό στρες με χρήση του αρσενιώδους νατρίου παρουσίασε μια μερική αποκατάσταση της ανοχής που παρουσιάζουν τα φυσιολογικά άτομα, ενώ χρειάζονται συμπληρωματικά πειράματα και στα BRF670 άτομα για έλεγχο της δυνατότητας της ανθρώπινης Lon να συμπληρώνει την έλλειψη της Lonp-1 στην ανοχή κάτω από οξειδωτικό στρες.

Σε επίπεδο πειραμάτων στο εργαστήριο, έχουν παραχθεί σειρές για την έκφραση των κατασκευών των δύο μιτοχονδριακών Lon πρωτεασών στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* Lon1 και Lon4 συντηγμένα με το γονίδιο της *gfp*, σε γενετικό υπόβαθρο *lonp-1*, για παρόμοιες μελέτες του ρυθμού ανάπτυξης, της διάρκειας ζωής και της ανθεκτικότητας σε διάφορες μορφές στρες. Τέλος, επειδή υπάρχουν ευρήματα που δείχνουν ότι στα ποντίκια τα επίπεδα της Lon μειώνονται κατά το χρόνιο οξειδωτικό στρες ή τη γήρανση και πως αυτό μπορεί να αποτραπεί με θερμιδικό περιορισμό [352], θα μελετηθούν τα επίπεδα του *lonp-1(mRNA)* σε διάφορες ηλικίες σε αγρίου τύπου νηματώδεις αλλά και στο μακρόβιο στέλεχος *eat-2(ad465)* που αποτελεί γενετικό μοντέλο θερμιδικού περιορισμού.

Παρά τον υψηλό βαθμό συντήρησης των Lon στα διάφορα βασίλεια των οργανισμών κατά το μήκος της εξέλιξης, υποδηλώνοντας τον βασικό ρόλο τους στη διατήρηση της ζωής και επίτευξης της κυτταρικής ομοιόστασης, υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα όσον αφορά τον ρόλο της. Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία προσπάθεια απάντησης ορισμένων τέτοιων ερωτημάτων για την κατανόηση της λειτουργικότητας αυτού του πολυλειτουργικού ενζύμου σε *in vivo* επίπεδο, με απότερο σκοπό την ευεργετική γνώση για την αντιμετώπιση σοβαρών νοσημάτων που σχετίζονται με τέτοιου ίδους πρωτεάσες, μέσω σχεδιασμού φαρμάκων που στοχεύουν διαφορετικές δράσεις της ανθρώπινης μιτοχονδριακής Lon.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
2. Hoeijmakers, J.H., *DNA damage, aging, and cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(15): p. 1475-85.
3. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 832-53.
4. Ragnauth, C.D., et al., *Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging*. Circulation, 2010. **121**(20): p. 2200-10.
5. Gregg, S.Q., et al., *A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair*. Hepatology, 2012. **55**(2): p. 609-21.
6. Murga, M., et al., *A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging*. Nat Genet, 2009. **41**(8): p. 891-8.
7. Burtner, C.R. and B.K. Kennedy, *Progeria syndromes and ageing: what is the connection?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 567-78.
8. Baker, D.J., et al., *Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(1): p. 96-102.
9. Olovnikov, A.M., *Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory*. Exp Gerontol, 1996. **31**(4): p. 443-8.
10. Palm, W. and T. de Lange, *How shelterin protects mammalian telomeres*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 301-34.
11. Armanios, M., et al., *Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(6): p. 823-32.
12. Herrera, E., et al., *Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 2950-60.
13. Rudolph, K.L., et al., *Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice*. Cell, 1999. **96**(5): p. 701-12.
14. Tomas-Loba, A., et al., *Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice*. Cell, 2008. **135**(4): p. 609-22.
15. Jaskelioff, M., et al., *Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice*. Nature, 2011. **469**(7328): p. 102-6.
16. Martinez, P. and M.A. Blasco, *Role of shelterin in cancer and aging*. Aging Cell, 2010. **9**(5): p. 653-66.
17. Talens, R.P., et al., *Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs*. Aging Cell, 2012. **11**(4): p. 694-703.
18. Fraga, M.F. and M. Esteller, *Epigenetics and aging: the targets and the marks*. Trends Genet, 2007. **23**(8): p. 413-8.
19. Han, S. and A. Brunet, *Histone methylation makes its mark on longevity*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(1): p. 42-9.
20. Greer, E.L., et al., *Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in C. elegans*. Nature, 2010. **466**(7304): p. 383-7.
21. Siebold, A.P., et al., *Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate Drosophila longevity and stress resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 169-74.
22. Mostoslavsky, R., et al., *Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6*. Cell, 2006. **124**(2): p. 315-29.
23. Kanfi, Y., et al., *The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice*. Nature, 2012. **483**(7388): p. 218-21.

