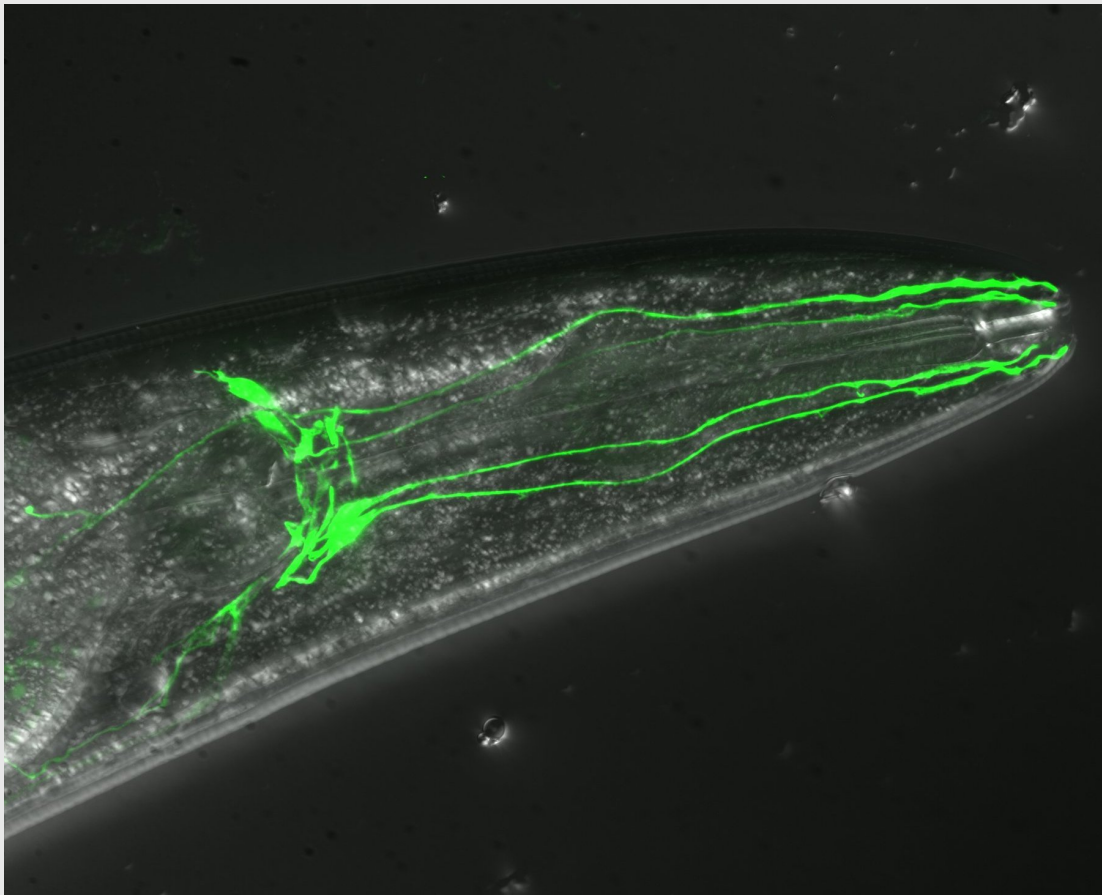


Udvikling af Parkinson's: Interaktionen mellem Hedgehog-signalering, PINK1/PARK2 og mitokondriel dysfunktion i *C. elegans*



Kandidatspeciale

Christian Dupont Danielsen



AALBORG UNIVERSITY
STUDENT REPORT

School of Engineering & Science Institute
for Chemistry & Bioscience Fredrik Bajers
Vej 7H 9220 Aalborg Øst
<http://www.tnb.aau.dk>

Titel:

Udvikling af Parkinson's: Interaktionen
mellem Hedgehog-signaler, PINK1/PARK2 og mitokondriel dysfunktion i
C. elegans

Skrevet af:

Christian Dupont Danielsen

Semester: 5. semester (MSc)

ECTS: 30

Projektperiode: august 2024 – marts 2025,
med pause grundet barselsorlov fra
november 2024 – februar 2025

Vejledere:

Anders Olsen

Lisbeth Birk Møller

Projekt antal sider: 60

Bilag antal sider: 3

Deadline: 31/3/2024

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a prevalent neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons, with dysfunctional mitochondria playing a central role in disease progression, potentially caused by reduced mitophagy by PINK1/PARK2 mutations.

Preliminary data shows substantially elevated levels of Hedgehog (Hh) signaling in fibroblast cells of PD patients with disease causing variants in PINK1/PARK2, indicating that there might be a correlation between Hh-signaling & PD. Hh-signaling has been implicated in a wide range of processes, including neurogenesis & neuroprotective effects, yet it is not clear whether it impacts development of PD. In this study, *C. elegans* was used as a model organism to explore possible interactions between PINK1/PARK2-mediated mitochondrial quality control & Hh-signaling, & if this underlines a possible connection to PD.

To answer these questions, different transgenic worm strains were subjected to RNAi-mediated knockdown of *pdr-1* (homolog of human PARK2), *hhat-2* (homolog of human HHAT) or the Hh-related gene *grl-1* (no direct human homolog). Dopaminergic neurodegeneration was assessed by qualitatively scoring the morphology of CEP-neurons. Furthermore, changes in mitochondrial morphology were quantified using the fluorescent probe MitoTracker as a marker for mitochondrial health. Lastly, *tra-1* expression was measured as a potential readout of components of Hh-signaling activity.

Knockdown of *hhat-2* in a PD model reduced α -synuclein induced toxicity & age dependent neurodegeneration in CEP-neurons, suggesting neurotoxic effects of Hh-signaling in dopaminergic neurons. Surprisingly, *pdr-1* knockdown didn't affect neurodegeneration in a PD model. Furthermore, knockdown of *grl-1* induced changes in mitochondrial morphology, suggesting components of Hh-signaling as a potential regulator of mitochondrial dynamics. Lastly, *pdr-1* & *grl-1* knockdown resulted in changes in *tra-1* expression, suggesting both as a regulator of components of the Hh-signaling pathway. This indicates that the PINK1/PARK2 system potentially regulates PD-development, mediated by upregulation of Hh-signaling, that has neurotoxic effects on dopaminergic neurons.

Together, these findings highlight a potential functional link between Hh-signaling, PINK1/PARK2 & PD-neuropathology.

Forord

Dette speciale projekt er skrevet af Christian Dupont Danielsen, en 11. semester 2-faglig studerende, med hovedfag i biologi og sidefag i psykologi. Det eksperimentelle arbejde blev udført i perioden august – november 2024, og projektet blev skrevet i perioden august 2024 – marts 2025, med pause grundet barselsorlov fra november 2024 – februar 2025, ved Aalborg Universitet på Institut for Kemi og Biovidenskab.

Jeg vil gerne takke min vejleder Anders Olsen, for at være behjælpelig med vejledning, overvejelser af eksperiment-design, og altid stå til rådighed hvis tiden er til det, uanset om man banker på døren eller sender en mail, og hurtig hjælp i slutfasen af projektskrivning, samt spontan hjælp en sen eftermiddag hvor jeg havde travlt. Yderligere tak for at facilitere et godt socialt miljø i laboratoriet, med sociale arrangementer i dit sommerhus osv. Tak til min anden vejleder Lisbeth Birk Møller, for at være behjælpelig med online vejledning og hurtigt at hjælpe i slutfasen af projektskrivning. Yderligere tak for til Lisbeth, som venligt inviterede gruppen på smørrebrød, selvom jeg desværre blev forhindret i at deltage.

Tak til Magnus Tudsborg Frantzen for uovertruffen hjælp i flere henseender, på vegne af mig og de andre studerende i orme-lab. Tak til Annika Fugl for kyndig hjælp med RStudio og sparring omkring dataanalyse. Tak til Katrine Houmann Jensen for samarbejdet i laboratoriet, og for at dele rådata med mig, herunder genotypisk verificering af UA202 og UA196 via PCR, samt data med *hhat-2* knockdown og halvdelen af EV og *pdr-1* knockdown i UA202 og UA196.

Til sidst tak til Katrine Houmann Jensen, Louise Schiødte Schmidt, Annika Fugl, Verónica Feteira Montero, Magnus Tudsborg Frantzen, Helene Halkjær Jensen, Cristina Maria Ribeiro Do Canto Lagido, Ayah Mohamed Abou Bakr Abdelhamid, Ivy Quan og Stine Maria Park for at bidrage til godt socialt miljø i laboratoriet samt diverse form for hjælp.

Indholdsfortegnelse

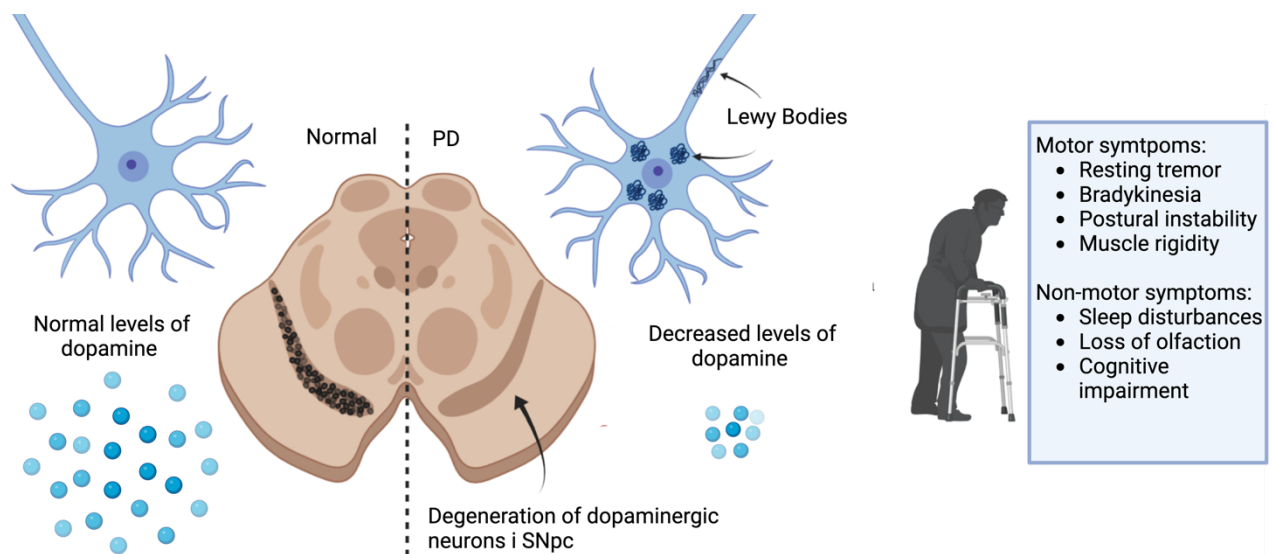
Abstract.....	
Forord.....	i
1 Indledning.....	1
1.1 Parkinson's sygdom	1
1.2 <i>C. elegans</i> som modelorganisme.....	3
1.2.1 <i>C. elegans</i> som modelorganisme i Parkinson's.....	3
1.3 PINK1/PARK2 og mitokondrier	6
1.3.1 Generel funktion af mitokondrier.....	6
1.3.2 PINK1/PARK2 medieret kvalitetskontrol af mitokondrier	8
1.3.3 Homologi mellem <i>C. elegans' pdr-1/pink-1</i> og menneskers <i>PARK2/PINK1</i>	8
1.4 Hedgehog-signalvejen	9
1.4.2 Modning af Hedgehog-liganderne Shh, Ihh og Dhh i vertebrater.....	9
1.4.3 Hedgehog-signalvejen i vertebrater	10
1.4.4 Hedgehog-signalvejen i <i>C. elegans</i>	12
1.5.1 Baggrund	13
1.5.2 Formål	13
2 Metode	14
2.1 <i>C. elegans</i> stammer.....	14
2.1.1 Vedligehold af <i>C. elegans</i> stammer	14
2.1.2 Fænotypisk verificering af stammer.....	14
2.2 Funktionel analyse af gener via RNAi-medieret genknockdown	15
2.2.1 Fremstilling af LB-plader	15
2.2.2 Fremstilling af RNAi-plader	15
2.2.3 RNAi medieret knockdown via foddermetoden og inducering af transgenerationelle effekter.....	16
2.3 Fluorescensmikroskopi: fotografering i confocal spinning disc mikroskop.....	17
2.4 <i>tra-1</i> ekspressions-assay: Kvantificering af <i>tra-1</i> udtryk som mål for niveau af Hh-signaler.	18
2.5 Dopaminerge neurodegenerations-assay: Morfologisk degeneration af dopaminerge CEP-neuroner i Parkinson's model	20
2.6 Mitokondriemorfologi-assay: Effekt ved <i>grl-1</i> og <i>pdr-1</i> knockdown på mitokondriesundhed i <i>pink-1</i> mutant	22
2.7 Statistiske tests	25
3 Resultater	26
3.1 <i>tra-1</i> ekspressions-assay: <i>grl-1</i> knockdown øger og <i>pdr-1</i> knockdown reducerer <i>tra-1</i> ekspression i Hedgehog-reporterstamme.....	26
3.2 Dopaminerge neurodegenerations-assay: kvantificering af CEP-neuroners degenerering og morfologi ..	29

3.2.2	<i>Knockdown af hhat-2 beskytter mod aldersbetinget neurodegeneration, effekt af grl-1 er aldersbetinget i CEP-neuroner i kontrol for PD.</i>	31
3.2.3	<i>Degeneration af CEP-neuroner er aldersbetinget, og forstærkes af αSyn-induceret toksicitet</i>	33
3.3	<i>Mitokondriemorfologi-assay: Sundhed af mitokondrie-netværket baseret på MitoTracker kvantificeret morfologi ved grl-1 og pdr-1 knockdown</i>	35
3.3.1	<i>Network Junctions/Area: grl-1 knockdown beskytter mod pink-1 relateret fragmentering af det mitokondrielle netværk og ingen effekt ved knockdown af pdr-1</i>	36
3.3.2	<i>Total Branch Length/Area: grl-1 knockdown beskytter mod fragmentering af det mitokondrielle netværk og ingen effekt ved knockdown af pdr-1</i>	38
3.3.3	<i>Network Junctions/Area: grl-1 knockdown beskytter mod fragmentering af det mitokondrielle netværk og ingen effekt ved knockdown af pdr-1</i>	39
4	Diskussion	41
4.1	<i>Uventet opregulering af tra-1 ekspresion efter grl-1 knockdown</i>	41
4.1.1	<i>Tolkning af tra-1 opregulering ved grl-1 knockdown i en fragmenteret Hh-signalvej</i>	41
4.1.2	<i>DZ840 som Hh-reporterstamme: tra-1 ekspresion som markør for komponenter af Hh-signalerings</i>	42
4.2	<i>Hedgehog-signalerings i PD: Neurotoksicitet og aldersbetingede effekter ved hhat-2 og grl-1 knockdown</i>	43
4.3	<i>Reduceret neurodegeneration ved hhat-2 knockdown skyldes sandsynligvis inhibering af Hedgehog-signalerings snarere end forlænget levetid</i>	44
4.4	<i>Mitokondrielle-dynamikker som nedstrøms effekt af Hedgehog-signalerings</i>	45
4.5	<i>Hedgehog-signalerings som nedstrøms effekt af mitokondrielle dynamikker og PINK1/PARK2 aktivitet</i>	46
4.6	<i>Udfordringer ved MitoTracker og alternative metoder til visualisering af mitokondriemorfologi</i>	47
4.7	<i>Komplekst samspil mellem PINK1/PARK2, mitokondriel dysfunktion og Hedgehog-signalerings i Parkinsons sygdom</i>	48
4.8	<i>Fremtidige perspektiver</i>	48
5	Konklusion	51
6	Litteraturliste	52
Bilag		1
	<i>Bilag 1</i>	1

1 Indledning

1.1 Parkinson's sygdom

Parkinson's sygdom (PD) er den næstmest udbredte form for neurodegenerative lidelse i verden, som påvirker globalt mere end 10 millioner mennesker (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Sygdommen blev første gang beskrevet af James Parkinson i 1817. Diagnostiske kriterier omfatter blandt andet bradykinesia og minimum én af symptomerne rigiditet, tremorer eller postural instabilitet (Dickson, 2012). Disse motorisk betingede symptomer er et resultat af degenerering af dopaminerge neuroner i hjerneområdet substantia nigra pars compacta (SNpc), hvilket betragtes som et neuropatologisk kendetegn for PD (figur 1.1). SNpc frigiver neurotransmitteren dopamin via projektioner til striatum, hvor dopamin har en inhiberende effekt, som regulerer striatums excitabilitet. Striatum er blandt andet involveret i bevidst kontrol og bevægelse af kroppen (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Degenerering af de dopaminerge neuroner i SNpc fører til reducerede dopaminniveauer i striatum, hvilket resulterer i nedsat inhibitorisk kontrol af striatale neuroner, der som konsekvens har øget patologisk neuronal aktivitet (Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Symptomerne opstår typisk når cirka 50% af de dopaminerge neuroner i SNpc er nedbrudt og dopaminniveau reduceret med 80-95% (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Denne neurodegeneration skyldes formentlig dannelse af Lewy Bodies (LB), hvilket er det andet neuropatologiske kendetegn for PD (Obeso *et al.*, 2010; Maiti, Manna & Dunbar, 2017). LB er unormal proteinaggregater, hovedsageligt bestående af det naturligt forekommende protein α Syn, hvis funktion under normale homeostatiske forhold i neuroner ikke er fuldt forstået. Man forventer dog det er involveret i synaptisk vesikel dynamik, frigivelse af neurotransmittere, exocytose, mitokondrie funktion og intracellulær transport (Abeliovich & Gitler, 2016; Poewe *et al.*, 2017). α Syn bliver neurotoksisk, når proteinet, oprindeligt som opløselig monomer, aggregere til oligomerer, protofibriller og til sidst uopløselige fibriller, hvilket er den form, der findes i LB (Poewe *et al.*, 2017).



Figur 1.1: Neurologiske og symptomatiske kendetegn for Parkinson's sygdom. Sunde neuroner i substantia nigra pars compacta (SNpc) har projektioner til striatum, hvor de frigiver dopamin. Ved Parkinson's ses en ophobning af Lewy Bodies, nedbrydning af nigrale neuroner og tab af

dopaminniveau i striatum. Dette medfører både motorisk og ikke-motorisk relaterede symptomer (Wirdefeldt et al., 2011).

