



**«Αναπτυξιακή χαρτογράφηση της γενετικής στόχευσης
κρίσιμων συστατικών ελέγχου ενδοκυτταρικών
σηματοδοτικών δικτύων σε πρότυπα βιολογικά συστήματα»**



**Διπλωματική Εργασία
Σταματία Α. Καταραχιά
Βιολόγος**



**Επιβλέπων Καθηγητής
Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης
Επίκουρος Καθηγητής M.Sc., Ph.D.**

1837
2017
ΧΡΟΝΙΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΚΠΑ

**Αναπτυξιακή Χαρτογράφηση της Γενετικής Στόχευσης
Κρίσιμων Συστατικών Ελέγχου Ενδοκυτταρικών
Σηματοδοτικών Δικτύων σε Πρότυπα Βιολογικά Συστήματα**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σταματία Α. Καταραχιά, Βιολόγος

Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Ι. Στραβοπόδης - Επίκουρος Καθηγητής

Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δ. Ι. Στραβοπόδης - Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ι. Σ. Παπασιδέρη - Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Γ. Ε. Βουτσινάς - Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Αθήνα 2017

1837
2017
YEARS



HELLENIC REPUBLIC
**National and Kapodistrian
University of Athens**

MASTER OF SCIENCE

«APPLICATIONS OF BIOLOGY IN MEDICINE»

SECTION OF CELL BIOLOGY AND BIOPHYSICS, DEPARTMENT OF BIOLOGY, NKUA

**Developmental Mapping of Gene Targeting of Critical
Control Components Regulating Intracellular
Signaling Networks in Model Biological Systems**

M.Sc. Thesis

Stamatia A. Katarachia

Biologist

Athens 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οζώδης σκλήρυνση είναι μία γενετική διαταραχή που προκαλεί μη-κακοήθεις όγκους και πλήττει πολλαπλά ζωτικά όργανα. Για την εμφάνιση της ασθένειας υπεύθυνες είναι μεταλλαγές στα γονίδια *TSC1* και *TSC2* του ετεροδιμερούς πρωτεϊνικού συμπλόκου TSC, το οποίο αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της πρωτεΐνης mTOR. Η κινάση σερίνης/θρεονίνης mTOR λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας και είναι απαραίτητη για την κυτταρική αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε ο ρόλος των dTOR, dTSC1 και dTSC2 πρωτεϊνών στη συστημική παθο-φυσιολογία της *Drosophila melanogaster*, με σκοπό την ανάπτυξη ενός *in vivo* πειραματικού μοντέλου της οζώδους σκλήρυνσης. Δια μέσου της χρήσης του γενετικού συστήματος GAL4/UAS και της RNAi τεχνολογίας, αναλύθηκε η επίδραση της στοχευμένης μειορρύθμισης των dTOR, dTSC1 και dTSC2 πρωτεϊνών σε ολόκληρο το σώμα, στο 3^ο στάδιο της λάρβας, το νευρικό σύστημα, τον οφθαλμό και το φτερό. Διαπιστώθηκε ο κρίσιμος ρόλος των εν λόγω πρωτεϊνών για την επιβίωση των εντόμων, καθώς η μειορρύθμιση αυτών τόσο σε ολόκληρο το σώμα όσο και κατά το 3^ο στάδιο της λάρβας είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης εντόμων. Θεμελιώδης καταδεικνύεται ο ρόλος των dTOR, dTSC1 και dTSC2 πρωτεϊνών για τις κινητικές ικανότητες των εντόμων. Στον οφθαλμό, μετά από αποσιώπηση της dTSC2, αναπτύσσεται παθολογικός φαινότυπος στα ομμάτια κατά την πρόοδο της γήρανσης. Η αποσιώπηση καθεμίας εκ των υπό μελέτη πρωτεϊνών επάγει τον σχηματισμό δυσμορφικών φτερών, επηρεάζοντας ταυτόχρονα και την επιβίωση των εντόμων. Ομοίως, η υπερέκφραση της dTOR πρωτεΐνης προκαλεί παθολογικούς φαινοτύπους στους ιστούς των οφθαλμών, φτερών, αλλά και ολόκληρου του σώματος. Τέλος πραγματοποιήσαμε μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης στους χολινεργικούς και γλουταμινεργικούς νευρώνες καθώς επίσης και στην περιοχή του εγκεφάλου mushroom body. Παθολογικός φαινότυπος εμφανίστηκε σε έντομα με μειορρύθμιση της πρωτεΐνης στους χολινεργικούς νευρώνες, όπου τα έντομα εμφάνισαν μειωμένη κινητική ικανότητα σε σύγκριση με τα έντομα διασταύρωσης ελέγχου.

ABSTRACT

Tuberous sclerosis is a genetic disorder that causes non-malignant tumors and affects multiple organs. Mutations in the TSC1 and TSC2 genes of the heterodimer TSC complex, a negative regulator of mTOR protein, are responsible for the disease. The serine/threonine kinase mTOR, functions as a negative regulator of autophagy and is essential for cell growth and cell proliferation.

In this study, we used as an experimental animal model system of tuberous sclerosis the insect *Drosophila melanogaster* and tried to elucidate the role of dTOR, dTSC1 and dTSC2 proteins in the systemic pathophysiology of *Drosophila melanogaster*. After suitable employment of the GAL4/UAS binary genetic system and the RNAi technology, we examined the effects of the dTOR, dTSC1 and dTSC2 targeted silencing in the whole body, 3rd instar larval stage, nervous system, eye and fly wing. It was demonstrated the vital role of these proteins in fly's development and survival, since their RNAi-mediated downregulation either in wholebody tissues or 3rd instar larval stage caused inability of mature offspring production. Indispensable was also proved the role of dTOR, dTSC1 and dTSC2 proteins for controlling fly's kinetic capacity. The eye-specific suppression of dTSC2 resulted in the generation of dysmorphic ommatidia, but only at older flies. The RNAi-mediated silencing of all of the studied proteins promoted the formation of dysmorphic wings, which also detrimentally affected their viability. Most interestingly, overexpression of dTOR protein caused severe-pathological phenotypes in the fly eyes, wings, and whole body tissues. Finally, we reduced the dTSC2 protein in the cholinergic and glutaminergic neurons as well as in the mushroom body brain area. Pathologic phenotype occurred in insects with protein downregulation in cholinergic neurons, with insects showing reduced kinetic ability compared to control cross-over insects.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2016-2017 στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού επιπέδου.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Δημήτριο Ι. Στραβοπόδη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αρχικά για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας σε προπτυχιακό επίπεδο, στο εργαστήριό του και μετέπειτα για την συνέχιση της συνεργασίας μας και στο μεταπτυχιακό, παραχωρώντας μου το συγκεκριμένο θέμα και προσφέροντας μου τη δυνατότητα για άλλη μια φορά να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Οι ιδέες του, οι συμβουλές του, η επιμονή του, η υποστήριξή του και η παρουσία του κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας αποτέλεσαν και θα αποτελούν σημείο αναφοράς. Επίσης τον ευχαριστώ γιατί μου έδειξε πώς να σκέφτομαι σωστά, επιστημονικά και πώς να αντιλαμβάνομαι την αξία των πειραματικών ευρημάτων καθώς και για τις μοναδικές και τις πρωτοποριακές επιστημονικές ιδέες του. Τον ευχαριστώ από καρδιάς για όσα μου έχει προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια που είχα την χαρά και την τιμή να τον γνωρίσω και να συνεργαστώ μαζί του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, η οποία δέχτηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, καθώς επίσης με την αισιοδοξία και τη γαλήνη που την διέπει πάντοτε με ενθάρρυνε, ενώ με την «ήρεμη» δυναμική και τις πολυεπίπεδες και βαθιές επιστημονικές της γνώσεις (με έμφαση στην Παθοφυσιολογία και Αναπτυξιακή Βιολογία του δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster*, ως ένα πρότυπο σύστημα μελέτης ανθρώπινων ασθενειών) με στήριζε και με ενέπνεε συνεχώς και αδιάλειπτα.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεράσιμο Βουσινά, Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», ο οποίος δέχθηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, ώστε με τις ειδικές του γνώσεις στο θεματικό πεδίο της οξώδους σκλήρυνσης να μπορέσει να ανοίξει νέους ορίζοντες στους μηχανισμούς και στη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Αθανάσιο Βελέντζα για τη στήριξη που μου έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές του. Τον ευχαριστώ διότι πάντοτε μου παρείχε απλόχερα τη βοήθεια του και τις γνώσεις του πάνω σε οποιοδήποτε πρόβλημα ανέκυπτε στην πορεία της εργασίας, με τη μεγάλη εμπειρία του στα εργαστηριακά ζητήματα. Θέλω όμως να τον ευχαριστήσω για την φιλία του, γιατί δεν με στήριξε μόνο σε επαγγελματικό επίπεδο αλλά και σε προσωπικό.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις βιολόγους Κάτια Γιαννοπούλου και Σοφία Πασαδάκη για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου παρείχαν καθημερινά. Χάρη στη φιλία και την αισιοδοξία τους το κλίμα στο εργαστήριο ήταν πάντα ευχάριστο και η πορεία γεμάτη χαρούμενες στιγμές και ωραίες αναμνήσεις. Χωρίς αυτές, τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Στραβοπόδη και του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής για την ευχάριστη συνεργασία. Τέλος, τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω στην οικογένεια μου, για την πολύτιμη υλική και ψυχολογική υποστήριξη, που απλόχερα μου πρόσφεραν, για το πέρας της εργασίας μου και την ολοκλήρωση της διετούς μου φοίτησης στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική».

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Δίπτερα έντομα.....	10
1.1.1 Το έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.1.2 Φυσική περιγραφή.....	11
1.1.3 Κύκλος ζωής της <i>Drosophila melanogaster</i> και Αναπαραγωγή.....	11
1.1.4 <i>Drosophila melanogaster</i> , μοντέλο-οργανισμός στην γενετική.....	14
1.2 Οργάνωση και μορφογένεση οφθαλμού στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.2.1 Ο σύνθετος οφθαλμός του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.2.2 Δημιουργία οπτικού τμήματος στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.2.3 Μορφογενετική αυλάκωση και δημιουργία ομματοδίων.....	17
1.3 Οργάνωση και μορφογένεση των φτερών στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.3.1 Μορφολογία των φτερών.....	19
1.3.2 Μηχανισμοί μορφογένεσης των φτερών.....	20
1.3.3 Τοπικές και καθολικές δυνάμεις σε άλλους οργανισμούς-μοντέλα και ανθρώπινες ασθένειες.....	23
1.4 Το νευρικό σύστημα του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	23
1.4.1 Σύνοψη της ιστολογίας του νευρικού συστήματος στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	23
1.4.2 Ο εγκέφαλος στο ενήλικο άτομο της μύγας.....	26
1.5 Δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων στη <i>Drosophila melanogaster</i>	28
1.5.1 Το σύστημα GAL4/UAS στη <i>Drosophila</i>	28
1.6 Το RNAi (RNA interference) μονοπάτι στον έλεγχο της ενεργότητας γονιδίων.....	30
1.6.1 Λεπτομερής μελέτη του RNAi μηχανισμού.....	31
1.7 Αυτοφαγία.....	34
1.7.1 Μοριακός μηχανισμός (μακρο)αυτοφαγίας.....	36
1.8 Γενικά στοιχεία για το TOR μονοπάτι.....	39
1.8.1 Κυτταρικές διεργασίες ρυθμιζόμενες από το σύμπλοκο mTORC1.....	41
1.8.2 Επισκόπηση του δικτύου σηματοδότησης του συμπλόκου mTORC2.....	44
1.8.3 Σηματοδότηση του mTOR στους ιστούς και ο ρόλος του σε μεταβολικές ασθένειες.....	44
1.9 Το σύμπλοκο Tsc (Tuberous Sclerosis Complex).....	46
1.9.1 Το TSC1/2 σύμπλοκο ανταγωνίζεται το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR/S6K1/4E-BP1.....	46
1.9.2 Ρύθμιση του συμπλόκου TSC1/2.....	47
1.10 Σκοπός της Εργασίας.....	49
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51

2.1	Πειραματόζωα.....	51
2.2	Τρόπος καλλιέργειας και συντήρησης του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	51
2.2	Παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM).....	52
2.4	Παρατήρηση σε μικροσκόπιο CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy).....	53
2.5	Πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της βιωσιμότητας.....	54
2.6	Πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της λειτουργίας του νευρικού συστήματος (climbing assay).....	54
2.7	Στερεο(μικρο)σκόπιο.....	54
2.8	Στατιστική ανάλυση.....	55
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
3.1	Έλεγχος της ιστοειδικότητας των στελεχών-οδηγών (drivers) στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	57
3.1.1	Έλεγχος Driver οφθαλμού.....	57
3.1.2	Έλεγχος Driver φτερού.....	57
3.1.3	Έλεγχος Driver φτερού & αλτήρα.....	57
3.1.4	Έλεγχος Driver όλου του σώματος.....	58
3.1.5	Έλεγχος Driver νευρικού συστήματος.....	58
3.1.6	Έλεγχος Driver κινητικών νευρώνων.....	59
3.1.7	Έλεγχος Driver τροφοκυττάρων.....	59
3.2	Επίδραση της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2 στους οφθαλμούς του δίπτερου εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	60
3.2.1	Παρατήρηση οφθαλμών ύστερα από αποσιώπηση του dTSC1 γονιδίου.....	60
3.2.2	Παρατήρηση οφθαλμών ύστερα από αποσιώπηση του dTOR γονιδίου.....	61
3.2.3	Παρατήρηση οφθαλμών ύστερα από αποσιώπηση του dTSC2 γονιδίου.....	62
3.3	Επίδραση της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2, και της υπερέκφρασης του dTOR στα φτερά της <i>Drosophila melanogaster</i>	62
3.3.1	Παρατήρηση της μορφολογίας των φτερών ύστερα από αποσιώπηση των dTOR dTSC1 και dTSC2 γονιδίων και μετά από υπερέκφραση του dTOR, με driver φτερού.....	63
3.3.2	Παρατήρηση της μορφολογίας των φτερών ύστερα από αποσιώπηση των dTOR dTSC1 και dTSC2 γονιδίων με driver φτερού και αλτήρα.....	65
3.4	Μελέτης της επίδρασης της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2 στα ωοθυλάκια της <i>Drosophila melanogaster</i>	67
3.5	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2 στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της <i>Drosophila melanogaster</i> , με τη δοκιμασία της βιωσιμότητας.....	68
3.5.1	Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου dTSC2 στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της <i>Drosophila melanogaster</i> , με τη δοκιμασία της βιωσιμότητας.....	69

3.5.2	Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου dTSC1 στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της <i>Drosophila melanogaster</i> , με τη δοκιμασία της βιωσιμότητας.....	70
3.5.3	Επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου dTOR στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της <i>Drosophila melanogaster</i>	71
3.6	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2 στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της <i>Drosophila melanogaster</i> , με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing).....	71
3.6.1	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTOR, στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της <i>Drosophila melanogaster</i>	72
3.6.2	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της <i>Drosophila melanogaster</i>	72
3.6.3	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC1, στους κινητικούς νευρώνες της <i>Drosophila melanogaster</i>	73
3.7	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στους χολινεργικούς νευρώνες της <i>Drosophila melanogaster</i> , με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing).....	73
3.8	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στους γλουταμινεργικούς νευρώνες της <i>Drosophila melanogaster</i> , με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing).....	74
3.9	Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στην περιοχή mushroom body του εγκεφάλου της <i>Drosophila melanogaster</i> , με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing).....	75
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	79
4.1	Συζήτηση αποτελεσμάτων από τη μειορρύθμιση της dTOR πρωτεΐνης.....	79
4.2	Συζήτηση αποτελεσμάτων από τη μειορρύθμιση της dTSC1 πρωτεΐνης.....	80
4.3	Συζήτηση αποτελεσμάτων από τη μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης.....	82
4.4	Συζήτηση αποτελεσμάτων από την υπερέκφραση της dTOR πρωτεΐνης.....	83
4.5	Συζήτηση αποτελεσμάτων από την μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης στους χολινεργικούς και γλουταμινεργικούς νευρώνες και στην περιοχή του εγκεφάλου mushroom body.....	83
4.6	Οζώδης σκλήρυνση.....	84
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δίπτερα έντομα

1.1.1 Το έντομο *Drosophila melanogaster*

Η *Drosophila melanogaster* είναι ένα είδος μύγας που ανήκει στην τάξη Δίπτερα και στην οικογένεια Drosophilidae. Το είδος είναι γνωστό γενικά ως η μύγα των φρούτων ή μύγα ξιδιού (**εικ. 1.1**). Η συστηματική κατάταξή του είναι:

- Βασίλειο: Ζώα
- Φύλο: Αρθρόποδα
- Κλάση: Έντομα
- Τάξη: Δίπτερα
- Οικογένεια: Drosophilidae
- Γένος: *Drosophila*
- Υπογένος: *Sophophora*
- Είδος: *Drosophila melanogaster*

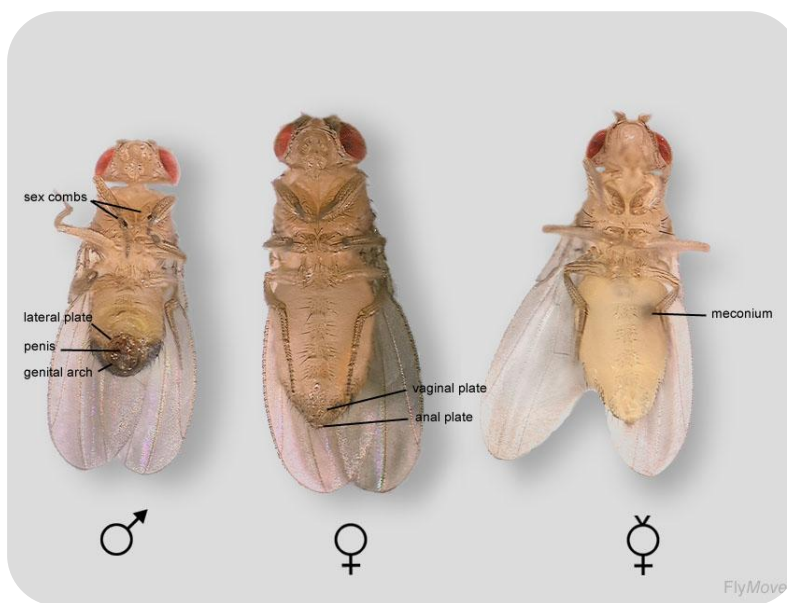


Εικόνα 1.1: Το έντομο *Drosophila melanogaster*

Ξεκινώντας από την πρόταση του Charles W. Woodworth για τη χρήση αυτού του είδους ως πρότυπο οργανισμό, η *D. melanogaster* εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως στη βιολογική έρευνα, σε μελέτες γενετικής, φυσιολογίας, μικροβιακής παθογένειας αλλά και στην εξέλιξη. Χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα, επειδή είναι ένα ζωικό είδος που είναι εύκολο στη φροντίδα, αναπαράγεται γρήγορα και αναπαράγει πολλά αυγά. Η *Drosophila melanogaster* ζει σε ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων. Η κοινή μύγα των φρούτων έχει εισαχθεί σε όλες σχεδόν τις εύκρατες περιοχές του κόσμου. Η επιστημονική ονομασία της *Drosophila* στην πραγματικότητα είναι "εραστής της δροσιάς" (lover of dew), υπονοώντας ότι αυτό το είδος απαιτεί υγρά περιβάλλοντα. Η ανάπτυξη των απογόνων αυτών των ειδών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τα ενήλικα άτομα δεν αντέχουν σε ψυχρότερα κλίματα. Πολλές φορές μπορούμε να εντοπίσουμε τη *Drosophila* σε κελάρια φρούτων ή σε άλλες διαθέσιμες τεχνητές κατασκευές με μεγάλη ποσότητα τροφίμων.

1.1.2 Φυσική περιγραφή

Η *Drosophila* ωριμάζει με πλήρη μεταμόρφωση, όπως και όλα τα μέλη της τάξης των δίπτερων. Παρόμοια με όλα τα έντομα, καλύπτεται και αυτή από ένα χιτινώδες εξωσκελετό. Το σώμα της χωρίζεται σε τρία κύρια τμήματα και έχει τρία ζεύγη ποδιών. Η κοινή μύγα των φρούτων σε ενήλικο στάδιο, έχει ένα κιτρινο-καφέ χρώμα σώματος και έχει μήκος περίπου 3 mm και πλάτος 2 mm. Ως προς το σχήμα του σώματος, τα έντομα αυτά έχουν μια στρογγυλοποιημένη κεφαλή με μεγάλους, κόκκινους, σύνθετους οφθαλμούς, τρία μικρότερα πιο απλά μάτια και κοντές κεραίες. Το στόμα τους έχει αναπτυχθεί έτσι (προβοσκίδα), ώστε να συλλέγουν υγρά. Τα θηλυκά άτομα έχουν ελαφρώς μεγαλύτερο σώμα από τα αρσενικά. Υπάρχουν μαύροι εγκάρσιοι δακτύλιοι στην ραχιαία επιφάνεια της κοιλιάς, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του φύλου ενός ατόμου. Τα αρσενικά έντομα έχουν μεγαλύτερη ποσότητα μαύρου χρωματισμού συγκεντρωμένη στο οπίσθιο άκρο της κοιλιάς. Επιπλέον, τα αρσενικά έντομα διαθέτουν στον ταρσό καθενός από τα άκρα του πρώτου ζεύγους το φυλετικό χτένι, που είναι το πιο ασφαλές κριτήριο για τον προσδιορισμό του φύλου (**εικ. 1.2**) [1].

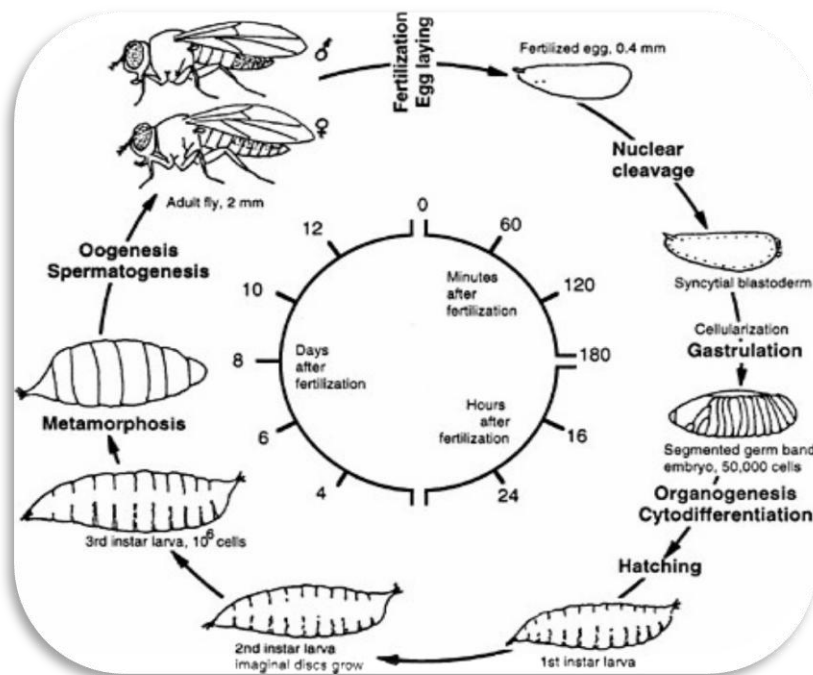


Εικόνα 1.2: Διάκριση θηλυκών και αρσενικών ατόμων της *Drosophila melanogaster*, με βάση εξωτερικά μορφολογικά γνωρίσματα

1.1.3 Κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster* και Αναπαραγωγή

✓ Στάδια και διάρκεια

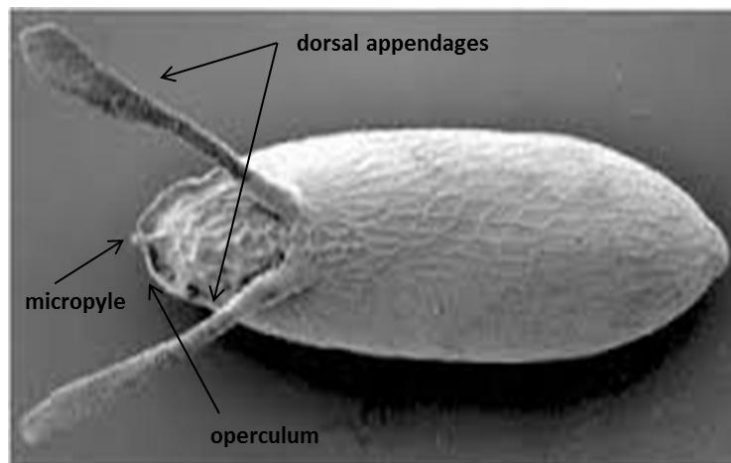
Μετά τη γονιμοποίηση και το σχηματισμό του ζυγωτού, ξεκινά η εμβρυϊκή ανάπτυξη μέσα στη μεμβράνη των αυγών. Από το αυγό προκύπτει η λάρβα (3 στάδια), η οποία μεγαλώνει σε μήκος και μετατρέπεται σε πούπα (pupa). Τέλος, γίνεται έκδυση ενήλικων ατόμων από τις πούπες. Η διάρκεια αυτών των σταδίων ποικίλλει ανάλογα με τη θερμοκρασία. Στους 20 °C, η μέση διάρκεια ανάπτυξης των λαρβών είναι περίπου 8 ημέρες, ενώ στους 25 °C μειώνεται στις 5 ημέρες. Το στάδιο της πούπας στους 20 °C διαρκεί περίπου 6,3 ημέρες, ενώ στους 25 °C 4,2 ημέρες. Συνεπώς, στους 25 °C ο κύκλος ζωής μπορεί να ολοκληρωθεί σε περίπου 10 ημέρες, αλλά στους 20 °C απαιτούνται περίπου 15 ημέρες (**εικ. 1.3**). Οι καλλιέργειες των εντόμων θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, όπου η θερμοκρασία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των 20-25 °C. Η συνεχιζόμενη έκθεση σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C μπορεί να προκαλέσει στείρωση ή και θάνατο, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες η βιωσιμότητα των εντόμων είναι μειωμένη και η διάρκεια του κύκλου ζωής παρατεταμένη [1]



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του εντόμου *Drosophila melanogaster* [2]

✓ Ωοθυλάκια

Το αυγό της *Drosophila melanogaster* είναι περίπου 0,5 mm. Εξωτερικά το αυγό περιβάλλεται από μια μεμβράνη, το χόριο. Επίσης διαθέτει ένα ζευγάρι αναπνευστικών νημάτων, στο εμπρόσθιο τμήμα. Η είσοδος των σπερματοζωαρίων στο αυγό γίνεται μέσω ενός μικρού ανοίγματος, την μικροπύλη, που εντοπίζεται στο πρόσθιο άκρο του ωοθυλακίου (εικ. 1.4). Τα θηλυκά έντομα αποθηκεύουν τα σπερματοζωάρια από τη στιγμή του ζευγαρώματος. Μετά την είσοδο του σπέρματος στο ωοθυλάκιο, αρχίζει να αναπτύσσεται το έμβρυο. Τα ωοθυλάκια εναποτίθενται από τα θηλυκά έντομα σε σύντομο χρονικό διάστημα από την είσοδο του σπέρματος ή μπορούν να παραμείνουν στη μήτρα κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων εμβρυϊκής ανάπτυξης [1].



Εικόνα 1.4: Απεικόνιση των τμημάτων που απαρτίζουν ένα ωοθυλάκιο σταδίου 14

✓ Στάδια λάρβας

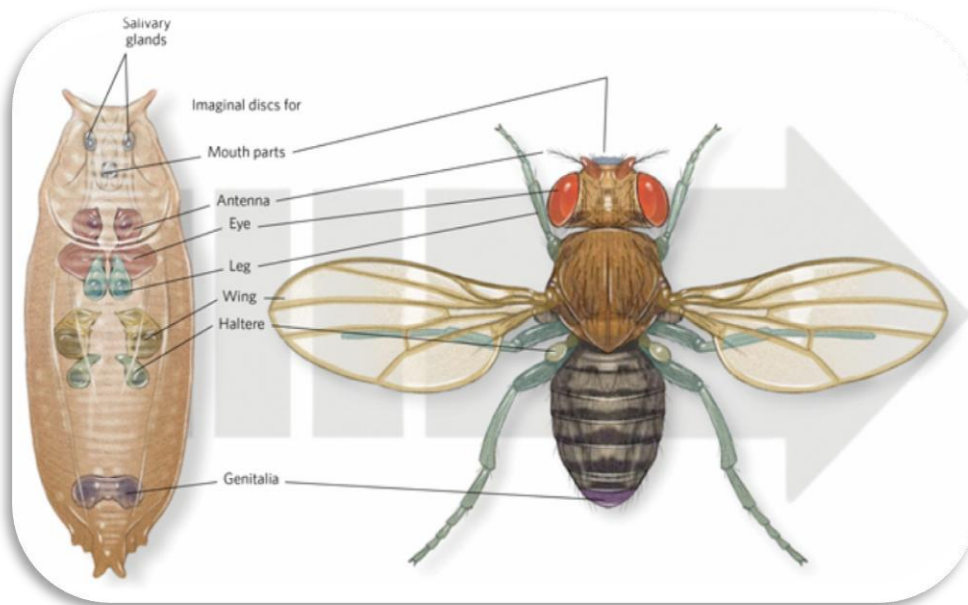
Το στάδιο αυτό διακρίνεται χρονικά και μορφολογικά σε τρία επιμέρους στάδια (instars). Τα θηλυκά έντομα εναποθέτουν έως και 400 αυγά σε ευνοϊκό υπόστρωμα, και τα γονιμοποιημένα αυγά μετατρέπονται σε λάρβες (προνύμφες) πρώτου σταδίου (L1-first instar) εντός 24 ωρών. Αν και χρειάζονται 24 ώρες μετά την γονιμοποίηση του αυγού για την εκκόλαψη της λάρβας, οι διάφορες περιοχές των προνυμφών καθίστανται καλά καθορισμένες αρκετές ώρες πριν από τη μετάβαση αυτή. Το κεφάλι της προνύμφης είναι κρυμμένο πριν από την εκκόλαψη. Η πρόσθια περιοχή που βρίσκεται το κεφάλι, αποτελεί μια ειδική δομή που ονομάζεται άκρον (acron), ενώ το οπίσθιο τμήμα ονομάζεται τέλσον (telson). Τρία θωρακικά τμήματα και οκτώ κοιλιακά τμήματα εμφανίζονται μεταξύ του άκρον και του τέλσον. Οι προνύμφες για να μεγαλώσουν τρέφονται συνεχώς είτε από την επιφάνεια της τροφής είτε εισχωρούν σε αυτήν ανάλογα το στάδιο που βρίσκονται. Για να μεταβούν οι προνύμφες από το πρώτο στο δεύτερο στάδιο (L2-second instar) χρειάζονται 25 ώρες, και άλλες 24 για να φτάσουν στο τρίτο (L3-third instar) και τελικό στάδιο [1].

✓ Στάδιο πούπας

Το τρίτο στάδιο λάρβας, αρχίζει να ανέρχεται από την τροφή στα τοιχώματα του δοχείου φύλαξης και μετά από 30 ώρες μετατρέπεται σε πούπα. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού, στο αναπτυσσόμενο έντομο δημιουργούνται φτερά και πόδια μέσω μεταμόρφωσης με τη βοήθεια ορμονών. Αυτές οι δομές υπάρχουν ήδη στην προνύμφη με τη μορφή των imaginal discs (επιδερμικά κύτταρα που προέρχονται από το κυτταρικό βλαστοδεर्मίδιο) (*εικ. 1.5*). Αυτοί οι δίσκοι αναπτύσσονται σε όλη τη φάση των προνυμφών, σχηματίζοντας επιθηλιακούς σάκους οι οποίοι διπλώνουν για να εξυπηρετήσουν την αύξηση του μεγέθους. Το γεγονός αυτό βοηθά στην ανάπτυξη των οργάνων των ενήλικων εντόμων κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης [1].

✓ Ενήλικο έντομο

Το ενήλικο έντομο εκδύεται από την πούπα αλλά δεν έχει πάρει ακόμη την τελική του μορφή. Τα φτερά βρίσκονται κολλημένα και διπλωμένα στο σώμα, το χρώμα του σώματος και των οφθαλμών είναι πιο ανοιχτόχρωμο, και τα έντομα είναι αναπαραγωγικά ανώριμα. Τα θηλυκά άτομα ωριμάζουν μετά από 8 έως 12 ώρες από την στιγμή της έκδυσης και διαθέτουν ικανότητα αναπαραγωγής. Στη συνέχεια αρχίζουν το ζευγάρισμα και τα θηλυκά συλλέγουν και αποθηκεύουν το σπέρμα των αρσενικών στην σπερματοθήκη για να το χρησιμοποιήσουν αργότερα για την εναπόθεση των αυγών, έτσι ώστε να αρχίσει ένας νέος κύκλος [1].



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση των imaginal discs. Οι δίσκοι αυτοί βρίσκονται στη λάρβα και είναι ιστοί που τελικά θα δώσουν τα όργανα και τα άκρα των ενήλικων εντόμων [3]

1.1.4 *Drosophila melanogaster*, μοντέλο-οργανισμός στην γενετική

Η *Drosophila melanogaster* είναι ένας από τους πιο μελετημένους οργανισμούς στη βιολογική έρευνα, ιδιαίτερα στη γενετική και στην αναπτυξιακή βιολογία. Οι λόγοι είναι αρκετοί:

- ✓ Η φροντίδα και η καλλιέργεια των εντόμων απαιτεί μικρό εξοπλισμό, και το συνολικό κόστος είναι χαμηλό
- ✓ Τα έντομα έχουν μικρό μέγεθος και είναι εύκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο, ενώ η παρατήρηση της μορφολογίας των εντόμων είναι εύκολη μόλις αυτά αναισθητοποιηθούν
- ✓ Ο χρόνος αναπαραγωγής είναι μικρός (περίπου 10 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου), επομένως αρκετές γενιές μπορούν να μελετηθούν μέσα σε λίγες μόλις εβδομάδες
- ✓ Τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα διακρίνονται εύκολα καθώς επίσης είναι εύκολη και η απομόνωση παρθένων θηλυκών εντόμων
- ✓ Υπάρχουν μόνο 4 ζεύγη χρωμοσωμάτων, 3 αυτοσωμικά και ένα φυλετικό
- ✓ Στα αρσενικά έντομα δεν συμβαίνει μειωτικός ανασυνδυασμός, διευκολύνοντας έτσι τις γενετικές μελέτες
- ✓ Μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπολειπόμενα θνησιγόνα «χρωμοσώματα εξισορρόπησης» (balancer chromosomes) που φέρουν ορατούς γενετικούς δείκτες. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να διατηρηθούν θανατηφόρα αλληλόμορφα σε ετερόζυγη κατάσταση χωρίς ανασυνδυασμό μέσω πολλαπλών αναστροφών στον balancer
- ✓ Έχει γίνει χαρτογράφηση του πλήρους γονιδιώματος του εντόμου

1.2 Οργάνωση και μορφογένεση οφθαλμού στο έντομο *Drosophila melanogaster*

1.2.1 Ο σύνθετος οφθαλμός του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Το περιφερικό νευρικό σύστημα στα ενήλικα άτομα της *Drosophila melanogaster* αποτελείται από αισθητήρια και κινητικά τμήματα. Τα εξωτερικά αισθητήρια όργανα του εντόμου καθιερώνονται από τα αναπτυξιακά στάδια της προνύμφης και της πούπας, και αφορούν ολόκληρο το σώμα του εντόμου για

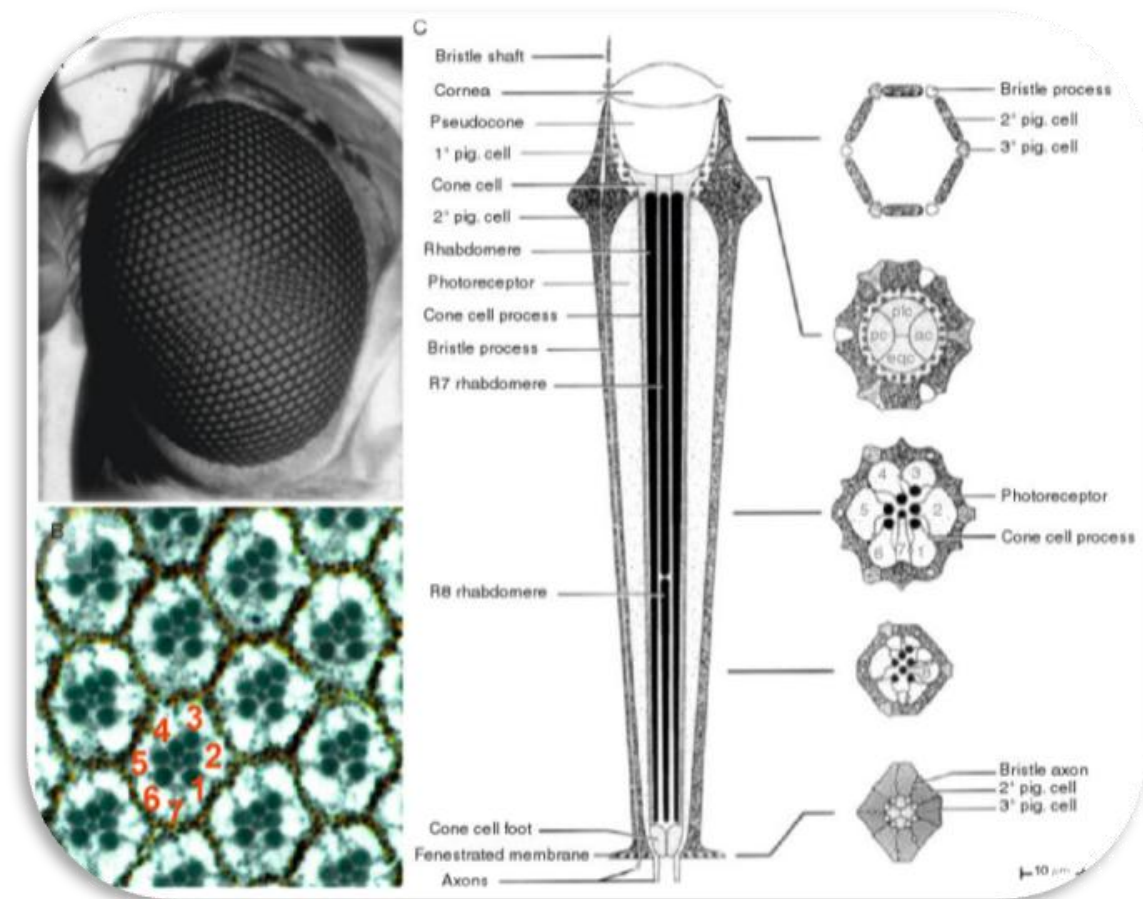
την ανίχνευση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Αν και τα αισθητήρια όργανα διαφέρουν ως προς τη δομή και την οργάνωση, ο σύνθετος οφθαλμός και οι βλεφαρίδες (bristles) έχουν κοινές απαιτήσεις ως προς τον καθορισμό των νευρικών κυττάρων κατά τη μορφογένεση, γεγονός που απαιτεί πολύπλοκες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις [4].

Ο οφθαλμός της *Drosophila* είναι μία από τις πιο όμορφες δομές της φύσης. Έχει αναδειχθεί ως ένα πολύ ευνοϊκό μοντέλο για την κατανόηση των διαδικασιών που αφορούν τον προσδιορισμό της τύχης των κυττάρων, την διαμόρφωση τους και την μορφογένεση. Αν και αποτελείται από χιλιάδες κύτταρα, κάθε οφθαλμός είναι ένα απλό επαναλαμβανόμενο πρότυπο 12 κυτταρικών τύπων σε εξαγωνική συστοιχία, γεγονός που βελτιστοποιεί την κάλυψη του οπτικού πεδίου [5]. Ο οφθαλμός του εντόμου περιέχει 700 (στα αρσενικά), με 750 (στα θηλυκά) διακριτές οπτικές μονάδες που ονομάζονται ομματίδια (εικ. 1.6). Κάθε ομματίδιο υποδιαιρείται σε δύο δομικά μέρη, τον φακό και το κανάλι. Ο φακός περιλαμβάνει έναν κερατοειδή χιτώνα στην εξωτερική επιφάνεια του ομματιδίου. Κάθε ομματίδιο αποτελείται από έναν πυρήνα οκτώ νευρώνων – φωτουποδοχέων (photoreceptor neurons, R cells), που καλύπτονται από τέσσερα μη νευρωνικά κωνικά κύτταρα και δύο βασικά κύτταρα χρωστικής που σχηματίζουν μαζί την «ίριδα». Οι πυρήνες είναι οπτικά απομονωμένοι από τα γειτονικά ομματίδια μέσω ενός εξαγωνικού πλέγματος που σχηματίζουν τα χρωμοφόρα κύτταρα και με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται το πέρασμα του φωτός μεταξύ των ομματιδίων, καθώς φαίνεται πως η χρωστική εξυπηρετεί τον σκοπό της οπτικής μόνωσης [5] [20]. Η διάταξη αυτή είναι εκπληκτικά ακριβής, με στόχο κάθε ομματίδιο να καλύπτει ομοιόμορφα το οπτικό πεδίο. Η δημιουργία αυτής της δομής παρουσιάζει μια μεγάλη πρόκληση: η οξύτητα της όρασης των μυγών σχετίζεται άμεσα με την ακρίβεια με την οποία μπορεί να κατασκευασθεί και να τοποθετηθεί το κάθε ομματίδιο [5].

Στα χρωμοφόρα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένες οι χρωστικές που προσδίδουν στον οφθαλμό των εντόμων αγρίου τύπου το χαρακτηριστικό σκούρο κόκκινο χρώμα, το οποίο είναι αποτέλεσμα της συνισταμένης δράσης δύο ομάδων χρωστικών, των καφέ ομοχρωμάτων και των κόκκινων (δρόσο-) πτερινών, η σύνθεση των οποίων ακολουθεί διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια. Με εξαίρεση τις βλεφαρίδες, όλα τα κύτταρα στον οφθαλμό εκφράζουν τη μία ή και τις δύο χρωστικές. Οι φωτουποδοχείς, τα κωνικά κύτταρα και τα πρωτογενή χρωμοφόρα κύτταρα, διαθέτουν μόνο ομοχρώματα. Τα δευτερογενή και τριτογενή χρωμοφόρα κύτταρα διαθέτουν και ομοχρώματα και πτεριδίνες [6].