24. Koga, H., S. Kaushik, and A.M. Cuervo, *Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control*. Ageing Res Rev, 2011. **10**(2): p. 205-15.
25. Powers, E.T., et al., *Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 959-91.
26. Hartl, F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 324-32.
27. Calderwood, S.K., A. Murshid, and T. Prince, *The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review*. Gerontology, 2009. **55**(5): p. 550-8.
28. Morrow, G., et al., *Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends Drosophila life span and increases resistance to oxidative stress*. FASEB J, 2004. **18**(3): p. 598-9.
29. Walker, G.A. and G.J. Lithgow, *Lifespan extension in C. elegans by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals*. Aging Cell, 2003. **2**(2): p. 131-9.
30. Min, J.N., et al., *CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): p. 4018-25.
31. Tomaru, U., et al., *Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities*. Am J Pathol, 2012. **180**(3): p. 963-72.
32. Rubinsztein, D.C., G. Marino, and G. Kroemer, *Autophagy and aging*. Cell, 2011. **146**(5): p. 682-95.
33. Chondrogianni, N., et al., *Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo*. Free Radic Biol Med, 2014. **71**: p. 303-20.
34. Madeo, F., et al., *Essential role for autophagy in life span extension*. J Clin Invest, 2015. **125**(1): p. 85-93.
35. Houtkooper, R.H., R.W. Williams, and J. Auwerx, *Metabolic networks of longevity*. Cell, 2010. **142**(1): p. 9-14.
36. Fontana, L., L. Partridge, and V.D. Longo, *Extending healthy life span--from yeast to humans*. Science, 2010. **328**(5976): p. 321-6.
37. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 392-5.
38. Sun, N., R.J. Youle, and T. Finkel, *The Mitochondrial Basis of Aging*. Mol Cell, 2016. **61**(5): p. 654-66.
39. Green, D.R., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1109-12.
40. Van Raamsdonk, J.M. and S. Hekimi, *Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2009. **5**(2): p. e1000361.
41. Yang, W. and S. Hekimi, *A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in Caenorhabditis elegans*. PLoS Biol, 2010. **8**(12): p. e1000556.
42. Yee, C., W. Yang, and S. Hekimi, *The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in C. elegans*. Cell, 2014. **157**(4): p. 897-909.
43. Hekimi, S., J. Lapointe, and Y. Wen, *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(10): p. 569-76.
44. Vermulst, M., et al., *DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice*. Nat Genet, 2008. **40**(4): p. 392-4.

45. Edgar, D., et al., *Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice*. Cell Metab, 2009. **10**(2): p. 131-8.
46. Haigis, M.C. and B.A. Yankner, *The aging stress response*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 333-44.
47. Kuilman, T., et al., *The essence of senescence*. Genes Dev, 2010. **24**(22): p. 2463-79.
48. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
49. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
50. Rodier, F. and J. Campisi, *Four faces of cellular senescence*. J Cell Biol, 2011. **192**(4): p. 547-56.
51. Conboy, I.M. and T.A. Rando, *Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches*. Cell Cycle, 2012. **11**(12): p. 2260-7.
52. Cheng, T., et al., *Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1804-8.
53. Kippin, T.E., D.J. Martens, and D. van der Kooy, *p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity*. Genes Dev, 2005. **19**(6): p. 756-67.
54. Rera, M., et al., *Modulation of longevity and tissue homeostasis by the Drosophila PGC-1 homolog*. Cell Metab, 2011. **14**(5): p. 623-34.
55. Chakkalakal, J.V., et al., *The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence*. Nature, 2012. **490**(7420): p. 355-60.
56. Conboy, I.M., M.J. Conboy, and J. Rebo, *Systemic Problems: A perspective on stem cell aging and rejuvenation*. Aging (Albany NY), 2015. **7**(10): p. 754-65.
57. Russell, S.J. and C.R. Kahn, *Endocrine regulation of ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 681-91.
58. Zhang, G., et al., *Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 211-6.
59. Salminen, A., K. Kaarniranta, and A. Kauppinen, *Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(3): p. 166-75.
60. Deeks, S.G., *HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging*. Annu Rev Med, 2011. **62**: p. 141-55.
61. Lefebvre, J.S., et al., *The aged microenvironment contributes to the age-related functional defects of CD4 T cells in mice*. Aging Cell, 2012. **11**(5): p. 732-40.
62. Osorio, F.G., et al., *Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging*. Sci Transl Med, 2011. **3**(106): p. 106ra107.
63. Adler, A.S., et al., *Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3244-57.
64. Tilstra, J.S., et al., *NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2601-12.
65. Durieux, J., S. Wolff, and A. Dillin, *The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity*. Cell, 2011. **144**(1): p. 79-91.
66. Lavasani, M., et al., *Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 608.
67. Wolkow, C.A., et al., *Regulation of C. elegans life-span by insulinlike signaling in the nervous system*. Science, 2000. **290**(5489): p. 147-50.
68. Barbieri, M., et al., *Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(5): p. E1064-71.

69. Kenyon, C., et al., *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 461-4.
70. Hwangbo, D.S., et al., *Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body*. Nature, 2004. **429**(6991): p. 562-6.
71. Holzenberger, M., et al., *IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice*. Nature, 2003. **421**(6919): p. 182-7.
72. Milman, S., et al., *Low insulin-like growth factor-1 level predicts survival in humans with exceptional longevity*. Aging Cell, 2014. **13**(4): p. 769-71.
73. Kimura, K.D., et al., *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Science, 1997. **277**(5328): p. 942-6.
74. Pierce, S.B., et al., *Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse C. elegans insulin gene family*. Genes Dev, 2001. **15**(6): p. 672-86.
75. Li, W., S.G. Kennedy, and G. Ruvkun, *daf-28 encodes a C. elegans insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway*. Genes Dev, 2003. **17**(7): p. 844-58.
76. Hertweck, M., C. Gobel, and R. Baumeister, *C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 577-88.
77. Paradis, S., et al., *A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in Caenorhabditis elegans*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1438-52.
78. Paradis, S. and G. Ruvkun, *Caenorhabditis elegans Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor*. Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2488-98.
79. Lin, K., et al., *daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of Caenorhabditis elegans*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1319-22.
80. Morris, J.Z., H.A. Tissenbaum, and G. Ruvkun, *A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1996. **382**(6591): p. 536-9.
81. Murphy, C.T., et al., *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 277-83.
82. Lee, S.S., et al., *DAF-16 target genes that control C. elegans life-span and metabolism*. Science, 2003. **300**(5619): p. 644-7.
83. Upton, Z., et al., *Evolution of insulin-like growth factor (IGF) function: production and characterization of recombinant hagfish IGF*. Gen Comp Endocrinol, 1997. **105**(1): p. 79-90.
84. Reinecke, M. and C. Collet, *The phylogeny of the insulin-like growth factors*. Int Rev Cytol, 1998. **183**: p. 1-94.
85. Bluher, M., B.B. Kahn, and C.R. Kahn, *Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue*. Science, 2003. **299**(5606): p. 572-4.
86. Apfeld, J. and C. Kenyon, *Cell nonautonomy of C. elegans daf-2 function in the regulation of diapause and life span*. Cell, 1998. **95**(2): p. 199-210.
87. Libina, N., J.R. Berman, and C. Kenyon, *Tissue-specific activities of C. elegans DAF-16 in the regulation of lifespan*. Cell, 2003. **115**(4): p. 489-502.
88. Giannakou, M.E., et al., *Long-lived Drosophila with overexpressed dFOXO in adult fat body*. Science, 2004. **305**(5682): p. 361.
89. Apfeld, J. and C. Kenyon, *Regulation of lifespan by sensory perception in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1999. **402**(6763): p. 804-9.
90. Alcedo, J. and C. Kenyon, *Regulation of C. elegans longevity by specific gustatory and olfactory neurons*. Neuron, 2004. **41**(1): p. 45-55.