Den præcise ætiologi og underliggende mekanismer for udvikling af PD og dertilhørende tab af dopaminerge neuroner i SNpc er endnu ikke fuldt forstået, om end genetik, miljø og aldring vides at spille kausale roller (Wirdefeldt et al., 2011). Blandt de mest fremtrædende mekanismer er misfoldning og aggregering af proteiner, mitokondriel dysfunktion, genetiske mutationer, dysfunktion i protein-nedbrydningssystemer, oxidativt stress og neuroinflammation (Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Idiopatisk PD, hvor årsagen til sygdommens opståen er ukendt, udgør cirka 85 % af tilfældene. De resterende cirka 15 % er familiær PD, som har et genetisk komponent (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Forskning i disse PD-relaterede gener har bidraget væsentligt til vores forståelse af sygdommens neuropatologiske mekanismer (Poewe et al., 2017). Punktmutationer, øget genekspression og multiplikationer af SNCA forårsager familiær PD, hvilket understøtter, at α Syn spiller en væsentlig rolle i sygdomsudviklingen (Obeso et al., 2010; Poewe et al., 2017). Andre hyppigt forekommende mutationer, der øger risikoen for familiær PD, er *PINK1* (koder for PINK1) og *PARK2* (koder for PARK2) som er involveret i kvalitetskontrol af mitokondrier medieret af mitofagi (Obeso et al., 2010; Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Neuroner er meget energikrævende celler, og derfor er mitokondriel dysfunktion i disse ofte forbundet med øget risiko for udvikling af neurodegenerative sygdomme som PD (Camandola & Mattson, 2017; Choong & Mochizuki, 2023). Mange studier har vist, at mitokondriel-dysfunktion inducerer degeneration af dopaminerge neuroner og kronisk ROS-produktion (Dong-Chen et al., 2023). Nedsat energi i dopaminerge neuroner med mitokondriel dysfunktion, kan føre til dysfunktion i proteinnedbrydningssystemer som ubiquitin-proteasom systemet (UPS) og lysosomal autofagi-systemet (LAS), herunder chaperon-medieret autofagi (CMA) og makroautofagi, som er de primære regulatoriske systemer for intracellulær homeostase af α Syn (Abeliovich & Gitler, 2016; Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Der er dog uenighed om den relative fordeling i betydning af LAS og UPS α Syn-nedbrydning (Poewe et al., 2017). UPS nedbryder misfoldede eller beskadigede proteiner som α Syn i cytosolen, ER eller nucleus, ved at polyubiquitinerer proteinet, hvilket signalerer til proteolytisk nedbrydning via proteasomet (Maiti, Manna & Dunbar, 2017). CMA er ansvarlig for selektiv nedbrydning af monomerisk α Syn ved genkendelse af et signalpeptid, som signalere til lysosomal nedbrydning (Xilouri et al., 2009). Større α Syn-aggregater nedbrydes via makroautofagi, hvor aggregater transporteres via autofagosomer til lysosomal nedbrydning (Poewe et al., 2017). Makroautofagi nedbryder effektivt mindre aggregerede former af α Syn, såsom oligomere og protofibriller, mens LB formentlig er for store til at blive nedbrudt (Webb, Ravikumar & Rubinsztein, 2004). Derfor udgør makroautofagi, CMA og UPS afgørende roller i intracellulær homeostase af α Syn, hvis dysfunktion øger risiko for α Syn-akkumulering, LB-dannelse og udvikling af PD. Omvendt kan α Syn-akkumulering også inhibere disse nedbrydningssystemer, hvilket kan skabe en negativ feedback-cyklus med stigende forstyrrelser i proteostase (Poewe et al., 2017). Endvidere er dopaminerge neuroner specielt sensitive overfor α Syn-induceret toksicitet, idet dannelsen af dopamin- α Syn-addukter yderligere hæmmer CMA og øger α Syn akkumuleringen (Obeso et al., 2010).

De underliggende cellulære og molekulære mekanismer for udvikling af PD er derfor kompleks og kræver mere viden. Til dette benyttes *C. elegans* ofte som modelorganisme, da den har vist

sig særlig nyttig til studiet af neurodegenerative sygdomme som PD (Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Gaeta, Caldwell & Caldwell, 2019; Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020).

1.2 *C. elegans* som modelorganisme

C. elegans er en lille fritlevende og ikke-parasitisk rundorm med en længde på cirka 1 mm, som typisk lever af bakterier på rådende plantemateriale. Ormen blev introduceret som modelorganisme af Sidney Brenner i 1973 (Brenner, 1973). I laboratoriet vedligeholdes populationen nemt på petriskåle indeholdende nematode growth medium (NGM), agar, samt en bakteriel fødekilde bestående af *E. coli* bakterier. *C. elegans* har en kort livscyklus på blot tre dage fra æg til kønsmoden adult ved 20 °C (Da Silva *et al.*, 2024). Ormen findes hovedsageligt som selvbefrugtende hermafroditter (XX) mens hanner (XO) forekommer sjældent ($\approx 0.2\%$), som følge af non-disjunction under meiose (Walsh, Boivin & Barr, 2020). Ormen har seks kromosomer og cirka 20.000 gener (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Under normale forhold består adulte *C. elegans* af et invariant antal somatiske celler på 959. Dette konstante celletal muliggør at observere individuel celleudvikling og differentiering fra befrugtning til voksenstadiet, og samtlige cellers udvikling er allerede kortlagt (Corsi, Wightman & Chalfie, 2015). Disse celler danner basale anatomiske systemer tilsvarende højere organismer, herunder et nervesystem med 302 neuroner, et fordøjelsessystem samt skelet- og muskellignende strukturer (Olsen & Gill, 2017). Adulte hermafroditter kan under normale betingelser producere op til 300 afkom ved selvbefrugtning, hvilket fører til genetisk identisk afkom. Dette driver *C. elegans* mod homozygositet, da to hermafroditter ikke kan parre med hinanden (Corsi, Wightman & Chalfie, 2015).

Der er udviklet en række biokemiske og molekylærgenetiske værktøjer til genetisk manipulation og screening, som gør *C. elegans* til en attraktiv og tilgængelig modelorganisme inden for genetik. Disse værktøjer inkluderer introduktion af ekstrakromosomale arrays, RNAi-medieret genknockdown, CRISPR-teknologi mm. (Frøkjær-Jensen *et al.*, 2008; Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). Desuden er *C. elegans*' genom fuldt sekventeret, og 60-80% af menneskets gener har orthologer i *C. elegans* (Corsi, Wightman & Chalfie, 2015). Disse egenskaber gør *C. elegans* velegnet som modelorganisme til studiet af sygdomme, herunder neurodegenerative lidelser som PD (Da Silva *et al.*, 2024).

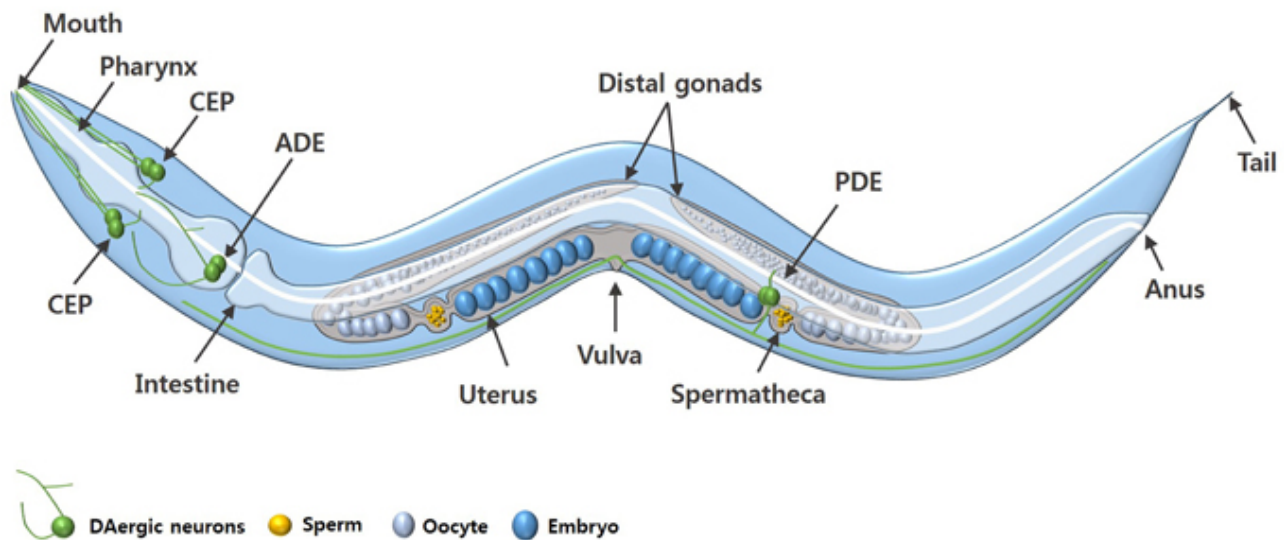
1.2.1 *C. elegans* som modelorganisme i Parkinson's

Prævalensen af neurodegenerative sygdomme stiger i takt med at gruppen af ældre vokser, som følge af at vi i dag lever længere end tidligere, hvilket øger behovet for forskningsbaserede løsninger. *C. elegans* udgør en potentiel modelorganisme til at accelerere opdagelser, der kan bidrage med at bekæmpe neurodegenerative sygdomme som Parkinson's. Pattedyrs nervesystem er enormt komplekst og består af milliarder af neuroner. Til sammenligning er *C. elegans* evolutionært set en relativ simpel organisme, men mange fundamentale cellulære mekanismer og molekylære signalveje er velbevarede, hvilket muliggør komparative studier af *C. elegans* og mennesker. *C. elegans*' nervesystem består af blot 302 neuroner, hvilket

reducerer kompleksiteten og forbedrer præcisionen i neurale analyser. Selvom strukturen og anatomien af nervesystemet hos *C. elegans* og mennesker er evolutionært divergente, er de basale funktionelle komponenter af synaptisk transmission velbevarede, herunder neurotransmittere, receptorer, transportører og ionkanaler. Hvert individ er gennemsigtig, hvilket muliggør visuelt at følge neuroners tidslige og spatiale ændringer, forårsaget af faktorer såsom mutationer, ændringer i genekspression eller miljø (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020).

Forskere har udviklet transgene *C. elegans*-stammer til brug i både forward og reverse genetics, hvor eksogent DNA inkorporeres i ormens genom eller som ekstrakromosomal array (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). Brug af transgene stammer gør det nemt og tilgængeligt, at analysere gen-funktion, -screening, -udtryk mm. (Li & Le, 2013). Transgenet er altid kontrolleret af endogene *C. elegans*-promotorer, som muliggør udtryk af transgenet i hele ormen eller specifikt væv, afhængig af promotoren (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). Et revolutionerende transgen er green fluorescens protein (GFP), der har muliggjort detaljerede undersøgelser ved brug af proteinmærkning (Corsi, Wightman & Chalfie, 2015). Et eksempel herpå er GFP som udtrykkes under *dat-1*-promotoren, som driver ekspression i dopaminerge neuroner, og tilstanden af de dopaminerge neuroner kan dermed visualiseres med fluorescensmikroskopi (Gaeta, Caldwell & Caldwell, 2019).

Af *C. elegans*' i alt 302 neuroner er 8 dopaminerge. Nedbrydning af dopaminerge neuroner er som nævnt et neuropatologisk kendetegn for PD. Derfor er degeneration af disse neuroner de primære markører, som undersøges i *C. elegans*-modeller for PD. Derudover kan andre neurale fænotyper som forsvindende aksoner, dendritter, blebbing mm. kvantificeres (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Det begrænsede antal dopaminerge neuroner, gør det muligt at udføre studier i stor skala og opnå statistisk stærke og robust data (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). Som tidligere nævnt (afsnit [1.1](#)) er det andet neuropatologiske kendetegn for PD er ophobning og aggregering af proteinet α Syn, specifikt i dopaminerge neuroner. *C. elegans* har ikke et orthologt gen for SNCA (genet for α Syn i mennesker), og transgene PD-modelstammer er derfor udviklet til at udtrykke α Syn. Disse transgene stammer udvikles ofte med α Syn og GFP kontrolleret under en dopaminerg eller panneural promoter, for at efterligne tilstanden hos PD-patienter (Li & Le, 2013; Gaeta, Caldwell & Caldwell, 2019). Fraværet af SNCA-orthologer gør brug af *C. elegans* som model for PD fordelagtig, da WT (wild type) fungerer som en α Syn-null genetisk baggrund (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020).



Figur 1.2: Dopaminerge neuroner. Generelt overblik over anatomien af en *C. elegans* hermafrodit med alle tre grupper af dopaminerge neuroner, herunder de anterior neuroner i hovedet; CEP (4) og ADE (2) og de posterior neuroner i halen; PDE (2). Dopaminerge neuroner er vigtige for registrering af mad, bevægelse og æglægning (Chege & McColl, 2014).

Opdagelsen af RNA-interferens (RNAi) revolutionerede fænotypisk analyse. Ved eksponering af en organisme til dobbeltstrengt RNA (dsRNA), kunne man nedregulere ekspression af specifikke gener. I modsætning til andre organismer, kan *C. elegans* blot fodres med genetisk modificerede *E. coli* der producerer dsRNA, hvilket gør RNAi medieret genknockdown let tilgængeligt og effektivt (Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). Effekterne af RNAi kan desuden være transgenerationelle og videreføres i tre til fem generationer. Eksponering til dsRNA over flere generationer kan føre til en akkumulering af dsRNA og forstærket fænotypisk effekt (Rechavi & Lev, 2017). RNAi-medieret genknockdown ved fodring er tilstrækkelig til at opnå knockdown af gener i de fleste væv. Dog er neuroner mindre sensitive over for RNAi, grundet lavt udtryk af membrantransporteren SID-1, som er ansvarlig for transport af dsRNA ind i cellen (Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). For at omgå denne begrænsning er der udviklet transgene *C. elegans*-stammer, som udtrykker SID-1 i neuroner, hvilket muliggør optagelse af dsRNA og effektiv knockdown af gener specifikt i neuroner (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Et eksempel på en sådan transgen stamme er UA196, som udtrykker GFP, α Syn og *sid-1* i dopaminerge neuroner (Wormbase, n.d.1).

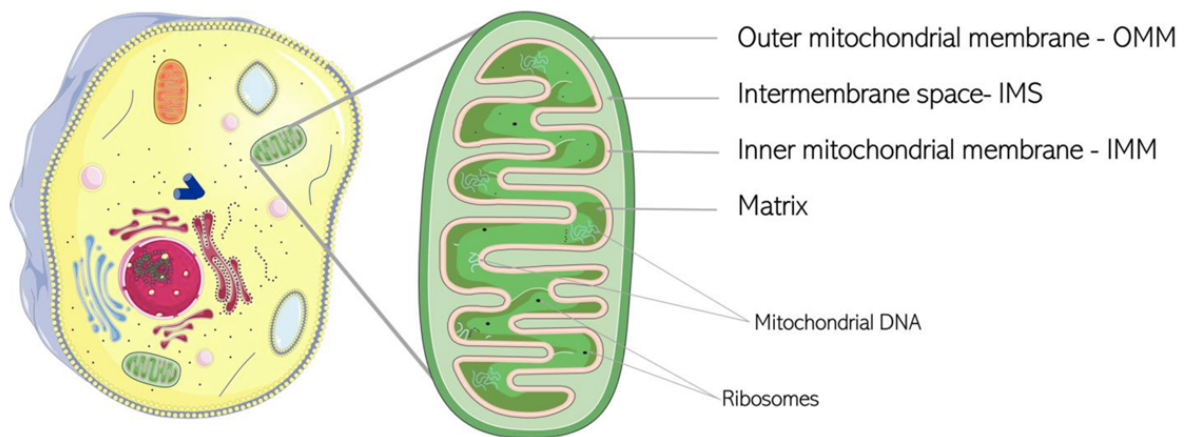
C. elegans' gennemsigtighed, invariable lave antal neuroner, korte livscyklus, homozygotiske populationer, let tilgængelige værktøjer for genetisk manipulation og mulighed for visualisering af det mitokondrielle netværk gør den til en værdifuld modelorganisme til forskning af neurodegenerative sygdomme som Parkinson's (Li & Le, 2013; Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020).

1.3 PINK1/PARK2 og mitokondrier

1.3.1 Generel funktion af mitokondrier

Mitokondrier er organeller der findes i langt de fleste eukaryote celler, og spiller en vigtig rolle i funktioner som produktion af ATP, regulering af metaboliske signalveje, ion-homeostase, apoptose, stressrespons, ROS produktion og forbrug mm. (Brand *et al.*, 2013).

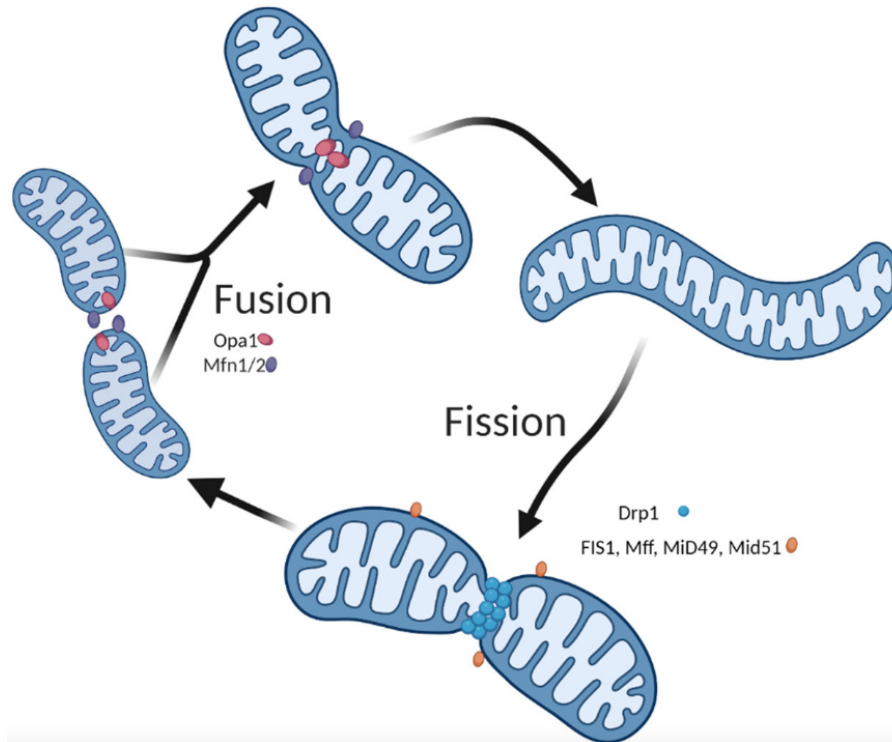
Mitokondrier er strukturelt karakteriseret ved to membraner; en ydre membran (OMM), indre membran (IMM) og det intermembranøse rum (IMS) (figur 1.3). På indersiden af IMM findes den mitokondrielle matrix, der indeholder mitokondrielt DNA (mtDNA) og ribosomer. mtDNA koder for proteiner, som udgør kernekomponenter af mitokondriens respiratoriske kompleks I–IV indlejret i IMM, som er ansvarlig for ATP-produktion gennem oxidativ fosforylering (Friedman & Nunnari, 2014; Campbell & Zuryn, 2024). Komplekserne indgår i elektrontransportkæden og samarbejder med Krebs' cyklus i mitokondriets matrix ved at benytte de reduktionsækvivalenter, som dannes i cyklussen. Elektrontransporten gennem kompleks I–IV pumper protoner fra matrix til IMS, hvilket skaber en elektrokemisk gradient, som driver ATP-produktion i kompleks V (Friedman & Nunnari, 2014).



