



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Αθήνα, 2019

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία
Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των βασικών
μηχανισμών διατήρησης μιτοχονδριακής
ομοιόστασης στη γήρανση και απόκριση σε
στρες στο νηματώδη *C. elegans*.



Ειρήνη Χ. Ταουκτσή

Επιβλέπων Καθηγητής: Σταμάτης Ρήγας

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

«Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των βασικών μηχανισμών διατήρησης μιτοχονδριακής ομοιόστασης στη γήρανση και απόκριση σε στρες στο νηματώδη *C. elegans*.»

“Investigation of the interaction of the basic mechanisms of maintenance of mitochondrial homeostasis in aging and stress response in the nematode *C. elegans*.”

Ειρήνη Χ. Ταουκτσή

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Σταμάτης Ρήγας, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Πόπη Συντυχάκη, Ερευνήτρια Γ' ΙΙΒΕΑΑ (Μέλος)

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής (Μέλος)

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής της Γήρανσης του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών υπό την καθημερινή επίβλεψη της Δρ. Πόπης Συντυχάκη στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Βιολογία Συστημάτων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω...

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, Δρ. Σταμάτη Ρήγα, Δρ. Πόπη Συντυχάκη και Δρ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή εξέτασής μου και τον χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διπλωματικής μου μελέτης,

Τη Δρ. Πόπη Συντυχάκη, υπεύθυνη του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής της Γήρανσης του ΙΙΒΕΑΑ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεκπεραιώσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό της, για το ενδιαφέρον και το χρόνο που διέθεσε για την εκπόνησή της, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθ' όλη την παραμονή μου στο εργαστήριο,

Το Δρ. Φοίβο Μπορμπόλη για τη βοήθειά στην παρούσα διπλωματική, τις συμβουλές και την υπομονή του κατά την εκπαίδευσή μου στο χειρισμό του νηματώδη και στις υπόλοιπες μοριακές τεχνικές,

Τα μέλη του εργαστηρίου Δρ. Ελένη Κυριακού για τη συνεισφορά της στη διεξαγωγή των πειραμάτων, τους Γιάννη Ράλλη και Νίκο Μαλακάση για την άριστη συνεργασία μας και ιδιαιτέρως τη Δήμητρα Ράντη για την υποστήριξη, τη φιλία και τις στιγμές που μοιραστήκαμε,

Την οικογένειά μου και τους φίλους μου που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν.

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι αφιερωμένη στη μνήμη του παππού μου, Δημήτρη Μακρή, που με έμαθε να αγωνίζομαι, να κυνηγάω τους στόχους μου και να «κάνω τις χαρές μου πολλές».

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η διατάραξη της πρωτεϊνικής ομοιόστασης θεωρούνται από τους κυριότερους παράγοντες που συμβάλλουν στη γήρανση ενός οργανισμού. Η διατήρηση της ακεραιότητας του πρωτεώματος είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και για αυτό όλοι οι ευκαρυώτες έχουν αναπτύξει σχετικούς μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας. Έναν τέτοιο μηχανισμό αποτελεί η επιλεκτική αποικοδόμηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη, ή δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά, από ATP-εξαρτώμενες μιτοχονδριακές πρωτεάσες (AAA⁺ οικογένεια πρωτεασών). Η απώλεια της λειτουργίας τους έχει συσχετιστεί με μία ποικιλία ανθρωπίνων ασθενειών, ωστόσο οι γνώσεις μας για τις κυτταρικές αποκρίσεις που προκαλούνται από την αδρανοποίησή τους είναι περιορισμένες. Σε αυτή την οικογένεια ανήκει η εξελικτικά συντηρημένη μιτοχονδριακή πρωτεάση LON, που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της μιτοχονδριακής δραστηριότητας αποτρέποντας τη συσσώρευση κακώς ή μη αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή μήτρα, διατηρώντας τα επίπεδα του μιτοχονδριακού DNA και στηρίζοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων υπό συνθήκες στρες. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στο ρόλο της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LON στη φυσιολογία ενός οργανισμού, στην απόκριση στο στρες και στη διάρκεια ζωής του, χρησιμοποιώντας ως πειραματικό μοντέλο το νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*. Στελέχη που φέρουν έλλειψη του γονιδίου *lonp-1*, που κωδικοποιεί για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LON στο νηματώδη, παρουσιάζουν καθυστερημένη λαρβική ανάπτυξη, μειωμένη διάρκεια ζωής και μεταβολές στη μιτοχονδριακή μορφολογία των μιτοχονδρίων, κάτι που παραπέμπει σε αυξημένο ενδογενές μιτοχονδριακό στρες. Πράγματι, εδώ επιβεβαιώσαμε την έντονη ενεργοποίηση του κύριου μονοπατιού απόκρισης στο μιτοχονδριακό στρες (UPR^{mt}, mitochondrial Unfolded Protein Response) στα μεταλλαγμένα ζώα *lonp-1*, υπό φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας. Μελετώντας κάποιους βασικούς παράγοντες του UPR^{mt} –όπως της μιτοχονδριακής πρωτεάσης CLPP-1, του μεταγραφικού παράγοντα ATFS-1 και του μεταφορέα πεπτιδίων HAF-1- δείξαμε πως η ενεργοποίηση αυτή του UPR^{mt} εξαρτάται μόνο από τον παράγοντα ATFS-1. Παράλληλα, αποκαλύψαμε τη διαφορετική επιρροή της απώλειας λειτουργίας αυτών των παραγόντων στην ανάπτυξη, τη μακροβιότητα και την απόκριση σε θερμικό στρες των νηματωδών *lonp-1*. Απροσδόκητο αποτέλεσμα ήταν η επίδραση της μεταλλαγής *lonp-1* στη ρύθμιση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16/FOXO, που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης/IGF-1 και ρυθμίζει ένα μεγάλο εύρος σημαντικών κυτταρικών διεργασιών, σε όλους τους οργανισμούς. Αυτό αποτελεί πρόκληση για την εύρεση νέων μορίων-στόχων της πρωτεάσης LON. Επίσης η παρούσα εργασία επεκτείνει τη γνώση μας για το ρόλο της πρωτεάσης LON σε βασικές πτυχές της βιολογίας του νηματώδη αλλά και του ανθρώπου, κατ'επέκταση.

Μοριακή Γενετική της Γήρανσης

Λέξεις-κλειδιά: *C. elegans*, γήρανση, πρωτεάση *Lonp-1*, μιτοχόνδρια, διάρκεια ζωής, μιτοχονδριακό στρες, UPR^{mt}, θερμικό στρες.

ABSTRACT

Mitochondrial dysfunction and disruption of protein homeostasis are considered to be major contributing factors to organismal ageing. Maintaining the integrity of the proteome is vital to the cell and therefore all eukaryotes have developed relative quality control mechanisms. One such mechanism is the selective degradation of mitochondrial proteins that are damaged or not properly folded, by ATP-dependent mitochondrial proteases (AAA⁺ proteases family). Loss of their function has been associated with a variety of human diseases, however, our knowledge of the cellular responses to this loss is limited. A member of the above family is the evolutionarily conserved mitochondrial protease LON, which is an important regulator of mitochondrial activity, preventing the accumulation of poorly or non-folding proteins in the mitochondrial breast, while maintaining mitochondrial DNA levels and sustaining viability under stress. The present study focuses on the role of mitochondrial protease LON in organismal physiology, response to stress and lifespan, using the nematode *Caenorhabditis elegans* as an experimental model. Strains lacking the *lonp-1* gene, which encodes mitochondrial LON in the nematode, show delayed larval development, shortened adult lifespan and alterations in mitochondrial morphology, suggesting augmented endogenous mitochondrial stress. Indeed, the strong activation of the main mitochondrial stress response pathway (UPR^{mt}, mitochondrial unfolded protein response) in *lonp-1* mutant animals, under normal culture conditions, is hereby confirmed. By studying some key factors of UPR^{mt} -such as mitochondrial CpP-1 protease, ATFS-1 transcription factor and HAF-1 peptide transporter- we shown that this activation of UPR^{mt} depends only on ATFS-1. Moreover, the different effect of deficiency of those factors on growth, longevity and heat stress response of *lonp-1* nematodes has been revealed. An unexpected result was the effect of *lonp-1* mutation on the regulation of DAF-16/FOXO transcription factor, which participates in the insulin/IGF-1 signaling pathway and regulates a wide range of important cellular processes in all organisms. This is a challenge for finding new molecular targets of the LON protease. The present work also expands our knowledge on the role of LON protease in key aspects of nematode biology and, consequently, of humans.

Molecular genetics of aging

Keywords: *C. elegans*, aging, *Lonp-1* protease, mitochondria, lifespan, mitochondrial stress, UPR^{mt}, heat shock.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. Μιτοχόνδρια.....	8
1.1.1 Δομή και λειτουργία.....	8
1.1.2 Οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων.....	9
1.2 Μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου.....	11
1.2.1 Μιτοχονδριακός ποιοτικός έλεγχος πρωτεϊνών	12
1.2.2 Μιτοχονδριακή απόκριση στις μη ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (UPR ^{mt} , Mitochondrial Unfolded Protein Response).....	17
1.3 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη γήρανση.....	19
1.3.1 Το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και ο ρόλος του DAF-16.....	20
1.4 Ο <i>C. elegans</i> ως μοντέλο για τη μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας.....	22
1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά	23
1.4.2 Κύκλος ζωής του <i>C. elegans</i>	25
Κεφάλαιο 2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων	29
2.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	29
2.1.2 Απομόνωση ολικού RNA	29
2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	30
2.2.1 Πολυμεράσες και εκκινητές	30
2.2.2 Σύνθεση cDNA και ποσοτική RT-PCR	32
2.3 PCR σε ολόκληρους νηματώδεις.....	33
2.4 Χειρισμοί βακτηριακών στελεχών.....	33
2.4.1 Καλλιέργεια και αποθήκευση βακτηριακών στελεχών	33
2.4.2. Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	34
2.5 Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	34
2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	35
2.7 Φορείς κλωνοποίησης.....	35
2.8 Χειρισμοί στελεχών <i>C. elegans</i>	35
2.8.1 Καλλιέργεια, αποθήκευση και ψύξη στελεχών <i>C. elegans</i>	35
2.9 Αποσιώπηση γονίδιων με RNAi μέσω σίτισης	38
2.10 Παραγωγή αρσενικών ατόμων	38
2.11 Διασταύρωση στελεχών <i>C. elegans</i>	39
2.12 Δοκιμασία προσδιορισμού διάρκειας ζωής.....	39

2.13	Στελέχη <i>C. elegans</i>	40
2.14	Δοκιμασία θερμικού στρες για έλεγχο και ποσοτικοποίηση φθορισμού	41
2.14.1.	Δοκιμασία θερμικού στρες	41
2.14.2	Ποσοτικοποίηση φθορισμού	42
2.15	Στατιστική ανάλυση	42
	Κεφάλαιο 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
3.1	Δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης LONP-1 και χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου <i>tm5171</i>	44
3.2	Η πρωτεάση LONP-1 στον <i>C. elegans</i> απαιτείται για τη φυσιολογική ανάπτυξη, γονιμότητα και διάρκεια ζωής του.	46
3.3	Η έλλειψη του γονιδίου <i>lonp-1</i> επηρεάζει τη μιτοχονδριακή δομή και πρωτεϊνική ομοιόσταση στο νηματώδη.....	48
3.4	Επαγωγή του UPR ^{mt} στα <i>lonp-1</i> σκουλήκια.....	51
3.5	Επίδραση συστατικών του UPR ^{mt} στη διάρκεια ζωής του νηματώδη	55
3.5	Τα μεταλλάγματα <i>lonp-1</i> είναι ανθεκτικά στο θερμικό σοκ.....	58
3.6	Η LONP-1 ρυθμίζει τη μετατόπιση του DAF-16.....	59
	Κεφάλαιο 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
	Κεφάλαιο 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια σχηματίστηκαν πριν από περίπου δύο δισεκατομμύρια χρόνια με την εγκόλπωση ενός α-πρωτεοβακτηρίου, που μπορούσε να απελευθερώνει ενέργεια από την τροφή, σε ένα πρόδρομο του σύγχρονου ευκαρυωτικού κυττάρου. Το βακτήριο αυτό αντί να αποικοδομηθεί, έζησε στο κύτταρο-ξενιστή σε μια μορφή ενδοσυμβίωσης και έγινε το μιτοχόνδριο του κυττάρου. Η επακόλουθη εξέλιξη διαμόρφωσε τη σχέση μεταξύ των μιτοχονδρίων και των κυττάρων-ξενιστών τους, οδηγώντας σε υψηλό βαθμό μορφολογικής και λειτουργικής εξειδίκευσης στο οργανίδιο [1].

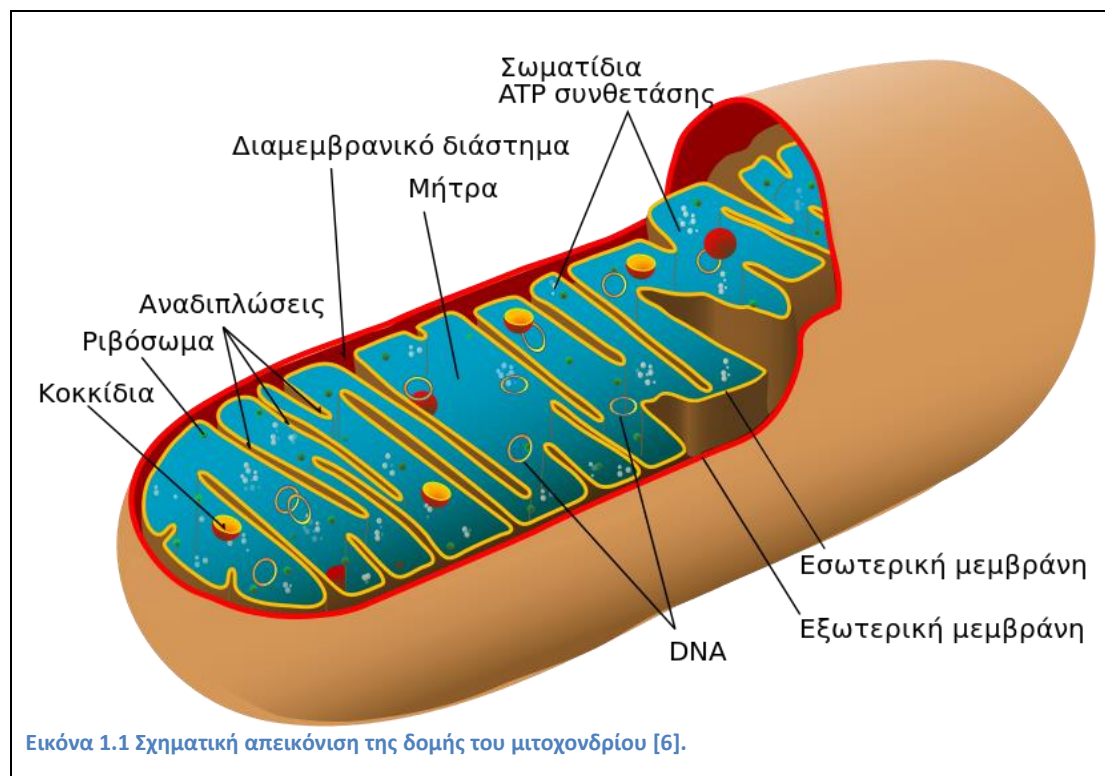
Τα μιτοχόνδρια καταλαμβάνουν σημαντικό τμήμα του κυτταροπλασματικού όγκου των ευκαρυωτικών κυττάρων (18-20%) και μπορούν να θεωρηθούν οι γεννήτριες ισχύος του κυττάρου, παράγοντας από τη διάσπαση των υδατανθράκων και των λιπαρών οξέων τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) μέσω της διεργασίας της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης. Το ATP είναι το ενεργειακό «νόμισμα» του κυττάρου που τροφοδοτεί τις μεταβολικές δραστηριότητές του. Αυτή η διαδικασία της αερόβιας αναπνοής δίνει τη δυνατότητα στα μιτοχόνδρια να παράγουν 15 φορές περισσότερο ATP σε σύγκριση με την αναερόβια αναπνοή, κάτι που είναι απαραίτητο για την επιβίωση πολύπλοκων οργανισμών όπως ο άνθρωπος[2]. Ευκαρυωτικά κύτταρα που θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους δεν μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί πολλές ασθένειες που οφείλονται στα μιτοχόνδρια (γνωστές ως μιτοχονδριοπάθειες), οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στα μεταβολικά νοσήματα.

1.1.1 Δομή και λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια είναι επιμήκη, σφαιρικά ή ωσειδή οργανίδια, τα οποία κυμαίνονται σε μήκος μεταξύ 1 και 10 μικρομέτρων και εμφανίζονται σε αριθμούς που συσχετίζονται άμεσα με το επίπεδο μεταβολικής δραστηριότητας του κυττάρου. Είναι αρκετά ευέλικτα, αλλάζουν σχήμα γρήγορα και μετακινούνται συνεχώς στο κύτταρο δημιουργώντας ένα δυναμικό δίκτυο, το μιτοχονδριακό δίκτυο. Στο κυτταρόπλασμα ακολουθούν τις δομές των μικροσωληνίσκων, που σε συνεργασία με κινητήριες πρωτεΐνες, μετακινούν και διανέμουν τα μιτοχόνδρια στο κύτταρο. Οπότε το μιτοχονδριακό δίκτυο σε κάποια κύτταρα οργανώνεται σε μορφή αλυσίδων, ενώ σε άλλα κύτταρα τα μιτοχόνδρια συσκευάζονται σφιχτά σε σχετικά σταθερές θέσεις με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις βάσει των αναγκών του κυττάρου (π.χ. κοντά στις συνάψεις νευρώνων) [2, 3]. Η τρέχουσα θεωρία προτείνει ότι η μιτοχονδριακή μορφολογία διατηρείται από δύο αντιτιθέμενες διεργασίες, τη σχάση και τη σύντηξη, οι οποίες αναλόγως της σχετικής υπεροχής τους, καθορίζουν τη συνολική συνδεσιμότητα και τις δομικές ιδιότητες του δικτύου[4,5].

Η πολύπλοκη δομή ενός μιτοχονδρίου είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία του οργανιδίου. Κάθε μιτοχόνδριο περικλείεται από μια εξωτερική μεμβράνη ενώ μια δεύτερη, εσωτερική, μεμβράνη σχηματίζει πολυάριθμες αναδιπλώσεις (*cristae*). Το μιτοχόνδριο διαιρείται με αυτό τον τρόπο στον εσωτερικό χώρο του μιτοχονδρίου, που ονομάζεται μήτρα ή στρώμα (*matrix*) και περικλείεται από τα *cristae*, και τον ενδιάμεσο διαμεμβρανικό χώρο που είναι απαραίτητος για την επικοινωνία των δύο μεμβρανών. Η εξωτερική μεμβράνη ενός μιτοχονδρίου περιέχει πολλούς διαύλους που σχηματίζονται από την πρωτεΐνη πορίνη και εμφανίζει υψηλή διαπερατότητα σε μικρά μόρια, φιλτράροντας μόρια που είναι πολύ μεγάλα. Η εσωτερική μεμβράνη είναι η κύρια θέση παραγωγής ATP και

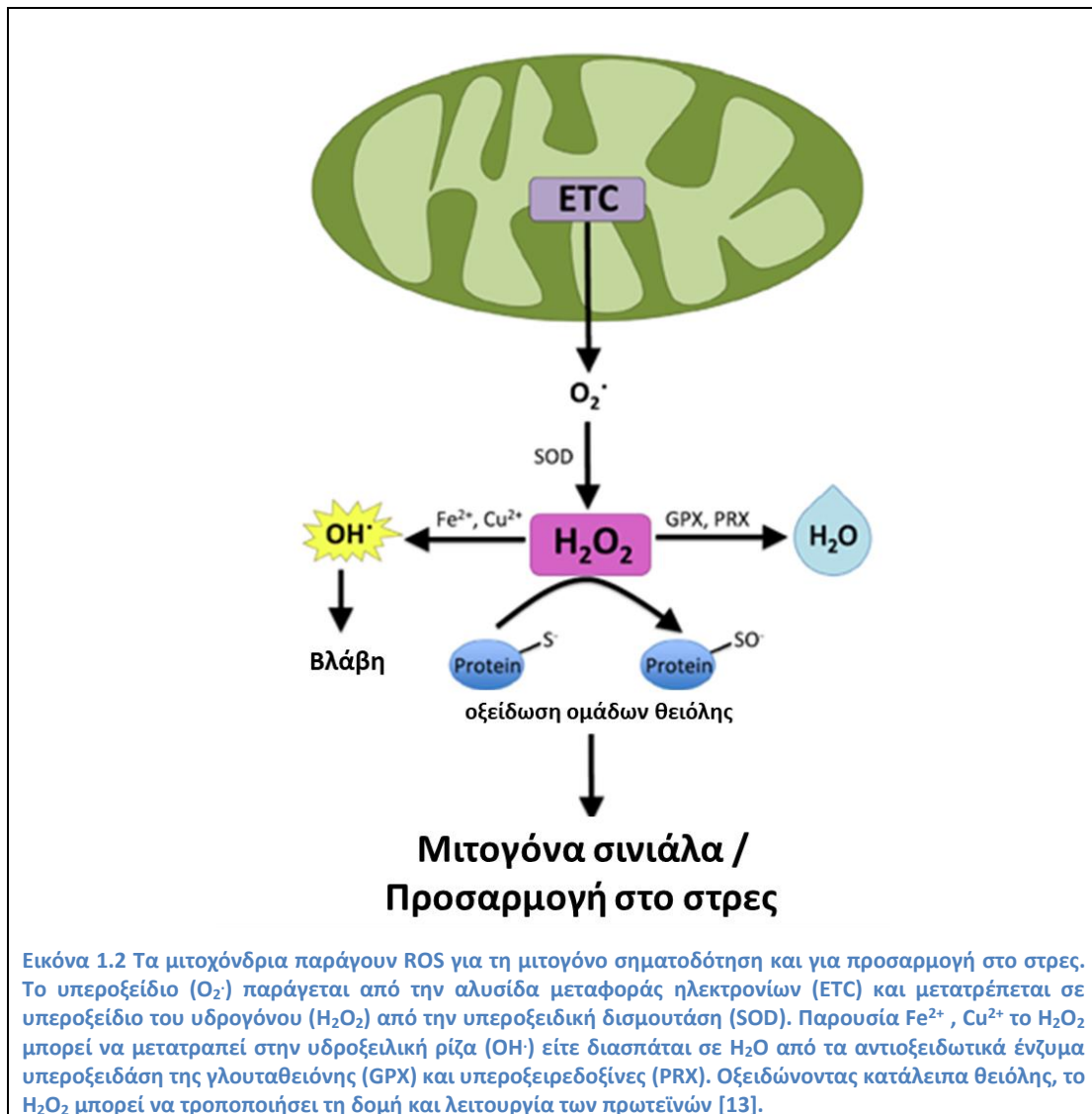
είναι πολύ πιο επιλεκτική στη διαπερατότητα από την εξωτερική μεμβράνη, διατηρώντας τη διαβάθμιση πρωτονίων που απαιτείται για την οξειδωτική φωσφορυλίωση [2].



Η μήτρα περιέχει το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων και τα ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs ή σε αντιδράσεις του οξειδωτικού μεταβολισμού. Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και διαθέτουν δικό τους DNA, διακριτό από το πυρηνικό, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Το γονιδίωμά τους είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια DNA και μπορεί να υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα (1-10) σε κάθε μιτοχόνδριο. Το μέγεθος του ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος κυμαίνεται στις 16 χιλιάδες ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί για 13 πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, δύο μόρια rRNA (12S και 16S) και 22 tRNA. Ωστόσο, οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (95%) κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα.

1.1.2 Οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων

Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (ETC) υπάρχουν διαρροές ηλεκτρονίων λόγω ατελούς αναγωγής του οξυγόνου [7] και δημιουργούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου O_2^- , που μετατρέπονται γρήγορα σε H_2O_2 [8, 9]. Μ' αυτόν τον τρόπο, τα μιτοχόνδρια αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές πηγές παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) στους αερόβιους οργανισμούς. Το H_2O_2 δημιουργείται στα κύτταρα, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά η συγκέντρωσή του εντός των κυττάρων μπορεί να αυξηθεί σημαντικά σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις [10, 11]. Οι δύο κύριες πηγές δημιουργίας του στα κύτταρα είναι η οικογένεια των NADPH οξειδασών (NOX enzymes) και τα μιτοχόνδρια [12].



1.1.2.1 Δημιουργία και ρύθμιση των δραστικών μορφών οξυγόνου

Η δημιουργία ROS στα μιτοχόνδρια οφείλεται στην οξείδωση ενδιάμεσων προϊόντων της αναπνευστικής αλυσίδας και ρυθμίζεται αυστηρά ώστε να αποφευχθεί οξειδωτική βλάβη των κυτταρικών διεργασιών, καθώς μπορούν να δημιουργήσουν βλάβες σε πολλά μακρομόρια όπως λιπίδια και πρωτεΐνες. Οι μιτοχονδριακές ROS (mtROS) παράγονται στο ETC με τη μορφή υπεροξειδίου, με το σύμπλοκο I να θεωρείται ως η κύρια πηγή τους, παρότι είναι δύσκολο να συσχετίσουμε τη δημιουργία τους με συγκεκριμένο σύμπλοκο του ETC *in cellulo* [14]. Η εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τις ROS έχει συνδεθεί με την πρόωρη γήρανση και την ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με αυτή. Τα μετα-μιτωτικά κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις όσο αυξάνεται η ηλικία. Ο ρυθμός συσσώρευσής τους αυξάνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες [15] ή υπό οξειδωτικό στρες [16].

Κύριοι παράγοντες στη ρύθμιση των mtROS είναι οικογένειες αντιοξειδωτικών ενζύμων που δεσμεύουν και εξαλείφουν την περίσσεια ROS. Τρεις υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs) διευκολύνουν τη μετατροπή των ριζών υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το SOD1 βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο καθώς και στο κυτοσόλιο [17], το SOD2 στοχεύει

στη μιτοχονδριακή μήτρα [18] και το SOD3 είναι ακινητοποιημένο στην εξωκυττάρια μήτρα [19]. Μετά τη μετατροπή του υπεροξειδίου στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, η καταλάση, οι περοξυρεδοξίνες και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης εκτελούν μια τελική βαθμίδα αναγωγής για να μετατρέψουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό.

1.1.2.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου ως μόρια σηματοδότησης

Ωστόσο οι mtROS, εκτός από παραπροϊόντα βλαβερά για το κύτταρο, συμβάλλουν και σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικής απόκρισης [20] όπως η προσαρμογή στην υποξία [21], η κυτταρική διαφοροποίηση [22], η αυτοφαγία [23], η φλεγμονή [24] και η ανοσοαπόκριση [25]. Η υπερπαραγωγή των mtROS μπορεί να συμβεί απουσία μόλυνσης και εμπλέκονται στην ανάπτυξη όγκων [26] και στην υπέρταση [27, 28]. Ενώ οι ρόλοι για μιτοχόνδρια και mtROS στις ανοσολογικές αποκρίσεις αρχίζουν να είναι καλά τεκμηριωμένοι, ο μηχανιστικός δεσμός μεταξύ της ανοσολογικής σηματοδότησης και της παραγωγής mtROS δεν είναι ακόμη σαφώς κατανοητός.

Σύμφωνα με τη θεωρία οξειδοαναγωγής (redox relay) αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η περοξυρεδοξίνη (PRX) ή η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος του υπεροξειδίου του υδρογόνου προς τα υποστρώματα-στόχους του [29]. Επιπλέον, το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να τροποποιεί τη δομή ή/και τη λειτουργία πρωτεϊνών ώστε να επηρεάσει μία πληθώρα σηματοδοτικών καταρρακτών [13, 30].

1.2 Μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου

Λόγω της μεγάλης συνεισφοράς των μιτοχονδρίων στη δημιουργία μορίων ATP και του σημαντικού ρόλου τους σε κυτταρικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων της ομοιόστασης ασβεστίου, της παραγωγής ROS, της απόπτωσης, της αυτοφαγίας και του μεταβολισμού αμινοξέων, λιπιδίων και γλυκόζης, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σχετίζεται με πολλούς τύπους ασθενειών [31, 32]. Επομένως είναι κρίσιμος ο ποιοτικός τους έλεγχος μέσω ενδο- και διακυτταρικών μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου. Ο ενδοκυτταρικός ποιοτικός έλεγχος αποτελείται από τη βιογένεση, τη σύντηξη και σχάση και την αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων, ενώ οι διακυτταρικοί μηχανισμοί συντελούνται από νανοσωληνές σήραγγες (TNTs, tunneling nanotubes) και εξωκυτταρικά κυστίδια (εξωσώματα) [33].