91. Lin, K., et al., *Regulation of the Caenorhabditis elegans longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling*. Nat Genet, 2001. **28**(2): p. 139-45.
92. Hsu, A.L., C.T. Murphy, and C. Kenyon, *Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1142-5.
93. Morley, J.F. and R.I. Morimoto, *Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 657-64.
94. Oh, S.W., et al., *JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4494-9.
95. Kondo, M., et al., *The p38 signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to Caenorhabditis elegans nuclei*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(6-7): p. 642-7.
96. Apfeld, J., et al., *The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3004-9.
97. Troemel, E.R., et al., *p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in C. elegans*. PLoS Genet, 2006. **2**(11): p. e183.
98. Nanji, M., N.A. Hopper, and D. Gems, *LET-60 RAS modulates effects of insulin/IGF-1 signaling on development and aging in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2005. **4**(5): p. 235-45.
99. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.
100. Oh, W.J. and E. Jacinto, *mTOR complex 2 signaling and functions*. Cell Cycle, 2011. **10**(14): p. 2305-16.
101. Xie, X. and K.L. Guan, *The ribosome and TORC2: collaborators for cell growth*. Cell, 2011. **144**(5): p. 640-2.
102. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.
103. Jewell, J.L. and K.L. Guan, *Nutrient signaling to mTOR and cell growth*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(5): p. 233-42.
104. Jewell, J.L., R.C. Russell, and K.L. Guan, *Amino acid signalling upstream of mTOR*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(3): p. 133-9.
105. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-93.
106. Johnson, S.C., et al., *Modulating mTOR in aging and health*. Interdiscip Top Gerontol, 2015. **40**: p. 107-27.
107. Fabrizio, P., et al., *Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast*. Science, 2001. **292**(5515): p. 288-90.
108. Vellai, T., et al., *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 620.
109. Kapahi, P., et al., *Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway*. Curr Biol, 2004. **14**(10): p. 885-90.
110. Powers, R.W., 3rd, et al., *Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling*. Genes Dev, 2006. **20**(2): p. 174-84.
111. Robida-Stubbs, S., et al., *TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO*. Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 713-24.
112. Bjedov, I., et al., *Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly Drosophila melanogaster*. Cell Metab, 2010. **11**(1): p. 35-46.
113. Johnson, S.C., P.S. Rabinovitch, and M. Kaerberlein, *mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease*. Nature, 2013. **493**(7432): p. 338-45.
114. Watroba, M. and D. Szukiewicz, *The role of sirtuins in aging and age-related diseases*. Adv Med Sci, 2016. **61**(1): p. 52-62.

115. Kaeberlein, M., M. McVey, and L. Guarente, *The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms*. *Genes Dev*, 1999. **13**(19): p. 2570-80.
116. Tissenbaum, H.A. and L. Guarente, *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2001. **410**(6825): p. 227-30.
117. Rogina, B. and S.L. Helfand, *Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(45): p. 15998-6003.
118. Burnett, C., et al., *Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in C. elegans and Drosophila*. *Nature*, 2011. **477**(7365): p. 482-5.
119. Viswanathan, M. and L. Guarente, *Regulation of Caenorhabditis elegans lifespan by sir-2.1 transgenes*. *Nature*, 2011. **477**(7365): p. E1-2.
120. Houtkooper, R.H., E. Pirinen, and J. Auwerx, *Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(4): p. 225-38.
121. Herranz, D., et al., *Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer*. *Nat Commun*, 2010. **1**: p. 3.
122. Satoh, A., et al., *Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH*. *Cell Metab*, 2013. **18**(3): p. 416-30.
123. Someya, S., et al., *Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction*. *Cell*, 2010. **143**(5): p. 802-12.
124. Oberdoerffer, P., et al., *SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging*. *Cell*, 2008. **135**(5): p. 907-18.
125. Wang, R.H., et al., *Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(4): p. 312-23.
126. Nogueiras, R., et al., *Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(3): p. 1479-514.
127. Kawahara, T.L., et al., *SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span*. *Cell*, 2009. **136**(1): p. 62-74.
128. Zhong, L., et al., *The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha*. *Cell*, 2010. **140**(2): p. 280-93.
129. Brown, K., et al., *SIRT3 reverses aging-associated degeneration*. *Cell Rep*, 2013. **3**(2): p. 319-27.
130. Imai, S. and L. Guarente, *NAD+ and sirtuins in aging and disease*. *Trends Cell Biol*, 2014. **24**(8): p. 464-71.
131. Wood, J.G., et al., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. *Nature*, 2004. **430**(7000): p. 686-9.
132. Pearson, K.J., et al., *Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span*. *Cell Metab*, 2008. **8**(2): p. 157-68.
133. Gomes, A.P., et al., *Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging*. *Cell*, 2013. **155**(7): p. 1624-38.
134. Hardie, D.G., *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(10): p. 774-85.
135. Ulgherait, M., et al., *AMPK modulates tissue and organismal aging in a non-cell-autonomous manner*. *Cell Rep*, 2014. **8**(6): p. 1767-80.
136. Onken, B. and M. Driscoll, *Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend C. elegans Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8758.
137. Dilman, V.M. and V.N. Anisimov, *Effect of treatment with phenformin, diphenylhydantoin or L-dopa on life span and tumour incidence in C3H/Sn mice*. *Gerontology*, 1980. **26**(5): p. 241-6.