Figur 1.3: Strukturen af et mitokondrie består af en dobbeltmembranstruktur, med en ydre membran (OMM), indre membran (IMM) og det intermembranøse rum (IMS). Bag IMM findes mitokondriets matrix, hvor mitokondrielle enzymer, mtDNA og ribosomer findes (Friedman & Nunnari, 2014)..

Mitokondrier er dynamiske organeller, der typisk organiserer sig i et rørformet netværk i cellen. Netværket udviser høj morfologisk plasticitet, og undergår konstant forandring for at opretholde strukturel integritet og funktion. Disse ændringer er medieret af processerne fusion og fission, hvis dynamik er kritisk for mitokondriel kvalitetssikring, og tilpasses cellens specifikke behov (Leduc-Gaudet *et al.*, 2021; Campbell & Zuryn, 2024) (figur 1.4). Fusion og fission er konstant i modvægt, hvor aktivering af den ene proces typisk modsvares af inaktivering af den anden (Liu *et al.*, 2020). Fusion er sammensmeltning af to eller flere mitokondrier, til et sammenhængende netværk. Dette muliggør interorganel kommunikation og samarbejde (Friedman & Nunnari, 2014). Desuden muliggør fusion, at sunde mitokondrier kan kompensere for skader på defekte mitokondrier og proteiner, ved at dele intakte proteiner, lipider og mtDNA. Dette bidrager til at øge cellens stresstolerance (Campbell & Zuryn, 2024). Fusion resulterer generelt i øget mitokondrielt membranpotentiale, oxidativ fosforylering og ATP-produktion (Liu *et al.*, 2020). Fusion reguleres primært af dynamin-relaterede guanin

trifosfater (GTPaser), som sidder på IMM og OMM. I *C. elegans* indebærer dette FZO-1 (ortholog til human MFN1 og MFN2) og EAT-3 (ortholog til human OPA1) (Campbell & Zuryn, 2024).



Figur 1.4: Mitokondrier er dynamiske organeller, der er i stand til at ændre sin morfologi gennem processerne fusion og fission. Fusion resulterer i sammensmeltede mitokondrier der er mere elongerede og sidder i netværk. Fission resulterer i fragmenterede mitokondrier, der består af flere mindre enheder. Fusion reguleres primært af Opa1, Mfn1 og Mfn2. Fission reguleres primært af Drp1 (Leduc-Gaudet *et al.*, 2021)

Fission er den modsatte proces af fusion, hvor mitokondrierne opdeles til flere mindre adskilte enheder. Fission er nødvendig for at bevare mitokondrie funktion og sundhed ved at muliggøre fjernelse af beskadigede mitokondrier via mitofagi, samt ved at fremme regenerering og biogenese af nye mitokondrier (Campbell & Zuryn, 2024). Yderligere bidrager fission til fordeling af mitokondrierne, og transporterer dem til områder med stort energibehov (Friedman & Nunnari, 2014). Fission er primært reguleret af dynamin-relaterede guanin trifosfater, som i *C. elegans* inkluderer DRP-1 (ortholog til human DRP1). Reduceret fission resulterer typisk i stærkt elongeret, netværkslignende mitokondriel struktur, fejl i oxidativ fosforylering og tab af mtDNA (Liu *et al.*, 2020). Omvendt resulterer mutationer i fusionsregulerende gener som *fzo-1* og *eat-3* i små hyper-fragmenterede mitokondrier, hvilket typisk resulterer i nedsat membranpotentiale og ATP-produktion (Liu *et al.*, 2020; Campbell & Zuryn, 2024). Ændringer som disse undersøges typisk ved hjælp af membranpotentiale-afhængige fluorescerende prober, som MitoTracker, i kombination med fluorescensmikroskopi, hvilket muliggør visualisering og kvantificering af ændringer i mitokondrie-netværket (Perry *et al.*, 2011)

En velreguleret balance mellem fission og fusion er essentiel for organismen, og dysregulering kan føre til ophobning af beskadigede mitokondrier og nedsat cellulær funktion hvis ikke de fjernes (Friedman & Nunnari, 2014).

1.3.2 PINK1/PARK2 medieret kvalitetskontrol af mitokondrier

Mitokondrier udsættes kontinuerligt for genetiske og miljømæssige stressfaktorer der beskadiger mitokondrierne, der ved ophobning kan føre til mitokondriel dysfunktion. Disse inkluderer ROS-produktion inde i mitokondriet, mtDNA mutationer, nedsat membranpotentiale, misfoldede proteiner, toksiner der inhiberer den oxidative fosforylering osv. (Friedman & Nunnari, 2014; Pickrell & Youle, 2015). Alle disse følger er impliceret i udvikling af eller beskyttelse mod sygdom (Brand *et al.*, 2013). For at undgå ophobning af beskadigede organeller, er der udviklet en række stress- og kvalitetssikrings signalveje, som identificerer og responderer på mitokondriel og cellulær dysfunktion (Friedman & Nunnari, 2014).

En vigtig mekanisme i denne kvalitetssikring er fission, som muliggør adskillelse af beskadigede mitokondrier, der herefter kan fjernes via mitofagi. Ved denne proces fjernes mitokondrier af LAS, som regulæres især af E3 ubiquitin-protein ligasen PARK2 og PTEN-induceret kinase 1 PINK1, som kodes af hhv. *PARK2* og *PINK1* i mennesker (Campbell & Zuryn, 2024). PINK1/PARK2-systemet fungerer som en essentiel kvalitetskontrollmekanisme, som sikrer at beskadigede eller dysfunktionelle mitokondrier identificeres, mærkes og fjernes. Velfungerende kvalitetssikring af mitokondrier, er specielt vigtigt i celler med højt energibehov såsom neuroner og i højere grad dopaminerge neuroner, da de typisk har øget ROS og oxidativt stress (Pickrell & Youle, 2015; Filograna *et al.*, 2021). Mutationer i *PARK2* og *PINK1* øger derfor risikoen for autosomal-recessive former for PD, formentlig medieret af nedsat mitokondrie kvalitetskontrol (Cooper & Van Raamsdonk, 2018).

Under normale omstændigheder importeres PINK1 konstant til funktionelle mitokondrier gennem TOM-komplekset i OMM, hvor det kløves af proteaser i TIM-komplekset i IMM (Pickrell & Youle, 2015). Herefter frigives det til cytosolen med en N-terminal fenylalanin-rest som dermed hurtigt nedbrydes af proeasomet. Ved nedsat membranpotentiale, typisk i beskadiget mitokondrier, blokeres PINK1 importen gennem TOM-komplekset, hvilket medfører ophobning af PINK1 på OMM (Bayne & Trempe, 2019). Denne ophobning aktiverer PINK1, som herefter fosforylerer ubiquitin og PARK2. Dette rekrutterer PARK2, som ubiquitinerer mitokondriet, hvilket fungerer som signal for autofagiske adapterproteiner, som rekrutterer autofagosomer til at omslutte mitokondriet, og transportere det til lysosomal nedbrydning (Pickrell & Youle, 2015). PINK1/PARK2 kan derfor anses som værende et simpelt men effektivt system til kvalitetssikring og selektiv fjernelse af mitokondrier gennem et positivt feedbackmekanisme, og er derfor et evolutionært konserveret system (Agarwal & Muqit, 2022).

1.3.3 Homologi mellem *C. elegans*' *pdr-1/pink-1* og menneskers *PARK2/PINK1*

Biologien bag mitokondriers struktur, funktion og dynamik udviser høj grad af evolutionær konservering på tværs af eukaryoter. Mange af de molekylære signalveje og mekanismer bag mitokondriets dynamik er velbevaret mellem mennesker og lavere organismer, som fx nematoder. Dette muliggør anvendelse af *C. elegans* som modelorganisme, til effektivt at undersøge mitokondriers funktion (Campbell & Zuryn, 2024).

C. elegans, har ét orthologt gen for både human *PINK1* og *PARK2* kodet af hhv. *pink-1* og *pdr-1* (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Ligesom i pattedyr er mitofagi induceret af PINK-1/PDR-1

som respons på mitokondriel stress (Schiavi *et al.*, 2015). Deres funktion indikerer at være evolutionært velbevaret, da *pink-1* og *pdr-1* *C. elegans* mutanter udviser nedsat respiration og ATP-produktion, som indikerer mitokondriel dysfunktion medieret af nedsat mitokondriel kvalitetskontrol af PINK-1 og PDR-1, på samme måde som i pattedyr (Da Silva *et al.*, 2024). Yderligere resulterer *pink-1* og *pdr-1* knockdown i, at ældre orme udviser ændret morfologi af det mitokondrielle netværk, beskadiget mtDNA, nedsat oxidativ fosforylering samt ophobning af PINK-1 på beskadiget mitokondrier (Schiavi *et al.*, 2015; Cooper & Van Raamsdonk, 2018).

Disse observationer indikerer, at *C. elegans* har et evolutionært konserveret og funktionelt tilsvarende system af regulatoriske gener for mitofagi og kvalitetssikring af mitokondrier, herunder *pink-1* og *pdr-1* (Schiavi *et al.*, 2015).

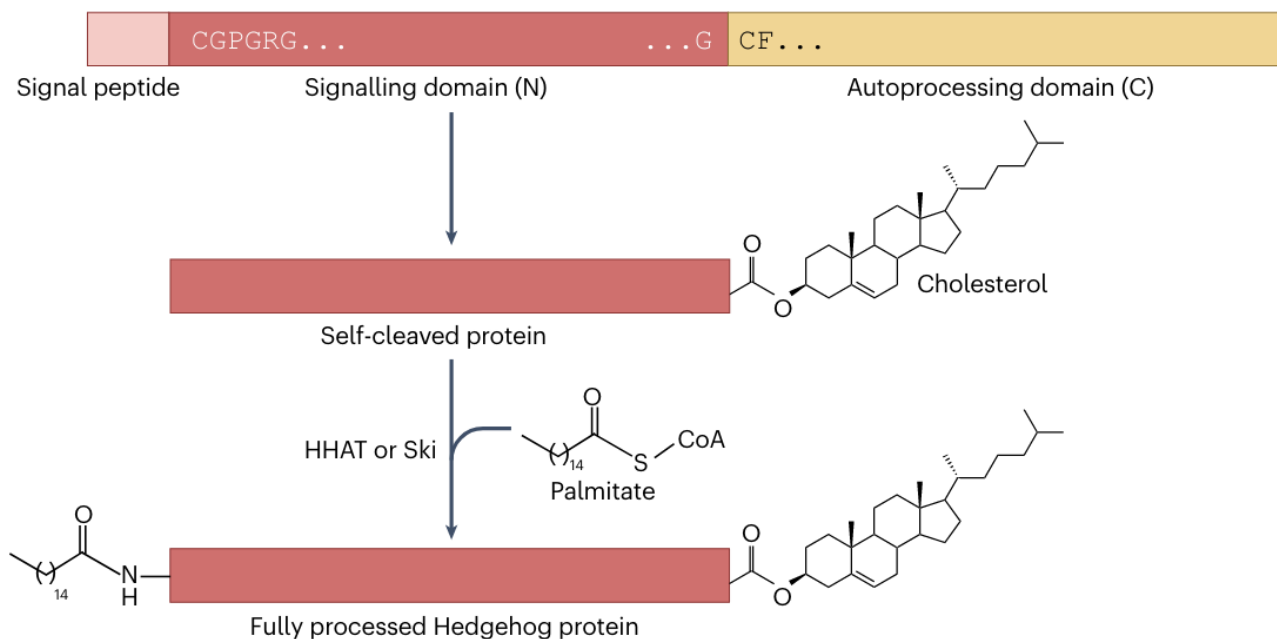
1.4 Hedgehog-signalvejen

I 1970 identificerede C. Nüsslein-Volhard og E. F. Wieschaus mere end 50 forskellige gener, som havde direkte betydning for embryonal udvikling i *Drosophila melanogaster*. Mutation af et af disse gener resulterede i, at fluelarverne fik hårlignende børster, der gav dem et pindsvinelignende udseende, hvilket førte til, at genet fik navnet Hedgehog. I 1993 blev de tre paraloge gener identificeret i vertebrater: Sonic Hh (*Shh*), Indian Hh (*Ihh*) og Desert Hh (*Dhh*) (Briscoe & Théron, 2013).

Hedgehog-gener fungerer som centrale regulatorer i embryonal udvikling, hvis aktivitet som morfogen er afgørende for kropsplanen i både vertebrater og invertebrater (Ingham & McMahon, 2001). Yderligere spiller de en essentiel rolle i celledifferentiering, celledeling, vækst, vævsmønsterdannelse, regenerering af væv og udvikling af hjernen, blandt andet ved neural celledifferentiering (Rash & Grove, 2007; Heretsch, Tzagkaroulaki & Giannis, 2010; Briscoe & Théron, 2013). Derudover er det vist, at Hh-signalering har neurobeskyttende egenskaber, som styrker neuroners evne til at håndtere cellulært stress, der potentielt kan beskytte mod neurodegenerative sygdomme som PD (Chen *et al.*, 2018). Hh-signalering indgår således i en bred vifte af fysiologiske processer, både under organismens udvikling og vedligeholdelse.

1.4.2 Modning af Hedgehog-liganderne Shh, Ihh og Dhh i vertebrater

De centrale komponenter af Hh-signalering er stærkt konserverede på tværs af store dele af dyreriget. Der ses dog evolutionær divergens i hvordan signalvejen implementeres og reguleres inden for de fylogenetiske grupper (Ingham, Nakano & Seger, 2011). I pattedyr reguleres Hh-signalvejen af de tre ligander Shh, Ihh og Dhh, som via en signaleringskaskade regulerer aktiviteten af transkriptionsfaktorerne Gli1, Gli2 og Gli3, der enten hæmmer eller aktiverer udtryk af Hh-målgener (Briscoe & Théron, 2013).



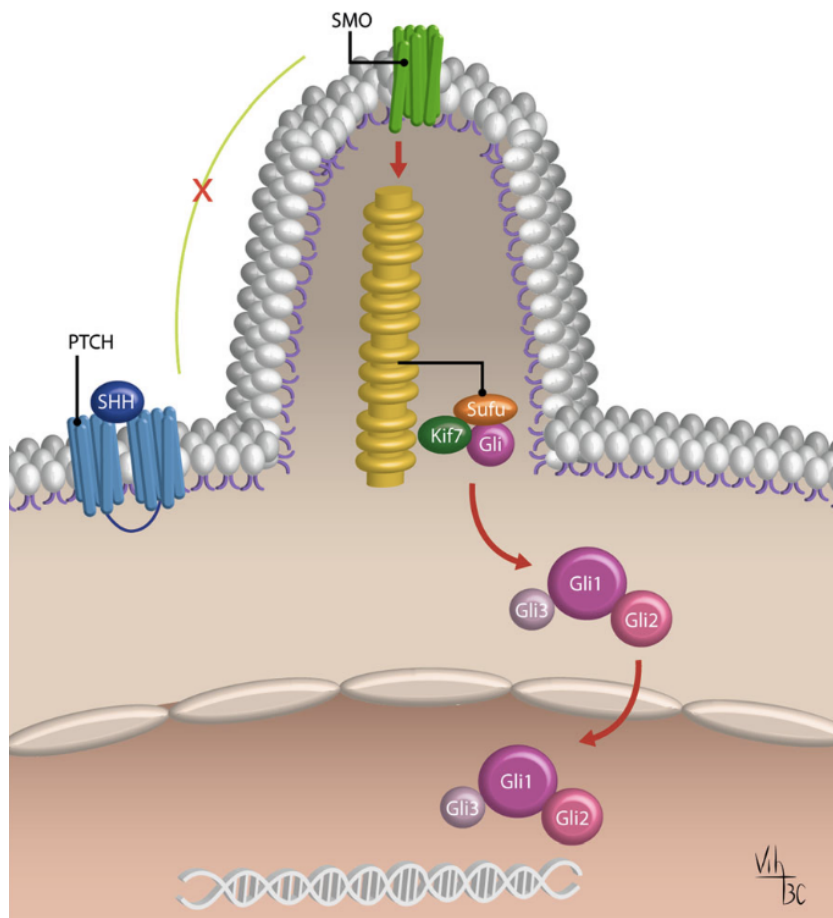
Figur 1.5: Modning af Hh-ligander. Hh-liganden undergår posttranslationelle modifikationer: autoproteolytisk kløvning mellem glycine og cysteine, som frigiver det N-terminale signaleringsdomæne, og binder kolesterol kovalent til domænets C-terminale glycine samt palmitoylering af den N-terminale cysteine via enzymet Hedgehog acyltransferase (Hhat). Modifieret fra: (Zhang & Beachy, 2023).

Hh-proteinerne består af to hoveddomæner: et N-terminal signaleringsdomæne, som står for den aktive signalering (Hedge-domænet), og et C-terminalt selvkløvende domæne (Hog-domænet) (figur 1.5) (Bürglin, 2008). Shh, Ihh og Dhh gennemgår posttranslationelle lipidmodifikationer i den Hh-producerende afsendercelle, hvilket er afgørende for effektiv signalering. Først fjernes det N-terminale signaldomæne fra forstadie-polypeptiderne, hvorefter der sker en autoproteolytisk kløvning mellem glycine og cysteine. Denne kløvning frigiver det N-terminale signaleringsdomæne, og tillader kovalent binding af en kolesterol til domænets C-terminale glycine. Kolesterolen øger ligandens hydrofobicitet og forankrer det til afsendercellens plasmamembran. Efterfølgende palmitoylerer enzymet Hedgehog acyltransferase (Hhat) den N-terminale cysteine, hvilket yderligere øger ligandens hydrofobicitet og fuldender modningen af Shh, Ihh eller Dhh (Heretsch, Tzagkaroulaki & Giannis, 2010; Zhang & Beachy, 2023). Uden denne Hhat-medierede palmitoylering er signalstyrken og rækkevidden af Hh-signalet væsentligt nedsat, hvilket gør lipidmodifikationen til et kritisk trin. Efter modning frigives Hh-liganderne fra afsendercellens plasmamembran via transportproteinet Dispatched (Disp) og transporteres til modtagercellen (Zhang & Beachy, 2023).