Οι φωτουποδοχείς διακρίνονται σε τρεις ομάδες κυττάρων: R1-6, R7 και R8, ανάλογα με τη μορφολογία τους, τη θέση του στο ομματίδιο, τις συνάψεις που δημιουργούν στον οπτικό λοβό του εγκεφάλου και την έκφραση του γονιδίου *opsin* (Rh). Οι φωτουποδοχείς R1-6 εντοπίζονται στην εξωτερική πλευρά των ομματιδίων, εμφανίζοντας ομόκεντρη διάταξη σε εγκάρσια τομή, περιβάλλοντας τους R7 και R8. Ο R7 φωτουποδοχέας βρίσκεται άνωθεν του R8, οπότε το κεντρικό ραβδομερές, μιας εγκάρσιας τομής του ομματιδίου θα είναι εκείνο του R7, εάν πρόκειται για επιφανειακή τομή, και εκείνο του R8 εάν πρόκειται για πιο βαθιά τομή. Μεταξύ του ακραίου τμήματος τους ενός φωτουποδοχέα και του αρχικού του άλλου, υπάρχει μια περιοχή αλληλοεπικάλυψης. Οι εξωτερικοί φωτουποδοχείς R1-6 εκφράζουν το γονίδιο *opsin* Rh1 (*ninaE*), το οποίο ανταποκρίνεται σε ένα ευρύ φάσμα φωτός και παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στο μπλε χρώμα. Ο R7 εκφράζει είτε το γονίδιο Rh3 είτε το Rh4 *opsin*, τα οποία είναι ευαίσθητα στην υπεριώδη ακτινοβολία. Ο R8 εκφράζει το γονίδιο Rh5 *opsin* το οποίο είναι ευαίσθητο στο ιώδες χρώμα ή το Rh6 *opsin*, το οποίο είναι ευαίσθητο στο πράσινο χρώμα. Οι 2 κεντρικοί φωτουποδοχείς προσδίδουν στον οφθαλμό την ικανότητα έγχρωμης όρασης και αντιστοιχούν στα κωνία των σπονδυλοζώων [7].

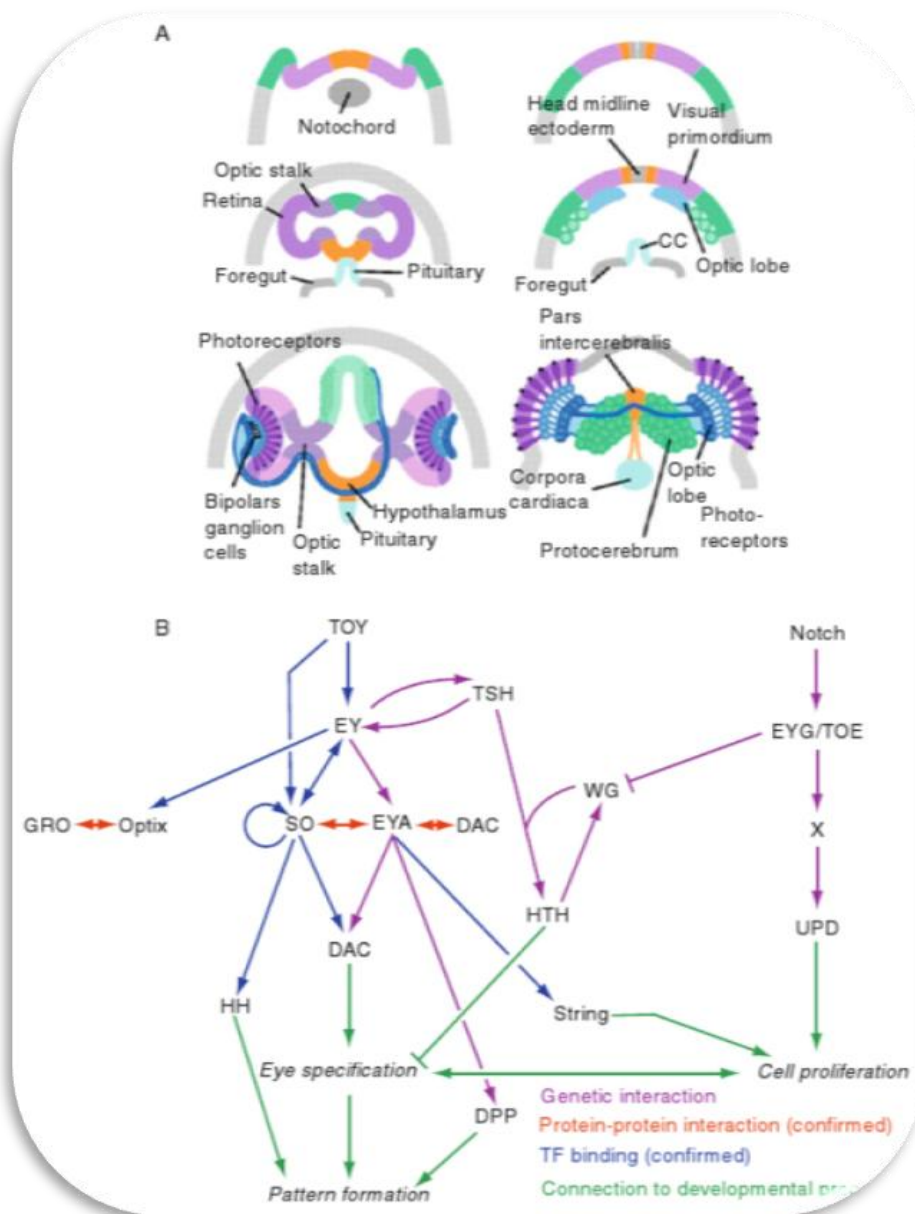
Ο οφθαλμός του εντόμου περιλαμβάνει επίσης μηχανοαισθητήριο σύστημα, αποτελούμενο από ένα σύνολο βλεφαρίδων-τριχιδίων διευθετημένων μεταξύ των ομματιδίων με απόλυτα οργανωμένο τρόπο. Κάθε τριχίδιο δομείται από 4 κύτταρα. Το σύστημα αυτό, αφενός συμβάλλει στην ικανότητα αντίληψης του χώρου από το έντομο, αφ' ετέρου προστατεύει τον οφθαλμό από μηχανικές πιέσεις και αιωρούμενα σωματίδια του περιβάλλοντος [8].



Εικόνα 1.6: Ο οφθαλμός του ενήλικου εντόμου. Ο οφθαλμός στο ενήλικο άτομο της *Drosophila melanogaster* είναι ένα μοντέλο ακριβείας. (A) Ο ενήλικος σύνθετος οφθαλμός αποτελείται από περισσότερα από 700 ακριβώς διατεταγμένα ομματίδια. Αυτή η ακρίβεια συνδυάζεται με την καμπυλότητα του οφθαλμού για την ομοιόμορφη κάλυψη του οπτικού πεδίου του εντόμου. (B) Τομή ενός ενήλικου οφθαλμού 30 μm περίπου, όπου αναπαριστώνται 10 ολοκληρωμένα ομματίδια. Οι 7 βασικοί φωτοϋποδοχείς - νευρώνες ενός ομματιδίου φαίνονται εντός των ομματιδίων. Τα ραβδοειδή (μπλε) διατάσσονται σε ένα τραπεζοειδές. Είναι εντυπωσιακό το πώς απομονώνεται το κάθε ομματίδιο από το γειτονικό του μέσω του εξαγωνικού πλέγματος που σχηματίζουν τα χρωμοφόρα κύτταρα. (C) Σχηματική αναπαράσταση ενός ομματιδίου [5]

1.2.2 Δημιουργία οπτικού τμήματος στο έντομο *Drosophila melanogaster*

Όπως και κάθε άλλη δομή στο έντομο, έτσι και ο οφθαλμός προκύπτει από τους imaginal disks. οι δομές αυτές σχηματίζονται από εκφυλισμό του εκτοδέρματος, το οποίο είναι αρχικά καθορισμένο και χωρισμένο σε δύο οπτικά πεδία, σε συνδυασμό με τη δράση των μονοπατιών Decapentaplegic (Dpp) and Hedgehog (Hh), με τρόπο ανάλογο της σηματοδότησης που καθορίζει το οπτικό μέρος των σπονδυλωτών. Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια στη συνέχεια, δρουν μαζί με το Notch μονοπάτι και το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω του EGF υποδοχέα και επάγουν τον πολλαπλασιασμό, καθώς επίσης επάγουν και ένα πολύπλοκο σηματοδοτικό δίκτυο, για την δημιουργία και τον καθορισμό του οπτικού πεδίου. Έξι θεμελιώδεις μεταγραφικοί παράγοντες (eye, toy, ortix, so, eya, dac) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά και με άλλους επικουρικής δράσης, για τον καθορισμό του οπτικού πεδίου (**εικ. 1.7**). Κάθε ένας από αυτούς τους έξι μεταγραφικούς παράγοντες είναι ενεργός στον καθορισμό των οφθαλμών στα θηλαστικά και μεταλλαγές σε αυτούς, μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές παθήσεις του αμφιβληστροειδούς αλλά και αλλού [5].



Εικόνα 1.7: Δημιουργία οπτικού τμήματος. (Α) Σύγκριση της δημιουργίας των οφθαλμών στη *Drosophila* και στα σπονδυλωτά κατά τη διάρκεια της πρώιμης νευρογένεσης. (Β) Το δίκτυο των παραγόντων που είναι γνωστό πως συμμετέχουν στην δημιουργία του οπτικού πεδίου [5]

1.2.3 Μορφογενετική αυλάκωση και δημιουργία ομματιδίων

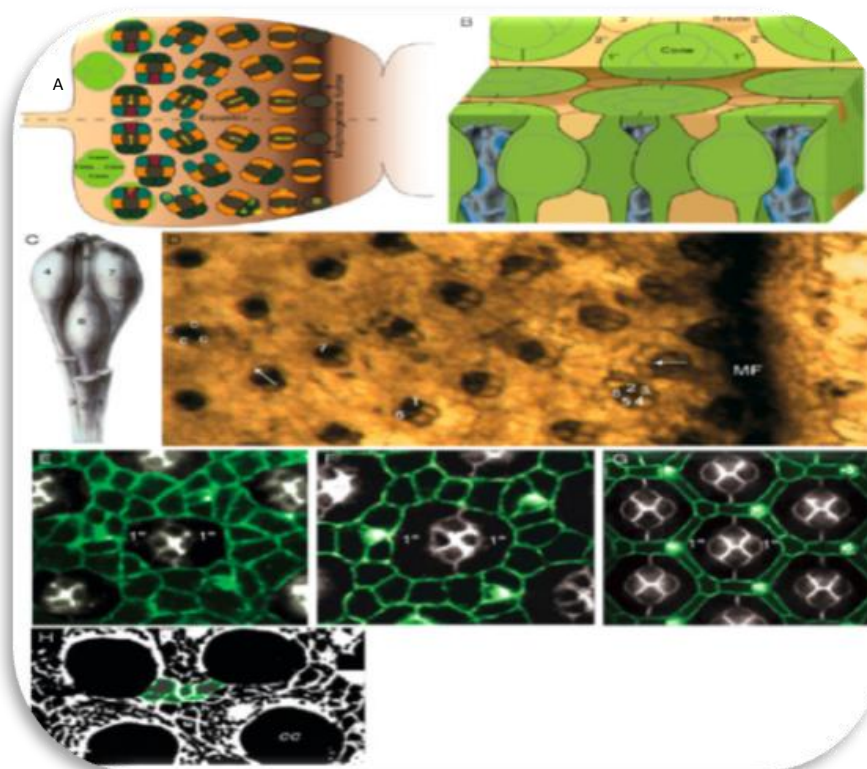
Ο κύκλος ζωής της *Drosophila* περιλαμβάνει τρία στάδια προνυμφών που συνολικά διαρκούν τέσσερις ημέρες. Στο μεγαλύτερο μέρος της ζωής του εντόμου στο στάδιο της λάρβας, οι «δίσκοι» πολλαπλασιάζονται, δημιουργώντας το οπτικό πεδίο και διαιρώντας το σε ραχιαίες και κοιλιακές περιοχές. Η διαφοροποίηση των κυττάρων ξεκινά στο μέσο περίπου του τελικού σταδίου της προνύμφης. Το πρώτο γεγονός που συμβαίνει είναι η «μορφογενετική αυλάκωση», μια φυσική εσοχή που εμφανίζεται αρχικά κοντά στο οπίσθιο άκρο του δίσκου οφθαλμού/κεραίας. Η αυλάκωση προχωρά εμπρός, καθώς οι προσδευτικές σειρές των κυττάρων αλλάζουν σχήμα μέσω του μηχανισμού ακτίνης/μυοσίνης. Πριν από την μορφογενετική αυλάκωση, τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν το τμήμα του οφθαλμού. Η αυλάκωση αποτελεί σημείο διακοπής

του κυτταρικού κύκλου καθώς τα κύτταρα μπαίνουν στην φάση G1. Ο καθορισμός της τύχης των κυττάρων ξεκινάει μέσα στην αυλάκωση και εξακολουθεί να συνεχίζει και ύστερα από αυτήν [5].

Η τύχη των κυττάρων εξαρτάται τόσο από τη θέση που κατέχουν όσο και από σήματα που δέχονται και αφορούν την διαφοροποίησή τους. Με βάση αυτούς τους δύο παράγοντες, γίνεται επαγωγή των κυττάρων και αρχίζει η διαφοροποίησή τους σε νευρώνες-φωτοϋποδοχείς. Πρώτα διαφοροποιείται ο νευρώνας R8, ύστερα οι R2 και R5, R3 / R4, R1 / R6, και τελευταίος ο R7 μέσα σε κάθε ομματίδιο. Τέσσερα κωνικά κύτταρα στρατολογούνται σε κάθε οκτάδα νευρώνα-φωτοϋποδοχέα, και στις νεαρές πούτσες, δύο πρωτογενή χρωμοφόρα κύτταρα ολοκληρώνουν ένα ομματιδιακό πυρήνα 14-κυττάρων (εικ. 1.8). Τέλος, δευτερογενή και τριτογενή χρωμοφόρα κύτταρα, καθώς επίσης και τριχιδία-βλεφαρίδες που λειτουργούν ως αισθητήριο όργανο, δημιουργούν την περιοχή των ομματιδίων με ένα ακριβές πρότυπο [5].

Η ακρίβεια στη διαδοχική ανάπτυξη των φωτοϋποδοχέων προμηνύει την ύπαρξη συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων και συμμετεχόντων μορίων κατά τις μορφογενετικές διαδικασίες. Έρευνες έχουν δείξει, ότι οι φωτοϋποδοχείς R2, R3 και R7 εκφράζουν τη διαμεμβρανική, τύπου υποδοχέα, πρωτεΐνη *sevenless*, η οποία μάλιστα από τοπολογικής άποψης εντοπίζεται στην περιοχή εκείνη της μεμβράνης των παραπάνω κυττάρων, η οποία συνορεύει με τον φωτοϋποδοχέα R8. Στο σημείο αυτό, η *sevenless* αλληλεπιδρά με τη διαμεμβρανική, τύπου προσδέτη, πρωτεΐνη *boss* (*bride-of-sevenless*) την οποία εκφράζει ο R8 φωτοϋποδοχέας [9]. Η διαφοροποίηση των R3, R4, R1 και R6 φωτοϋποδοχέων, απαιτεί την παρουσία και την έκφραση του γονιδίου *seven-up*, ενός ακόμη ουσιαστικού μεταγραφικού παράγοντα [10].

Μετά την ολοκλήρωση των βασικών μορφογενετικών διαδικασιών των ομματιδίων, αρχίζει η ανάπτυξη των βλεφαρίδων. Στην περίπτωση τους, δεν ακολουθείται η οπίσθιο-πρόσθια αλληλουχία γεγονότων, αντιθέτως η διαδικασία ξεκινά στο κέντρο του οφθαλμού και σταδιακά επεκτείνεται προς τα έξω. Οι βλεφαρίδες αποτελούνται από τέσσερα κύτταρα, τα οποία προέρχονται από ένα προγονικό κύτταρο και αναπτυσσόμενες εντάσσονται στο πλέγμα μεταξύ των ομματιδίων. Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών, τα κύτταρα των οποίων ο προσδιορισμός εκκρεμεί, εξακολουθούν να διαιρούνται και περιστασιακά, κυρίως προς το τέλος, τα πλεονάζοντα σε αριθμό πεθαίνουν, σε ποσοστό που φθάνει λίγο παραπάνω από το 10% [8].

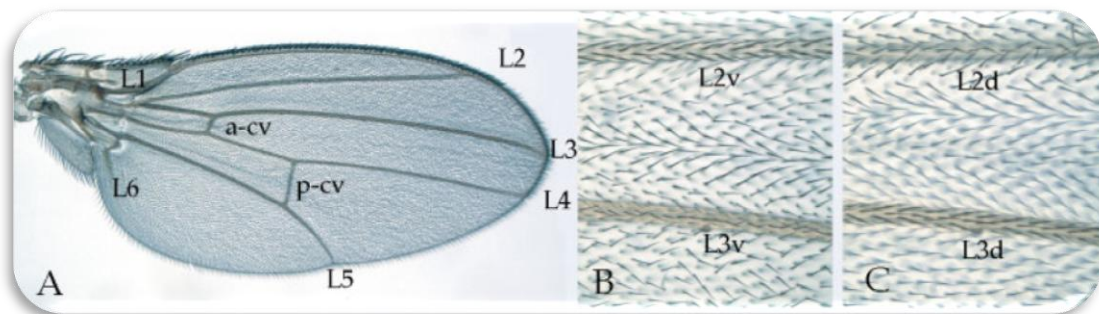


Εικόνα 1.8: Ανάπτυξη των οφθαλμών στο στάδιο της προνύμφης και της πούπας. Η διαφοροποίηση των ομματαδίων και ο σχεδιασμός των οφθαλμών ξεκινά στο τρίτο στάδιο της προνύμφης (**A-D**), και συνεχίζει στα πρώτα στάδια πούπας (**E-G**). (**A**) Οι φωτοϋποδοχείς αναδύονται προοδευτικά σε συμμετρικά ζεύγη: οι R8, R2/R5, R3/R4, R1/R6 και τέλος ο R7, αναδύονται σταδιακά και συμμετρικά κατά μήκος του κεντρικού άξονα του ομματαδίου. Η πολικότητα των κυττάρων (PCP-Planar cell polarity) εμφανίζεται με βαθμιαία περιστροφή κάθε ομματαδίου (κίτρινα βέλη). Διακρίνονται οι φωτοϋποδοχείς R3 και R4 (*) σε κάθε ομμάτιο, γεγονός απαραίτητο για την καθιέρωση της πολικότητάς του. (**B**) Στο στάδιο της πούπας, τα κορυφαία τμήματα των κωνικών και χρωμοφόρων κυττάρων, σπρώχνουν τους φωτοϋποδοχείς ώστε να κυριαρχήσουν στην επιφάνεια. Κάθε οκτάδα φωτοϋποδοχέων βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια, ακριβώς κάτω από τα πρωτογενή χρωμοφόρα κύτταρα και τα κωνικά. Ο άξονας Z παρέχεται για να δείχθει ότι ενώ οι κινήσεις των κυττάρων ξεκινούν στην κορυφαία επιφάνεια, το κάθε κύτταρο επεκτείνεται προς την βασική μεμβράνη. (**C**) Σχηματική αναπαράσταση μιας ομάδας φωτοϋποδοχέων στο στάδιο της λάρβας. (**D**) Τμήμα αναπτυσσόμενου οπτικού δίσκου στο στάδιο της λάρβας, όπου απεικονίζεται το επάνω τμήμα του. Οι μεμβράνες των κυττάρων έχουν σημανθεί με σουλφίδια κοβαλτίου. Η μορφογενετική αυλάκωση (MF- morphogenetic furrow) καθώς επίσης και η εξέλιξη των νευρώνων-φωτοϋποδοχέων (1-8) και των κωνικών κυττάρων (c) απεικονίζονται στη φωτογραφία. Με τα βέλη δίνεται έμφαση στην εξέλιξη της περιστροφής των ομματαδίων. (**E-G**) Τρεις απεικονίσεις τμήματος του οφθαλμού στο στάδιο της πούπας, σε 20, 24 και 42 ώρες APF αντίστοιχα. Τα IPCs είναι χρωματισμένα πράσινα. Στην εικόνα (**F**) φαίνεται η τελική δομή των ομματαδίων. (**H**) Σε πολλούς σύνθετους οφθαλμούς δεν γίνεται αναδιοργάνωση των χρωμοφόρων κυττάρων ώστε να δημιουργηθεί ένα ακριβές ομματαδιακό πρότυπο. Στην εικόνα φαίνεται ο οφθαλμός ενήλικης κασαρίδας με μια περιοχή 6 χαλαρά οργανωμένων κυττάρων, τύπου δευτερογενών χρωμοφόρων κυττάρων, που είναι ψευδοχρωματισμένα. Επίσης υποδεικνύονται τα κωνικά κύτταρα ενός ομματαδίου (cc) [5].

1.3 Οργάνωση και μορφογένεση των φτερών στο έντομο *Drosophila melanogaster*

1.3.1 Μορφολογία των φτερών

Το έντομο *Drosophila melanogaster* διαθέτει ένα ζεύγος επιμηκών σχηματισμών, τα φτερά, τα οποία εξυπηρετούν στην πτήση, την προστασία και τη σηματοδότηση. Έχουν τη δυνατότητα να πάλλονται έως 220 φορές το δευτερόλεπτο. Η πτήση πραγματοποιείται μέσω ευθύγραμμης κίνησης, στην οποία παρεμβάλλονται αστραπιαίοι ελιγμοί, κατά τους οποίους το έντομο έχει την ικανότητα περιστροφής 90°, σε λιγότερο από 50 msec. Τα περισσότερα έντομα διαθέτουν τέσσερις πτέρυγες, από ένα ζεύγος στο μεσοθώρακα και στο μεταθώρακα. Στη *Drosophila* όμως, το ζεύγος του μεταθώρακα έχει μετεξελιχθεί σε αλτήρες, όργανα που υποβοηθούν την κίνηση. Τα φτερά αποτελούν απλές ιστικές δομές και συνιστούν δυο πλατιά φύλλα επιθηλιακής προέλευσης, σε συνέχεια του επιδερμιδίου του θώρακα, τα οποία υφίστανται μια επακριβώς προσδιορισμένη αλληλουχία αναπτυξιακών γεγονότων *in vivo*, προκειμένου να προσδώσουν στο όργανο την τελική του μορφή [11]. Τα κύτταρα των φτερού διακρίνονται σε τριχοφόρα και φλεβικά. Τα κύτταρα των φλεβών ορίζουν συγκεκριμένο αγγειακό πρότυπο στο ενήλικο άτομο (αναφέρεται και ως 'νέυρωση'), σύμφωνα με το οποίο πέντε φλέβες διασχίζουν παραλλήλως το φτερό (L1-L5), καταλήγοντας σε συνδέσεις με το χείλος του και δύο αγγεία, a-cv και p-cv, καθέτως, συνδέοντας τα διαμήκη νεύρα L3-L4 και L4-L5 μεταξύ τους, αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα αυτής της οργάνωσης, το φτερό υποδιαιρείται μορφολογικά σε πέντε διαφλεβικά διαμερίσματα, παρεμβαλλόμενα μεταξύ των επιμηκών αιμοφόρων αγγείων (**εικ. 1.7**) [12].



Εικόνα 1.9: Μοτίβο των φλεβών του φτερού στο έντομο *Drosophila melanogaster*. (**A**) Φτερό εντόμου αγρίου τύπου, στο οποίο διακρίνονται οι διαμήκεις φλέβες (L1-L6) και οι εγκάρσιες φλέβες (a-cv, p-cv). (**B,C**) Μεγαλύτερη μεγέθυνση της κοιλιακής (**B**:L2v, L3v) και της ραχιαίας (**C**: L2d, L3d) επιφάνειας του φτερού, όπου διαφαίνονται τα τριχίδια-σμήρριγες αυτής [13]

1.3.2 Μηχανισμοί μορφογένεσης των φτερών

Η ανάπτυξη των φτερών στη *Drosophila melanogaster* ξεκινά από το εμβρυϊκό εξώδερμα, σαν μια σφαίρα κυβοειδών κυττάρων, με μια κοιλιακή κοιλότητα. Στο αναπτυξιακό στάδιο της λάρβας, αυτή η κύστη έχει ευθυγραμμιστεί και έχει τη μορφή δίσκου, κοινώς ως «larva wing disc». Όσο το έντομο τρέφεται και αυξάνει σε μέγεθος, στους δίσκους πραγματοποιούνται κυτταρικές διαιρέσεις και αύξηση του μεγέθους των κυττάρων. Στο τελικό στάδιο ανάπτυξης της λάρβας, η αύξηση των δίσκων επιβραδύνεται, και οι κυτταρικές διαιρέσεις σταματούν τελείως, προκειμένου να προετοιμαστούν σημαντικοί μορφογενετικοί μετασχηματισμοί, που θα οδηγήσουν τελικά στον σχηματισμό του φτερού (εικ. 1.10).

- ✓ Αναστροφή και επέκταση του δίσκου των φτερών (wing imaginal disk)

Οι δίσκοι των φτερών στη λάρβα, ξεκινούν τις μορφογενετικές αλλαγές με αναστροφή, έτσι ώστε η εσωτερική κορυφαία κοιλότητα στρέφεται προς τα έξω, μια διαδικασία που περιλαμβάνει συμπίεση των ραχιαίων και κοιλιακών τμημάτων του δίσκου κατά μήκος της βασικής τους επιφάνειας. Ως επακόλουθο, προκύπτει θραύση του υπερκείμενου περιφερειακού επιθηλίου. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός κορυφαίου εξωτερικού επιθηλιακού σάκου, όπου η περιοχή του φτερού διευρύνεται και επιμηκύνεται, σχηματίζοντας ένα μεγάλο επίπεδο φτερό 8 ώρες μετά το σχηματισμό της πούπας (εικ. 1.10) [14].

- ✓ Σχηματισμός του φτερού στο στάδιο της πούπας

Μετά την αναστροφή και την επιμήκυνση, το φτερό αρχίζει να διογκώνεται λόγω συσσώρευσης υγρού μεταξύ των κοιλιακών και ραχιαίων επιθηλιακών στρωμάτων, και πραγματοποιείται έκκριση του περιβλήματος. Στη συνέχεια το φτερό επανέρχεται σε επίπεδη μορφή, με επανατοποθέτηση των κοιλιακών και ραχιαίων τμημάτων κατά μήκος των βασικών του επιφανειών, με εξαίρεση τις φλέβες, οι οποίες παραμένουν ως ένα στενό κανάλι για αποθήκευση υγρού. Η συστολή του αρμού του φτερού (σημείο σύνδεσης με το σώμα) και η αγκίστρωση του φτερού στο περίβλημα της πούπας, δημιουργούν ένα καθολικό πρότυπο, όπου το φτερό ισώνει και σχηματίζεται μέσω κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και προσανατολισμένων κυτταρικών διαιρέσεων (εικ. 1.11) [14].

Ο μεταγραφικός παράγοντας SRF/Blistered εκφράζεται συγκεκριμένα στις διαφλεβικές περιοχές, αλλά όχι στις φλέβες ή στον αρμό του φτερού, δηλαδή περιοχές όπου υφίστανται έντονη συστολή. Η απώλεια του SRF / Blistered παράγοντα οδηγεί τα κύτταρα των διαφλεβικών περιοχών σε έντονη συστολή, όπως συμβαίνει στις φλέβες. Η έκφραση του SRF/Blistered καθορίζεται και επηρεάζεται από τα πρότυπα σηματοδότησης του EGFR, του Dpp και του Notch. Ο τρόπος με τον οποίον ρυθμίζεται ο κυτταροσκελετός ακτίνης-μυοσίνης κατά τον σχηματισμό των φλεβών παραμένει ασαφής, αλλά φαίνεται να εξαρτάται από την ρύθμιση της έκφρασης και τοποθέτησης της E-cadherin και N-cadherin, μέσω σηματοδότησης από τον EGFR και Dpp. Ωστόσο, η σηματοδότηση μέσω EGFR μπορεί επίσης να επηρεάσει άμεσα την συστατικότητα της Μυοσίνης-II κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης του εμβρύου [14].

Μετά από 40 ώρες από τον σχηματισμό της πούπας, τα κύτταρα έχουν υιοθετήσει μια εξαγωνική μορφή στην κορυφαία τους επιφάνεια και εκκρίνουν μια κορυφαία τρίχα στο φτερό (προεξοχή ακτίνης) με πολωμένο τρόπο, κάτω από τον έλεγχο του συστήματος Frizzled, του οποίου η πολικότητα καθιερώνεται στον δίσκο που σχηματίζει το φτερό, στο στάδιο της λάρβας. Το φτερό σε αυτή τη φάση προσομοιάζει το φτερό του ενήλικου εντόμου, με εξαίρεση το μέγεθος, όπου είναι περίπου το μισό από το τελικό-το οριστικό στάδιο που απομένει για την ολοκλήρωσή του [14].

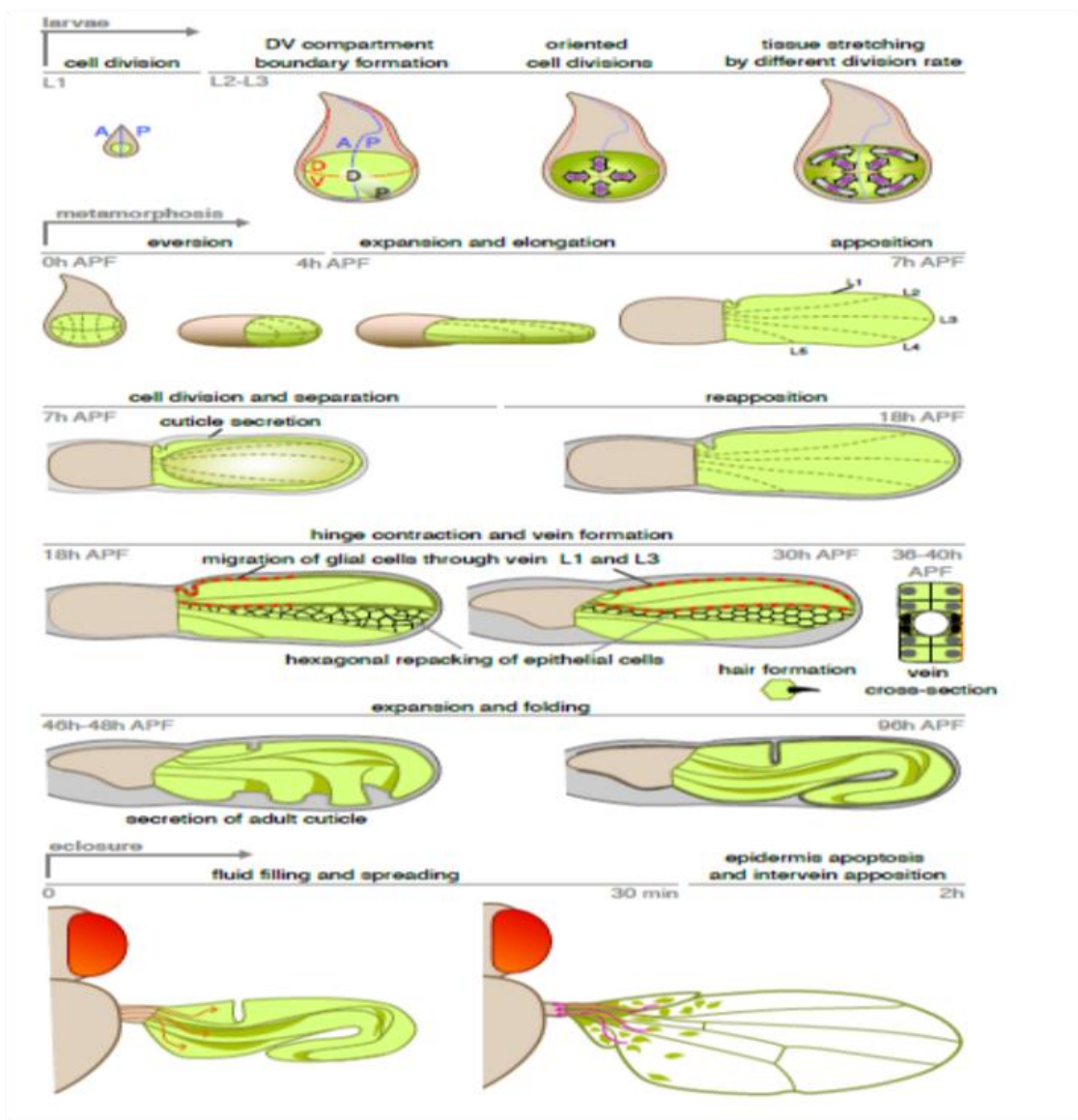
- ✓ Επέκταση του φτερού στο στάδιο της πούπας και σχηματισμός φτερού ενήλικου ατόμου

Μετά από 46 ώρες από τον σχηματισμό της πούπας, το φτερό αρχίζει να επεκτείνεται το μέγεθός του και να αναδιπλώνεται μέσα στο περίβλημα της πούπας, από το οποίο δεν έχει απομακρυνθεί ακόμη. Αυτά τα γεγονότα ανακεφαλαιώνουν ουσιαστικά αυτά που συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της πούπας,

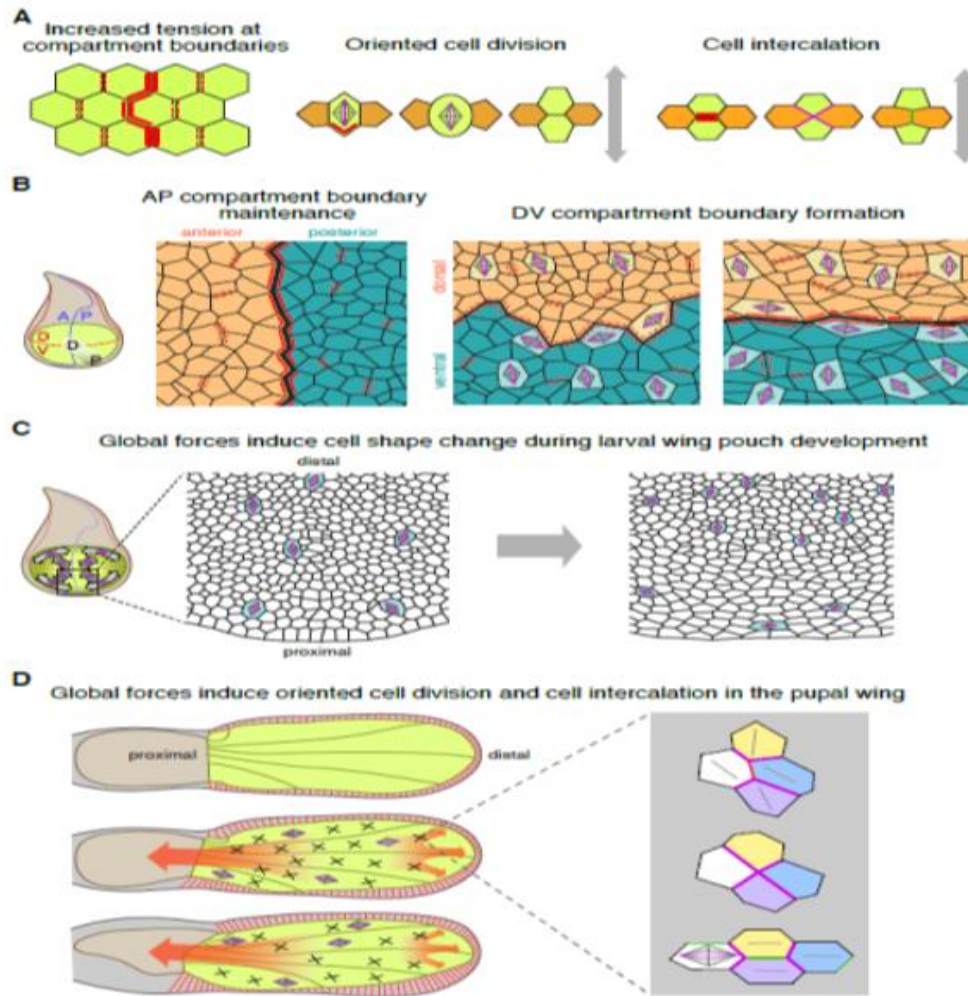
δηλαδή ευθυγράμμιση του επιθηλίου, αύξηση του μεγέθους και διαχωρισμός των κοιλιακών και ραχιαίων επιφανειών, πριν την οριστική επανατοποθέτησή τους. Η έκκριση μιας νέας επιδερμίδας πραγματοποιείται λίγο πριν την έκδυση του εντόμου από την πούτσα. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι κατά τη διάρκεια αυτού του αναπτυξιακού σταδίου, συμβαίνουν μεταλλαγές στο γονίδιο *Curly*, οι οποίες ρυθμίζουν τη σύνδεση μεταξύ των ραχιαίων και κοιλιακών επιδερμικών επιφανειών [14].

✓ Έκδυση ενήλικου εντόμου και ωρίμανση του φτερού

Ύστερα από την έκδυση του εντόμου από την πούτσα, το φτερό επεκτείνεται, με την άντληση υγρού μέσω των φλεβών, σε απόκριση στην ορμόνη Bursicon. Στο τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση των επιθηλιακών κυττάρων του φτερού, έτσι ώστε η τελική δομή του φτερού να αποτελείται κυρίως από επιδερμικό υλικό [14].



Εικόνα 1.10: Ανασκόπηση της μορφογένεσης των φτερών. Ο πρόδρομος των φτερών (wing imaginal disc) έχει δύο διαφορετικά τμήματα, που θα οδηγήσουν στον σχηματισμό του φτερού ενήλικου εντόμου (απεικονίζεται με πράσινο χρώμα) ή στην άρθρωση, καθώς επίσης και τμήμα του εξωσκελετού (απεικονίζεται με καφέ χρώμα). Κατά τη διάρκεια των σταδίων της λάρβας, η επιθηλιακή μονοστιβάδα που σχηματίζει τους προδρόμους των φτερών υπάρχει ήδη (A-P), και τα όρια των διαμερισμάτων (D-V) κατευθύνουν τις κυτταρικές διαιρέσεις και την επέκταση των ιστών με διαφορετικούς ρυθμούς διαίρεσης. Στην αρχή της μεταμόρφωσης, και ως αποτέλεσμα της αναστροφής του σάκου του φτερού, το φτερό αποτελείται από 2 επιθηλιακές στιβάδες, οι οποίες έχουν αντικριστά τις βασικές τους επιφάνειες. Μετά από 7 ώρες APF (rhabdium formation), το αναπτυσσόμενο φτερό επεκτείνεται, επιμηκύνεται, διαχωρίζεται και επανατοποθετεί και τα δύο επιθηλιακά φύλλα. Σύσπαση του αρμού του φτερού, οδηγεί σε ένα καθολικό μοτίβο δυνάμεων, που επάγουν προσανατολισμένη κυτταρική διαίρεση και αναδιάταξη του κυττάρου, ώστε να διαμορφωθεί εκ νέου το φτερό στο 'τελικό στάδιο' στις 40 ώρες APF. Τέλος, μετά την έκδυση του ενήλικου εντόμου, το διπλωμένο φτερό ξεδιπλώνεται, χάρις την εισροή υγρού στις φλέβες [14]



Εικόνα 1.11: Τοπικές και καθολικές δυνάμεις που οδηγούν στην μορφογένεση του φτερού. (A) Η αυξημένη τάση μεταξύ γειτονικών κυττάρων, η οποία οφείλεται σε πολωμένες μωσίνες (λεπτές κόκκινες γραμμές), βοηθά στη διατήρηση των ορίων μεταξύ των διαμερισμάτων, στην επιμήκυνση του κυττάρου για τον καθορισμό του προσανατολισμού του άξονα και επηρεάζει την παράθεση των κυττάρων. (B) Κατά τη διάρκεια των σταδίων της λάρβας, αυξημένη τάση-μεσολαβούμενη από μωσίνη-διατηρεί τα όρια των διαμερισμάτων AP, τα οποία κληρονομούνται από το έμβryo, ενώ τα όρια μεταξύ των διαμερισμάτων DV σχηματίζονται από συσσώρευση μωσίνης, σε συνδυασμό με προσανατολισμένη κυτταρική διαίρεση παράλληλη των ορίων DV. (C) Στο τέλος της ανάπτυξης της προνύμφης, κυτταρικές διαιρέσεις στον εγγύς-περιφερικό άξονα από το σύστημα Dachous-Fat, ξεκινούν να προσανατολίζονται εκ νέου, από ένα καθολικό μοτίβο δυνάμεων περιφερικής έκτασης, που προκύπτει από ταχύτερη ανάπτυξη στην κεντρική περιοχή του σάκου του φτερού. (D) Κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης, συστολή του ιστού της άρθρωσης, έλκει το επιθήλιο του φτερού, επαναπροσανατολίζοντας την κυτταρική διαίρεση και επάγει την παράθεση των κυττάρων [14]

1.3.3 Τοπικές και καθολικές δυνάμεις σε άλλους οργανισμούς-μοντέλα και ανθρώπινες ασθένειες

Οι ανακαλύψεις που αφορούν τα φτερά του εντόμου *Drosophila melanogaster*, μπορούν να παραλληλιστούν με άλλους ιστούς και οργανισμούς μοντέλα, καταδεικνύοντας τη γενική τους σημασία για την κατανόηση της μορφογένεσης των ιστών, καθώς επίσης και για την κατανόηση ασθενειών που αφορούν τον άνθρωπο. Για παράδειγμα, η επιμήκυνση των ιστών μέσω του συστήματος Dachshous-Fat, είναι συντηρημένη διαδικασία στα ποντίκια, και συμβάλει σε ασθένειες του ανθρώπου που αφορούν την καρδιά και το συκώτι. Το σύστημα Frizzled συμβάλει επίσης, στην επιμήκυνση των ιστών στο Zebrafish, μέσω προσανατολισμού των κυτταρικών διαιρέσεων και παράθεσης κυττάρων για σύγκλιση-επέκταση [14].

Εξωτερικά καθολικά μοτίβα δυνάμεων, μπορούν και ελέγχουν την παράθεση των κυττάρων καθώς και τον προσανατολισμό των κυτταρικών διαιρέσεων στο έμβρυο της μύγας, στην ανάπτυξη των σπονδυλωτών ή στην επούλωση τραυμάτων. Το εξωκυττάριο κολλαγόνο έχει βασικό ρόλο στην μορφογένεση των σπονδυλωτών αλλά και στον καρκίνο. Επιπροσθέτως, η σύνδεση στον εξωσκελετό χιτίνης μέσω της εξωκυττάριας ουσίας, είναι συντηρημένη στο Zebrafish. Επιπλέον, η σηματοδότηση μέσω των Wnt/Wingless, BMP/Dpp και του EGF υποδοχέα, είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν βασικό ρόλο σε πολλούς ανθρώπινους επιθηλιακούς ιστούς, αλλά και στον καρκίνο. Συμπερασματικά, μελλοντικές ανακαλύψεις που αφορούν τη μορφογένεση των φτερών στη *Drosophila*, μπορούν να ταυτοποιήσουν γενικούς μηχανισμούς που ελέγχουν τον σχηματισμό των ιστών, γεγονός που υποδεικνύει τη συσχέτιση στην ανάπτυξη διαφορετικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου [14].