Βάσει της ειδικής σχέσης των μιτοχονδρίων με το κύτταρο-ξενιστή, υπάρχουν δύο επίπεδα ποιοτικού ελέγχου σε περίπτωση συσσώρευσης πολυπεπτιδίων που έχουν υποστεί βλάβη. Αρχικά υπάρχει το ενδογενές μιτοχονδριακό ποιοτικό σύστημα ελέγχου πρωτεϊνών (Protein Quality Control, PQC) που προσπαθεί να επιδιορθώσει το πρόβλημα σε μοριακό επίπεδο. Εάν αυτό το σύστημα κατακλυστεί, υπάρχουν τρεις μορφές αντιδράσεων σε κυτταρικό επίπεδο που μπορούν να επηρεάσουν ολόκληρο το οργανίδιο, απαιτώντας εξειδικευμένες αντιδράσεις σηματοδότησης μεταξύ οργανιδίου και κυττάρου: (i) μέσω μίας διαδικασίας ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων για να επαναφέρουν την πρωτεϊνική ομοιόσταση του μιτοχονδρίου που ονομάζεται μιτοχονδριακή απόκριση στις μη ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (UPR^{mt}, Mitochondrial Unfolded Protein Response), τα κύτταρα προσπαθούν να αυξήσουν την ικανότητα αποκατάστασης των πολυπεπτιδίων (ii) μέσω μίας ειδικής μορφής αυτοφαγίας, τη μιτοφαγία, τα κύτταρα αφαιρούν τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια εάν έχουν συσσωρευτεί λόγω σοβαρής βλάβης (iii) σε περίπτωση που η κυτταρική βλάβη που

προκαλείται από τα μιτοχόνδρια είναι πολύ σοβαρή, το κύτταρο μπορεί να προκαλέσει τη δική του απομάκρυνση με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση [34].

1.2.1 Μιτοχονδριακός ποιοτικός έλεγχος πρωτεϊνών

Η συσσώρευση κακώς ή μη αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στο κύτταρο συνήθως αντιμετωπίζεται αρχικά μέσω τσαπερονών (μοριακών συνοδών), που αποτελούν τον κύριο επιδιορθωτικό μηχανισμό του κυττάρου. Σε περίπτωση που αυτός ο μηχανισμός αποτύχει, πρωτεΐνες που αποτυγχάνουν να ωριμάσουν ή να αναδιπλωθούν σωστά, καθώς και αν οξειδωθούν ή μετουσιωθούν, αποικοδομούνται από μιτοχονδριακές πρωτεάσες.

Για την αποτελεσματική αναδίπλωση και συναρμολόγηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, τα μιτοχόνδρια έχουν ένα ευρύ φάσμα μοριακών τσαπερονών στο διαμεμβρανικό χώρο και στη μήτρα [35, 36]. Η πρωτεΐνη θερμικού στρες Hsp60 βρίσκεται στη μήτρα και αποτελείται από δύο υπομονάδες, τις Hsp60 και Hsp10, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο σε σχήμα βαρελιού όπου αναδιπλώνει κυρίως μικρές, διαλυτές, μονομερείς πρωτεΐνες [37-39]. Σε συνεργασία με την Hsp60, η μιτοχονδριακή Hsp70 (mtHsp70) είναι ουσιώδης για την αναδίπλωση των πρόσφατα εισαγόμενων πρωτεϊνών που έχουν πιο αυστηρές απαιτήσεις αναδίπλωσης [40]. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν επίσης μια ισομορφή της Hsp90 γνωστή ως TRAP-1 (TNF receptor-associated protein 1) η οποία πιστεύεται ότι προάγει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών με τρόπο παρόμοιο με τις κυτταροπλασματικές ισομορφές της Hsp90 [41, 42].

Επιπροσθέτως, τα μιτοχόνδρια έχουν αρκετές πρωτεάσες ποιοτικού ελέγχου που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν όσες πρωτεΐνες αποτυγχάνουν να αναδιπλωθούν ή να συναρμολογηθούν σωστά. Αυτές ονομάζονται ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες (AAA⁺, ATPase Associated with diverse cellular Activities) και εντοπίζονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Μία από τις πιο σημαντικές είναι η πρωτεάση Lon (ομόλογη της PIM1 στη ζύμη) που μέσω πρωτεόλυσης απομακρύνει κυρίως πολυπεπτίδια με χαμηλή σταθερότητα διαμόρφωσης και θα αναλυθεί περαιτέρω στη συνέχεια. Ακόμη μία σημαντική πρωτεάση είναι η ClpX (ομόλογη της βακτηριακής Clp) που για να αποικοδομήσει την πρωτεΐνη-υπόστρωμά της απαιτείται πρώτα να βρεθεί η πρωτεΐνη σε μη αναδιπλωμένη μορφή από την Hsp100. Αποτελείται από δύο δομικά υποσυμπλέγματα, την καζεϊνολυτική πεπτιδάση P (ClpP), με δράση πρωτεάσης, που συμπλοκοποιείται με τη μιτοχονδριακή τσαπερόνη ClpX, με δράση ΑΤΡάσης, σχηματίζοντας τη λειτουργική πρωτεάση [43]. Τέλος, υπάρχουν οι πρωτεάσες m-AAA και i-AAA (ομόλογες πρωτεάσες της βακτηριακής FtsH) και εξειδικεύονται στην εξαγωγή πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης και στην αποικοδόμησή τους [34].

1.2.1.1 Η πρωτεάση Lon

Η ανθρώπινη μιτοχονδριακή πρωτεάση Lon είναι υψηλά συντηρημένη, παρούσα στα περισσότερα βακτηριακά είδη, στα αρχαία και στα ευκαρυωτικά κύτταρα καθώς και στα περισσότερα ευκαρυωτικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και τα υπεροξεισώματα [44]. Είναι ομόλογη της βακτηριακής La και της PIM1/Lon στη ζύμη. Η έκφρασή της είναι ζωτικής σημασίας στα θηλαστικά καθώς ομόζυγη διαγραφή της προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα [45]. Για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας της, έχουν γίνει μεταλλάξεις που μεταβάλλουν τη φυσιολογική λειτουργία της και που οδήγησαν

στο συμπέρασμα ότι σχετίζεται με πολλαπλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις στους ανθρώπους, όπως η γήρανση, ο καρκίνος και ο νευροεκφυλισμός [46].

Η ανακάλυψη

Από το 1982 υπήρχαν ενδείξεις για την παρουσία στη μήτρα μιτοχονδρίων, ποικίλων οργάνων θηλαστικών, μιας πρωτεολυτικής δραστικότητας εξαρτώμενη από ATP. Η πρωτεάση υπεύθυνη για αυτή τη δραστικότητα βρέθηκε ότι είναι ένα ομοπρωτεϊνικό εξαμερές σύμπλοκο 600-650kDa, που εκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς με τα υψηλότερα επίπεδά του να βρίσκονται κυρίως στα πιο μεταβολικώς ενεργά όργανα (καρδιά, εγκέφαλο, ήπαρ και σκελετικούς μύες) [47]. Υπάρχουν δύο μορφές της πρωτεάσης LON, η μιτοχονδριακή LONP1 και η υπεροξεισωματική LONP2, που ενεργοποιούνται από διαφορετικά πυρηνικά γονίδια και ρυθμίζονται ανεξάρτητα [48].

Η δομή

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μιτοχονδριακή LON εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 και παράγει πρωτεΐνη που αποτελείται από 963 αμινοξέα μοριακού βάρους 106 kDa [47]. Αποτελείται από μία μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης (MTS), την αμινοτελική περιοχή (N domain) που είναι απαραίτητη για τη σύνδεση του υποστρώματος, την περιοχή σερίνης-πρωτεάσης (P domain) και ένα Walker A και B μοτίβο δέσμησης ATP που εμπλέκεται στη δέσμηση νουκλεοτιδίων και στην υδρόλυση των μορίων ATP [49]. Μετά την εισαγωγή του πεπτιδίου τη μιτοχονδριακή μήτρα, αποκόπτεται το MTS και δημιουργείται η ώριμη μορφή της πρωτεΐνης που έχει τελικό μοριακό βάρος 100 kDa [47]. Η κρυσταλλική δομή της προκαρυωτικής (*Escherichia coli*) πρωτεΐνης LON δείχνει ότι δημιουργεί εξαμερή που συγκροτούν έναν κύλινδρο με έναν μεγάλο κεντρικό θάλαμο στον οποίο πραγματοποιούνται οι αναδιπλώσεις και αποικοδομήσεις άλλων πρωτεϊνών [50]. Η δομή της πρωτεολυτικής περιοχής της ανθρώπινης LON προσομοιάζει αυτή της βακτηριακής, οπότε προτείνεται πως σχηματίζει και αυτή ένα εξαμερές σύμπλοκο.

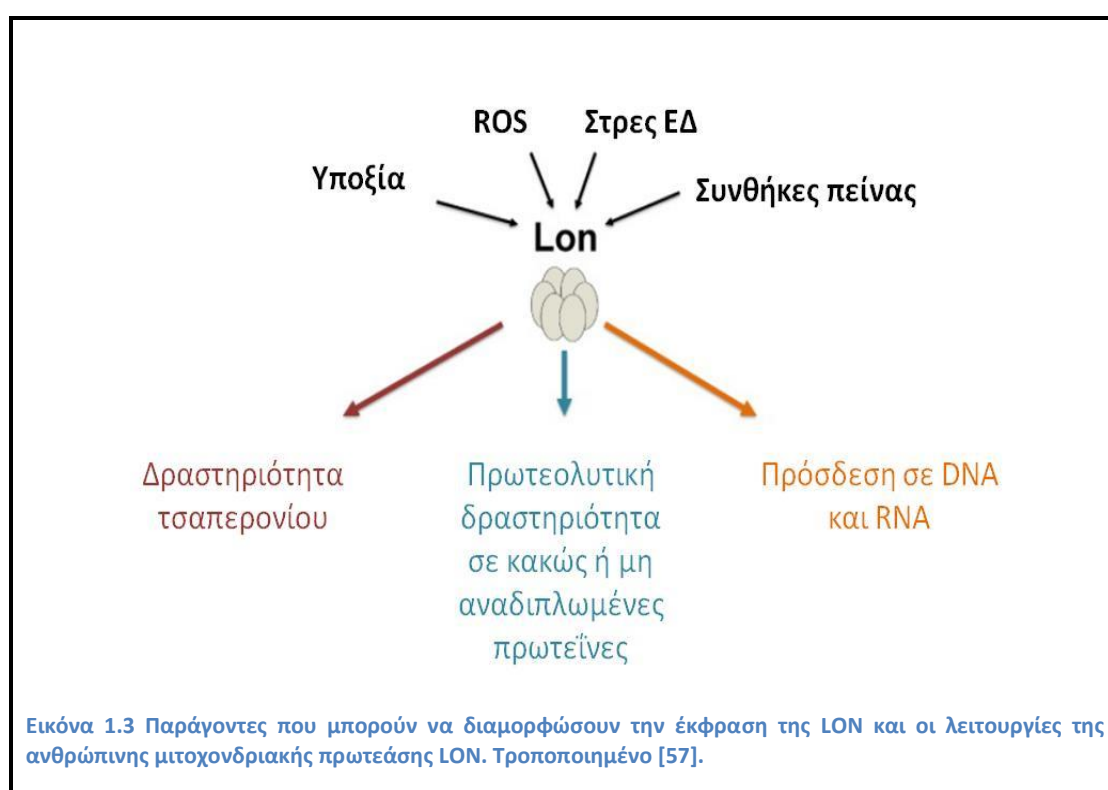
Η ρύθμιση

Η μιτοχονδριακή LON ανήκει στις σημαντικότερες κυτταρικές πρωτεΐνες που ανταποκρίνονται στο στρες καθώς στρεσογόνοι παράγοντες όπως το θερμικό σοκ, η πείνα και το οξειδωτικό στρες οδηγούν στην αυξορρύθμισή της [51]. Ωστόσο χρόνιες και σοβαρές στρεγόνες καταστάσεις όπως η γήρανση, η εκτεταμένη υποξία και το παρατεταμένο οξειδωτικό στρες, οδηγούν σε μειορύθμιση της Lon υποδηλώνοντας ένα διττό ρόλο στη ρύθμισή της. Ως εκ τούτου προτείνεται ότι η Lon είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη γήρανση και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες [52].

Η LON έχει περιοχές στον υποκινητή της για την πρόσδεση αρκετών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφρασή της. Ο πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας 2 (NRF-2, Nuclear Respiratory Factor 2) είναι απαραίτητος για την απόκριση σε ενεργές ρίζες οξυγόνου [53] και η ικανότητά του να ρυθμίζει την έκφραση της LON τον καθιστά ένα βασικό παράγοντα προαγωγής της έκφρασης κύριων συστατικών του μηχανισμού αντιγραφής και μεταγραφής μιτοχονδριακού DNA, καθώς και γονιδίων που κωδικοποιούν για υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας [54]. Υπάρχει επίσης μία θέση δέσμησης για

τον πυρηνικό παράγοντα-ελαφράς-αλύσου-ενισχυτή ενεργοποιημένων Β κυττάρων (NF-κΒ, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) που ενισχύει την υπόθεση ότι η LON είναι πρωτεΐνη στρες-ρυθμιζόμενη και πως συμμετέχει στην ογκογένεση, διαδικασία που περιλαμβάνει μονοπάτια που ρυθμίζονται από τον NF-κΒ [51]. Η έκφραση της LON εξαρτάται επίσης από τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα (HIF-1) και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) μέσω δύο μονοπατιών i) της ρυθμιζόμενης από εξωκυτταρικά μηνύματα πρωτεϊνικής κινάσης (ERK) και ii) της φωσφατιδυλο-ινοσιτολικής κινάσης 3 (PI3K) [55]. Μετα- μεταφραστικά η LON ρυθμίζεται από την NAD⁺εξαρτώμενη αποακετυλάση σιρτουΐνη, με την αποσιώπησή της να προκαλεί αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης LON όχι όμως και των επιπέδων έκφρασής της [56].

Η LON μπορεί να λειτουργήσει ως πρωτεάση, ως τσαπερόνη αλλά και ως πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο μιτοχονδριακό DNA.



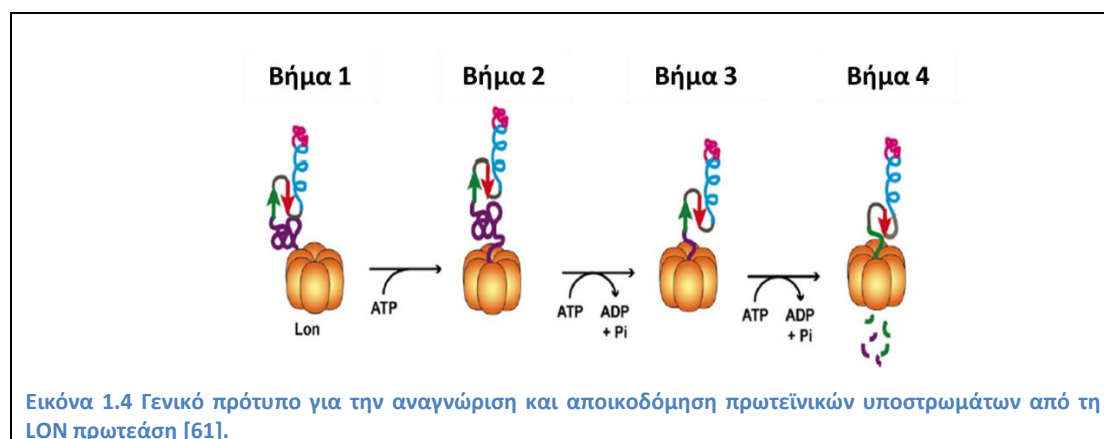
Δράση ως πρωτεάση

Η πρωτεολυτική δραστηριότητα της LON ήταν η πρώτη λειτουργία της που ανακαλύφθηκε όταν εντοπίστηκε στα μιτοχόνδρια κυττάρων μία ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση που αποικοδομούσε την οξειδωμένη μιτοχονδριακή ακονιτάση [58]. Η δράση της αν και διατηρείται απουσία ATP, διεγείρεται έως και 9 φορές περισσότερο παρουσία ATP αρκεί τα μόριά του να έχουν υδρολυθεί. Η LON μπορεί να αποικοδομήσει τα υποστρώματά της είτε είναι σε διπλωμένη είτε αναδιπλούμενη κατάσταση με προτίμηση τις πρωτεΐνες που δεν έχουν συναρμολογηθεί [59]. Στην περίπτωση λειτουργικών και σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, η διάσπαση ξεκινάει κατά προτίμηση μεταξύ των υδροφοβικών αμινοξέων που

βρίσκονται σε υψηλά φορτισμένο περιβάλλον, ενώ οι επακόλουθες διασπάσεις προχωρούν κατά μήκος της πρωτοταγούς πολυπεπτιδικής αλυσίδας [59].

Πολύ σημαντική λειτουργία της LON είναι η διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης των μιτοχονδρίων, αναγνωρίζοντας και αποικοδομώντας οξειδωμένες πρωτεΐνες. Οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες είναι σε συνεχή επαφή με ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από την αναπνευστική αλυσίδα οπότε όσες οξειδώνονται πρέπει να απομακρύνονται και να αντικαθιστούνται γρήγορα πριν συσσωρευτούν και προκαλέσουν τοξικότητα [60]. Η πρωτεολυτική δράση της LON είναι συντηρημένη από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο, καθώς η μειορύθμιση της LON σε κύτταρα ζύμης και θηλαστικών οδηγεί σε συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, ενώ η λειτουργία της στη ζύμη διασώνεται από τη βακτηριακή ομόλογη πρωτεΐνη [10].

Το γενικό πρότυπο που ισχύει για την ATP-εξαρτώμενη πρωτεόλυση πιθανώς εφαρμόζεται και στην πρωτεάση LON (Εικ. 1.4). Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αναγνώριση από την αμινοτελική περιοχή και την AAA⁺ περιοχή και δέσμευση συγκεκριμένων θέσεων αναγνώρισης ενός πρωτεϊνικού υποστρώματος με τρόπο μη-εξαρτώμενο από ATP. Στο δεύτερο βήμα, η δέσμευση και υδρόλυση του ATP προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζυμικού συμπλόκου που ξεδιπλώνουν τα πολυπεπίδια-υποστρώματα και στη συνέχεια (τρίτο βήμα) εξουσιοδοτούν τη μετατόπιση των μετουσιωμένων υποστρωμάτων στον πρωτεολυτικό θάλαμο που απομονώνεται από το υδατικό περιβάλλον. Αφού το υπόστρωμα έχει ξεδιπλωθεί και είναι προσβάσιμο στις πρωτεολυτικά ενεργές θέσεις, τότε ακολουθεί το τέταρτο βήμα, η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού [61].



Εικόνα 1.4 Γενικό πρότυπο για την αναγνώριση και αποικοδόμηση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων από τη LON πρωτεάση [61].

Οι στόχοι της LON που έχουν ταυτοποιηθεί είναι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που εμπλέκονται είτε σε βιοενεργειακές διαδικασίες του μιτοχονδρίου είτε στην προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης είτε στη διατήρηση του μιτοχονδριακού DNA. Μερικές από αυτές είναι η αναγωγή αδρενοντοξίνης με το κυτόχρωμα P-450sc, η αναγωγή της θειορεδοξίνης και η οξειδωμένη ακονιτάση που σχετίζεται με τη γήρανση αλλά και διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Σημαντικό ακόμη υπόστρωμα είναι ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM) που ρυθμίζει τον αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA στα θηλαστικά ενώ η LON συμμετέχει επίσης στο μονοπάτι του παράγοντα επαγόμενου από την υποξία (HIF-1) [61].

Δράση ως τσαπερόνη

Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έχουν ταυτοποιήσει 76 διαφορετικές μιτοχondριακές πρωτεΐνες που δεσμεύουν τη LON. Μερικές από αυτές είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP60, mtHSP70, η μυοσΐνη-9/10, η πρωτοκαδερίνη-18 και η οξειδοαναγωγή του NADH (NDUFS8). Η LON συνεισφέρει στη σταθερότητα του συμπλόκου HSP60- mtHSP70 και προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση λόγω περιβαλλοντικού στρες μέσω αλληλεπίδρασης με τη HSP60 και σταθεροποιώντας τη [62].

Δράση ως πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο μιτοχondριακό DNA

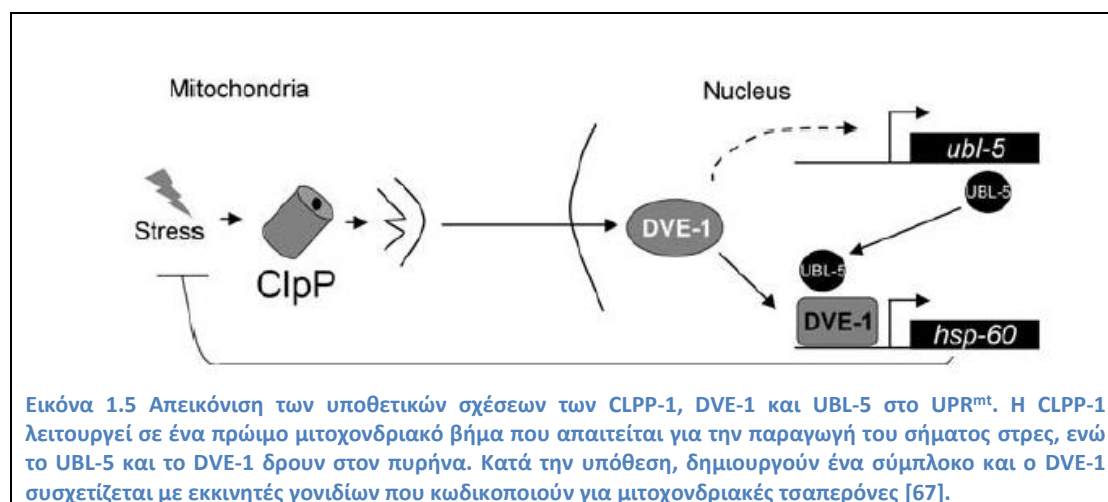
Αρχικά είχε προταθεί πως η LON ίσως εμπλέκεται στον έλεγχο του αριθμού των μιτοχondρίων στο κύτταρο ή στην έκταση του δικτύου τους και η υπερέκφρασή της είχε βρεθεί σε κύτταρα με αυξημένη βιογένεση μιτοχondρίων όπως σε ηπατικούς όγκους [63]. Είναι πλέον γνωστό πως η ανθρώπινη LON δεσμεύεται σε μιτοχondριακούς εκκινητές και ίσως ελέγχει την μεταγραφή και μετάφραση του mtDNA, αποικοδομώντας ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην διατήρηση του mtDNA. Επιπλέον σχετίζεται με mtDNA αλληλουχίες που έχουν τουλάχιστον τέσσερα κατάλοιπα συνεχόμενων γουανινών. Η LON του ποντικού δεσμεύει συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια μονόκλωνου DNA και όχι δίκλωνου [64]. Αν και σε ανθρώπινους ινοβλάστες καθώς και σε καρκίνο του εντέρου, η μειορύθμιση της LON επιφέρει απώλεια mtDNA, δεν έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό αντιγράφων του mtDNA σε άλλες μελέτες με κυτταρικές σειρές καρκίνου του εντέρου (LS174T) [65].

1.2.1.2 Η ClpP-1 πρωτεάση

Η καζεΐνολυτική πεπτιδάση P (ClpP) είναι μία υψηλά συντηρημένη πρωτεάση ποιοτικού ελέγχου από τα βακτήρια έως τους ανθρώπους. Αν και δεν έχει δραστηριότητα ATPάσης, συμπλοκοποιείται με τη μιτοχondριακή τσαπερόνη και ATPάση, ClpX για να σχηματίσει τη λειτουργική πρωτεάση ClpXP. Στο νηματώδη η ClpP (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *clpp-1*) κατέχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του UPR^{mt}, ένα σηματοδοτικό μονοπάτι απόκρισης για τη διατήρηση της μιτοχondριακής πρωτεϊνικής ομοιόστασης που θα αναλυθεί στην επόμενη παράγραφο. Τα πεπτίδια που δημιουργούνται από την πρωτεολυτική διάσπαση των κακώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών από τη CLPP-1, είναι που δίνουν το έναυσμα του UPR^{mt} στον *C. elegans*. Στα θηλαστικά, η συσσώρευση κακώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στη μιτοχondριακή μήτρα οδηγεί στην αυξορύθμιση μιτοχondριακών τσαπερονών και της ClpP. Αν και ο ρόλος της ClpP στο UPR^{mt} των θηλαστικών δεν έχει διευκρινισθεί, προτείνεται ένας παρόμοιος μηχανισμός απελευθέρωσης πεπτιδίων με τον *C. elegans*. Εκτός από το ρόλο της στο UPR^{mt}, εμπλέκεται και σε άλλες μιτοχondριακές λειτουργίες καθώς γονιδιακή αποσιώπησή της (knockdown) σε μυϊκά κύτταρα προκαλεί μιτοχondριακή δυσλειτουργία και μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επιπλέον συμμετέχει στη ρύθμιση της μιτοχondριακής πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω μιτοχondριακών ριβοσωμάτων. Οι υπολειπόμενες μεταλλάξεις στη ClpP προκαλούν το σύνδρομο Perrault σε ανθρώπους, που χαρακτηρίζεται από αισθητήρια κώφωση και ωθηκική ανεπάρκεια [66].

Μελέτες αποσιώπησης του γονιδίου *clpp-1* μέσω παρεμβολής του RNA (RNAi, RNA interference) στο νηματώδη [67], έδειξαν επαγωγή του διαγονιδίου *hsp60p::gfp* υπό

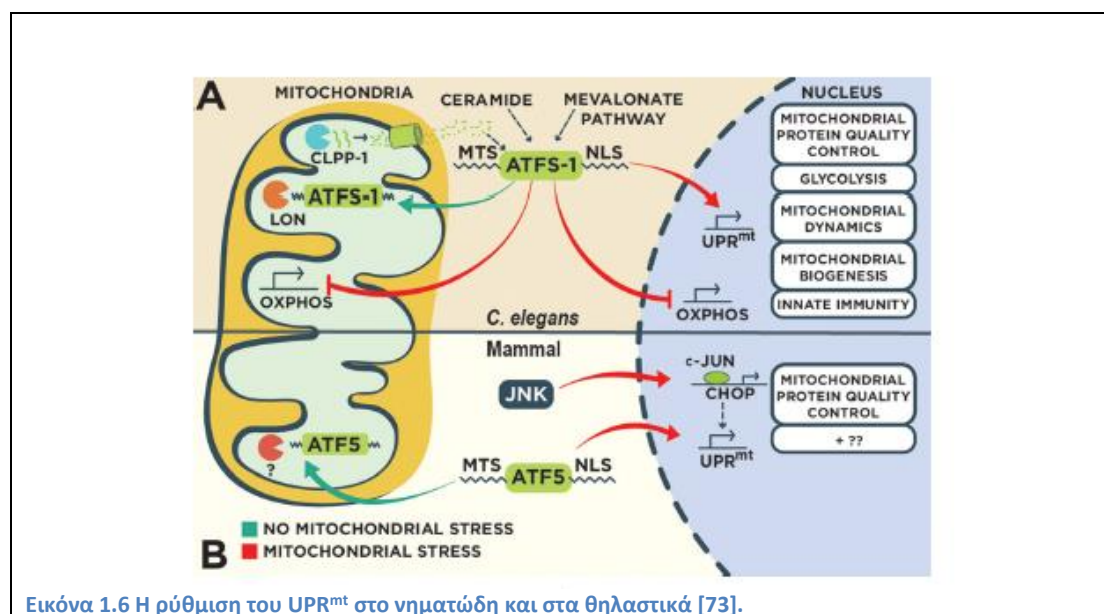
μιτοχονδριακό στρες και διαταραγμένη μιτοχονδριακή μορφολογία, που συμφωνεί με τα υψηλά επίπεδα κακώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών λόγω στρες στα οργανίδια ζώων που τους λείπει η ClpP. Η κύρια διαφορά της πρωτεάσης CLPP-1 του *C. elegans* από της βακτηριακής, είναι μία αμινοτελική επέκταση υποδηλώνοντας μια ακολουθία στόχευσης μιτοχονδρίων. Προτείνεται ότι η CLPP-1 μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου εμπλέκεται στην επαγωγή μιτοχονδριακών τσαπερονών και δρα αναρροϊκά του UPR^{mt} (Εικ. 1.5) [67].