1.4.3 Hedgehog-signalvejen i vertebrater

Når Hh-ligander ankommer til modtagercellen og igangsætter Hh-signaleringen, øger det ekspressionen af Hh-målgener. I vertebrater foregår størstedelen af Hh-signaleringen i primære cilia, som er antennelignende mikrotubuli-baserede udvækster af plasmamembranen, som

findes i en kopi i de fleste hvilende eukaryotiske celler (figur 1.6). Det primære cilia fungerer som centrale platforme for cellemekommunikation og signalering, og korrekt længde og formation er essentiel for Hh-signaleringskaskade (Carballo *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2022). I fraværet af Hh-ligander hæmmer receptoren Patched (Ptch) aktiviteten af transmembranproteinet Smoothened (Smo) (Carballo *et al.*, 2018). Når Hh-signaleringskaskaden er inaktiv, eksisterer Smo i to forskellige konformationer (SmoA og SmoB), som ændres til hinanden i en dynamisk ligevægt. Signaleringskaskaden initieres, når en Hh-ligand binder sig til Ptch, hvilket fører til endocytose af Ptch fra det primære cilia og efterfølgende lysosomal nedbrydning. Fjernelse af Ptch fra det primære cilia ophæver inhiberingen af Smo, hvilket medfører en konformationel ændring af den inaktive SmoB til den aktive form SmoC, som akkumuleres i det primære cilia. Dette initierer den nedstrøms Hh-signaleringskaskade, som ender med aktivering af transkriptionsfaktorerne Gli1, Gli2 og Gli3 (Heretsch, Tzagkaroulaki & Giannis, 2010; Carballo *et al.*, 2018).



Figur 1.6: Aktivering af Hh-signaleringskaskaden medieret af Shh i vertebrater. Aktivering sker når SHH-liganden bindes til PTCH-receptoren på cellemembranen. Som respons på dette, stoppes PTCH-inhiberingen af SMO, som aktiveres og akkumuleres i det primære cilia. Dette resulterer i en nedstrøms signaleringskaskade. Når Gli1, Gli2 og Gli3 er aktiveret, translokeres de til cellekernen, hvor de aktiverer ekspresion af Hh-målgener (Carballo *et al.*, 2018).

I fravær af Hh-ligander binder Suppressor of Fused (SUFU) sig til Gli2/3, hvilket forhindrer deres translokation til cellekernen. Denne interaktion muliggør, at kinaser kan fosforylere Gli2/3, så de proteolytisk spaltes til deres repressorform Gli-R, som hæmmer ekspresion af Hh-målgener. Gli1 er dog altid aktiv og aktiverer transskription af Hh-målgener, som dermed holder signalvejen funktionel (Carballo *et al.*, 2018). Ved aktiv Hh-signaleringskaskade hæmmes kinaserne af

SmoC, hvilket stabiliserer Gli2/3 til deres aktive form (Gli-A), og Gli1/2/3 translokeres til cellekernen og aktiverer ekspressionen af Hh-målgene, herunder *Gli1* og *Ptch1*, som dermed både leder til positiv og negativ feedbackmekanisme af Hh-signalvejen (Heretsch, Tzagkaroulaki & Giannis, 2010).

1.4.4 Hedgehog-signalvejen i *C. elegans*

I *C. elegans* har Hh-signalering undergået en betydelig evolutionær divergens. Mange af de centrale komponenter af Hh-signalvejen er fraværende, herunder homologer af Hh-ligander, signalproteinerne Smo og Fusu. Dog findes Hh-receptoren Ptch stadig, repræsenteret af to orthologer, *ptc-1* og *ptc-3*, samt et pseudogen, *ptc-2*. Yderligere findes 24 *ptc*-relaterede (*ptr*) gener i *C. elegans*, hvor pattedyr kun har ét (Burglin, 2006). Transkriptionsfaktorerne Gli1/2/3, der fungerer nedstrøms for Hh-signalering i pattedyr, har én homolog i *C. elegans*, *tra-1* (Jenkins, 2009). *C. elegans*' genom koder for 60 proteiner, der formodes at være evolutionært relaterede til Hh-ligander. Disse proteiner kaldes Hh-relaterede (*Hh-r*), og opdeles i fire familier; *Ground-like* (*grl*), *Warthog* (*wrt*), *Groundhog* (*grd*) og *Quahog* (*qua*) (Serra, Darwin & Sundaram, 2024). Langt størstedelen af disse Hh-r proteiner er endnu uudforsket, og deres molekylære funktion har længe være et mysterium (Emans *et al.*, 2023; Serra, Darwin & Sundaram, 2024). Indtil videre er kun 14 *Hh-r* gener blevet mekanistisk karakteriseret, og blot to af disse er fundet funktionelt associeret med *ptc/ptr*-gener (Emans *et al.*, 2023).

Hh-r og *ptc/ptr*-gener er blevet forbundet med forskellige funktioner inden for udvikling og fysiologi, hvoraf de bedst understøttede er regulering af hamskifte samt organisering af den apikale ekstracellulære matrix (Serra, Darwin & Sundaram, 2024). Enkelte Hh-r proteiner indeholder det autoproteolytiske C-terminale domæne (Hog-domænet), som ses hos pattedyrs Hh-ligander (Burglin, 2006). Det N-terminale signaleringsdomæne (Hedge-domænet), der interagerer med Ptch hos pattedyr, er dog fraværende i samtlige Hh-r proteiner i *C. elegans* (Burglin, 2006; Serra, Darwin & Sundaram, 2024). Hos pattedyr, når Hh-ligandernes Hedge-domæne interagerer med Ptch, ophæves inhiberingen af Smo. Eftersom Hh-r proteinerne mangler dette domæne, kan de ikke aktiverer Ptc/Ptr-proteinerne. Funktionen af *ptc/ptr* i *C. elegans* er derfor uklar (Zugasti, Rajan & Kuwabara, 2005). Den omfattende udvidelse af både *Hh-r* og *ptc/ptr*-genfamilierne i *C. elegans* antyder dog, at der kan eksistere en ukendt form for interaktion mellem disse proteiner (Serra, Darwin & Sundaram, 2024). Forstyrrelse i genfunktion af *Hh-r* og *Ptc/Ptc-r* resulterer i lignende fænotyper, hvilket indikerer, at de fungerer agonistisk i samme processer, i modsætning til antagonistisk, som det ses i pattedyr. Disse fænotyper involverer defekter i hamskifte, haleudvikling og vækst (Jenkins, 2009).

Samlet set illustrerer dette, at Hh-signaleringen i *C. elegans* har undergået en betydelig evolutionær divergens sammenlignet med pattedyr, selvom kernekomponenter som *Ptch*- og *Gli*-homologer samt Hh- og *Ptch*-lignende gener stadig observeres i *C. elegans*, mangler der fortsat grundlæggende forståelse for funktion og bagvedliggende mekanismer af Hh-r og PTC/PTR-proteinernes aktivitet (Emans *et al.*, 2023; Serra, Darwin & Sundaram, 2024).

1.5.1 Baggrund

Dette projekt er startet på baggrund af præliminære og meget spændende observationer af forhøjet Hh-signalering i fibroblast-celler af PD-patienter med sygdomsfremkaldende varianter i *PINK1* (*PINK1* $-/-$) og *PARK2* (*PARK2* $-/-$) (Birk Møller, ikke publiceret).

Den kausale sammenhæng mellem *PINK1*/*PARK2* og udvikling af PD medieret af mitokondriel dysfunktion er velfunderet (Pickrell & Youle, 2015).

En sammenhæng mellem PD og Hh-signalering er tidligere rapporteret. Nogen studier finder at Hh-signalering bidrager til udvikling af PD (Schmidt *et al.*, 2022), hvorimod andre viser, at nedsat Hh-signalering fører til mindre neurobeskyttelse af dopaminerge neuroner, som fremmer udvikling af PD (Khan *et al.*, 2024). Yderligere undersøgelser er derfor nødvendige til at bestemme, om Hh-signalering har en neurotoksisk eller neurobeskyttende effekt. Vores forståelse af denne potentielle sammenhæng og de underliggende mekanismer er derfor mangelfuld (Schmidt *et al.*, 2022).

Sammenhængen mellem PD og Hh-signalering kan potentielt være medieret af *PINK1*/*PARK2*, men indtil videre er der ikke blevet dokumenteret en direkte kausal sammenhæng. Kun enkelte studier har indikeret direkte interaktioner mellem Hh-signalering og mitokondrier (Yao *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2022).

1.5.2 Formål

Dette projekt har til mål at undersøge: i) om der er en potentiel korrelation mellem Hh-signalering og *PINK1*/*PARK2*, og ii) om denne medierer udviklingen af PD, og dermed bidrage til vores forståelse af sammenhængen mellem Hh-signalering og PD.

Dette leder til følgende forskningsspørgsmål:

1. Er Hh-signalering korreleret med udvikling af PD?
2. Påvirker Hh-signalering (positivt eller negativt) dopaminerge neuroner?
3. Er Hh-signalering korreleret med *PINK1*/*PARK2*?

Disse spørgsmål vil blive undersøgt ved at udføre RNAi medieret genknockdown af Hh-generne *hhat-2* (homolog til human *HHAT*) og *grl-1* (relateret til humane Hh-ligander SHH, IHH og DHH) samt *pdr-1* (ortholog til human *PARK2*) i forskellige transgene stammer af *C. elegans* (Hao *et al.*, 2006; Kolotuev, Apaydin & Labouesse, 2009; Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Effekt kvantificeres via dopaminerge neurodegeneration-assay, mitokondriemorfologi-assay og af *tra-1* ekspressions-assay. Funktionen af *hhat-2* i *C. elegans* er ikke velundersøgt, men den er formentlig involveret i modning af Hh-r proteiner (Kolotuev, Apaydin & Labouesse, 2009). *grl-1* koder for et Hh-r protein, som udtrykkes i lumbare ganglions i haleregionen, men funktionen er ukendt (Wormbase, u.d.2). *pdr-1* og er involveret i kvalitetskontrol af mitokondrier gennem mitofagi, og mutationer er associeret med øget risiko for autosomal recessiv PD (Cooper & Van Raamsdonk, 2018).

2 Metode

2.1 *C. elegans* stammer

Tabel 2.1: Alle anvendte *C. elegans* stammer og deres genotype og fænotype.

Stamme navn og genotype	Fænotype
<u>DZ840</u> <i>tra-1</i> (ez72[biotag::GFP::TEV::3xflag:: <i>tra-1</i>]) III.	TRA-1 mærket med GFP.
<u>UA196</u> <i>sid-1</i> (pk3321); <i>baln33</i> [<i>Pdat-1</i> :: <i>sid-1</i> , <i>Pmyo-2</i> ::mCherry]; <i>baln11</i> [<i>Pdat-1</i> ::GFP, <i>Pdat-1</i> :: α -syn]	Aldersbetinget α Syn-induceret toksicitet i dopaminerge neuroner. GFP udtrykt i dopaminerge neuroner og mCherry udtrykt i pharynx.
<u>UA202</u> <i>sid-1</i> (pk3321); <i>baln36</i> [<i>Pdat-1</i> :: <i>sid-1</i> , <i>Pmyo-2</i> ::mCherry]; <i>vtls7</i> [<i>Pdat-1</i> ::GFP]	GFP udtrykt i dopaminerge neuroner og mCherry udtrykt i pharynx.
<u>RB2547</u> <i>pink-1</i> (ok3538) II.	Nedsat PINK-1-afhængig mitofagi og kvalitetskontrol af mitokondrier
<u>N2, Wild type</u>	

2.1.1 Vedligehold af *C. elegans* stammer

Alle stammer blev vedligeholdt på Nematode Growth Media (NGM) plader spottet med bakterien *Escherichia coli* stamme OP50. For at undgå overpopulation og fødemangel blev ca. 20 æg overført til nye OP50-plader to gange ugentligt, hvilket sikrede kontinuerlig adgang til føde (ad libitum).

NGM-plader blev fremstillet ved at opløse 2,5 g sojapeptone, 17 g agar og 3 g NaCl til 1L ELGA-vand. Blandingen blev hældt i en bluecap-flaske med magnet og autoklaveret. Efter afkøling til cirka 55 °C, blev 25 mL 1 M KPO₄, 1 mL 1 M CaCl₂, 1 mL 1 M MgSO₄ og 1 mL 5 mg/mL kolesterol i EtOH tilføjet. Efterfølgende blev cirka 5 mL medie hældt i 30 mm petriskåle, som tørrede i to døgn, før de blev spottet med OP50.

OP50 blev groet via overnight (ON) kultur, ved at tilføje én koloni af OP50 til 5 mL autoklaveret 25 g/L Luria Broth (LB) medie i ELGA-vand og inkuberet ved 37 °C og 190 rpm (revolutions per minute). Dagen efter blev NGM-pladerne spottet med to dråber OP50 centralt på pladen. Disse stod i to dage for at reducere overskydende fugt og sikre tilstrækkelig bakteriel vækst, således ormene fodres ad libitum. Pladerne blev opbevaret i en åben kasse ved stuetemperatur ved cirka 21°C. Vedligeholdte plader med *C. elegans* blev forseglet med parafilm og opbevaret i mørke ved 20 °C i lukkede bokse.

2.1.2 Fænotypisk verificering af stammer

UA202 og UA196 bærer begge transgenet *Pmyo-2*::mCherry, der fungerer som markør for tilstedeværelsen af transgenet. mCherry er et rødt fluorescerende protein, der i dette tilfælde

udtrykkes under kontrol af *myo-2* promotoren, som er specifikt for musklerne i pharynx. Samtidig indeholder de begge transgenet *Pdat-1::GFP*. GFP er en grøn fluorescerende proteinmarkør, som i dette tilfælde udtrykkes under kontrol af *dat-1* promotoren, hvor *dat-1* koder for en dopamintransporter som findes specifikt i dopaminerge neuroner som fx Cephalic sensilla dopaminerge neuroner (CEP). UA202 og UA196 kan derfor verificeres via fluorescensmikroskopi for tilstedeværelsen af GFP og mCherry i hhv. CEP neuroner og pharynx, om end genotypisk verificering er nødvendig for at adskille dem fra hinanden.

DZ840 blev delvist verificeret via fluorescensmikroskopi, ved visuelt og kvantitativt at bekræfte for tilstedeværelsen af GFP-signal i hale- og hovedregion sammenlignet med N2 (WT, wild type). Yderligere viste DZ840-hanner mindre GFP signal i hale- og hovedregionen sammenlignet med hermafroditter (Salzberg *et al.*, 2020) hvilket delvist verificere stammen. Fremtidig genotypisk verificering af stammerne er nødvendig, herunder RB2547.

2.2 Funktionel analyse af gener via RNAi-medieret genknockdown

For at undersøge geners funktionelle rolle i *C. elegans*, kan man anvende RNA interference (RNAi) til målrettet at reducere proteinsyntese af specifikke gener, og dermed lave en funktionel genanalyse. I dette projekt leveres RNAi via fodermetoden, hvor *C. elegans* fodres med en genetisk modificeret *E. coli* stamme (HT115(DE3)). Denne stamme adskiller sig fra standardfoderbakterien OP50, ved at indeholde en T7-promoterstyret vektor, som udtrykker ampicillin resistens og dsRNA målrettet mod et specifikt *C. elegans* gen. Dette dsRNA igangsætter den endogene RNAi-mekanisme, hvilket medfører nedregulering af det tilsvarende genprodukt (Timmons, Court & Fire, 2001).

2.2.1 Fremstilling af LB-plader

20 g Luria agar (lysogeny broth) blev opløst i 500 ml MQ-vand og autoklaveret. Efter nedkøling til cirka 50 °C tilsattes 500 uL ampicillin (100 mg/mL) og 500 uL tetracyclin (12 mg/mL). Mediet blev efterfølgende hældt i petriskåle, som lades tørre ved cirka 21 °C natten over. Brønd med ønskede bakterie prikkes med steril nål og stryges på LB plader. Disse stod natten over ved cirka 21 °C.

2.2.2 Fremstilling af RNAi-plader

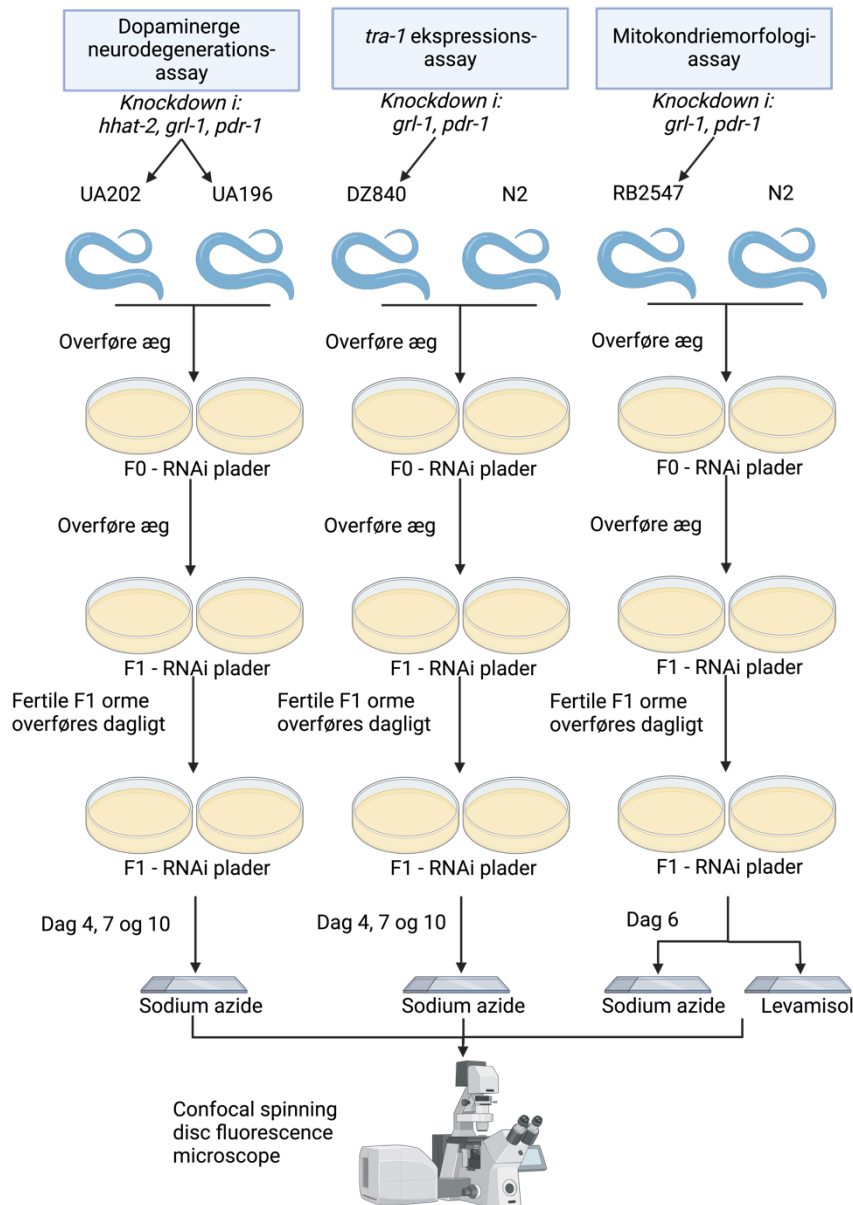
RNAi plader blev fremstillet ved at tilføje 100 mg/mL ampicillin og 1 M IPTG til NGM-medie umiddelbart efter autoklaving, når temperaturen var faldet til cirka 55 °C. IPTG inducerer ekspressionen af T7-RNA polymerase ved at fjerne repressoren i plasmidet, som indeholder T7 vektoren. Dette resulterer i dsRNA produceret af T7-RNA polymerase, som specifikt nedregulerer ekspression af det gen, hvis funktion undersøges. Ampicillin er et bred-spektrums antibiotika, som i RNAi-pladerne hæmmer væksten af uønskede bakterier og selekterer for bakterier indeholdende T7-vektoren, da de har tendens til at smide det (Timmons, Court & Fire, 2001).