1.4 Το νευρικό σύστημα του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS-central nervous system) της *Drosophila melanogaster* αποτελεί σημαντικό σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη της νευρωνικής ανάπτυξης. Ο πλούτος των διαθέσιμων τεχνικών για τη μελέτη οποιασδήποτε πτυχής της νευρογενετικής στη *Drosophila*, την καθιστά ιδανικό μοντέλο για την εύρεση απαντήσεων σε θέματα που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την λειτουργία καθώς επίσης και τις ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επομένως, δεν πρέπει να αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι βρίσκονται σε εξέλιξη σημαντικές προσπάθειες για τη χαρτογράφηση και την ταυτοποίηση όλων των νευρώνων του εγκεφάλου στο στάδιο της προνύμφης αλλά και στον εγκέφαλο του ενήλικου εντόμου της *Drosophila melanogaster*. Οι γνώσεις που προκύπτουν από αυτές τις προσπάθειες, θα ενισχύσουν περαιτέρω την ικανότητά μας να αναλύσουμε το νευρικό κύκλωμα και τους γενετικούς μηχανισμούς που ελέγχουν διάφορες συμπεριφορές. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα λεπτομερούς μελέτης της λειτουργίας γονιδίων που έχουν εμπλακεί σε ανθρώπινες ασθένειες που σχετίζονται με το νευρικό σύστημα, όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές και οι ψυχιατρικές διαταραχές [15].

1.4.1 Σύνοψη της ιστολογίας του νευρικού συστήματος στο έντομο *Drosophila melanogaster*

Συνολικά, ο εγκέφαλος της ενήλικας μύγας και το θωρακικό γάγγλιο (το ισοδύναμο της μύγας με τον νωτιαίο μυελό των θηλαστικών) φιλοξενεί 200.000 – 300.000 νευρώνες. Οι νευρώνες στη *Drosophila* είναι αρκετά όμοιοι ως προς τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες, με τους νευρώνες των θηλαστικών:

- ✓ Διεγείρουν κατάλληλα δυναμικά δράσης βασισμένα σε ιόντα Na^+/K^+
- ✓ Χρησιμοποιούν υψηλά συντηρημένους μηχανισμούς απελευθέρωσης συναπτικών κυστιδίων, τα οποία περιέχουν συντηρημένους νευροδιαβιβαστές, (γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), γλουταμικό, ακετυλοχολίνη) αλλά και νευροδιαμορφωτές (βιογενείς αμίνες, νευροπεπτίδια)

Η ιστολογία του νευρικού συστήματος στο ενήλικο άτομο της *Drosophila* είναι σχετικά περίπλοκη. Ο εγκέφαλος χωρίζεται σε πολλούς ανατομικά διακριτούς εγκεφαλικούς λοβούς, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με πολλά συσσωματωμένα νεύρα. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δύο ιστολογικές περιοχές: τον νευρωνικό κυτταρικό φλοιό, στον οποίο εδρεύονται όλα τα σώματα των νευρώνων του ΚΝΣ, και το νευροπίλημα, από την οποία προβάλλουν οι άξονες και οι δενδρίτες και σχηματίζουν τα νευρικά κυκλώματα [16] (**εικ 1.12**).

Όπως και στα θηλαστικά, τα κύτταρα της γλοίας στη *Drosophila* χαρακτηρίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη μορφολογία τους και τη σύνδεσή τους με τους νευρώνες (**εικ 1.12**). Ο ακριβής αριθμός των γλοιακών κυττάρων στο νευρικό σύστημα της *Drosophila* παραμένει ασαφής, αλλά πιθανώς αντιπροσωπεύει το 5% -10% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων του ΚΝΣ. Πιο βαθιά στο ΚΝΣ, ένας αριθμός εξειδικευμένων υποτύπων γλοιακών κυττάρων συνδέονται με τους νευρώνες [16]. Ποιο αναλυτικά οι τύποι της γλοίας είναι οι εξής:

- ✓ Επιφανειακή γλοία

Αποτελεί το εξωτερικό στρώμα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (blood-brain barrier / BBB) που απομονώνει το νευρικό σύστημα από την αιμολήμφο του ανοικτού κυκλοφορικού συστήματος του εντόμου. Δύο τύποι γλοιακών κυττάρων την αποτελούν, που μπορούν να διακριθούν με βάση τη θέση τους και το κυτταρικό σχήμα τους: περινευρικά κορυφαία κύτταρα, τα οποία καλύπτονται από μια παχιά εξκυτταρική μήτρα, νευρικό έλασμα και υποπερινευρική βασική γλοία (subperineurial (basal) glia) [17].

Η περινευρική γλοία βρίσκεται πάνω στην γαγγλιακή επιφάνεια και έχει μικρούς επιμήκεις πυρήνες και πιθανώς η λειτουργία της σχετίζεται μόνο με τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό στα ενήλικα έντομα. Η ακριβής λειτουργία της δεν είναι γνωστή. Η υποπερινευρική γλοία σχηματίζει ένα εσωτερικό στρώμα μεγάλων γλοιακών κυττάρων και είναι πλούσια σε συνδέσεις, που προτείνεται ότι είναι τα κύρια συστατικά του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στο στάδιο της προνύμφης. Έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι δύο στοιβάδες γλοιακών κυττάρων, με τα διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, παίζουν μη αλληλεπικαλυπτόμενο, συμπληρωματικό ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας του BBB [17].

- ✓ Γλοία του φλοιού

Τα γλοιακά κύτταρα του φλοιού διατηρούν στενή επαφή με τα σώματα των νευρώνων στον φλοιό του ΚΝΣ. Ανατομικά σχηματίζουν ένα πλέγμα στο φλοιό, και ένα μόνο γλοιακό κύτταρο του φλοιού μπορεί να περιβάλλει πολλά σώματα νευρώνων. Στο οπτικό σύστημα, όλα τα γλοιακά κύτταρα του φλοιού ονομάζονται «δορυφορική γλοία», εκ των οποίων υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι στο έλασμα, που κάθε ένας περιβάλλει τα κυτταρικά σώματα διαφορετικών κατηγοριών νευρώνων [17].

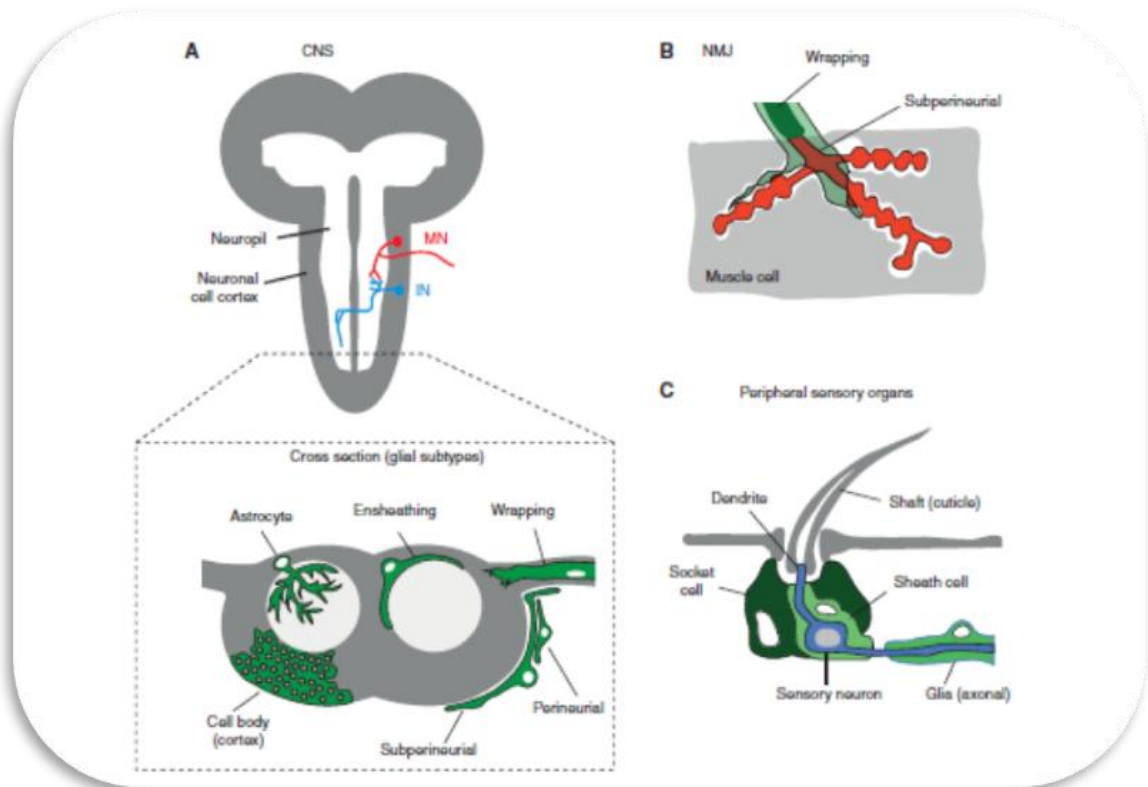
- ✓ Γλοία νευροπιλήματος

Τα κύτταρα σε αυτόν τον τύπο γλοίας, έχουν τον πυρήνα τους στο συναπτικό νευροπίλημα, που σχετίζονται με τους νευράξονες και τις αξονικές δέσμες και επεκτείνουν τις μεμβράνες που μοιάζουν με «μανδύα» γύρω από τις αξονικές δεσμίδες. Βοηθούν στην απομόνωση των νεύρων και μπορούν να προάγουν την επιβίωση των νευρώνων μέσω τροφικής υποστήριξης. Η γλοία του νευροπιλήματος μπορεί να είναι: 1) ινώδης ή 2) δενδριτική και αστροκυτταρική. Η αστροκυτταρική γλοία επεξεργάζεται εκτεταμένες διαδικασίες στο νευροπίλημα, και με βάση χωρικές υποθέσεις υπαγορεύεται ότι πρέπει να συνδέεται με συναπτικές περιοχές και έτσι μπορεί να διαμορφώνει τις νευρικές συνδέσεις [17, 18].

Η γλοία των ασπόνδυλων ωστόσο μπορεί να έχει λειτουργικές ομοιότητες με εκείνη των θηλαστικών. Η γλοία στον εγκέφαλο των εντόμων, αν και διακρίνεται από εκείνη των θηλαστικών, εν τέλει μοιράζεται κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Η πιο εμφανής διαφορά μεταξύ της γλοίας των θηλαστικών και των

εντόμων είναι ο αριθμός των κυττάρων στο ΚΝΣ, με την γλοία να αποτελεί τον πιο άφθονο κυτταρικό τύπο του εγκεφάλου των θηλαστικών εν αντιθέσει με τα έντομα όπου αποτελεί μόλις το 10-25%. Ενώ οι δέσμες των αξόνων στα έντομα καλύπτονται από τη γλοία, οι άξονες από μόνοι τους δεν συνδέονται με κανένα τύπο κυττάρου Schwann ή με ολιγοδενδρικά - τύπου θήκης μυελίνης κύτταρα, αν και στη γλοία της *Drosophila* εκφράζεται η νευροεξίνη, ένα βασικό συνδετικό πρωτεϊνικό συστατικό που απαιτείται για τη μυελίνωση των σπονδυλωτών. Ομοιότητες όμως εμφανίζονται και ως προς τη δομή της γλοίας. Κύτταρα γλοίας σε μορφή αστροκυττάρων, εντοπίζονται εντός των συναπτικών νευροπλημάτων της *Drosophila*. Παρομοίως, ως γλοία νευροπληματος θα μπορούσαν να θεωρηθούν ολιγοδενδρικά κύτταρα που τυλίγουν και οδηγούν μεμονωμένους νευράξονες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και αστροκυτταρα που εμπλέκονται στην ρύθμιση της ανακύκλωσης των νευροδιαβιβαστών στο ενήλικο άτομο. Δεν έχει αναφερθεί στη *Drosophila* μικρογλοία ανοσο-σχετιζόμενη [17].

Στη *Drosophila*, συναντάμε έναν αριθμό υποτύπων γλοιακών κυττάρων εκτός του ΚΝΣ, ο ρόλος των οποίων είναι η στήριξη και η διαμόρφωση τόσο της ανάπτυξης όσο και της λειτουργίας των περιφερειακών αισθητήριων νευρών, των αξόνων των κινητικών νευρώνων και των ακροδεκτών (**εικ 1.12**). Τα περιφερικά νύρα καλύπτονται από τα στρώματα PG και SPG, με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που συναντάμε στο ΚΝΣ, αλλά επιπλέον υπάρχει ένας πληθυσμός γλοιακών κυττάρων (wrapping glia) που περιβάλλουν τους κινητικούς και αισθητήριους άξονες και των οποίων η ιστολογία είναι παρόμοια με αυτή των θηλαστικών. Στις νευρομυϊκές συνδέσεις το SPG στρώμα προάγει διαδικασίες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις συναπτικές συνδέσεις των κινητικών νευρώνων των μυών (**εικ 1.12**), όπου εκτελούν πολλές βασικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ανακύκλωσης των νευροδιαβιβαστών. Τέλος, οι νευρώνες των εξωτερικών αισθητήριων οργάνων που ευθύνονται για τη λήψη μηχανικών, χημικών ή άλλων ερεθισμάτων από το περιβάλλον συνδέονται στενά με υποδοχείς γλοιακών κυττάρων, αλλά και με τα γλοιακά κύτταρα θήκης που τυλίγουν τον νευρίτη και το κυτταρικό σώμα, και ένα νευρογλοιακό κύτταρο που σχετίζεται με τον άξονα [16] (**εικ 1.12**).



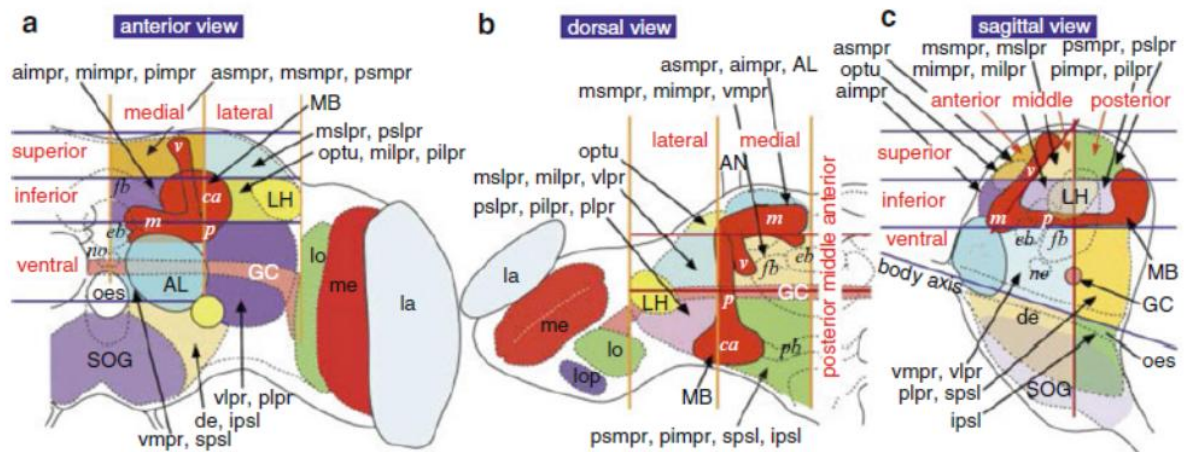
Εικόνα 1.12: Υπότυποι, θέσεις και μορφολογία της γλοίας στο έντομο *Drosophila melanogaster*. **(Α)** Επισκόπηση του κεντρικού νευρικού συστήματος στο στάδιο της προνύμφης. Στο φλοιό των νευρωνικών κυττάρων (γκρι χρώμα) συναντάμε όλα τα νευρωνικά και τα περισσότερα γλοιακά κυτταρικά σώματα. Συνάψεις μεταξύ των νευρώνων στο ΚΝΣ εντοπίζονται εντός του νευροπιλήματος (ανοιχτό γκρι). Οι διάμεσοι νευρώνες (Interneurons-IN / μπλε χρώμα) διατηρούν όλες τις προβολές τους στη νευροτύλη. Οι κινητικοί νευρώνες (motoneurons-MN / κόκκινο χρώμα) επεκτείνουν τους άξονες τους στο περιφερειακό μυϊκό πεδίο. Στην κάτω όψη παρουσιάζονται οι διάφοροι υπότυποι της γλοίας (πράσινο χρώμα). Η μορφολογική διάταξη στον εγκέφαλο ενήλικου εντόμου είναι παρόμοια. **(Β)** Παρατήρηση της γλοίας σε νευρομυϊκές συνδέσεις (neuromuscular junction – NMJ) στο στάδιο της προνύμφης. Τα άκρα των κινητικών νευρώνων (motor neuron - MN) διεισδύουν στο μυ. **(C)** Τα αισθητήρια όργανα της *Drosophila* περιέχουν τουλάχιστον τρεις τύπους νευρογλοίας: το κύτταρο υποδοχέα, το κύτταρο θήκης και ένα κύτταρο σχετιζόμενο με τον άξονα [16]

1.4.2 Ο εγκέφαλος στο ενήλικο άτομο της μύγας

Ο εγκέφαλος στο ενήλικο άτομο της *Drosophila melanogaster* αποτελείται από τρία νευρομερή που ονομάζονται πρωτεγκέφαλος (protocerebrum), δευτεγκέφαλος (deutocerebrum) και τριτεγκέφαλος (tritocerebrum), που υποδιαιρούνται περαιτέρω σε διάφορες περιοχές. Η ονοματολογία που χρησιμοποιείται εδώ βασίζεται στο κανονικό σύστημα ονομασίας που προορίζεται για σαφώς προσδιορισμένες θέσεις στον εγκέφαλο [15]. Οι περιοχές που χωρίζεται ο εγκέφαλος είναι οι εξής (**εικ 1.13**) :

- I. Οπτικοί λοβοί (Optic lobes)
 - Έλασμα (Lamina - LA)
 - Κυρίως έλασμα (Lamina proper - LAP)
 - Έλασμα ακραίας ραχιαίας περιοχής (Lamina dorsal rim area - LADRA)
 - Δικτυωτό έλασμα (Plexiform - lamina PLLA)
 - Πρόσθετο έλασμα (Accessory lamina - ALA)
 - Μυελός (Medulla - ME)
 - Κυρίως μυελός (medulla proper - MEP)
 - Μυελός ακραίας ραχιαίας περιοχής (Medulla dorsal rim area - MEDRA)
 - Δικτυωτός μυελός (Plexiform medulla)
 - Εξωτερικός μυελός (Outer medulla - MEO)
 - Ελικοειδής στοιβάδα (Serpentine layer – SPL)
 - Εσωτερικός μυελός (Inner medulla - MEI)
 - Πρόσθετος μυελός (Accessory medulla - AME)
 - Λοβιακό σύμπλοκο (Lobula complex - LOX)
 - Λοβιακός (lobula - LO)
 - Λοβιακός δίσκος (Lobula plate - LOP)
- II. Mushroom bodies (MB)
 - Σύμπλεγμα κάλυκα (Calyx complex - CAX)
 - Κάλυκας (Calyx - VA)
 - Διάμεσος κάλυκας (medial calyx - MCA)
 - Πλευρικός κάλυκας (lateral calyx - LCA)
 - Πρόσθετος κάλυκας (Accessory calyx - ACA)
 - Μισχωτό τμήμα (Pedunculus - PED)
 - Μισχωτός λαιμός (Pedunculus neck - PEDN)
 - Μισχωτό χώρισμα (pedunculus divide - PEDD)
 - Άκανθα (Sprue - SPU)
 - Κατακόρυφοι λοβοί (Vertical lobes - VL)
 - Διάμεσοι λοβοί (Medial lobes - ML)
- III. Κεντρικό σύμπλεγμα (Central complex - CX)
 - Κεντρικό σώμα (Central body - CB)
 - Ελλειψοειδές σώμα (Ellipsoid body - EB)

- Fan-shaped body (FB)
- Πρωτοεγκεφαλική γέφυρα (Protocerebral bridge - PB)
- Noduli (NO)
- IV. Πλευρικό σύμπλεγμα (Lateral complex - LX)
 - Βολβός (Bulb - BU)
 - Πλευρικός πρόσθετος βολβός (Lateral accessory lobe - LAL)
 - Άνω πλευρικός πρόσθετος βολβός (Upper lateral accessory lobe - ULAL)
 - Κάτω πλευρικός πρόσθετος βολβός (Lower lateral accessory lobe - LLAL)
 - Gall
- V. Πλαγιοκοιλιακό νευροπίλημα (Ventrolateral neuropils - VLNP)
 - Οπτικός σωλήνας (Optic tubercle - OTU)
 - Πλαγιοκοιλιακός πρωτεγκέφαλος (Ventrolateral protocerebrum - VLP)
 - Οπισθοπλευρικός πρωτεγκέφαλος (Posteriorlateral protocerebrum - PLP)
- VI. Πλευρικό κέρασ (Lateral horn - LH)
- VII. Άπω νευροπιλήματα
 - Ανώτερος πλευρικός πρωτεγκέφαλος (Superior lateral protocerebrum - SLP)
 - Ενδιάμεσος πλευρικός πρωτεγκέφαλος (Intermediate lateral protocerebrum - SIP)
 - Μέσος πλευρικός πρωτεγκέφαλος (Medial lateral protocerebrum - SMP)
- VIII. Κατώτερα νευροπιλήματα (Inferior neuropils - INP)
 - Σύνδεσμος (Clamp – CL)
 - Ανώτερος σύνδεσμος (Superior clamp - SCL)
 - Κατώτερος σύνδεσμος (Inferior clamp - ICL)
 - Crepine (CRE)
 - Rubus (RUB)
 - Antler (ATL)
 - Κατώτερη γέφυρα (Inferior bridge - IB)
- IX. Λοβός κεραίας (Antennal lobe - AL)
 - Antennal lobe hub (ALH)
 - Antennal lobe glomeruli (GL or ALGL)
- X. Μεσοκοιλιακά νευροπιλήματα
 - Κοιλιακό σύμπλεγμα (Ventral complex - VX)
 - Οπίσθιο επίπεδο (Posterior slope - PS)
 - Άπω οπίσθιο επίπεδο (Superior posterior slope - SPS)
 - Κάτω οπίσθιο επίπεδο (Inferior posterior slope - IPS)
- XI. Περι-οισοφαγικά νευροπιλήματα (Periesophageal neuropils - PONP)
 - Saddle (SAD)
 - antennal mechanosensory and motor center – AMMC
 - Flange (FLA)
 - Cantle (CAN)
 - Prow (PRW)
 - dorsal pharyngeal sensory center (DPS)
- XII. Υπο-οισοφαγικό γάγγλιο (Subesophageal ganglion - SOG)
 - Κοιλιακό φαρυγγικό αισθητήριο κέντρο (Ventral pharyngeal sensory center - VPS)
 - Μπροστινό γναθικό αισθητήριο κέντρο (Anterior maxillary sensory center - AMS)
 - Οπίσθιο γναθικό αισθητήριο κέντρο (Posterior maxillary sensory center - PMS)
 - Labellar sensory center (LBS)



Εικόνα 1.13: Τμήματα του εγκεφάλου ενήλικου ατόμου στη *Drosophila*. Οι μπλε, κόκκινες και πορτοκαλί γραμμές ορίζουν τα οριζόντια, στεφανιαία και οβελιαία επίπεδα που χρησιμοποιήθηκαν για να διαιρεθεί ο εγκέφαλος στα τμήματα αυτά: **la** – lamina, **me** – medulla, **lo** – lobula, **lop** – lobula plate, **a** – anterior, **m** – middle, **p** – posterior, **s** – superior, **i** – inferior, **v** – ventral, **lpr** – lateral protocerebrum, **mpr** – medial protocerebrum, **optu** – optic tubercle, **de** – deutocerebrum, **psl** – posterior slope, **oes** – esophagus, **GC** – great commissure, **AL** – antennal lobe, **SOG** – subesophageal ganglion, **LH** – lateral horn, **MB** – mushroom body, **CC** – central complex (**fb** / fan-shaped body, **eb** – ellipsoid body, **no** – nodule, **pb** – protocerebral bridge) [15]

1.5 Δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων στη *Drosophila melanogaster*

1.5.1 Το σύστημα GAL4/UAS στη *Drosophila*

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στα διαθέσιμα γενετικά εργαλεία διαχείρισης των οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως «μοντέλα» στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών. Ιδιαίτερη ανάπτυξη παρουσιάστηκε στην περίπτωση του οργανισμού-μοντέλου *Drosophila melanogaster*, όπου η παροχή των παραπάνω εργαλείων, σε συνδυασμό με την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματός του, οδήγησε στη δυνατότητα ανάλυσης οποιασδήποτε βιολογικής διαδικασίας στο εν λόγω έντομο. Ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα σύγχρονα γενετικά εργαλεία, είναι και το σύστημα GAL4/UAS, με το οποίο επιτυγχάνεται στοχευμένη γονιδιακή έκφραση στη *Drosophila*. Χάρη στις εφαρμογές αυτού του συστήματος, η *Drosophila melanogaster* έγινε ένα από τα πιο εύχρηστα, από γενετικής άποψης, μετάζωα και προσέλκυσε το ενδιαφέρον της βιοτεχνολογικής βιομηχανίας, ως μέσο ενδεδειγμένης διερεύνησης της λειτουργίας γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται σε πολυάριθμες, ιατρικά και οικονομικά αξιόλογες, διαδικασίες [19].

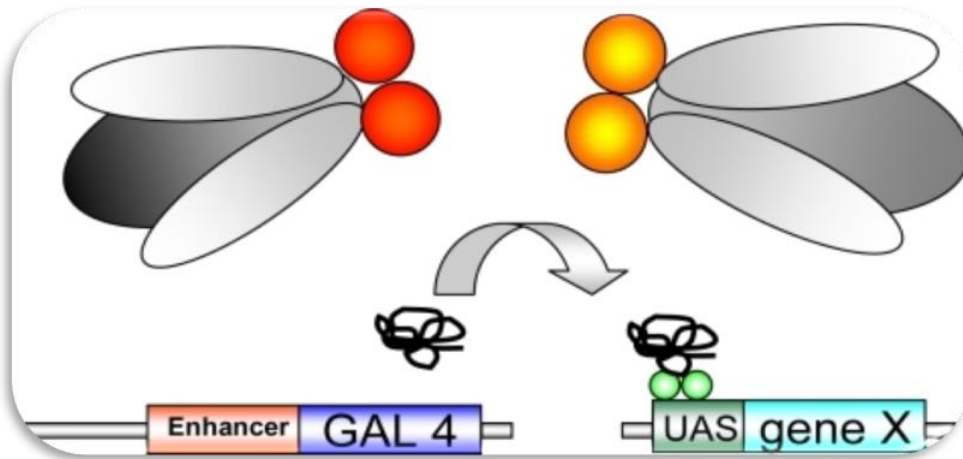
Το γονίδιο *gal4*, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 881 αμινοξέων, που ταυτοποιήθηκε στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και έχει ρόλο ρυθμιστή γονιδίων, ο οποίος επάγεται από τη γαλακτόζη [20]. Ο παράγοντας GAL4 στο ζυμομύκητα ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων GAL10 και GAL1, χάρη στην ικανότητά του να προσδένεται άμεσα σε τέσσερις, σχετιζόμενες μεταξύ τους, περιοχές μήκους 17 ζβ, ευρισκόμενες μεταξύ των δύο εν λόγω γονιδίων. Οι περιοχές αυτές συνιστούν ένα Upstream Activating Sequences (UAS) στοιχείο, ανάλογο ενός υποκινητή που έχει βρεθεί στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το οποίο είναι απαραίτητο για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των συγκεκριμένων, σχετιζόμενων με τον παράγοντα GAL4, γονιδίων. Η ενεργότητα πρόσδεσης του GAL4 στο DNA, αποδίδεται στα πρώτα 74 αμινοξικά κατάλοιπα της αλληλουχίας του, ενώ η μεταγραφική ενεργότητά του σχετίζεται με δύο περιοχές, η μία οριοθετούμενη από τα κατάλοιπα

148 έως 196 και η άλλη από τα κατάλοιπα 768 έως 881 [21]. Με δεδομένα τα παραπάνω και μετά από μία σειρά ερευνών, οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι η έκφραση του παράγοντα GAL4 είναι ικανή να διεγείρει τη μεταγραφή ενός γονιδίου-ανταποκριτή (reporter gene) στη *Drosophila*, υπό τον έλεγχο του UAS στοιχείου [22], χαρίζοντας στην επιστήμη ένα ανεκτίμητο εργαλείο γενετικών και κυτταροβιολογικών προσεγγίσεων. Βεβαίως η δράση του GAL4 δεν περιορίζεται στο εν λόγω έντομο, αλλά δύναται να λειτουργήσει σε μία σε μία ποικιλία βιολογικών συστημάτων [22].

Μέσω του συστήματος GAL4 επιτυγχάνεται στοχευμένη γονιδιακή έκφραση σε συγκεκριμένο χρόνο και σε συγκεκριμένη περιοχή, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η λειτουργία των γονιδίων, *in vivo* (εικ. 1.14). Η έκφραση του γονιδίου-ανταποκριτή που μας ενδιαφέρει ρυθμίζεται από την παρουσία του στοιχείου UAS, που στην προκειμένη περίπτωση απαρτίζεται από πέντε διαδοχικά διατεταγμένες και βελτιστοποιημένες περιοχές πρόσδεσης του παράγοντα GAL4. Δεδομένου ότι η μεταγραφή του ανταποκριτή προϋποθέτει την παρουσία του παράγοντα GAL4, απουσία αυτού διατηρείται μία μεταγραφικά ανενεργός κατάσταση. Για να ενεργοποιηθεί το γονίδιο, το στέλεχος που το φέρει ζευγαρώνει με ένα στέλεχος στο οποίο εκφράζεται ο παράγοντας GAL4 με βάση ένα συγκεκριμένο πρότυπο και το οποίο αποκαλείται οδηγός (driver) διότι «κατευθύνει» την έκφραση και απαιτείται για αυτήν. Οι προκύπτοντες απόγονοι της διασταύρωσης εκφράζουν το γονίδιο-ανταποκριτή σύμφωνα με ένα μεταγραφικό πρότυπο, όπως αυτό ορίζεται από το πρότυπο του παράγοντα GAL4, του αντίστοιχου οδηγού.

Η εφαρμογή της εν λόγω τεχνολογίας προσφέρει ποικίλα πλεονεκτήματα. Πρώτον, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν διαγονιδιακές σειρές ανταποκριτών για γονιδιακά προϊόντα που είναι τοξικά, θνησιγενή ή προκαλούν χαμηλή βιωσιμότητα όταν εκφραστούν, χωρίς οι ίδιες να επηρεάζονται, δεδομένου ότι εν γένει χαρακτηρίζονται από μεταγραφική σίγαση. Η διασταύρωση στελεχών-ανταποκριτών με τον ειδικό GAL4-οδηγό, ενεργοποιεί την έκφραση των παραπάνω προϊόντων στους απογόνους, προκαλώντας της συνέπειες της λειτουργίας τους. Έτσι, προκύπτει ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της επίδρασης είτε της απώλειας συγκεκριμένων κυττάρων, είτε του ρόλου και της λειτουργίας συγκεκριμένων δομών και γονιδίων, όσον αφορά στις διαδικασίες που μας ενδιαφέρει να διερευνήσουμε. Δεύτερον, ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα προσφέρει η δυνατότητα στοχευμένης έκφρασης ενός γονιδίου-ανταποκριτή, βάσει ενός συγκεκριμένου χωροχρονικού προτύπου, διασταυρώνοντας το επιθυμητό στέλεχος-ανταποκριτή με τον κατάλληλο GAL4-οδηγό. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση μιας μεγάλης ποικιλίας ρυθμιστικών αλληλουχιών του γονιδίου GAL4 και δημιουργία ενός enhancer trap (pGAWB), με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας σειράς GAL4-οδηγών για στοχευμένη έκφραση σε σχεδόν κάθε κύριο τύπο ιστού.

Το σύστημα GAL4/UAS αποτελεί ένα εργαλείο εκτοπικής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, ωστόσο οι εφαρμογές του συνεχώς εμπλουτίζονται και περιλαμβάνουν προσεγγίσεις όπως: 1) ταυτοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν σε συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες, μέσω ενίσχυσης ή παγίδευσης γονιδίων, 2) ανάλυση της κυτταρικής αυτονομίας ενός γονιδιακού προϊόντος, μέσω στοχευμένων μωσαϊκών, 3) κυτταρική σήμανση για τη μελέτη της δράσης γονιδιακών προϊόντων στην υπό μελέτη βιολογική διαδικασία και 4) απώλεια λειτουργίας γονιδίων, μέσω στοχευμένης έκφρασης RNAi μεταγράφων και επακόλουθη ανάλυση φαινοτύπων κλπ [19].



Εικόνα 1.14: Το σύστημα GAL4/UAS. Διαγονιδιακές μύγες που εκφράζουν τον μεταγραφικό ενεργοποιητή Gala4 του ζυμομύκητα, διασταυρώνονται με διαγονιδιακές μύγες που φέρουν την αλληλουχία UAS (upstream activating sequence) και το γονίδιο ενδιαφέροντος (gene X). Το γονίδιο "X" ενεργοποιείται στους απογόνους ύστερα από διασταύρωση των δύο αυτών διαγονιδιακών γραμμών. Το διαγονίδιο εκφράζεται με τρόπο εξαρτώμενο από τον χρόνο ή τον ιστό με βάση την επιλεγμένη γραμμή οδηγού GAL4 [23]

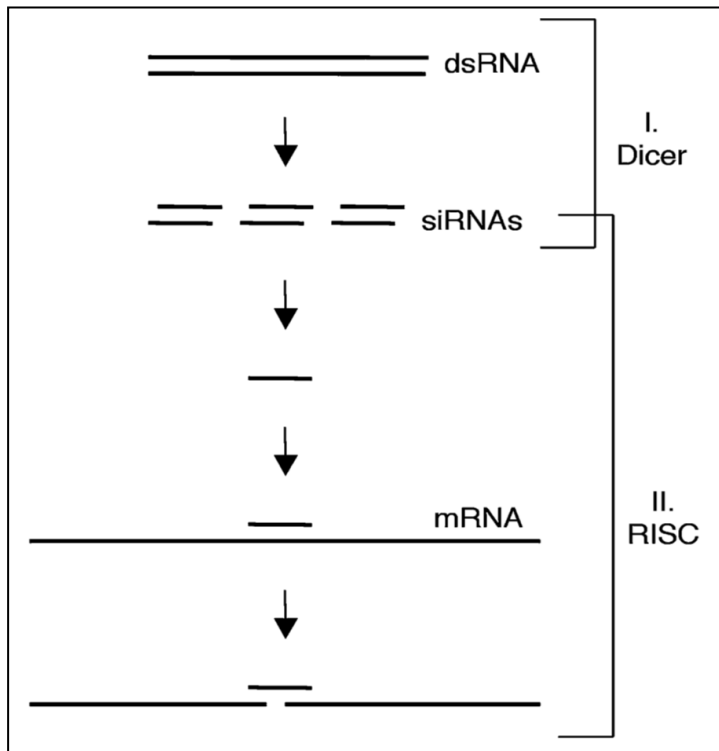
1.6 Το RNAi (RNA interference) μονοπάτι στον έλεγχο της ενεργότητας γονιδίων

Ίσως ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα στην PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) και στην RNA σίγηση σε γενικές γραμμές, ήταν η ανακάλυψη ενός απροσδόκητου είδους RNA μήκους περίπου 25 nt, που αντιστοιχεί τόσο στη νοηματική όσο και στη μη- νοηματική αλληλουχία των mRNA's στόχων, και έχει αυστηρή συσχέτιση με την εμφάνιση του PTGS. Η παρουσία τόσο του νοηματικού όσο και του μη-νοηματικού τύπου του συγκεκριμένου RNA, υποδηλώνει ότι δίκλωνο RNA (dsRNA) πρέπει να παράγεται πριν από το σχηματισμό των ειδών αυτών. Επίσης, η σημασία της ενεργοποίησης dsRNA στην PTGS, αποδείχθηκε από την κατασκευή RNA's, τα οποία είχαν την ικανότητα να δημιουργούν δίκλωνες δομές είτε μέσω δομών φουρκέτας, είτε μέσω σύνδεσης νοηματικού και μη νοηματικού κλώνου (sense- antisense), και τα οποία ήταν ισχυρότεροι επαγωγείς της γονιδιακής σίγησης από αντίστοιχα μονόκλωνα RNA με νοηματικό ή μη-νοηματικό προσανατολισμό. Η πρώτη άμεση απόδειξη ότι το dsRNA μπορεί να οδηγήσει σε RNA σίγηση προήλθε από μια εργασία στο νηματώδη *C. elegans*. Ενώ οι ερευνητές χρησιμοποιούσαν μη νοηματικές αλυσίδες RNA για να παρεμποδίσουν την γονιδιακή έκφραση, έκπληκτοι βρήκαν πως μόρια με νοηματικό προσανατολισμό ήταν το ίδιο αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης. Το παράδοξο αυτό λύθηκε , όταν αποδείχθηκε πως dsRNA, είναι ο επαγωγέας της παρεμπόδισης RNA (RNAi) και το αποτέλεσμα του παραπάνω πειράματος οφειλόταν σε RNAi εξαιτίας μόλυνσης του μονόκλωνου RNA που χρησιμοποιούνταν, με dsRNA. Μεταγενέστερα πειράματα πρότειναν ότι το RNAi στοχεύει σε ένα μετα-μεταγραφικό γεγονός της έκφρασης του γονιδίου . Με την αύξηση του ποσοστού των λαθών σε ένα mRNA, το RNAi οδηγεί σε φαινοτύπους που είτε είναι ταυτόσημοι με γενετικά μηδενικές μεταλλαγές, ή μοιάζουν με αλληλόμορφες μεταλλαγμένες σειρές. Το dsRNA λοιπόν, στοχεύει mRNA τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα των εκτεθειμένων κυττάρων, αλλά δρα μετά το μάτισμα. Μεμονωμένα πολυιστρονικά mRNAs μπορούν να στοχευθούν ανεξάρτητα, ενώ dsRNA που στρέφεται έναντι αλληλουχιών του παρακινητή και των εσονίων δεν είναι αποτελεσματικό στην επαγωγή του RNAi. Αξίζει να αναφέρουμε πως η αλληλουχία του dsRNA δεν είναι απαραίτητο, να είναι πλήρως ταυτόσημη με το γονίδιο στόχο (έχει βρεθεί ότι ακόμη και 88% ομοιότητα είχε αποτελεσματικότητα στην επαγωγή RNAi).

1.6.1 Λεπτομερής μελέτη του RNAi μηχανισμού

Το μόριο το οποίο είναι τελεστής στο φαινόμενο του RNAi είναι ένα dsRNA μήκους 21-25nt το λεγόμενο siRNA (small interfering RNA-μικρά παρεμβατικά RNA), με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου-στόχου. Τα siRNA's είναι δίκλωνα μόρια με δύο νουκλεοτίδια να προεξέχουν σε κάθε 3' άκρο, και 5'-φωσφορυλιωμένο άκρο, και αυτή η διαμόρφωση είναι λειτουργικά σημαντική για την ενσωμάτωση του στο σύμπλοκο του RISC. Επίσης το 5' άκρο φαίνεται πως είναι λιγότερο σημαντικό από το 3' άκρο, για την αναγνώριση του στόχου και την πραγματοποίηση του RNAi. Παρ' ότι αποκλειστικά και μόνο το δίκλωνο dsRNA διεγείρει το RNAi, η χημική σύνθεση του μη νοηματικού RNA είναι πιο σημαντική απ' ότι η νοηματική και επιτελούν διαφορετικούς ρόλους. Έχει προταθεί για παράδειγμα, πως η antisense αλυσίδα είναι η άμεση υπεύθυνη για την επαγωγή του RNAi, καθώς είναι αυτή που συνδέεται με το mRNA-στόχο, ενώ η sense αλυσίδα πιθανότατα συμμετέχει έμμεσα στο μηχανισμό προστατεύοντας την antisense αλυσίδα από την αποικοδόμηση [24].

Σημαντική εικόνα για την παραγωγή siRNAs και τη λειτουργία τους στην RNA σίγηση προήλθε από την βιοχημική ανάλυση του RNAi in vitro. Σε ένα ελεύθερο από κύτταρα σύστημα που προερχόταν από έμβρυο δροσόφιλας, dsRNA στόχευε σε αντίστοιχο mRNA-στόχο με σκοπό την αποικοδόμησή του, κατά την οποία RNA μεγέθους περίπου 21-23 nt σχηματίζονται από την επεξεργασία του εισερχόμενου dsRNA. Ανεξάρτητα από αυτό, βρέθηκε ότι στη δροσόφιλα τα S2 κύτταρα παρουσιάζουν μια αλληλουχοειδική αποικοδόμηση του mRNA κατά την επιμόλυνση με ομόλογο dsRNA. Μία αλληλουχοειδική δραστηριότητα νουκλεάσης καθορίστηκε από αυτά τα κύτταρα, η οποία περιείχε επίσης θραύσματα RNA περίπου 25 nt σε μήκος, που η αλληλουχία τους αντιστοιχούσε στο dsRNA που είχε εισαχθεί. Λαμβάνοντας τα δεδομένα αυτά οι ερευνητές οδηγήθηκαν σε ένα απλό μοντέλο δύο σταδίων για να εξηγήσουν το φαινόμενο του RNAi: (α) Τα μακρά μόρια dsRNA τεμαχίζονται σε κομμάτια μήκους 21-23nt (siRNA's) από μία dsRNA-ειδική νουκλεάση (β) αυτά τα siRNA's καθοδηγούν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο νουκλεάσης RISC (RNA-induced silencing complex - RNA-σύμπλοκο που επάγει τη γονιδιακή σίγηση) προς το υπόστρωμα, μέσω ταιριάσματος των ζευγών βάσεων της μη νοηματικής αλυσίδας του siRNA με το mRNA στόχο, ενεργοποιώντας έτσι την επακόλουθη καταστροφή του (εικ. 1.15) [24].