1.2.2 Μιτοχονδριακή απόκριση στις μη ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (UPR^{mt}, Mitochondrial Unfolded Protein Response)

Η μιτοχονδριακή απόκριση στις μη ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (UPR^{mt}) είναι ένα συντηρημένο μεταξύ θηλαστικών, νηματωδών και μυγών σηματοδοτικό μονοπάτι απόκρισης στο στρες που ανακαλύφθηκε σε κύτταρα θηλαστικών [68], αλλά μελετήθηκε αρκετά στον νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* (Εικ. 1.6). Το έναυσμα για την ενεργοποίηση του UPR^{mt} δίνεται από συνθήκες που αυξάνουν τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνική τοξικότητα, όπως ο εκφυλισμός του mtDNA, η μείωση της λειτουργίας των μιτοχονδριακών μηχανισμών ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών και η διατάραξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) [69, 70]. Ο ρόλος του UPR^{mt} είναι να διατηρήσει την πρωτεόσταση του μιτοχονδρίου ενεργοποιώντας την έκφραση μοριακών συνοδών και πρωτεασών που ελέγχουν την αναδίπλωση, συναρμολόγηση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Η διατάραξη της μιτοχονδριακής πρωτεόστασης από την έκφραση μίας κακώς αναδιπλωμένης πρωτεΐνης που εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο είναι ικανή να ενεργοποιήσει το UPR^{mt} [68]. Οι κακώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες κατακλύζουν τη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών τσαπερονών στη μήτρα, κάτι που είναι κρίσιμο για πολλαπλές μιτοχονδριακές δραστηριότητες όπως η εισαγωγή πρωτεϊνών. Οπότε η διαγραφή μιτοχονδριακών τσαπερονών ή πρωτεασών είναι επίσης ικανή να ενεργοποιήσει το UPR^{mt} [69]. Μέσω γενετικών προσεγγίσεων έχουν βρεθεί αρκετοί ρυθμιστές του UPR^{mt} όπως η μιτοχονδριακή πρωτεάση CLPP-1, η πρωτεΐνη τύπου ουβικιτίνης UBL-5, ο μεταγραφικός παράγοντας DVE-1, ο μιτοχονδριακός -με περιοχές δέσμησης ATP (ABC)- μεταφορέας HAF-1 και ο μοτίβου φερμουάρ λευκίνης (bZIP, Basic Leucine Zipper) μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1 [67, 71].

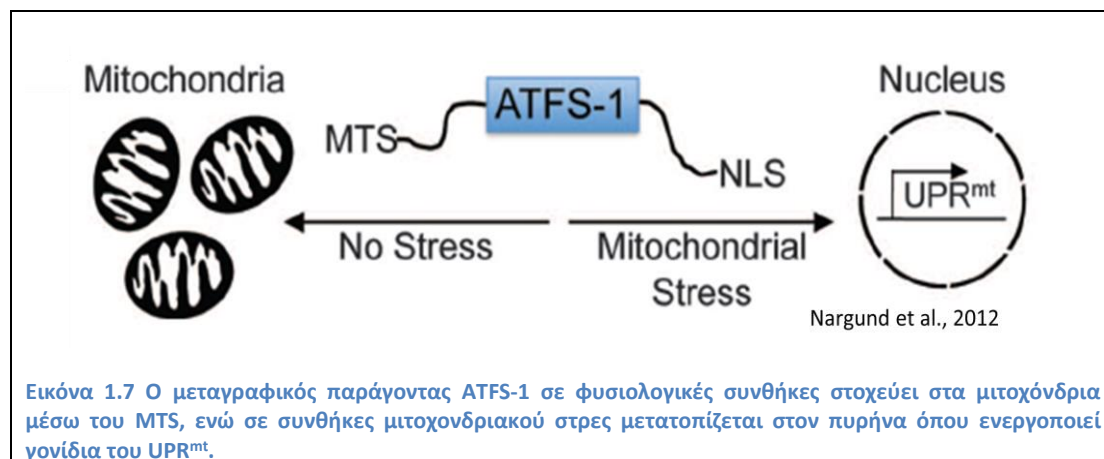
Η τρέχουσα θεωρία προτείνει ότι η CLPP-1 αποικοδομεί κατεστραμμένες ή πρωτεολυτικά κακώς αναδιπλωμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που οδηγούν σε συσσώρευση των παραγόμενων πεπτιδίων στη μήτρα του μιτοχονδρίου [67]. Η επακόλουθη απελευθέρωση των επαγόμενων πεπτιδίων στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα HAF-1 δίνει το έναυσμα σε καταρράκτες σηματοδότησης έξω από τα μιτοχόνδρια [67, 71]. Η συσσώρευση των πεπτιδίων στο κυτταρόπλασμα σε συνδυασμό με την εξασθενημένη μιτοχονδριακή εισαγωγή, που πιθανώς μεσολαβείται από τον HAF-1, οδηγεί στη μειωμένη εισαγωγή του ATFS-1 στο μιτοχόνδριο, που είναι ο κύριος ενεργοποιητής του UPR^{mt} [70, 71, 72, 73].



Εικόνα 1.6 Η ρύθμιση του UPR^{mt} στο ηλιατώδη και στα θηλαστικά [73].

Ο ATFS-1 εκτός από το σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού (NLS, Nuclear Localization Signal), που φέρουν όλοι οι bZIP παράγοντες, φέρει και μία αμινο-τελική ακολουθία στόχευσης στα μιτοχόνδρια (MTS, Mitochondrial Targeting Signal), γεγονός που επιτρέπει στο κύτταρο να αξιολογεί την κατάσταση του μιτοχονδριακού δικτύου βάσει της αποδοτικότητας της εισαγωγής πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια [70]. Καθώς ο ATFS-1 έχει σημαντικά ασθενέστερο MTS από τις μιτοχονδριακές τσαπερόνες και πρωτεάσες ίσως αυτό δρα ως αισθητήρας της αποτελεσματικότητας της μιτοχονδριακής εισαγωγής [69]. Σε κύτταρα με υγιές μιτοχονδριακό δίκτυο το MTS επικρατεί, οπότε ο ATFS-1 εισέρχεται στα μιτοχόνδρια όπου αποικοδομείται από τη πρωτεάση LON. Σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες, αυτή η διαταραχή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων μειώνει την εισαγωγή του ATFS-1 σε αυτά και ένα μέρος του παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Το NLS που φέρει ο ATFS-1 τον οδηγεί στον πυρήνα όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για προστατευτικά γονίδια όπως μιτοχονδριακές τσαπερόνες (HSP60 και mtHSP70) και πρωτεάσες, αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και συστατικά του μονοπατιού της γλυκόλυσης ώστε να επανέλθει η πρωτεϊνική ομοιοστάση [70]. Εκτός από γονίδια του πυρήνα, ο ATFS-1 δένεται και στο μιτοχονδριακό DNA και αλληλεπιδρά με εκκινητές γονιδίων του TCA κύκλου και της OXPHOS, υποδεικνύοντας ότι ρυθμίζει πολλαπλά μεταβολικά μονοπάτια [72, 74]. Για τη συντονισμένη έκφραση των OXPHOS γονιδίων, απαιτείται η ισορροπημένη μετακίνηση του ATFS-1 μεταξύ πυρήνα και μιτοχονδρίου [74]. Οι ATFS-1 και DVE-1 μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν καταρράκτες σηματοδότησης παράλληλων μονοπατιών αλλά

απαιτούνται και οι δύο για την ενεργοποίηση όλων των γονιδίων του UPR^{mt} [42]. Ο πυρηνικός συμπαράγοντας του DVE-1, LIN-65 και η μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης MET-2 αναδιοργανώνουν ενεργά τη δομή της χρωματίνης, πιθανώς επιτρέποντας στους ATFS-1 και DVE-1 να αλληλεπιδράσουν απευθείας με τους εκκινήτες των γονιδίων του UPR^{mt} [42, 70, 74, 75].



Η ενεργοποίηση του UPR^{mt} περιορίζει τη μεταγραφή γονιδίων συστατικών της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), πιθανώς για να μειωθεί το φορτίο κατά τη διάρκεια του στρες, στους διάφορους μηχανισμούς της πρωτεϊνικής ομοιόστασης. Ταυτόχρονα επάγονται όλα τα γονίδια της γλυκόλυσης, υπαινίσσοντας ότι η ενεργοποίηση του UPR^{mt} παίζει ρόλο στην ισορροπία του μεταβολισμού του κυττάρου κατά τη διάρκεια του μιτοχονδριακού στρες, προάγοντας εναλλακτικούς μηχανισμούς σύνθεσης ATP, για τη διευκόλυνση της μιτοχονδριακής ανάρρωσης [76].

1.3 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη γήρανση

Όπως η ενδοσυμβιωτική προέλευση των μιτοχονδρίων είναι συντηρημένη σε όλους τους ευκαρυώτες, προτείνεται ότι το ίδιο ισχύει και για τη μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Τα μιτοχόνδρια είναι αναγνωρισμένα τα οργανίδια που επηρεάζονται κυρίως από τη γήρανση, όπως ο ρυθμός αναπνοής τους, τα επίπεδα των ενζύμων τους, η συνολική μιτοχονδριακή μάζα και η μορφολογία τους. Με τη γήρανση μπορεί επίσης να συμβεί βλάβη στην οδό της μιτοφαγίας με αποτέλεσμα τη συσσώρευση κατεστραμμένων μιτοχονδρίων με μεταλλαγές στο μιτοχονδριακό DNA. Συνεπώς, η αυξημένη μιτοφαγία είναι προστατευτική για την υγεία του μιτοχονδρίου και σχετίζεται με μειωμένη κυτταρική γήρανση σε ποντίκια και ανθρώπους και αυξημένη διάρκεια ζωής στον *C. elegans* και στη *Drosophila* [77]. Σαρώσεις με RNAi μεγάλης κλίμακας στον *C. elegans*, αποκάλυψαν ότι η μεγαλύτερη τάξη γονιδίων που ρυθμίζουν τη διάρκεια ζωής είναι αυτά που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, με το μεγαλύτερο ποσοστό του να επηρεάζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ETC [78]. Μεταλλάξεις των γονιδίων ETC μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν το προσδόκιμο ζωής και σε αυτά που αυξάνεται η διάρκεια ζωής έχει παρατηρηθεί παράλληλη αύξηση των επιπέδων της μιτοχονδριακής σύντηξης. Τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικά οργανίδια που μπορούν να συντηχθούν ή να κατακερματιστούν (σύντηξη/σχάση), διαδικασίες απαραίτητες για τη

σωστή λειτουργία του μιτοχονδρίου. Καθώς επιτελείται η διαδικασία της γήρανσης στον *C. elegans*, τα μιτοχόνδριά του όλο και κατακερματίζονται [79].

Η ελάττωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης στους περισσότερους οργανισμούς και σχετίζεται με τη συσσώρευση μεταλλάξεων του mtDNA καθώς και με μειωμένα επίπεδα OXPLOS [80]. Παραδόξως, σημαντικά στοιχεία δείχνουν ότι οι ήπιες μιτοχονδριακές διαταραχές προκαλούν αυξημένη διάρκεια ζωής. Στον *C. elegans*, η δυσλειτουργία της λειτουργίας του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας (μέσω RNAi για το γονίδιο *cco-1*), ενεργοποιεί το UPR^{mt} και αυξάνει τη διάρκεια ζωής κατά 50% [81]. Είναι ενδιαφέρον ότι η διαμόρφωση της διάρκειας ζωής εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο κατά τη διάρκεια του οποίου η μιτοχονδριακή λειτουργία μειώνεται, δηλαδή η αυξημένη μακροζωία εμφανίζεται μόνο όταν το *cco-1(RNAi)* χορηγείται πριν την ενηλικίωση. Αυτό υποδηλώνει ότι η χρονική ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας συσχετίζεται με τη διάρκεια ζωής, πιθανώς λόγω των - επιγενετικού επιπέδου- αλλαγών κατά τη διάρκεια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης [76,81, 82].

Ο Harman αρχικά είχε προτείνει τη θεωρία της γήρανσης λόγω των ελευθέρων ριζών, όπου βλάβες από δραστικές μορφές οξυγόνου, που παράγονται ως υποπροϊόντα μεταβολισμού του μιτοχονδρίου, καθορίζουν το ρυθμό γήρανσης του οργανισμού [83]. Άλλες θεωρίες υποστηρίζουν πως η επαγωγή του UPR^{mt} μέσω αναστολής της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC), επηρεάζει άμεσα την επέκταση της διάρκειας ζωής [81]. Αποσιώπηση γονιδίων της ETC έχουν δείξει επαγωγή του UPR^{mt} στον *C. elegans* μέσω αυξορρύθμισης των μιτοχονδριακών γονιδίων *hsp-6* και *hsp-60*, που είναι μάρτυρες επαγωγής του UPR^{mt} [69, 81]. Επιπλέον, αποσιώπηση γονιδίων του UPR^{mt} με RNAi, μείωσε τη διάρκεια ζωής σκουληκιών αγρίου τύπου αλλά και ανείρεσε τη μακροζωία συγκεκριμένων μεταλλαγμάτων όπως το *isp-1* και *clk-1* [81]. Απρόσμενα όμως, πολλά RNAi που επάγουν το UPR^{mt} μειώνουν το προσδόκιμο ζωής και αρκετά από αυτά που αυξάνουν τη διάρκεια ζωής δεν προϋποθέτουν την ενεργοποίηση του UPR^{mt} καθώς επίσης ενεργοποίηση του UPR^{mt} απουσίας στρες, επίσης δεν αυξάνει τη διάρκεια ζωής [84]. Συμπερασματικά, το UPR^{mt} δεν είναι ούτε απαραίτητο ούτε επαρκές για να αυξήσει τη διάρκεια ζωής και προτείνεται πως η καταστολή της ETC αυξάνει τη διάρκεια ζωής παρά το UPR^{mt} και όχι εξαιτίας του.

1.3.1 Το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και ο ρόλος του DAF-16

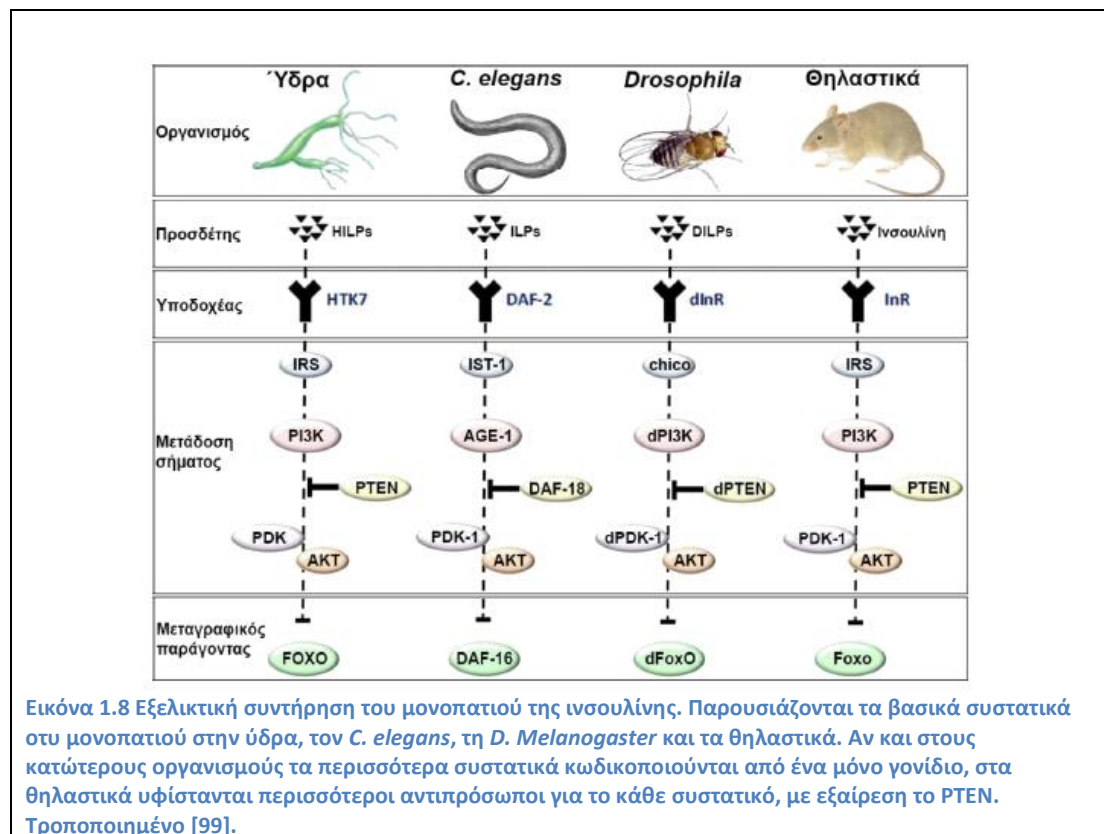
Το μονοπάτι της ινσουλίνης είναι σημαντικότερο και εκτενέστερα μελετημένο μονοπάτι σηματοδότησης που σχετίζεται με τη μακροζωία των οργανισμών. Είναι εξελικτικά συντηρημένο από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο και η λειτουργία του έχει συσχετιστεί με το ρυθμό της γήρανσης στο νηματώδη, την μύγα, τα ποντίκια και τον άνθρωπο [85, 86]. Στο νηματώδη μεταλλαγές σε συστατικά του μονοπατιού έχουν βρεθεί να αυξάνουν την διάρκεια ζωής του μέχρι και δύο φορές. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ξεκινάει μέσω μιας πρωτεΐνης υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης. Αυτή η διαμεμβρανική πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *daf-2* στον *C. elegans*. Αποτελεί το μοναδικό υποδοχέα της ινσουλίνης και ινσουλινόμορφων πεπτιδίων και αναγνωρίζει πάνω από 40 ινσουλινόμορφα πεπτίδια [87]. Μεταλλαγές στο *daf-2* προκαλούν διπλασιασμό της διάρκειας ζωής του σκουληκιού. Η πρόσδεση ενός ινσουλινόμορφου πεπτιδίου ενεργοποιεί την περιοχή κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την κινάση AGE-

1/P13K και την ενεργοποιεί. Με τη σειρά της, η AGE-1 παράγει 3-φωσφοϊνοσιτίδια τα οποία αποτελούν δευτερογενή μηνύματα απαραίτητα για την ενεργοποίηση κινασών καταρροϊκά του μονοπατιού, όπως οι PDK-1, SGK-1, AKT-1 και AKT-2 [88-90]. Οι τελευταίες ρυθμίζουν τον εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16, ομόλογο του FOXO στα θηλαστικά. Οι FOXOs ανήκουν στην κατηγορία O της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων Forkhead, η οποία χαρακτηρίζεται από μία συντηρημένη περιοχή δέσμησης DNA, το κουτί Forkhead (FOX) που συμμετέχει σε ένα μεγάλο εύρος σημαντικών κυτταρικών διεργασιών όπως η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση και ο μεταβολισμός εκτός από τη λειτουργία του στην αντοχή στο στρες και τη διάρκεια ζωής. Στα θηλαστικά υπάρχουν 4 γονίδια ενώ στα ασπόνδυλα μόνο ένα, που στον *C. elegans* ονομάζεται *daf-16*, βασισμένο στον ελαττωματικό φαινότυπο *dauer* που σχηματίζεται κατά την έλλειψή του [91]. Ο *daf-16* έχει οκτώ διακριτά μετάγραφα (a-h) εκ των οποίων τα a/d/f/h θεωρούνται οι κύριες ισομορφές που συμμετέχουν στο σχηματισμό του σταδίου *dauer* και στη διάρκεια ζωής και δίνουν πρωτεΐνες με υψηλό ποσοστό ομολογίας με τις ανθρώπινες FOXO1/3/4, ειδικά στην Forkhead περιοχή δέσμησης και η *daf-16a* στο μοτίβο φωσφορυλίωσης.

Η μεγαλύτερη επέκταση της διάρκειας ζωής του *C. elegans* περιγράφηκε πριν περίπου 30 χρόνια, από μοναδιαία γενετική τροποποίηση που μείωνε τη δράση του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης [92]. Για να συμβεί η επέκταση της διάρκειας ζωής μέσω αυτού του μονοπατιού, απαιτείται ο μεταγραφικός παράγοντας DAF-16, ομόλογος των ανθρώπινων FOXO παραγόντων, που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που απαιτούνται για τη διάρκεια ζωής. Ο DAF-16 καταστέλλει την έκφραση δύο μιτοχονδριακών m-AAA πρωτεασών που ρυθμίζουν αρνητικά τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη σύντηξης EAT-3/OPA1. Απενεργοποίηση της σηματοδότησης της ινσουλίνης, οδηγεί σε ενεργοποίηση του DAF-16 και αντίστοιχα στην καταστολή των m-AAA πρωτεασών, συνεπώς και στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης της EAT-3/OPA1 και της μιτοχονδριακής σύντηξης. Καθώς στα μεταλλάγματα του IIS με αυξημένη διάρκεια ζωής και συντηγμένα μιτοχόνδρια, η καταστολή της μιτοχονδριακής σύντηξης εξαλείφει την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, συμπεραίνεται ότι η αύξηση της μιτοχονδριακής σύντηξης απαιτείται για τη σημαντική αύξηση ζωής [79]. Με ενεργοποίηση του μονοπατιού οι κινάσες φωσφορυλιώνουν τον DAF-16 και τον κρατούν απενεργοποιημένο στο κυτταρόπλασμα. Αν το μονοπάτι παραμένει ανενεργό η φωσφορυλίωση του DAF-16 δεν πραγματοποιείται. Η αποφωσφορυλιωμένη μορφή του DAF-16 μεταβαίνει στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων [93, 94]. Τα εξαρτώμενα από DAF-16 γονίδια σχετίζονται με αντιμικροβιακά πεπτίδια, αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες του μεταβολισμού, αλλά κυρίως παράγοντες σχετιζόμενους με τη μακροβιότητα και την αντοχή σε στρες. Στα σπονδυλωτά, που διαθέτουν ξεχωριστούς υποδοχείς για την ινσουλίνη και για τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα (IGF-1, Insulin-like Growth Factor 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. Εντούτοις οι δύο υποδοχείς μοιράζονται κοινά καταρροϊκά συστατικά και η δράση και των δύο εμπλέκεται με τη μακροβιότητα [95]. 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 [96]. Η ενεργότητα του DAF-16/FOXO στο λιπώδη ιστό του σκουληκιού και της *Drosophila* μπορεί

να προκαλέσει αύξηση της διάρκειας ζωής τους. Ο πυρηνικός υποδοχέας ορμονών DAF-12 και το κυτόχρωμα P450/DAF-9 είναι επίσης απαραίτητα για τον πυρηνικό εντοπισμό του DAF-16. Αντίστοιχα, υπάρχει δυνατότητα του νευρικού συστήματος να στέλνει σήματα που επηρεάζουν θετικά τη διάρκεια της ζωής μέσω του μονοπατιού της ινσουλίνης. Πειράματα διάσωσης του υποδοχέα DAF-2 στο νευρικό ιστό προκαλεί απώλεια της μακροβιότητας *daf-2* μεταλλαγμένων ατόμων [97].

Επιπλέον, η μετατόπιση του DAF-16/FOXO στον πυρήνα είναι δυνατόν να επαχθεί, αλληλεπιδρώντας κατευθείαν με βασικούς ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης και της απόκρισης στο στρες όπως οι κινάσες p38 και JNK-1, συνδυάζοντας τα μονοπάτια αυτά με τη μακροβιότητα. Επιπλέον, κινάσες εκτός του μονοπατιού όπως η AMPK, η p38 MAPK και κινάσες της σηματοδότησης RAS φαίνεται να είναι εν μέρει απαραίτητες για την μακροβιότητα των *daf-2* μεταλλαγμάτων. Η c-Jun N-terminal kinase (JNK) είναι μια επαγόμενη από το στρες κινάση που ανήκει στη οικογένεια MAPK. Αποτελεί θετικό ρυθμιστή του DAF-16 τόσο στο σκουλήκι όσο και στον άνθρωπο. Η JNK φωσφορυλιώνει απευθείας τον DAF-16 *in vitro*, και από γενετικά και βιοχημικά δεδομένα φαίνεται ότι δρα παράλληλα με το μονοπάτι της ινσουλίνης προκειμένου να ρυθμίσει τον DAF-16, αλλά με ανάποδο τρόπο, δηλαδή η φωσφορυλίωση του DAF-16 σε διαφορετική θέση επάγει τον πυρηνικό του εντοπισμό και τη επακόλουθη ενεργοποίησή του [98].



1.4 Ο *C. elegans* ως μοντέλο για τη μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας
 Αν και χρησιμοποιούνται πολλές προσεγγίσεις για να κατανοήσουμε πώς λειτουργούν τα μιτοχόνδρια, ο *C. elegans* προσφέρει ισχυρά και μοναδικά πλεονεκτήματα. Ο βαθμός συντήρησης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μεταξύ των νηματωδών και των θηλαστικών

είναι αρκετά υψηλός και υποδεικνύει ότι η γνώση που αποκτάται στο νηματώδη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για την κατανόηση του αντίστοιχου μηχανισμού στα θηλαστικά. Η ικανότητα σήμανσης των μιτοχονδρίων και η παρακολούθηση της κινητικότητας, της δομής και ακόμη και της λειτουργίας τους στο διαφανή νηματώδη ενισχύει περαιτέρω τον *C. elegans* ως μοντέλο για τις μιτοχονδριακές μελέτες. Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη ανθρώπινων μιτοχονδρίων είναι εύκολα εφαρμόσιμες στο νηματώδη, με ελάχιστες τροποποιήσεις. Αυτό ισχύει για μελέτες οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, προσδιορισμού ενζύμων ETC, ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης με μπλε χρώση (BNGs, blue native gels), παραγωγής ελεύθερων ριζών, βλάβης κλπ. Πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η απομόνωση των λειτουργικών μιτοχονδρίων από το νηματώδη είναι λίγο πιο δύσκολη από ότι από τα κύτταρα των θηλαστικών, διότι πρέπει να διαταραχθεί η επιδερμίδα διατηρώντας παράλληλα άθικτα τα μιτοχόνδρια. Αυτός ο περιορισμός στην απομόνωση επισκιάζεται από την δυνατότητα να προκληθεί μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων με RNAi (knock down). Δεδομένου ότι είναι δυνατό να δημιουργηθούν διαφορετικοί βαθμοί μιτοχονδριακής βλάβης με RNAi, μπορεί κανείς να μελετήσει πολλές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που θα ήταν θανατηφόρες σε ένα ζώο με πλήρη απώλεια λειτουργίας του γονιδίου (knockout) [100,101].

1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

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 [102, 103], η εύρεση των πρώτων μεταλλαγών που ρυθμίζουν τη διάρκεια της ζωής, η ανακάλυψη των πρώτων miRNA και του μηχανισμού RNA παρεμπόδισης (RNAi) και η εισαγωγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) ως μάρτυρα της γονιδιακής έκφρασης και του εντοπισμού πρωτεϊνών σε ζωντανούς οργανισμούς. 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 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 αναπτυγμένου σε σκουλήκια συστήματος CRISPR/CAS [104].

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 εμπότισμό των ατόμων σε διάλυμα dsRNA, ή την κατανάλωση βακτηρίων *E. coli* που παράγουν το επιθυμητό dsRNA [105]. 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. 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* [106, 107]. 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 [108]. 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 [109]. 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 [110]. Οι 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 μετázων, παρά τη μεγάλη εξελικτική απόσταση που τον χωρίζει από τα θηλαστικά και τον άνθρωπο.

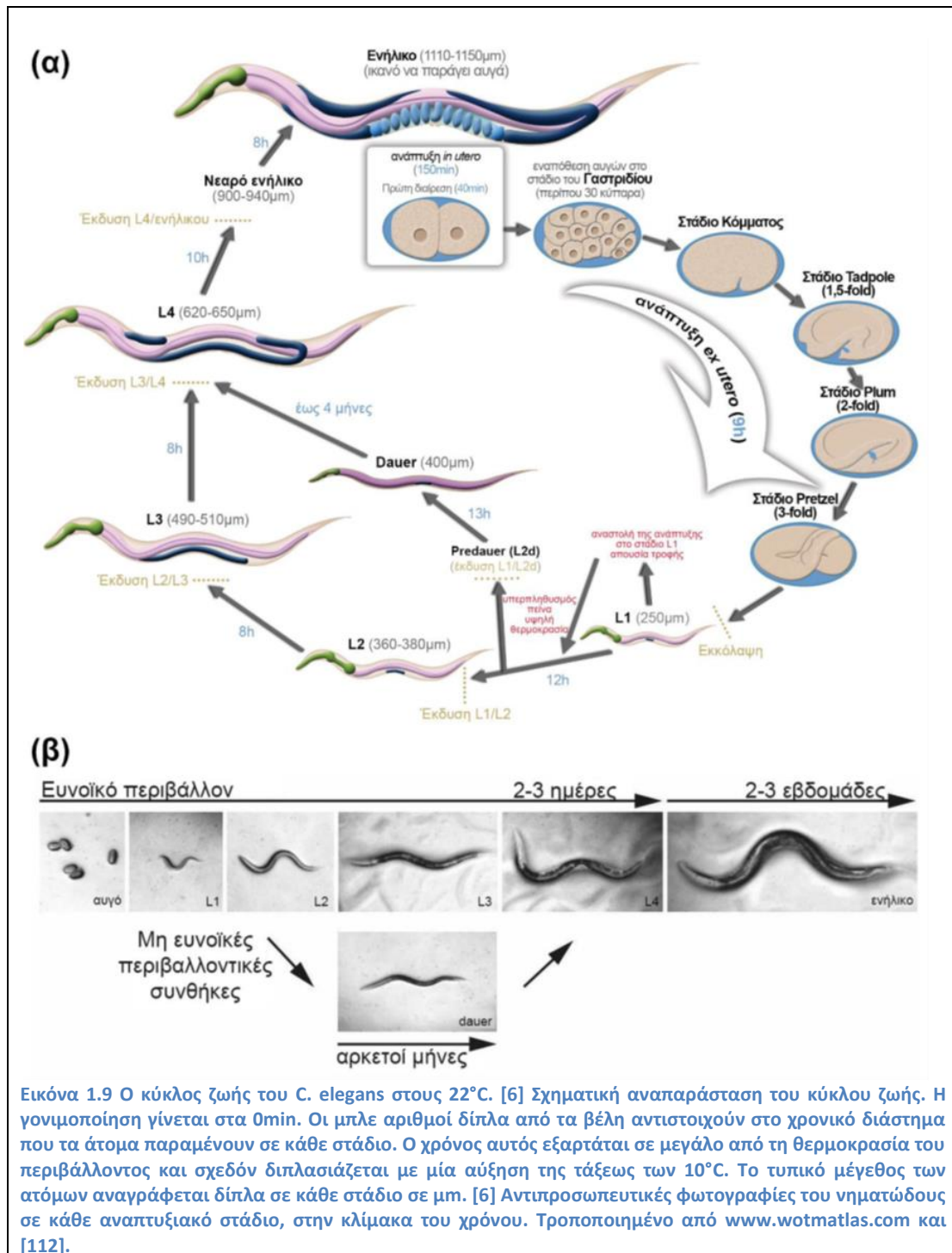
Πέρα από τα πολλαπλά του πλεονεκτήματα στις γενετικές μελέτες, ο *C. elegans* διαθέτει και επιπλέον χαρακτηριστικά που τον καθιστούν ένα εξαιρετικά ισχυρό μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας των ευκαρυωτών, το σημαντικότερο εκ των οποίων είναι η διαφάνεια του σώματός του. Επιπλέον, καθιστά δυνατή τη 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 του των κυττάρων έχει διαλευκανθεί πλήρως και έχει βρεθεί να παρουσιάζει ελάχιστη ποικιλομορφία στα πλαίσια ενός ισογενετικού πληθυσμού, διευκολύνοντας στο μέγιστο τις μελέτες αναπτυξιακής βιολογίας. Ένα ενήλικο ερμαφρόδιτο άτομο του νηματώδους διαθέτει 959 μετα-μιτωτικά κύτταρα, τα οποία, παρά την απλότητα του οργανισμού, είναι οργανωμένα σε σαφώς καθορισμένους ιστούς.