138. Martin-Montalvo, A., et al., *Metformin improves healthspan and lifespan in mice*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2192.
139. Bannister, C.A., et al., *Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls*. Diabetes Obes Metab, 2014. **16**(11): p. 1165-73.
140. McCay, C.M., M.F. Crowell, and L.A. Maynard, *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size*. 1935. Nutrition, 1989. **5**(3): p. 155-71; discussion 172.
141. Lee, S.H. and K.J. Min, *Caloric restriction and its mimetics*. BMB Rep, 2013. **46**(4): p. 181-7.
142. Lee, C. and V. Longo, *Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging*. F1000Res, 2016. **5**.
143. Weraarchakul, N., et al., *The effect of aging and dietary restriction on DNA repair*. Exp Cell Res, 1989. **181**(1): p. 197-204.
144. Spaulding, C.C., R.L. Walford, and R.B. Effros, *Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice*. Mech Ageing Dev, 1997. **93**(1-3): p. 87-94.
145. Merry, B.J., *Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(11): p. 1340-54.
146. Fontana, L., S. Klein, and J.O. Holloszy, *Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production*. Age (Dordr), 2010. **32**(1): p. 97-108.
147. Redman, L.M. and E. Ravussin, *Endocrine alterations in response to calorie restriction in humans*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **299**(1): p. 129-36.
148. Hwang, A.B., D.E. Jeong, and S.J. Lee, *Mitochondria and organismal longevity*. Curr Genomics, 2012. **13**(7): p. 519-32.
149. Lee, S.J., A.B. Hwang, and C. Kenyon, *Inhibition of respiration extends C. elegans life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity*. Curr Biol, 2010. **20**(23): p. 2131-6.
150. Curtis, R., G. O'Connor, and P.S. DiStefano, *Aging networks in Caenorhabditis elegans: AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 119-26.
151. Walter, L., et al., *The homeobox protein CEH-23 mediates prolonged longevity in response to impaired mitochondrial electron transport chain in C. elegans*. PLoS Biol, 2011. **9**(6): p. e1001084.
152. Suliman, H.B. and C.A. Piantadosi, *Mitochondrial Quality Control as a Therapeutic Target*. Pharmacol Rev, 2016. **68**(1): p. 20-48.
153. Canto, C., K.J. Menzies, and J. Auwerx, *NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus*. Cell Metab, 2015. **22**(1): p. 31-53.
154. Bernardes de Jesus, B., et al., *Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(8): p. 691-704.
155. Raices, M., et al., *Uncoupling of longevity and telomere length in C. elegans*. PLoS Genet, 2005. **1**(3): p. e30.
156. Hsin, H. and C. Kenyon, *Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans*. Nature, 1999. **399**(6734): p. 362-6.
157. Flatt, T., et al., *Drosophila germ-line modulation of insulin signaling and lifespan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6368-73.

158. Cargill, S.L., et al., *Age of ovary determines remaining life expectancy in old ovariectomized mice*. *Aging Cell*, 2003. **2**(3): p. 185-90.
159. Arnsburg, K. and J. Kirstein-Miles, *Interrelation between protein synthesis, proteostasis and life span*. *Curr Genomics*, 2014. **15**(1): p. 66-75.
160. Syntichaki, P., K. Troulinaki, and N. Tavernarakis, *Protein synthesis is a novel determinant of aging in *Caenorhabditis elegans**. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1119**: p. 289-95.
161. Proud, C.G., *mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **313**(2): p. 429-36.
162. Mendez, R., et al., *Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(6): p. 2857-64.
163. Syntichaki, P. and N. Tavernarakis, *Signaling pathways regulating protein synthesis during ageing*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(10): p. 1020-5.
164. Spriggs, K.A., M. Bushell, and A.E. Willis, *Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress*. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 228-37.
165. Gallinetti, J., E. Harputlugil, and J.R. Mitchell, *Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR*. *Biochem J*, 2013. **449**(1): p. 1-10.
166. Makrides, S.C., *Protein synthesis and degradation during aging and senescence*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1983. **58**(3): p. 343-422.
167. Rattan, S.I. and B.F. Clark, *Intracellular protein synthesis, modifications and aging*. *Biochem Soc Trans*, 1996. **24**(4): p. 1043-9.
168. Makrides, S.C. and J. Goldthwaite, *The content and size distribution of membrane-bound and free polyribosomes in mouse liver during aging*. *Mech Ageing Dev*, 1984. **27**(1): p. 111-34.
169. Webster, G.C. and S.L. Webster, *Decline in synthesis of elongation factor one (EF-1) precedes the decreased synthesis of total protein in aging *Drosophila melanogaster**. *Mech Ageing Dev*, 1983. **22**(2): p. 121-8.
170. Golden, T.R. and S. Melov, *Microarray analysis of gene expression with age in individual nematodes*. *Aging Cell*, 2004. **3**(3): p. 111-24.
171. Walther, D.M., et al., *Widespread Proteome Remodeling and Aggregation in Aging *C. elegans**. *Cell*, 2015. **161**(4): p. 919-32.
172. Ibanez-Ventoso, C., et al., *Modulated microRNA expression during adult lifespan in *Caenorhabditis elegans**. *Aging Cell*, 2006. **5**(3): p. 235-46.
173. Ellis, R.J. and A.P. Minton, *Protein aggregation in crowded environments*. *Biol Chem*, 2006. **387**(5): p. 485-97.
174. Buchberger, A., B. Bukau, and T. Sommer, *Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms*. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 238-52.
175. Finley, D., *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome*. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 477-513.
176. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 67-93.
177. David, D.C., et al., *Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans**. *PLoS Biol*, 2010. **8**(8): p. e1000450.
178. Ben-Zvi, A., E.A. Miller, and R.I. Morimoto, *Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(35): p. 14914-9.
179. Kirstein-Miles, J., et al., *The nascent polypeptide-associated complex is a key regulator of proteostasis*. *EMBO J*, 2013. **32**(10): p. 1451-68.

180. Akerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 545-55.
181. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
182. Powers, E.T. and W.E. Balch, *Diversity in the origins of proteostasis networks--a driver for protein function in evolution*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(4): p. 237-48.
183. Feder, M.E. and G.E. Hofmann, *Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology*. Annu Rev Physiol, 1999. **61**: p. 243-82.
184. Jiang, J., et al., *Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70*. Mol Cell, 2007. **28**(3): p. 422-33.
185. Ahmad, A., et al., *Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(47): p. 18966-71.
186. Harrison, C.J., et al., *Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK*. Science, 1997. **276**(5311): p. 431-5.
187. Taipale, M., D.F. Jarosz, and S. Lindquist, *HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(7): p. 515-28.
188. Rutherford, S.L. and S. Lindquist, *Hsp90 as a capacitor for morphological evolution*. Nature, 1998. **396**(6709): p. 336-42.
189. Haynes, C.M., C.J. Fiorese, and Y.F. Lin, *Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(7): p. 311-8.
190. Martinus, R.D., et al., *Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome*. Eur J Biochem, 1996. **240**(1): p. 98-103.
191. Zhao, Q., et al., *A mitochondrial specific stress response in mammalian cells*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4411-9.
192. Yoneda, T., et al., *Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 18): p. 4055-66.
193. Nargund, A.M., et al., *Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation*. Science, 2012. **337**(6094): p. 587-90.
194. Haynes, C.M., et al., *The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in C. elegans*. Mol Cell, 2010. **37**(4): p. 529-40.
195. Aldridge, J.E., T. Horibe, and N.J. Hoogenraad, *Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e874.
196. Baker, B.M., et al., *Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2alpha kinase GCN-2*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002760.
197. Benedetti, C., et al., *Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response*. Genetics, 2006. **174**(1): p. 229-39.
198. Haynes, C.M., et al., *ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in C. elegans*. Dev Cell, 2007. **13**(4): p. 467-80.
199. Rainbolt, T.K., et al., *Stress-regulated translational attenuation adapts mitochondrial protein import through Tim17A degradation*. Cell Metab, 2013. **18**(6): p. 908-19.
200. Martin, J., K. Mahlke, and N. Pfanner, *Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences*. J Biol Chem, 1991. **266**(27): p. 18051-7.

201. Wright, G., et al., *Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation*. *Exp Cell Res*, 2001. **263**(1): p. 107-17.
202. Bota, D.A. and K.J. Davies, *Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders*. *Mitochondrion*, 2001. **1**(1): p. 33-49.
203. Fukuda, R., et al., *HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells*. *Cell*, 2007. **129**(1): p. 111-22.
204. Hori, O., et al., *Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(7): p. 1151-60.
205. Haynes, C.M. and D. Ron, *The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 22): p. 3849-55.
206. Matsushima, Y., Y. Goto, and L.S. Kaguni, *Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(43): p. 18410-5.
207. Park, S.C., et al., *Oligomeric structure of the ATP-dependent protease La (Lon) of Escherichia coli*. *Mol Cells*, 2006. **21**(1): p. 129-34.
208. Sauer, R.T. and T.A. Baker, *AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction*. *Annu Rev Biochem*, 2011. **80**: p. 587-612.
209. Schmidt, M., A.N. Lupas, and D. Finley, *Structure and mechanism of ATP-dependent proteases*. *Curr Opin Chem Biol*, 1999. **3**(5): p. 584-91.
210. Kang, S.G., et al., *Human mitochondrial ClpP is a stable heptamer that assembles into a tetradecamer in the presence of ClpX*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(42): p. 35424-32.
211. Arnold, I. and T. Langer, *Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1592**(1): p. 89-96.
212. Rotanova, T.V., et al., *Slicing a protease: structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains*. *Protein Sci*, 2006. **15**(8): p. 1815-28.
213. Pinti, M., et al., *Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. **72**(24): p. 4807-24.
214. Gottesman, S., S. Wickner, and M.R. Maurizi, *Protein quality control: triage by chaperones and proteases*. *Genes Dev*, 1997. **11**(7): p. 815-23.
215. Chung, C.H. and A.L. Goldberg, *The product of the lon (capR) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(8): p. 4931-5.
216. Fu, G.K., M.J. Smith, and D.M. Markovitz, *Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(1): p. 534-8.
217. Botos, I., et al., *Crystal structure of the AAA+ alpha domain of E. coli Lon protease at 1.9A resolution*. *J Struct Biol*, 2004. **146**(1-2): p. 113-22.
218. Vieux, E.F., et al., *Distinct quaternary structures of the AAA+ Lon protease control substrate degradation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(22): p. E2002-8.
219. Wang, N., et al., *A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(23): p. 11247-51.
220. Garcia-Nafria, J., et al., *Structure of the catalytic domain of the human mitochondrial Lon protease: proposed relation of oligomer formation and activity*. *Protein Sci*, 2010. **19**(5): p. 987-99.
221. Venkatesh, S., et al., *Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1823**(1): p. 56-66.