Εικόνα 1.15: Διαγραμματική απεικόνιση του RNAi και συμμετοχή των siRNA's στη διαδικασία αυτή

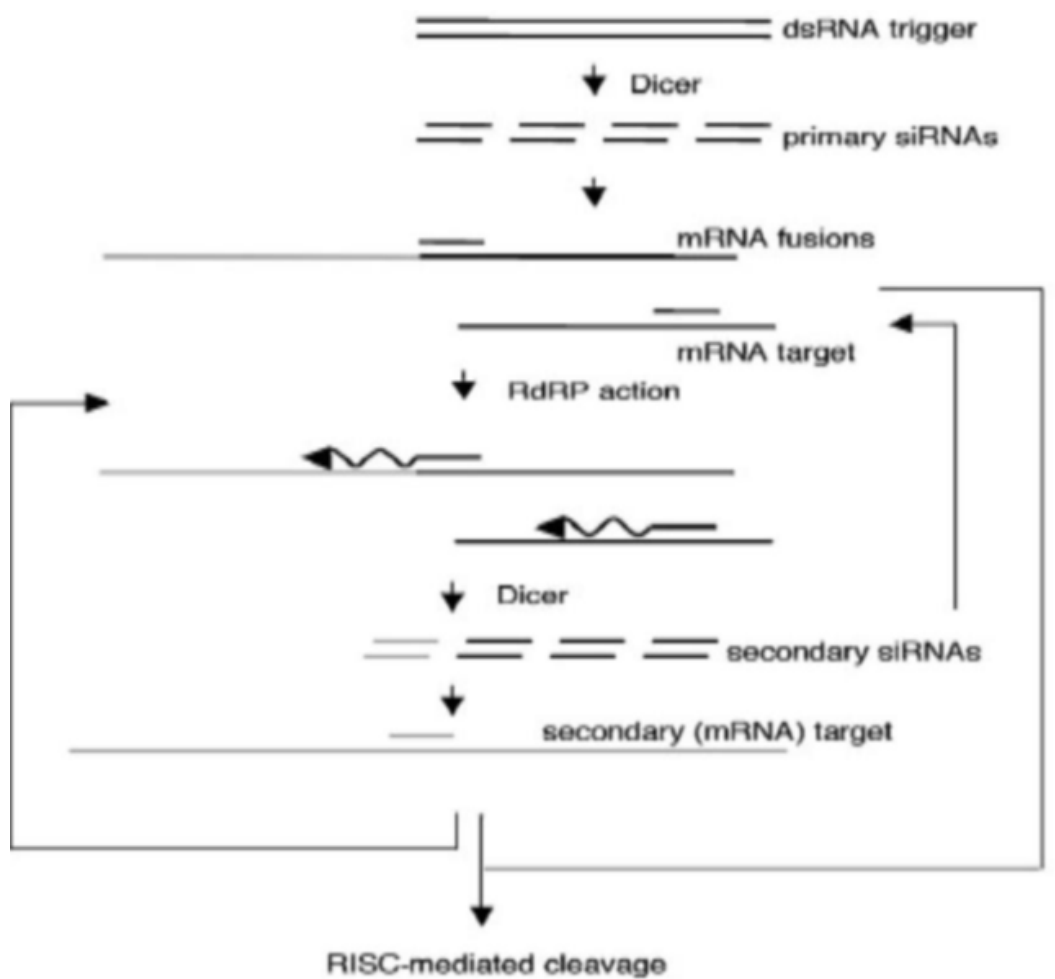
Το διακριτό μέγεθος των siRNA's υπονοεί τη συμμετοχή της RNase III ή κάποιου άλλου σχετικού ενζύμου, επειδή τα ένζυμα αυτά διασπούν dsRNA. Τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια της RNase III μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες με βάση τη δομή των επικρατειών τους: Η βακτηριακή RNase III περιέχει μια ενιαία καταλυτική επικράτεια και θέση δέσμευσης του dsRNA. Οι νουκλεάσες που ανήκουν στην οικογένεια της δροσόφιλα περιέχουν διπλή καταλυτική επικράτεια ενώ η τρίτη οικογένεια περιέχει επίσης διπλή καταλυτική επικράτεια και επιπλέον ενεργότητα ελικάσης. Ο Hannon και οι συνεργάτες του εξέτασαν στη *Drosophila*, μέλη της οικογένειας RNase III ως προς την ικανότητά τους να παράγουν siRNA's από την είσοδο dsRNA και διαπίστωσαν ότι η ενεργότητα που έκοβε το dsRNA μπορούσε να ανοσοκατακρημνιστεί με αντισώματα που εγείρονται κατά συγκεκριμένου μέλους, που ακολούθως ορίστηκε ως DICER. Το Dicer είναι εξελικτικά συντηρημένο και ομόλογά του υπάρχουν σε μύκητες (*Neurospora crassa*, *Saccharomyces pombe*), φυτά (*Arabidopsis*) και ζώα, συμπεριλαμβανομένων των *C. elegans*, *Drosophila* και των θηλαστικών. Η δομή του DICER φαίνεται ότι μπορεί να προτείνει ένα μοντέλο για την διάσπαση του dsRNA σε siRNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Λειτουργεί λοιπόν ως ένα διμερές ένζυμο το οποίο σχηματίζει αντιπαράλληλες επικράτειες καθμία εκ των οποίων αποτελείται από 2 μονομερή, τα οποία σχηματίζουν τα καταλυτικά κέντρα του ενζύμου. Ο τρόπος με τον οποίο τοποθετείται το ένζυμο, μπορεί να κόψει το dsRNA σε τμήματα μήκους 22 νουκλεοτιδίων, ενώ παραλλαγές που παρατηρούνται στους διάφορους οργανισμούς από την αλληλουχία συναίνεσης οδηγούν σε διαφορετική τοποθέτηση των καταλυτικών κέντρων και επομένως τα siRNA's που παράγονται διαφέρουν στο μέγεθος. Το ATP φαίνεται πως δεν είναι απαραίτητο για την παραγωγή αυτών των μορίων RNA's αν και έρευνες έχουν δείξει πως η παρουσία του απλώς επιταχύνει την παραγωγή [25].

Το δεύτερο βήμα, είναι η καθοδήγηση του RISC από τα siRNA's προς το υπόστρωμα, μέσω ταιριάσματος των ζευγών βάσεων της μη νοηματικής αλυσίδας του siRNA με το mRNA στόχο, ενεργοποιώντας έτσι την επακόλουθη καταστροφή του (εικ.1.6. Η πρώτη υπομονάδα του RISC που εντοπίστηκε ήταν το siRNA, το οποίο προσδιορίζει το υποστρώματα μέσω ζευγαρώματος βάσεων κατά Watson-Crick. Για να επαχθεί μάλιστα ο μηχανισμός του RNAi θα πρέπει να υπάρχει πλήρης και απόλυτη συμπληρωματικότητα μεταξύ του siRNA και του mRNA στόχου και διαφορά έστω και ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε αναστολή της παρεμπόδισης. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι πολύ σημαντικό καθώς πιθανότατα τα siRNA's να μπορούν να αναγνωρίσουν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα καθώς και πολυμορφισμούς σε πιθανές μελλοντικά θεραπευτικές τους χρήσεις. Το RISC σχηματίζεται σε εκχυλίσματα εμβρύου, ως ένα πρόδρομο σύμπλοκο ~ 250K το οποίο ενεργοποιείται με την προσθήκη ATP, προς σχηματισμό ενός ~ 100K που μπορεί να διασπάσει τα mRNA-στόχο. Η διάσπαση είναι ενδονουκλεολυτική, και εμφανίζεται μόνο στη μέση της περιοχής των 21-23 νουκλεοτιδίων που είναι ομόλογη με το siRNA. Τα προϊόντα διάσπασης του mRNA αποικοδομούνται ταχέως καθώς στερούνται είτε το σταθεροποιητικό κάλυμμα στο 5' άκρο είτε την πολύ-AA ούρα. Επιπλέον, τα μονόκλωνα siRNAs είναι πιο αποτελεσματικά στην αναζήτηση ομολογιών που αποτελούν στόχους και για αυτό θα πρέπει να έχει προηγηθεί ξετύλιγμα της διπλής έλικας. Το RISC επίσης συν-καθορίζεται με την πρωτεΐνη AGO2, ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Argonaute και οι οποίες αποτελούν τον πυρήνα του συμπλόκου. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί πως στους διάφορους οργανισμούς συμμετέχουν και ομόλογες πρωτεΐνες με την RDE-4. Η RDE-4 είναι μια μικρή dsRNA-δέσμευτική πρωτεΐνη που μπορεί να αλληλεπιδράσει με την Dicer. Έχει προταθεί λοιπόν, πως η RDE-4 αναγνωρίζει αρχικά το dsRNA και το μεταφέρει στο ένζυμο Dicer [25].

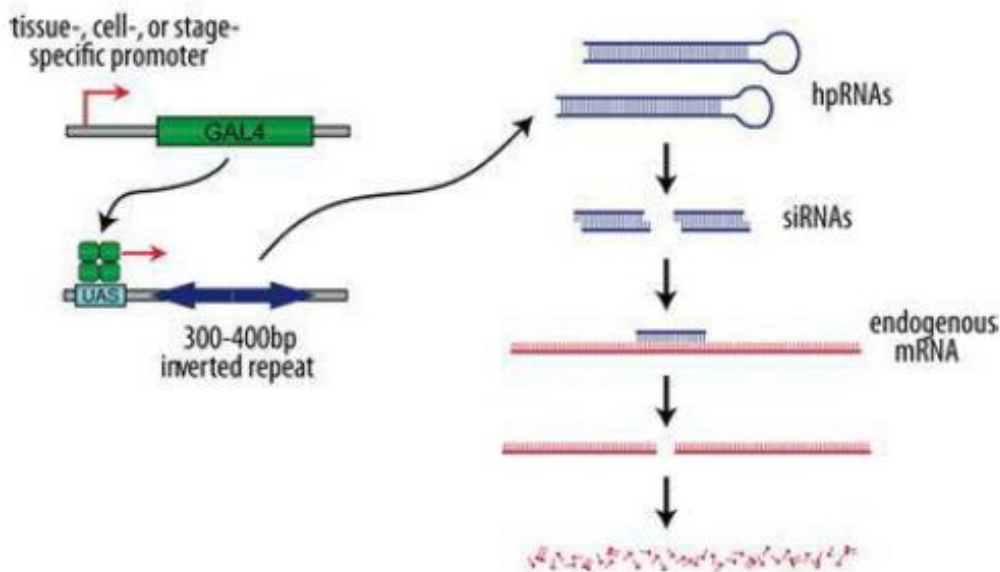
Τα τελευταία χρόνια, αξίζει να αναφέρουμε πως τα siRNA συμμετέχουν και σε ένα στάδιο μεταβατικού RNAi (transitive RNAi) με τελικό αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του φαινομένου του RNAi μέσα σ' ένα κύτταρο (το φαινόμενο αυτό πρωτοεμφανίστηκε και μελετήθηκε στον *C.elegans*). Πρωτογενή siRNA που κόβονται από το dsRNA μέσω του συστήματος DICER, συνδέονται με RNA μόρια τα οποία περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες. Αυτό το καινούργιο υπόστρωμα περιέχει στο 5' άκρο του έναν εκκινήτη, ο οποίος χρησιμοποιείται για τη σύνθεση RNA από μια RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRP) με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου dsRNA. Το σύστημα DICER αναγνωρίζει το νέο dsRNA και το κόβει, δημιουργώντας έτσι δευτερογενή siRNA's, τα οποία σε ένα δεύτερο γύρο, μπορεί να συνδεθούν με ένα νέο mRNA-στόχο, το οποίο δε μοιράζεται καμία ομολογία με το αρχικό

dsRNA το οποίο και ενεργοποίησε το μηχανισμό του RNAi, αλλά μοιράζονται ομολογία με τα ενδιάμεσα μόρια RNA. Έτσι, άλλος ένας γύρος μπορεί πλέον να ξεκινήσει, αποικοδομώντας το mRNA και ολοκληρώνοντας έτσι το RNAi. Τέλος, να σημειώσουμε ότι ο μηχανισμός αυτός δεν χρειάζεται, αλλά ούτε και αποκλείει τη δράση του RISC [25].

Εάν το γενετικό σύστημα UAS/GAL4 συνδυαστεί με το μηχανισμό RNAi, μπορούμε να επιτύχουμε στοχευμένη ιστοειδική αποσιώπηση/μειορρύθμιση ενδογενών RNA μεταγράφων (εικ. 1.17). Ακριβώς αυτή την προσέγγιση εκμεταλλευτήκαμε στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 1.16: Απεικόνιση του transitive RNAi



Εικόνα 1.17: Συνδυασμός της τεχνολογίας UAS/GAL4 με το μηχανισμό μετα-μεταγραφικής αποσίωπησης RNAi. Οι ιστοειδικά υπερεκφραζόμενες, μέσω του συστήματος GAL4/UAS, επαναλαμβανόμενες ανάστροφες αλληλουχίες του επιθυμητού γονιδίου δημιουργούν δίκλινα hpRNAs με δομή φουρκέτας, τα οποία υπόκεινται στη δράση της Dicer και κόβονται σε μικρά δίκλινα τμήματα siRNAs. Έπειτα, ακολουθεί η διαδικασία RNAi, όπως περιγράφηκε προηγουμένως και επιτυγχάνεται στοχευμένη μειορρύθμιση των ενδογενών RNA μεταγράφων

1.7 Αυτοφαγία

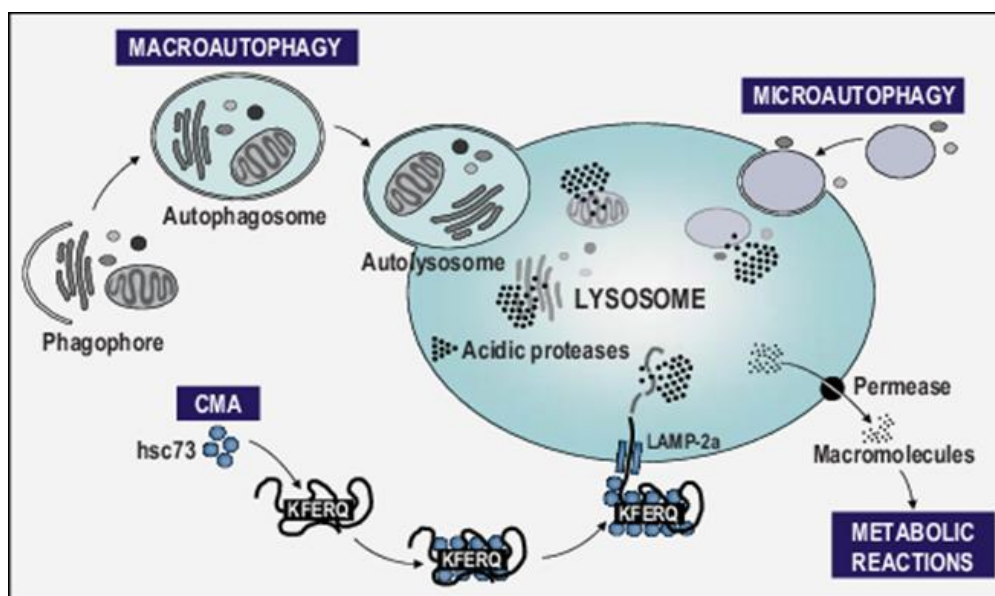
Αυτοφαγία είναι η διαδικασία κατά την οποία τα συστατικά των κυττάρων παραδίδονται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Αποτελεί τον κύριο μηχανισμό για την εξάλειψη κατεστραμμένων οργανιδίων, ενδοκυττάρων παθογόνων και περιττών τμημάτων του κυτταροπλάσματος. Επίσης ο μηχανισμός αυτός συμβάλει στην απομάκρυνση ανωμάτων, συσσωματωμένων ή μακράς διάρκειας ζωής πρωτεϊνών. Η μικρής διάρκειας πρωτεΐνες αποικοδομούνται μέσω του πρωτεασώματος. Η αυτοφαγία λαμβάνει χώρα στα βασικά επίπεδα των φυσιολογικών αναπτυξιακών συνθηκών, αλλά μπορεί δραματικά να απορρυθμιστεί από έναν αριθμό ερεθισμάτων, όπως κυτταρική πείνα, υποξία, ενδοκυτταρικού στρες, υψηλή θερμοκρασία, υψηλή πυκνότητα καλλιέργειας, ορμόνες, απώλεια αυξητικών παραγόντων. Τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τύποι αυτοφαγίας έχουν περιγραφεί, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τον τρόπο παράδοσης του φορτίου στα λυσοσώματα: η αυτοφαγία μέσω τσαπερονών (CMA), η μικροαυτοφαγία και η μακροαυτοφαγία (**εικ. 1.18**) [26, 27].

Η μακροαυτοφαγία (**εικ. 1.18/1.19**) χαρακτηρίζεται από τη διαμόρφωση ενός κυτοσολικού, καλυπτόμενου από διπλή μεμβράνη, κυστιδίου, του αυτοφαγοσώματος (AP). Κάθε αυτοφαγόσωμα, προκύπτει από μικρότερους πρόδρομους μεμβρανικούς σχηματισμούς, τα φαγοφόρα, τα οποία περιβάλλουν και επεκτεινόμενα σταδιακά εγκλείουν πρωτεΐνες, οργανίδια και άλλα κυτταροπλασματικά υλικά στοχευμένων περιοχών του κυττάρου. Κατόπιν, το αυτοφαγόσωμα συγχωνεύεται με ένα λυσοσώμα σχηματίζοντας μια ιδιαίτερη δομή, το αυτολυσόσωμα (AL), μέσα στο οποίο θα λάβουν χώρα οι πρωτεολυτικές αντιδράσεις υπό τη δράση υδρολασών του οργανιδίου. Μετά το πέρας την διαδικασίας, τα προϊόντα της αποικοδόμησης μεταφέρονται πίσω στο κυτοσόλιο για επαναχρησιμοποίηση, μέσω της δράσης μεμβρανικών περμεασών [28]. Μεταξύ των τριών κύριων τύπων αυτοφαγίας, η μακροαυτοφαγία συνιστά την περισσότερο μελετημένη και καλύτερα προσδιορισμένη διεργασία. Κύριο αρνητικό ρυθμιστή της μακροαυτοφαγίας αποτελεί η κίνηση mTOR (mammalian target of rapamycin), η οποία υπό κανονικές συνθήκες επιτρέπει το σχηματισμό του

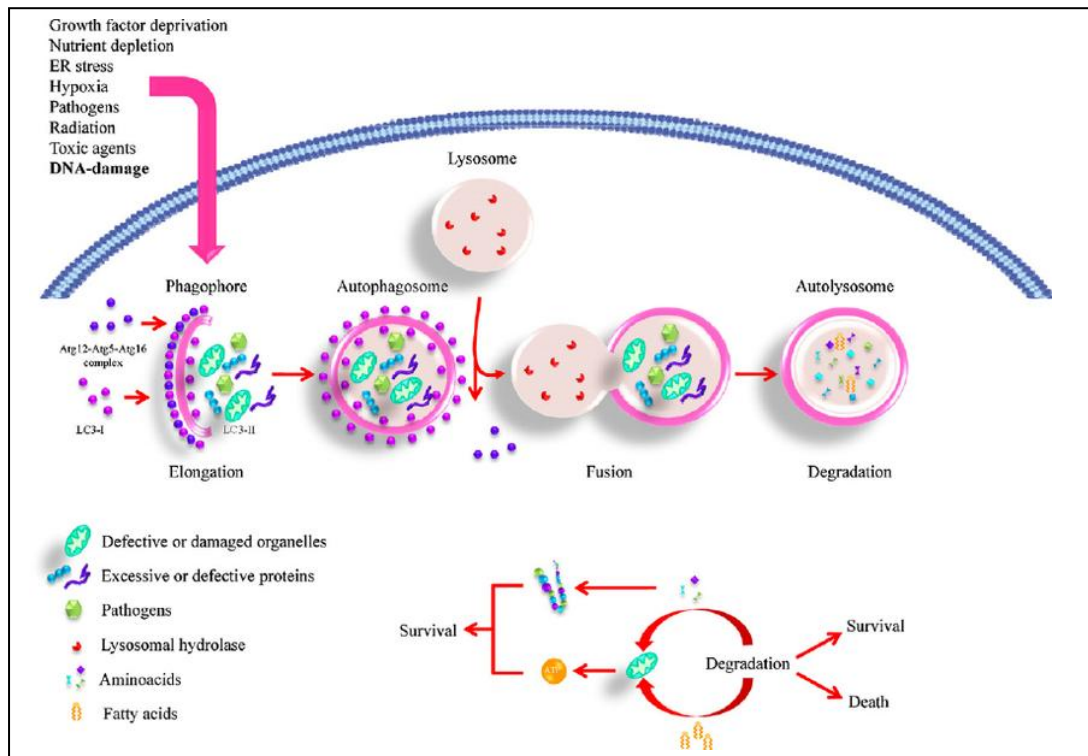
αυτοφαγοσώματος, αλλά η αναστολή της πυροδοτεί την αυτοφαγία. Η αναστολή της κινάσης mTOR συμβάλλει στην ενεργοποίηση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, που σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες PI3K, Vps34, Beclin 1, Vps15, UVRAG, Bif-1, Ambra-1 και πιθανώς και από άλλες πρωτεΐνες. Αυτό το σύμπλοκο ρυθμίζεται αρνητικά από τον παράγοντα Bcl-2/XL. Η πρωτεΐνη Vps34 παράγει το μόριο PtdIns(3)P (phosphatidylinositol-3-phosphate), που αποτελεί μοριακό σήμα για την συναρμολόγηση της αυτοφαγικής μηχανής (επιμήκυνση / κλείσιμο κυστιδίων) [26]. Η μακροαυτοφαγία μπορεί να ανασταλεί και από το μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα ινσουλίνης/ IGF-1 (insulin-like growth factor 1), κατά το οποίο το μόριο PtdIns(3,4,5)P3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) διεγείρει την κινάση mTOR [26].

Ένας δεύτερος τύπος αυτοφαγίας αν και όχι τόσο καλά κατανοητός όσο η μακροαυτοφαγία, είναι η μικροαυτοφαγία. Κατά τη μικροαυτοφαγία, κυτταροπλασματικό υλικό μεταφέρεται στο λυσόσωμα προς αποικοδόμηση, είτε μέσω άμεσης εγκόλπωσης, είτε μέσω προεκβολής, είτε μέσω διαφραγματοποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης. Και αυτός ο μηχανισμός αποτελεί ένα μονοπάτι αποικοδόμησης οργανιδίων και μακράς διάρκειας ζωής πρωτεϊνών, αλλά αντίθετα με την μακροαυτοφαγία, δεν είναι υπεύθυνος για την προσαρμογή σε συνθήκες στέρσης θρεπτικών. Μία συγκεκριμένη μορφή μικροαυτοφαγίας είναι η εξαιρετικά εκλεκτική αποικοδόμηση των υπεροξεισωμάτων (microrexorhagy), η οποία περιγράφηκε στη ζύμη ως απαραίτητη για την προσαρμογή σε οξειδωτικό στρες [26].

Ένα τρίτο τύπο αυτοφαγίας αποτελεί η αυτοφαγία μέσω τσαπερονών (CMA). Αυτός ο τύπος αυτοφαγίας ανταποκρίνεται σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών, ωστόσο δεν συναντάμε εγκόλπωση από μεμβράνες και επιλεκτική αναγνώριση υποστρωμάτων. Στη CMA, κυτοσολικές πρωτεΐνες που περιέχουν ένα συγκεκριμένο πενταπεπτιδίο (μοτίβο στόχευσης από τα λυσοσώματα / KFERQ), αναγνωρίζονται από σύμπλοκα τσαπερονών, συμπεριλαμβανομένης και της hsc73 (heat shock 73-kDa), στοχεύονται προς τη λυσοσωμική μεμβράνη και συνδέονται σε μια πρωτεΐνη αυτής, την LAMP 2a. Η πρωτεΐνη - υπόστρωμα κατόπιν ξεδιπλώνεται και μεταφέρεται στο λυσοσωμικό αυλό για αποικοδόμηση. Το μοτίβο KFERQ υπάρχει σε περίπου 30% των κυτοσολικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της RNase A και της APP (amyloid precursor protein). Δεν είναι ακόμα σαφές πώς το μοτίβο KFERQ αναγνωρίζεται από τα σύμπλοκα των τσαπερονών. Ορισμένες μετα - μεταγραφικές τροποποιήσεις των υποστρωμάτων (π.χ. οξείδωση) μπορεί να καταστήσουν το μοτίβο περισσότερο προσιτό στις τσαπερόνες [26].



Εικόνα 1.18: Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες μπορούν να καταλήξουν στον αυλό του λυσοσώματος για αποικοδόμηση, μέσω τριών διαφορετικών μηχανισμών. Στη μακροαυτοφαγία, μία ολόκληρη κυτταροπλασματική περιοχή εγκλείεται μέσα σε ένα διπλομεμβρανικό κυστιδίο, το οποίο στη συνέχεια συγχωνεύεται με ένα λυσόσωμα. Στη μικροαυτοφαγία, η λυσοσωμική μεμβράνη σχηματίζει εγκοιλώσεις ώστε να παγιδεύσει περιοχές του κυτοσολίου και να τις εσωτερικεύσει στο λυσοσωμικό αυλό ως μεμονωμένα μεμβρανικά κυστιδία. Στην αυτοφαγία με τη βοήθεια τσαπερώνων, μία κυτταροπλασματική τσαπερόνη αναγνωρίζει ένα ειδικό μοτίβο πρωτεϊνών-υποστρωμάτων και τη μεταφέρει στην επιφάνεια του λυσοσώματος. Εκεί, η πρωτεΐνη προσδένεται σε ειδικό λυσοσωμικό υποδοχέα και πολυμερίζεται ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο μετατόπισης. Μία τσαπερόνη του αυλού του λυσοσώματος διεκπεραιώνει τη μετατόπιση του υποστρώματος μέσα στον αυλό, όπου λαμβάνει χώρα ραγδαία η αποικοδόμηση και απόδοση του φορτίου [26]



Εικόνα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της μακροαυτοφαγίας. Η μακροαυτοφαγία ξεκινά με το σχηματισμό των φαγοφόρων ή την απομόνωση της μεμβράνης (πυρήνωση κυστιδίου). Τα φαγοφόρα εκτείνεται και μετατρέπεται σε αυτοφαγόσωμα, με τη δράση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην πλευρά συγκρότησης των φαγοφόρων (PAS) (επιμήκυνση κυστιδίου). Το αυτοφαγόσωμα μπορεί να καταβροχθίζει συσσωρευμένο τμήμα του κυτταροπλάσματος, κατά μη-ειδικό τρόπο, περιλαμβανομένων οργανιδίων και στοχευμένου φορτίου, κατά ειδικό τρόπο. Όταν η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγώσματος συντηχθεί με ένα ενδόσωμα (δημιουργώντας το αμφίσωμα, πριν από τη σύντηξη με το λυσόσωμα) ή άμεσα με ένα λυσόσωμα (σύντηξη), σχηματίζεται το αυτοφαγολυσόσωμα. Εν τέλει, το απομονωμένο υλικό αποικοδομείται (ρήξη κυστιδίου και αποικοδόμηση) και ανακυκλώνεται [29]

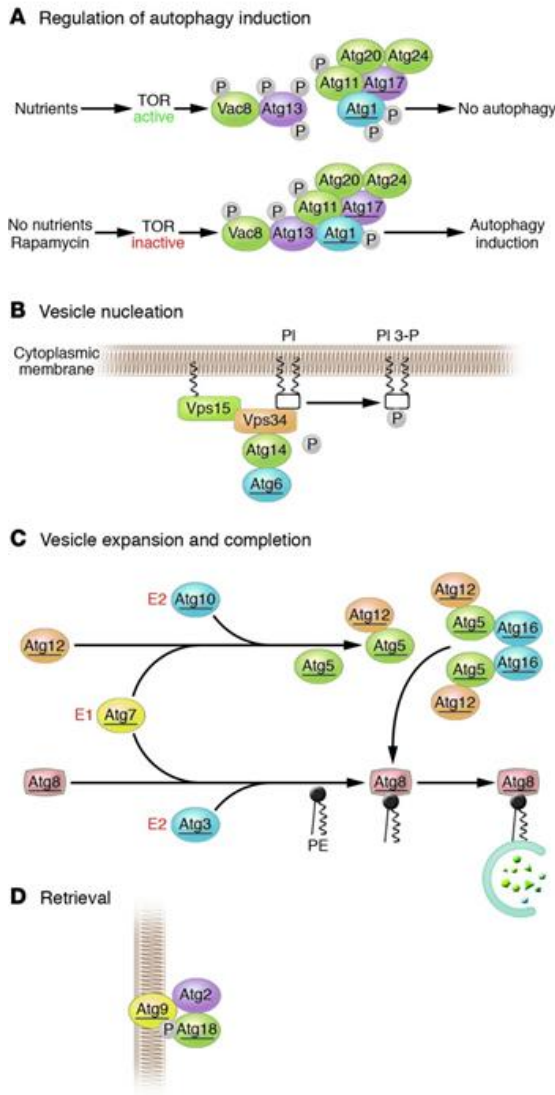
1.7.1 Μοριακός μηχανισμός (μακρο)αυτοφαγίας

Ο βασικός μοριακός μηχανισμός της αυτοφαγίας, είναι ιδιαίτερα συντηρημένος εξελικτικά, δεδομένου ότι τα υπεύθυνα γονίδια *atg* είναι παρόμοια μεταξύ των οργανισμών όπως ο ζυμομύκητας, η μύγα και τα θηλαστικά. Συγκεκριμένα, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η αυτοφαγία περιλαμβάνει τα παρακάτω χαρακτηριστικά στάδια, τα οποία εξαρτώνται από την κατανάλωση ενέργειας με τη μορφή ATP (εικ. 1.20/1.21) [30]

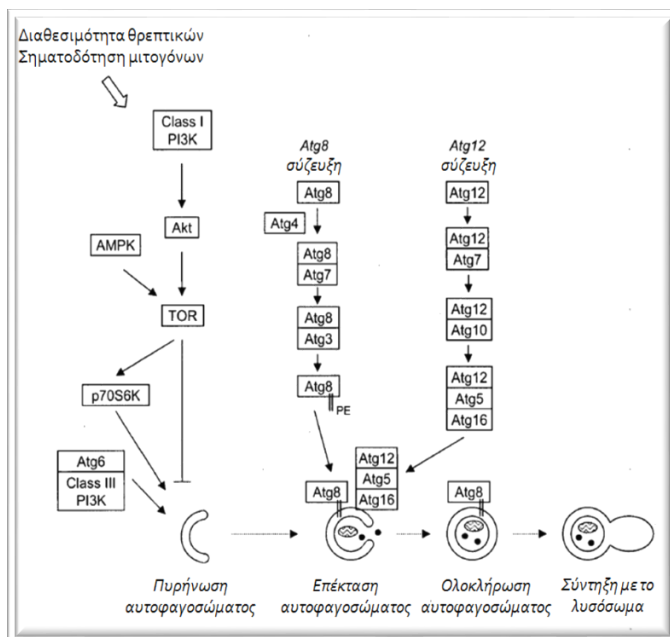
- ❖ **Επαγωγή:** Η επαγωγή ξεκινά με την ενεργοποίηση του συμπλόκου Atg1. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται μέσω σηματοδότησης από την TOR κινάση και περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Atg17 και Atg13.

- ❖ **Κυστιδιακή πυρήνωση:** Συνιστά το πρώτο στάδιο κατά το οποίο απαιτούνται πρωτεΐνες και λιπίδια για τη συγκρότηση των αυτοφαγοσωμάτων. Συγκεκριμένα, στρατολογούνται πρωτεΐνες Atg σε συγκεκριμένες περιοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που θα δώσουν γένεση στα φαγοφόρα (PAS), ενώ φαίνεται να απαιτείται η συμμετοχή του συμπλόκου PI-3K. Συγκεκριμένα, συμμετέχουν οι πρωτεΐνες Atg6 και Atg14.
- ❖ **Επέκταση κυστιδίου:** Ο σχηματισμός των αυτοφαγοσωμάτων αποτελεί μία *de novo* διαδικασία, κατά την οποία οι μεμβράνες των κυστιδίων δανείζονται μεμβρανικό υλικό από πηγές όπως το ΕΔ και επεκτείνονται εγκλείοντας το φορτίο. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν τα συστήματα πρόσδεσης τύπου ουβικιτίνης Atg8 (Atg8, Atg3, και Atg7) και Atg12 (Atg5, Atg12, και Atg16).
- ❖ **Σχηματισμός αυτοφαγολυσσώματος - ανάκτηση:** Μετά το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος, αυτό συντηρείται με το λυσόσωμα προς σχηματισμό του αυτολυσσώματος, όπου θα λάβει χώρα η αποικοδόμηση. Τα θραύσματα απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ ανακτάται η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Atg9 της PAS περιοχής, μέσω της δράσης των Atg2 και Atg18.

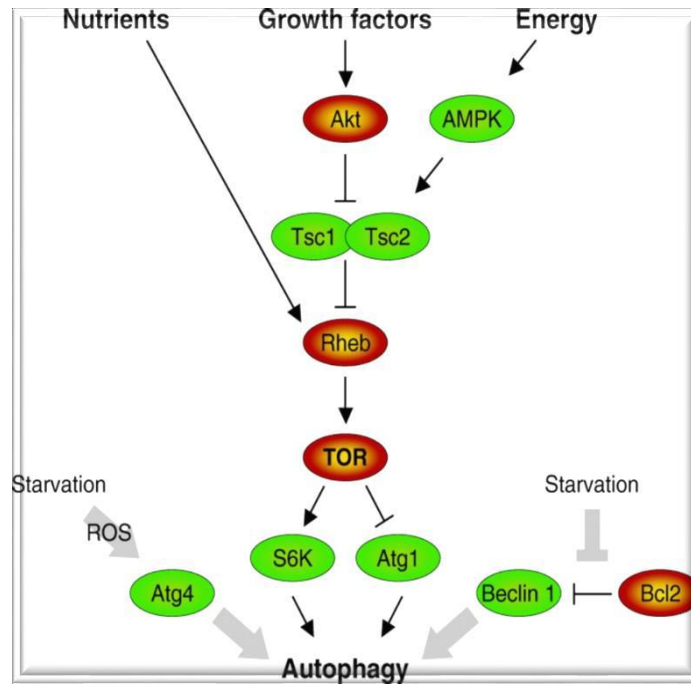
Η επιμήκυνση της μεμβράνης απομόνωσης, η δημιουργία του αυτοφαγοσώματος και η πλήρωσή του, είναι άκρως σημαντικές και συντηρημένες διαδικασίες, τόσο στη ζύμη όσο και στα μετάζωα, περιλαμβάνοντας δύο συστήματα σύζευξης. Κατά το πρώτο σύστημα σύζευξης, στη μεμβράνη απομόνωσης σχηματίζεται το σύμπλοκο Atg12-5-16 προαπαιτώντας την E1-ενεργότητα του Atg7 και την E2-ενεργότητα του Atg10. Το δεύτερο σύστημα σύζευξης απαιτεί τη δραστηριότητα του Atg7 και την E2-ενεργότητα του Atg3. Σε αυτό το στάδιο, το κυτταροπλασματικό Atg8 (LC3στα θηλαστικά), τροποποιείται από τη σύνδεση με τη φωσφολιπιδική άγκυρα φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη (PE), με τη βοήθεια της πρωτεάσης κυστεΐνης Atg4. Το βήμα αυτό αποσκοπεί στην τοποθέτηση του Atg8- PE στη μεμβράνη απομόνωσης και συμμετέχει στην επιμήκυνση της. Το Atg8 παραμένει συνδεδεμένο με το αυτοφαγόσωμα, μέχρι τη στιγμή σύντηξης της εξωτερικής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα και τη δημιουργία του αυτοφαγολυσσώματος. Στο σημείο αυτό το μόριο Atg4 απελευθερώνει το Atg8 από την PE. Για το λόγο αυτό το Atg8 χρησιμοποιείται ως δείκτης των αυτοφαγοσωμάτων. Μετά τη δημιουργία του αυτοφαγολυσσώματος, το περιεχόμενο του καθώς και η εσωτερική του μεμβράνη αποικοδομούνται και τα συστατικά απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα για να ανακυκλωθούν παράγοντας μακρομόρια, θρεπτικά και ενέργεια. Παράλληλα, καταστρέφονται οργάνια που έχουν υποστεί βλάβη και η συσσώρευσή τους θα ήταν τοξική για το κύτταρο, αφού παράγουν ενεργές ρίζες οξυγόνου [31].



Εικόνα 1.20: Ο μοριακός μηχανισμός της αυτοφαγίας. Οι πρωτεΐνες αυτοφαγίας (Atg) μπορούν να διακριθούν σε 4 λειτουργικές ομάδες: το ρυθμιστικό σύμπλοκο με ενεργότητα κινάσης (A), που απαντά σε αναρροϊκά σήματα, συμπεριλαμβανομένης της έλλειψης θρεπτικών, το σύμπλοκο σηματοδότησης με ενεργότητα κινάσης λιπιδίων (B), αυτές που συμμετέχουν στα μονοπάτια σύζευξης πρωτεϊνών τύπου ουβικιτίνης (C), απαραίτητες για την επέκταση και ολοκλήρωση και εκείνες του μονοπατιού ανάκτησης, για την αποδιοργάνωση των Atg συμπλόκων από τα ώριμα αυτοφαγοσώματα. Εικονίζονται οι πρωτεΐνες Atg του ζυμομύκητα, από τις οποίες υπογραμμίζονται όσες εμφανίζουν ορθόλογα σε ανώτερους ευκαρυώτες. PI: φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, PI3-P: 3 φωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, PE: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη [32]



Εικόνα 1.19: Το μονοπάτι της αυτοφαγίας στα θηλαστικά. Εικονίζεται σχηματικά η διαδικασία διαμόρφωσης των αυτοφαγοσωμάτων και η σύντηξη αυτών με το λυσόσωμα, καθώς και τα σύμπλοκα που συμμετέχουν σε κάθε στάδιο του μονοπατιού [32]



Εικόνα 1.22: Εξαρτώμενη από θρεπτικά ρύθμιση της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία προχωρά με έναν αργό βασικό ρυθμό στα κύτταρα, και μπορεί να φτάσει σε υψηλά επίπεδα ως απάντηση στην πείνα, στην έλλειψη αυξητικών παραγόντων και σε άλλα ερεθίσματα. Το TOR μονοπάτι παίζει κεντρικό ρόλο σε πολλές από αυτές τις απαντήσεις. Η δραστηριότητα κινάσης που έχει, αναστέλλεται από το σύμπλοκο TSC1/2, που αυτό με τη σειρά του αναστέλλει τη δράση της Rheb GTPάσης, η οποία αποτελεί ενεργοποιητή του TOR. Το σύμπλοκο TSC1/2, ρυθμίζεται από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες, όπως η Akt σε απάντηση στο σήμα ινσουλίνης και το AMPK σε απάντηση των επιπέδων AMP/ATP. Καταρροϊκά του TOR, οι κινάσες Atg1 & S6K έχουν σημαντικό ρόλο στην αυτοφαγία, και αναστέλλουν το TOR μέσω αρνητικών μηχανισμών ανάδρασης. Τα επίπεδα ROS δημιουργούνται ως απάντηση στην κυτταρική πείνα και απαιτούνται για την ενεργοποίηση της Atg4-πρωτεάσης. Η κυτταρική πείνα επίσης εμποδίζει την ένωση Beclin-1/Atg6 με την Bcl-2, οδηγώντας σε αυξανόμενη αυτοφαγική δραστηριότητα της Beclin-1 [31]

1.8 Γενικά στοιχεία για το TOR μονοπάτι

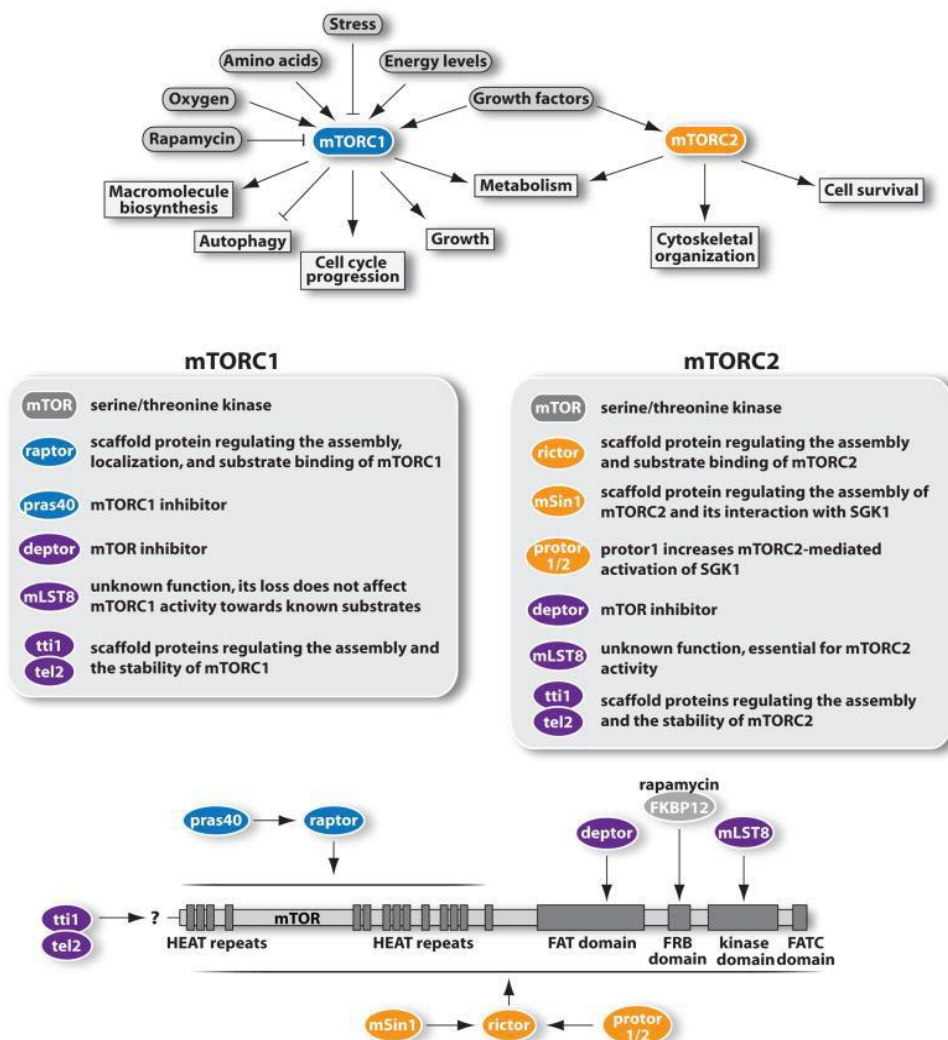
Το mTOR μονοπάτι ελέγχει την κυτταρική αύξηση, αποκρινόμενο σε ποικίλες περιβαλλοντικές παραμέτρους. Οι αυξητικοί παράγοντες, τα επίπεδα ενέργειας, και τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών αποτελούν βασικές παραμέτρους για την ενεργοποίηση ή καταστολή του μονοπατιού [33]. Κύριο ρόλο στο μονοπάτι διαδραματίζει η πρωτεΐνη mTOR, η οποία είναι μια κινάση σερίνης-θρεονίνης με μοριακό βάρος 289-kD, ανήκει στην PI3K (phosphoinositide 3-kinase) οικογένεια κινασών και είναι συντηρημένη κατά τη διάρκεια της εξέλιξη [34]. Το mTOR συναρμολογείται από δύο σύμπλοκα με διαφορετική συμμετοχή και διαφορετική καταρροϊκή δράση το καθένα από αυτά, το TOR complex 1 (TORC1) και το TOR complex 2 (TORC2) (**εικ. 1.23**). Το mTORC1 σύμπλοκο ορίζεται από την υπομονάδα RAPTOR, η οποία αντικαθίσταται από την υπομονάδα RICTOR στο σύμπλοκο mTORC2. Και τα δύο σύμπλοκα περιέχουν επίσης την υπομονάδα mLST8, αλλά διαφέρουν σε μια σειρά άλλων υπομονάδων που αλληλεπιδρούν με το RAPTOR ή το RICTOR [33].

Το σύμπλοκο mTORC1 ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη προωθώντας την μετάφραση, την αυτοφαγία και τη βιογένεση των ριβοσωμάτων. Ενεργοποιείται από θρεπτικά συστατικά και αμινοξέα, και μετά την ενεργοποίησή του στρατολογείται στα λυσοσώματα και στα όψιμα ενδοσώματα όπου συνεντοπίζεται με τον ενεργοποιητή του, την RHEB GTPase. Στους τρόπους δράσης της RHEB συμπεριλαμβάνονται, πρώτον η δέσμευση της στο κατάλληλο τμήμα της κινάσης με επακόλουθη ενεργοποίησή της και δεύτερον η αντικατάσταση του αναστολέα PRAS40 στο mTORC1 από το

RAPTOR. Η RHEB με τη σειρά της ρυθμίζεται αρνητικά από την επικράτεια GTPάσης του καταστολέα όγκων TSC2. Στα υποστρώματα του mTORC1 συγκαταλέγονται ο παράγοντας 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) και η ριβοσωμική κινάση S6K. Η φωσφορυλίωση των 4E-BP1 και S6K1 εξαρτάται από τα μοτίβα TOS (Tor signalling sequence), τα οποία συνδέονται με τον RAPTOR και τα συναντάμε και στον αρνητικό ρυθμιστή PRAS40 [33].