Efter de valgte kloner har dannet bakteriekolonier på LB plader, blev én bakteriekoloni overført til LB-medie med tilsætning af ampicillin 100 mg/ml og inkuberet natten over i rystebord ved 37 °C og 190 rpm for at lave ON. Samtidig blev der lavet en ON uden tilsat bakteriekultur, som negativ kontrol for at kontrollere for kontaminering. Alle trin gøres i LAF bænke. Dagen efter blev RNAi-pladerne spottet med to dråber ON kulturer i LAF bænken og opbevaret ved cirka 21 °C i to dage og derefter opbevares i køleskab ved cirka 5 °C. For at verificere, at RNAi-klonerne var korrekte, blev plasmider oprenset med et miniprep-kit, og prøverne blev sendt til Tyskland til Sanger-sekventering.

2.2.3 RNAi medieret knockdown via foddermetoden og inducering af transgenerationelle effekter

For at undersøge effekten af *hhat-2*, *pdr-1* og *grl-1* blev *C. elegans* fodret med *E. coli* kloner, som inducerer RNAi-medieret knockdown af det ønskede gen transkription i ormen. Udvælgelsen af to Hh-gener blev foretaget ved et RNAi-screen af otte forskellige Hh-gener i N2 (WT) over to generationer. *hhat-2* blev udvalgt da denne udviste en tydelig fænotype i form af færre lagte æg, mens *grl-1* blev valgt som et gen med en mindre tydelig fænotype.

For at sikre tydelige fænotyper, blev ormene fodret med dsRNA over to generationer (F0 og F1), da effekterne af RNAi kan være transgenerationelle og dsRNA kan akkumuleres over flere generationer og forstærke fænotypen (Rechavi & Lev, 2017). Cirka 30 æg fra de vedligeholdte stammer blev overført pr. RNAi-plade (F0) (figur 2.2). Efter 4 dage blev yderligere 30 æg fra F0 overført til nye RNAi-plader med samme klon (F1). For at alderskontrollere ormene og undgå forveksling mellem F1-orme og deres afkom, blev F1-orme dagligt overført til nye RNAi-plader fra 4-dages alderen. Yderligere minimerer dette antallet af orme på pladen og sikrer ad libitum fodring og maksimal genknockdown. Plader blev opbevaret ved 20 °C. Alle behandlinger i alle assays var under eksperimentets forløb blindet for stamme og RNAi klon.



Figur 2.2: Flowchart over dopaminerge neurodegenerations-assay, *tra-1* ekspressions-assay og mitokondriemorfologi-assay.

2.3 Fluorescensmikroskopi: fotografering i confocal spinning disc mikroskop

Før billedtagning blev ormene monteret på et glasmikroskopi-slide med en dråbe størknet 2% agarose opløsning. Medmindre andet er angivet, blev der pr. slide overført 25 tilfældigt valgte orme med 15 μ L sodium azide (25 mM) for at lamme dem. Et cover slip blev placeret ovenpå og fastgjort og forseglet med neglelak langs kanten af cover slip. Slides blev brugt umiddelbart efter for at undgå tab af signal ved photobleaching i ormene.

Til billedtagning blev brugt et confocal spinning disc fluorescence microscope (Olympus IX83 inverted microscope) med et Yokogawa CSU-W1 spinning disc unit, HAMAMATSU C13440 kamera, Hamamatsu ORCAFlash 4.0 v3 grayscale kamera, Olympus UPlanSApo 60x/1.35na Oil objektiv og Olympus CellSens Dimension software. Billederne blev taget som z-stacks, hvor ormene blev afbildet i flere fokalplan langs deres z-akse. Efterfølgende blev billederne fra de

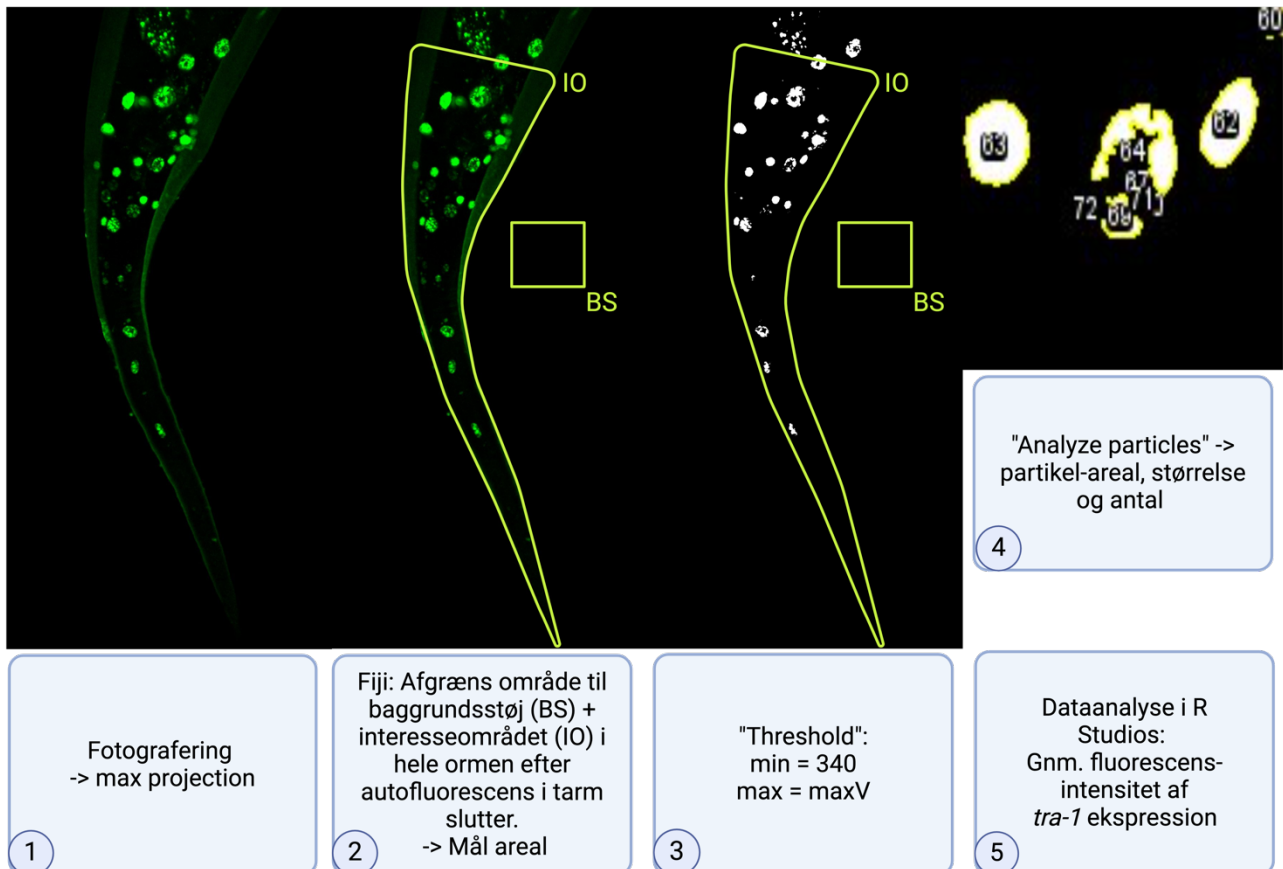
forskellige dybder sammenflettet vha. maksimalintensitetsprojektion, hvor pixel med det højeste signal for hver fokalplan bevares. Dette resulterer i et 2D-billede af ormene, hvor information fra de forskellige dybder er visualiseret. Dette blev gjort via funktionen *Maximum Intensity Projection over z* i softwaren FIJI (Fiji Is Just ImageJ). Medmindre andet er angivet, blev alle billeder taget med eksponeringstid på 500 ms, laserintensitet på 10%, step size på 0,34 µM og 60x forstørrelse med olie.

2.4 *tra-1* ekspressions-assay: Kvantificering af *tra-1* udtryk som mål for niveau af Hh-signalering.

I *tra-1* ekspressions-assay fik stammen DZ840 (*tra-1::GFP*) RNAi medieret knockdown af enten *grl-1* eller *pdr-1* eller EV som negativ kontrol, mens N2 (WT) med EV fungerede som negativ kontrol. Ormene blev undersøgt ved 4-, 7- og 10-dages alderen for DZ840 og 4-dages alderen for N2. Dette gav følgende 4 behandlinger:

Tabel 2.4: Oversigt over behandlinger i *tra-1* ekspressions-assay.

Stamme	RNAi klon	Alder ved assay	Forsøgsgruppe	Responsvariabel / markør for Hh-signalering
DZ840 (<i>tra-1::GFP</i>)	<i>pdr-1</i>	4, 7 og 10 dage.	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>pdr-1</i> .	Fluorescensintensitet af TRA-1::GFP og dermed <i>tra-1</i> ekspression
DZ840 (<i>tra-1::GFP</i>)	<i>grl-1</i>	4, 7 og 10 dage.	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>grl-1</i> .	
DZ840 (<i>tra-1::GFP</i>)	EV	4, 7 og 10 dage.	Negativ kontrol for RNAi.	
N2 (WT)	EV	4 dage.	Positiv kontrol for transgenet <i>tra-1::GFP</i> .	



Figur 2.3: Flowchart over processen for databehandling i softwaren Fiji. 1) Billedtagning blev udført i et spinning disc confocal mikroskop, hvor haleområdet blev fotograferet enkeltvis med 60x forstørrelse med olieimmersion, 500 ms eksponeringstid, 100% laser intensitet (488 nm), Z-stacks og en 0,34 μm step size. Efterfølgende laves max projection af alle Z-stacks. 2) I Fiji afgrænses interesseområdet for kvantificering. For at standardisere blev der udvalgt et tydeligt og reproducerbart genkendeligt interesseområde med mindst mulig autofluorescens, og derfor blev hele halen valgt som interesseområde, startende fra hvor autofluorescens visuelt stopper ved tarmen. 3) I Fiji blev Threshold sat til minimum = 340 og maximum = maximum value, således pixelintensiteter under dette blev fjernet fra analysen. 4) Analyze particles funktionen i Fiji kvantificerede partikelareal, partikelstørrelse og partikelantal. 5) Efterfølgende blev alt data behandlet, udregnet og analyseret i RStudio, og en total intensitet pr. areal pr. orm blev bestemt.

Genknockdown af F1-orme blev udført som beskrevet i afsnit 2.2.3, og blev undersøgt da de var 4, 7 og 10 dage gamle. Fremstilling af slides og billedtagning foregik som beskrevet i afsnit 2.3, dog med 100% laserintensitet, da GFP-signalet var meget svagt og dette resulterede i mindst støj. Efterfølgende blev billederne databehandlet i softwaren Fiji, og alle prøver var blindet for klon, stamme og alder vha. pluginnet "Blind Analysis Tools" og funktionen "File Name Encrypter". Funktionen "Polygon Selection" blev anvendt både til markering af interesseområdet i halen og til definition af et referenceområde på 30x30 pixels til kvantificering af baggrundsfluorescens (figur 2.3). "Threshold"-funktionen blev anvendt med minimum = 340 og maximum = maximum value, og efterfølgende blev funktionerne "Measure" og "Analyze Particles" brugt til at måle areal og den gennemsnitlige pixelintensitet for hver partikel.

For at udregne *tra-1* ekspresion, blev summen af hver partikels gennemsnitlige pixelintensitet ganget med dets areal og divideret med arealet af interesseområdet. Da interesseområdets

areal blev standardiseret ud fra ormenes anatomi i stedet for pixel-dimensioner, varierer interesseområdet fra orm til orm. Den følgende beregning tager således højde for variation i ormenes størrelse:

$$tra - 1 \text{ ekspression} = \frac{\sum (Int_{partikel,i} - Int_{BS}) * Areal_{partikel,i}}{Areal_{IO}}$$

$Int_{partikel,i}$ = Gennemsnitsintensitet pr. partikel pr. pixel

$Areal_{partikel,i}$ = Areal af partikel

Int_{BS} = Gennemsnitsintensitet for baggrundsstøj pr. pixel

$Areal_{IO}$ = Areal af interesseområdet (halen)

2.5 Dopaminerge neurodegenerations-assay: Morfologisk degeneration af dopaminerge CEP-neuroner i Parkinson's model

I dopaminerge neurodegenerations-assay af CEP-neuroner, blev der udført RNAi medieret knockdown i stammerne UA196 (αSyn+) og UA202 (-αSyn), som blev undersøgt da F1-orme var 4, 7 og 10 dage gamle. Knockdown blev udført på generne *pdr-1*, *hhat-2* og *grl-1* eller Empty Vector (EV) som kontrol. Dette gav følgende 8 behandlinger:

Tabel 2.5: Oversigt over behandlinger i dopaminerge neurodegenerations-assay.

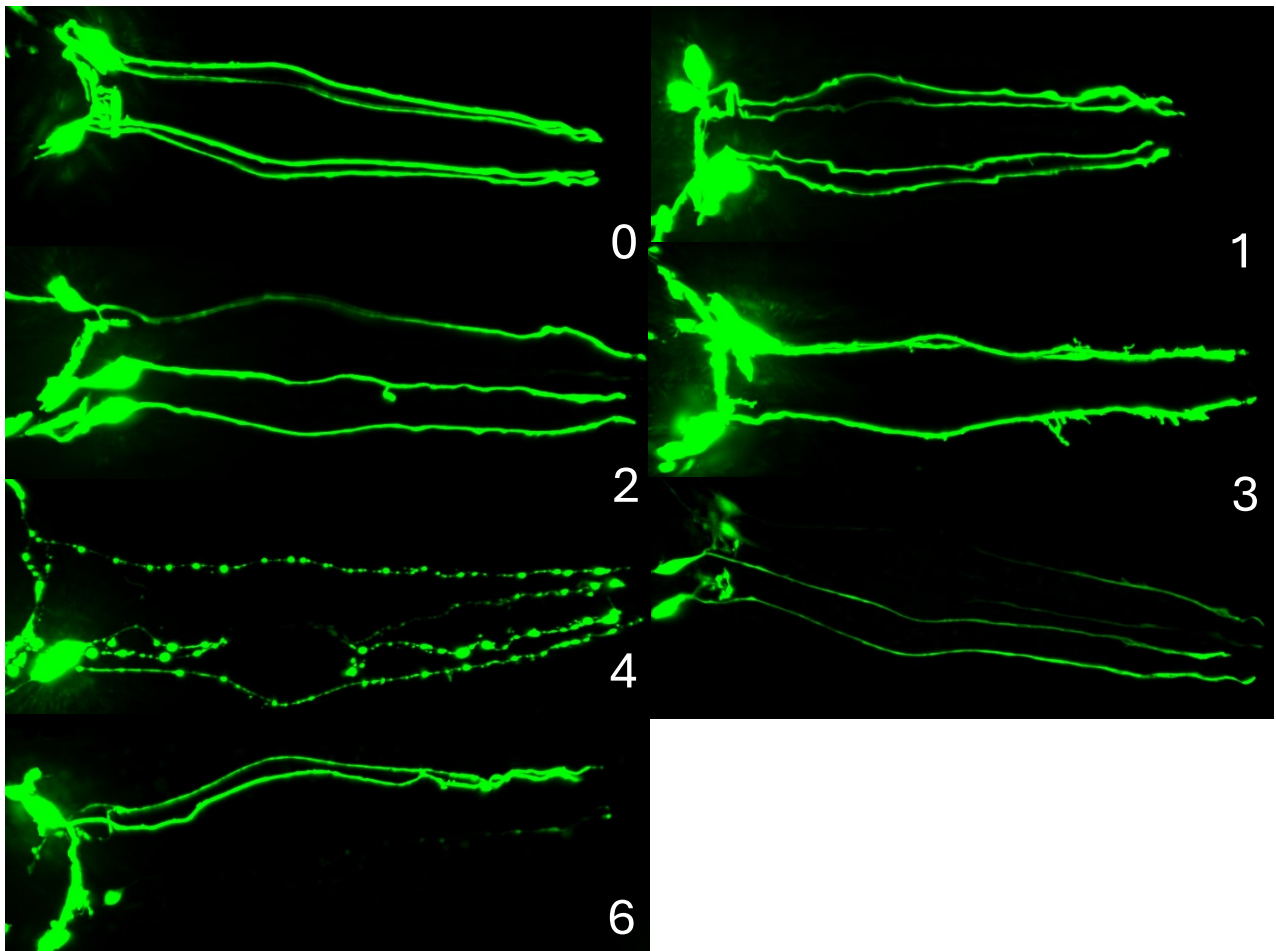
Stamme	αSyn	RNAi klon	Forsøgsgrupper	Responsvariabel / markør for dopaminerge neuroners sundhed
UA196	+	<i>pdr-1</i>	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>pdr-1</i> +αSyn.	Kvalitativ score fra 0-6 af de 4 CEP-neuroner.
UA196	+	<i>grl-1</i>	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>grl-1</i> +αSyn.	
UA196	+	<i>hhat-2</i>	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>hhat-2</i> +αSyn.	
UA196	+	EV	Negativ kontrol for RNAi i UA196 / Negativ kontrol for -αSyn i UA202.	
UA202	-	<i>pdr-1</i>	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>pdr-1</i> - αSyn.	
UA202	-	<i>grl-1</i>	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>grl-1</i> -αSyn.	