1.4.2 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. 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 μετα-μιτωτικά 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.. 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 [111]. 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 [112].

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.



Κεφάλαιο 2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

2.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA, οι νηματώδεις συλλέχθηκαν από τρυβλία NGM με διάλυμα M9 (πίνακας B6), μεταφέρθηκαν σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου 1,5ml και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 2000gpm 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 πρωτεΐνωση 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 φυγοκέντρωση στις 13.000gpm 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 13.000gpm 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 φυγοκέντρωση στις 13.000gpm 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.

2.1.2 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 2000gpm. 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 φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 12.000 x g (11.200gpm) 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) ή σε nanodrop spectrophotometer.

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.2.1 Πολυμεράσες και εκκινητές

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωτική (πίνακας B1) διαλύθηκαν σε TE (10mM Tris/1mM EDTA pH 8). Για την ενίσχυση τμημάτων DNA που προορίζονταν για κατασκευές RNAi χρησιμοποιήθηκε Taq πολυμεράση. Για την ενίσχυση τμημάτων DNA που προορίζονταν για έκφραση στο νηματώδη χρησιμοποιήθηκαν πολυμεράσες υψηλής πιστότητας, που διαθέτουν ενεργότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης, μειώνοντας δραματικά τη συχνότητα των λαθών κατά την αντιγραφή του DNA. 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 την εκάστοτε πολυμεράση.

Πίνακας B2.1. Primers που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσης διπλωματικής εργασίας

Εκκινητής	Αλληλουχία 5' 3'	Εφαρμογή
<i>lonp-1 del FRW</i>	GTTTACTCGGGATCTGGTC	Διαγνωστική PCR/
<i>lonp-1 del REV</i>	TATTACCGAATCGTCTGCAC	ταυτοποίηση μεταλλαγμένου στελέχους
<i>haf-1 del FRW</i>	GGTGCGGCAGATGTTAATC	Διαγνωστική PCR/
<i>haf-1 del REV</i>	CCGACAAATTTCTCGCCCT	ταυτοποίηση μεταλλαγμένου στελέχους
<i>daf-16/3 del</i> ή <i>daf-16a_Frw</i> για N2	GGCTATTTCTCACTGTCTAC ή CAATGAGATTTATCAATGGTTCTC	Διαγνωστική PCR/ ταυτοποίηση

<i>daf-16/4</i>	CGATTGAGTTCGGGGACTG	μεταλλαγμένου στελέχους
<i>atfs-1 FRW</i>	ATGTTTTCCCGTGTGGGACGT	Κατασκευή RNAi construct
<i>atfs-1 REV</i>	CGAACATTTTTCCGTGAAGATAACT	
<i>clpp-1i/Frw HindIII (clpp-1)</i>	TTAAGCTTATGATAAGTGCACCAGTGTCC	Κατασκευή RNAi construct
<i>clpp-1i/Rev BamHI (clpp-1)</i>	CATGGATCCTTTAATCTGATGGCATTGATCC	
<i>AMA-1/RT2</i>	GCTCCAAATGACCGAAATGT	Ποσοτική RT- PCR
<i>AMA-1/RT3</i>	GCCCGGAGGAGATTAAACG	
<i>hsp-16.2/RT1</i>	TACCACTATTTCCGTCCAGC	Ποσοτική RT- PCR
<i>hsp-16.2/RT2</i>	CCTTGAACCGCTTCTTTCTTTG	
<i>Hsp-6/RT1</i>	GGTTCAAAGGACTTAAAGGTCG	Ποσοτική RT- PCR
<i>Hsp-6/RT2</i>	GTTGTTGACGGTGGTTCCC	
<i>hsp-60/RT1</i>	AGATCGAGAAGCGAATCGAG	Ποσοτική RT- PCR
<i>hsp-60/RT2</i>	GGTGACACGGTCCTTCTTCT	
<i>F44E5.4 (HSP- 70) RT Frw</i>	CAGAATGGAAAGGTTGAGATCCTC	Ποσοτική RT- PCR
<i>F44E5.4 (HSP- 70)RT Rev</i>	CATCGAAACGTCGTCCAATCAATC	
<i>sod-1/RT3</i>	GTGGACCAAATCCGAGATC	Ποσοτική RT- PCR
<i>sod-1/Rev</i>	ACAACCATAGATCGGCCAAC	
<i>sod-2/Frw</i>	GGTCTCAAAGGAAACGTCA	Ποσοτική RT- PCR
<i>sod-2/Rev</i>	TGATCCTTGAACAGCGACAG	

<i>sod-3_Frw</i>	TCGGTCCCTGGATAACTTG	
<i>sod-3_Rev</i>	CATAGTCTGGGCGGACATTT	Ποσοτική RT-PCR
<i>ctl-1/Frw</i>	CGCCTTGGACCAAACACTACAT	
<i>ctl-1/Rev</i>	GTGGCTGCTCGTAGTTGTGA	Ποσοτική RT-PCR
<i>mtl-1/Frw</i>	ATGGCTTGCAAGTGTGACTG	
<i>mtl-1/Rev</i>	GCTTCTGCTCTGCACAATGA	Ποσοτική RT-PCR
<i>atsf-1 FRW</i>	ATGTTTTCCCGTGTGGGACGT	
<i>atsf-1 REV</i>	CGAACATTTTTCCGTGAAGATAACT	Ποσοτική RT-PCR

2.2.2 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. Ολικό RNA απομονώθηκε και η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας το σύστημα iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) ή το SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Στα πειράματα προσδιορισμού των επιπέδων mRNA του νηματώδους με την πάροδο του χρόνου, οι συγχρονισμένοι πληθυσμοί αποκτήθηκαν μέσω κατεργασίας ενήλικων ατόμων με αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη συλλέχθηκαν σε διάλυμα M9 όταν έφτασαν στο επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο και φυγοκεντρήθηκαν 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 επαναιωρήθηκε σε 5μl διαλύματος M9. Στα δείγματα προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης για RNA με πρωτεΐνάση K (πίνακας B2) και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 65°C και 5 λεπτά στους 85°C. Το διάλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας το σύστημα Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific). 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 μηχανήμα 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).

2.3 PCR σε ολόκληρους νηματώδεις

Για την ταυτοποίηση του γονότυπου των ατόμων που προέκυψαν από διασταύρωση στελεχών 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 διαλυμάτων λύσης για DNA και RNA			
DNA (2X)		RNA (2X)	
Συστατικό	Συγκέντρωση	Συστατικό	Συγκέντρωση
KCl	50mM	Tris pH 8	10mM
Tris-HCl pH 8,3	10mM	Triton X-100	1%
MgCl ₂	2,5mM	Tween 20	1%
Triton X-100	0,45%	EDTA	0,5mM
Tween 20	0,45%		
Πριν τη χρήση προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml			

2.4 Χειρισμοί βακτηριακών στελεχών

2.4.1 Καλλιέργεια και αποθήκευση βακτηριακών στελεχών

Τα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό Luria Bertani, 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 B3. 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 Β3. Διαλύματα αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό	Διαλύτης	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος(mg/ml)	Συγκέντρωση τελικού διαλύματος(mg/ml)
Αμπικιλλίνη	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

2.4.2. 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 3000rpm 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).

2.5 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 Β3) 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 επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες, μετά το πέρας των οποίων ελέγχθηκαν για την παρουσία βακτηριακών αποικιών.

2.6 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 επωάστηκε 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).

2.7 Φορείς κλωνοποίησης

I. pPD129.36 (pL4440)

Ο φορέας κλωνοποίησης pPD129.36 (pL4440 - Fire Kit, Addgene) [495] είναι κατάλληλος για την παραγωγή δίκλωνου RNA, καθώς περιέχει δύο υποκινητές της T7 RNA πολυμεράσης που περιβάλλουν μια αλληλουχία πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (multicloning site, MCS). Όταν μία αλληλουχία DNA κλωνοποιείται στο MCS, η T7 RNA πολυμεράση αναγνωρίζει τους δύο αντίθετες κατεύθυνσης T7 υποκινητές και μεταγράφει και τις δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες, με αποτέλεσμα την παραγωγή δίκλωνου RNA εντός των βακτηριακών κυττάρων. Στα σκουλήκια που τρέφονται με τα βακτήρια αυτά προκαλείται συστημική αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου μέσω του μηχανισμού RNAi. Περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη και είναι κατάλληλος για μετασχηματισμό DH5α και HT115 κυττάρων.

2.8 Χειρισμοί στελεχών *C. elegans*

2.8.1 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 Β4. 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
	Αμπικιλίνη ³	500-1000μl	50-100μg/ml
	Νυστατίνη ⁴	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

³ Αντιβιοτικό. Προστίθεται σε θρεπτικό που προορίζεται για επίστρωση του βακτηριακού στελέχους *E. coli* HT115

⁴ Μυκητοστατικό. Προστίθεται σε συνδυασμό με την στρεπτομυκίνη σε θρεπτικό που προορίζεται για τρυβλία στοκ

Η σύσταση του θρεπτικού παρουσιάζεται στον πίνακα Β5. 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. Ακολουθως τα τρυβλία 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 διατριβής, εκτός αυτών που περιλαμβάνουν αποσιώπηση γονιδίων με RNAi. Εναλλακτικά του OP-50 μπορεί να χρησιμοποιηθεί το στέλεχος HB101, το οποίο φέρει όμοια χαρακτηριστικά. Για την αποσιώπηση γονιδίων με RNAi μέσω της σίτισης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος HT115 (DE3). Το στέλεχος αυτό στερείται RNάσης III (*rnc*) και για το λόγο αυτό είναι κατάλληλο για παραγωγή δίκλωνου RNA. Επιπλέον, φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *lacZ*. Το διαγονίδιο έχει ενσωματωθεί σε ένα τροποποιημένο προφάγο λDH3, ο οποίος με τη σειρά του είναι ενσωματωμένος στο χρωμόσωμα του βακτηρίου. Στον προφάγο περιέχεται επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη. Μετά από επαγωγή με IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside), που ενεργοποιεί τον υποκινητή του γονιδίου *lacZ*, η παραγόμενη T7 RNA πολυμεράση μπορεί να μεταγράψει οποιοδήποτε γονίδιο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο κατάλληλου υποκινητή. Ο φορέας κλωνοποίησης pPD129.36 (*pL4440*) είναι κατάλληλος για το μετασηματισμό του στελέχους HT115 και κατευθύνει την παραγωγή δίκλωνου RNA εντός των βακτηριακών κυττάρων. Η ανάπτυξη του στελέχους γίνεται συνήθως παρουσία αμπικιλίνης, προκειμένου να διατηρείται το πλασμίδιο που προσφέρει την ανθεκτικότητα και παράγει το δίκλωνο RNA. Για την αποφυγή μολύνσεων η ανάπτυξη μπορεί να γίνει και παρουσία τετρακυκλίνης.

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 ξηπλύθηκαν με παγωμένο διάλυμα M9 (πίνακας Β6) και στο εναιώρημα που προέκυψε προστέθηκε ίσος όγκος παγωμένου διαλύματος ψύξης (πίνακας Β6). 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 Β5. 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

2.9 Αποσιώπηση γονιδίων με RNAi μέσω σίτισης

Η αποσιώπηση γονιδίων με RNAi πραγματοποιήθηκε μέσω της διατροφής των ατόμων με στέλεχος *E. coli* HT115, μετασχηματισμένο με το πλασμίδιο pPD129.36 (pL4440), που φέρει κλωνοποιημένο τμήμα του επιθυμητού γονιδίου, προκειμένου να παράγει το αντίστοιχο δίκλωνο RNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή τρυβλίων RNAi έχει ως εξής: το επιθυμητό βακτηριακό στέλεχος εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό LB που περιείχε τετρακυκλίνη και αμπικιλίνη και επώαστηκε στους 37°C για 16 ώρες υπό ανάδευση. Μέρος της καλλιέργειας αυτής χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού LB που περιείχε αμπικιλίνη (αναλογία εμβολίου-καλλιέργειας 1:10). Ακολούθησε επώαση στους 37°C υπό ανάδευση στις 220rpm για 2-3 ώρες (έως ότου η καλλιέργεια φτάσει σε εκθετική φάση ανάπτυξης) και επαγωγή της έκφρασης του δίκλωνου RNA με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 2mM. Η καλλιέργεια επώαστηκε για άλλες 3 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση και επιστρώθηκε σε τρυβλία NGM (0,5ml καλλιέργειας/τρυβλίο), τα οποία επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της αποσιώπησης γονιδίων κατά την ανάπτυξη στους 27,5°C, IPTG προστέθηκε και στο θρεπτικό NGM πριν από την επίστρωση των βακτηρίων σε συγκέντρωση 1mM. Προς αποφυγή (ή απαλλαγή) μόλυνσεων πριν την επίστρωση της βακτηριακής καλλιέργειας προστέθηκε επίσης τετρακυκλίνη, σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml, όποτε κρίθηκε απαραίτητο.

2.10 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.

2.11 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 ή διαγονιδίων έγινε είτε απευθείας στα F₂ άτομα είτε στους απογόνους τους (γενιά F₃), μέσω PCR με τους κατάλληλους εκκινητές ή μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης. Κατά τη διασταύρωση διαγονιδιακών στελεχών που φέρουν εξωχρωμοσωμική συστοιχία DNA, η παρουσία της διαπιστώθηκε μέσω του φαινότυπου roller που προσδίδει στα άτομα, λόγω του γονιδίου *rol-6(su1006)*.

2.12 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 ή HT115) μετασηματισμένα με το επιθυμητό πλασμίδιο για αποσιώπηση μέσω RNAi). Σε κάθε τρυβλίο με καλλιέργεια OP-50 τοποθετήθηκαν κατά κανόνα 50 άτομα, όπου προστέθηκε FUdR (Flouxuridine) και επώαστηκαν στην επιθυμητή θερμοκρασία. Το FUdR (5 φλουορο-δεοξυ-ουριδίνη), είναι ένα ανάλογο της θυμιδίνης, έχοντας ως αποτέλεσμα να σταματάει τη κυτταρική διαίρεση. Η χορήγηση FUdR, λοιπόν, έχει ως συνέπεια να σταματάει η γαμετογένεση και η εμβρυογένεση ώστε να μην αναπτύσσονται απόγονοι στα τρυβλία με τα αρχικά άτομα. Χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα, όπου τα άτομα καλλιεργήθηκαν σε OP-50 όταν έφταναν στο στάδιο L4. Τα άτομα που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια RNAi, τοποθετήθηκαν 25-30/τρυβλίο (4τρυβλία/στλελεχος). 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 ημέρα της ζωής τους και ακολούθως κάθε 4-6 ημέρες, για να αποφευχθούν καταστάσεις πείνας, υπερπληθυσμού, στρες ή κατανάλωσης νεκρών βακτηρίων. 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.

2.13 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). Όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη διασταυρώθηκαν τουλάχιστον 3 φορές με το στέλεχος N2 και τα στελέχη που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν σε γενετικές διασταυρώσεις για την παραγωγή των διπλά μεταλλαγμένων ατόμων. Η παρουσία των μεταλλαγμών ανιχνεύθηκε στα άτομα της γενιάς F₂, είτε με PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα B1, είτε μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης.

Πίνακας B6. Στελέχη που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής

Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή	Αναφορά
N2	N2	Στέλεχος αγρίου τύπου	CGC
BRF548	<i>lonp-1(tm5171) I</i>	Διαγραφή του C34B2.6 (Celon)	CGC
RB867	<i>haf-1(ok705) IV</i>	Διαγραφή του C30H6.6 (μιτοχονδριακός ABC μεταφορέας).	CGC
VC3201	<i>atfs-1(gk3094)V</i>	Αλληλόμορφο απώλειας λειτουργίας (Loss-of-function) του ZC376.7	CGC
QC115	<i>atfs-1(et15) V</i>	Αλληλόμορφο απόκτησης λειτουργίας (Gain-of-function) του <i>atfs-1</i> .	CGC, Ref. Rauthan et al., PNAS 2013
BRF727 (CF1407)	<i>daf-16(mu86);muls71[GFP::daf-16a; rol-6] I;X</i>	Χρήση πράσινης φθρίζουσας πρωτεΐνης στον υποκινητή του γονιδίου <i>daf-16a</i> .	Παρούσα διπλωματική
BRF726	<i>lonp-1(tm5171);(daf-16a::GFP;daf-16b del) I;I;X</i>	Διασταύρωση αρσενικών <i>lonp-1</i> με CF1407 ερμαφρόδιτα	Παρούσα διπλωματική
BRF720	<i>lonp-1(tm5171);haf-1(ok705) I;IV</i>	Διασταύρωση αρσενικών <i>lonp-1</i> με ερμαφρόδιτα <i>haf-1</i> , σειρά 2.25	Παρούσα διπλωματική
BRF733	N2	Συλλογή αγρίου τύπου ατόμων από τη διασταύρωση BRF720	Παρούσα διπλωματική
BRF734	<i>lonp-1(tm5171) I</i>	Συλλογή <i>lonp-1</i> ατόμων από τη διασταύρωση BRF720	Παρούσα διπλωματική
SJ4058	<i>zcls9[Phsp-60::gfp] V</i>	Χρήση πράσινης φθρίζουσας πρωτεΐνης στον υποκινητή του γονιδίου <i>hsp-60</i> (δείκτης ενεργοποίησης UPR ^{mt})	CGC

BRF651	<i>lonp-1 (tm5171); zcls9[Phsp-60::gfp] I;V</i>	Διασταύρωση αρσενικών <i>lonp-1</i> με SJ4058 ερμαφρόδιτα	Προηγούμενες μελέτες εργαστηρίου
BRF735	<i>N2; In[mgo-3::GFP; pRF4]</i>	Χρήση πράσινης φθιρίτσας πρωτεΐνης στον υποκινητή και ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου <i>mgo-3</i> . Μικροένεση του πλασμιδίου <i>Pmgo-3::GFP-pPD95.77</i> σε <i>N2</i> .	Προηγούμενες μελέτες εργαστηρίου
BRF736	<i>lonp-1; In[mgo-3::GFP; pRF4] I</i>	Διασταύρωση αρσενικών <i>lonp-1</i> με BRF735 ερμαφρόδιτα	Παρούσα διπλωματική
BRF737 (SJ4100)	<i>N2; (zcls13[Phsp-6::gfp, lin-15(+)])</i>	Χρήση πράσινης φθιρίτσας πρωτεΐνης στον υποκινητή του γονιδίου <i>hsp-6</i> (δείκτης ενεργοποίησης <i>UPR^{mt}</i>)	Παρούσα διπλωματική
BRF738	<i>lonp-1; (zcls13[Phsp-6::gfp, lin-15(+)])</i>	Διασταύρωση αρσενικών <i>lonp-1</i> με BRF737 ερμαφρόδιτα	Παρούσα διπλωματική

2.14 Δοκιμασία θερμικού στρες για έλεγχο και ποσοτικοποίηση φθορισμού

Όλα τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ανθεκτικότητας στο στρες αναπτύχθηκαν σε ιδανικές συνθήκες (20°C) και όλα τα στελέχη μελετήθηκαν παράλληλα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα *N2*, BRF548, VC3201, QC115, RB867, BRF720 (2.25), BRF733, BRF734). Τα στελέχη *N2* και BRF548 χρησιμοποιήθηκαν για το θερμικό σοκ σε τροφή RNAi για την αποσιώπηση των γονιδίων *clrp-1*, *atfs-1* αφού μεγάλωσαν σε αυτά συγχρονισμένα για μία και δύο γενιές αντίστοιχα.

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.

2.14.1. Δοκιμασία θερμικού στρες

Για κάθε στέλεχος προς μελέτη της ανθεκτικότητας στο θερμικό σοκ, μοιράσαμε 120 άτομα σε τρία πιάτα (40 στο καθένα). Τα πιάτα τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα 35° C για 6,5 ώρες και έπειτα τοποθετήθηκαν στους 20°C για ανάκαμψη για 16 ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκαν σε κάθε πιάτο πόσα επέζησαν και πόσα πέθαναν και υπολογίστηκε η % επιβίωσή τους.

2.14.2 Ποσοτικοποίηση φθορισμού

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. Για την εκτίμηση του φθορισμού των *daf-16::GFP* στελεχών, έγινε πρώτα σταθεροποίηση των ζώων σε 4% PFA διαλυμένο σε M9 για 10 λεπτά, ακολούθησε πλύση σε M9 και έπειτα τοποθετήθηκε στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η παρατήρηση του φθορισμού και η λήψη φωτογραφιών 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 των διαγονιδιακών στελεχών που φέρουν GFP, παρατηρήθηκαν ενήλικα άτομα μιας ημέρας στους 20°C, ενώ οι παράμετροι ρυθμίστηκαν μία φορά για κάθε μοριακή κατασκευή και παρέμειναν σταθερές κατά την παρατήρηση των διαφορετικών σειρών διαγονιδιακών ατόμων. Η ένταση του φθορισμού των στελεχών μετρήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Image J (Fiji is just). Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με ασύζευκτη ανάλυση t-test χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism version 6.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Όλες οι εικόνες φθορισμού που παρουσιάζονται στην παρούσα διπλωματική 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 και 63x.

2.15 Στατιστική ανάλυση

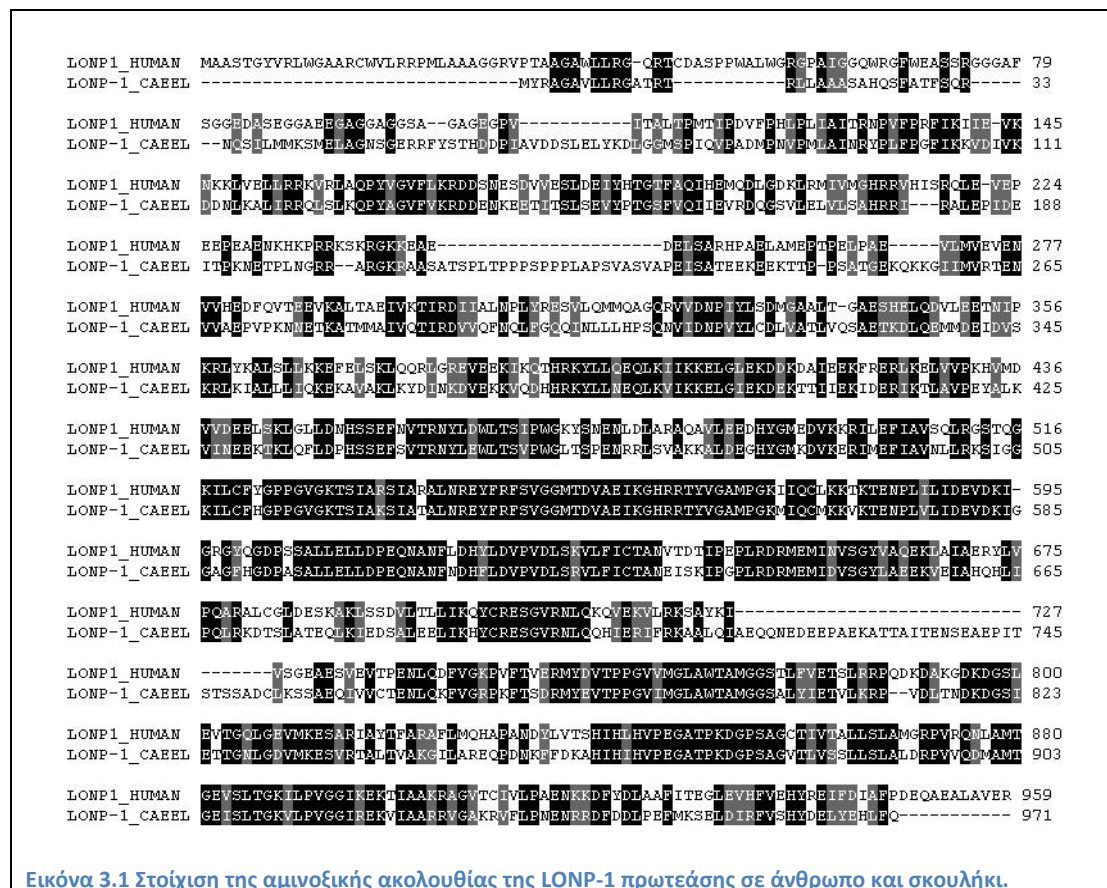
Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism (version 6.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Για τις καμπύλες επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε ανάλυση log-rank, ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η ανάλυση έγινε με ασύζευκτο t-test. Η στατιστική σημαντικότητα απεικονίζεται ως εξής: **** υποδηλώνει εξαιρετικά σημαντικές διαφορές με p-value μικρότερο του 0,0001, *** υποδηλώνει εξαιρετικά σημαντικές διαφορές με p-value από 0,0001 έως 0,001, ** υποδηλώνει πολύ σημαντικές διαφορές με p-value από 0,001 έως 0,01, * υποδηλώνει σημαντικές διαφορές με p-value από 0,01 έως 0,05, ns υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές με p-value μεγαλύτερο από 0,05.

Η στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών της LONP-1 για άνθρωπο και νηματώδη έγινε στο <http://www.bioinformatics.org/>, ενώ η προβλεπόμενη αμινοξική ακολουθία του μεταλλαγμένου για τη LONP-1 αλληλομόρφου συγκριτικά με την αμινοξική ακολουθία του αγρίου τύπου αλληλομόρφου, με λειτουργική τη LONP-1 έγινε στο UniProt.

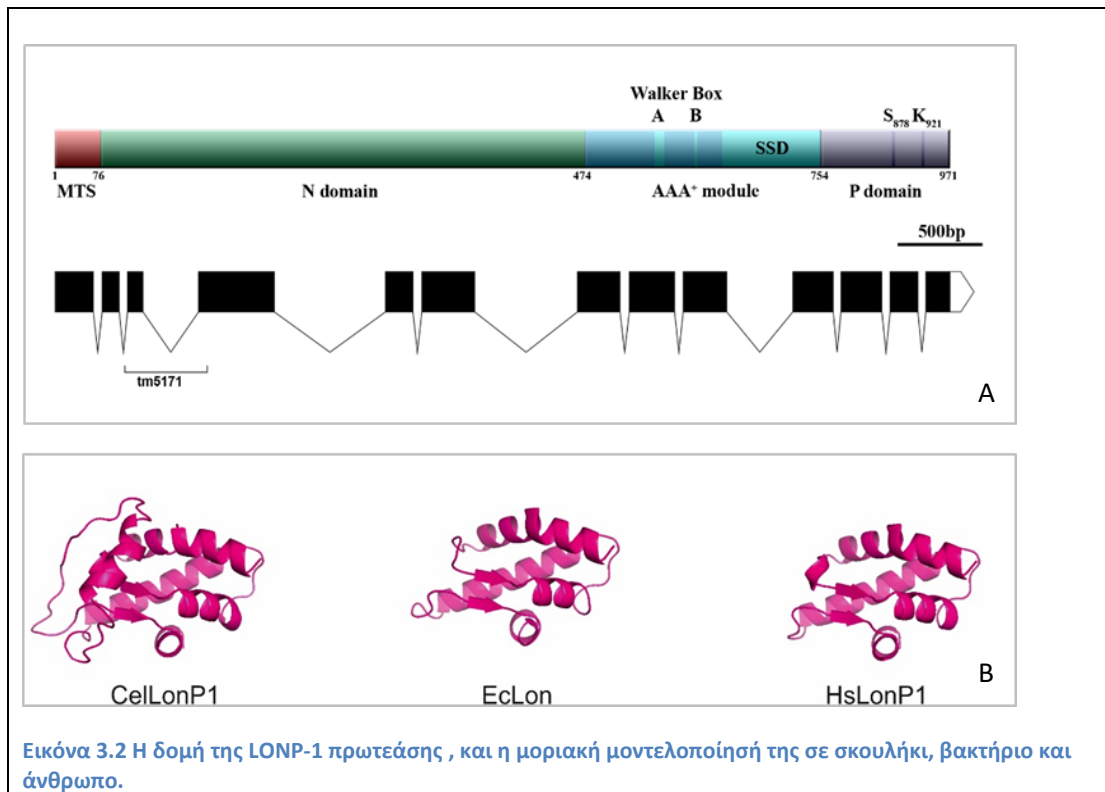
Κεφάλαιο 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης LONP-1 και χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου *tm5171*.