Το σύμπλοκο mTORC2 ανταποκρίνεται κυρίως σε αυξητικούς παράγοντες, προωθώντας την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική επιβίωση, αναβολικές διεργασίες και την πόλωση του κυτταροσκελετού ακτίνης. Υποστρώματά του αποτελούν οι πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr, AKT, SGK και PKC, οι οποίες μοιράζονται το υδροφοβικό μοτίβο στη θέση φωσφορυλίωσης, με την S6K [33].

Η ραπαμυκίνη, η οποία σχηματίζει τριμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη FKBP12 (FK506-binding protein 12) και το domain FRB του mTOR, πιστεύεται ότι είναι ένας αλλοστερικός αναστολέας. Αναστέλλει το mTORC1 σε βαθμό που εξαρτάται από το υπόστρωμα και τη θέση φωσφορυλίωσης, και δεν δεσμεύεται στο mTORC2. Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, ανταγωνιστικοί αναστολείς για το ATP, που αναστέλλουν δυναμικά και ομοιόμορφα αμφότερα τα mTORC1 και mTORC2, αναπτύσσονται ως αντικαρκινικοί παράγοντες [18, 33].



Εικόνα 1.23: Η TOR κινάση αποτελείται από δύο διακριτά πρωτεϊνικά συμπλέγματα, το TORC1 και το TORC2. Το TORC1 αποκρίνεται σε αμινοξέα, στο στρες, στο οξυγόνο, σε ενέργεια και σε αυξητικούς παράγοντες, και είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη. Προωθεί την κυτταρική αύξηση, με επαγωγή ή αναστολή καταβολικών και αναβολικών διεργασιών και βοηθά και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Το TORC2 αποκρίνεται σε αυξητικούς παράγοντες και ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση, τον μεταβολισμό και τον κυτταροσκελετό. Το TORC2 δεν είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη, αλλά χρόνια έκθεση στο φάρμακο μπορεί να επηρεάσει τη δομή του. Το μεσαίο σχήμα περιγράφει τις γνωστές λειτουργίες των συστατικών του TOR, ενώ το κάτω σχήμα περιγράφει τις θέσεις αλληλεπίδρασης [35].

1.8.1 Κυτταρικές διεργασίες ρυθμιζόμενες από το σύμπλοκο mTORC1

Η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι μακράν η διαδικασία που έχει μελετηθεί περισσότερο και ελέγχεται από το mTORC1 (**εικ. 1.24**). Το mTORC1 φωσφορυλιώνει απευθείας τους μεταφραστικούς ρυθμιστικούς παράγοντες eIF4E (initiation factor 4E), 4E-BP1 (4E binding protein 1) και S6K1 (S6 kinase 1), οι οποίοι προάγουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση του 4E-BP1 παρεμποδίζει τη πρόσδεσή του στον παράγοντα eIF4E, καθιστώντας τον ικανό να συμμετάσχει στο σχηματισμό του συμπλόκου eIF4F, που απαιτείται για την έναρξη της εξαρτώμενης από το κάλυμμα μετάφρασης. Η ενεργοποίηση της S6K1 οδηγεί σε αύξηση της βιογένεσης των mRNA, καθώς και στην έναρξη της μετάφρασης και στην επιμήκυνση (**εικ. 1.24**). Η κινάση S6K1 θεωρήθηκε αρχικά ότι ελέγχει τη μετάφραση μιας αφθονίας υποτύπων mRNAs, που χαρακτηρίζονται από μια ολιγοπυριμιδική περιοχή στο 5' άκρο (5' TOP mRNAs). Αν και το ίδιο το mTOR αποτελεί το κλειδί για τον μεταφραστικό έλεγχο των 5'TOP mRNAs, η S6K1 και το υπόστρωμά της (S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη) δεν απαιτούνται για την διαδικασία αυτή και έτσι ο τρόπος με τον οποίον το mTORC1 ελέγχει τη μετάφραση αυτών των mRNA, παραμένει άγνωστη [35]. Το mTORC1 ρυθμίζει την πρωτεϊνική μηχανή σύνθεσης και με άλλους τρόπους:

- ❖ Ενεργοποιεί το ρυθμιστικό στοιχείο TIF-1A (tripartite motif-containing protein-24), το οποίο προάγει την αλληλεπίδρασή με την RNA πολυμεράση I (Pol I) και την έκφραση του ριβοσωμικού RNA (rRNA)
- ❖ Φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τον Maf1 (καταστολής της Pol III), επάγωντας έτσι την μεταγραφή των 5S rRNAs και tRNAs

Ο συνολικός ρόλος του mTORC1 στη ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA είναι εξαιρετικά σημαντικός, καθώς ειδικοί αναστολείς της ενεργού θέσης του mTOR, αναστέλλουν πλήρως τη λειτουργία του mTORC1, με αποτέλεσμα τη δραματική μείωση του συνολικού ποσοστού πρωτεϊνοσύνθεσης σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα κυτταροκαλλιέργειας [35].

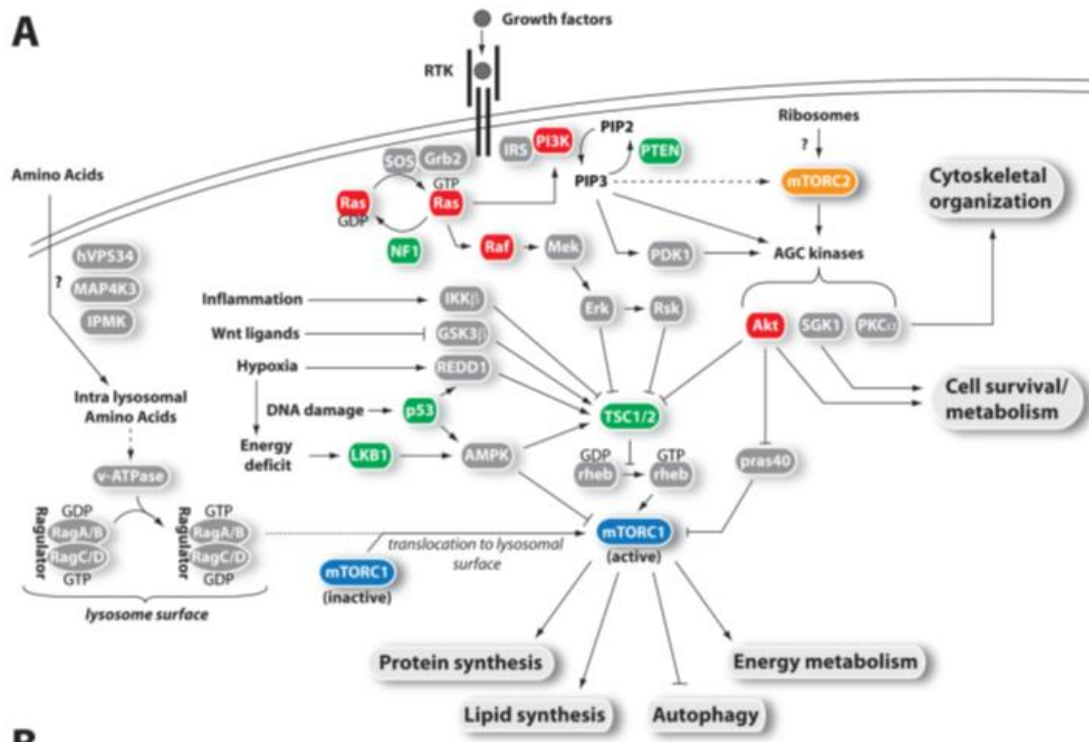
Εκτός από τη ρύθμιση της παραγωγής πρωτεϊνών, το mTORC1 ελέγχει επιπροσθέτως και τη σύνθεση των λιπιδίων, που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων για τη δημιουργία μεμβρανών. Σε μεγάλο βαθμό, το mTORC1 δρα μέσω της πρωτεΐνης SREBP1/2 (sterol regulatory element binding protein 1/2), που αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ελέγχει την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στη σύνθεση της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων (**εικ. 1.24**). Οι απενεργοποιημένοι παράγοντες SREBP1/2 εδράζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και η πρωτεόλυσή τους ως απόκριση στη μείωση της χοληστερίνης ή της ινσουλίνης απελευθερώνει μια ενεργή μορφή που μεταφέρεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την μεταγραφή. Το mTORC1 φαίνεται να ρυθμίζει τη λειτουργία των παραγόντων SREBP, μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου και της κινάσης S6K1, τουλάχιστον σε μερικούς τύπους κυττάρων. Το mTORC1 επίσης προάγει την έκφραση και τη δραστηριότητα του PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), ο οποίος αποτελεί κύριο ρυθμιστή της αδιπογένεσης [35].

Το σύμπλοκο mTORC1 ρυθμίζει θετικά τον κυτταρικό μεταβολισμό και την παραγωγή ATP. Το mTORC1 αυξάνει τη γλυκολυτική ροή ενεργοποιώντας τη μεταγραφή και τη μετάφραση του

παράγοντα HIF1α (hypoxia inducible factor 1α), ένα θετικό ρυθμιστή πολλών γλυκολυτικών γονιδίων (εικ. 1.24). Σε μια άλλη έρευνα, έχει αναφερθεί ότι το mTORC1 αυξάνει το μιτοχονδριακό περιεχόμενο σε DNA και την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στον οξειδωτικό μεταβολισμό, εν μέρει μέσω της πυρηνικής συσχέτισης του PGC1α (PPAR-γ coactivator 1α) και του μεταγραφικού παράγοντα YY1 (Ying-Yang 1), οι οποίοι ρυθμίζουν θετικά τη μιτοχονδριακή βιογένεση και την οξειδωτική λειτουργία [35].

Η συζήτηση μέχρι στιγμής επικεντρώθηκε στις θετικές επιδράσεις του mTORC1 στις αναβολικές διεργασίες, αλλά το mTORC1 προάγει επίσης την ανάπτυξη μέσω αρνητικής ρύθμισης της αυτοφαγίας, η οποία αποτελεί τη κεντρική αποικοδομητική διαδικασία των κυττάρων. Η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για την ανακύκλωση των κατεστραμμένων οργανιδίων και για την οργανική και κυτταρική προσαρμογή στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Μετά την αναστολή του mTORC1, σχηματίζονται αυτοφαγοσώματα, τα οποία εν συνεχεία εγκολπώνουν κυτταροπλασματικό υλικό και οργανίδια και συντήκονται με λυσοσώματα, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των συστατικών του κυττάρου και την ανακύκλωση των κυτταρικών δομικών στοιχείων. Στα θηλαστικά, το mTORC1 φωσφορυλιώνει και καταστέλλει το σύμπλοκο ULK1/Atg13/FIP200, ένα σύμπλοκο κίνησης που απαιτείται για την εκκίνηση της αυτοφαγίας. Όπως συμβαίνει και με τον έλεγχο της πρωτεϊνικής και λιπιδικής σύνθεσης, το mTORC1 είναι πιθανό να επηρεάσει την αυτοφαγία μέσω διαφόρων μηχανισμών. Για παράδειγμα, το mTORC1 ρυθμίζει τη πρωτεΐνη DAP1 (death associated protein 1), μια πρωτεΐνη καταστολέα της αυτοφαγίας [35].

Είναι μερικές φορές αστεία η άποψη το ότι το «mTOR ρυθμίζει τα πάντα» και παρόλο που αυτό δεν είναι βέβαια αληθινό, είναι αξιοσημείωτο πόσες κρίσιμες διαδικασίες ελέγχει αυτό το μονοπάτι. Αυτό ίσως δεν είναι τόσο περίεργο, δεδομένου ότι το mTOR είναι ένας από τους βασικούς αισθητήρες για το ενεργειακό επίπεδο των κυττάρων, και δεν είναι δύσκολο να φανταστούμε γιατί είναι ευεργετικό για πολλές διαδικασίες που εξαρτώνται από την κατάσταση των θρεπτικών [35].



Εικόνα 1.24: Το μονοπάτι σηματοδότησης mTOR. (A) Τα κύρια στοιχεία που ρυθμίζουν το mTORC1 και το mTORC2. (B) Οι κύριες κυτταρικές διαδικασίες συμμετοχής των συμπλόκων mTORC1 και το mTORC2 [35]

1.8.2 Επισκόπηση του δικτύου σηματοδότησης του συμπλόκου mTORC2

Το TORC2 συγκροτείται από έξι διαφορετικές πρωτεΐνες, μερικές από τις οποίες είναι κοινές μεταξύ του TORC1 και του TORC2. Το TORC2 αποτελείται λοιπόν από το TOR, τον Rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR), τον SIN1, τον Protor-1, τον mLST8 και τον Deptor. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο Rictor και ο mSIN1 σταθεροποιούν ο ένας τον άλλον, συμβάλλοντας στον σχηματισμό του TORC2. Ο Rictor αλληλεπιδρά με τον Protor-1, χωρίς να είναι ξεκάθαρη η λειτουργία αυτής της αλληλεπίδρασης. Ο Deptor, όπως και στην περίπτωση του TORC1 ρυθμίζει αρνητικά την δράση του TORC2. Τέλος, ο mLST8 είναι βασικός για τη λειτουργία του TORC2, καθώς η απουσία του μειώνει τη σταθερότητα και τη δράση του συμπλόκου [34].

Επειδή η θεραπεία με ραπαμυκίνη δεν διαταράσσει την σηματοδότηση μέσω του mTORC2, και το σύμπλοκο FKBP12 – ραπαμυκίνης δεν μπορεί να προσδεθεί στο mTORC2, αυτό το σύμπλεγμα αρχικά θεωρήθηκε ότι δεν ήταν ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη. Ωστόσο, η κατάσταση αποδεικνύεται περισσότερο πολύπλοκη καθώς η μακροχρόνια θεραπεία με ραπαμυκίνη μειώνει τη σηματοδότηση μέσω mTORC2 σε μερικούς, αλλά όχι σε όλους τους τύπους κυττάρων, και το κάνει με την καταστολή του mTORC2 [35].

Σε σύγκριση με το mTORC1, πολύ λιγότερα είναι γνωστά για το μονοπάτι mTORC2. Η σηματοδότηση μέσω mTORC2 δεν είναι ευαίσθητη στα θρεπτικά συστατικά, αλλά ανταποκρίνεται σε αυξητικούς παράγοντες όπως η ινσουλίνη, μέσω ανεπαρκώς καθορισμένων μηχανισμών που απαιτούν την PI3K. Ένας πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει ένα νέο ρόλο των ριβοσωμάτων, καθώς απαιτούνται ριβοσώματα για την ενεργοποίηση του mTORC2 και έτσι το mTORC2 δεσμεύεται σε αυτά με τρόπο εξαρτώμενο από την PI3K [35].

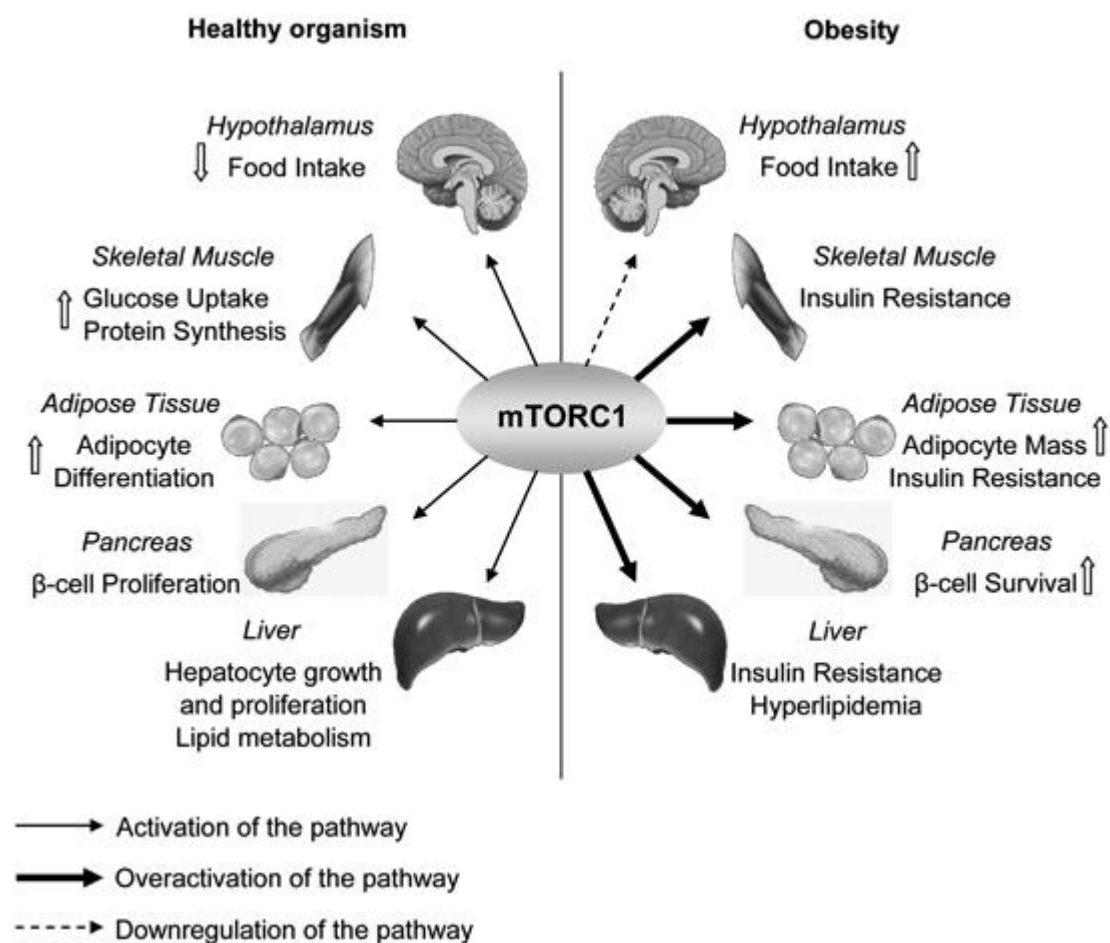
Το mTORC2 ελέγχει αρκετά μέλη της υποοικογένειας των κινασών AGC, συμπεριλαμβανομένων της Akt, της SGK1 (glucocorticoid-induced protein kinase 1) και της PKC-α (protein kinase C-α) (**εικ. 1.22**). Η Akt ρυθμίζει κυτταρικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός, η επιβίωση, η απόπτωση, η ανάπτυξη, και ο πολλαπλασιασμός, μέσω φωσφορυλίωσης διαφόρων τελεστών. Το mTORC2 ενεργοποιεί άμεσα την Akt, με φωσφορυλίωση του υδρόφοβου μοτίβου της (Ser473), μιας θέσης που απαιτείται για την μέγιστη ενεργοποίησή της. Ελαττωματική φωσφορυλίωση της Akt, λόγω μείωση της δραστηριότητας του mTORC2, παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση ορισμένων στόχων της Akt, συμπεριλαμβανομένου και του FoxO1/3a, ενώ άλλοι στόχοι, όπως είναι το TSC2 και η GSK3-β, δεν επηρεάζονται. Το mTORC2 επίσης ενεργοποιεί άμεσα την κινάση SGK1, η οποία ελέγχει τη μεταφορά των ιόντων και την αύξηση. Εν αντιθέσει με την Akt, η ενεργότητα της SGK-1 μπλοκάρεται τελείως από την απώλεια του mTORC2. Η PKC-α είναι η τρίτη κινάση που ενεργοποιείται από το σύμπλοκο mTORC2. Μαζί με άλλους τελεστές όπως οι Rho GTPάσες, η ενεργοποίηση της PKC-α από το mTORC2 ρυθμίζει το κυτταρικό σχήμα, επιδρώντας στον κυτταροσκελετό της ακτίνης [35].

1.8.3 Σηματοδότηση του mTOR στους ιστούς και ο ρόλος του σε μεταβολικές ασθένειες

Στα θηλαστικά, η μετάβαση μεταξύ των καταστάσεων νηστείας και παροχής συστατικών επηρεάζει τις διαθέσιμες ποσότητες θρεπτικών ουσιών και αυξητικών παραγόντων. Με τη σειρά τους, αυτές οι αλλαγές καθορίζουν εάν οι ιστοί προσανατολίζουν το μεταβολισμό τους προς αναβολικές ή καταβολικές διεργασίες. Για παράδειγμα, υψηλά επίπεδα θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων οδηγούν σε σύνθεση γλυκογόνου στους μύς και το ήπαρ, την πρόσληψη λιπιδίων από λιπώδεις ιστούς, μειώνοντας παράλληλα τη διάσπαση πρωτεϊνών στους μύες, τη γλυκονογένεση στο ήπαρ, και λιπόλυση στον λιπώδη ιστό. Επειδή το μονοπάτι mTOR ανταποκρίνεται στα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων και των θρεπτικών, ο ρόλος του στη ρύθμιση του μεταβολισμού παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια [35].

Η κατανόηση του ρόλου του mTOR στη ρύθμιση του μεταβολισμού *in vivo* έχει περιοριστεί από το γεγονός ότι η αδρανοποίηση βασικών συστατικών του μονοπατιού σε ολόκληρο το σώμα ποντικών, οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα. Η χρήση αλληλόμορφων γονιδίων διαγραφής διαφόρων συστατικών του μονοπατιού υπό συνθήκες, άρχισε να αποκαλύπτει νέες λειτουργίες του μονοπατιού στον έλεγχο του μεταβολισμού σε διάφορους ιστούς (**εικ.1.25**) [8]. Μερικές βασικές διαδικασίες στις οποίες το μονοπάτι αυτό έχει κρίσιμο ρόλο είναι οι εξής:

- ❖ Ρύθμιση των επιπέδων ενέργειας στον εγκέφαλο
- ❖ Ρύθμιση της αδιπογένεσης και της λιπογένεσης στο λιπώδη ιστό
- ❖ Ρύθμιση της μυϊκής μάζας, του οξειδωτικού μεταβολισμού και της ομοιόστασης της γλυκόζης στους μύες
- ❖ Ρύθμιση της κετογένεσης και της λιπογένεσης στο συκώτι
- ❖ Ρύθμιση της μάζας των β-κυττάρων, της έκκρισης ινσουλίνης, και της ομοιόστασης της γλυκόζης στο πάγκρεας



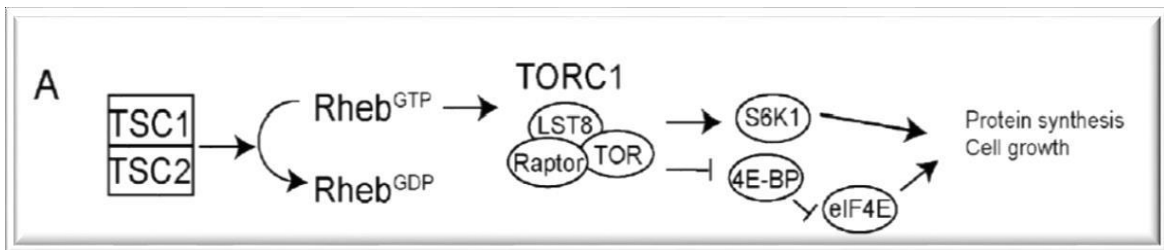
Εικόνα 1.25: Ρύθμιση και λειτουργία του mTORC1 μονοπατιού σε διάφορα όργανα

1.9 Το σύμπλοκο Tsc (Tuberous Sclerosis Complex)

Το σύμπλοκο Οζώδους σκλήρυνσης ή αλλιώς TSC, είναι ένα ετεροδιμερές και αποτελείται από το TSC1 και το TSC2. Το γονίδιο TSC1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη hamartin ενώ το γονίδιο TSC2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη tuberin. Ετερόζυγες μεταλλάξεις στο TSC1 ή στο TSC2 έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό καλοθών όγκων σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, της καρδιάς και του εγκεφάλου. Μεταλλάξεις στα γονίδια TSC συνδέονται επίσης με διάφορες νευροαναπτυξιακές διαταραχές όπως η επιληψία, ο αυτισμός, το σύνδρομο ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας, το άγχος και οι διαταραχές της διάθεσης. Στην καλύτερη κατανόηση του μονοπατιού TSC βοήθησε η ανακάλυψη ότι αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της TOR κινάσης, μέσω αναστολή της Rheb, μιας μικρής GTPάσης. Το TSC2 δρα ως μια GAP πρωτεΐνη (GTPase-activating protein), και αναστέλλει την Rheb διατηρώντας τη συνδεδεμένη με GDP (**εικ. 1.26**). Το TSC1 δεν έχει επικράτεια GAP, αλλά δρα ως σταθεροποιητής του TSC2 καθώς το προστατεύει από την αποικοδόμηση. Το TSC2 φωσφορυλιώνεται από την AMPK σε ένα κατάλοιπο σερίνης, και έτσι ενεργοποιείται. Ενεργοποίηση του TSC2 οδηγεί σε απενεργοποίηση της Rheb και συνεπώς και αποσιώπηση της καταλυτικής δράσης του TORC1 [36].

Η Hamartin, είναι μία πρωτεΐνη 130 kDa και περιέχει μια υποθετική διαμεμβρανική επικράτεια, καθώς και δύο επικράτειες coiled-coil που είναι απαραίτητες για την σύνδεσή της με την Tuberin. Επίσης η Hamartin αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας ezrin-radixin-moesin και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Rho (GTP binding protein), γεγονός που υποδηλώνει ότι η Hamartin συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση. Η Tuberin (198 kDa) έχει μια περιοχή με μικρή ομολογία ως προς την καταλυτική επικράτεια της Rap1GAP, στο καρβοξυτελικό της άκρο. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στη *Drosophila* όσο και σε θηλαστικά έχουν δείξει ότι το σύμπλοκο Hamartin/Tuberin δρα αναρροϊκά της S6K1 και καταρροϊκά της Akt στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K [36].

Στη *Drosophila melanogaster*, η απενεργοποίηση του TSC1 ή του TSC2 αυξάνει το κυτταρικό μέγεθος και τον πολλαπλασιασμό, αλλά η υπερέκφραση και των δύο μαζί και όχι μεμονωμένα μειώνει το κυτταρικό μέγεθος, ενισχύοντας την υπόθεση ότι TSC1/TSC2 σχηματίζουν ένα λειτουργικό σύμπλοκο που ρυθμίζει την αύξηση των κυττάρων [37].



Εικόνα 1.26: Το εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι TSC, ρυθμίζει την πρωτεϊνοσύνθεση και την κυτταρική αύξηση μέσω ενεργοποίησης του TORC1 συμπλόκου [38]

1.9.1 Το TSC1/2 σύμπλοκο ανταγωνίζεται το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR/S6K1/4E-BP1

Ο ρόλος του συμπλόκου TSC1/2 στο mTOR μονοπάτι προτάθηκε πρώτα ύστερα από γενετικές μελέτες στο έντομο *Drosophila melanogaster*, οι οποίες έδειξαν ότι το TSC1/2 λειτουργεί ως αναστολέας του

μονοπατιού σηματοδότησης μέσω ινσουλίνης καταρροϊκά της AKT (**εικ. 1.27**). Αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν επίσης ότι η S6K1 θα μπορούσε να αποτελεί έναν ανασταλτικό στόχο του TSC1/2 στον έλεγχο της ανάπτυξης. Βιοχημικές μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών επιβεβαιώνουν ότι το TSC1/2 αναστέλλει τη δραστηριότητα της S6K1. Ο παράγοντας eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), η κινάση S6K1 και ο παράγοντας 4E-BP1 (binding protein 1) βρέθηκε ότι είναι σταθερά φωσφορυλιωμένοι σε ομόζυγα κύτταρα *tsc1* ή *tsc2*. Μείωση της έκφρασης TSC2 μέσω RNAi, είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη φωσφορυλίωση της S6K1 σε κατάλοιπα Thr389, γεγονός που συσχετίζεται με την ενεργοποίηση της κινάσης. Η υπερέκφραση του TSC1/2 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση και κατ'επέκταση την ενεργοποίηση της S6K1, καθώς επίσης αναστέλλει και τη φωσφορυλίωση του 4E-BP1 [39].

Έχει αναφερθεί ότι η επίδραση του TSC1/2 επί των S6K1/4E-BP1 θα μπορούσε να είναι είτε εξαρτώμενη από mTOR ή ανεξάρτητη από αυτό, αλλά η πλειονότητα των ερευνών ευνοεί την εξάρτηση από το μονοπάτι mTOR. Η S6K1 ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα (Thr389, Thr421, Ser424). Το κατάλοιπο Thr389 είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στην αναστολή από ραπαμυκίνη, και φωσφορυλιώνεται απ'ευθείας από το mTOR *in vitro*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υπερέκφραση του TSC1/2 καταστέλλει κυρίως τη φωσφορυλίωση της Thr389, αλλά έχει περιορισμένη επίδραση στη φωσφορυλίωση της Thr421 ή της Ser424. Γενετικές αναλύσεις στη *Drosophila*, τοποθετούν το TSC1/2 ως έναν αναρροϊκό αναστολέα του TOR, και σε κύτταρα θηλαστικών, το TSC1/2 αποκλείει τη φωσφορυλίωση της Ser2448 του mTOR, το οποίο μπορεί να είναι σημαντικό για την ενεργοποίηση του mTOR [39].

Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργότητα και η κατάσταση φωσφορυλίωσης της S6K1 μειώνεται, ως απόκριση στο περιορισμό των αμινοξέων και διεγείρεται μετά την επαναπροσθήκη αμινοξέων, και το mTOR απαιτείται για τη σύνδεση της ενεργότητας της S6K1 με τα επίπεδα των αμινοξέων. Η διεγερόμενη από αμινοξέα ενεργοποίηση της S6K1, παρεμποδίζεται από την υπερέκφραση του TSC1/2. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι το TSC1/2 ανταγωνίζεται την διεγερόμενη από αμινοξέα σηματοδότηση μέσω mTOR [39].

Οι μεταλλάξεις στο TSC2 που έχουν βρεθεί σε ασθενείς με TSC, είναι ελαττωματικές ως προς τη καταστολή της φωσφορυλίωσης των S6K1 και 4E-BP1, υποδηλώνοντας ότι η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR/S6K1/4E-BP1, είναι ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες που προκαλούν την ασθένεια. Ως εκ τούτου, διάφορα συστατικά αυτού του μονοπατιού θα μπορούσαν να αποτελέσουν κατάλληλο στόχο για φαρμακευτική παρέμβαση, για την θεραπεία της ασθένειας. Πράγματι, *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι βραχυπρόθεσμη αναστολή του mTOR από τη ραπαμυκίνη, σχετίζεται με σημαντική απόκριση των όγκων, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της απόπτωσης και της μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [39].

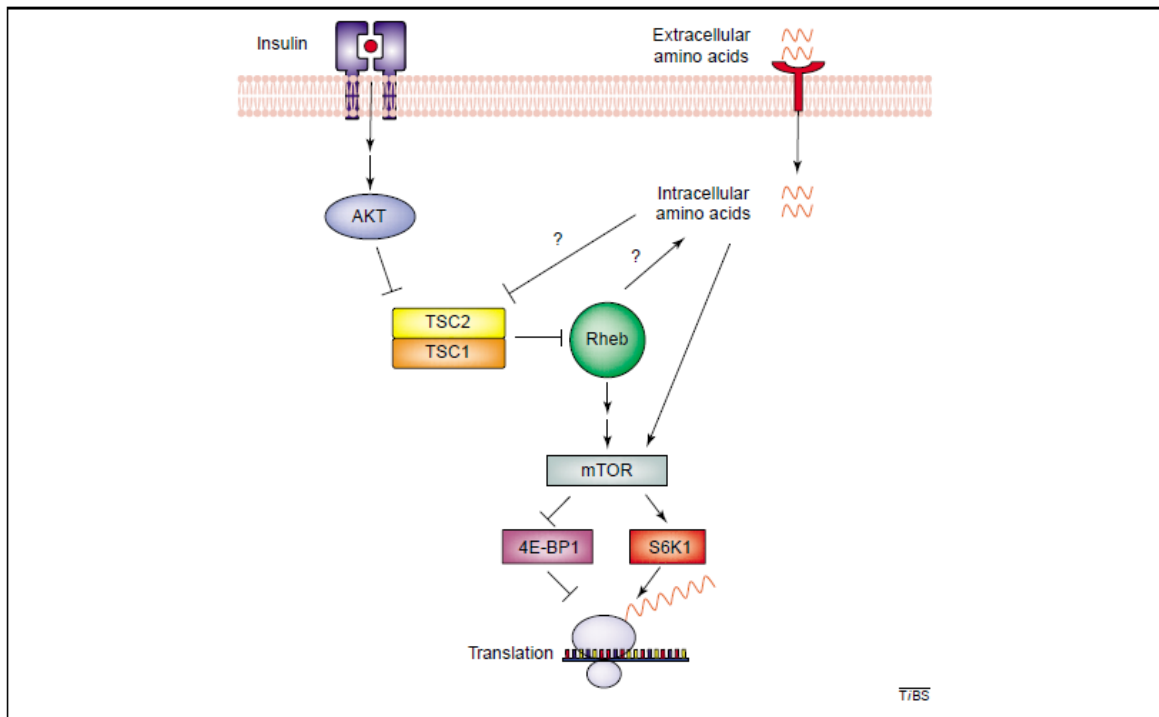
1.9.2 Ρύθμιση του συμπλόκου TSC1/2

✓ Φωσφορυλίωση και αναστολή μέσω της AKT

Γενετικές αναλύσεις τοποθετούν το TSC1/2 σε ένα μονοπάτι, το οποίο ανταγωνίζεται το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω ινσουλίνης, καταρροϊκά ή παράλληλα του PI3K/AKT μονοπατιού. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αρκετές πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από την AKT στο TSC2, αλλά όχι στο TSC1. Μεταλλάγματα TSC2, όπου έχουν υποστεί μεταλλαγή σε αλανίνη στη θέση φωσφορυλίωσης από την AKT, έχουν ενισχυμένη επίδραση στην αναστολή της S6K1, ενώ αυτά που έχουν μεταλλαγμένο ασπαρτικό οξύ, εμφανίζουν μειωμένη επίδραση. Αυτό υποδηλώνει ότι το TSC1/2 ρυθμίζεται αρνητικά από την AKT και υποστηρίζει ένα μοντέλο που η AKT διεγείρει τη σηματοδότηση μέσω mTOR, αναστέλλοντας το TSC1/2 [39].

✓ Ρύθμιση μέσω πρωτεϊνών της οικογένειας 14-3-3

Κατά το παρελθόν, αρκετές ομάδες έχουν αναφέρει αλληλεπιδράσεις μεταξύ του TSC2 και μελών της οικογένειας πρωτεϊνών 14-3-3. Έχει δειχθεί ότι οι θέσεις φωσφορυλίωσης από την AKT, είναι υπεύθυνες για την δέσμευση των πρωτεϊνών 14-3-3. Βέβαια, έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλίωση της Ser1210 του TSC2, η οποία δεν αποτελεί θέση φωσφορυλίωσης από την AKT, είναι απαραίτητη για την δέσμευση των πρωτεϊνών 14-3-3. Η υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών ενισχύει τη φωσφορυλίωση των S6K1 και 4E-BP1, αλλά εξακολουθεί να παραμένει ασαφές αν η σύνδεση των 14-3-3 με το TSC2 εμπλέκεται σε αυτό το αποτέλεσμα [39].



Εικόνα 1.27: Η ετεροδιμερής πρωτεΐνη TSC1/2 (Tuberous sclerosis complex 1/2) και η Rheb, αποτελούν αναρροϊκά συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR (mammalian target of rapamycin). Το TSC2 φωσφορυλιώνεται και αναστέλλεται από την πρωτεΐνη AKT, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, όπως η ινσουλίνη. Το TSC2 αποτελεί μια GAP πρωτεΐνη (GTPase-activating protein) για τη μικρή G πρωτεΐνη, Rheb. Η απενεργοποίηση της Rheb από το TSC2 είναι σημαντική, καθώς η σύνδεση του GTP ενεργοποιεί τη Rheb, οδηγώντας σε αύξηση της ενεργοποίησης του mTOR, ενός κεντρικού ρυθμιστή της κυτταρικής ανάπτυξης. Σε απόκριση στα κυτταρικά ενεργειακά επίπεδα αλλά και στα αμινοξέα, το mTOR ελέγχει τη μετάφραση μέσω ενεργοποίησης της S6K1, του eIF4E παράγοντα και του 4E-BP1. Είναι γνωστό ότι τα κυτταρικά θρεπτικά επίπεδα (ενδοκυτταρικά αμινοξέα) μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία του mTOR [39]

1.10 Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη των επιπτώσεων στον οργανισμό που προκύπτουν από μεταλλαγές στα γονίδια TOR, TSC1 και TSC2. Και τα δύο γενετικά συστατικά TOR και TSC1/2 σχετίζονται με μια πληθώρα ασθενειών στον άνθρωπο, μιας εκ των οποίων είναι και η οζώδης σκλήρυνση. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιώντας ως *in vivo* μοντέλο, το δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*, επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε τον τρόπο λειτουργίας και αλληλεπίδρασης των δύο αυτών στενά συνδεδεμένων σηματοδοτικών καθοριστών και τον τρόπο που επηρεάζουν τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου.

Στην κατεύθυνση αυτή, μέσω του γενετικού συστήματος UAS/GAL4 και της RNAi τεχνολογίας διερευνήθηκε η συμμετοχή των σηματοδοτικών μεταγωγέων TOR και TSC του κυττάρου στις αναπτυξιακές διαδικασίες σχηματισμού του σύνθετου οφθαλμού και του φτερού. Επίσης, διερευνήθηκε η συμμετοχή τους στο νευρικό σύστημα, στους κινητικούς νευρώνες αλλά και σε ολόκληρο τον οργανισμό του εντόμου, μέσω των διαδικασιών βιωσιμότητας και αναρρίχησης. Αυτό το επιτύχαμε μέσω μειορρύθμισης αυτών των πρωτεϊνών και παρατήρησης του προκύπτοντος φαινοτύπου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα

Ως πειραματόζωο για τη μελέτη των επιπτώσεων που έχουν στην παθοφυσιολογία στοχευμένες διαταραχές σε κρίσιμα σηματοδοτικά δίκτυα χρησιμοποιήθηκε το Δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα γονίδια dTSC1, dTSC2 και dTOR σε διαφορετικούς ιστούς του εντόμου. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ιστοειδικές διασταυρώσεις στα ωοθυλάκια, στον οφθαλμό, στο φτερό, σε ολόκληρο το σώμα, στους κινητικούς νευρώνες, στους χολινεργικούς νευρώνες, στους γλουταμινεργικούς νευρώνες, σε μια ειδική περιοχή του εγκεφάλου (mushroom body-mb) καθώς επίσης και στο νευρικό σύστημα με συγκεκριμένα RNAi στελέχη.

Οι drivers που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρήχθησαν από τον οργανισμό Bloomington *Drosophila* Stock Center και ήταν οι εξής:

STOCK NUMBER	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΕΝΘΕΣΗ	ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ
1104	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR}12	2o	οφθαλμός
8761	P{w[+m*]=GAL4}A9, w[*]	1o	φτερό και αλήθρας
8860	w[1118] P{w[+mW.hs]=GawB}Bx[MS1096]	1o	φτερό
4414	y[1] w[*]; P{w[+mC]=Act5C-GAL4}25F01/CyO, y[+]	2o	ολόκληρο σώμα
8816	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}D42	3o	κινητικοί νευρώνες
8760	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-elav.L}3	3o	νευρικό σύστημα
6354	w[*]; P{GAL4}bs[1348]	2o	φλέβες φτερού
6874	w[*]; P{w[+mC]=UAS-2xEGFP}AH2	2o	gfp
3750	P{w[+mW.hs]=GawB}c355, w[1118]	1o	θυλακοκύτταρα
30814	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}117Y	2o	mushroom body
26160	w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}VGlut[OK371]	2o	γλουταμινεργικοί νευρώνες
6798	w[1118]; P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19B/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12}FK1	2o	χολινεργικοί νευρώνες

Τα RNAi στελέχη των υπό μελέτη πρωτεϊνών της εργασίας που πραγματοποιήθηκε ήταν τα εξής:

STOCK NUMBER	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΕΝΘΕΣΗ	RNAi	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
7012	y[1] w[*] P{ry[+t7.2]=hsFLP}12; P{w[+mC]=UAS-Tor.WT}III	3o	Expresses Tor under UAS control	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
54034	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMJ21477}attP 40	2o	Expresses dsRNA for RNAi of Tsc1 under UAS control	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
103417	P{KK100646}VIE-260B	2o	Expresses dsRNA for RNAi of Tsc2 under UAS control	VDRC
33951	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00904}attP 2	3o	Expresses dsRNA for RNAi of Tor under UAS control	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center

2.2 Τρόπος καλλιέργειας και συντήρησης του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Τα περισσότερα stocks μπορούν να καλλιεργηθούν επιτυχώς με την περιοδική μαζική μεταφορά των ενηλίκων εντόμων σε φρέσκια τροφή (φιαλίδια) (εικ 2.1). Η συχνότητα με την οποία πρέπει να

δημιουργηθούν νέες καλλιέργειες εξαρτάται από την υγεία και τη γονιμότητα του στελέχους του συγκεκριμένου γονότυπου, τη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται τα έντομα, και τη πυκνότητα των καλλιεργειών. Η θερμοκρασία έχει μεγάλη επίδραση στο ρυθμό ανάπτυξης της *Drosophila*. Ο χρόνος δημιουργίας νέας γενιάς (από αυγό σε ενήλικα) είναι περίπου 7 ημέρες στους 29 °C, 9 ημέρες στους 25 °C, 11 ημέρες στους 22 °C και 19 ημέρες στους 18 °C. Στην παρούσα μελέτη το έντομο αυτό αναπτύχθηκε σε πλαστικούς σωλήνες, οι συνθήκες θερμοκρασίας της καλλιέργειας ήταν σταθερές στους 24-25 °C, εναλλασσόμενη φωτοπερίοδο φωτός - σκοταδιού ανά δώδεκα ώρες και σταθερή υγρασία.