UA202	-	<i>hhat-2</i>	Testgruppe. Effekt ved knockdown af <i>hhat-2</i> - α Syn.	
UA202	-	EV	Negativ kontrol for RNAi i UA202 / Negativ kontrol for + α Syn i UA196.	

Assay blev udviklet med udgangspunkt i (Bijwadia, Morton & Meyer, 2021). Genknockdown blev udført som beskrevet i afsnit [2.2.3](#). F1-orme blev fotograferet da de var 4, 7 og 10 dage gamle som beskrevet i afsnit [2.3](#). For at bestemme graden af degeneration af CEP-neuroner, blev dendritternes morfologi kvalitativt scoret fra 0 til 6 hvor 0 er perfekte neuroner og 6 er maksimalt skadet neuroner (Bijwadia, Morton & Meyer, 2021). Protokollen blev tilpasset til, at dendritter med spines-lignende strukturer og andre projektioner indgik i scoringen (figur 2.5).

- 0 - Ingen skade, “perfekte” dendritter
- 1 - Irregulære, fx knæk, bøjninger
- 2 - <5 blebs/“spines”/”branching”
- 3 - 5-10 blebs/“spines”/”branching”
- 4 - >10 blebs og eller brud der fjerner <25% af dendritten
- 5 - Brud der fjerner <25-75% af dendritten
- 6 - Brud der fjerner >75% af dendritten

Under den kvalitative scoring var billederne randomiseret og blindet for alder og behandling vha. funktionen *Analyse & Decide* i Fiji pluginnet *Blind Analysis Tools*. I Fiji blev Brightness/Contrast sat til minimum = 150 og maximum = 1500. Dette blev bestemt på baggrund af UA202 (- α Syn) EV 4 dage gamle, da det vurderes at denne behandling burde have de sundeste CEP-neuroner, og fungerede derfor som udgangspunkt til bestemmelse af Brightness/Contrast.



Figur 2.5: Visualisering af Pdat-1::GFP ekspression, og repræsentativ demonstration af kriterier for hver given score af CEP-dendritter. 0 = Perfekte dendritter. 1 = irregulære dendritter i form af knæk/bøjninger. 2 = projektion, som ses ved midterste dendrit. 3 = 5-10 blebs or eller projektioner, som ses ved nederste dendrit. 4 = >10 blebs or eller projektioner, som ses ved øverste og nederste dendrit, samt <25% brud på de midterste dendritter. 5 = 25-75% brud på de 2 øverste dendritter. 6 = >75% brud på de 2 nederste dendritter.

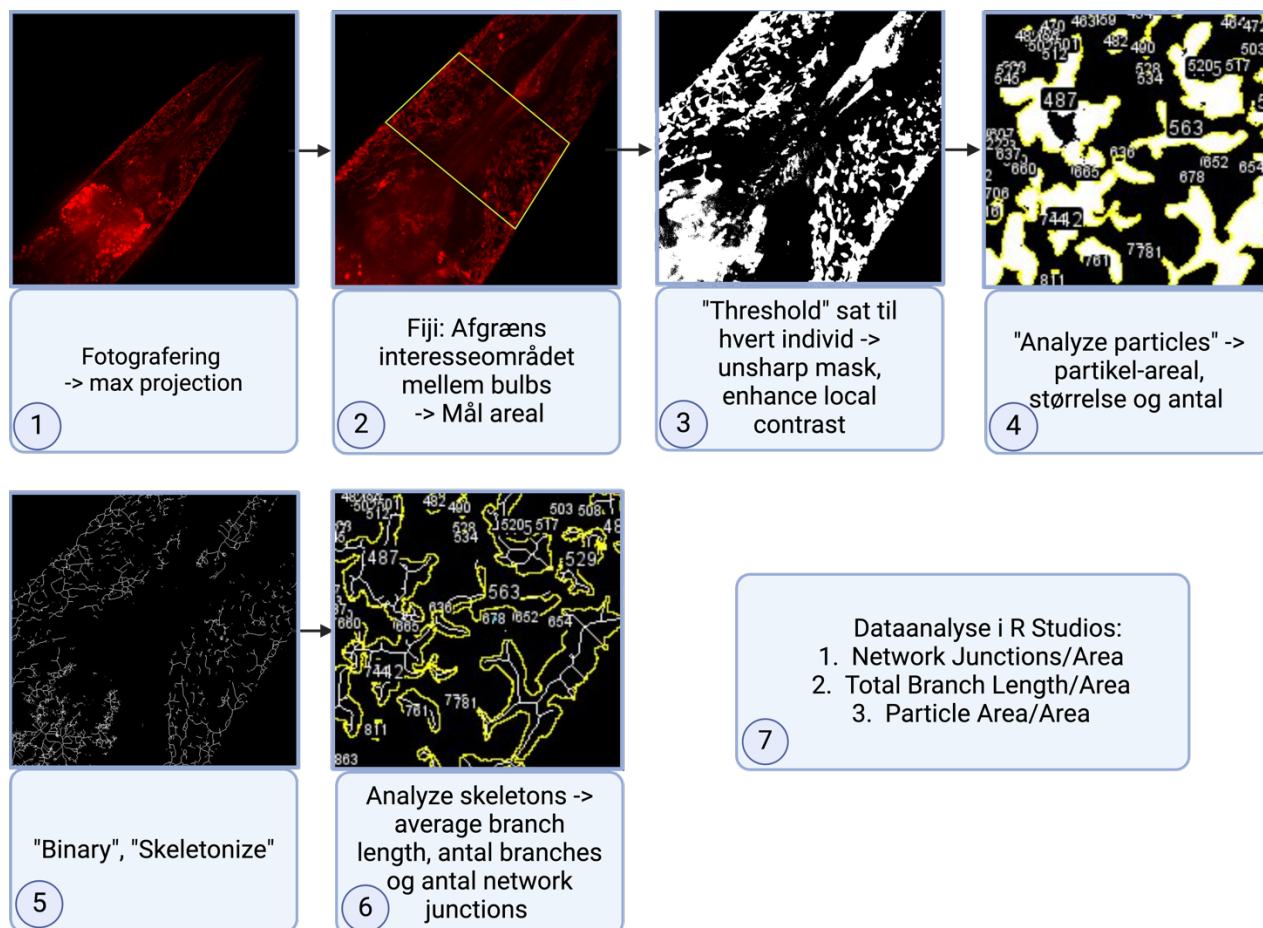
2.6 Mitokondriemorfologi-assay: Effekt ved *grl-1* og *pdr-1* knockdown på mitokondriesundhed i *pink-1* mutant

I mitokondriemorfologi-assay fik stammen RB2547 RNAi medieret knockdown af enten *grl-1* eller *pdr-1* eller EV som kontrol og N2 (WT) med EV brugt som kontrol. For at visualisere mitokondrienetværket, som markør for mitokondrie-sundhed, blev F1-orme farvet med proben MitoTracker og fotograferet da de var 6 dage gamle. Alle 3 behandlinger af RB2547 blev lammet i sodium azide, og N2 blev lammet i enten sodium azide eller levamisol. Dette resulterede i følgende 5 behandlinger:

Tabel 2.6: Oversigt over behandlinger i mitokondriemorfologi-assay.

Stammer	RNAi kloner	Alder, dage	Stof til lammelse	Forsøgsgrupper	Responsvariabel / markør for mitokondriesundhed
RB2547 (mutation i <i>pink-1</i>)	<i>pdr-1</i>	6	levamisol	Testgruppe: Effekt ved knockdown af <i>pdr-1</i>	Network Junctions/Area, Total Branch Length/Area og Particle Area/Area kvantificeret via MitoTracker
RB2547 (mutation i <i>pink-1</i>)	<i>grl-1</i>	6	levamisol	Testgruppe: Effekt ved knockdown af <i>grl-1</i>	
RB2547 (mutation i <i>pink-1</i>)	EV	6	levamisol	Negativ kontrol af RNAi	
N2 (WT)	EV	6	levamisol	Positiv kontrol af <i>pink-1</i> mutation	
N2 (WT)	EV	6	sodium azide	Positiv kontrol af assay	

Genknockdown blev udført som beskrevet i afsnit [2.2.3](#). Når F1-orme var 6 dage gamle, blev de farvet med MitoTracker Orange CMTMRos og efterfølgende fotograferet. Protokollen for farvning med MitoTracker var baseret og inspireret af (Zhu, Chisholm & Jin, no date). MitoTrackeren 1 mM blev opløst i M9 buffer for at lave en 2,5 µM opløsning. For hver behandling blev 3x 50 µL af denne opløsning overført til 3x 1,5 mL centrifugerør. 40 orme pr. behandling blev tilfældigt udtaget og overført til hvert rør. Efterfølgende blev centrifugerørerne pakket ind i alufolie for at minimere photobleaching af ormene, og opbevaret mørkt ved 20 °C i 30 min. Ormene blev efterfølgende vasket ved centrifugering ved 100 rpm i 20 sekunder. Herefter blev 30 µL af opløsningen fjernet og erstattet med 30 mL M9 buffer. Dette blev gentaget i alt 4 gange. Efter den sidste vask blev der fjernet 35 µL af opløsningen og ormene blev overført med pipette afklippet i spidsen til plader med OP50 for at restituere. Pladerne blev pakket ind i alufolie og opbevaret i mørke i cirka 2 timer.



Figur 2.6: Flowchart over processen for databehandling i softwaren Fiji. 1) Orme fotograferes enkeltvis i hovedregionen i et spinning disc confocal mikroskop, med 60x forstørrelse med olieimmersion, 500 ms eksponeringstid, 10% laser intensitet, 561 nm laser, Z-stacks og 0,34 μM step size. Efterfølgende laves max projection af alle Z-stacks og der dannes ét billede. 2) I Fiji afgrænses interesseområdet for kvantificering. For at standardisere blev der udvalgt et tydeligt og reproducerbart genkendeligt interesseområde; body wall mellem metacarpus og terminal bulb. 3) I Fiji tilpasses "Threshold" individuelt til hvert individ, og vælges på baggrund af den værdi hvor mest muligt af mitokondrienetværket er med, med mindst mulig støj. 4) "Analyze particles" funktionen i Fiji kvantificerede partikelareal, partikelstørrelse og partikelantal. 5) Efterfølgende blev billedet gjort binært og funktionen "Skeletonize" fremviser mitokondrienetværket via et skelet. 6) Funktionen "Analyze skeletons" kvantificerede average branch length, antal branches og antal network junctions. 7) Efterfølgende blev disse data behandlet, udregnet og analyseret i RStudio, og Network Junctions/Area, Total Branch Length/Area og Particle Area/Area blev udregnet.

Efterfølgende blev der lavet slides som beskrevet i afsnit 2.3, dog med 10 mM levamisol i stedet for sodium azide, da dette påvirker signalet af MitoTrackeren. Som positiv kontrol blev N2 EV lammet med 10 μL 1 M sodium azide. Området mellem Terminal bulb og Metacarpus i Pharynx var interesseområdet for kvantificering af MitoTracker signalet (figur 2.6). Billedtagning af området blev standardiseret, ved at sætte minimum og maksimum z til det område, hvor begge bulbs begyndte at være ude af fokus når man scrollede gennem z. Til databehandling blev billederne blindet og randomiseret via Fiji pluginnet "Blind Analysis Tools" og funktionen "File Name Encrypter". Med inspiration fra Valente *et al.* (2017) blev der udarbejdet en makro (Bilag 1) til effektivt at kvantificere hvert billede standardiseret og indsamle data til udregning af Partikel Area/Area, Network Junctions/Areal og Total Branch Length/Area.

Grundet stor variation i signal og pixelintensitet mellem prøverne, blev "Threshold" manuelt justeret for hvert billede, således mest muligt af mitokondrie-netværket var med og med mindst mulig støj, baseret på subjektiv vurdering. Interesseområdet mellem Terminal bulb og Metacarpus blev manuelt sat via funktionen "Polygon selections". For at udregne Partikel areal/Areal, blev der gjort brug af funktionen "Analyze particles". Outputtet af dette var et areal af hver partikel, som blev summeret og divideret med interesseområdet, og resulterede derfor i en værdi mellem 0-1 for Partikel areal/Areal. For at udregne Network Junctions/Areal og Total Branch Length/Areal blev der gjort brug af funktionen "Skeletonize". Dette danner et binært billede på baggrund af værdien manuelt sat i "Threshold", og simplificerer mitokondrie-netværkene til lineære skeletter. Efterfølgende udregnede funktionen "Analyze skeleton (2D/3D)" average branch length, antal branches og network junctions for hvert mitokondrie-netværk. Network junctions og average branch length blev summeret og divideret med arealet af interesseområde, for at give resultaterne Network Junctions/Area og Total Branch Length/Area.

2.7 Statistiske tests

For at bestemme passende statistiske tests til hypotesetestning blev en Shapiro-Wilk test anvendt for alle assays for at teste for normalfordeling af data.

Data for *tra-1* ekspressions-assay var ikke normalfordelt ($p = 2.012e-11$), hvorfor non-parametriske statistiske test blev valgt. Når data ikke er normalfordelt, er der mere statistisk power i at bruge tests som Wilcoxon Rank Sum test eller Kruskal Wallis test, sammenlignet med parametriske tests der antager normalfordeling (Sawilowsky, 2005; Kitchen, 2009). Derfor blev data analyseret med Kruskal Wallis test, for at undersøge, om der var forskel mellem grupperne. Nulhypotesen (H_0) om ingen signifikant forskel mellem grupperne kunne forkastes, og der blev efterfølgende anvendt en post-hoc test i form af Dunn's test med Bonferroni-korrektion, for at bestemme hvilke par der er forskellig i deres fordeling.

Mitokondriemorfologi-assay resulterede i normalfordelt data ($p = 0,0512$, $0,1525$ og $0,2344$ for hhv. Network junctions/Area, Total Branch Length/Area og Particle Area/Area). Derfor anvendes parametriske tests. Til normalfordelt data kan der bruges en Student's t-test. Samtidig laves der Bonferroni-korrektion, for at undgå falsk-positive ved mange sammenligninger, da der blev foretaget 4 Student's t-tests for både Particle Area/Area, Network Junctions/Area og Total Branch Length/Area.

Data for dopaminerge neurodegenerations-assay var ikke normalfordelt ($p = 7.945e-09$). Derfor gøres der brug af non-parametriske statistisk test. Hver observation blev kvalitativt scoreet på en skala fra 0-6, og er derfor ordinal data. En test som Wilcoxon Rank Sum eller Dunn's test kan derfor give problemer i denne kontekst, da der er for mange bindinger mellem hver observation. Da alle forventede celfrekvenser er ≥ 5 , anvendes derfor en Pearson's χ^2 test, som tester om de to kategoriske variabler, neuron-scorer og behandling (stamme + klon), er uafhængige for dag 4, 7 og 10. I alle tilfælde kunne nulhypotesen (H_0) om ingen signifikant forskel forkastes ($p = 0,0037$). For at bestemme hvilke behandlinger der er forskellige, bruges en parvis Pearson's χ^2 test med bonferroni korrektion.

3 Resultater

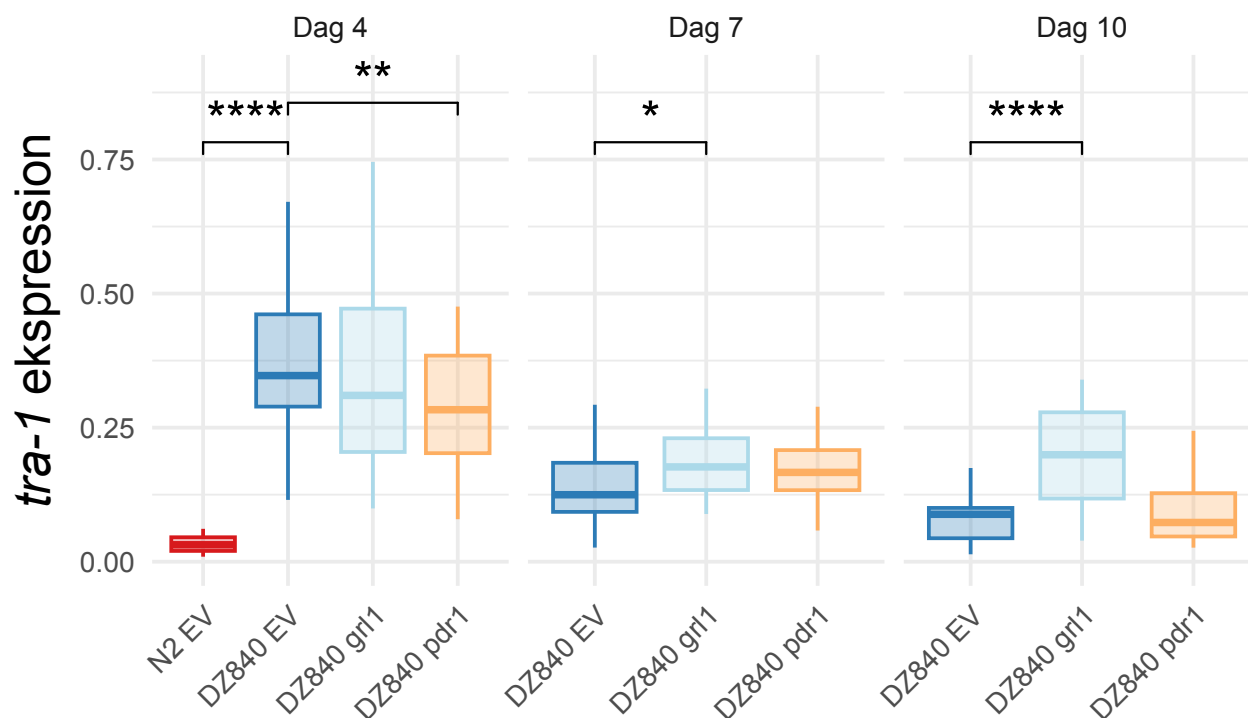
3.1 *tra-1* ekspressions-assay: *grl-1* knockdown øger og *pdr-1* knockdown reducerer *tra-1* ekspression i Hedgehog-reporterstamme

For at vurdere om den observerede effekt af *grl-1* (relateret til humane Hh-ligander SHH, IHH og DHH) og *pdr-1* (ortholog til humane *PARK2*) knockdown i dopaminerge neurodegenerations-assay, mitokondriemorfologi-assay og fremtidige assays potentielt er et resultat af op- eller nedreguleret Hh-signalering, er det afgørende at have værktøjer til at bestemme *grl-1*, *pdr-1* og andre Hh-r-geners rolle i Hh-signalering (Burglin, 2006; Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Derfor undersøges DZ840 som potentiel Hh-reporterstamme med *tra-1* ekspression som markør. Funktionen af det Hh-relaterede gen *grl-1* er ukendt, og det vides ikke, om det har nedstrøms effekt på *tra-1* ekspression. Hidtil er der ikke blevet dokumenteret ændringer i TRA-1 ekspression som følge af Hh-r aktivitet (VanDerMolen *et al.*, 2025).