222. Wang, N., et al., *Synthesis, processing, and localization of human Lon protease*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 29308-13.
223. Bota, D.A. and K.J. Davies, *Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 674-80.
224. Cha, S.S., et al., *Crystal structure of Lon protease: molecular architecture of gated entry to a sequestered degradation chamber*. EMBO J, 2010. **29**(20): p. 3520-30.
225. Gibellini, L., et al., *Mitochondrial Proteases as Emerging Pharmacological Targets*. Curr Pharm Des, 2016. **22**(18): p. 2679-88.
226. Wu, Y., et al., *Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population*. Cell, 2014. **158**(6): p. 1415-1430.
227. Voos, W., *Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(2): p. 388-99.
228. Quiros, P.M., C. Barcena, and C. Lopez-Otin, *Lon protease: A key enzyme controlling mitochondrial bioenergetics in cancer*. Mol Cell Oncol, 2014. **1**(4): p. e968505.
229. Rep, M., et al., *Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon*. Science, 1996. **274**(5284): p. 103-6.
230. Kao, T.Y., et al., *Mitochondrial Lon regulates apoptosis through the association with Hsp60-mtHsp70 complex*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1642.
231. Charette, M.F., et al., *DNA-stimulated ATPase activity on the lon (CapR) protein*. J Bacteriol, 1984. **158**(1): p. 195-201.
232. Fu, G.K. and D.M. Markovitz, *The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner*. Biochemistry, 1998. **37**(7): p. 1905-9.
233. Menon, A.S. and A.L. Goldberg, *Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP*. J Biol Chem, 1987. **262**(31): p. 14929-34.
234. Zehnbauer, B.A., et al., *Identification and purification of the Lon+ (capR+) gene product, a DNA-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2043-7.
235. Liu, T., et al., *DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13902-10.
236. Ekstrand, M.I., et al., *Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(9): p. 935-44.
237. Kaufman, B.A., et al., *The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3225-36.
238. Ambro, L., et al., *The influence of ATP-dependent proteases on a variety of nucleoid-associated processes*. J Struct Biol, 2012. **179**(2): p. 181-92.
239. Lee, C.K., et al., *Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction*. Science, 1999. **285**(5432): p. 1390-3.
240. Bota, D.A., H. Van Remmen, and K.J. Davies, *Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress*. FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 103-6.
241. Bota, D.A., J.K. Ngo, and K.J. Davies, *Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(5): p. 665-77.
242. Bakala, H., et al., *Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix*. Eur J Biochem, 2003. **270**(10): p. 2295-302.
243. Shigenaga, M.K., T.M. Hagen, and B.N. Ames, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10771-8.

244. Shringarpure, R. and K.J. Davies, *Protein turnover by the proteasome in aging and disease*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1084-9.
245. Delaval, E., M. Perichon, and B. Friguet, *Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart*. Eur J Biochem, 2004. **271**(22): p. 4559-64.
246. Dikoglu, E., et al., *Mutations in LONP1, a mitochondrial matrix protease, cause CODAS syndrome*. Am J Med Genet A, 2015. **167**(7): p. 1501-9.
247. Strauss, K.A., et al., *CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial AAA+ Lon protease*. Am J Hum Genet, 2015. **96**(1): p. 121-35.
248. Royer-Bertrand, B., et al., *Mutations in the heat-shock protein A9 (HSPA9) gene cause the EVEN-PLUS syndrome of congenital malformations and skeletal dysplasia*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17154.
249. Gibellini, L., et al., *Silencing of mitochondrial Lon protease deeply impairs mitochondrial proteome and function in colon cancer cells*. FASEB J, 2014. **28**(12): p. 5122-35.
250. Bernstein, S.H., et al., *The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: a novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives*. Blood, 2012. **119**(14): p. 3321-9.
251. Cheng, C.W., et al., *Overexpression of Lon contributes to survival and aggressive phenotype of cancer cells through mitochondrial complex I-mediated generation of reactive oxygen species*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e681.
252. Liu, Y., et al., *Inhibition of Lon blocks cell proliferation, enhances chemosensitivity by promoting apoptosis and decreases cellular bioenergetics of bladder cancer: potential roles of Lon as a prognostic marker and therapeutic target in bladder cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(22): p. 11209-24.
253. Nie, X., et al., *Down-regulating overexpressed human Lon in cervical cancer suppresses cell proliferation and bioenergetics*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81084.
254. Semenza, G.L., *Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1*. Biochem J, 2007. **405**(1): p. 1-9.
255. Ngo, J.K. and K.J. Davies, *Mitochondrial Lon protease is a human stress protein*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(8): p. 1042-8.
256. Goto, M., et al., *Adaptation of leukemia cells to hypoxic condition through switching the energy metabolism or avoiding the oxidative stress*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 76.
257. Kuo, C.Y., et al., *Mitochondrial Lon protease controls ROS-dependent apoptosis in cardiomyocyte under hypoxia*. Mitochondrion, 2015. **23**: p. 7-16.
258. Quiros, P.M., et al., *ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity*. Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 542-56.
259. Granot, Z., et al., *Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(9): p. 2164-77.
260. Hedgecock, E.M., J.E. Sulston, and J.N. Thomson, *Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1983. **220**(4603): p. 1277-9.
261. Ellis, H.M. and H.R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. Cell, 1986. **44**(6): p. 817-29.
262. Friedman, D.B. and T.E. Johnson, *A mutation in the age-1 gene in Caenorhabditis elegans lengthens life and reduces hermaphrodite fertility*. Genetics, 1988. **118**(1): p. 75-86.

263. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
264. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
265. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. *Science*, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
266. Dickinson, D.J. and B. Goldstein, *CRISPR-Based Methods for Caenorhabditis elegans Genome Engineering*. *Genetics*, 2016. **202**(3): p. 885-901.
267. Ohkumo, T., et al., *Use of RNAi in C. elegans*. *Methods Mol Biol*, 2008. **442**: p. 129-37.
268. Kelly, W.G., et al., *Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed Caenorhabditis elegans gene*. *Genetics*, 1997. **146**(1): p. 227-38.
269. Ketting, R.F. and R.H. Plasterk, *A genetic link between co-suppression and RNA interference in C. elegans*. *Nature*, 2000. **404**(6775): p. 296-8.
270. Frokjaer-Jensen, C., et al., *Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet*, 2008. **40**(11): p. 1375-83.
271. Frokjaer-Jensen, C., et al., *Improved Mos1-mediated transgenesis in C. elegans*. *Nat Methods*, 2012. **9**(2): p. 117-8.
272. Shaye, D.D. and I. Greenwald, *OrthoList: a compendium of C. elegans genes with human orthologs*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20085.
273. Kaletta, T. and M.O. Hengartner, *Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(5): p. 387-98.
274. Spieth, J. and D. Lawson, *Overview of gene structure*. *WormBook*, 2006: p. 1-10.
275. Blumenthal, T., *Trans-splicing and operons*. *WormBook*, 2005: p. 1-9.
276. Hu, C.W., et al., *Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: first evidence of DNA methylation in Caenorhabditis elegans*. *Biochem J*, 2015. **465**(1): p. 39-47.
277. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 1977. **56**(1): p. 110-56.
278. Grant, B.D. and M. Sato, *Intracellular trafficking*. *WormBook*, 2006: p. 1-9.
279. Chisholm, A.D. and T.I. Hsiao, *The Caenorhabditis elegans epidermis as a model skin. I: development, patterning, and growth*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012. **1**(6): p. 861-78.
280. Moerman, D.G. and A. Fire, *Muscle: Structure, Function, and Development*. 1997.
281. White, J.G., et al., *The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1986. **314**(1165): p. 1-340.
282. Ward, S., et al., *Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode Caenorhabditis elegans. ?2UU*. *J Comp Neurol*, 1975. **160**(3): p. 313-37.
283. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 1983. **100**(1): p. 64-119.
284. White, J.G., et al., *Factors that determine connectivity in the nervous system of Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1983. **48 Pt 2**: p. 633-40.
285. Oikonomou, G. and S. Shaham, *The glia of Caenorhabditis elegans*. *Glia*, 2011. **59**(9): p. 1253-63.
286. Dong, X., et al., *An extracellular adhesion molecule complex patterns dendritic branching and morphogenesis*. *Cell*, 2013. **155**(2): p. 296-307.

287. Hobert, O., *The neuronal genome of Caenorhabditis elegans*. WormBook, 2013: p. 1-106.
288. Silhankova, M. and H.C. Korswagen, *Migration of neuronal cells along the anterior-posterior body axis of C. elegans: Wnts are in control*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(4): p. 320-5.
289. Hammarlund, M. and Y. Jin, *Axon regeneration in C. elegans*. Curr Opin Neurobiol, 2014. **27**: p. 199-207.
290. Shaham, S., *Glial development and function in the nervous system of Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4): p. a020578.
291. Bargmann, C.I., *Chemosensation in C. elegans*. WormBook, 2006: p. 1-29.
292. Ardiel, E.L. and C.H. Rankin, *An elegant mind: learning and memory in Caenorhabditis elegans*. Learn Mem, 2010. **17**(4): p. 191-201.
293. Mango, S.E., *The C. elegans pharynx: a model for organogenesis*. WormBook, 2007: p. 1-26.
294. Avery, L. and Y.J. You, *C. elegans feeding*. WormBook, 2012: p. 1-23.
295. Keane, J. and L. Avery, *Mechanosensory inputs influence Caenorhabditis elegans pharyngeal activity via ivermectin sensitivity genes*. Genetics, 2003. **164**(1): p. 153-62.
296. Avery, L. and B.B. Shtonda, *Food transport in the C. elegans pharynx*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 14): p. 2441-57.
297. Schulenburg, H., C.L. Kurz, and J.J. Ewbank, *Evolution of the innate immune system: the worm perspective*. Immunol Rev, 2004. **198**: p. 36-58.
298. McGhee, J.D., *The C. elegans intestine*. WormBook, 2007: p. 1-36.
299. Kimble, J. and W.J. Sharrock, *Tissue-specific synthesis of yolk proteins in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **96**(1): p. 189-96.
300. Kimble, J.E. and J.G. White, *On the control of germ cell development in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1981. **81**(2): p. 208-19.
301. McCarter, J., et al., *Soma-germ cell interactions in Caenorhabditis elegans: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages*. Dev Biol, 1997. **181**(2): p. 121-43.
302. Hall, D.H., et al., *Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of Caenorhabditis elegans: relations between the germ line and soma*. Dev Biol, 1999. **212**(1): p. 101-23.
303. Miller, M.A., et al., *A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation*. Science, 2001. **291**(5511): p. 2144-7.
304. Kimble, J. and S.L. Crittenden, *Germline proliferation and its control*. WormBook, 2005: p. 1-14.
305. Sternberg, P.W., *Vulval development*. WormBook, 2005: p. 1-28.
306. Baugh, L.R., *To grow or not to grow: nutritional control of development during Caenorhabditis elegans L1 arrest*. Genetics, 2013. **194**(3): p. 539-55.
307. Fielenbach, N. and A. Antebi, *C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity*. Genes Dev, 2008. **22**(16): p. 2149-65.
308. Ambros, V. and H.R. Horvitz, *Heterochronic mutants of the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1984. **226**(4673): p. 409-16.
309. Feinbaum, R. and V. Ambros, *The timing of lin-4 RNA accumulation controls the timing of postembryonic developmental events in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1999. **210**(1): p. 87-95.
310. Hristova, M., et al., *The Caenorhabditis elegans heterochronic regulator LIN-14 is a novel transcription factor that controls the developmental timing of transcription from the insulin/insulin-like growth factor gene ins-33 by direct DNA binding*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 11059-72.