Το μέσο καλλιέργειας συνίσταται από:

ΥΛΙΚΑ	1/2 ΔΟΣΗ	1 ΔΟΣΗ	1 1/2 ΔΟΣΗ	2 ΔΟΣΕΙΣ
ΝΕΡΟ (ml)	250	50	75	1000
ΑΓΑΡ (gr)	2	4	6	8
ΜΑΓΙΑ ΞΗΡΗ (gr)	1,95	3,9	5,85	7,8
ΖΑΧΑΡΗ (gr)	8	19	24	32
ΑΝΘΟΣ ΟΡΥΖΗΣ (gr)	16	32	48	64
ΤΟΜΑΤΟΠΟΛΤΟΣ (gr)	12,5	25	37,5	50
ΑΙΘΑΝΟΛΗ 95% (ml)	1	2	3	4
ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ (ml)	1	2	3	4



Εικόνα 2.1: Χώρος φύλαξης και καλλιέργειας του εντόμου *Drosophila melanogaster*

2.2 Παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

Το ΗΜΣ αποτελείται (α) από την ηλεκτρονική οπτική κολόνα, μέσα στην οποία δημιουργείται η ηλεκτρονική δέσμη και (β) από το θάλαμο ανιχνευτών. Η ηλεκτρονική οπτική κολόνα περιέχει το θάλαμο ηλεκτρονικού πιστολιού (*electron gun*) όπου γεννιέται η δέσμη ηλεκτρονίων και από την περιοχή ηλεκτρομαγνητικών φακών, οι οποίοι εστιάζουν τη δέσμη σε ένα πάρα πολύ μικρό σημείο (ή δέσμη) (*beam-spot, probe*) με όσο το δυνατό μεγάλη πυκνότητα ηλεκτρονίων. Η εστιασμένη ηλεκτρονική δέσμη προσπίπτει και δημιουργεί εκπομπές ανάλογα με τις ιδιότητες του υλικού στο σημείο πρόσπτωσης. Επί πλέον, η δέσμη σαρώνεται στην επιφάνεια του δοκιμίου σε παράλληλες ευθείες γραμμές μέσα σε ένα πάρα πολύ μικρό τετράγωνο με τον ίδιο τρόπο που σαρώνεται η δέσμη ηλεκτρονίων μέσα στην οθόνη της αναλογικής τηλεόρασης. Η διαφορά είναι μόνο ποσοτική: Στην τηλεόραση η σάρωση καλύπτει μία μεγάλη επιφάνεια, ενώ στο ΗΜΣ καλύπτει το πολύ μέχρι λίγα χιλιοστά, ενώ τελικά φτάνει να καλύπτει μόνο ένα ελάχιστο ορθογώνιο με διαστάσεις μικρού κλάσματος του χιλιοστού ανάλογα με την ικανότητα κάθε οργάνου. Έτσι, η βασική αρχή του ΗΜΣ είναι πρώτα να συγχρονίζουμε τη σάρωση της δέσμης του με την σάρωση μιας εξωτερικής οθόνης

(τηλεόρασης ή υπολογιστή), ενώ ταυτόχρονα να ανιχνεύουμε τις παραγόμενες εκπομπές από το δοκίμιο και να τις διοχετεύουμε στην οθόνη, όπου έτσι δημιουργείται ένα είδωλο ανάλογο με τις εκπομπές του δοκιμίου. Δηλαδή προβάλλουμε μία πάρα πολύ μικρή επιφάνεια του εξεταζομένου αντικειμένου στην μεγάλη μας οθόνη δημιουργώντας έτσι απλά μία τεράστια μεγέθυνση. Όσο πιο πολύ μικρή επιφάνεια ένα ΗΜΣ μπορεί να σαρώσει, τόσο πιο μεγάλη μεγέθυνση επιτυγχάνεται. Το μεγάλο κατόρθωμα της απλής αυτής αρχής έγκειται στη τεχνολογική παραγωγή μιας τόσο τεράστια μικρής δέσμης μέσα στο ΗΜΣ, αν φανταστούμε πως η δέσμη στη μεγάλη μας οθόνη είναι σχεδόν αόρατη από απόσταση στο γυμνό οφθαλμό, για να έχουμε μια καθαρή εικόνα.

Για πιο εκτενή παρατήρηση της εξωτερικής μορφολογίας των μυγών, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης υψηλής διακριτικότητας (SEM) τύπου Phillips 515. Ένα παρασκεύασμα για να παρατηρηθεί με το κλασσικό ΗΜΣ θα πρέπει να έχει ορισμένες ιδιότητες που είναι:

- α. να αντέχει στο υψηλό κενό,
- β. να αντέχει στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, και
- γ. να είναι αγώγιμο

Οι ιστοί που παρατηρήθηκαν με SEM ήταν οι οφθαλμοί και τα φτερά. Για τους οφθαλμούς χρειάστηκαν μύγες 10, 30 και 50 ημερών. Για τα φτερά χρησιμοποιήθηκαν μύγες ηλικίας αντίστοιχων ημερών.

Το πρωτόκολλο είναι το εξής:

- Συλλογή αρσενικών και θηλυκών μυγών και τοποθέτηση σε eppendorfs.
- Μονιμοποίηση σε 2% γλουταρική αλδεΐδη σε 0,08 M κακοδυλικό ρυθμιστικό διάλυμα για 90 λεπτά.
- Έκπλυση σε 4% σακχαρόζη σε 0,08 M κακοδυλικό ρυθμιστικό διάλυμα για 40 λεπτά.
- Μονιμοποίηση σε 2% τετροξείδιο του οσμίου (OsO₄) για 24 ώρες.
- Έκπλυση σε 4% σακχαρόζη σε 0,08 M κακοδυλικό ρυθμιστικό διάλυμα για 40 λεπτά.
- Αφυδάτωση σε 30%, 50%, 70%, 95% και 3 φορές σε 100% αιθανόλη για 20 λεπτά την κάθε φορά.
- Ξήρανση σε συσκευή κρίσιμου σημείου (critical point dryer) και τοποθέτηση των μυγών σε stubs και επικάλυψη με λεπτό στρώμα μετάλλου (χρυσού), που συνήθως γίνεται με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού, για να γίνουν αγώγιμα και παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Για τα φτερά και τα μάτια ωστόσο δεν ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία, διότι είναι ιστοί με μικρή περιεκτικότητα σε νερό. Συνεπώς, για την παρατήρηση των φτερών κάναμε αρχικά αφαίρεση φτερών από αρσενικές και από θηλυκές μύγες, έγινε απευθείας επικόλληση τους σε stubs και επικάλυψη με λεπτό στρώμα μετάλλου (χρυσού). Για τους οφθαλμούς τοποθετήσαμε σε stubs ολόκληρες μύγες και των δύο φύλων και εν συνεχεία ακολουθήσαμε την διαδικασία που προαναφέρθηκε για τα φτερά.

2.4 Παρατήρηση σε μικροσκόπιο CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)

Φθορίζοντα παρασκευάσματα με σημαντικό πάχος, όπως για παράδειγμα στρογγυλά κύτταρα ή τομές ιστών δεν απεικονίζονται καλά με μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου διότι φθορίζοντα σήματα από μόρια που ευρίσκονται εκτός αλλά κοντά στο επίπεδο εστίασης ανιχνεύονται, αυξάνουν το background και δίνουν εικόνες με χαμηλή αντίθεση (contrast). Η συνεστιακή μικροσκοπία (confocal laser scanning microscopy) επιλύει το πρόβλημα διότι απορρίπτει σήματα από κοντινά αντικείμενα πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης. Με τη συνεστιακή μικροσκοπία δίνεται η δυνατότητα παρατήρησης οπτικών «τομών» του παρασκευάσματος.

Η αρχή λειτουργίας της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης πρωτοπεριγράφηκε από τον Minski το 1961. Αντίθετα με τον κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση περιορίζονται σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος (<10μm) στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτικού φακού. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου

Το CLSM αποτελείται από μικροσκόπιο φθορισμού, πολλαπλές πηγές φωτός laser, την κεφαλή σάρωσης (scan head) με οπτικά και ηλεκτρονικά στοιχεία, ηλεκτρονικό υπολογιστή, software και οθόνες για συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση της εικόνας. Το laser παρέχει τη φωτεινή δέσμη η οποία υπό τον έλεγχο ηλεκτρονικού υπολογιστή «σαρώνει» το παρασκεύασμα. Η κεφαλή σάρωσης του confocal κατευθύνει τα φθορίζοντα σήματα από το παρασκεύασμα στην pinhole και τον φωτοπολλαπλασιαστή (photomultiplier, PMT). Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής μετατρέπει τις διαφορές έντασης φωτός σε ψηφιακή εικόνα. Η εικόνα του confocal δεν δημιουργείται στο μικροσκόπιο και μπορούμε να τη δούμε μόνο στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή.

2.5 Πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της βιωσιμότητας

Για να ελέγξουμε τη βιωσιμότητα των μυγών τοποθετήσαμε, στα ειδικά μπουκαλάκια, 20 μύγες (ξεχωριστά αρσενικά και θηλυκά) ηλικίας 1-2 ημερών. Τα μπουκαλάκια τροφής παρέμειναν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στον ειδικό θάλαμο φύλαξης των μυγών (flyroom), υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Σε καθημερινή βάση γινόταν καταμέτρηση του αριθμού των νεκρών μυγών σε κάθε μπουκαλάκι. Αλλαγή τροφής γινόταν ανά 5-6 μέρες και αν ήταν απαραίτητο και σε συντομότερο χρονικό διάστημα (κάθε 2-3 μέρες). Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα (3 μήνες). Συνολικά συγκεντρώθηκαν 100 μύγες για κάθε διασταύρωση και για κάθε φύλο.

2.6 Πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της λειτουργίας του νευρικού συστήματος (climbing assay)

Για την εκτίμηση της λειτουργίας του νευρικού συστήματος, χρησιμοποιήσαμε την δοκιμασία του climbing. Οι μύγες φυλάσσονταν μαζί (20 θηλυκά και 20 αρσενικά/ ανά μπουκαλάκι), και πριν από κάθε δοκιμασία γινόταν αναισθησία με την χρήση αιθέρα και διαχωρισμός των ατόμων. Μετά από 1 ώρα (ώστε να έχουν επανέλθει πλήρως οι μύγες από την νάρκωση) τοποθετούσαν οι μύγες κάθε δείγματος σε βαθμονομημένο ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL. Πραγματοποιούσαμε ένα ελαφρύ χτύπημα ώστε να κατέβουν όλες οι μύγες στον πάτο και στη συνέχεια με τη βοήθεια χρονομέτρου, καταγράφαμε πόσες μύγες έχουν ξεπεράσει το όριο των 60 mL, στο χρονικό διάστημα των 20 δευτερολέπτων. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήσουμε 5 επαναλήψεις και στο τέλος λαμβάναμε τον μέσο όρο. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν ανά 10 ημέρες και μέχρι την ηλικία των 30 ημερών.

2.7 Στερεο(μικρο)σκόπιο

Η εξέταση των αντικειμένων σε τρεις διαστάσεις, πραγματοποιείται σε έναν ειδικό τύπο φωτονικού μικροσκοπίου, το στερεοσκόπιο. Επειδή η απόσταση αντικειμένου-φακού είναι μεγάλη, για να επιτρέπονται χειρισμοί, αλλά και για να σχηματισθεί στερεοσκοπικό είδωλο, δεν επιτυγχάνονται μεγεθύνσεις μεγαλύτερες των 300x με αυτό το είδος μικροσκοπίου.

Το στερεοσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση της εξωτερικής μορφολογίας των εντόμων και τη μελέτη όλων τις παραμέτρων που αυτή επηρεάζει, καθώς και για ανατομία ή απομόνωση ιστού (π.χ. οφθαλμοί, φτερά). Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο BMS 74958 stereo-microscope, στο οποίο μέσω κατάλληλης τεχνολογίας (H/Y-κάμερα) και λογισμικού (πρόγραμμα "Scorphoto") έγινε λήψη εικόνων. Τα έντομα αναισθητοποιούνται με διάλυμα αιθέρα 99% πριν από την παρατήρηση, για να είναι εφικτός ο χειρισμός τους.

2.8 Στατιστική ανάλυση

Το SPSS (Statistical Package for Social Sciences) είναι ένα στατιστικό πρόγραμμα με ευρύτατη χρήση σε όλους τους ερευνητικούς χώρους. Δίνει λύσεις και απαντήσεις σε θέματα που απαιτούν χρήση της Στατιστικής Επιστήμης. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων των βιωσιμότητων χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα αυτό. Στο πρόγραμμα εισάγαμε ως δεδομένα τα άτομα που απεβίωναν κάθε μέρα μέχρι να πεθάνει και το τελευταίο. Στη συνέχεια μέσω της ανάλυσης κατά Kaplan Mayer έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αποδίδοντάς τα σε γραφήματα βιωσιμότητας. Ως στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα δεχτήκαμε αυτά που είχαν $p < 0,05$.

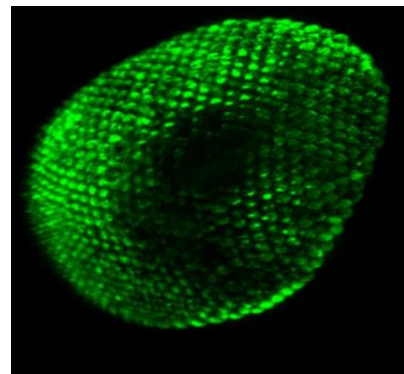
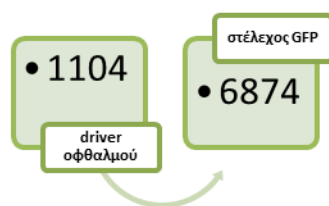
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος της ιστοειδικότητας των στελεχών-οδηγών (drivers) στο έντομο *Drosophila melanogaster*

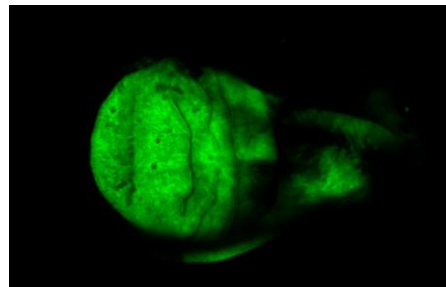
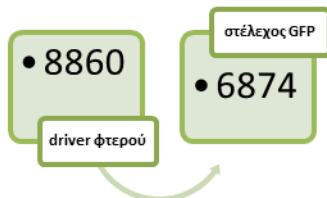
Πριν την έναρξη των πειραμάτων, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της ιστοειδικότητας των οδηγών (driver). Προκειμένου να γίνει ο έλεγχος έντομα που έφεραν τον εκάστοτε GAL4-οδηγό διασταυρώθηκαν με έντομα που έφεραν το διαγονίδιο UAS-eGFP ("Green Fluorescent Protein"). Ο εκάστοτε ιστός στον οποίο υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη GFP, αποκτά έντονο πράσινο χρώμα, όπως προκύπτει από παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης.

3.1.1 Έλεγχος Driver οφθαλμού



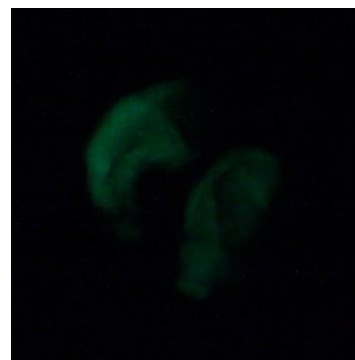
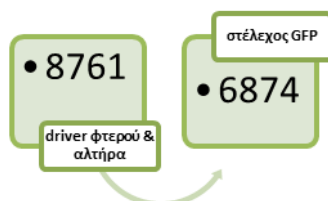
Εικόνα 3.1: . Εικονίζεται ο οφθαλμός εντόμου *D. melanogaster*, ο οποίος φθορίζει πράσινα σε όλη την επιφάνειά του. Διακρίνονται ευκρινώς οι δομές των ομματιδίων και των βλεφαρίδων

3.1.2 Έλεγχος Driver φτερού



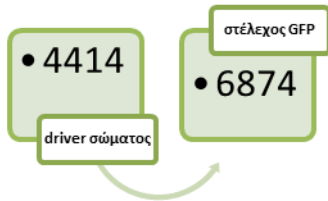
Εικόνα 3.2: Απεικόνιση φτερού (wing disc) *D.melanogaster*, όπου φθορίζει η χρωστική GFP

3.1.3 Έλεγχος Driver φτερού & αλτήρα



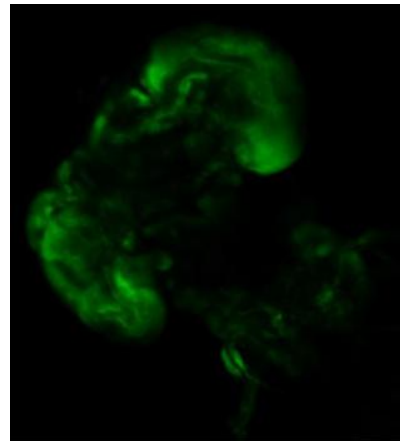
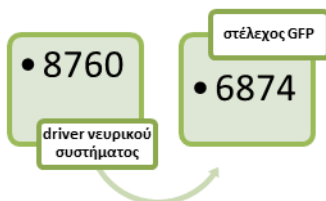
Εικόνα 3.3: Απεικόνιση wing & haltere disc *D.melanogaster*, όπου φθορίζει η χρωστική GFP

3.1.4 Έλεγχος Driver όλου του σώματος

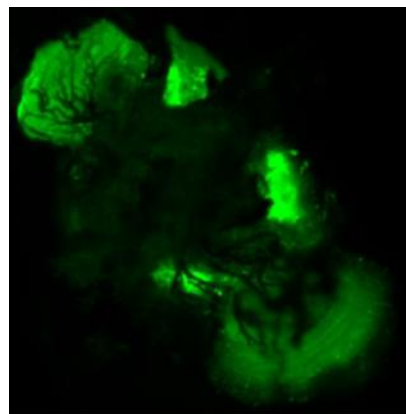


Εικόνα 3.4: Απεικόνιση του σώματος της *D.melanogaster*, όπου φθορίζει η χρωστική GFP

3.1.5 Έλεγχος Driver νευρικού συστήματος



Εικόνα 3.5: Απεικόνιση του εγκεφάλου λάρβας της *D.melanogaster*, όπου φθορίζει η χρωστική GFP



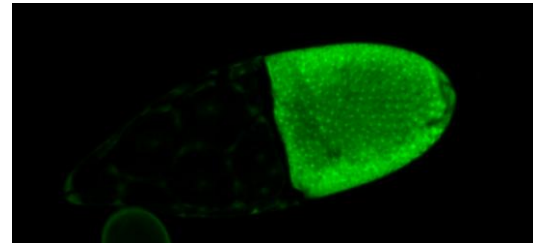
Εικόνα 3.6: Απεικόνιση του εγκεφάλου ενήλικου ατόμου της *D.melanogaster*, όπου φθορίζει η χρωστική GFP

3.1.6 Έλεγχος Driver κινητικών νευρώνων



Εικόνα 3.7: Απεικόνιση ενήλικου εντόμου της *D.melanogaster*, όπου φθορίζει η χρωστική GFP στο νευρικό σύστημα

3.1.7 Έλεγχος Driver τροφοκυττάρων

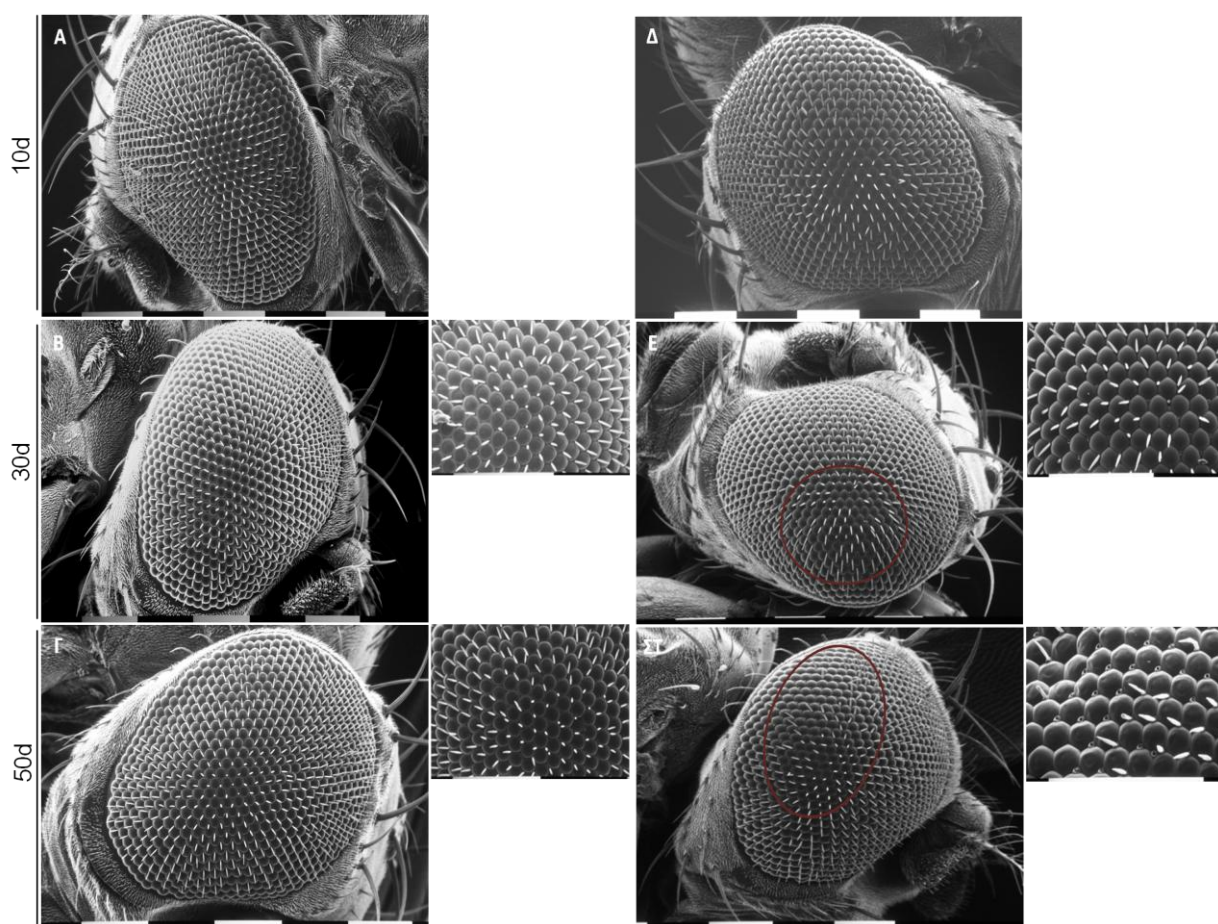


Εικόνα 3.8: Απεικόνιση των τροφοκυττάρων του ωοθυλακίου της *D.melanogaster*, όπου φθορίζει η χρωστική GFP

3.2 Επίδραση της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2 στους οφθαλμούς του δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster*

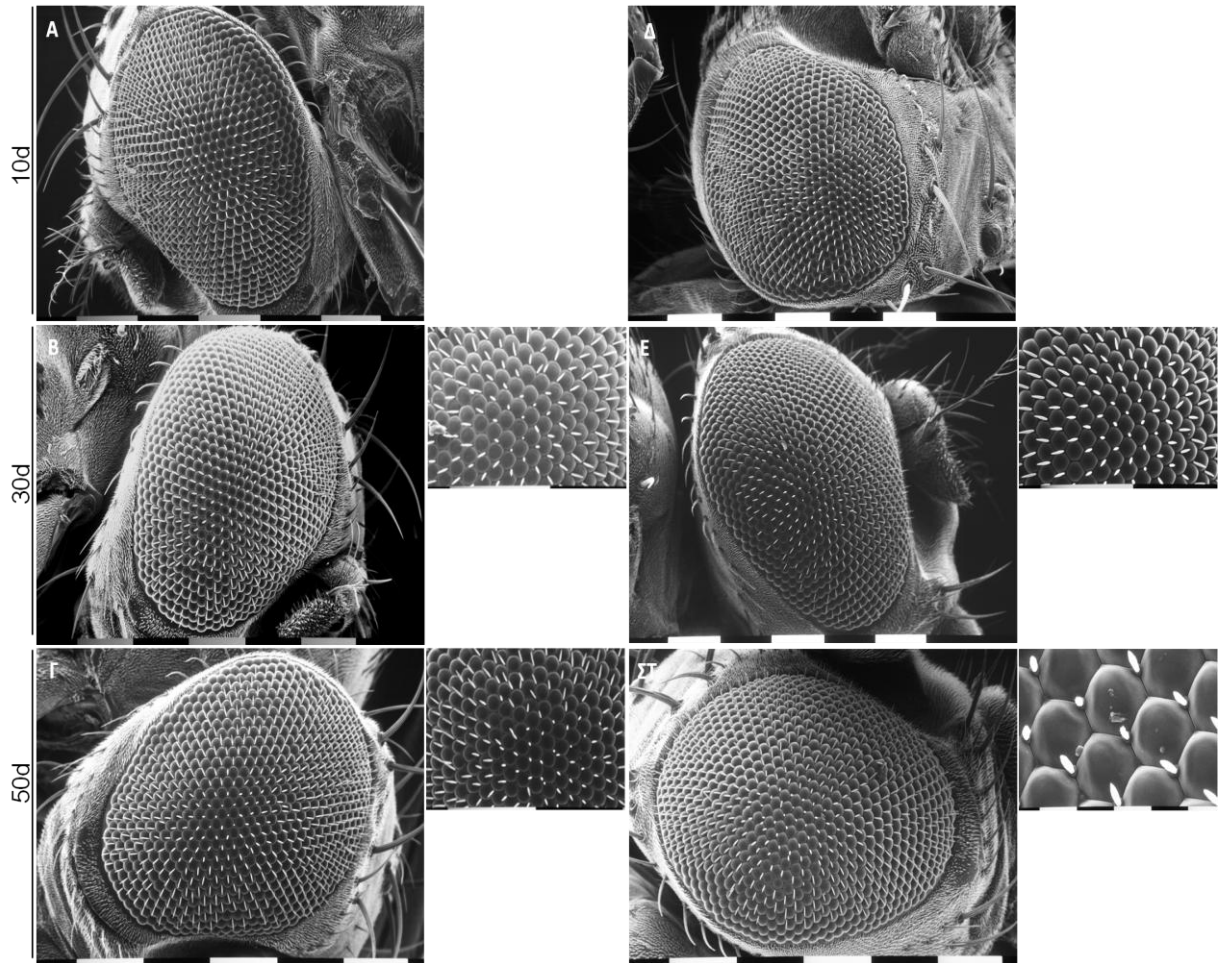
Σε έντομα που είχαμε αποσιωπήσει είτε την dTOR είτε τις πρωτεΐνες dTSC1 και dTSC2, κάναμε παρατήρηση των οφθαλμών σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Η παρατήρηση έγινε σε ηλικία 10, 30, & 50 ημερών. Ταυτόχρονα έγινε και παρατήρηση οφθαλμών από έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Στις περιπτώσεις που υπήρξε φαινότυπος έγινε παρατήρηση των οφθαλμών και σε άλλες ηλικίες έτσι ώστε να εντοπισθεί η έναρξη του φαινομένου. Οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 103417 x 1104, x 1104, 54034 x 1104 και 1104 x wt, όπου 1104: driver ματιού / 33951: dTOR RNAi / 103417: dTSC2 RNAi / 54034: dTSC1 RNAi

3.2.1 Παρατήρηση οφθαλμών ύστερα από αποσιώπηση του dTSC1 γονιδίου



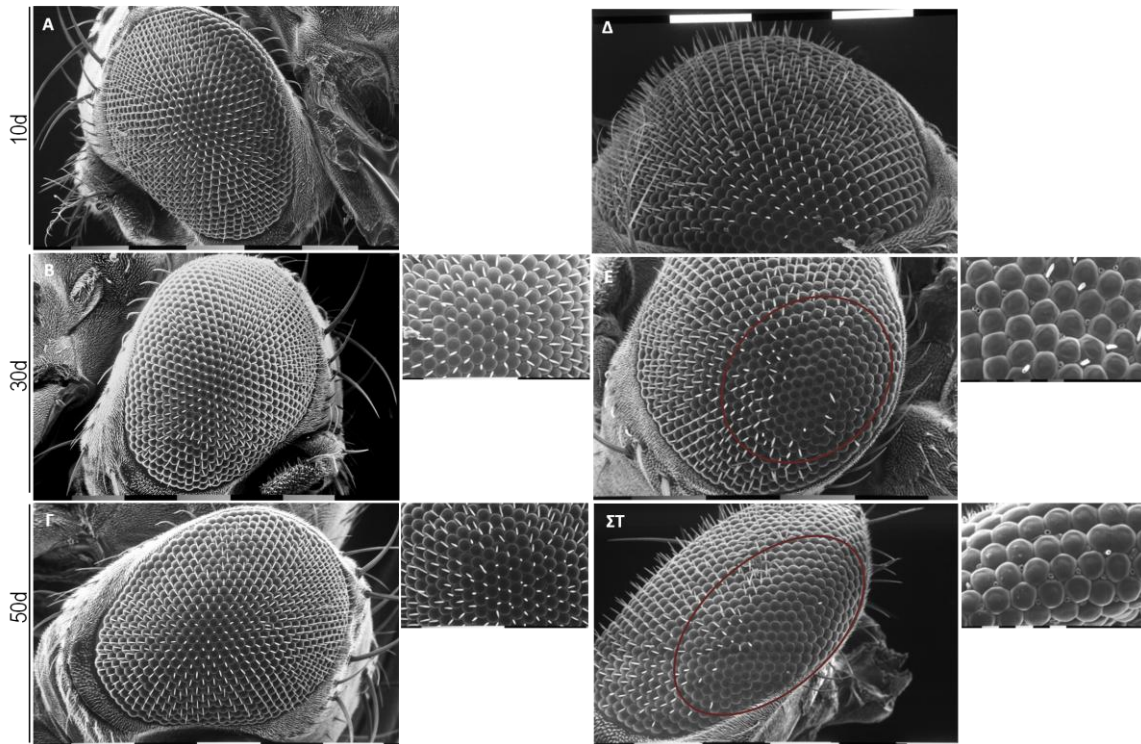
Εικόνα 3.9: (Α-Γ) Εικόνες οφθαλμών εντόμων διασταύρωσης ελέγχου κατά τη διάρκεια της γήρανσης. (Δ-Ζ) Εικόνες οφθαλμών από άτομα θυγατρικής γενιάς της υπό μελέτη διασταύρωσης σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, 10, 30 και 50 ημερών. Με σύγκριση των εικόνων, προκύπτει ότι η αποσιώπηση της dTSC1 πρωτεΐνης προκαλεί ήπιο παθολογικό φαινόμενο από την ηλικία των 30 ημερών, με μικρή απώλεια βλεφαρίδων. Το φαινόμενο εντείνεται στις 50 ημέρες, όπου η απώλεια βλεφαρίδων αφορά μεγαλύτερο τμήμα του οφθαλμού. Ράβδοι μεγέθυνσης: 100μm

3.2.2 Παρατήρηση οφθαλμών ύστερα από αποσιώπηση του dTOR γονιδίου



Εικόνα 3.10: (Α-Γ) Εικόνες οφθαλμών εντόμων διασταύρωσης ελέγχου κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Δ-ΣΤ) Εικόνες οφθαλμών από άτομα θυγατρικής γενιάς της υπό μελέτη διασταύρωσης σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, 10, 30 και 50 ημερών. Με σύγκριση των εικόνων, προκύπτει ότι η αποσιώπηση της dTOR πρωτεΐνης δεν φαίνεται να επιφέρει αλλοιώσεις στην μορφολογία του οφθαλμού, ο οποίος εμφανίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της γήρανσης φυσιολογικός. Ράβδοι μεγέθυνσης: 100μm

3.2.3 Παρατήρηση οφθαλμών ύστερα από αποσιώπηση του dTSC2 γονιδίου

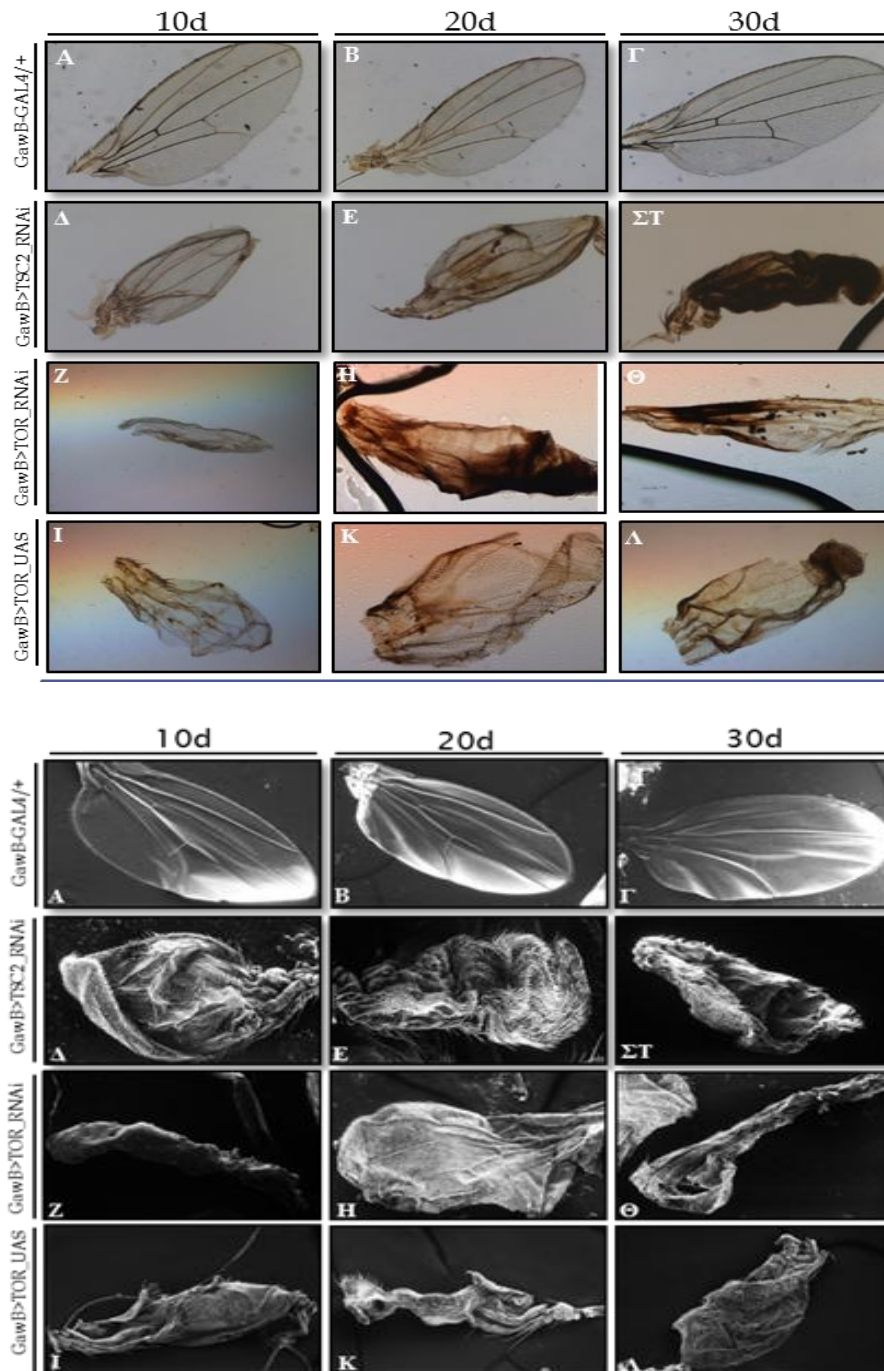


Εικόνα 3.11: Εικόνες οφθαλμών 10, 30 και 50 ημερών εντόμων διασταύρωσης ελέγχου (Α-Γ) και (Δ-ΣΤ) από άτομα θυγατρικής γενιάς της υπό μελέτη διασταύρωσης σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Με σύγκριση των εικόνων, προκύπτει ότι η αποσιώπηση της dTSC2 πρωτεΐνης προκαλεί έντονο παθολογικό φαινόμενο από την ηλικία των 15 ημερών, με απώλεια βλεφαρίδων σε σημαντικό τμήμα του οφθαλμού. Το φαινόμενο κατά τη διάρκεια της γήρανσης γίνεται ακόμη εντονότερο, όπου η απώλεια και το σπάσιμο των βλεφαρίδων καταλαμβάνει πολύ μεγάλο τμήμα του οφθαλμού. Επίσης, παρατηρείται συσσωμάτωση των ομμάτιδων. Αντίθετα τα άτομα διασταύρωσης ελέγχου, εμφανίζουν φυσιολογικό φαινόμενο και σε μεγάλες ηλικίες. Ράβδοι μεγέθυνσης: 100μm

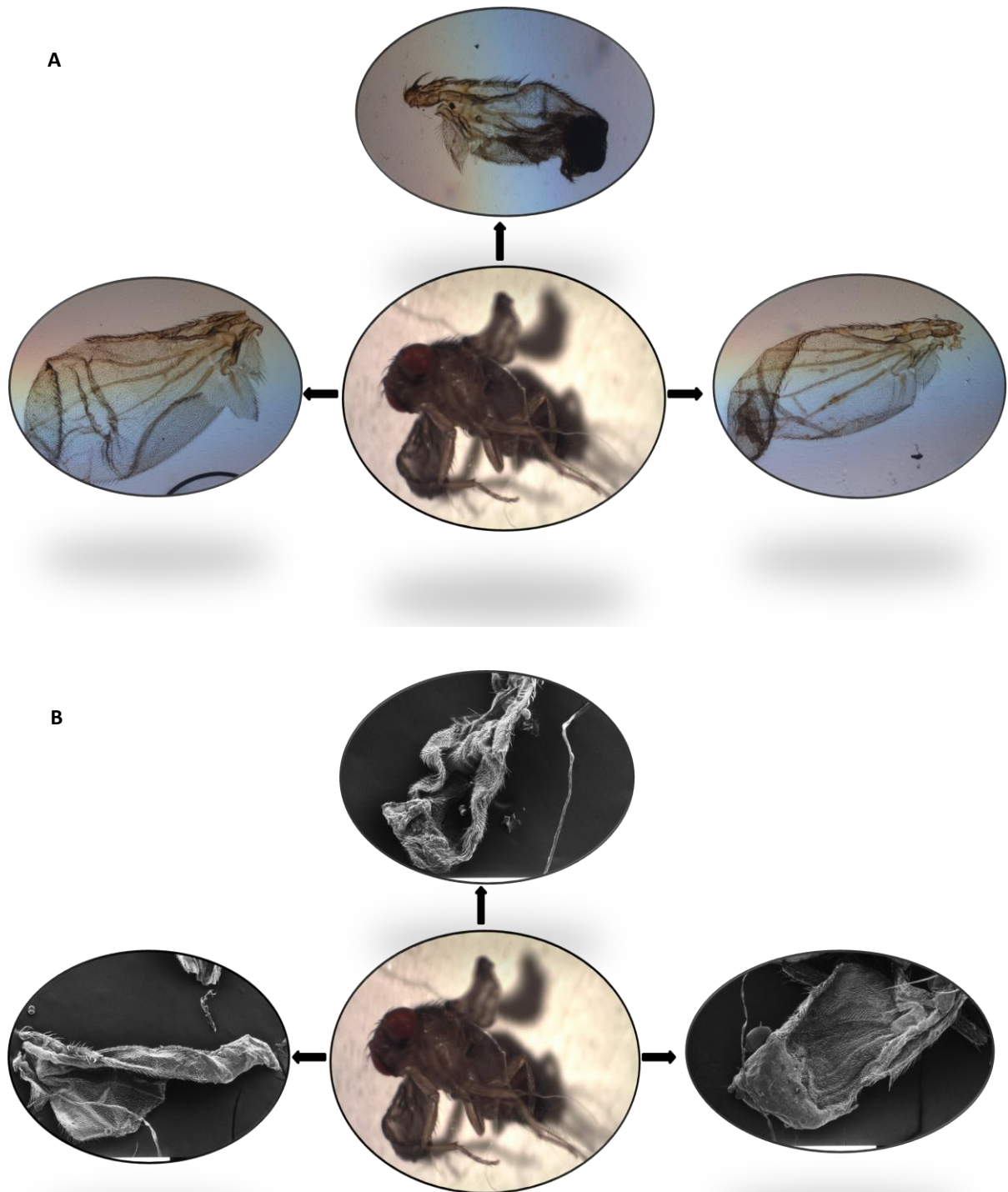
3.3 Επίδραση της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2, και της υπερέκφρασης του dTOR στα φτερά της *Drosophila melanogaster*

Σε έντομα που είχε πραγματοποιηθεί αποσιώπηση των πρωτεϊνών dTOR, dTSC1, dTSC2 είτε υπερέκφρασαμε την dTOR κάναμε παρατήρηση της εξωτερικής μορφολογίας των φτερών σε φωτονικό μικροσκόπιο και σε μικροσκόπιο σάρωσης. Η παρατήρηση έγινε σε έντομα ηλικίας 10, 20 & 30 ημερών. Παράλληλα παρατηρήθηκαν και φτερά εντόμων διασταύρωσης ελέγχου. Οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 33951 x 8860, 33951 x 8761, 103417 x 8860, 103417 x 8761, 54034 x 8860, 54034 x 8761, 7012 x 8860, 7012 x 8761, όπου 33951: dTOR RNAi / 7012: dTOR υπερέκφραση / 103417: dTSC2 RNAi / 54034: dTSC1 RNAi / 8860: driver φτερού / 8761: driver φτερού και αλήτρα.