DZ840 bærer et transgen, hvor *tra-1* er mærket med GFP. Dette tillader brug af fluorescens mikroskopi til at kvantificere *tra-1* ekspression, som potentiel markør for op- eller nedreguleret Hh-signalering. I *C. elegans* er *tra-1* homolog til transkriptionsfaktorerne Gli1, Gli2 og Gli3, som er nedstrøms i Hh signalvejen (Burglin, 2006).

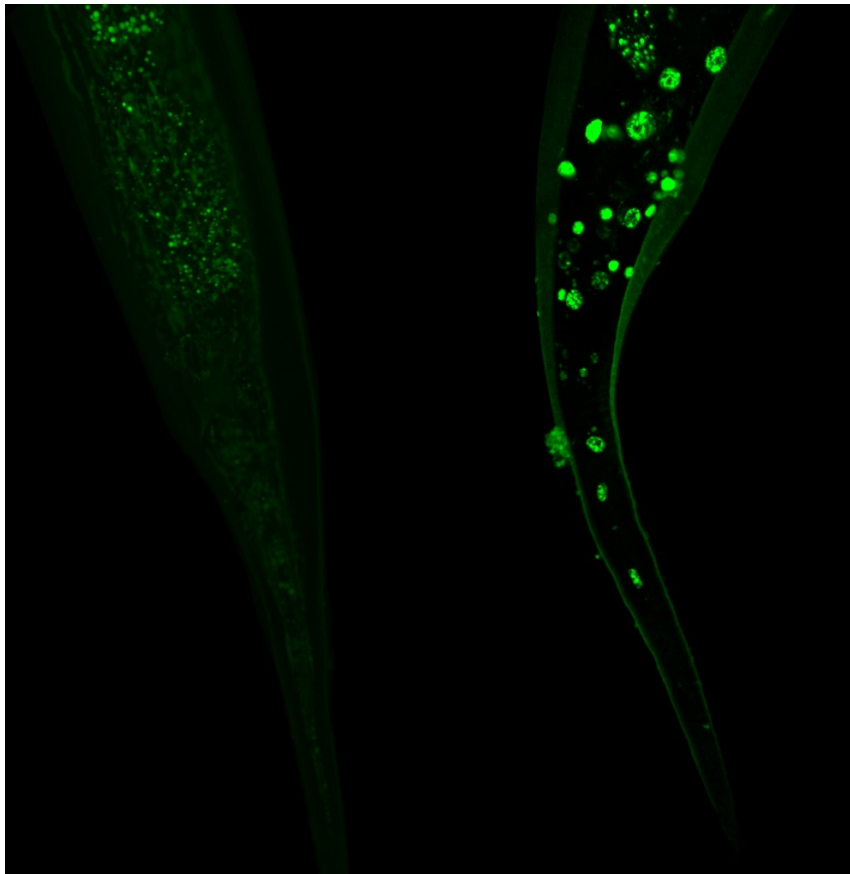
For at undersøge om *pdr-1* er involveret i øget Hh-signalering, medieret af mitokondriel dysfunktion, og for at bestemme effekten af *grl-1* i Hh-signalvejen, blev der udført RNAi medieret knockdown af *pdr-1* og *grl-1* i DZ840. TRA-1::GFP signalet blev kvantificeret da F1-orme var 4, 7 og 10 dage gamle. N2 (WT) med EV fungerede som kontrol for *tra-1*::GFP og blev kvantificeret da F1-orme var 4 dage gamle (figur 3.2).

Autofluorescens er særlig udtalt i tarmen af *C. elegans*, som blandt andet skyldes lysosomale granuler. For at undgå at udvaskning af TRA-1::GFP signalet grundet autofluorescens, vælges typisk hoved- eller haleregionen (Teuscher & Ewald, 2018). Salzberg *et al.* (2020) fandt *tra-1* ekspression i DZ840 i cellekroppe af AVG neuron i hovedet og PHB og PHA neuroner i halen. Før assayets start var signalet i halen vurderet kraftigere end i hovedet (data ikke inkluderet) og halen vælges derfor som interesseområde for kvantificering.



Figur 3.1: Box plot for sum af intensitet pr. partikel, vægtet med partikelareal og normaliseret til interesseområdet i halen af *C. elegans*. Undersøgt for stammen DZ840 med RNAi medieret genknockdown af enten *grl-1*, *pdr-1* eller EV (empty vector, kontrol) ($n \geq 35$) og N2 (WT) EV ($n = 16$). Fotograferingen foregik da DZ840 F1-orme var 4, 7 og 10 dage gamle og N2 F1-orme var 4 dage gamle. Statistisk analyse blev beregnet med Dunn's test med Bonferroni-korrektion vist med signifikansniveauer: $*P < 0,05$; $**P < 0,01$ og $****P < 0,0001$. Kun signifikante sammenligninger er vist.

Ved knockdown af *grl-1* blev der observeret statistisk signifikant øget *tra-1* ekspression ved dag 7 og ved dag 10 er denne forskel endnu større (figur 3.1, tabel 3.1). Interessant nok faldt *tra-1* ekspressionen fra dag 4 til 10 i både EV og *pdr-1*, mens niveauet ved *grl-1* knockdown steg mellem dag 7 og 10. Det forventet, at knockdown af *grl-1* reducerer *tra-1* ekspression for alle aldre, da *grl-1* er relateret til liganderne Shh, Ihh og Dhh i pattedyr, som alle er signalmolekyler der initierer Hh-signaler, om end funktionen af *grl-1* i *C. elegans* er ukendt (Hao et al., 2006). Ved dag 4 ses et statistisk signifikant nedsat *tra-1* ekspression ved knockdown af *pdr-1*, dog ingen forskel observeret for dag 7 og 10. PDR-1 regulerer mitofagi, og dets knockdown kan derfor antages at øge risiko for mitokondriel dysfunktion (Da Silva et al., 2024). Disse observationer kan dermed enten indikere, at Hh-signaler øges som respons på mitokondriel dysfunktion, eller direkte regulering af Hh-signaler grundet PDR-1 aktivitet, om end potentielt aldersbetinget, da det kun ses for 4 dage gamle orme.



Figur 3.2: Repræsentation af visuel forskel i flourosens mellem N2 (WT, kontrol) til venstre og DZ840 (*tra-1::GFP*, testgruppe) til højre. Begge orme er 4 dage gamle.

Tabel 3.1: Tabel over *p*-værdier og signifikansniveauer beregnet med Dunn's test med Bonferroni-korrektion for sum af gennemsnitlig intensitet pr. partikel normaliseret til interesseområdet. Signifikansniveauer: **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01 og *****p* ≤ 0,0001.

Dunn's test med bonferroni korrektion på forskel mellem EV og RNAi medieret genknockdown af enten <i>grl-1</i> eller <i>pdr-1</i> ved alderen 4, 7 og 10 dage gamle.					
Behandling	Alder	Z	Korrigeret <i>p</i> -værdi	Signifikans-niveau	Højere/lavere <i>tra-1</i> ekspresion end DZ840 EV?
DZ840 EV / DZ840 <i>grl-1</i>	4	1.5187217	0.05455		
DZ840 EV / DZ840 <i>pdr-1</i>	4	2.4433504	0,01455160	**	Lavere
DZ840 EV / N2 EV	4	6.5671087	1.13×10 ⁻¹¹	****	Lavere
DZ840 EV / DZ840 <i>grl-1</i>	7	-2.2466427	0,02466287	*	Højere
DZ840 EV / DZ840 <i>pdr-1</i>	7	-1, 8242635	0,06811		
DZ840 EV / DZ840 <i>grl-1</i>	10	-4.6326662	8.15×10 ⁻⁶	****	Højere
DZ840 EV / DZ840 <i>pdr-1</i>	10	-0.5000826	0,61702		

Yderligere ses en statistisk signifikant forskel mellem N2 EV og DZ840 EV, hvilket er at forvente, da WT ikke udtrykker GFP, og signal kan formentlig tilskrives autofluorescens (figur 3.2). GFP signal i N2 blev derfor ikke kvantificeret yderligere efter dag 4.

Disse observationer indikerer dermed, at *pdr-1* potentielt positivt regulerer Hh-signalerings med *tra-1* som markør, om end kun i yngre orme. Yderligere antyder det, at *grl-1* negativt regulerer Hh-signalerings, men yderligere analyser er nødvendig for at bekræfte en direkte sammenhæng.

3.2 Dopaminerge neurodegenerations-assay: kvantificering af CEP-neuroners degenerering og morfologi

For at undersøge om Hh-signalerings er korreleret med udvikling af PD, blev der udviklet et assay der undersøger morfologisk degenerering af dopaminerge CEP-neuroner i stammerne UA196 (+ α Syn) og UA202 (- α Syn) (Wormbase, u.d.1; Wormbase, u.d.4). WT optager normalt dsRNA til celler via den passive dsRNA membrantransporter der kodes af *sid-1* genet, hvilket ikke udtrykkes i neuroner (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). I UA196 og UA202 er funktionen af *sid-1* nedsat eller tabt vha. en punktmutation. Yderligere er *sid-1* sat ind igen under kontrol af *Pdat-1*, og de udtrykker derfor *sid-1* i dopaminerge neuroner. Dette resulterer i stammer som optager dsRNA til dopaminerge neuroner, uden en systemisk optagelse. Dette tillader at undersøge effekten af gener direkte i dopaminerge neuroner med RNAi medieret knockdown. Yderligere udtrykker UA196 α Syn under kontrol af *dat-1* promotoren, og α Syn er derfor til stede i dopaminerge neuroner, hvilket gør den til en oplagt model for PD, da et kendetegn for sygdommen er ophobning af α Syn i dopaminerge neuroner. UA196 og UA202 udtrykker begge GFP under kontrol af *Pdat-1*. Dette muliggør at visualisere og kvantificere de dopaminerge CEP-neuroner, og undersøge morfologiske ændringer og degenerering ved knockdown af udvalgte gener.

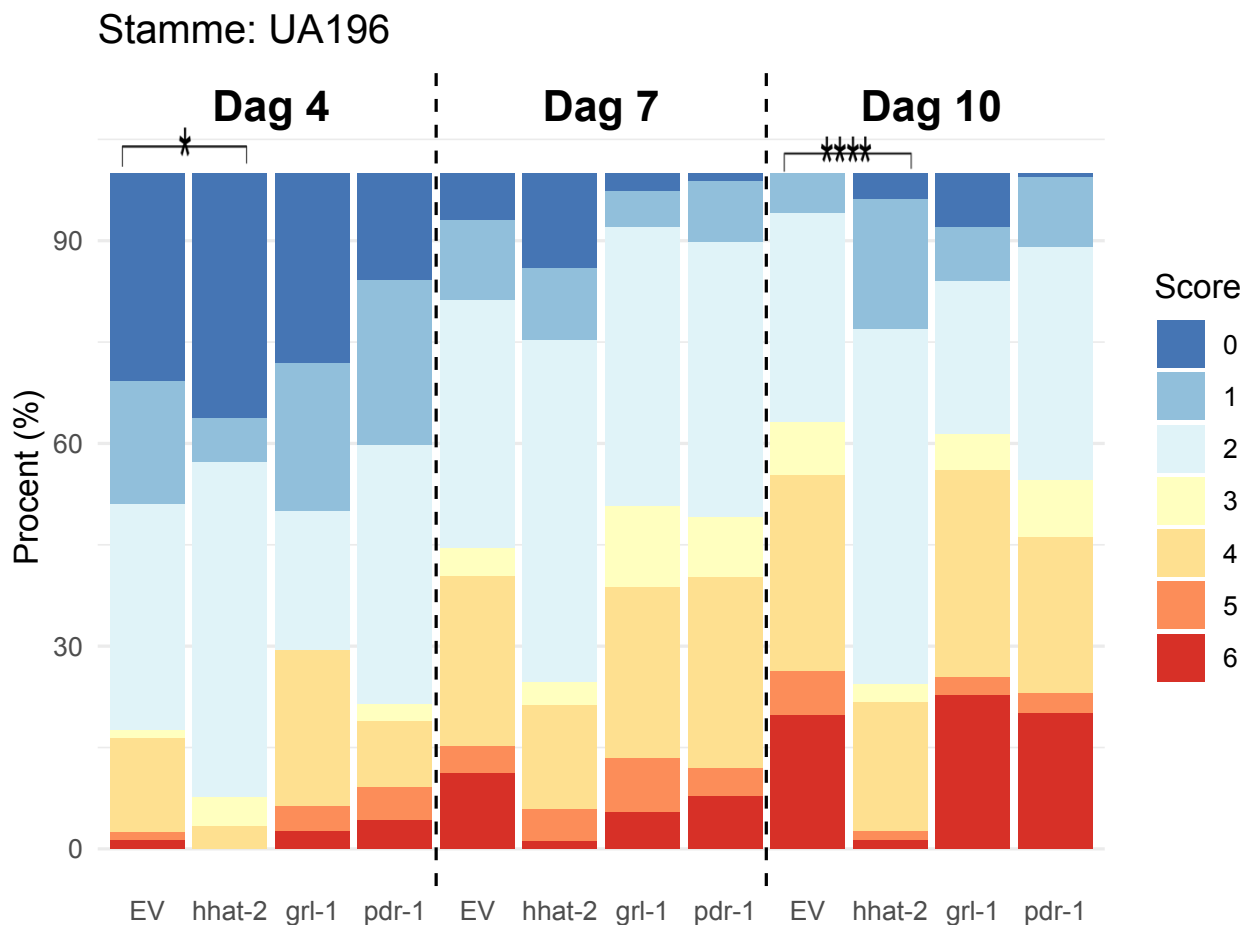
For at undersøge effekten af Hh-signalerings på α Syn-induceret toksicitet og aldersbetinget degeneration af CEP-neuroner, udføres der knockdown af *hhat-2* (homolog til human *HHAT*) og *grl-1* i UA196 og UA202 (Burglin, 2006). Funktionen af *hhat-2* er ikke veletableret, men det formodes at den modner Hh-r proteiner, og derfor er nødvendig for Hh-signalerings (Kolotuev, Apaydin & Labouesse, 2009). For at undersøge effekten af mitokondriel dysfunktion på CEP-neuroner, med og uden tilstedeværelse af α Syn, udføres der knockdown af *pdr-1* i UA196 og UA202. Yderligere fungerede EV som kontrol. Observationer er baseret på 4, 7 og 10 dage gamle F1-orme, hvis CEP-neuroner kvalitativt er scores på en skala fra 0-6 baseret på deres morfologi, som udtryk for graden af neurodegeneration.

3.2.1 *hhat-2* knockdown beskytter CEP-neuroner mod α Syn-induceret toksicitet og aldersbetinget degeneration i model for PD.

hhat-2 knockdown i UA196 (+ α Syn) resulterer i statistisk signifikant mindre degeneration af CEP-neuroner på dag 4 og 10 (figur 3.3, tabel 3.2). Yderligere er dette den næstlaveste middelværdi blandt alle behandlinger på dag 4 og laveste dag 10 (figur 3.6). Dette tyder på, at Hh-signalerings potentielt er korreleret med PD, og nedregulering af *hhat-2* ekspression potentielt fungerer som en beskyttende faktor for aldersbetinget neurodegeneration og α Syn-induceret toksicitet i dopaminerge neuroner. Større forskel i p-værdier ved dag 10 end dag 4 kan tyde på, at den beskytter i større grad jo ældre ormene er. Dette stemmer overens med

litteraturen, da α Syn-induceret toksicitet er aldersbetinget (Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Der ses dog ingen signifikant forskel ved dag 7, men et betydeligt højere forekomst af scoren 6 (usunde neuroner) i EV end i *hhat-2* (hhv. 19 og 1) (figur 3.3).

Knockdown af *grl-1* og *pdr-1* resulterer i ingen observeret forskel på dag 4, 7 eller 10. *grl-1* og *pdr-1* ser derfor ikke ud til, at have en effekt på α Syn-induceret toksicitet. Dette strider imod forventningen, da det vides at mutationer i *pdr-1* øger neurodegeneration ved tilstedeværelsen af α Syn i *C. elegans*, medieret af nedsat mitofagi og mitokondriel dysfunktion (Bornhorst *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2015).



Figur 3.3: Stabilet søjlediagram over stammen UA196 (+ α Syn) med RNAi medieret genknockdown af enten *hhat-2*, *grl-1* eller *pdr-1* (hhv. $n \geq 21$, $n \geq 20$, $n \geq 40$) eller EV (Empty Vector, kontrol) ($n \geq 40$). Fotograferet som 4, 7 og 10 dage gamle F1-orme. Y-akse viser andelen i procentvis fordeling af en kvalitativ score fra 0-6 af 4 CEP dopaminerge neuroner i hovedet. Hvor 0 = perfekte neuroner og 6 = maksimalt degenereret. X-aksen viser hver behandling. Statistisk analyse blev beregnet med en Parvis χ^2 -test og bonferroni korrektion. Signifikansniveauer er vist med: * $p \leq 0,05$ og **** $p \leq 0,0001$. Kun signifikante værdier er vist.