Το ομόλογο της ανθρώπινης μιτοχονδριακής πρωτεάσης LON για το νηματώδη σκώληκα, κωδικοποιείται από το γονίδιο *lonp-1* (C34B2.6) που ανήκει στο οπερόνιο (CEOP1636) και περιέχει τα εξής τέσσερα γονίδια: *sdha-2* (C34B2.7), *spsc-1* (C34B2.10), *lonp-1* (C34B2.6) and *ttc-1* (C34B2.5) (<https://www.wormbase.org>). Η προβλεπόμενη πρωτεΐνη 971 αμινοξέων έχει 47.6% ποσοστό ομοιότητας αλληλουχιών και 62.1% ομοιότητα με την ανθρώπινη ισομορφή 1 της LONP1 πρωτεάσης (Εικ. 3.1), φέρει την μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης στο N-τελικό άκρο και όλες τις λειτουργικές περιοχές των LON πρωτεασών (Εικ. 3.2A). Η μοριακή μοντελοποίηση του τμήματος SSD (Sensor and Substrate Discrimination domain, επικράτεια διαφοροποίησης αισθητήρα και υποστρώματος) της πρωτεάσης σε βακτήριο, άνθρωπο [44] και νηματώδη (S. Rigas, μη δημοσιευμένα δεδομένα), δείχνει ότι μοιράζονται την ίδια βασική δομή προτείνοντας συντηρημένες λειτουργίες (Εικ. 3.2B).

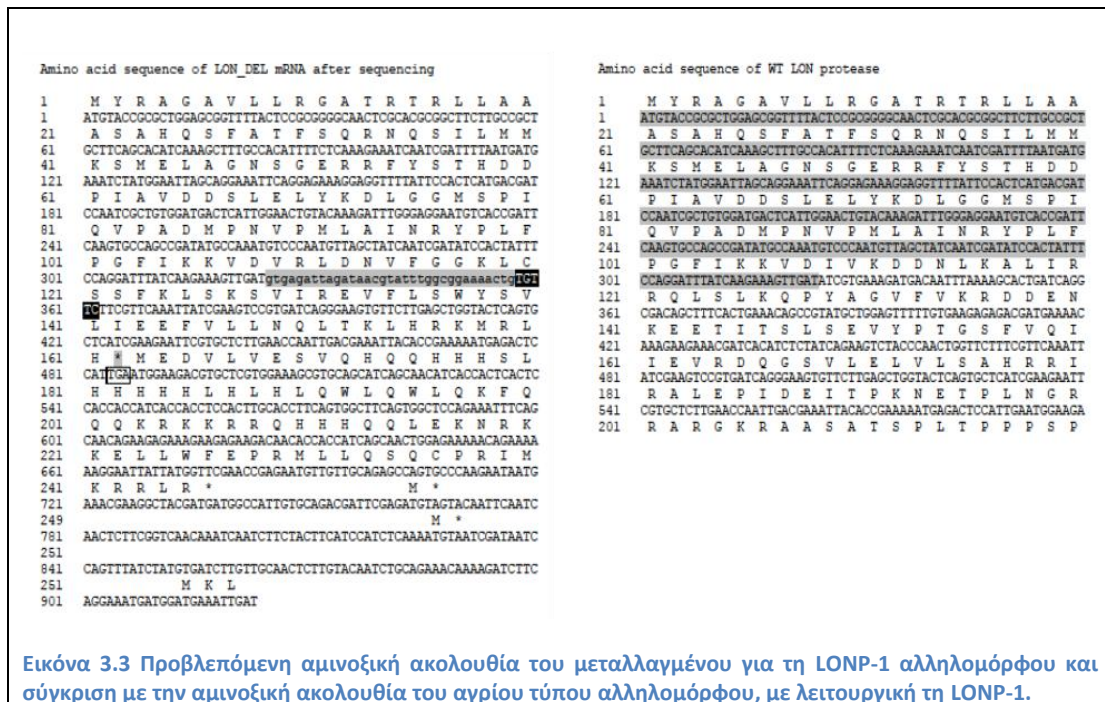


Εικόνα 3.1 Στοιχία της αμινοξικής ακολουθίας της LONP-1 πρωτεάσης σε άνθρωπο και σκουλήκι.

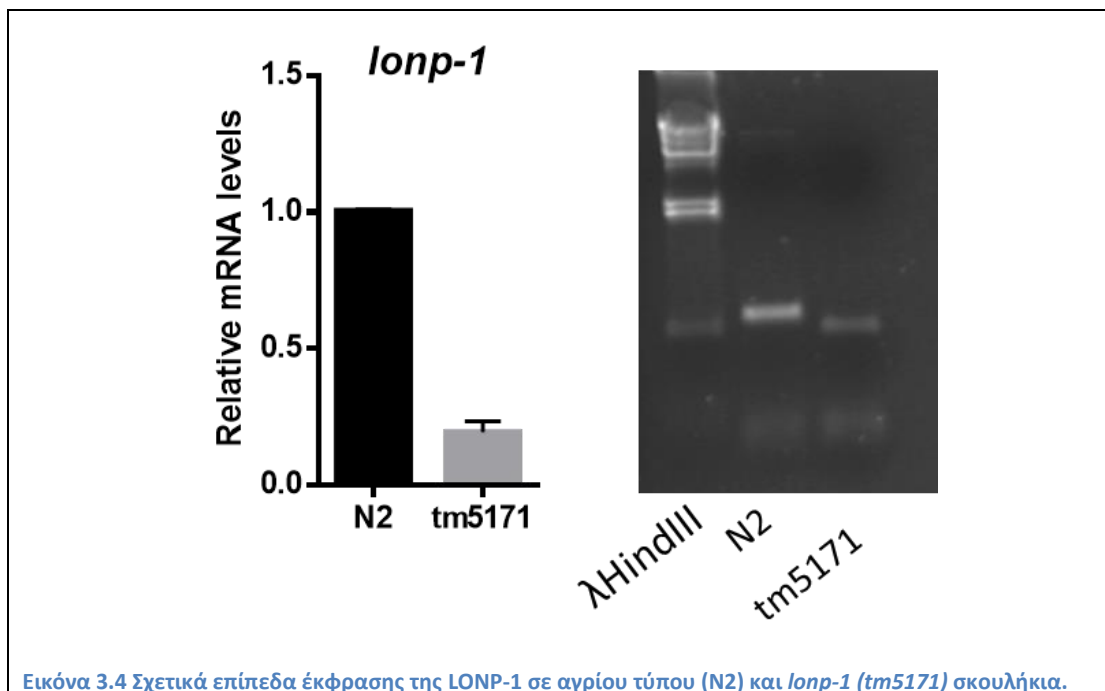


Εικόνα 3.2 Η δομή της LONP-1 πρωτεάσης , και η μοριακή μοντελοποίηση της σε σκουλήκι, βακτήριο και άνθρωπο.

Το μεταλλαγμένο στέλεχος *lonp-1(tm5171)* αποκτήθηκε από την τράπεζα στελεχών National Bioresource Project (NBRP, Japan) και χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί η επίδραση της ανεπάρκειας της LONP-1 στη φυσιολογία και διάρκεια ζωής των σκουληκιών. Σε επίπεδο DNA έχει μία ένθεση 5 ζευγών βάσεων και μία διαγραφή 490 ζευγών βάσεων που περιλαμβάνουν το τρίτο και μέρος του τέταρτου εξωνίου του *lonp-1* γονιδίου (Εικ. 3.2Α). Για να επιβεβαιωθεί πως το μετάγραφο της *lonp-1(tm5171)* οδηγεί στην παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης, έγινε αλληλούχηση του αντίστοιχου cDNA. Βρέθηκε πως το προβλεπόμενο προϊόν μετάφρασης φέρει μετά το 109^ο αμινοξύ μία αλλοιωμένη αλληλουχία που περιέχει 33 βάσεις του πρόδρομου mRNA και έπειτα την ένθεση των 5 βάσεων, οδηγώντας στη σύνθεση 53 νέων αμινοξέων πριν από ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης (Εικ. 3.3). Αυτό πιθανώς να οδηγεί σε αποικοδόμηση του μεταγραφήματος, μέσω της δράσης του μηχανισμού nonsense mediated decay. Πράγματι, η σχετική έκφραση του *lonp-1* στα μεταλλαγμένα *tm5171* σκουλήκια είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη από τα αγρίου τύπου (N2) σκουλήκια, όπως μετρήθηκε με RT-qPCR (Εικ. 3.4). Επόμενως, το αλληλόμορφο *tm5171* μπορεί να θεωρείται ως μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας (loss of function mutation) του γονιδίου *lonp-1*.



Εικόνα 3.3 Προβλεπόμενη αμινοξική ακολουθία του μεταλλαγμένου για τη LONP-1 αλληλομόρφου και σύγκριση με την αμινοξική ακολουθία του αγρίου τύπου αλληλομόρφου, με λειτουργική τη LONP-1.

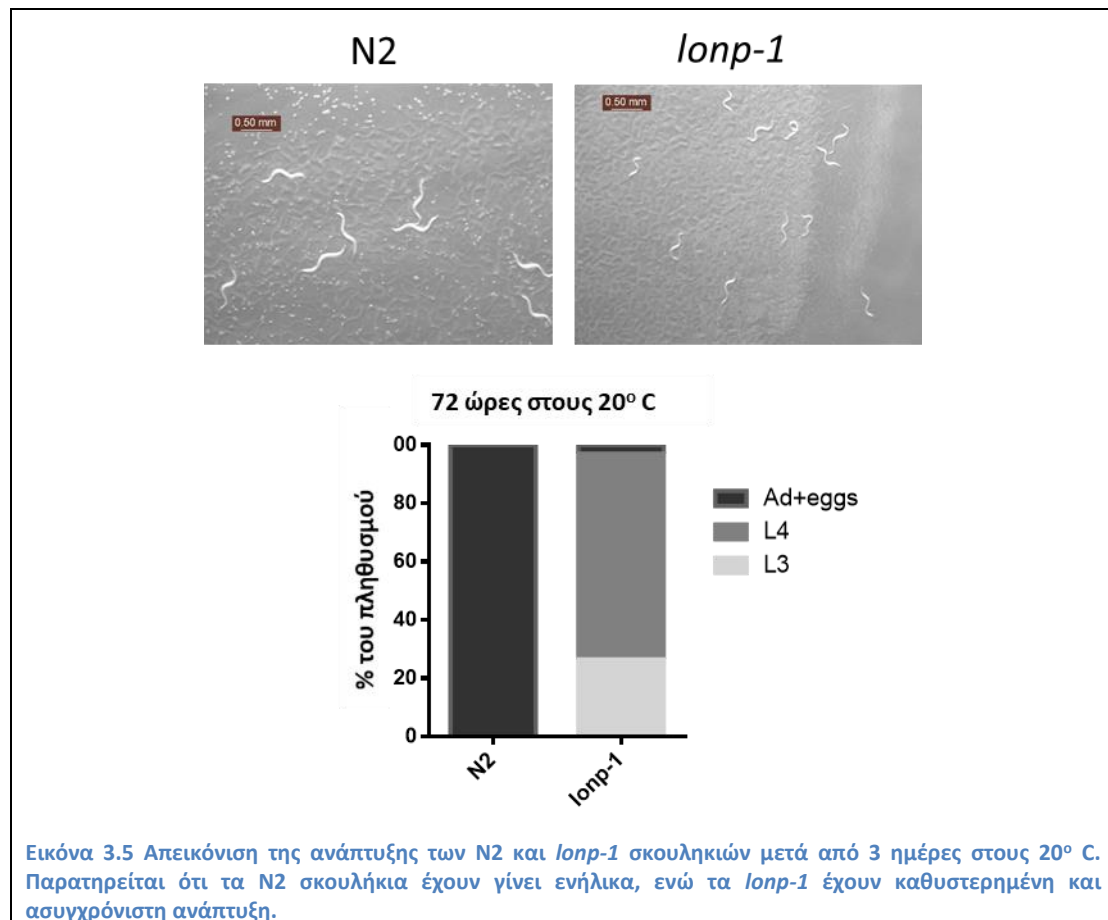


Εικόνα 3.4 Σχετικά επίπεδα έκφρασης της LONP-1 σε αγρίου τύπου (N2) και *lonp-1* (*tm5171*) σκουλήκια.

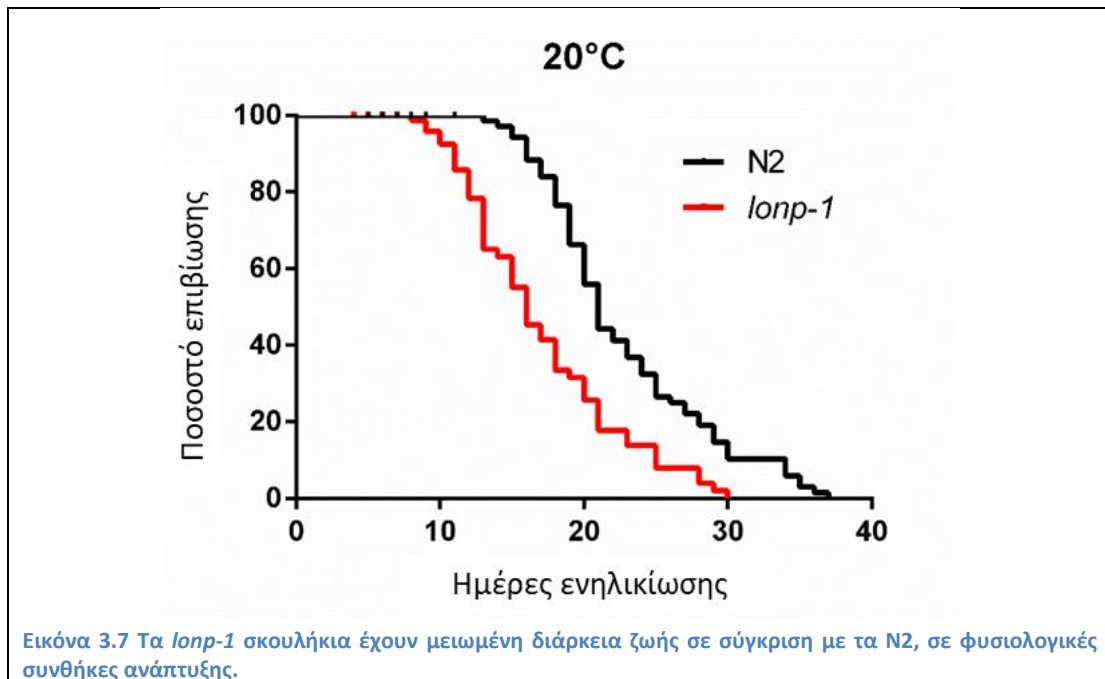
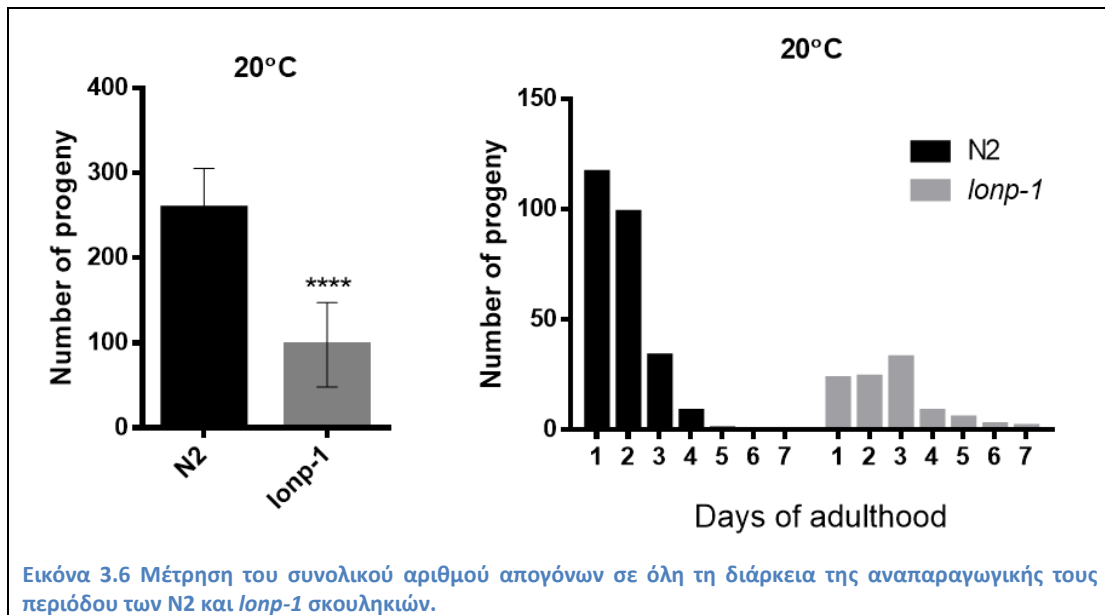
3.2 Η πρωτεάση LONP-1 στον *C. elegans* απαιτείται για τη φυσιολογική ανάπτυξη, γονιμότητα και διάρκεια ζωής του.

Χαρακτηρίζοντας το μεταλλαγμένο στέλεχος *lonp-1(tm5171)*, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου [113], δείχθηκε ότι τα σκουλήκια που τους λείπει η πρωτεάση LON είναι βιώσιμα, εν αντιθέσει ομόζυγων μεταλλαγμένων ποντικών για τη LON που είναι μη βιώσιμοι [45]. Τα *lonp-1(tm5171)* άτομα όμως έχουν καθυστερημένη ανάπτυξη και μικρότερη εναπόθεση αυγών. Πιο συγκεκριμένα τα *lonp-1* σκουλήκια επιδεικνύουν καθυστερημένη και ασυγχρόνιστη ανάπτυξη καθώς την 4^η μέρα στους 20°C βρίσκονται στο

3^ο-4^ο λαρβικό στάδιο, εν αντιθέσει με τα αγρίου τύπου (N2) σκουλήκια που έχουν γίνει ενήλικα, με αυγά, από την 3^η ημέρα (Εικ. 3.5).



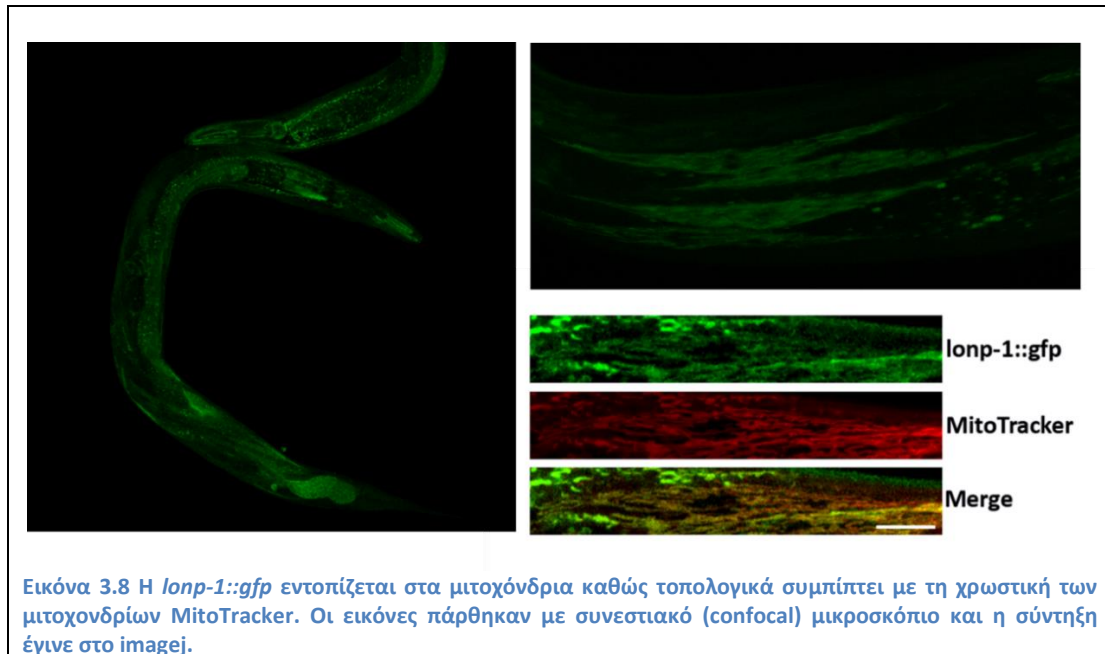
Φαινοτυπικά, τα *lonp-1* σκουλήκια είναι μικρότερα και πιο ανοιχτόχρωμα συγκριτικά με του αγρίου τύπου και δίνουν μειωμένο πληθυσμό απογόνων χωρίς όμως να παρατείνεται εκτενώς η περίοδος εναπόθεσης των αυγών (Εικ. 3.6). Επιπλέον, τα *lonp-1* σκουλήκια έχουν μειωμένη διάρκεια ζωής σε πιάτα με τροφή το στέλεχος βακτηρίων *E.coli*, OP-50. Ο μέσος όρος ενήλικης ζωής των *lonp-1* είναι 14 ημέρες εν αντιθέσει του αγρίου τύπου που είναι 22 (Εικ. 3.7).



3.3 Η έλλειψη του γονιδίου *lonp-1* επηρεάζει τη μιτοχονδριακή δομή και πρωτεϊνική ομοιόσταση στο νηματώδη.

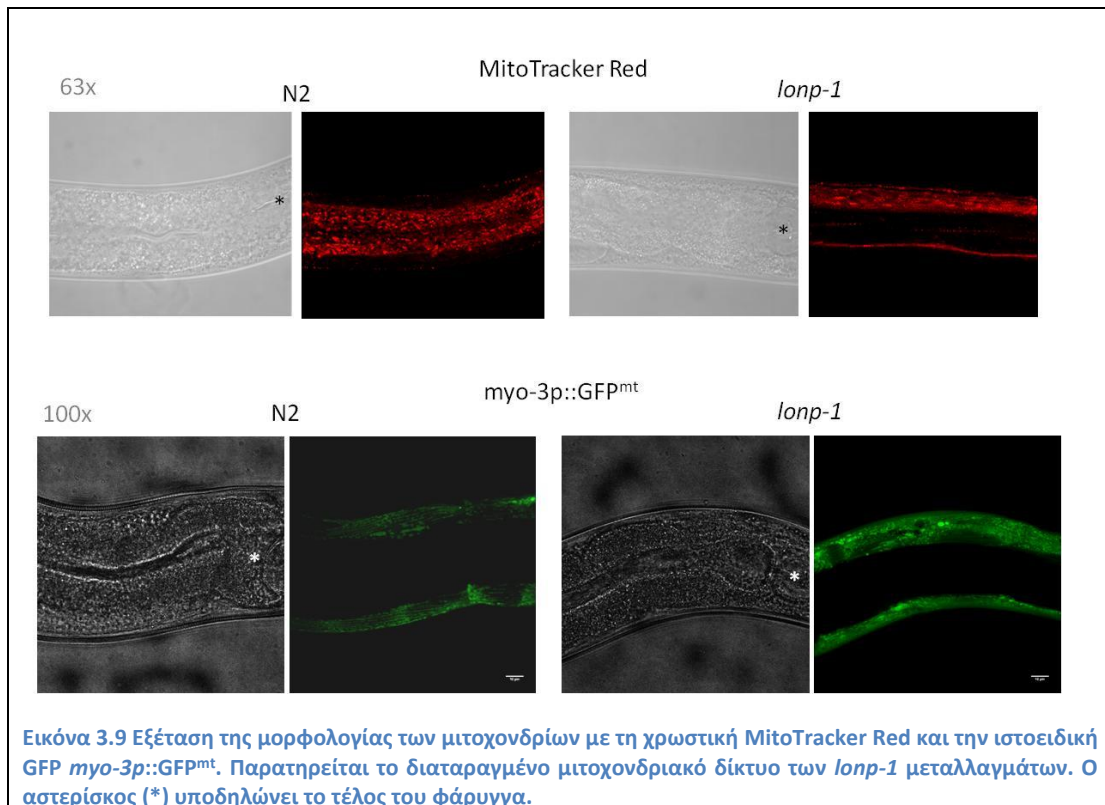
Για να επιβεβαιωθεί πως η προβλεπόμενη πρωτεΐνη LONP-1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια του *C. elegans* και πως οι παραπάνω φαινότυποι του *lonp-1(tm5171)* οφείλονται στην έλλειψή της χρησιμοποιήθηκαν κάποια διαγονιδιακά στελέχη (BRF663) που είχαν δημιουργηθεί σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο (114). Τα διαγονίδια αυτών φέρουν την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *lonp-1* σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP, Green Fluorescence Protein), υπό τον έλεγχο μιας περιοχής αναρροϊκά του γονιδίου *lonp-1*. Η περιοχή αυτή δεν αποτελεί τον πλήρη υποκινητή του γονιδίου (καθώς πιθανώς απαιτούνται και αλληλουχίες στην αρχή του οπερονίου), έχει όμως

χρησιμοποιηθεί σε άλλα διαγονιδιακά στελέχη, που φέρουν μόνο αυτήν την περιοχή σε σύντηξη με το γονίδιο *gfp*, και δημιουργήθηκαν στα πλαίσια μαζικής ανάλυσης των μεταγραφημάτων του *C. elegans* [114, 115]. Φαινοτυπικά, τα *lonp-1::gfp* διαγονίδια έσωζαν μερικώς την καθυστερημένη ανάπτυξη και τη μειωμένη διάρκεια ζωής των *lonp-1* σκουληκιών (δεδομένα δεν παρουσιάζονται, [113]), υποδεικνύοντας ότι είναι λειτουργικά. Παρατηρείται φθορίζων σήμα της GFP σε όλους τους ιστούς του σκουλήκιου, χαμηλής όμως έντασης, υποδηλώνοντας πιθανά ανεπαρκή επίπεδα έκφρασης εξαιτίας είτε λόγω της έλλειψης στοιχείων που προηγούνται του υποκινητή στο 5' άκρο του οπερονίου είτε λόγω χρησιμοποίησης του cDNA του *lonp-1* (όπου λείπουν εσώνια που ενισχύουν την έκφραση) ή ακόμη και λόγω τοξικότητας από την υπερέκφραση του διαγονιδίου σε εξωχρωμοσωμικές συστοιχίες. Όμως, η υποκυτταρική κατανομή ήταν χαρακτηριστική των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και η χρώση των μιτοχονδρίων αυτών των διαγονιδιακών σκουληκιών με τη χρωστική MitoTracker Red CMXRos (M7512, Invitrogen) έδειξε ότι η πρωτεΐνη LONP-1::GFP συμπίπτει με τα μιτοχονδρία στα τοιχώματα των μυών του σώματος (Εικ. 3.8).

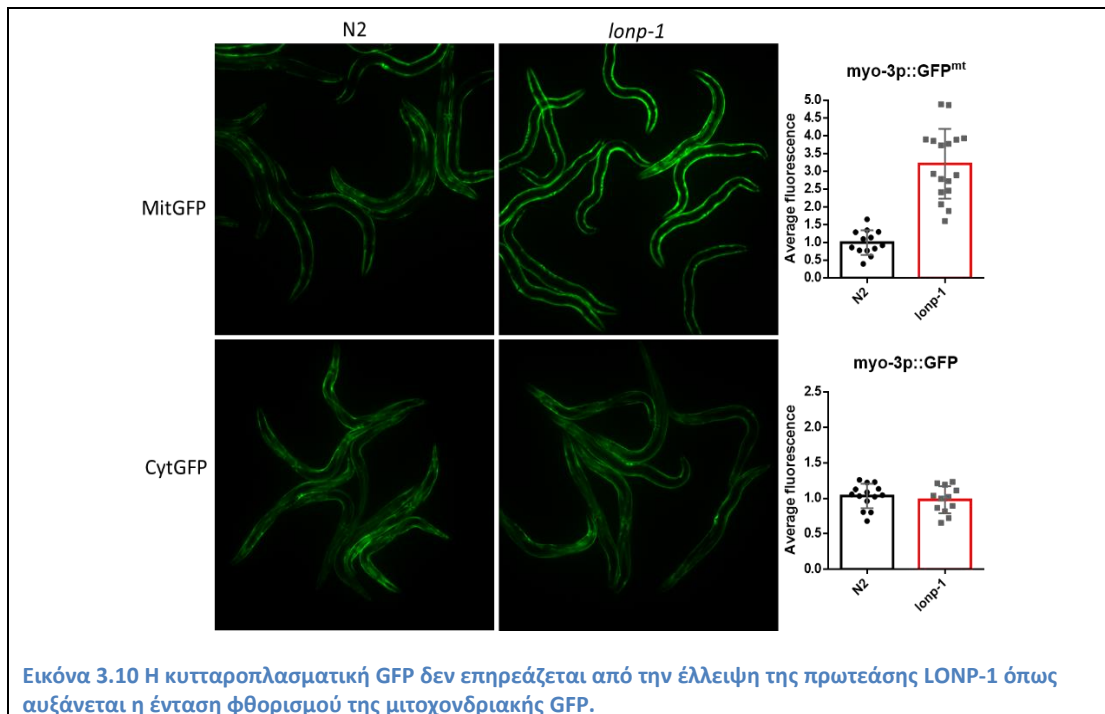


Εικόνα 3.8 Η *lonp-1::gfp* εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια καθώς τοπολογικά συμπίπτει με τη χρωστική των μιτοχονδρίων MitoTracker. Οι εικόνες πάρθηκαν με συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο και η σύντηξη έγινε στο imagej.