3.3.1 Παρατήρηση της μορφολογίας των φτερών ύστερα από αποσιώπηση των dTOR dTSC1 και dTSC2 γονιδίων και μετά από υπερέκφραση του dTOR, με driver φτερού

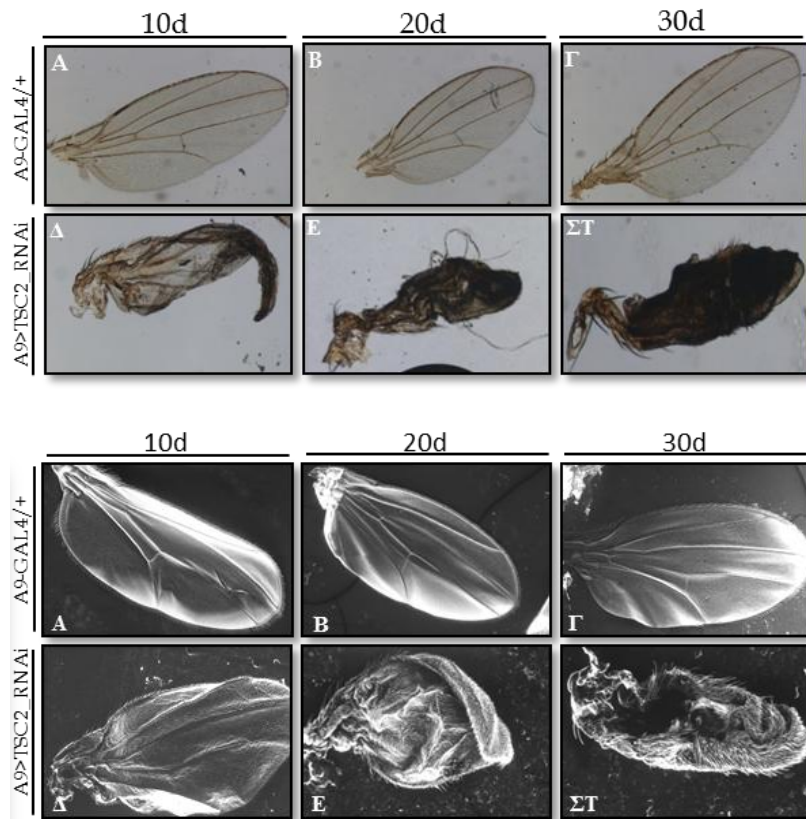


Εικόνα 3.12: Απεικόνιση φτερών σε φωτονικό μικροσκόπιο (επάνω) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (κάτω). (Α-Γ) Εικόνες φτερών εντόμων διασταύρωσης ελέγχου κατά τη διάρκεια της γήρανσης. (Δ-ΣΤ) Απεικόνιση φτερών μετά από αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTSC2. Παρατηρείται αλλοίωση της φυσιολογικής μορφολογίας των φτερών, τα οποία εμφανίζονται με έντονη αναδίπλωση και παραμόρφωση. (Ζ-Θ) Απεικόνιση φτερών ύστερα από αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTOR και (Ι-Λ) ύστερα από υπερέκφρασή της. Και στις δύο περιπτώσεις τα φτερά εμφανίζονται σε μεγάλο βαθμό δυσμορφικά συγκριτικά με αυτά της διασταύρωσης ελέγχου

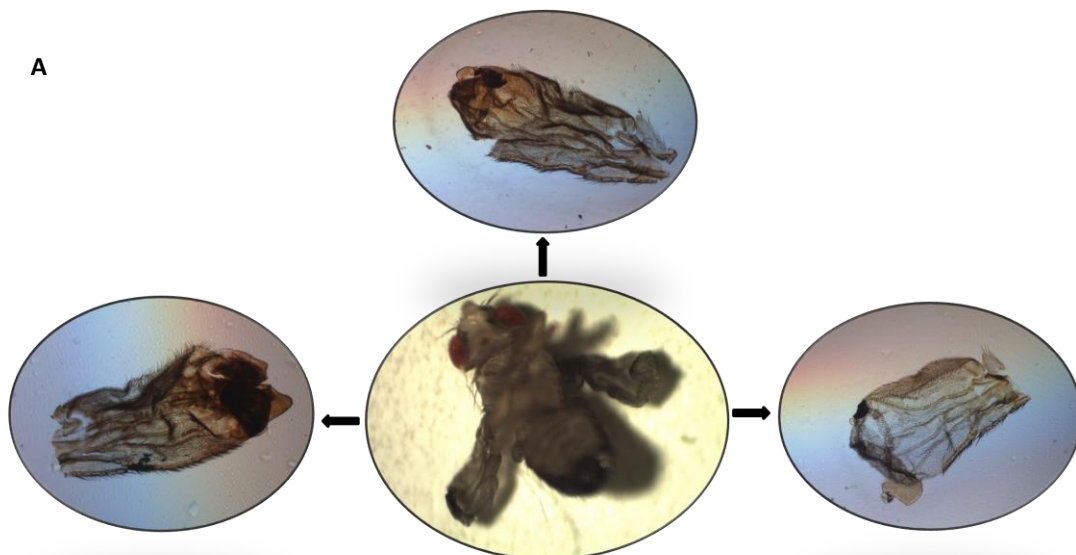


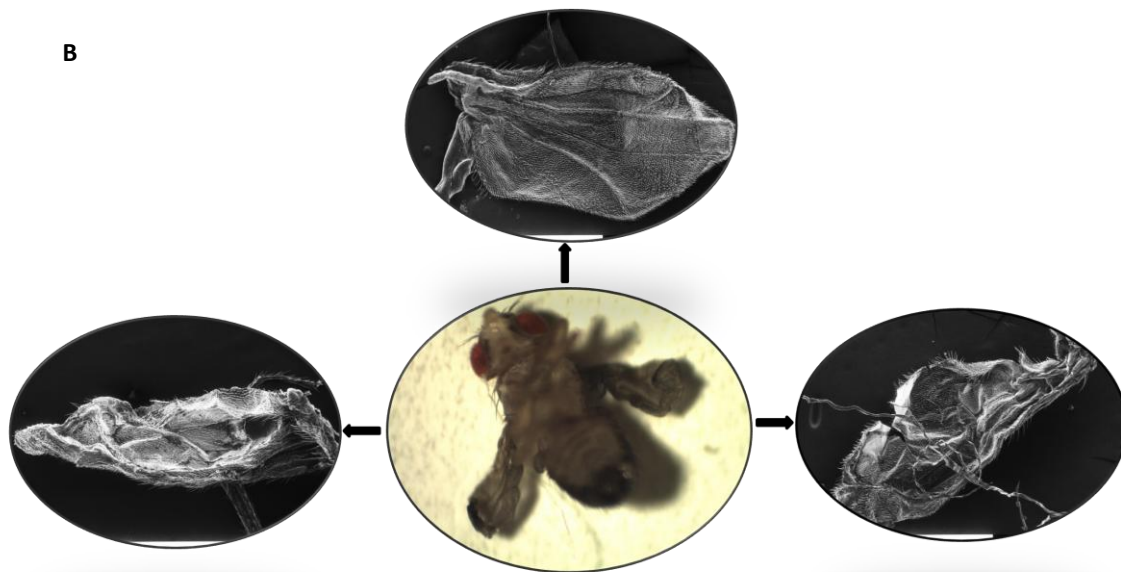
Εικόνα 3.13: Απεικόνιση φτερών σε φωτονικό μικροσκόπιο (**A**) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (**B**). Η αποσιώπηση της dTSC1 πρωτεΐνης προκάλεσε έντονες αλλοιώσεις στα φτερά, τα οποία εμφανίζονται παραμορφωμένα, διπλωμένα και συνεχώς παρατεταμένα, με αποτέλεσμα τα έντομα να προσκολλώνται στην τροφή. Αυτό το γεγονός επηρέασε σημαντικά την επιβίωσή τους, και συνεπώς δεν μπόρεσε να γίνει μελέτη τους κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Στο κέντρο της εικόνας παρατηρούμε ένα ενήλικο έντομο

3.3.2 Παρατήρηση της μορφολογίας των φτερών ύστερα από αποσιώπηση των dTOR dTSC1 και dTSC2 γονιδίων με driver φτερού και αλτήρα

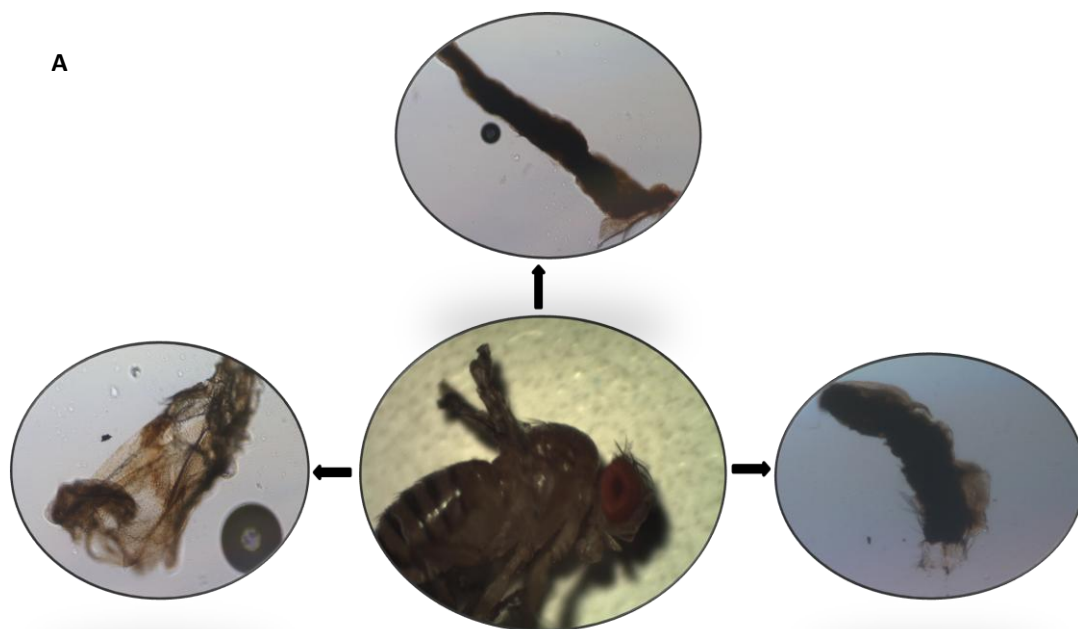


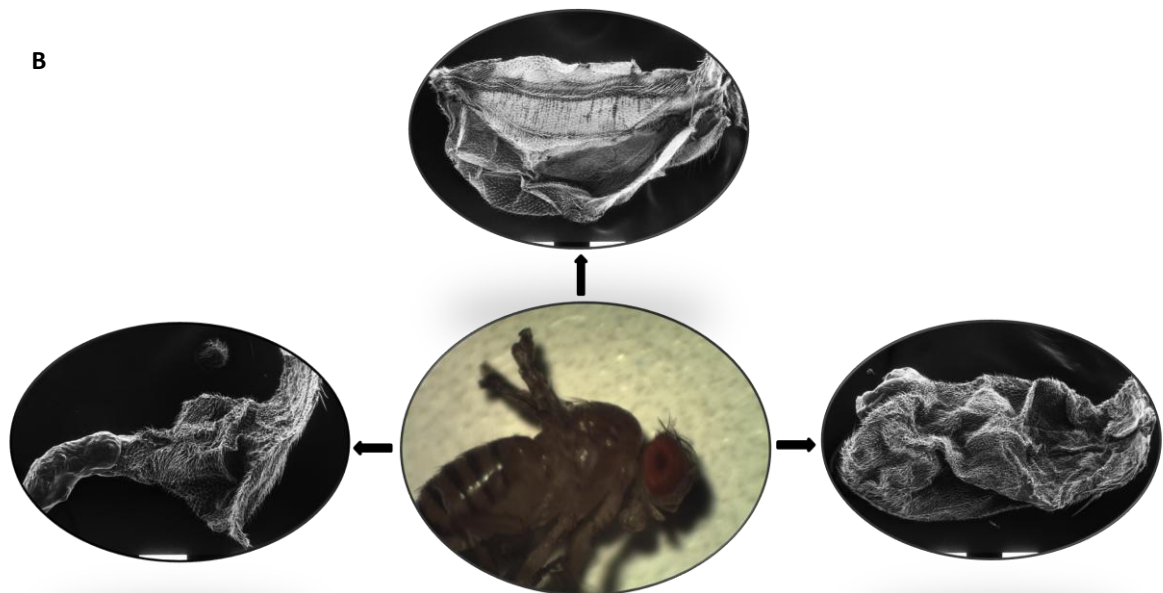
Εικόνα 3.14: Απεικόνιση φτερών σε φωτονικό μικροσκόπιο (επάνω) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (κάτω). (Α-Γ) Εικόνες φτερών εντόμων διασταύρωσης ελέγχου κατά τη διάρκεια της γήρανσης. (Δ-ΣΤ) Απεικόνιση φτερών με αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTSC2. Τα φτερά εμφανίζουν ποικίλους φαινοτύπους, με έντονες δυσμορφίες και αλλοιώσεις





Εικόνα 3.15: Απεικόνιση φτερών σε φωτονικό μικροσκόπιο (A) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (B). Απεικόνιση φτερών μετά απο αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTSC1. Τα φτερά απεικονίζονται έντονα δυσμορφικά. Τα έντομα παρουσίαζαν δυσκολία στην πτήση και παρέμεναν στην τροφή, στην οποία και προσκολλούνταν και πέθαιναν. Αυτό το γεγονός επηρέασε την βιωσιμότητά τους, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να μελετηθούν τα φτερά κατά τη διάρκεια της γήρανσης



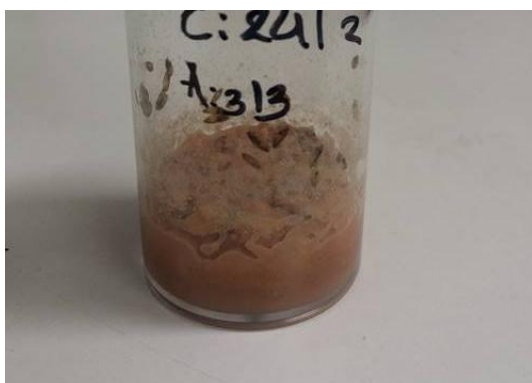


Εικόνα 3.16: Απεικόνιση φτερών σε φωτονικό μικροσκόπιο (A) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (B). Απεικόνιση φτερών μετά απο αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTOR. Η παραμόρφωση των φτερών και σε αυτήν την περίπτωση είναι έντονη. Παρατηρείται ποικιλία φαιντύπων. Τα έντομα παρουσίαζαν δυσκολία στην πήψη και στην βιάδιση λόγω ότι επηρεάζεται και ο αλτήρας, και προσκολλούνταν στην τροφή. Επηρεάστηκε η επιβίωσή τους, και κατέστη αδύνατη η μελέτη τους σε μεγαλύτερες ηλικίες

3.4 Μελέτης της επίδρασης της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2 στα ωοθυλάκια της *Drosophila melanogaster*



Εικόνα 3.17: Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTOR στα ωοθυλάκια είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης εντόμων καθώς ο κύκλος ζωής τους σταματούσε στο 2^ο στάδιο της λάρβας



Εικόνα 3.18: Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTSC1 στα ωοθυλάκια είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης εντόμων. Ο κύκλος ζωής σταματούσε στο 2^ο στάδιο της πούπας, όπως φαίνεται και στην εικόνα, καθώς τα άτομα δεν εκδύονταν

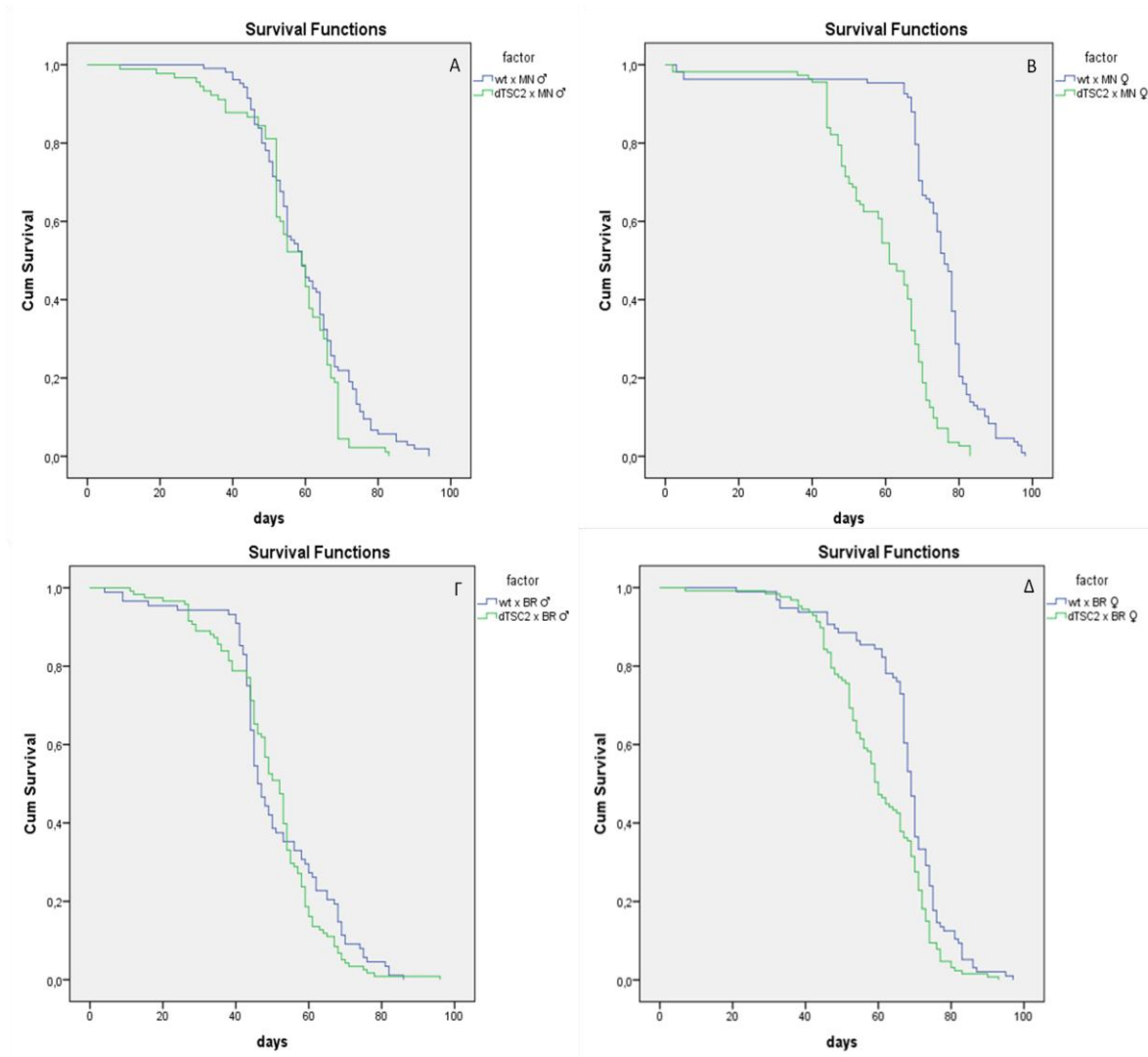


Εικόνα 3.19: Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTSC2 στα ωοθυλάκια είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης εντόμων. Ο κύκλος ζωής σταματούσε στο 2^ο στάδιο της λάρβας

3.5 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης των γονιδίων dTOR, dTSC1 και dTSC2 στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*, με τη δοκιμασία της βιωσιμότητας

Σε άτομα που είχαμε αποσιωπήσει την dTOR είτε την dTSC2 πρωτεΐνη στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα, πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία της βιωσιμότητας. Μέσω αυτής της δοκιμασίας μελετήσαμε πώς η μειορρύθμιση των πρωτεϊνών επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των εντόμων. Αρσενικά και θηλυκά άτομα φυλάσσονταν σε διαφορετικά μπουκαλάκια (20 άτομα / δείγμα) και μετρούσαμε σε καθημερινή βάση πόσα άτομα πέθαιναν. Στο τέλος έγινε στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος spss. Πραγματοποιήθηκαν οι διασταυρώσεις 33951 x 8760, 33951 x 8816, 103417 x 8760, 13417 x 8816, 54034 x 8816 όπου 33951: dTOR RNAi / 103417: dTSC2 RNAi / 54034: dTSC1 RNAi / 8760: driver νευρικού συστήματος / 8816: driver κινητικών νευρώνων

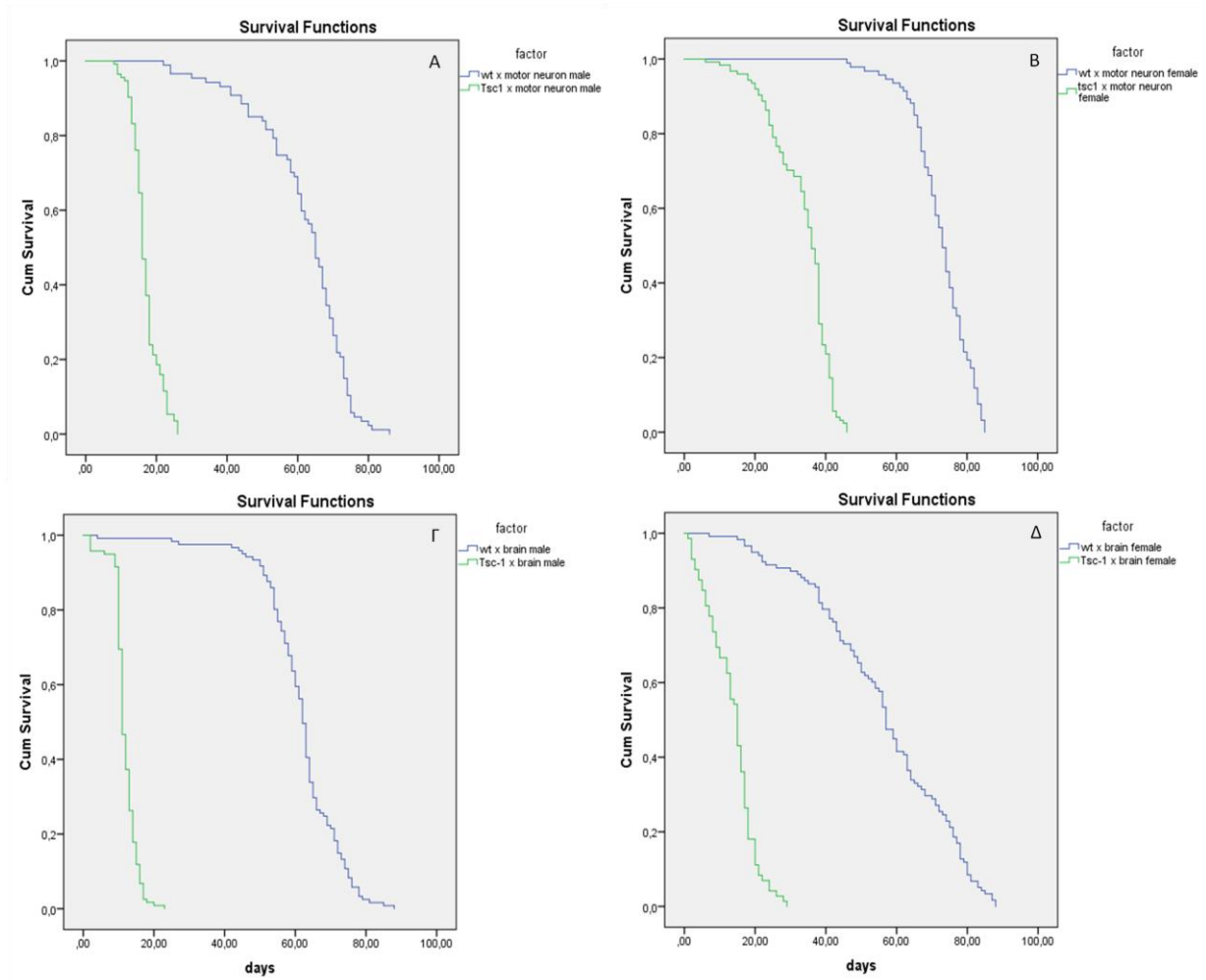
3.5.1 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου dTSC2 στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*, με τη δοκιμασία της βιωσιμότητας



Εικόνα 3.20: Βιωσιμότητα εντόμων με μειορρυθμισμένη την dTSC2 πρωτεΐνη. **(A-B)** Αρσενικά- θηλυκά έντομα με έλλειψη της dTSC2 πρωτεΐνης στους κινητικούς νευρώνες (Motor Neurons). **(Γ-Δ)** Αρσενικά - θηλυκά έντομα με έλλειψη της dTSC2 πρωτεΐνης στο νευρικό σύστημα (Brain)

Τα διαγράμματα A και B, αφορούν γραφικές παραστάσεις εντόμων, στα οποία μειορρυθμίσαμε την dTSC2 πρωτεΐνη στους κινητικούς νευρώνες. Το A διάγραμμα, είναι η καμπύλη βιωσιμότητας των αρσενικών εντόμων, ενώ το B των θηλυκών. Αρσενικά έντομα με έλλειψη της dTSC2 πρωτεΐνης στους κινητικούς νευρώνες παρουσιάζουν ομοιότητα στην επιβίωση με άτομα διασταύρωσης ελέγχου, εν' αντιθέσει με τα θηλυκά έντομα (διάγραμμα B) που εμφανίζουν μειωμένη επιβίωση. Τα διαγράμματα Γ και Δ, απεικονίζουν τις βιωσιμότητες αρσενικών και θηλυκών εντόμων αντίστοιχα, με μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης στο νευρικό σύστημα. Τα αρσενικά άτομα και εδώ δεν εμφανίζουν διαφορές στην επιβίωση από άτομα διασταύρωσης ελέγχου, ενώ τα θηλυκά έχουν χαμηλότερη βιωσιμότητα. Τα αποτελέσματα για τα θηλυκά έντομα ήταν στατιστικά σημαντικά με $p < 0,05$.

3.5.2 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης του γονιδίου dTSC1 στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*, με τη δοκιμασία της βιωσιμότητας



Εικόνα 3.21: Βιωσιμότητα εντόμων με μειορρυθμισμένη την dTSC1 πρωτεΐνη. (A-B) Αρσενικά - θηλυκά έντομα με έλλειψη της dTSC1 πρωτεΐνης στους κινητικούς νευρώνες (Motor Neurons). (Γ-Δ) Αρσενικά - θηλυκά έντομα με έλλειψη της dTSC1 πρωτεΐνης στο νευρικό σύστημα (Brain)

Τα διαγράμματα A και B, αφορούν γραφικές παραστάσεις εντόμων, στα οποία πραγματοποιήσαμε μειορρύθμιση της dTSC1 πρωτεΐνης στους κινητικούς νευρώνες. Το A διάγραμμα, είναι η καμπύλη βιωσιμότητας των αρσενικών εντόμων, ενώ το B των θηλυκών. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά έντομα, με έλλειψη της dTSC1 πρωτεΐνης στους κινητικούς νευρώνες, παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη επιβίωση σε σύγκριση με άτομα διασταύρωσης ελέγχου, με τα αρσενικά να έχουν πιο ισχυρό φαινότυπο. Τα διαγράμματα Γ και Δ, απεικονίζουν τις βιωσιμότητες αρσενικών και θηλυκών εντόμων αντίστοιχα, με μειορρύθμιση της dTSC1 πρωτεΐνης στο νευρικό σύστημα. Σε αυτή την περίπτωση ο φαινότυπος είναι ακόμη πιο έντονος καθώς τα έντομα αρχίζουν να πεθαίνουν από πολύ νεαρή ηλικία και η διάρκεια ζωής τους δεν ξεπερνά τις 30 ημέρες. Όλα τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά με $p < 0,05$.

3.5.3 Επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου dTOR στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*

Η αποσιώπηση του *dTOR* γονιδίου στο νευρικό σύστημα και στους κινητικούς νευρώνες προκάλεσε έντονο παθολογικό φαινόμενο. Αρχικά, η μειορρύθμιση στο νευρικό σύστημα, είχε ως αποτέλεσμα τα έντομα είτε να αδυνατούν να πραγματοποιήσουν έκδυση, ή αμέσως μετά την έκδυση πεθαίνουν. Παρομοίως, η μειορρύθμιση του γονιδίου στους κινητικούς νευρώνες είχε ως αποτέλεσμα, τα άτομα λίγο μετά την έκδυσή τους να εμφανίζονται «παράλυτα», με αποτέλεσμα να προσκολλώνται στην τροφή και να πεθαίνουν. Συνεπώς κατέστη αδύνατον η συλλογή απόμωων για περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 3.22-A: Έντομο με μειορρύθμιση του *dTOR* γονιδίου στο νευρικό σύστημα. Το έντομο δεν δύναται να πραγματοποιήσει έκδυση και πεθαίνει



Εικόνα 3.22-B: Έντομο με μειορρύθμιση του *dTOR* γονιδίου στους κινητικούς νευρώνες. Εμφανίζεται «παράλυτο». Τα φτερά δεν μπορούν να πάρουν την τελική τους μορφή. Το έντομο πεθαίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την έκδυση

3.6 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης των γονιδίων *dTOR*, *dTSC1* και *dTSC2* στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*, με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing)

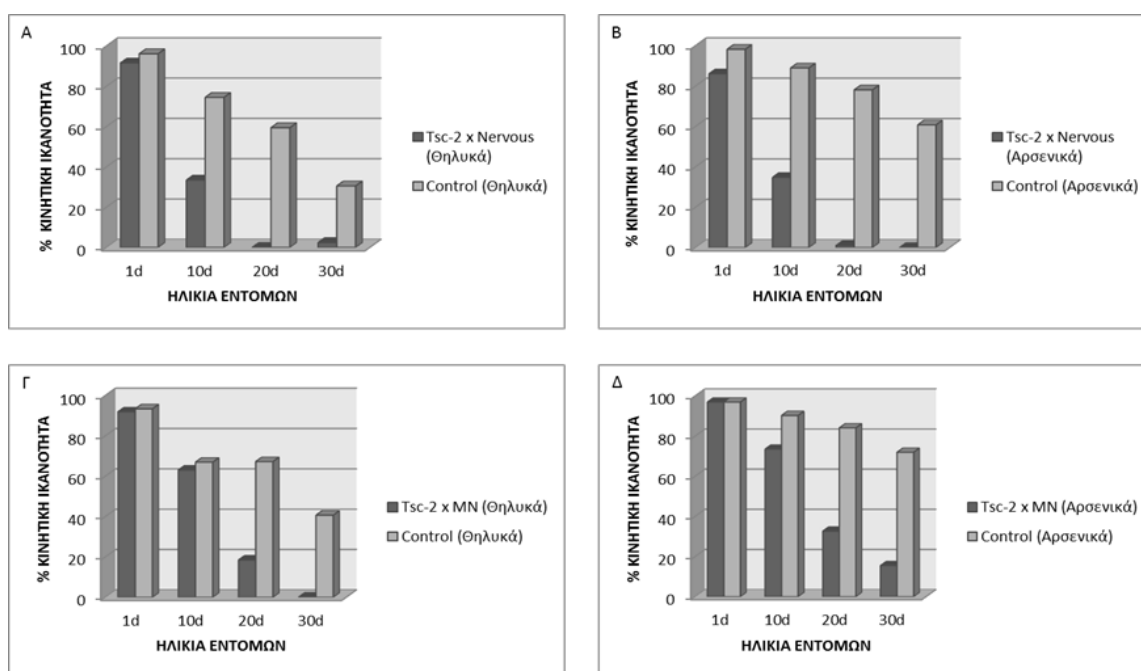
Σε άτομα που είχαμε αποσιωπήσει την *dTOR*, την *dTSC1* είτε την *dTSC2* πρωτεΐνη στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα, πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία της αναρρίχησης. Με αυτή τη

δοκιμασία μελετήσαμε πώς η μειορρύθμιση των πρωτεϊνών επηρεάζει την κινητική ικανότητα των εντόμων. Αρσενικά και θηλυκά έντομα φυλάσσονταν μαζί και ανά 10 ημέρες κάναμε τη δοκιμασία της αναρρίχησης. Πριν από κάθε δοκιμασία ξεχωρίζαμε αρσενικά από θηλυκά άτομα. Τα έντομα εισάγονταν σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο και εντός 20 δευτερολέπτων μετρούσαμε πόσα άτομα έχουν περάσει ένα συγκεκριμένο όριο. Η κινητική ικανότητα των εντόμων μελετήθηκε σε ηλικία 1, 10, 20 & 30 ημερών.

3.6.1 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTOR, στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*

Η αποσιώπηση του dTOR γονιδίου στο νευρικό σύστημα και στους κινητικούς νευρώνες προκάλεσε έντονο παθολογικό φαινόμενο. Αρχικά, η μειορρύθμιση στο νευρικό σύστημα, είχε ως αποτέλεσμα τα έντομα είτε να αδυνατούν να πραγματοποιήσουν έκδυση, ή αμέσως μετά την έκδυση να πεθαίνουν. Παρομοίως, η μειορρύθμιση του γονιδίου στους κινητικούς νευρώνες είχε ως αποτέλεσμα, τα άτομα λίγο μετά την έκδυσή τους να εμφανίζονται παράλυτα, με αποτέλεσμα να προσκολλώνται στην τροφή και να πεθαίνουν. Συνεπώς κατέστη αδύνατη η συλλογή ατόμων για μελέτη της αναρριχητικής τους ικανότητας.

3.6.2 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στους κινητικούς νευρώνες και στο νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*

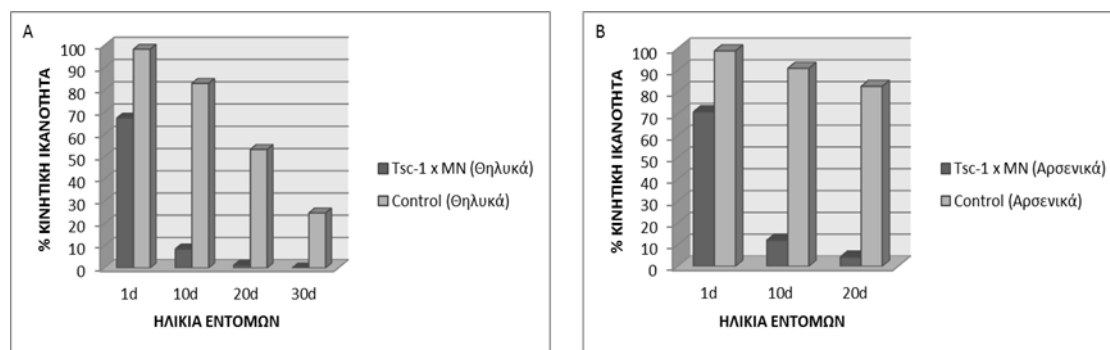


Εικόνα 3.23: Παρατήρηση της κινητικής ικανότητας των εντόμων μέσω της δοκιμασίας της αναρρίχησης, κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Στα διαγράμματα (A-B), παρατηρούμε άτομα με απουσία της dTSC2 πρωτεΐνης, στο νευρικό σύστημα (Nervous). Στα διαγράμματα (Γ-Δ), παρατηρούμε άτομα με απουσία της dTSC2 στους κινητικούς νευρώνες (Motor Neuron – MN)

Σε όλα τα διαγράμματα, με γκρι ράβδο αναπαριστώνται άτομα διασταύρωσης ελέγχου, ενώ με μαύρη ράβδο αναπαριστώνται άτομα στα οποία έχουμε μειορρυθμίσει την dTSC2 πρωτεΐνη, είτε στο νευρικό σύστημα (διαγράμματα A-B) είτε στους κινητικούς νευρώνες (διαγράμματα Γ-Δ). Παρατηρούμε στα διαγράμματα A και B, ότι η απουσία της dTSC2 πρωτεΐνης στο νευρικό σύστημα, προκαλεί έντονο παθολογικό φαινόμενο και στα δύο φύλα. Η κινητική ικανότητα των εντόμων εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη από την νεαρή ηλικία των δέκα ημερών. Σε μεγαλύτερες ηλικίες (20 & 30 ημέρες), τα έντομα

παρουσιάζουν ακόμη πιο έντονο κινητικό πρόβλημα. Στα διαγράμματα Γ και Δ αναπαριστώνται θηλυκά και αρσενικά άτομα αντίστοιχα, με απουσία της dTSC2 πρωτεΐνης στους κινητικούς νευρώνες. Και σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζεται παθολογικός φαινότυπος, αλλά η έναρξη του παρατηρείται από τις 20 ημέρες. Κινητική δυσλειτουργία παρατηρείται και στα δύο φύλα, με πιο έντονο φαινότυπο να παρουσιάζουν τα θηλυκά.

3.6.3 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC1, στους κινητικούς νευρώνες της *Drosophila melanogaster*



Εικόνα 3.24: Παρατήρηση της κινητικής ικανότητας των εντόμων μέσω της δοκιμασίας της αναρρίχησης, κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Στα διαγράμματα (A-B), παρατηρούμε άτομα με απουσία της dTSC1 πρωτεΐνης στους κινητικούς νευρώνες (Motor Neuron – MN)

Στα διαγράμματα A (θηλυκά) και B (αρσενικά), με γκρι ράβδο αναπαριστώνται άτομα διασταύρωσης ελέγχου, ενώ με μαύρη ράβδο αναπαριστώνται άτομα στα οποία έχουμε μειορρυθμίσει την dTSC1 πρωτεΐνη στους κινητικούς νευρώνες. Ο φαινότυπος είναι ιδιαίτερα ισχυρός, καθότι και στα δύο φύλα, η κινητική ικανότητα των εντόμων εμφανίζεται μειωμένη από την πρώτη κιόλας ημέρα. Όπως παρατηρούμε στα διαγράμματα, τα έντομα από τις 10 ημέρες και ύστερα εμφανίζουν δραματική πτώση στην αναρριχητική τους ικανότητα. Στα αρσενικά έντομα, η πειραματική διαδικασία σταματά στις 20 ημέρες, καθώς όπως προαναφέρθηκε στις βιωσιμότητες, η διάρκεια ζωής τους ήταν σύντομη, και δεν μπορούσαμε να συλλέξουμε άτομα για τις 30 ημέρες.

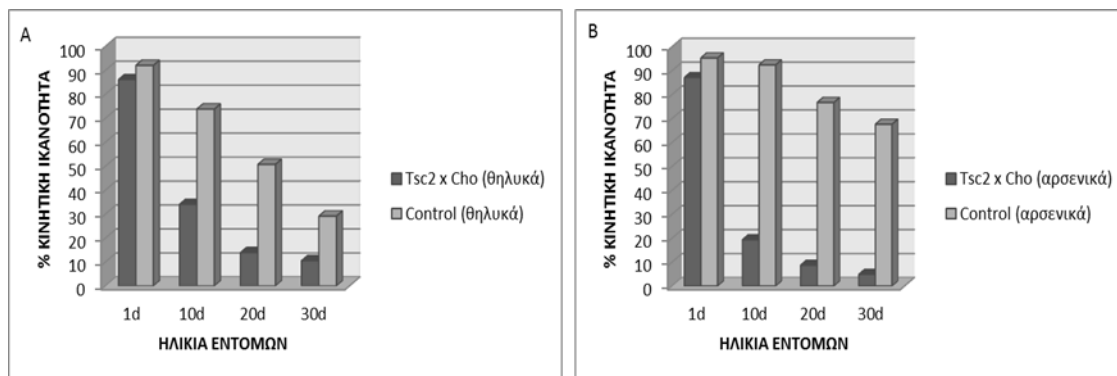
3.7 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στους χολινεργικούς νευρώνες της *Drosophila melanogaster*, με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing)

Χολινεργικοί ονομάζονται οι νευρώνες που χρησιμοποιούν ως νευροδιαβιβαστή την ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, ACh) και χαρακτηρίζονται από την παρουσία τριών πρωτεϊνών:

- ✓ Του συνθετικού ενζύμου της ακετυλοχολίνης, ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (choline acetyl transferase, ChAT)
- ✓ Του ενζύμου αποικοδόμησής της, ακετυλοχολινεστεράση (acetylcholinesterase, AchE)
- ✓ Του κυστικού μεταφορέα της (vesicular acetylcholine transporter, VAChT)

Φυλογενετικά, ο νευροδιαβιβαστής αυτός είναι παρόν σε όλα τα μέλη του ζωικού βασιλείου. Συντίθεται από τη χολίνη (μια ουσία παρούσα στην τροφή, που προσλαμβάνεται από τα χολινεργικά κύτταρα μέσω ενός νάτριο-εξαρτώμενου συστήματος μεταφοράς) και το ακέτυλο-συνένζυμο A. Η σύνθεση της ακετυλοχολίνης λαμβάνει χώρα στις τελικές νευραξονικές απολήξεις των χολινεργικών νευρώνων και καταλύεται από το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Ενεργοποίηση του νευρώνα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης στο συναπτικό χάσμα, και την πρόσδεσή της στους προ- και μετασυναπτικούς υποδοχείς της. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η χολινεργική νευροδιαβίβαση διαμεσολαβείται από δύο κατηγορίες υποδοχέων: τους μουςκαρινικούς και τους νευρωνικούς νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, οι οποίοι διακρίνονται μεταξύ τους με βάση

την ικανότητά τους να προσδένουν τα αλκαλοειδή μουσκαρίνη και νικοτίνη αντίστοιχα. Η νευροδιαβίβαση τερματίζεται με τη διάσπαση της ακετυλοχολίνης σε οξικό οξύ και χολίνη, που καταλύεται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση. Η χολίνη που παράγεται προσλαμβάνεται στη συνέχεια από το προσυναπτικό κύτταρο για τη σύνθεση εκ νέου ακετυλοχολίνης. Η ακετυλοχολίνη (ACh) αποτελεί έναν σημαντικό νευροδιαβιβαστή στη μύγα. Στην *Drosophila melanogaster*, οι υποδοχείς ακετυλοχολίνης εμπίπτουν στις ίδιες δύο κατηγορίες υποδοχέων που υπάρχουν και στα θηλαστικά [40].



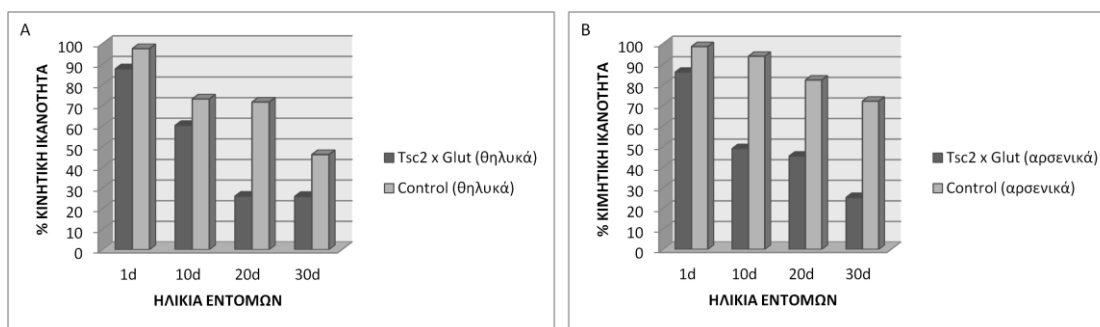
Εικόνα 3.25: Παρατήρηση της κινητικής ικανότητας των εντόμων μέσω της δοκιμασίας της αναρρίχησης, κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Στα διαγράμματα (A-B), παρατηρούμε άτομα με απουσία της dTSC2 πρωτεΐνης στους χολινεργικούς νευρώνες (**Cholinergic Neurons – Cho**)

Από τα διαγράμματα A και B, γίνεται εμφανές ότι η μειορρύθμιση της πρωτεΐνης dTSC2 στους χολινεργικούς νευρώνες προκάλεσε παθολογικό φαινόμενο. Τόσο τα θηλυκά όσο και τα αρσενικά έντομα, από την ηλικία των δέκα ημερών, παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη αναρριχητική ικανότητα σε σύγκριση με τα έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Η πτωτική τάση της κινητικής ικανότητας των εντόμων συνεχίστηκε στις ηλικίες των 20 και 30 ημερών.

3.8 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στους γλουταμινεργικούς νευρώνες της *Drosophila melanogaster*, με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing)

Το γλουταμινικό οξύ είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα των σπονδυλωτών. Οι γλουταμινεργικοί νευρώνες διανέμονται ευρέως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, κυρίως στον πρόσθιο εγκέφαλο, όπου οι περισσότερες από τις φλοιϊκές προβολές περιέχουν γλουταμινικό. Το γλουταμινικό χρησιμεύει ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του GABA στους ανασταλτικούς GABAεργικούς νευρώνες. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη γλουταμινική αποκαρβοξυλάση (GAD). Το γλουταμινικό δρα στα μετασυναπτικά κύτταρα σε τρεις οικογένειες ιονοτροπικών υποδοχέων, τα ονόματα των οποίων δόθηκαν από τους αγωνιστές τους, τους NMDA, τους AMPA και τους καϊνικούς υποδοχείς. Η συναπτική απελευθέρωση του γλουταμινικού ελέγχεται από ένα ευρύ φάσμα προσυναπτικών υποδοχέων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι ομάδες II και III των γλουταμινικών μεταβολοτροπικών υποδοχέων, καθώς και οι χολινεργικοί υποδοχείς, οι υποδοχείς της αδενοσίνης, οι κ υποδοχείς των οπιοειδών και οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.

Το γλουταμινικό αποτελεί σημαντικό διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στη *Drosophila melanogaster*, όπως συμβαίνει και στα θηλαστικά. Ωστόσο, ο ρόλος του στο ΚΝΣ των ενήλικων εντόμων δεν έχει οριστεί με ακρίβεια. Δεν υπάρχουν λεπτομερείς αναφορές που να περιγράφουν τα γλουταμινεργικά προσυναπτικά κυκλώματα στον εγκέφαλο ενήλικων ατόμων στη μύγα. Το γονιδίωμα της δροσόφιλα προβλέπεται πως κωδικοποιεί τουλάχιστον τριάντα ιονοτροπικούς και τρεις μεταβολοτροπικούς υποδοχείς γλουταμινικού [40].