311. Ambros, V. and H.R. Horvitz, *The lin-14 locus of Caenorhabditis elegans controls the time of expression of specific postembryonic developmental events*. Genes Dev, 1987. **1**(4): p. 398-414.
312. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
313. Shi, Z., G. Hayes, and G. Ruvkun, *Dual regulation of the lin-14 target mRNA by the lin-4 miRNA*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75475.
314. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
315. Abbott, A.L., et al., *The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Dev Cell, 2005. **9**(3): p. 403-14.
316. Abrahante, J.E., et al., *The Caenorhabditis elegans hunchback-like gene lin-57/hbl-1 controls developmental time and is regulated by microRNAs*. Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 625-37.
317. Lin, S.Y., et al., *The C elegans hunchback homolog, hbl-1, controls temporal patterning and is a probable microRNA target*. Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 639-50.
318. Slack, F.J., et al., *The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor*. Mol Cell, 2000. **5**(4): p. 659-69.
319. Vadla, B., et al., *lin-28 controls the succession of cell fate choices via two distinct activities*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002588.
320. Lehrbach, N.J., et al., *LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate let-7 microRNA processing in Caenorhabditis elegans*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(10): p. 1016-20.
321. Van Wynsberghe, P.M., et al., *LIN-28 co-transcriptionally binds primary let-7 to regulate miRNA maturation in Caenorhabditis elegans*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(3): p. 302-8.
322. Viswanathan, S.R., G.Q. Daley, and R.I. Gregory, *Selective blockade of microRNA processing by Lin28*. Science, 2008. **320**(5872): p. 97-100.
323. Moss, E.G., R.C. Lee, and V. Ambros, *The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA*. Cell, 1997. **88**(5): p. 637-46.
324. Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss, *Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation*. Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 215-25.
325. Tsalikas, J., et al., *Stage-Specific Timing of the microRNA Regulation of lin-28 by the Heterochronic Gene lin-14 in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2016.
326. Jeon, M., et al., *Similarity of the C. elegans developmental timing protein LIN-42 to circadian rhythm proteins*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1141-6.
327. Monsalve, G.C., C. Van Buskirk, and A.R. Frand, *LIN-42/PERIOD controls cyclical and developmental progression of C. elegans molts*. Curr Biol, 2011. **21**(24): p. 2033-45.
328. McCulloch, K.A. and A.E. Rougvie, *Caenorhabditis elegans period homolog lin-42 regulates the timing of heterochronic miRNA expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(43): p. 15450-5.
329. Perales, R., et al., *LIN-42, the Caenorhabditis elegans PERIOD homolog, negatively regulates microRNA transcription*. PLoS Genet, 2014. **10**(7): p. e1004486.
330. Van Wynsberghe, P.M., et al., *The Period protein homolog LIN-42 negatively regulates microRNA biogenesis in C. elegans*. Dev Biol, 2014. **390**(2): p. 126-35.
331. Mello, C. and A. Fire, *DNA transformation*. Methods Cell Biol, 1995. **48**: p. 451-82.

332. Blumenthal, T., et al., *A global analysis of Caenorhabditis elegans operons*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 851-4.
333. Van Dyck, L. and T. Langer, *ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(9-10): p. 825-42.
334. Quiros, P.M., T. Langer, and C. Lopez-Otin, *New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(6): p. 345-59.
335. Friguet, B., A.L. Bulteau, and I. Petropoulos, *Mitochondrial protein quality control: implications in ageing*. Biotechnol J, 2008. **3**(6): p. 757-64.
336. Ngo, J.K. and K.J. Davies, *Importance of the Lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining lon in aging*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1119**: p. 78-87.
337. Schoemaker, J.M., R.C. Gayda, and A. Markovitz, *Regulation of cell division in Escherichia coli: SOS induction and cellular location of the sulA protein, a key to lon-associated filamentation and death*. J Bacteriol, 1984. **158**(2): p. 551-61.
338. Suzuki, C.K., et al., *Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration*. Science, 1994. **264**(5161): p. 891.
339. Logan, D.C., et al., *Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos*. Plant Physiol, 2001. **125**(2): p. 662-72.
340. Rigas, S., et al., *Role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondrial function in Arabidopsis thaliana*. New Phytol, 2009. **181**(3): p. 588-600.
341. Ciesielski, S.J., et al., *Protection of scaffold protein Isu from degradation by the Lon protease Pim1 as a component of Fe-S cluster biogenesis regulation*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(7): p. 1060-8.
342. Christensen, S.K., et al., *Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in Escherichia coli: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system*. Mol Microbiol, 2004. **51**(6): p. 1705-17.
343. D'Amico, D., V. Sorrentino, and J. Auwerx, *Cytosolic Proteostasis Networks of the Mitochondrial Stress Response*. Trends Biochem Sci, 2017. **42**(9): p. 712-725.
344. Kim, H.E., et al., *Lipid Biosynthesis Coordinates a Mitochondrial-to-Cytosolic Stress Response*. Cell, 2016. **166**(6): p. 1539-1552 e16.
345. Rigas, S., et al., *The multifaceted role of Lon proteolysis in seedling establishment and maintenance of plant organelle function: living from protein destruction*. Physiol Plant, 2012. **145**(1): p. 215-23.
346. Pinti, M., et al., *Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1857**(8): p. 1300-1306.
347. Luce, K. and H.D. Osiewacz, *Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p. 852-8.
348. Adam, C., et al., *Biological roles of the Podospira anserina mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38138.
349. Erjavec, N., et al., *Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome*. Free Radic Biol Med, 2013. **56**: p. 9-16.
350. Bayot, A., et al., *Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11445-57.
351. Bayot, A., et al., *Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells*. Biochimie, 2014. **100**: p. 38-47.

352. Ngo, J.K., L.C. Pomatto, and K.J. Davies, *Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 258-64.
353. Nargund, A.M., et al., *Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt)*. Mol Cell, 2015. **58**(1): p. 123-33.
354. Bonekamp, N.A., et al., *Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance*. Biofactors, 2009. **35**(4): p. 346-55.
355. Hughes, A.L. and D.E. Gottschling, *An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast*. Nature, 2012. **492**(7428): p. 261-5.