Επίσης η απώλεια του *lonp-1* θα πρέπει να επηρεάζει τη μιτοχονδριακή δομή και ενδεχομένως τη λειτουργία τους, αφού εξέταση της μιτοχονδριακής μορφολογίας με τη χρώση MitoTracker Red στα μεταλλαγμένα στελέχη *lonp-1(tm5171)* έδειξε ότι το μιτοχονδριακό δίκτυο μειώθηκε σε αυτά σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου (N2) σκουλήκια (Εικ. 3.9A). Χρησιμοποιώντας ένα ακόμη διαγονίδιο που εκφράζει μία μιτοχονδριακή GFP αναφοράς υπό τον έλεγχο του υποκινητή *myo-3* (*myo-3_p::GFP^{mt}*, έκφραση στους μύες του ζώου), παρατηρήθηκε διαταραγμένη μιτοχονδριακή μορφολογία με ακανόνιστο μέγεθος και σχήμα μιτοχονδρίων στα *lonp-1* σκουλήκια. Αντίθετα, στα αγρίου τύπου ζώα υπήρχε το φυσιολογικό δίκτυο μιτοχονδριακών σωληνίσκων που εκτείνεται παράλληλα με τα μυοϊνίδια (Εικ. 3.9B).



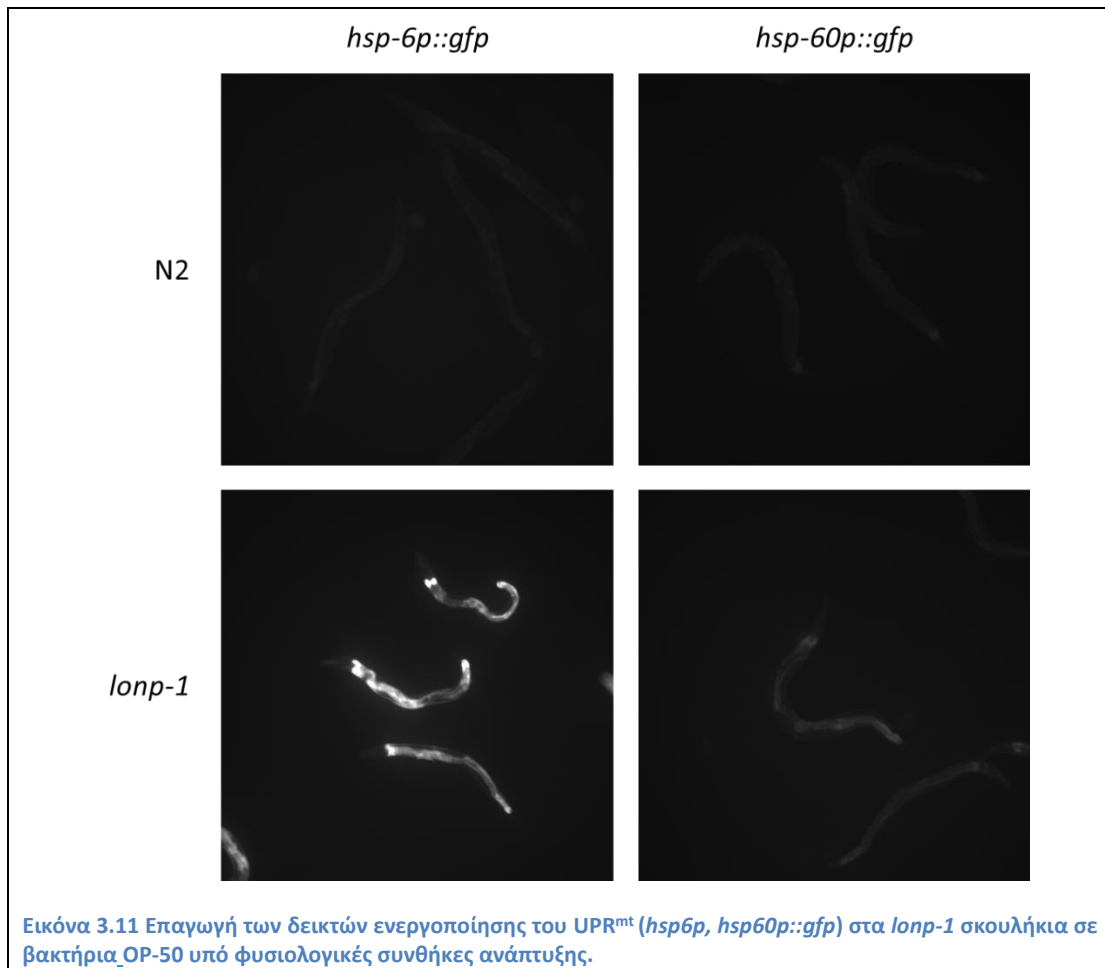
Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ζώα *lonp-1* που εκφράζουν κυτταροπλασματική GFP υπό τον έλεγχο του *myo-3*. Συγκριτικά με την αυξημένη ένταση της μιτοχονδριακής GFP στους μύες των τοιχωμάτων του σώματος των *lonp-1* σκουληκιών σε σχέση με τα N2, η κυτταροπλασματική GFP δεν έδειξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο στελέχη (Εικ 3.10). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι αυτή η αύξηση της έντασης της μιτοχονδριακής GFP έχει συνδυαστεί με τα κατακερματισμένα μιτοχόνδρια που έχουν ζώα που βιώνουν μιτοχονδριακό στρες. Ειδικά η αυξημένη έκφραση της μιτοχονδριακής GFP λόγω του ισχυρού υποκινητή *myo-3* έχει προταθεί πως διαταράσσει το μιτοχονδριακό περιβάλλον αναδίπλωσης πρωτεϊνών και αλληλεπιδρά αρνητικά με γενετικές βλάβες που συνδέονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία [67].



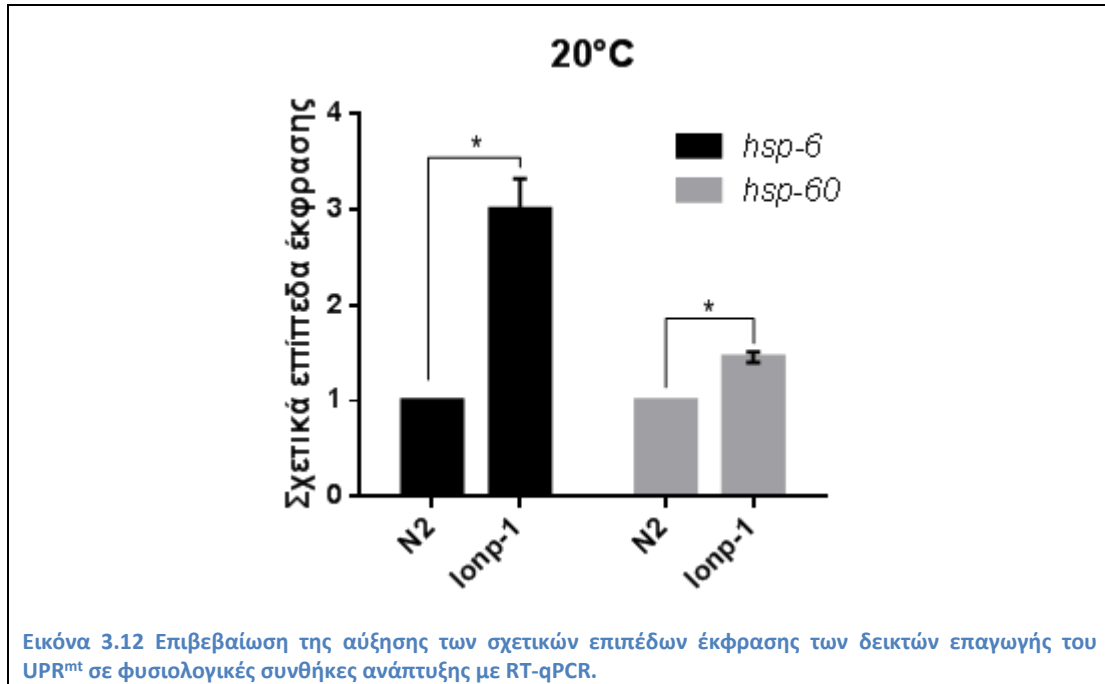
Εικόνα 3.10 Η κυτταροπλασματική GFP δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της πρωτεάσης LONP-1 όπως αυξάνεται η ένταση φθορισμού της μιτοχondριακής GFP.

3.4 Επαγωγή του UPR^{mt} στα *lonp-1* σκουλήκια

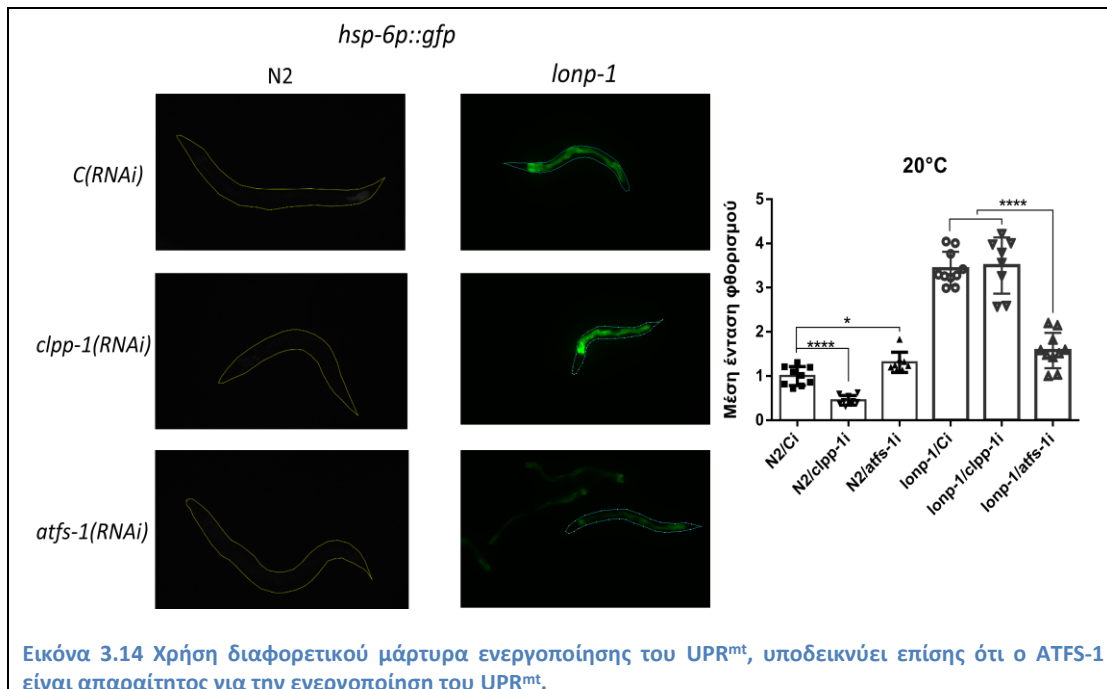
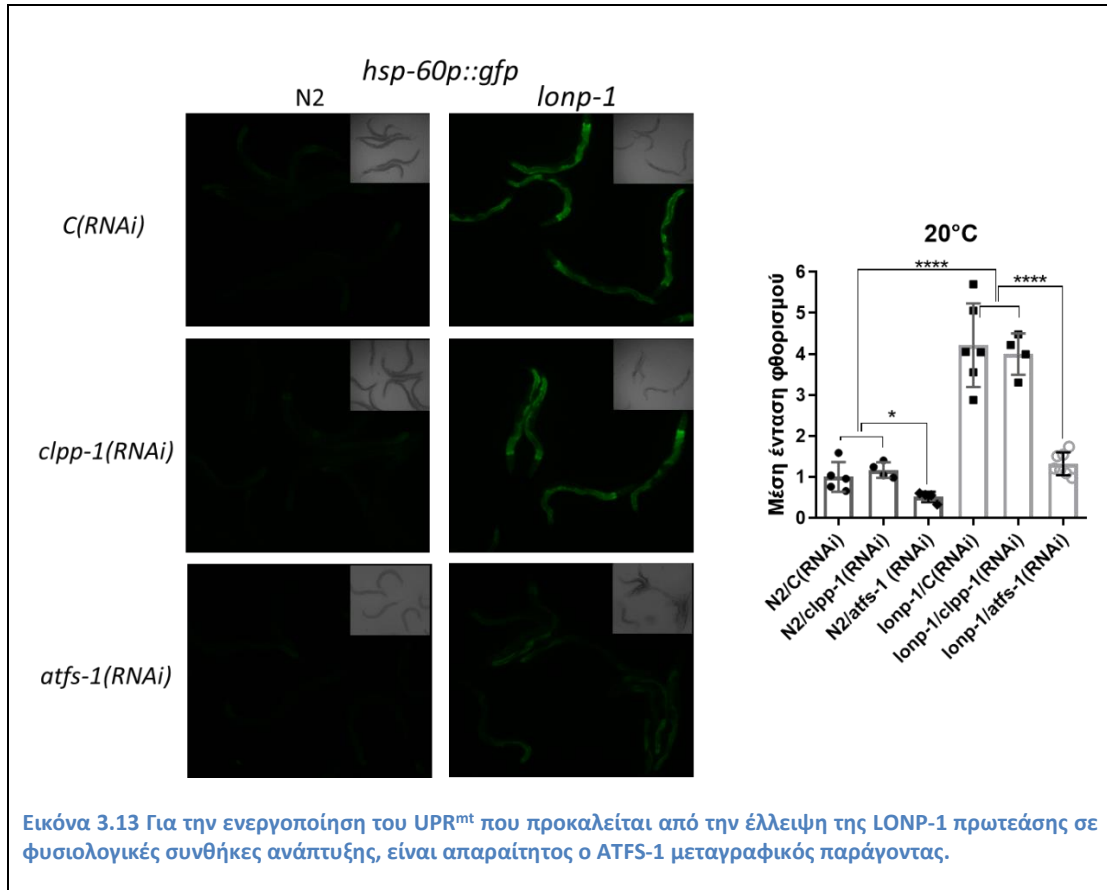
Οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις υποδεικνύουν μια διαταραχή της μιτοχondριακής λειτουργίας στα μεταλλαγμένα ζώα *lonp-1*, υπονοώντας έναν προστατευτικό ρόλο της πρωτεάσης LONP-1 στο μιτοχondριακό περιβάλλον αναδίπλωσης πρωτεϊνών του *C. elegans*. Προκειμένου να ελεγχθεί αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη με δύο αναγνωρισμένους δείκτες του μιτοχondριακού στρες, τους *hsp-60p::gfp* και *hsp-6p::gfp*, που τα βασικά επίπεδα έκφρασής τους είναι μετά βίας ανιχνεύσιμα, αλλά επάγονται ισχυρά κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης του UPR^{mt} [69]. Εισάγοντας αυτούς τους δείκτες στα *lonp-1* σκουλήκια, παρατηρήθηκε μεγάλη επαγωγή των δύο δεικτών σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των ζώων, αποδεικνύοντας αυξημένα επίπεδα ενδογενούς μιτοχondριακού στρες, πιθανώς λόγω της διαταραγμένης μιτοχondριακής πρωτεϊνικής ομοιόστασης (Εικ. 3.11).

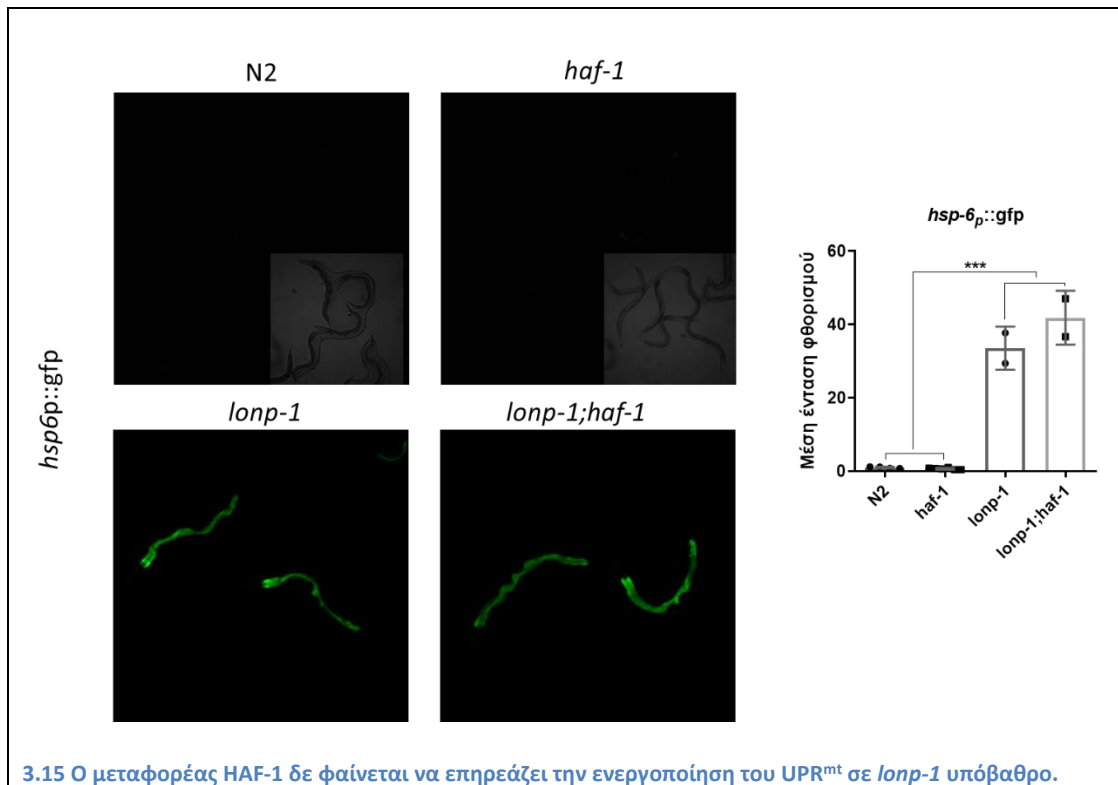


Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας και χωρίς τη χρήση των παραπάνω διαγονιδίων, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης των ενδογενών γονιδίων *hsp-6* και *hsp-60*, σε N2 και *lonp-1* σκουλήκια, μέσω RT-qPCR. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.12, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των δύο τσαπερονών είναι υψηλότερα σε *lonp-1* υπόβαθρο, με αντίστοιχο τρόπο με τα διαγονίδια.



Στη συνέχεια, έγινε γονιδιακή αποσιώπιση με RNAi για δύο συστατικά του UPR^{mt}, τα γονίδια *atfs-1* και *clpp-1* και μελετήθηκε η ένταση της GFP στους *hsp-60p::gfp* και *hsp-6p::gfp* δείκτες (Εικ. 3.13, 3.14). Η επαγωγή του UPR^{mt} στα *lonp-1* μεταλλάγματα δεν εμποδίστηκε από την αποσιώπιση του *clpp-1*, που κωδικοποιεί για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση CLPP-1 που δρα αναρροϊκά του μονοπατιού του μιτοχονδριακού στρες και συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του UPR^{mt}. Αντιθέτως, αποσιώπιση του *atfs-1*, που κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα που δρα καταρροϊκά του UPR^{mt}, μείωσε την ένταση του φθορισμού. Επομένως, η δράση του ATFS-1 είναι απαραίτητη για την επαγωγή του UPR^{mt} στα *lonp-1* σκουλήκια. Έχει αναφερθεί ότι το RNAi για το *lonp-1* δεν φαίνεται να επηρεάζει την πυρηνική εισαγωγή ή τη λειτουργία του ATSF-1 υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες [70, 74]. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι αυτό ισχύει και στο μεταλλαγμένο στέλεχος *lonp-1*. Ακόμη, με την εισαγωγή του δείκτη *hsp-6p::gfp* σε διπλά μεταλλαγμένα ζώα *lonp-1;haf-1*, παρατηρήθηκε πως ούτε ο HAF-1 είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* μεταλλάγματα.





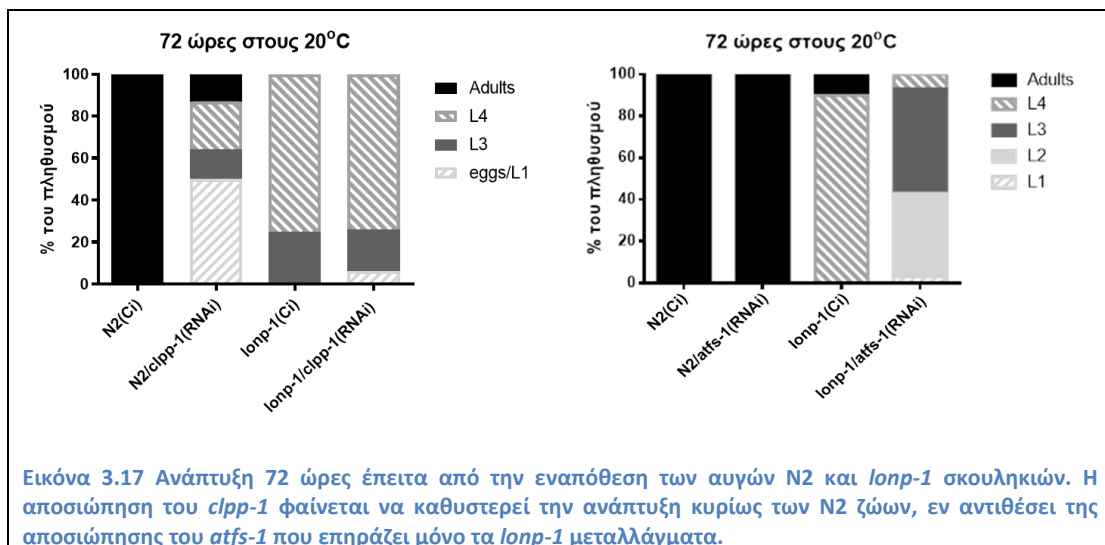
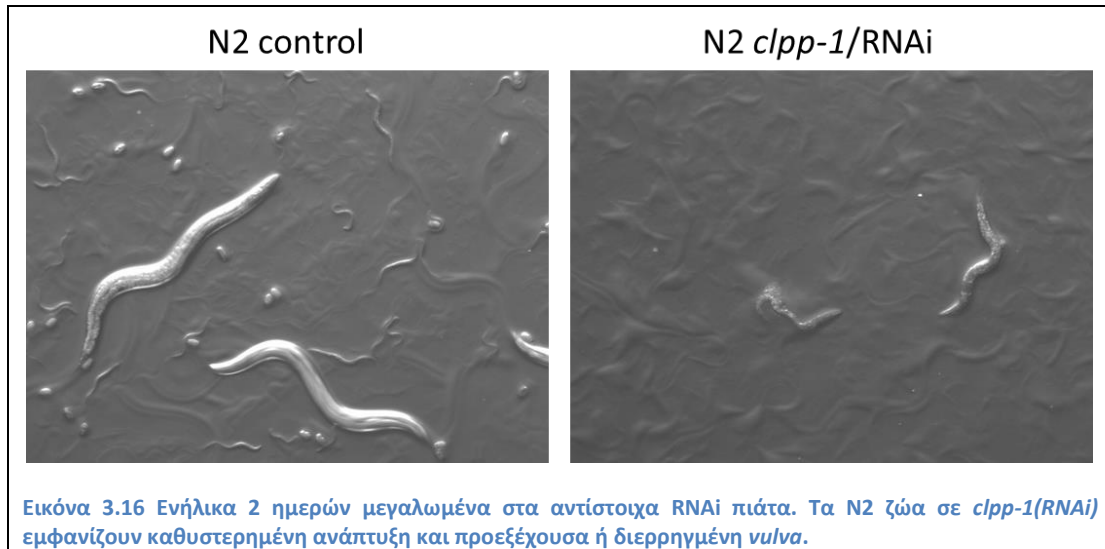
3.5 Επίδραση συσταστικών του UPR^{mt} στη διάρκεια ζωής του νηματώδη

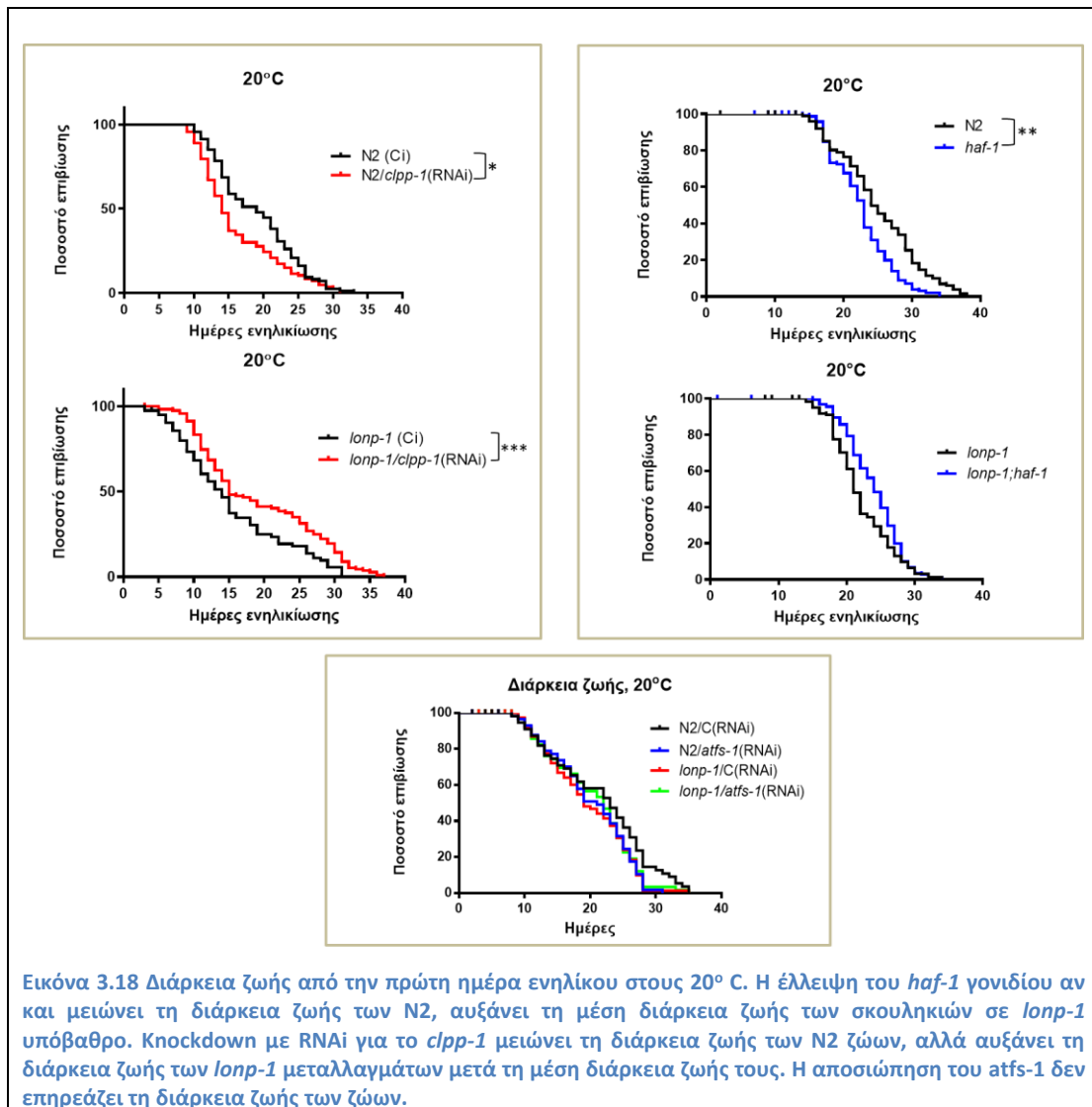
Δεδομένου του ρόλου των HAF-1, CLPP-1 και ATFS-1 στην επαγωγή του UPR^{mt} και των (αμφιλεγόμενων) επιδράσεων αυτής της απόκρισης στη μακροβιότητα, εξετάστηκε η επίδραση της ανεπάρκειας καθενός γονιδίου στη διάρκεια ζωής N2 και *lonp-1* ζώων. Έλλειψη του *haf-1*, αν και αναπτυξιακά δεν παρουσίασε καθυστέρηση συγκριτικά με τα N2, μείωσε την κανονική διάρκεια ζωής. Σε *lonp-1* υπόβαθρο επίσης δεν είχε σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους, αλλά φαίνεται να αυξάνει τη μέση διάρκεια ζωής τους, τουλάχιστον στο πρώτο πείραμα που ολοκληρώσαμε.