Εικόνα 3.26: Παρατήρηση της κινητικής ικανότητας των εντόμων μέσω της δοκιμασίας της αναρρίχησης, κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Στα διαγράμματα (A-B), παρατηρούμε άτομα με απουσία της dTSC2 πρωτεΐνης στους γλουταμινεργικούς νευρώνες (**Glutamnergic Neurons – Glut**)

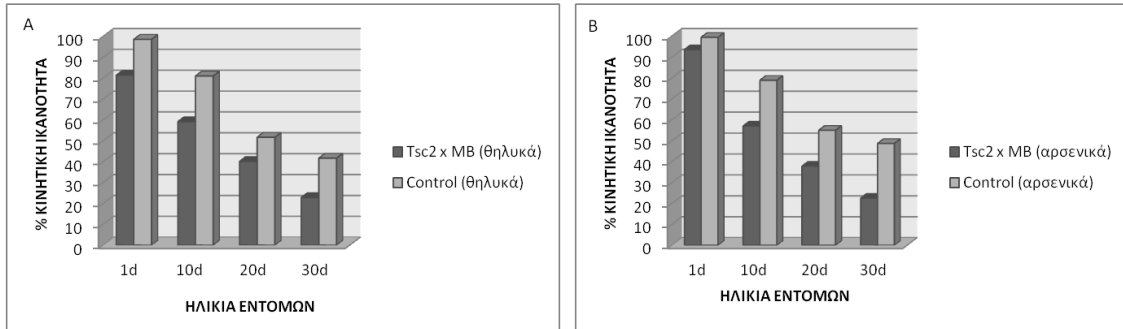
Η μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης στους γλουταμινεργικούς νευρώνες επηρέασε την αναρριχητική ικανότητα των εντόμων. Τα θηλυκά έντομα (διάγραμμα A), εμφανίζουν διαταραχή της κινητικής τους λειτουργίας από την ηλικία των 20 ημερών. Τα αρσενικά έντομα (διάγραμμα B), εμφανίζουν εντονότερο φαινότυπο, ο οποίος ξεκινάει από την νεαρή ηλικία των 10 ημερών.

3.9 Μελέτη της επίδρασης της μειορρύθμισης του γονιδίου dTSC2, στην περιοχή mushroom body του εγκεφάλου της *Drosophila melanogaster*, με τη δοκιμασία της αναρρίχησης (climbing)

Για να επιβιώσει σε ένα δυναμικό περιβάλλον ένα ζώο, πρέπει να ανακαλύψει και να θυμηθεί τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τα ερεθίσματα που λαμβάνει. Στη συνέχεια, πρέπει να επιλέξει προσαρμοστικές συμπεριφορές, όπως προσέγγιση στοιχείων που προβλέπουν για φαγητό, και αποφυγή παραγόντων που προβλέπουν κίνδυνο. Οι νευρωνικοί υπολογισμοί που εμπλέκονται στην αποτίμηση των αισθητήριων στοιχείων, η οποία βασίζεται στην μνήμη, απαιτούν τουλάχιστον τρεις διαδικασίες:

- ✓ Επεξεργασία της αισθητήριας πληροφορίας για την ταυτοποίηση των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και την διάκρισή τους
- ✓ Έναν προσαρμοστικό μηχανισμό -για την εκχώρηση θετικής ή αρνητικής εκτίμησης ως προς την επιβίωση- ενός ερεθίσματος, την αποθήκευση των πληροφοριών και την ανάκληση όταν το ίδιο ερέθισμα συναντάται εκ νέου
- ✓ Μηχανισμοί λήψης αποφάσεων, που λαμβάνουν και ενσωματώνουν πληροφορίες σχετικά με τα ερεθίσματα, και στη συνέχεια εκδήλωση της κατάλληλης συμπεριφοράς

Στη *Drosophila*, αυτή η συμπεριφορά απαιτεί την δράση μιας περιοχής του εγκεφάλου που ονομάζεται mushroom body, η οποία επεξεργάζεται αισθητήριες πληροφορίες ώστε να αποκρίνεται στα διάφορα ερεθίσματα. Το Mushroom Body (MB) αποτελεί το κύριο κέντρο της συσχετιστικής μνήμης του εγκεφάλου των εντόμων. Ενώ επεξεργάζεται διάφορες μορφές αισθητήριων πληροφοριών και ρυθμίζει τη μετακίνηση και τον ύπνο, το MB έχει μελετηθεί εκτενέστερα στο πλαίσιο της οσφρητικής μνήμης, και ειδικότερα στη συσχέτιση των οσφρητικών ερεθισμάτων με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, προκειμένου να καθοδηγηθεί η συμπεριφορά του εντόμου. Το τμήμα αυτό του εγκεφάλου έχει χαρτογραφηθεί στο σύνολό του στη *Drosophila melanogaster*, και μεταξύ άλλων έχει δείχθει ότι περιέχει 21 διαφορετικούς νευρώνες εξόδου [41].



Εικόνα 3.27: Παρατήρηση της κινητικής ικανότητας των εντόμων μέσω της δοκιμασίας της αναρρίχησης, κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Στα διαγράμματα (A-B), παρατηρούμε άτομα με απουσία της dTSC2 πρωτεΐνης στην περιοχή του εγκεφάλου Mushroom Body (MB)

Στα διαγράμματα A και B, παρατηρούμε ότι τόσο τα θηλυκά όσο και τα αρσενικά έντομα δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό ως προς την αναρριχητική τους ικανότητα. Παρατηρείται μικρή πτωτική τάση στην κινητικότητα των εντόμων απουσία της πρωτεΐνης, σε σχέση με τα έντομα διασταύρωσης ελέγχου, από τις δέκα ημέρας η οποία συνεχίζεται μέχρι και τις 30.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

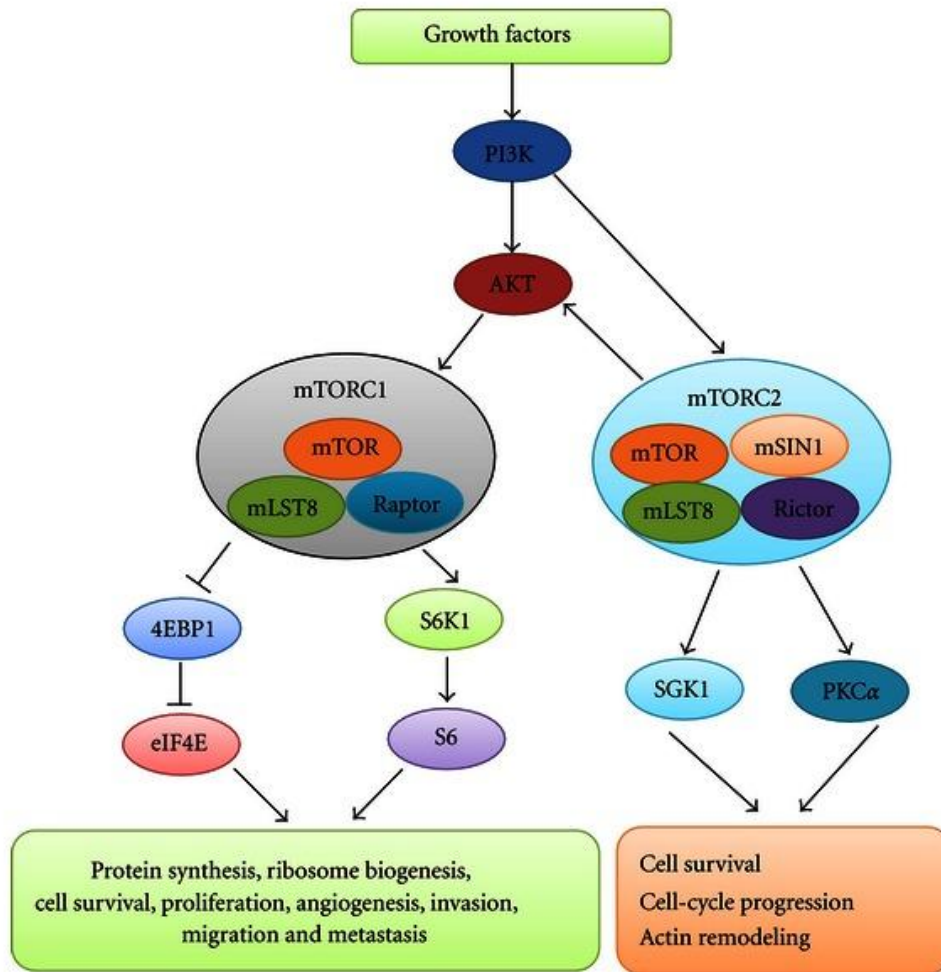
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Μειορρύθμιση της dTOR πρωτεΐνης

	ΟΦΘΑΛΜΟΣ	ΦΤΕΡΟ	ΦΤΕΡΟ & ΑΛΤΗΡΑΣ	ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΣΩΜΑ	ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ
dTOR RNAi	-	+	+	+	+	+
	ΔΕΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ	ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΜΗ ΒΙΩΣΙΜΑ ΕΝΤΟΜΑ	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

- ❖ **Οφθαλμός:** Δεν παρουσιάστηκε παθολογικός φαινότυπος ούτε σε θηλυκά ούτε σε αρσενικά έντομα κατά τη διάρκεια της γήρανσης.
- ❖ **Φτερό:** Τα φτερά παρουσιάστηκαν εντόνως δυσμορφικά τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά έντομα από την έκδυση τους.
- ❖ **Φτερό και αλτήρας:** Και σε αυτή την περίπτωση τα φτερά ήταν έντονα αλλοιωμένα. Η βιωσιμότητα των εντόμων επηρεάστηκε, καθώς αυτά προσκολλούνταν στην τροφή. Συνεπώς δεν μπόρεσαμε να πραγματοποιήσουμε μελέτη κατά τη διάρκεια της γήρανσης.
- ❖ **Ολόκληρο σώμα:** Η μειορρύθμιση της πρωτεΐνης σε ολόκληρο το σώμα είχε ως αποτέλεσμα τη μη ανάπτυξη των εντόμων.
- ❖ **Νευρικό σύστημα:** Τα έντομα εμφάνισαν σοβαρή νευρολογική διαταραχή με αποτέλεσμα να αδυνατούν να πραγματοποιήσουν έκδυση ή να πεθαίνουν αμέσως μετά την έκδυση.
- ❖ **Κινητικοί νευρώνες:** Και σε αυτή την περίπτωση τα έντομα εμφάνισαν έντονο παθολογικό φαινότυπο. Μετά την έκδυση τα άτομα ήταν ανίκανα να κινηθούν, τα φτερά δεν ξεδιπλώνονταν ώστε να σχηματιστούν πλήρως, και τα έντομα μετά από λίγο πέθαιναν.

Η αποσιώπηση της dTOR πρωτεΐνης όπως προαναφέρθηκε έχει σοβαρές επιπτώσεις στον οργανισμό του εντόμου. Αυτό είναι λογικό γιατί το TOR σηματοδοτικό μονοπάτι σχετίζεται με ποικίλες βιολογικές διαδικασίες. Το TOR ρυθμίζει θετικά την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό, προωθώντας πολλές αναβολικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των οργανιδίων, αλλά μπορεί και αναστέλλει καταβολικές διεργασίες όπως την αυτοφαγία (EIK 4.1). Ενεργοποιείται από διάφορα σήματα όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες και τα θρεπτικά συστατικά. Οι φαινότυποι που προκαλούνται είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι, απουσία της dTOR πρωτεΐνης μπλοκάρονται πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση των ριβοσωμάτων και η μεταγραφή και κατ' επέκταση επηρεάζεται η δραστηριότητα των μιτοχονδρίων και η αδιπογένεση. Συνεπώς επηρεάζεται η ομαλή ανάπτυξη του οργανισμού. Η απουσία της πρωτεΐνης δεν επηρέασε την μορφολογία του οφθαλμού, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανώς το μονοπάτι αυτό να μην εμπλέκεται στην μορφογένεσή τους. Εν αντιθέσει, δραματικές είναι οι επιπτώσεις της απώλειας της πρωτεΐνης αυτής στο νευρικό σύστημα και στους κινητικούς νευρώνες. Αυτό το γεγονός μπορεί να εξηγηθεί πιθανώς ότι εκτός των άλλων, το TOR μονοπάτι συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων ενέργειας στον εγκέφαλο και στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης στους μύες.



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση των κύριων βιολογικών διεργασιών στις οποίες εμπλέκονται οι πρωτεΐνες TORC1 και TORC2 [43]

4.2 Μειορρύθμιση της dTSC1 πρωτεΐνης

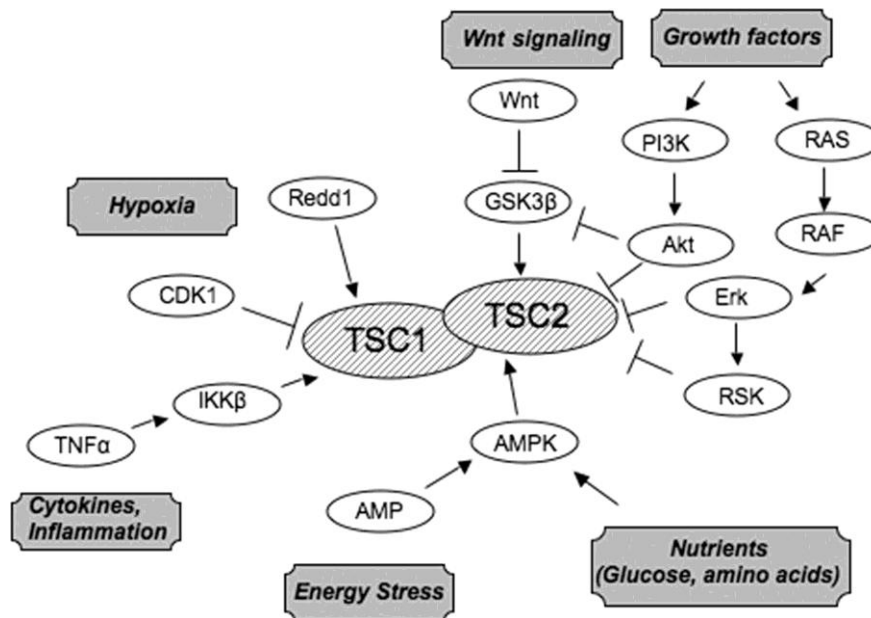
	ΟΦΘΑΛΜΟΣ	ΦΤΕΡΟ	ΦΤΕΡΟ & ΑΛΤΗΡΑΣ	ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΣΩΜΑ	ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ
dTSC1_RNAi	+	+	+	+	+	+
	ΗΠΙΑΛΛΟΙΩΣΗ	ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΜΗ ΒΙΩΣΙΜΑ ΕΝΤΟΜΑ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ

- ❖ **Οφθαλμός:** Ήπιος παθολογικός φαινότυπος εμφανίστηκε τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά έντομα ηλικίας 30 ημερών. Σε μικρή περιοχή του οφθαλμού παρατηρήθηκε απώλεια βλεφαριδών. Κατά τη διάρκεια της γήρανσης, η απώλεια των βλεφαριδών επεκτάθηκε σε μεγαλύτερη περιοχή.
- ❖ **Φτερό:** Τα φτερά των εντόμων ήταν έντονα αλλοιωμένα. Επειδή τα έντομα είχαν συνεχώς προτεταμένα τα φτερά τους, προσκολλούνταν στην τροφή και πέθαιναν σε νεαρή ηλικία.
- ❖ **Φτερό και αλιήρας:** Και σε αυτή την περίπτωση τα φτερά εμφάνισαν σημαντική απόκλιση ως προς την μορφολογία τους σε σύγκριση με τα έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Λόγω ότι η

απώλεια της πρωτεΐνης επηρεάζει και τον αλτήρα, το όργανο ισορροπίας της *Drosophila*, τα έντομα εμφανίζουν επιπρόσθετα πρόβλημα στην κίνηση. Ως εκ τούτου, η βιωσιμότητά τους επηρεάζεται και τα άτομα πεθαίνουν σε νεαρή ηλικία.

- ❖ **Ολόκληρο σώμα:** Η μειορρύθμιση της πρωτεΐνης σε ολόκληρο το σώμα είχε ως αποτέλεσμα τη μη ανάπτυξη των εντόμων.
- ❖ **Νευρικό σύστημα:** Τα έντομα εμφάνισαν σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα σε σύγκριση με τα έντομα διασταύρωσης ελέγχου.
- ❖ **Κινητικοί νευρώνες:** Τα έντομα παρουσίασαν έντονο κινητικό πρόβλημα. Από την πρώτη κιόλας ημέρα η αναρριχητική τους ικανότητα ήταν μειωμένη σε σύγκριση με τα έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Το φαινόμενο εντάθηκε ιδιαίτερω στις 10 ημέρες, και στις 20 και 30 ημέρες τόσο τα θηλυκά όσο και τα αρσενικά έντομα εμφανίζονται ανίκανα κίνησης. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στην επιβίωση των εντόμων.

Η μειορρύθμιση της *dTSC1* πρωτεΐνης επηρέασε την παθοφυσιολογία του εντόμου. Από τα αποτελέσματά μας γίνεται σαφές πως η πρωτεΐνη αυτή είναι κρίσιμη για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού, καθώς η απουσία της επιδρά αρνητικά σε πολλαπλά οργανικά συστήματα. Οι πρωτεΐνες *TSC1* και *TSC2* λειτουργούν ως ετεροδιμερές, το οποίο ενσωματώνει ξεχωριστά ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σήματα για τη ρύθμιση του συμπλόκου TOR, καθώς επίσης και για τη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού. Το σύμπλοκο *TSC1/TSC2* ρυθμίζει αρνητικά το *TORC1* και θετικά το *TORC2*. Ως ένδειξη της ισχυρής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου *TSC1/TSC2*, η συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών είναι ανθεκτική *in vitro*, σε απορρυπαντικά, σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και σε ακραίες συνθήκες pH. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική για τη σταθερότητα του *TSC2*, το οποίο πιστεύεται ότι υφίσταται ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος όταν διαχωρίζεται από το *TSC1*. Η σταθερότητα του *TSC1*, από την άλλη πλευρά, δεν επηρεάζεται πολύ από την αλληλεπίδρασή του με το *TSC2*. Στα πειράματα που διεξάχθηκαν, αποσιωπήσαμε μόνο την πρωτεΐνη *TSC1*. Ωστόσο, με βάση όσα προαναφέρθηκαν, η έλλειψή της επηρεάζει και την λειτουργία της *TSC2*. Συνεπώς, οι φαινότυποι ήταν τόσο ισχυροί εξαιτίας της διαταραχής της ομαλής λειτουργίας του συμπλόκου, με επιπτώσεις στα μονοπάτια σηματοδότησης καταρροϊκά αυτού (εικ 4.2).



Εικόνα 4.2: Απεικόνιση των κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται το σύμπλοκο *TSC1/TSC2* [42]

4.3 Μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης

	ΟΦΘΑΛΜΟΣ	ΦΤΕΡΟ	ΦΤΕΡΟ & ΑΛΤΗΡΑΣ	ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΣΩΜΑ	ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ
dTSC2 RNAi	+	+	+	+	+	+
	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΜΗ ΒΙΩΣΙΜΑ ΕΝΤΟΜΑ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ

- ❖ **Οφθαλμός:** Παρουσιάστηκε έντονα παθολογικός φαινότυπος από τη νεαρή ηλικία των 15 ημερών και στα δύο φύλα. Παρατηρήθηκε συσσωμάτωση ομματοδίων και απώλεια ή σπάσιμο βλεφαρίδων. Το φαινόμενο εντάθηκε σε έντομα μεγαλύτερης ηλικίας.
- ❖ **Φτερό:** Τα φτερά παρουσιάστηκαν και σε αυτή την περίπτωση εντόνως δυσμορφικά τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά έντομα από την έκδυση τους, με μειωμένη λειτουργικότητα που επηρέασε και τη βιωσιμότητα τους.
- ❖ **Φτερό και αλτήρας:** Έντονες αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στην εξωτερική μορφολογία τους, καθιστώντας τα μη λειτουργικά για τον οργανισμό.
- ❖ **Ολόκληρο σώμα:** Η μειορρύθμιση της πρωτεΐνης σε ολόκληρο το σώμα είχε ως αποτέλεσμα τη μη ανάπτυξη των εντόμων.
- ❖ **Νευρικό σύστημα:** Παρατηρήθηκε μειωμένη βιωσιμότητα των θηλυκών εντόμων, ενώ στα αρσενικά δεν σημειώθηκε διαφορά στη βιωσιμότητα σε σύγκριση με έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Σημαντικά μειωμένη εμφανίστηκε και η κινητική ικανότητα των εντόμων από την νεαρή ηλικία των 10 ημερών και στα δύο φύλα, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας έντομα, τα άτομα εμφανίζουν σημαντικό κινητικό πρόβλημα.
- ❖ **Κινητικοί νευρώνες:** Μειωμένη ήταν η βιωσιμότητα των θηλυκών εντόμων, ενώ στα αρσενικά δεν σημειώθηκε διαφορά στη βιωσιμότητα σε σύγκριση με έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Όσον αφορά την αναρριχητική ικανότητα των εντομών, και στα δύο φύλα εμφανίζεται μειωμένη από την ηλικία των 20 ημερών.

Η μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης προκάλεσε επίσης έντονους φαινοτύπους, που καταδεικνύουν τη σημασία της για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Αποσιώπηση της πρωτεΐνης dTSC2, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη λειτουργία της dTOR, αφού αποτελεί αναστολέα της. Η αυξημένη ωστόσο δράση της dTOR, οδηγεί σε μείωση της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία αποτελεί ένα ενδοκυτταρικό σύστημα αποικοδόμησης, κατά το οποίο κυτταροπλασματικά συστατικά μεταφέρονται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Η αυτοφαγία διαδραματίζει μια ποικιλία φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών ρόλων, όπως είναι η προσαρμογή σε καταστάσεις περιορισμένων θρεπτικών συστατικών, η ενδοκυτταρική πρωτεϊνική και οργανιδιακή εκκαθάριση, η συμμετοχή στην ανάπτυξη και στην αντιγήρανση, η εξάλειψη μικροοργανισμών, ο κυτταρικός θάνατος, η καταστολή όγκων και η αντιγονοπαρουσίαση. Η υπερβολική δράση της αυτοφαγίας μπορεί να έχει καταστρεπτικές συνέπειες για το κύτταρο, καθώς είναι στενά συνδεδεμένη με την απόπτωση, και επίσης η συνεχής αποικοδόμηση χωρίς κατασκευή νέων δομικών λίθων μόνο αρνητικές επιπτώσεις μπορεί να επιφέρει. Η μειωμένη αυτοφαγία από την άλλη μεριά, επιτρέπει τη συσσώρευση ελαττωματικών πρωτεϊνών και οργανιδίων, δημιουργώντας τοξικό περιβάλλον εντός του κυτάρου και επηρεάζοντας πολλές άλλες βιολογικές διαδικασίες οι οποίες προαναφέρθηκαν. Συνεπώς πρέπει να διατηρείται μια ισορροπία για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων. Στα πειράματά μας, οι έντονοι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν πιθανώς να συνδέονται με την μειωμένη δράση της αυτοφαγίας.

4.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων από την υπερέκφραση της dTOR πρωτεΐνης

	ΟΦΘΑΛΜΟΣ	ΦΤΕΡΟ	ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΣΩΜΑ
dTOR_UAS	+	+	+
	ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΗ	ΜΗ ΒΙΩΣΙΜΑ ΕΝΤΟΜΑ

- ❖ **Οφθαλμός:** Παρουσιάστηκε έντονα παθολογικός φαινότυπος. Υπήρξε αδυναμία ολοκλήρωσης της εμβρυογένεσης.
- ❖ **Φτερό:** Τα φτερά παρουσιάστηκαν και σε αυτή την περίπτωση εντόνως δυσμορφικά τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά έντομα, από την έκδυση τους.
- ❖ **Ολόκληρο σώμα:** Η μειορρύθμιση της πρωτεΐνης σε ολόκληρο το σώμα είχε ως αποτέλεσμα τη μη ανάπτυξη των εντόμων.

Στους ιστούς που μελετήσαμε, η υπερέκφραση της dTOR πρωτεΐνης προκάλεσε παρόμοιους φαινότυπους με την μειορρύθμιση της. Αυτό το γεγονός πιθανώς να εξηγείται με βάση το ότι τα υψηλά επίπεδα της TOR πρωτεΐνης διαταράσσουν την κατάλληλη σηματοδότηση μέσω του TOR μονοπατιού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι αλληλεπιδρώντες παράγοντες καταρροϊκά αυτού του μονοπατιού να επηρεάζονται και να διαταράσσονται οι φυσιολογικές διεργασίες των κυττάρων. Ειδικότερα, η ενδεχόμενη καταστολή της αυτοφαγίας ως αποτέλεσμα της υπερ-ενεργοποίησης της dTOR κινάσης θα μπορούσε να αντανάκλα τον καθοριστικό ρόλο της αυτοφαγικής μηχανής στη φυσιολογία του εντόμου. Ως εκ τούτου, υποστηρίζεται η άποψη ότι η αυτοφαγία συμμετέχει καταλυτικά στην κυτταρική λειτουργία πλήθους ιστών και οργανικών συστημάτων του εντόμου μέσω εκλεκτικής αναγνώρισης, και αποικοδόμησης, μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, γηρασμένων οργανιδίων και εν γένει τοξικών για την ευζωία του εν λόγω οργανισμού συστατικών.

4.5 Συζήτηση αποτελεσμάτων από την μειορρύθμιση της dTSC2 πρωτεΐνης στους χολινεργικούς και γλουταμινεργικούς νευρώνες και στην περιοχή του εγκεφάλου mushroom body

- ❖ Χολινεργικοί νευρώνες

Αν και οι χολινεργικοί νευρώνες αποτελούν μικρό ποσοστό του συνολικού αριθμού νευρώνων, φαίνεται ότι ρυθμίζουν και συντονίζουν την λειτουργία σχεδόν όλων των οργάνων και ιστών. Τόσο οι μουσκαρινικοί όσο και οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης ρυθμίζουν μια ευρεία ποικιλία φυσιολογικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της νευρωνικής διαφοροποίησης.

Η μειορρύθμιση της πρωτεΐνης dTSC2 στους χολινεργικούς νευρώνες επέφερε παθολογικό φαινότυπο και με βάση τα αποτελέσματά μας φαίνεται πως επηρεάζεται σημαντικά η κινητική ικανότητα των εντομών, η οποία εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με τα έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελεί το γεγονός ότι η απουσία της dTSC2 πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη δράση της dTOR κινάσης. Η dTOR πρωτεΐνη επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση και αναστέλλει την αυτοφαγία. Τα αυξημένα πρωτεϊνικά προϊόντα, και η μη αποικοδόμηση τους έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία τοξικού περιβάλλοντος στους χολινεργικούς νευρώνες, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η σωστή σύνθεση και αποθήκευση της ακετυλοχολίνης και κατ' επέκταση η χολινεργική νευροδιαβίβαση.

❖ Γλουταμινεργικοί νευρώνες

Το γλουταμινικό παίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και την επιβίωση των νευρώνων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Αυτό σε μεγάλο βαθμό οφείλεται στη ρύθμιση της εισόδου του Ca^{++} μέσω των NMDA υποδοχέων. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση είναι οι εξής: (1) σύνθεση του γλουταμινικού από γλουταμίνη μέσω της γλουταμινάσης, (2) αποθήκευση του γλουταμινικού σε συναπτικά κυστίδια, (3) απελευθέρωση του γλουταμινικού με εξωκυττάρωση, (4) ενεργοποίηση υποδοχέων, (5) επαναπρόσληψη του γλουταμινικού, (6) σύνθεση γλουταμίνης από γλουταμινικό, μέσω της δράσης της συνθετάσης της γλουταμίνης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η κινητική ικανότητα των εντόμων επηρεάστηκε σημαντικά, και κυρίως από τις 20 ημέρες. Η διαταραχή του μονοπατιού TSC/RHEB/TOR επηρέασε τον μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης και της αυτοφαγίας, όπως συνέβη και στην περίπτωση των χολινεργικών νευρώνων, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση και κατ' επέκταση οι διαδικασίες που απαιτούνται για την πραγματοποίησή της δεν λειτουργούν σωστά.

❖ Mushroom body

Η περιοχή mushroom body είναι απαραίτητη για μια ποικιλία συμπεριφορών στη *Drosophila*. Διαφορετικοί τύποι εσωτερικών και εξωτερικών νευρώνων την απαρτίζουν και αποτελούν πιθανώς βάση της λειτουργικής ποικιλομορφίας της. Τα κύτταρα Kenyon, αποτελούν την πλειοψηφία των εσωτερικών νευρώνων. Κατά κύριο λόγο το mushroom body σχετίζεται με την μνήμη και την μάθηση και ενδεικτικά παραθέτουμε κάποιες από τις λειτουργίες του:

- ✓ Συμμετοχή στην οσφρητική εκμάθηση
- ✓ Έλεγχος της κινητικής δραστηριότητας
- ✓ Έλεγχος του ύπνου
- ✓ Συμμετοχή στην κατανόηση της θέσης
- ✓ Βοήθεια στην μνημόνευση του χώρου κ.α

Με βάση τα αποτελέσματά μας η απουσία της πρωτεΐνης dTSC2 στο mushroom body φαίνεται ότι δεν επηρεάζει τον έλεγχο της κίνησης. Τα έντομα της υπό μελέτη διασταύρωσης παρουσίασαν μικρή πτώση στην αναρριχητική τους ικανότητα σε σύγκριση με τα άτομα της διασταύρωσης ελέγχου. Η διαταραχή που προκλήθηκε στο σηματοδοτικό μονοπάτι TSC/RHEB/TOR φαίνεται πως δεν σχετίζεται με τις λειτουργίες που ελέγχει η συγκεκριμένη περιοχή.

4.6 Οζώδης σκλήρυνση

Η Οζώδης σκλήρυνση (TSC) είναι μια γενετική διαταραχή που προκαλεί μη-κακοήθεις όγκους σε πολλά διαφορετικά όργανα, κυρίως στον εγκέφαλο, τα μάτια, την καρδιά, τα νεφρά, το δέρμα και τους πνεύμονες. Οι πλευρές της οζώδους σκλήρυνσης που επηρεάζουν πιο έντονα την ποιότητα ζωής, σχετίζονται γενικά με τον εγκέφαλο: σπασμοί-κρίσεις, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, νοητική υστέρηση και αυτισμός. Τα συμπτώματα ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το σημείο που αναπτύσσονται οι όγκοι. Η συχνότητα και η σοβαρότητα των διαφόρων μορφών της TSC μπορεί να ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ατόμων, ακόμη και μεταξύ πανομοιότυπων διδύμων. Η οζώδης σκλήρυνση συχνά ανιχνεύεται κατά τη βρεφική ή την παιδική ηλικία. Μερικοί άνθρωποι με σκλήρυνση εμφανίζουν ήπια συμπτώματα και η πάθηση δεν διαγιγνώσκεται μέχρι την ενηλικίωση, ή παραμένει αδιάγνωστη. Άλλοι αντιμετωπίζουν σοβαρές αναπηρίες. Τόσο το TSC1 γονίδιο όσο και το TSC2, καταστέλλουν την ανάπτυξη όγκων στο σώμα, καθώς ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της αναστολής της TOR

κινάσης. Όταν το TSC1 ή το TSC2 γονίδια είναι ελαττωματικά, η ανάπτυξη των κυττάρων δεν καταστέλλεται επαρκώς με αποτέλεσμα την εμφάνιση της οζώδους σκλήρυνσης. Η Hamartin, η tuberin, και η TOR κινάση εκφράζονται σε πολλά διαφορετικά όργανα σε όλο το σώμα, γεγονός που εξηγεί γιατί τόσο πολλά όργανα μπορούν να επηρεαστούν από την ασθένεια. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη συμπεριφορά, ναυτία, πονοκεφάλους ή και πολλά άλλα συμπτώματα. Τρεις τύποι εγκεφαλικών αλλοιώσεων έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με TSC: πρώτον, όγκοι στον φλοιό του εγκεφάλου, αλλά μπορεί επίσης να εμφανιστούν και σε πιο βαθιές περιοχές του εγκεφάλου, δεύτερον, υποεπενδυματικά οζίδια (SEN/subependymal nodules), τα οποία σχηματίζονται στα τοιχώματα των κοιλιών (κοιλότητες του εγκεφάλου που περιέχουν υγρό) και τρίτον, υποεπενδυματικά γιγαντιαία αστροκυτώματα (SEGA/ subependymal giant-cell astrocytomas), τα οποία αναπτύσσονται από τα SEN και μπορεί να μπλοκάρουν τη ροή του υγρού εντός του εγκεφάλου, προκαλώντας μια συσσώρευση υγρού και πίεσης και οδηγούν σε πονοκεφάλους και θολή όραση. Μπορεί να εμφανιστούν επιληπτικές κρίσεις, όλων των τύπων. Οι κρίσεις μπορεί να είναι δύσκολο να ελεγχθούν με φαρμακευτική αγωγή, και μερικές φορές η χειρουργική επέμβαση είναι απαραίτητη. Στην καρδιά, οι όγκοι είναι συνήθως μεγαλύτεροι κατά τη γέννηση και στη συνέχεια μπορεί να μειωθούν σε μέγεθος. Οι όγκοι στα μάτια δεν είναι τόσο συχνοί, αλλά μπορεί να παρουσιαστούν προβλήματα αν αυξηθούν και να μπλοκάρουν πάρα πολύ τον αμφιβληστροειδή. Καταλήγοντας, το 1/2 μέχρι και τα 3/4 των ατόμων με οζώδη σκλήρυνση παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη, που κυμαίνεται από ήπιες μαθησιακές δυσκολίες μέχρι και σοβαρές δυσλειτουργίες και ανεπάρκειες. Συμπεριφορικά προβλήματα, όπως η επιθετικότητα, η ξαφνική οργή, το σύνδρομο ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας δρουν σαν ψυχαναγκαστική διαταραχή και επαναλαμβανόμενες, καταστροφικές αλλά και συμπεριφορές αυτοτραυματισμού σε άτομα με οζώδη σκλήρυνση, είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν.

Με όσα προαναφέρθηκαν, γίνεται αντιληπτό ότι η οζώδης σκλήρυνση είναι μια ασθένεια που επηρεάζει έντονα το νευρικό σύστημα και όχι μόνο. Κρίνεται απαραίτητη είτε η χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση των όζων, είτε ευκολότερα η χρήση φαρμάκων για τον περιορισμό των συμπτωμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε το δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*, ως ένα *in vivo* βιολογικό μοντέλο ασπόνδυλων για την ανθρώπινη καταστροφική ασθένεια οζώδη σκλήρυνση. Χρησιμοποιήσαμε το έντομο αυτό, καθώς εμφανίζει σημαντική ομοιότητα, σε πολλά μονοπάτια που εμπλέκονται σε ασθένειες, με τον άνθρωπο. Σε έντομα με μειορρυθμισμένη την TSC2 στο νευρικό σύστημα, παρατηρήθηκαν έντονα κινητικά προβλήματα από τη νεαρή ηλικία των 10 ημερών, όπου η αναρριχητική τους ικανότητα ήταν εμφανώς μειωμένη σε σύγκριση με έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Στις 20 και 30 ημέρες, τα έντομα εμφανίζονται ανίκανα να κινηθούν, πράγμα που δηλώνει ότι κατά τη διάρκεια της γήρανσης το φαινόμενο της παραλυσίας εντείνεται και επηρεάζει και τη βιωσιμότητά τους, καθώς τα αδύναμα άκρα τους τα καθηλώνουν στην τροφή. Ακόμη πιο ισχυρό φαινόμενο παρατηρήσαμε με μειορρύθμιση της TSC1 πρωτεΐνης. Τα έντομα σε αυτήν την περίπτωση εμφάνισαν κινητικές δυσκολίες από την πρώτη κιόλας ημέρα, με αποτέλεσμα στις 10 ημέρες να εμφανίζονται σχεδόν παράλυτα. Η διάρκεια ζωής τους επίσης ήταν σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με έντομα διασταύρωσης ελέγχου. Συμπεραίνουμε ότι και τα δύο αυτά γονίδια είτε το καθένα ξεχωριστά είτε σε συνεργασία είναι ζωτικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Στα έντομα με έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών η δράση της TOR κινάσης είναι αυξημένη, και η αυτοφαγία αναστέλλεται. Μελλοντικός μας στόχος αποτελεί η χορήγηση φαρμάκων που είτε μπλοκάρουν την κινάση και κατ' επέκταση αυξάνουν την αυτοφαγία, είτε επάγουν άμεσα την αυτοφαγία, ώστε να διαπιστώσουμε κατά πόσο αυτή συμβάλλει στην εμφάνιση του φαινοτύπου. Εάν τα αποτελέσματα είναι θετικά, η ανακάλυψη αυτή θα μπορούσε να αποδειχθεί πολύ χρήσιμη, καθώς θα μπορούσαν πιθανώς μετά από κλινικές δοκιμές, να αποτελέσουν βάση για θεραπεία της οζώδους σκλήρυνσης. Θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην βελτίωση των διαταραχών που προκύπτουν από όζους στο εγκέφαλο και να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carnegie Institution of Washington. Department of Genetics. [from old catalog], Demerec M, Kaufmann BP: *Drosophila guide*. Washington,,: Carnegie Institution of Washington; 1961.
2. National Research Council (U.S.). Committee on Developmental Toxicology., National Research Council (U.S.). Commission on Life Sciences.: *Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment*. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
3. Grewal SS: **During development, communication between organs determines their relative final size**. 2013.
4. Leshko-Lindsay LA, Corces VG: **The role of selectins in Drosophila eye and bristle development**. *Development* 1997, **124**(1):169-180.
5. Cagan R: **Principles of Drosophila eye differentiation**. *Curr Top Dev Biol* 2009, **89**:115-135.
6. Tomlinson A: **The origin of the Drosophila subretinal pigment layer**. *J Comp Neurol* 2012, **520**(12):2676-2682.
7. Salcedo E, Huber A, Henrich S, Chadwell LV, Chou WH, Paulsen R, Britt SG: **Blue- and green-absorbing visual pigments of Drosophila: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins**. *J Neurosci* 1999, **19**(24):10716-10726.
8. lawrence A: *the making of a fly - the genetics of animal design*; 1992
9. Kramer H, Cagan RL, Zipursky SL: **Interaction of bride of sevenless membrane-bound ligand and the sevenless tyrosine-kinase receptor**. *Nature* 1991, **352**(6332):207-212.
10. Mlodzik M, Hiromi Y, Weber U, Goodman CS, Rubin GM: **The Drosophila seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates**. *Cell* 1990, **60**(2):211-224.
11. Waddington A: *The genetic control of wing development in Drosophila*; 1940.
12. Ripoll P: **The embryonic organization of the imaginal wing disc of Drosophila melanogaster**. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 1972, **169**(3):200-215.
13. De Celis JF: **Pattern formation in the Drosophila wing: The development of the veins**. *Bioessays* 2003, **25**(5):443-451.
14. Diaz de la Loza MC, Thompson BJ: **Forces shaping the Drosophila wing**. *Mech Dev* 2017, **144**(Pt A):23-32.
15. Hassan BA: *The making and un-making of neuronal circuits in Drosophila*. New York: Humana Press ; Springer; 2012.
16. Freeman MR: **Drosophila Central Nervous System Glia**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, **7**(11).
17. Edwards TN, Meinertzhagen IA: **The functional organisation of glia in the adult brain of Drosophila and other insects**. *Prog Neurobiol* 2010, **90**(4):471-497.
18. Abouassaly R, Finelli A, Tomlinson GA, Urbach DR, Alibhai SM: **Volume-outcome relationships in the treatment of renal tumors**. *J Urol* 2012, **187**(6):1984-1988.
19. Duffy JB: **GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife**. *Genesis* 2002, **34**(1-2):1-15.
20. Laughon A, Gesteland RF: **Primary structure of the Saccharomyces cerevisiae GAL4 gene**. *Mol Cell Biol* 1984, **4**(2):260-267.
21. Ma J, Ptashne M: **Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments**. *Cell* 1987, **48**(5):847-853.
22. Fischer JA, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M: **GAL4 activates transcription in Drosophila**. *Nature* 1988, **332**(6167):853-856.

23. Jeibmann A, Paulus W: **Drosophila melanogaster as a model organism of brain diseases.** *Int J Mol Sci* 2009, **10**(2):407-440.
24. Kim D, Rossi J: **RNAi mechanisms and applications.** *Biotechniques* 2008, **44**(5):613-616.
25. Kim K, Lee YS, Harris D, Nakahara K, Carthew RW: **The RNAi pathway initiated by Dicer-2 in Drosophila.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006, **71**:39-44.
26. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandro S *et al*: **Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review.** *Gerontology* 2008, **54**(2):92-99.
27. Klionsky DJ: **The molecular machinery of autophagy: unanswered questions.** *J Cell Sci* 2005, **118**(Pt 1):7-18.
28. Klionsky DJ: **Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(11):931-937.
29. Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R: **DNA damage and autophagy.** *Mutat Res* 2011, **711**(1-2):158-166.
30. Melendez A, Levine B: **Autophagy in C. elegans.** *WormBook* 2009:1-26.
31. Melendez A, Neufeld TP: **The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story.** *Development* 2008, **135**(14):2347-2360.
32. Levine B, Yuan J: **Autophagy in cell death: an innocent convict?** *J Clin Invest* 2005, **115**(10):2679-2688.
33. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP: **mTOR kinase structure, mechanism and regulation.** *Nature* 2013, **497**(7448):217-223.
34. Laplante M, Sabatini DM: **mTOR signaling at a glance.** *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 20):3589-3594.
35. Laplante M, Sabatini DM: **mTOR signaling in growth control and disease.** *Cell* 2012, **149**(2):274-293.
36. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J: **Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb.** *Curr Biol* 2003, **13**(15):1259-1268.
37. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL: **TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(9):648-657.
38. Zitserman D, Gupta S, Kruger WD, Karbowniczek M, Roegiers F: **The TSC1/2 complex controls Drosophila pigmentation through TORC1-dependent regulation of catecholamine biosynthesis.** *PLoS One* 2012, **7**(11):e48720.
39. Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL: **TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway.** *Trends Biochem Sci* 2004, **29**(1):32-38.
40. Nichols CD: **Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery.** *Pharmacol Ther* 2006, **112**(3):677-700.
41. Aso Y, Sitaraman D, Ichinose T, Kaun KR, Vogt K, Belliart-Guerin G, Placais PY, Robie AA, Yamagata N, Schnaitmann C *et al*: **Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in Drosophila.** *Elife* 2014, **3**:e04580.
42. Tomasoni R, Mondino A: **The tuberous sclerosis complex: balancing proliferation and survival.** *Biochem Soc Trans* 2011, **39**(2):466-471.
43. Gao W, Li JZ, Chan JY, Ho WK, Wong TS: **mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer.** *ISRN Otolaryngol* 2012, **2012**:953089.