Η αποσιώπηση της λειτουργίας του *clpp-1*, έγινε μέσω RNAi σε N2 και *lonp-1* σκουλήκια, σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, προκειμένου να διερευνησουμε την επίδραση που έχει σε αναπτυξιακά γεγονότα αλλά και στη διάρκεια ζωής. Στα αγρίου τύπου σκουλήκια παρατηρήθηκε προεξέχουσα *vuIna* (γεννητικό άνοιγμα του νηματώδη) με ελάχιστους απογόνους, που όσοι επιβιώνουν είναι στείροι, ακόμη και όταν το RNAi χορηγείται από την πρώτη μέρα ενηλικίωσης (Εικ. 3.16). Η διάρκεια ζωής τους ήταν επίσης σημαντικά μικρότερη από τα N2 σκουλήκια μεγαλωμένα σε control (RNAi) πιάτα (τουλάχιστον στα 2 από τα 3 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, Πίνακας 3.1 και Εικ. 3.18), υποδηλώνοντας ότι το *clpp-1* είναι κρίσιμο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του ζώου. Αντιθέτως, στα *lonp-1* μεταλλάγματα που έγινε αποσιώπηση της *clpp-1* σπάνια παρατηρήθηκε προεξέχουσα βούλβα και είχαν αυξημένη διάρκεια ζωής, ειδικά μετά τη μέση διάρκεια της ζωής τους (Πίνακας 3.1 και Εικ. 3.18).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της αποσιώπησης του *atfs-1*(RNAi) στη φυσιολογία των σκουληκιών. Το *atfs-1*(RNAi) δεν φαίνεται να επιδρά στην ανάπτυξη των N2 σκουληκιών σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης ούτε μειώνει τη διάρκεια ζωής τους.

Αντιθέτως τα *lonp-1* σκουλήκια δείχνουν καθυστερημένη και ασυγχρόνιστη ανάπτυξη χωρίς όμως πάλι να επιδρά στη διάρκεια ζωής τους. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι έγιναν πολλαπλές προσπάθειες απόκτησης του διπλού μεταλλάγματος *lonp-1;atfs-1* αλλά χωρίς επιτυχία, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι απόγονοι δεν ήταν βιώσιμοι. Επομένως, ο παράγοντας ATFS-1 είναι απαραίτητος για την εμβρυογένεση και ανάπτυξη των *lonp-1* μεταλλαγμάτων αλλά δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των ενήλικων ατόμων, τουλάχιστον κάτω από κανονικές συνθήκες διαβίωσης.





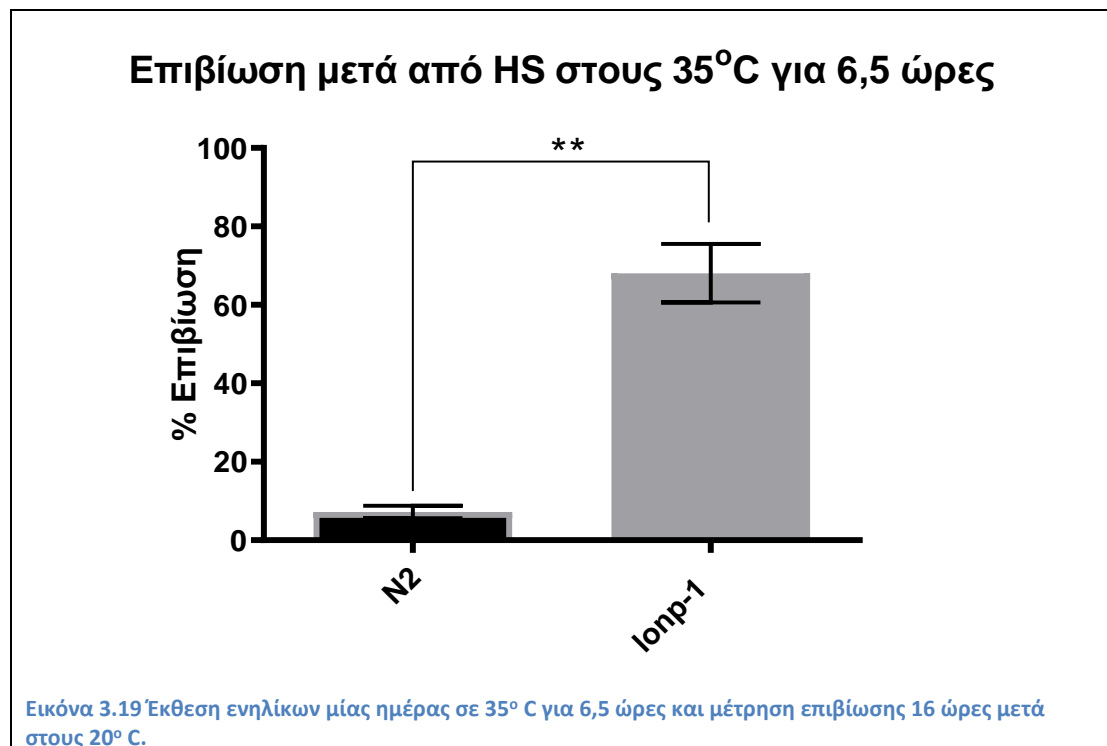
Πίνακας 3.1 Μέση διάρκεια ζωής των στελεχών σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (όλες οι επαναλήψεις).

Στέλεχος	Μέση διάρκεια ζωής	°C	p-value	
			vs N2	vs <i>lonp-1</i>
N2	22	20		
BRF548 (<i>lonp-1</i>)	14		0.0010 (***)	
N2	21	20		
BRF548	16		0.0001 (***)	
N2	24	20		
BRF548	21		<0.0001 (****)	
RB867 (<i>haf-1</i>)	23		<0.0001 (****)	
BRF734 (<i>lonp-1;haf-1</i>)	24		0.0005 (***)	0.0054 (**)
N2/C(RNAi)	20	20		
N2/ <i>clpp-1</i> (RNAi)	20		0.8897(ns)	
BRF548/C(RNAi)	14		0.0111(*)	

BRF548/ <i>clpp-1(RNAi)</i>	15		0.1584 (ns)	0.0008(***)
N2/C(RNAi)	19	20		
N2/ <i>clpp-1(RNAi)</i>	14		0.0119 (*)	
N2/C(RNAi)	21			
N2/ <i>clpp-1(RNAi)</i>	17	20	<0.0001(****)	
BRF548/C(RNAi)	21		0.1276 (ns)	
BRF548/ <i>clpp-1(RNAi)</i>	23		<0.0001(****)	<0.0001(****)
N2/C(RNAi)	23			
N2/ <i>atfs-1(RNAi)</i>	22	20	0.1150 (ns)	
BRF548/C(RNAi)	19		0.0283 (*)	
BRF548/ <i>atfs-1(RNAi)</i>	22		0.9155 (ns)	0.6738(ns)

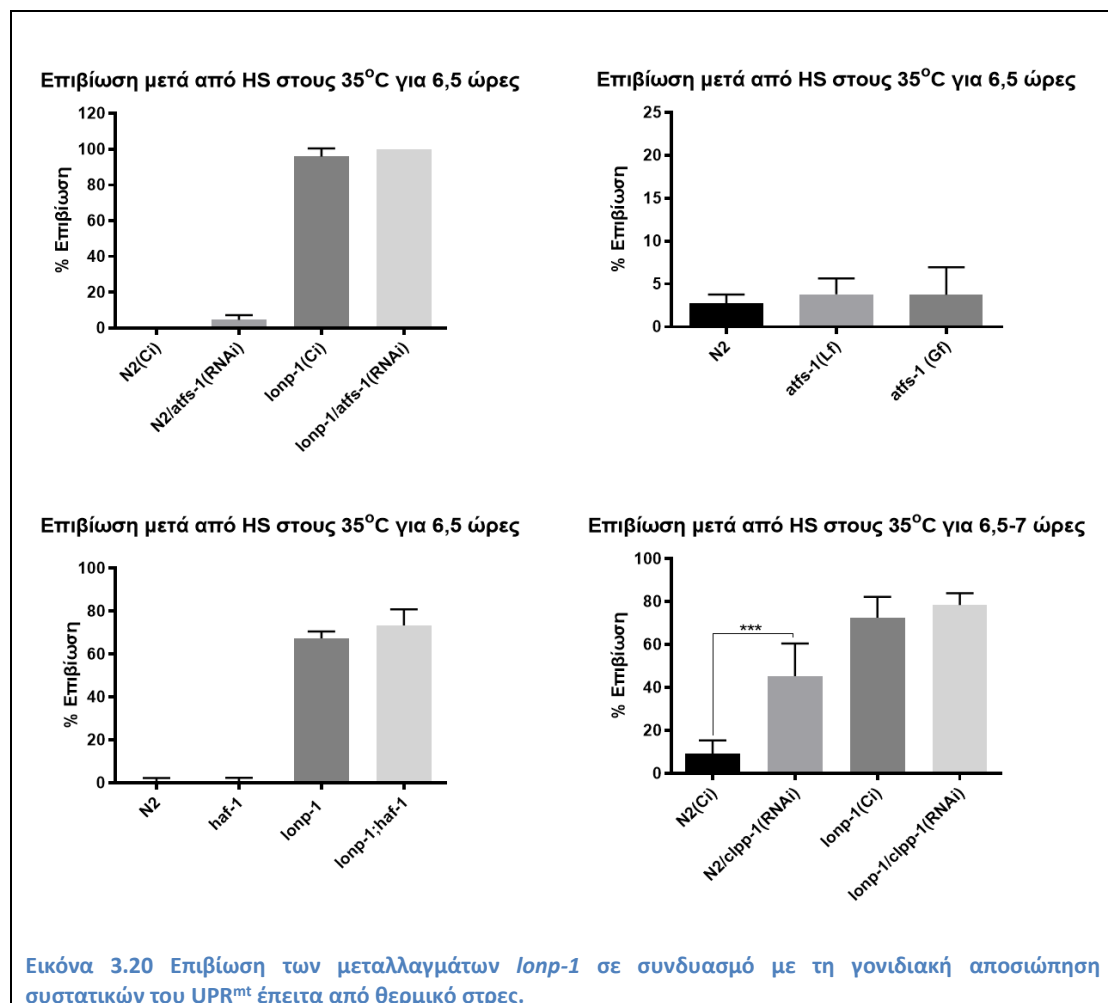
3.5 Τα μεταλλάγματα *lonp-1* είναι ανθεκτικά στο θερμικό σοκ

Προηγούμενη μελέτη του εργαστήριου έχει επίσης δείξει ότι έκθεση των σκουληκιών στους 35°C για 6,5 ώρες, έχει σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης στα *lonp-1* μεταλλάγματα συγκριτικά με του αγρίου τύπου (Εικ. 3.19).



Στην προσπάθεια να βρεθεί αν υπάρχει συσχέτιση της ανθεκτικότητας αυτής του *lonp-1* με την επαγωγή του UPR^{mt} που δείχθηκε προηγουμένως, εξετάστηκε ο ρόλος των *haf-1*, *atfs-1* και *clpp-1* στο θερμικό σοκ (HS, heat shock). N2 και *lonp-1* σκουλήκια μεγαλωμένα για δύο γενιές σε *atfs-1(RNAi)* (για πιο αποτελεσματική αποσιώπιση του γονιδίου), έπειτα από HS για 6,5 ώρες στους 35° C, δεν έδειξαν κάποια διαφορά στην επιβίωσή τους (Εικ. 3.20A). Αυτό δείχνει ότι ο ATFS-1 δεν απαιτείται για τη θερμοανθεκτικότητα των *lonp-1* ζώων. Κάτι που συμφωνεί με αυτό, είναι το γεγονός ότι αγρίου τύπου σκουλήκια που είχαν υπερενεργοποιημένο τον ATFS-1, λόγω μιας μεταλλαγής απόκτησης λειτουργίας του *atfs-1*

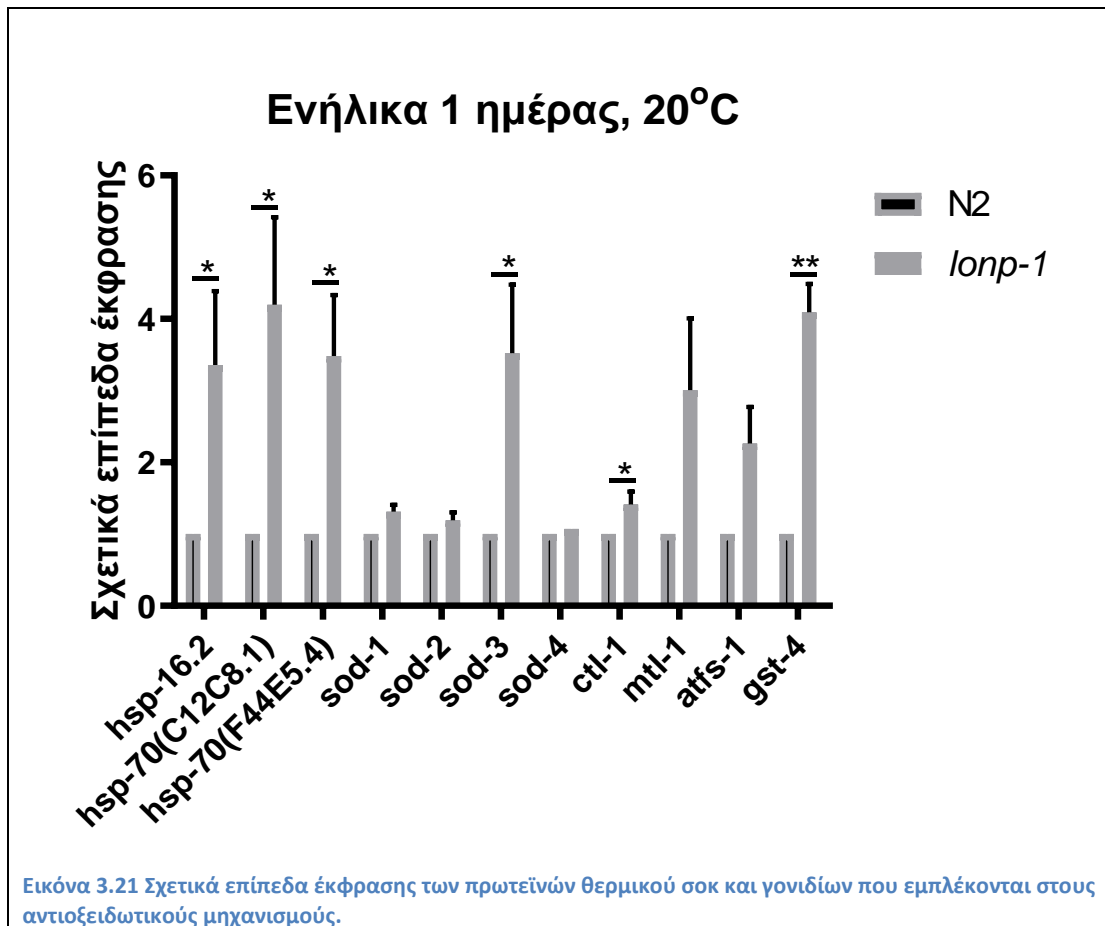
(gf, gain of function), δεν έδειξαν αυξημένη επιβίωση στο θερμικό σοκ, σε σχέση με τους μάρτυρες, ή με σκουλήκια που έφεραν μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας στο *atfs-1* (lf, loss of function). Οπότε η αύξηση της ενεργότητας του ATF5-1 δεν προσφέρει κάποια θερμοανθεκτικότητα ούτε στο wt (Εικ. 3.20B). Αντίστοιχα, η έλλειψη του *haf-1* δεν επηρέασε ούτε την ευαισθησία του αγρίου τύπου (WT vs *haf-1* στην Εικ. 3.20Γ) ούτε τη θερμοανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1* (Εικ. 3.20Γ, *lonp-1* vs *lonp-1;haf-1*). Αντίθετα, η μείωση έκφρασης του γονιδίου *clpp-1* στο στέλεχος αγρίου τύπου οδήγησε σε αυξημένη επιβίωση των σκουληκιών στις 6,5 ώρες HS, παρότι η επίδραση του *clpp-1(RNAi)* ήταν μόνο για μια γενιά, λόγω αδυναμίας των N2 σκουληκιών να αφήσουν βιώσιμους απογόνους στη 2^η γενιά. Επίσης δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην θερμοανθεκτικότητα των *lonp-1* σκουληκιών, ακόμη και μετά από 7 ώρες HS (Εικ. 3.20Δ). Αυτό πιθανώς υποδεικνύει ένα κοινό μηχανισμό αντιμετώπισης του θερμικού σοκ και στα δύο στελέχη που έχουν απώλεια λειτουργίας κάποιας από τις πρωτεΐνες αυτές.



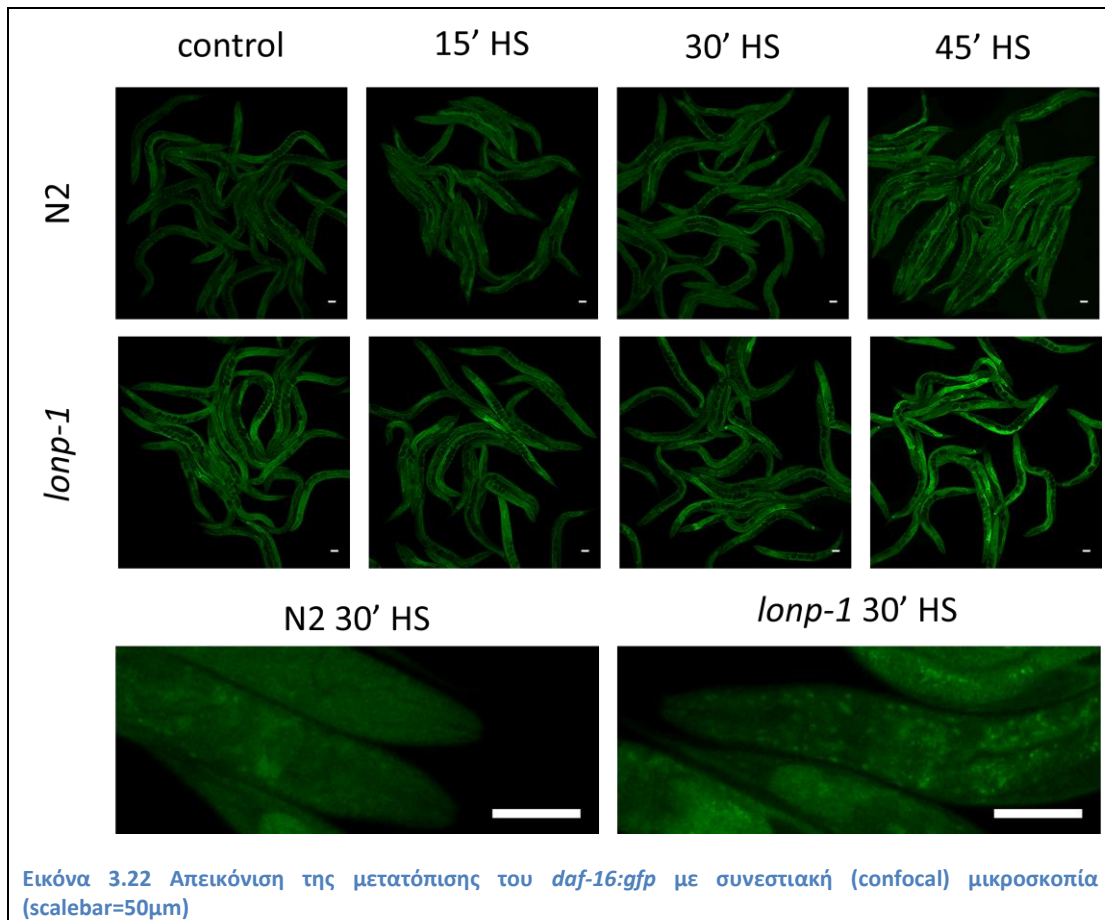
3.6 Η LONP-1 ρυθμίζει τη μετατόπιση του DAF-16

Μια άμεση απόκριση στο θερμικό σοκ, σε όλους τους οργανισμούς είναι τα αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών θερμικού σοκ (*hsp*, heat shock proteins), που δρουν ως τσαπερόνες και προστατεύουν τις κυτταρικές πρωτεΐνες υπό θερμική καταπόνηση. Έτσι, προκειμένου να κατανοήσουμε το μηχανισμό πίσω από την θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-*

1, μετρήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *hsp* στους 20° C, τη φυσιολογική θερμοκρασία ανάπτυξης των σκουληκιών (Εικ. 3.21). Παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια για τα μέλη της οικογένειας των *hsp-70* στο *C. elegans* (C12C8.1, F44E5.4), όπως και το γονίδιο *hsp-16.2*, ομόλογο της ανθρώπινης κρυσταλλίνης, είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (2- έως 4-φορές) συγκριτικά με τα N2, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μεταλλάγματα *lonp-1* έχουν χαμηλότερο κατώτατο όριο θερμοκρασίας για να επάγουν τη μεταγραφή των *hsps*. Αυτό ίσως εξηγεί και την αυξημένη θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1*. Παρατηρήθηκαν επίσης αυξημένα βασικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, όπως η μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (*sod-3*), η κυταροπλασματική καταλάση (*ctl-1*) και η μεταλλοπρωτεΐνάση (*mtl-1*) (Εικ. 3.21). Παρουσιάζει ενδιαφέρον πως η έκφραση όλων των παραπάνω γονιδίων (*hsp-70*, *hsp-16.2*, *sod-3*, *ctl-1* και *mtl-1*) εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα DAF-16 [96, 116, 117]. Ο DAF-16 ρυθμίζεται αρνητικά από στοιχεία αναρροϊκά του μονοπατιού της ινσουλίνης (IIS), αλλά υπό οξειδωτικό ή θερμικό στρες εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί, μεταξύ των άλλων και γονίδια που απαιτούνται για την αντοχή στο στρες και την αύξηση διάρκειας ζωής [118]. Τα γονίδια *sod-1* και *sod-2*, που παρέχουν στο νηματώδη το μεγαλύτερο μέρος της δραστηριότητας του SOD και δεν εξαρτώνται από τον DAF-16, δεν έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα *lonp-1* σκουλήκια. Αυτή ίσως είναι μία εξήγηση γιατί δεν έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα των *lonp-1* στο οξειδωτικό στρες. Επίσης, τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η έλλειψη του *lonp-1* ανεβάζει και τα βασικά επίπεδα έκφρασης του *atfs-1*, εκτός από τα μιτοχονδριακά επίπεδα της πρωτεΐνης και τον κυταροεντοπισμό της, συνεισφέροντας πιθανώς στην επαγωγή του UPR^{mt} σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο.

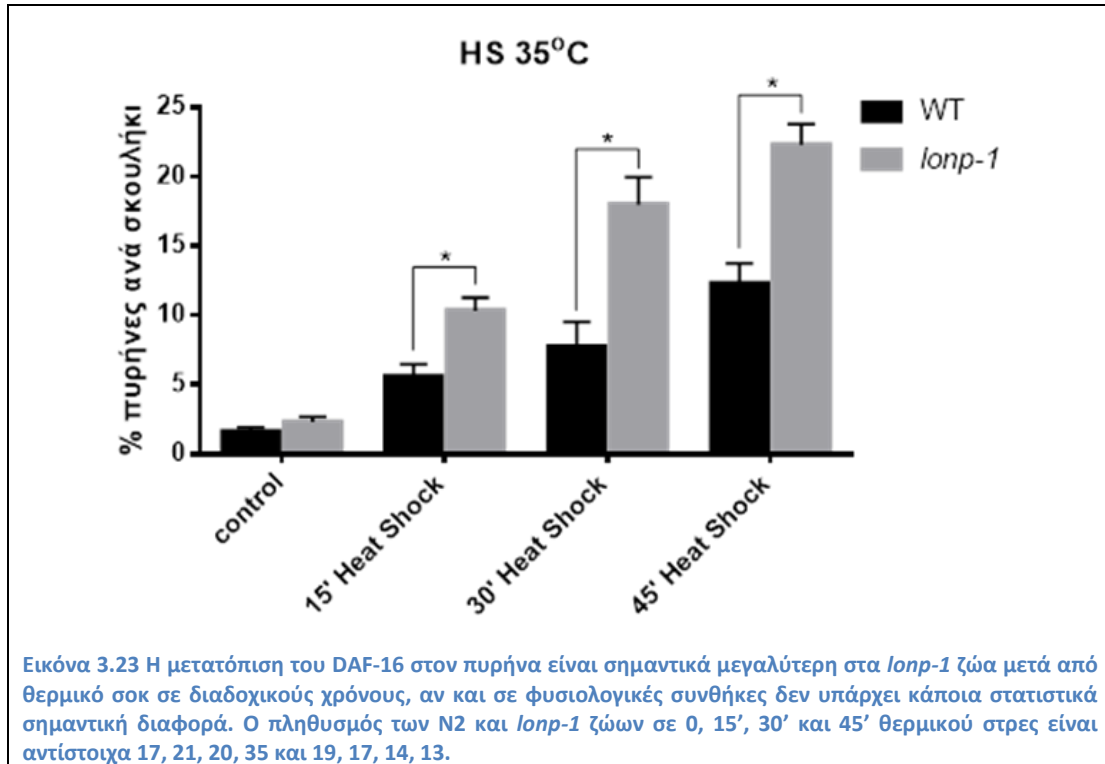


Λόγω του ότι παρατηρήθηκε αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης στόχων του DAF-16, ελέγχθηκε η υπόθεση ότι η απώλεια της *lonp-1* επηρεάζει άμεσα την έκφραση και δράση του DAF-16. Δημιουργώντας *lonp-1* στελέχη που φέρουν τη φθορίζουσα πρωτεΐνη *daf-16p::DAF-16a::GFP* (για την ισομορφή α της πρωτεΐνης) ελέγχθηκε με συνεστιακή (confocal) μικροσκοπία φθορισμού ο κυτταρικός εντοπισμός του DAF-16a::GFP στα *lonp-1* μεταλλάγματα (Εικ. 3.22).



Εικόνα 3.22 Απεικόνιση της μετατόπισης του *daf-16:gfp* με συνεστιακή (confocal) μικροσκοπία (scalebar=50μm)

Παρατηρείται πως στα *lonp-1* ζώα έχουμε μεγαλύτερη ένταση φθορισμού, σε φυσιολογικές συνθήκες (control), γεγονός που υποδεικνύει επαγωγή της έκφρασης του DAF-16 σε *lonp-1* υπόβαθρο. Αυτό απομένει να επιβεβαιωθεί και με RT-qPCR στο ενδογενές γονίδιο *daf-16*. Για να ελεγχθεί η μετατόπιση του DAF-16 στον πυρήνα, μετρήθηκαν οι φθορίζοντες πυρήνες κάθε ζώου και βγήκε ο μέσος όρος πυρήνων ανά σκουλήκι. Στις φυσιολογικές συνθήκες, παρά το αυξημένο σήμα φθορισμού στο στέλεχος *lonp-1*, δεν φαίνεται να μετατοπίζεται σημαντικά ο DAF-16 στον πυρήνα. Έπειτα όμως από θερμικό σοκ μικρής διάρκειας, στους 35°C, σε διαδοχικούς χρόνους 15, 30 και 45 λεπτών, ο DAF-16 μετατοπίζεται σημαντικά πιο γρήγορα στον πυρήνα των *lonp-1* σκουληκιών συγκριτικά με τα N2 (Εικ. 3.23). Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται η προηγούμενη υπόθεση ότι η απώλεια της LON πιθανώς επάγει την έκφραση και ενεργότητα του DAF-16 στον πυρήνα, για την επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στο θερμικό στρες. Πιθανώς, τα μεταλλαγμένα άτομα *lonp-1* να είναι πιο ανθεκτικά στο χαλκό ή βαρέα μέταλλα (λόγω επαγωγής του *ctl-1* ή *mtl-1*, αντίστοιχα). Επομένως, ένας νέος λειτουργικός ρόλος της πρωτεάσης LON είναι η ρύθμιση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16 υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και συνθήκες στρες.



Κεφάλαιο 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτεάση LON είναι εξελικτικά υψηλά συντηρημένη στα περισσότερα βακτηριακά είδη, στα Αρχαία και σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα [44]. Ανήκει στην AAA+ (ATPases Associated with diverse cellular Activities) οικογένεια πρωτεασών, της οποίας τα μέλη παίζουν κεντρικό ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο της διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης. Οι πρωτεάσες LON βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και τα υπεροξεισώματα [44]. Στα μιτοχόνδρια η LON είναι ένα διαλυτό ένζυμο στη μιτοχονδριακή μήτρα, που πιθανώς σχηματίζει μια διάταξη ανοικτού δακτυλίου έξι (σε βακτήρια και ανθρώπους) ή επτά (σε ζυμομύκητες) υπομονάδων. Η LON/Pim1p της ζύμης μπορεί να αποκατασταθεί λειτουργικά από τη βακτηριακή (*E. coli*) LON [119]. Ωστόσο λίγα είναι γνωστά για τις διάφορες λειτουργίες της σε ανώτερα είδη που σχετίζονται με τη διατήρηση της μιτοχονδριακής πρωτεϊνικής ομοιόστασης και της γονιδιακής ακεραιότητας, την ενίσχυση της μιτοχονδριακής βιογένεσης και τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής γονιδιακής έκφρασης [120]. Υπάρχει επίσης μέτρια γνώση σχετικά με την εκλεκτικότητα υποστρωμάτων της LON, η οποία πιθανότατα εξαρτάται από τα εγγενή χαρακτηριστικά του στοχευόμενου πολυπεπτιδίου, χωρίς να περιορίζεται απαραίτητα από τις οξειδωμένες και τις κακώς ή μη αναδιπλούμενες πρωτεΐνες. Μοντελοποίηση της δομής της LON στην περιοχή SSD έχει υποδείξει κοινή δομή άρα και συντηρημένη λειτουργία σε άνθρωπο, ζυμομήκυτα, βακτήριο (*E. coli*), φυτό (*A. thaliana*) και νηματώδη σκώληκα.

Σύμφωνα με τον προστατευτικό της ρόλο στη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης, τα επίπεδα έκφρασης της LON επάγονται κατά την οξεία οξειδωτική καταπόνηση, το θερμικό στρες και την υποξία [46]. Κατά τη διάρκεια όμως χρόνιου οξειδωτικού στρες ή κατά τη διάρκεια της γήρανσης, τα επίπεδα έκφρασης και η δραστηριότητα της LON πρωτεάσης μειώνονται, κάτι που μπορεί να προληφθεί με το θερμιδικό περιορισμό [60, 121], μια διατροφική παρέμβαση που επεκτείνει τη διάρκεια ζωής σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς. Μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπινους ινοβλάστες πνεύμονα, έχουν δείξει πως έχαναν την ικανότητά τους να επάγουν τη LON έπειτα από οξειδωτικό στρες όταν ήταν γηρασμένοι [60]. Καθώς η ανεπάρκεια της LON οδηγεί σε συσσώρευση καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια ζύμης και κυττάρων HeLa [122, 123], είναι πιθανό ότι η λειτουργία της σχετίζεται με τη γήρανση. Όντως, η απώλειά της στη ζύμη οδηγεί σε επιταχυνόμενη γήρανση, σε συνδυασμό με τη δημιουργία κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων πρωτεϊνών που ανέστειλαν τη δράση του πρωτεασώματος [124]. Αντίστοιχο πείραμα στον ασκομύκητα *Podospora anserina*, μείωσε τη διάρκεια ζωής του ενώ η υπερέκφραση της PaLon1 (ομόλογη της LON) οδήγησε σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής [125]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η απώλεια λειτουργίας της άλλης μιτοχονδριακής πρωτεάσης ClpP σε αυτόν τον μύκητα, προσδίδει μακροβιότητα [126]. Ωστόσο, ο ρόλος των μιτοχονδριακών πρωτεασών LON και ClpP στη γήρανση του *C. elegans* δεν έχει ακόμα διερευνηθεί.

Το γονίδιο *lonp-1* κωδικοποιεί για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LON στο *C. elegans*, όπως επιβεβαιώσαμε σε διαγονιδιακά άτομα που εκφράζουν τη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) συντηγμένη με τη LONP-1 και χρώσης των μιτοχονδρίων με MitoTracker Red. Για τη λειτουργία της μιτοχονδριακής LON στον *C. elegans* (LONP-1) είναι γνωστό μόνο ότι αποικοδομεί τον bZip μεταγραφικό παράγοντα ATFS-1 όταν αυτός εισέρχεται στη μιτοχονδριακή μήτρα σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες (UPR^{mt}) που ο ATFS-1 εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί πληθώρα γονιδίων

απόκρισης στο στρες, η έλλειψη της LONP-1 δεν επηρεάζει την ενεργότητά του, όπως είδαμε και εμείς, στη παρούσα εργασία. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν δείξει την καθυστερημένη ανάπτυξη των μεταλλαγμάτων *lonp-1(tm5171)*, τη χαμηλή γονιμότητά τους και τη μειωμένη διάρκεια ζωής τους, συγκριτικά με του αγρίου τύπου. Χρώση των *lonp-1* μεταλλαγμένων σκουληκιών με τη χρωστική MitoTracker Red έδειξε δομικές και ίσως λειτουργικές αλλαγές του μιτοχονδριακού δικτύου, ενώ η χρήση μίας μιτοχονδριακής GFP αναφοράς (*myo-3p::GFP^{mt}*) πάλι απεικόνισε διαταραγμένη μιτοχονδριακή μορφολογία στο στέλεχος αυτό.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδεικνύουν ένα προστατευτικό ρόλο της πρωτεάσης LON στο μιτοχονδριακό περιβάλλον αναδίπλωσης του *C. elegans*. Για την εξακρίβωση αυτή, χρησιμοποιήθηκαν δείκτες GFP του μιτοχονδριακού στρες (υπό τους υποκινητές των γονιδίων *hsp-60* και *hsp-6*) που επάγονται ισχυρά μόνο σε συνθήκες ενεργοποίησης του UPR^{mt}. Η αυξημένη επαγωγή των δεικτών αυτών σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των μεταλλαγμάτων *lonp-1* παραπέμπει σε αυξημένο ενδογενές μιτοχονδριακό στρες των ζώων και συνάδει με τη διαταραγμένη μιτοχονδριακή μορφολογία που είχε παρατηρηθεί. Ο έλεγχος βασικών παραγόντων του UPR^{mt}, της πρωτεάσης CLPP-1, του μεταγραφικού παράγοντα AFTS-1 και του μεταφορέα πεπτιδίων HAF-1, στα άτομα *lonp-1* που εκφράζουν τους παραπάνω φθορίζοντες δείκτες, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* σκουληκία είναι εξαρτώμενη μόνο από τον AFTS-1. Αυτό εξακριβώθηκε από τη σίγηση του *atfs-1* με RNAi, που μείωσε σημαντικά την ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* ζώα, αντίθετα με τη σίγηση του *clpp-1* (μέσω RNAi) και του διπλού μεταλλάγματος *lonp-1;haf-1* που δεν επηρέασαν την επαγωγή του UPR^{mt} στα *lonp-1* ζώα ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας.

Στη συνέχεια ελέγξαμε την επίδραση της σιώπισης μέσω RNAi (για τα γονίδια *atfs-1*, *clpp-1*) ή έλλειψη του γονιδίου *haf-1* στην ανάπτυξη και διάρκεια ζωής των N2 και *lonp-1* ζώων. Η σίγηση του *atfs-1(RNAi)* επηρέασε ακόμη περισσότερο την ήδη καθυστερημένη και ασυγχρόνιστη ανάπτυξη των *lonp-1* μεταλλαγμάτων χωρίς εμφανή επίδραση στα αγρίου τύπου στελέχη. Εφόσον η έλλειψη του *atfs-1*, που μετριάξει την ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* ζώα, ενισχύει τον αναπτυξιακό φαινότυπό τους, μπορούμε να υποθέσουμε πως η ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* σκουληκία είναι ευεργετική για τη φυσιολογική τους ανάπτυξη. Έχει βρεθεί πως αν και το *atfs-1(RNAi)* δεν επηρεάζει ούτε την ανάπτυξη ούτε τη διάρκεια ζωής των N2 σκουληκιών σε φυσιολογικές συνθήκες, υπό καταστάσεις μιτοχονδριακού στρες αυτά δεν μπορούν να αναπτυχθούν [70]. Παραδόξως, η σίγησή του δεν επηρέασε το προσδόκιμο ζωής των *lonp-1* ζώων, υποδηλώνοντας ίσως την επαγωγή ενός άλλου μηχανισμού/μονοπατιού που επηρεάζει θετικά τη διάρκεια ζωής, παρά το μιτοχονδριακό στρες που προκαλείται από την έλλειψη της LON.

Αντιθέτως, η σίγηση του *clpp-1* προκάλεσε σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα αλλά μόνο στα N2 σκουληκία, όπως προτεταμένη *νύλνα*, εμβρυακή θνησιμότητα και στειρότητα μετά από τη δεύτερη γενιά σίτησης σε RNAi, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αυτοί οι φαινότυποι στα *lonp-1* ζώα. Έτσι συμπεραίνουμε πως η απώλεια καθεμιάς από τις δύο μιτοχονδριακές πρωτεάσες, LONP-1 και CLPP-1, έχει διαφορετικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των αγρίου τύπου σκουληκιών. Επίσης, ενώ η έλλειψη τόσο του *lonp-1* όσο και του *clpp-1* μειώνει τη διάρκεια ζωής, η συνδυασμένη έλλειψη των δύο πρωτεασών φαίνεται πως αυξάνει τη μέση

και μέγιστη διάρκεια ζωής τους σε σχέση με τα N2. Οπότε, αν και η έλλειψη των δύο πρωτεασών δε φαίνεται να έχει αθροιστική δράση στο ρυθμό ανάπτυξης των ζώων, έχει αθροιστική δράση στη μακροβιότητά τους. Αυτό ίσως συνδέεται με το φαινόμενο της όρμησης (*hormesis*), κατά το οποίο ήπια έκθεση σε στρες μπορεί να έχει όφελος για την υγεία και μακροζωΐα του ζώου [128].

Αυτές οι παρατηρήσεις επεκτάθηκαν στη μελέτη του διπλού μεταλλάγματος *lonp-1;haf-1* καθώς ο HAF-1 είναι μεταφορέας πεπτιδίων αποδομημένων από τη CLPP-1 που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση του UPR^{mt} ενεργοποιώντας την εισαγωγή του ATFS-1 στον πυρήνα υπό συνθήκες ήπιου μιτοχονδριακού στρες [71]. Ωστόσο μελετώντας τον δείκτη επαγωγής του UPR^{mt}, *hsp-6p::gfp*, στα διπλά μεταλλάγματα, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως ο HAF-1 δεν απαιτείται για αυτή την επαγωγή του UPR^{mt} στα *lonp-1* άτομα. Τα *haf-1* ζώα ζουν λιγότερο από τα N2, σε *lonp-1* υπόβαθρο όμως έχουν αυξημένη μέση διάρκεια ζωής παρόλο που σε συνολική διάρκεια δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τα *lonp-1*. Παρουσιάζεται οπότε ένας αντίστροφος ρόλος των *clpp-1* και *haf-1* στο πώς επηρεάζουν τα *lonp-1* ζώα από τη μέση διάρκεια ζωής τους και μετά. Αναμένονται να γίνουν περισσότερα πειράματα για την επιβεβαίωση αυτού του συμπεράσματος, με διερεύνηση επίσης της επίδρασης του *clpp-1(RNAi)* στο διπλό μετάλλαγμα *lonp-1;haf-1*.

Τα *lonp-1* σκουλήκια επίσης παρουσιάζουν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα, καθώς επιβιώνουν σε ποσοστό ~65 σε σύγκριση με ~7% στο N2 στέλεχος, κατά την έκθεση στους 35° C για 6,5 ώρες σε OP-50 βακτήρια. Για την κατανόηση αυτού του φαινομένου, έγινε προσπάθεια συσχέτισής του με την ενεργοποίηση του UPR^{mt} που συμβαίνει στα *lonp-1* μεταλλάγματα. Η σίγηση του *atfs-1* με RNAi απέτυχε να αναιρέσει τη θερμοανθεκτικότητα αυτή, ενώ στελέχη απώλειας και απόκτησης λειτουργίας του ATFS-1 επίσης δεν έδειξαν καμία διαφορά στην επιβίωση στο θερμικό στρες συγκριτικά με τα N2. Οπότε αν και ο ATFS-1 είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του UPR^{mt} των *lonp-1*, δεν φαίνεται να ευθύνεται για τη θερμοανθεκτικότητά τους. Παρομοίως, η έλλειψη του *haf-1* αφήνει ανεπηρέαστη την επιβίωση και των N2 και των *lonp-1* ζώων στο θερμικό στρες. Αντιθέτως, η σίγηση της άλλης μιτοχονδριακής πρωτεΐσης, CLPP-1, οδήγησε σε αυξημένη θερμοανθεκτικότητα στα N2 ζώα χωρίς όμως να δράσει αθροιστικά στα *lonp-1*, ακόμη και όταν το θερμικό στρες πραγματοποιήθηκε για 7 ώρες. Μελέτες στρες, επαγόμενου από ψυχρές θερμοκρασίες, έχουν γίνει σε ποντίκια με απώλεια λειτουργίας της CLPP-1. Αν και σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης δεν παρουσίαζαν διαφορά με τα αγρίου τύπου ποντίκια, τα *clpp-1 -/-* δεν μπόρεσαν να αντιμετωπίσουν το ψύχος λόγω μη λειτουργικής προσαρμοστικής θερμογένεσης [43]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρησή μας ότι τα *lonp-1* σκουλήκια που αναπτύσσονται στους 15° C, εμφανίζουν εξαιρετικά καθυστερημένη ανάπτυξη από τα N2 απ' ότι στους 20° C. Συμπερασματικά, ίσως η απώλεια λειτουργίας των δύο μιτοχονδριακών πρωτεασών να οδηγεί σε ένα κοινό μηχανισμό καλύτερης προσαρμογής σε υψηλές, αλλά όχι σε χαμηλές, θερμοκρασίες.

Εφόσον η επαγωγή του UPR^{mt} στα άτομα *lonp-1* δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τη θερμοανθεκτικότητά τους, ελέγξαμε στα N2 και *lonp-1* στελέχη την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού στρες, HSPs, που προστατεύουν τον οργανισμό από το θερμικό και άλλα είδη στρες. Όλες οι HSPs είχαν αυξημένα σχετικά επίπεδα έκφρασης στα *lonp-1* ζώα, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, υποδηλώνοντας ένα χαμηλότερο «κατώφλι»

θερμοκρασίας για την απόκριση σε θερμικό στρες, που ίσως να εξηγεί την αυξημένη επιβίωση των *lonp-1* σε υψηλές θερμοκρασίες. Εκτός των HSPs, αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα γονίδια *sod-3*, *ctl-1*, *mtl-1* που όλα εμπλέκονται στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου αλλά και είναι στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16. Συνθήκες οξειδωτικού ή θερμικού στρες προκαλούν τη μετατόπιση του DAF-16 στον πυρήνα που επάγει ή καταστέλλει την έκφραση των καταρροϊκών στόχων του για να πυροδοτήσει την αντίσταση σε διαφορετικά είδη στρες και να επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής των οργανισμών. Στον πυρήνα εισέρχεται η αποφωσφορυλιωμένη μορφή του DAF-16 όταν το μονοπάτι της ινσουλίνης, που τον ρυθμίζει αρνητικά, παραμένει ανενεργό. Έτσι ελεγχθείκε ο κυτταρικός εντοπισμός του DAF-16 σε *lonp-1* υπόβαθρο, και χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη που εκφράζουν την πρωτεΐνη DAF-16a::GFP. Τα αντίστοιχα διαγονιδιακά στελέχη N2 και *lonp-1* υποβλήθηκαν σε θερμικό στρες στους 35° C σε διαδοχικούς χρόνους 15, 30 και 45 λεπτών. Έτσι είδαμε ότι αν και σε φυσιολογικές συνθήκες δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των στελεχών, υπό το σύντομο θερμικό στρες αυξήθηκε σημαντικά τόσο η ένταση του φθορισμού όσο και η πυρηνική μετατόπισή του DAF-16a::GFP στα *lonp-1* ζώα. Συμπεραίνεται έτσι ότι η απώλεια της LON σε συνθήκες στρες επάγει τον DAF-16 και τη μετατόπισή του στον πυρήνα, υποδηλώνοντας ενδεχομένως έναν ρυθμιστικό ρόλο της πρωτεΐνης LON ως προς τον μεταγραφικό παράγοντα DAF-16.

Αν και η LON έχει υψηλό βαθμό συντήρησης, υπάρχουν αρκετά κενά όσον αφορά τους λειτουργικούς της ρόλους. Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια κατανόησης κάποιων από αυτών τόσο σε επίπεδο κυτταρικής απόκρισης όσο και ολόκληρου του οργανισμού. Η συσχέτιση της LON με τη ρύθμιση της δράσης του DAF-16 που επηρεάζει μια πληθώρα γονιδίων, ανάλογα το στάδιο ανάπτυξης, τον ιστό, τις αλληλεπιδράσεις του με άλλους παράντες και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του, ρυθμίζοντας βασικές διεργασίες του νηματώδους όπως το μεταβολισμό, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, την απόκριση στο στρες και διάρκεια ζωής, αποτελεί πρόκληση στην κατανόηση της ρύθμισης της δράσης του DAF-16 και κατ'επέκταση στη διαδικασία της γήρανσης στον *C. elegans* αλλά και στον άνθρωπο.

Κεφάλαιο 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gray, M.W., *Mitochondrial evolution*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a011403.
2. Davidson, M.W. *Mitochondria*. Molecular Expressions 2015; Available from: <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/mitochondria/mitochondria.html>
3. Collins, T.J., Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D., *Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells*. EMBO J 2002. **21**: p. 1616–1627.
4. Chen, H.C., D. C., *Mitochondrial dynamics in mammals*. Curr Top Dev Biol 2004. **59**: p. 119–144.
5. Zamponi, N., et al., *Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 363.
6. Βικιπαίδεια. *Μιτοχόνδριο*. 2012; Available from: <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B9%CF%84%CE%BF%CF%87%CF%8C%CE%BD%CE%B4%CF%81%CE%B9%CE%BF>.
7. Dan Dunn, J., et al., *Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 472-485.
8. Cadenas, E.a.D., K.J.A. , *Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **29**: p. 222-230.
9. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
10. Breton-Romero, R. and S. Lamas, *Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 529-34.
11. Stone, J.R. and S. Yang, *Hydrogen peroxide: a signaling messenger*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(3-4): p. 243-70.
12. Geoffrey M. Cooper, R.E.H., *THE CELL: A MOLECULAR APPROACH*. 2011: ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ.
13. Diebold, L. and N.S. Chandel, *Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells*. Free Radic Biol Med, 2016. **100**: p. 86-93.
14. Sabharwal, S.S. and P.T. Schumacker, *Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?* Nat Rev Cancer, 2014. **14**(11): p. 709-21.
15. Garcia, A.M., et al., *Age- and temperature-dependent somatic mutation accumulation in Drosophila melanogaster*. PLoS Genet, 2010. **6**(5): p. e1000950.
16. Hegde, M.L., et al., *Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases*. Mech Ageing Dev, 2012. **133**(4): p. 157-68.
17. Kawamata, H. and G. Manfredi, *Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(9): p. 1375-84.
18. Karnati, S., et al., *Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes*. Histochem Cell Biol, 2013. **140**(2): p. 105-17.
19. Gottfredsen, R.H., et al., *The cellular distribution of extracellular superoxide dismutase in macrophages is altered by cellular activation but unaffected by the naturally occurring R213G substitution*. Free Radic Biol Med, 2014. **69**: p. 348-56.
20. Collins, Y., et al., *Mitochondrial redox signalling at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 4): p. 801-6.
21. Guzy, R.D. and P.T. Schumacker, *Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia*. Exp Physiol, 2006. **91**(5): p. 807-19.
22. Mandal, S., et al., *Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells*. Stem Cells, 2011. **29**(3): p. 486-95.
23. Lee, J., S. Giordano, and J. Zhang, *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling*. Biochem J, 2012. **441**(2): p. 523-40.

24. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. Nature, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
25. West, A.P., G.S. Shadel, and S. Ghosh, *Mitochondria in innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 389-402.
26. Bell, E.L., et al., *Sirt3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production*. Oncogene, 2011. **30**(26): p. 2986-96.
27. Dikalova, A.E., et al., *Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension*. Circ Res, 2010. **107**(1): p. 106-16.
28. Kimura, S., et al., *Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide*. Hypertension, 2005. **45**(3): p. 438-44.
29. Winterbourn, C.C., *The biological chemistry of hydrogen peroxide*. Methods Enzymol, 2013. **528**: p. 3-25.
30. Rozengurt, E., *Growth factors and cell proliferation*. Curr Opin Cell Biol, 1992. **4**(2): p. 161-5.
31. Chan, D.C., *Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1241-52.
32. Vakifahmetoglu-Norberg, H., A.T. Ouchida, and E. Norberg, *The role of mitochondria in metabolism and cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **482**(3): p. 426-431.
33. Kiriya, Y. and H. Noshi, *Intra- and Intercellular Quality Control Mechanisms of Mitochondria*. Cells, 2017. **7**(1).
34. Voos, W., et al., *Protein quality control at the mitochondrion*. Essays Biochem, 2016. **60**(2): p. 213-225.
35. Bukau, B., J. Weissman, and A. Horwich, *Molecular chaperones and protein quality control*. Cell, 2006. **125**(3): p. 443-51.
36. Chacinska, A., et al., *Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms*. Cell, 2009. **138**(4): p. 628-44.
37. Chakraborty, K., et al., *Chaperonin-catalyzed rescue of kinetically trapped states in protein folding*. Cell, 2010. **142**(1): p. 112-22.
38. Cheng, M.Y., et al., *Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria*. Nature, 1989. **337**(6208): p. 620-5.
39. Yamano, K., et al., *Step-size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation*. J Biol Chem, 2008. **283**(40): p. 27325-32.
40. Deocaris, C.C., S.C. Kaul, and R. Wadhwa, *On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60*. Cell Stress Chaperones, 2006. **11**(2): p. 116-28.
41. Altieri, D.C., et al., *TRAP-1, the mitochondrial Hsp90*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(3): p. 767-73.
42. Pellegrino, M.W., A.M. Nargund, and C.M. Haynes, *Signaling the mitochondrial unfolded protein response*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(2): p. 410-6.
43. Becker, C., et al., *CLPP deficiency protects against metabolic syndrome but hinders adaptive thermogenesis*. EMBO Rep, 2018. **19**(5).
44. 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.
45. Quiros, P.M., et al., *ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity*. Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 542-56.
46. 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.

47. 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.
48. Pomatto, L.C., R. Raynes, and K.J. Davies, *The peroxisomal Lon protease LonP2 in aging and disease: functions and comparisons with mitochondrial Lon protease LonP1*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2017. **92**(2): p. 739-753.
49. Neuwald, A.F., et al., *AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes*. Genome Res, 1999. **9**(1): p. 27-43.
50. 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.
51. 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.
52. Bota, D.A. and K.J. Davies, *Mitochondrial Lon protease in human disease and aging: Including an etiologic classification of Lon-related diseases and disorders*. Free Radic Biol Med, 2016. **100**: p. 188-198.
53. Pinti, M., et al., *Functional characterization of the promoter of the human Lon protease gene*. Mitochondrion, 2011. **11**(1): p. 200-6.
54. Scarpulla, R.C., *Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1576**(1-2): p. 1-14.
55. 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.
56. Gibellini, L., et al., *Sirtuin 3 interacts with Lon protease and regulates its acetylation status*. Mitochondrion, 2014. **18**: p. 76-81.
57. 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.
58. 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.
59. Ondrovicova, G., et al., *Cleavage site selection within a folded substrate by the ATP-dependent Lon protease*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25103-10.
60. Ngo, J.K., et al., *Impairment of Lon-induced protection against the accumulation of oxidized proteins in senescent wi-38 fibroblasts*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2011. **66**(11): p. 1178-85.
61. Venkatesh, S., et al., *Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(1): p. 56-66.
62. Kao, T.Y., et al., *Mitochondrial Lon regulates apoptosis through the association with Hsp60-mtHsp70 complex*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1642.
63. Luciakova, K., et al., *Enhanced mitochondrial biogenesis is associated with increased expression of the mitochondrial ATP-dependent Lon protease*. FEBS Lett, 1999. **444**(2-3): p. 186-8.
64. Lu, B., et al., *The ATP-dependent Lon protease of Mus musculus is a DNA-binding protein that is functionally conserved between yeast and mammals*. Gene, 2003. **306**: p. 45-55.
65. Lu, B., et al., *Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17363-74.
66. Bhaskaran, S., et al., *Loss of mitochondrial protease ClpP protects mice from diet-induced obesity and insulin resistance*. EMBO Rep, 2018. **19**(3).
67. 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.

68. Zhao, Q., et al., *A mitochondrial specific stress response in mammalian cells*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4411-9.
69. 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.
70. Nargund, A.M., et al., *Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation*. Science, 2012. **337**(6094): p. 587-90.
71. 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.
72. Melber, A. and C.M. Haynes, *UPR(mt) regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication*. Cell Res, 2018. **28**(3): p. 281-295.
73. Qureshi, M.A., C.M. Haynes, and M.W. Pellegrino, *The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse*. J Biol Chem, 2017. **292**(33): p. 13500-13506.
74. 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.
75. Shpilka, T. and C.M. Haynes, *The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(2): p. 109-120.
76. Naresh, N.U. and C.M. Haynes, *Signaling and Regulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019. **11**(6).
77. Palikaras, K., E. Lionaki, and N. Tavernarakis, *Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in C. elegans*. Nature, 2015. **521**(7553): p. 525-8.
78. Hamilton, B., et al., *A systematic RNAi screen for longevity genes in C. elegans*. Genes Dev, 2005. **19**(13): p. 1544-55.
79. Chaudhari, S.N. and E.T. Kipreos, *The Energy Maintenance Theory of Aging: Maintaining Energy Metabolism to Allow Longevity*. Bioessays, 2018. **40**(8): p. e1800005.
80. Bratic, A. and N.G. Larsson, *The role of mitochondria in aging*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 951-7.
81. 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.
82. Dillin, A., D.K. Crawford, and C. Kenyon, *Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in C. elegans*. Science, 2002. **298**(5594): p. 830-4.
83. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
84. Bennett, C.F., et al., *Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in Caenorhabditis elegans*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3483.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. Paradis, K., et al., *Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue*. The XEN 111 Study Group. Science, 1999. **285**(5431): p. 1236-41.

89. 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.
90. 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.
91. Riddle, D.L., M.M. Swanson, and P.S. Albert, *Interacting genes in nematode dauer larva formation*. *Nature*, 1981. **290**(5808): p. 668-71.
92. Kenyon, C., *The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011. **366**(1561): p. 9-16.
93. Henderson, S.T. and T.E. Johnson, *daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans**. *Curr Biol*, 2001. **11**(24): p. 1975-80.
94. Lee, R.Y., J. Hench, and G. Ruvkun, *Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the *daf-2* insulin-like signaling pathway*. *Curr Biol*, 2001. **11**(24): p. 1950-7.
95. 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.
96. 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.
97. 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.
98. Essers, M.A., et al., *FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK*. *EMBO J*, 2004. **23**(24): p. 4802-12.
99. Martins, R., G.J. Lithgow, and W. Link, *Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity*. *Aging Cell*, 2016. **15**(2): p. 196-207.
100. Rea, S.L., N. Ventura, and T.E. Johnson, *Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans**. *PLoS Biol*, 2007. **5**(10): p. e259.
101. van der Blik, A.M., M.M. Sedensky, and P.G. Morgan, *Cell Biology of the Mitochondrion*. *Genetics*, 2017. **207**(3): p. 843-871.
102. 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.
103. 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.
104. Dickinson, D.J. and B. Goldstein, *CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering*. *Genetics*, 2016. **202**(3): p. 885-901.
105. Ohkumo, T., et al., *Use of RNAi in *C. elegans**. *Methods Mol Biol*, 2008. **442**: p. 129-37.
106. 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.
107. Shaye, D.D. and I. Greenwald, *OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20085.
108. Spieth, J.a.D.L., *Overview of gene structure*. WormBook ed. The *C. elegans* Research Community, January 18, 2006.
109. T., B., *Trans-splicing and operons in *C. elegans** WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, November 20, 2012.
110. 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.

111. 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.
112. Fielenbach, N. and A. Antebi, *C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity*. Genes Dev, 2008. **22**(16): p. 2149-65.
113. Trigazis, E., «*Ο ρόλος της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LON στον ρυθμό ανάπτυξης, γήρανσης και απόκρισης σε στρες στο νηματώδη C.elegans*». MSc. Thesis, Systems Biology, Agricultural University of Athens, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens/ worm_lab, 2017.
114. McKay, R.M., et al., *C elegans: a model for exploring the genetics of fat storage*. Dev Cell, 2003. **4**(1): p. 131-42.
115. Hunt-Newbury, R., et al., *High-throughput in vivo analysis of gene expression in Caenorhabditis elegans*. PLoS Biol, 2007. **5**(9): p. e237.
116. Tullet, J.M., et al., *Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in C. elegans*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1025-38.
117. 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.
118. Murphy, C.T., *The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 910-21.
119. Teichmann, U., et al., *Substitution of PIM1 protease in mitochondria by Escherichia coli Lon protease*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10137-42.
120. Hamon, M.P., A.L. Bulteau, and B. Friguet, *Mitochondrial proteases and protein quality control in ageing and longevity*. Ageing Res Rev, 2015. **23**(Pt A): p. 56-66.
121. 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.
122. Bayot, A., et al., *Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells*. Biochimie, 2014. **100**: p. 38-47.
123. 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.
124. 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.
125. Luce, K. and H.D. Osiewacz, *Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p. 852-8.
126. Fischer, F., et al., *Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal ClpP deletion strain*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1397.
127. Smith, C.K., T.A. Baker, and R.T. Sauer, *Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6678-82.
128. Haigis, M.C. and B.A. Yankner, *The aging stress response*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 333-44.