Parvis χ^2 -test med bonferroni korrektion på forskel mellem EV og RNAi medieret genknockdown af enten *hhat-2*, *grl-1* eller *pdr-1* ved alderen 4, 7 og 10 dage gamle UA196 (+ α Syn)

Behandling	Alder	Chi ²	df	Korrigeret p-værdi	Signifikans-niveau	Lavere (sundere) score end EV
UA196 EV / UA196 <i>hhat-2</i>	4	21,06	6	0,032	*	Ja
UA196 EV / UA196 <i>hhat-2</i>	10	41,26	6	4,6×10 ⁻⁶	****	Ja

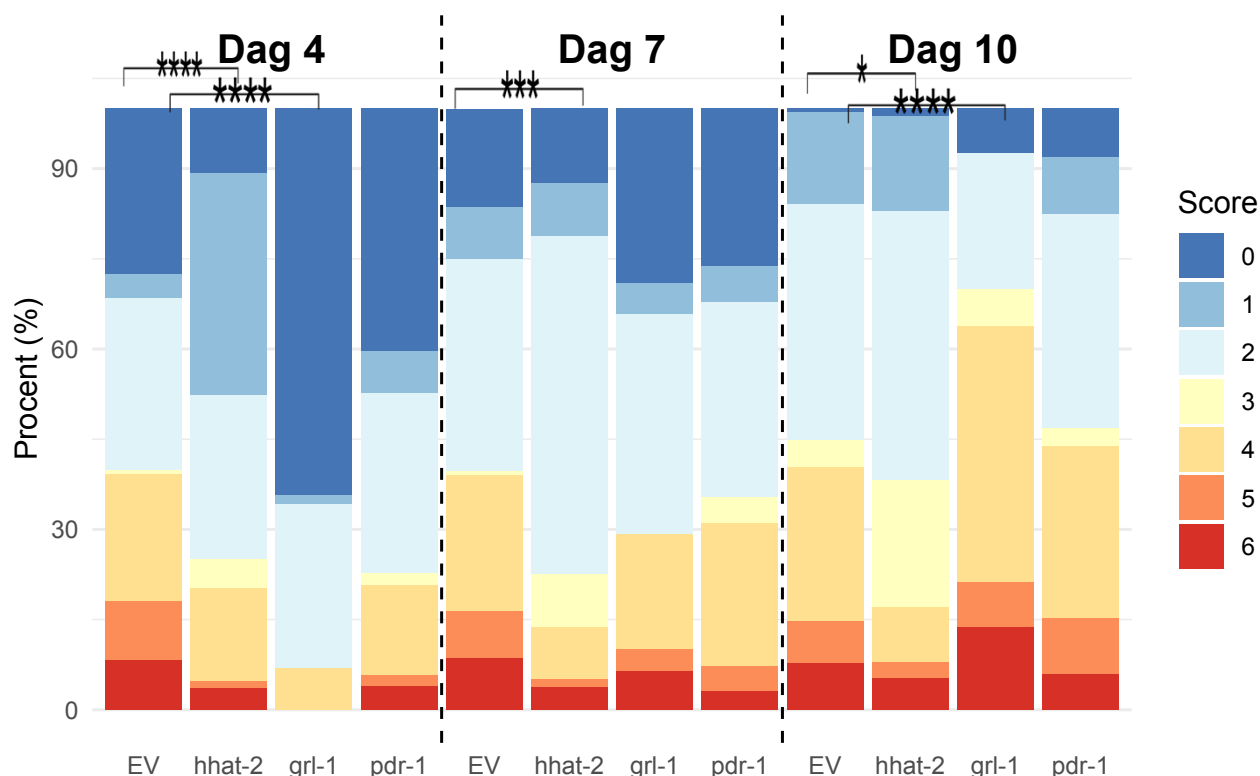
Tabel 3.2: Tabel over p-værdier og signifikansniveauer for test af variation af score i dopaminerge neuroner for hver behandling for hver alder i UA196 (+ α -synuclein). Behandling består af RNAi medieret genknockdown af enten *hhat-2*, *grl-1*, *pdr-1* eller EV (Empty Vector, kontrol). Statistisk analyse blev udført med en Pearson's χ^2 -test med bonferroni korrektion. Alle tests blev udført ved at sammenligne klon med EV inden for UA196, og derfor i alt 9 sammenligninger. Kun signifikante værdier er vist, med signifikansniveauer: * $p \leq 0,05$ og **** $p \leq 0,0001$

3.2.2 Knockdown af *hhat-2* beskytter mod aldersbetinget neurodegeneration, effekt af *grl-1* er aldersbetinget i CEP-neuroner i kontrol for PD.

Tilsvarende som for UA196 PD-modellen, ses den største effekt i UA202 (- α Syn) ved knockdown af *hhat-2*, som resulterede i statistisk signifikant lavere (sundere) score på dag 4, 7 og 10 (figur 3.4, tabel 3.3). Ligesom for UA196 indikerer dette, at nedregulering af *hhat-2* potentielt fungerer som beskyttende faktor for aldersbetinget neurodegeneration af dopaminerge neuroner, og Hh-signalering er dermed potentielt korreleret med PD. Yderligere var effektstørrelsen på dag 10 ved knockdown af *hhat-2* i UA196 større end i UA202 (tabel 3.4). *hhat-2* knockdown ser derfor ud til at have beskyttende effekt på dopaminerge neuroner, specielt i en model for PD.

Knockdown af *grl-1* resulterede i statistisk signifikant sundere neuroner på dag 4, som udviser den laveste middelværdi på tværs af alle 8 behandlinger (figur 3.6). Effekten af knockdown af *grl-1* skifter dog fortegn ved dag 10, da denne har signifikant usundere neuroner og næstlaveste middelværdi sammenlignet med alle behandlinger. Dette kan indikere, at *grl-1* har en aldersbetinget effekt på CEP-neuroner, tilsvarende som der ses i *tra-1* ekspressions-assay (figur 3.1). Yderligere ses ingen signifikant forskel for knockdown af *pdr-1* i UA202 på dag 4, 7 eller 10 (figur 3.4, tabel 3.3). Dette er som forventet, da man typisk ikke ser neurodegeneration af dopaminerge neuroner i *C. elegans* i *pdr-1/pink-1* mutanter ved fravær af α Syn (Bornhorst *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2015).

Stamme: UA202



Figur 3.4: Stablet søjlediagram over stammen UA202 (-alpha-synuclein) med RNAi medieret gen knockdown af enten hhat-2, grl-1 eller pdr-1 (hhv. $n \geq 21$, $n \geq 20$, $n \geq 40$) eller EV (Empty Vector, kontrol) ($n \geq 40$). Fotograferet som 4, 7 og 10 dage gamle F1-orme. Y-akse viser andelen i procentvis fordeling af en kvalitativ score fra 0-6 af 4 CEP dopaminerge neuroner i hovedet. Hvor 0 = perfekte neuroner og 6 = maksimalt degenereret. X-aksen viser hver behandling. Statistisk analyse blev beregnet med en Parvis χ^2 -test med bonferroni korrektion. Signifikansniveauer er vist med: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ og **** $p \leq 0,0001$. Kun signifikante værdier er vist.

Tabel 3.3: Tabel over p-værdier og signifikansniveauer for test af variation af score i CEP dopaminerge neuroner for hver behandling for hver alder i UA202 (-alpha-synuclein). Behandling består af RNAi medieret genknockdown af enten hhat-2, grl-1, pdr-1 eller EV (Empty Vector, kontrol). Statistisk analyse blev udført med en Parvis χ^2 -test med bonferroni korrektion. Alle tests blev udført ved at sammenligne klon med EV, og derfor i alt 9 sammenligninger. Kun signifikante værdier er vist, med signifikansniveauer: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ og **** $p \leq 0,0001$

Pearson's χ^2 -test med bonferroni korrektion på forskel mellem EV og RNAi medieret gen knockdown af enten hhat-2, grl-1 eller pdr-1 ved alderen 4, 7 og 10 dage gamle UA202 (-αSyn)						
Behandling	Alder	Chi ²	df	Korrigeret p-værdi	Signifikans-niveau	Lavere (sundere) score end EV
UA202 EV / UA202 hhat-2	4	61,78	6	$3,5 \times 10^{-10}$	****	Ja
UA202 EV / UA202 grl-1	4	39,07	6	$1,2 \times 10^{-5}$	****	Ja
UA202 EV / UA202 hhat-2	7	28,62	6	0,00129	***	Ja
UA202 EV / UA202 hhat-2	10	23,85	6	0,01004	*	Ja
UA202 EV / UA202 grl-1	10	32,17	6	0,00027	****	Nej

Tabel 3.4: Effektstørrelse (Cramér's V) er et mål for sammenhængen mellem to kategoriske variabler, hvor 0 = svag og 1 = stærk (Cramér, Harald. 1946). Udregnet på forskellen mellem scoren af de dopaminerge CEP neuroner i UA202 EV / UA202 *hhat-2*, samt UA196 EV / UA196 *hhat-2* i 10 dage gamle orme. Effektstørrelsen viser at knockdown af *hhat-2* har større effekt i UA196 (+ α Syn) end UA202 (- α Syn).

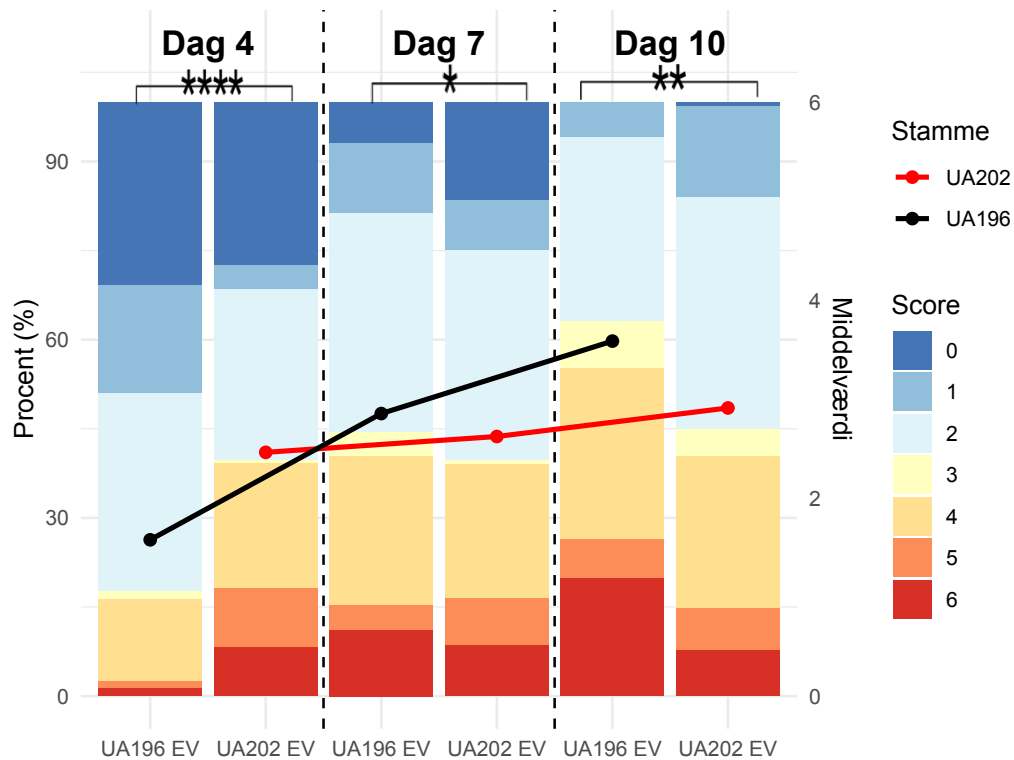
Effektstørrelse (Cramér's V) af RNAi medieret knockdown af <i>hhat-2</i> på helbred af CEP neuroner		
UA202 EV dag 10	UA202 <i>hhat-2</i> dag 10	0,31
UA196 EV dag 10	UA196 <i>hhat-2</i> dag 10	0,424

3.2.3 Degeneration af CEP-neuroner er aldersbetinget, og forstærkes af α Syn-induceret toksicitet

UA202 EV og UA196 EV var statistisk signifikant forskellige for alle dage (figur 3.5, tabel 3.5). På dag 4 udviste UA202 EV øget neurodegeneration sammenlignet med UA196 EV. Dette strider imod forventningen, da der forventes en α Syn-induceret toksicitet af de dopaminerge neuroner i UA196, som ville resultere i større neurodegeneration (Gaeta, Caldwell & Caldwell, 2019). α Syn-induceret toksicitet er dog aldersbetinget, og toksiciteten i dopaminerge neuroner ophobes typisk over tid (Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Dette stemmer overens med det der ses på dag 7 og 10, da der ses en tendens til, at UA196 forringes mere med alderen end UA202. For dag 7 og 10 har UA202 signifikant mindre degeneration end UA196. Dette tyder på, at α Syn har en aldersbetinget toksisk effekt på de dopaminerge CEP-neuroner som forventet.

Middelværdien stiger med alderen på tværs af alle 8 behandlinger, og resulterede derfor i statistisk signifikant større grad af degeneration fra dag 4 til 10 (figur 3.5, tabel 3.6). Dette er at forvente, da neurodegeneration af dopaminerge neuroner øges med alderen 31.03.2025 11.24.00. En andel af denne akkumulering af skader på CEP-neuronerne er formentlig betinget af α Syn i UA196 (figur 3.4, tabel 3.5) (Wirdefeldt *et al.*, 2011).

Disse resultater kan dermed indikere, at neurodegeneration er aldersbetinget for alle behandlinger. Yderligere vises det, at α Syn øger aldersbetinget degeneration af CEP-neuroner, som følge af α Syn-induceret toksicitet.



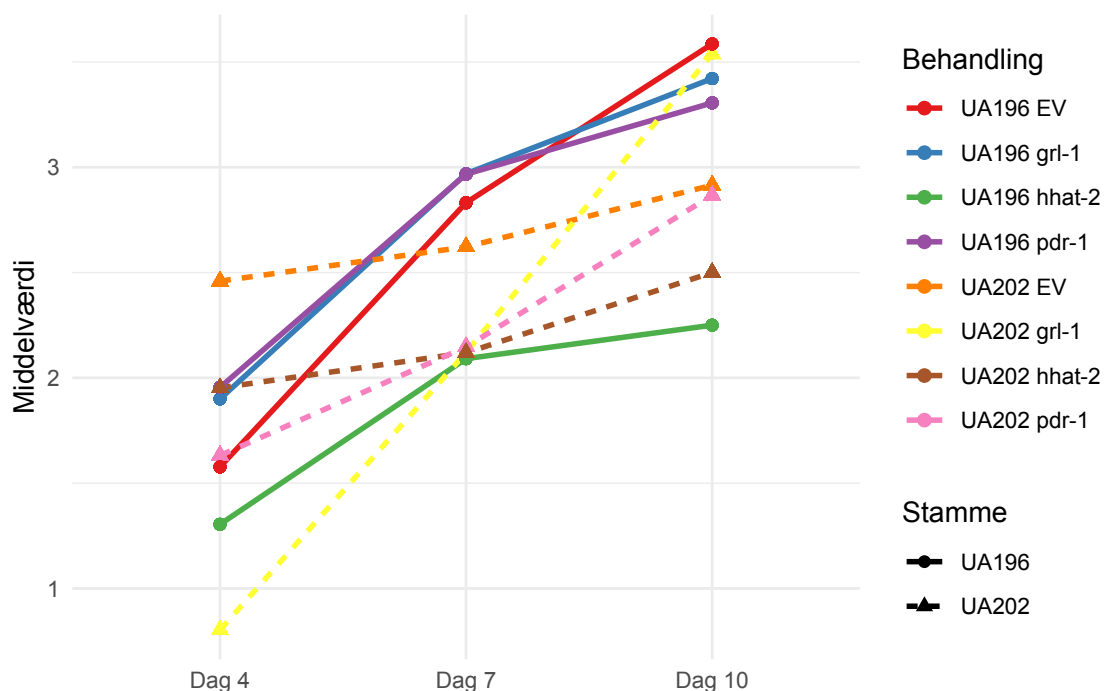
Figur 3.5: Stabledt søjlediagram over stammerne UA196 (+alpha-synuclein) og UA202 (-alpha-synuclein) med Empty Vector (EV) ($n \geq 40$). Fotograferet som 4, 7 og 10 dage gamle F1 orme. Venstre Y-akse henviser til søjlediagrammet og viser andelen i procentvis fordeling af en kvalitativ score fra 0-6 af 4 CEP dopaminerge neuroner i hovedet. Hvor 0 = perfekte neuroner og 6 = maksimalt degenereret. Højre Y-akse henviser til grafen og viser den gennemsnitlige middelværdi for hver behandling af scoren fra 0-6. X-aksen viser hver behandling. Statistisk analyse blev beregnet med en Parvis χ^2 -test, vist med signifikansniveauer: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ og $****p \leq 0,0001$.

Tabel 3.5: Tabel over p-værdier og signifikansniveauer for test af variation af score i dopaminerge neuroner for UA202 EV (-alpha-synuclein) og UA196 EV (+alpha-synuclein) ved alderen 4, 7 og 10 dage. Statistisk analyse blev udført med en Parvis χ^2 -test med bonferroni korrektion. Signifikansniveauer: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ og $****p \leq 0,0001$.

Pearson's χ^2 -test med bonferroni korrektion på forskel mellem UA202 EV og UA196 EV ved 4, 7 og 10 dage gamle orme.						
Behandling	Alder	Chi ²	df	Korrigeret p-værdi	Signifikans-niveau	Laveste (sundest) score
UA196 EV / UA202 EV	4	37,81	6	1.22×10^{-6}	****	UA196 (+αSyn)
UA196 EV / UA202 EV	7	14,40	6	0,0255	*	UA202 (-αSyn)
UA196 EV / UA202 EV	10	18,85	6	0,0044	**	UA202 (-αSyn)

Tabel 3.6: Tabel over p-værdier og signifikansniveauer for test af variation af score i CEP dopaminerge neuroner mellem dag 4 og 10 inden for samme behandling (stamme + klon). Statistisk analyse blev udført med en Parvis χ^2 -test med bonferroni korrektion. Alle sammenligninger er **** $p \leq 0,0001$.

Behandling		Chi ²	df	Korrigeret p-værdi	Signifikans-niveau
UA202 <i>grl-1</i> dag 4	UA202 <i>grl-1</i> dag 10	93,43	12	8.55×10^{-14}	****
UA202 <i>hhat-2</i> dag 4	UA202 <i>hhat-2</i> dag 10	44,93	12	8.48×10^{-5}	****
UA202 <i>pdr-1</i> dag 4	UA202 <i>pdr-1</i> dag 10	55,43	12	1.21×10^{-6}	****
UA202 EV dag 4	UA202 EV dag 10	63,36	12	4.38×10^{-8}	****
UA196 <i>grl-1</i> dag 4	UA202 EV dag 10	47,29	12	3.32×10^{-5}	****
UA196 <i>hhat-2</i> dag 4	UA196 <i>hhat-2</i> dag 10	69,25	12	3.54×10^{-9}	****
UA196 <i>pdr-1</i> dag 4	UA196 <i>pdr-1</i> dag 10	102,34	12	1.55×10^{-15}	****
UA196 EV dag 4	UA196 <i>pdr-1</i> dag 10	122,89	12	1.31×10^{-19}	****



Figur 3.6: Graf over stammerne UA202 (-alpha-synuclein) og UA196 (+alpha-synuclein) med RNAi medieret genknockdown af enten *hhat-2*, *grl-1* eller *pdr-1* (hhv. $n \geq 21$, $n \geq 20$, $n \geq 40$) eller EV (Empty Vector, kontrol) ($n \geq 40$). Y-akse viser den gennemsnitlige middelværdi for hver behandling af en kvalitativ score fra 0-6 af 4 CEP dopaminerge neuroner i hovedet af F1 orme. X-aksen viser ormenes alder ved billedtagning.

3.3 Mitokondriemorfologi-assay: Sundhed af mitokondrie-netværket baseret på MitoTracker kvantificeret morfologi ved *grl-1* og *pdr-1* knockdown

For at undersøge om Hh-signaler er involveret i mitokondriesundhed, blev der udviklet et assay som kvantificerer morfologien af mitokondrienetværket. Enkelte studier har vist en

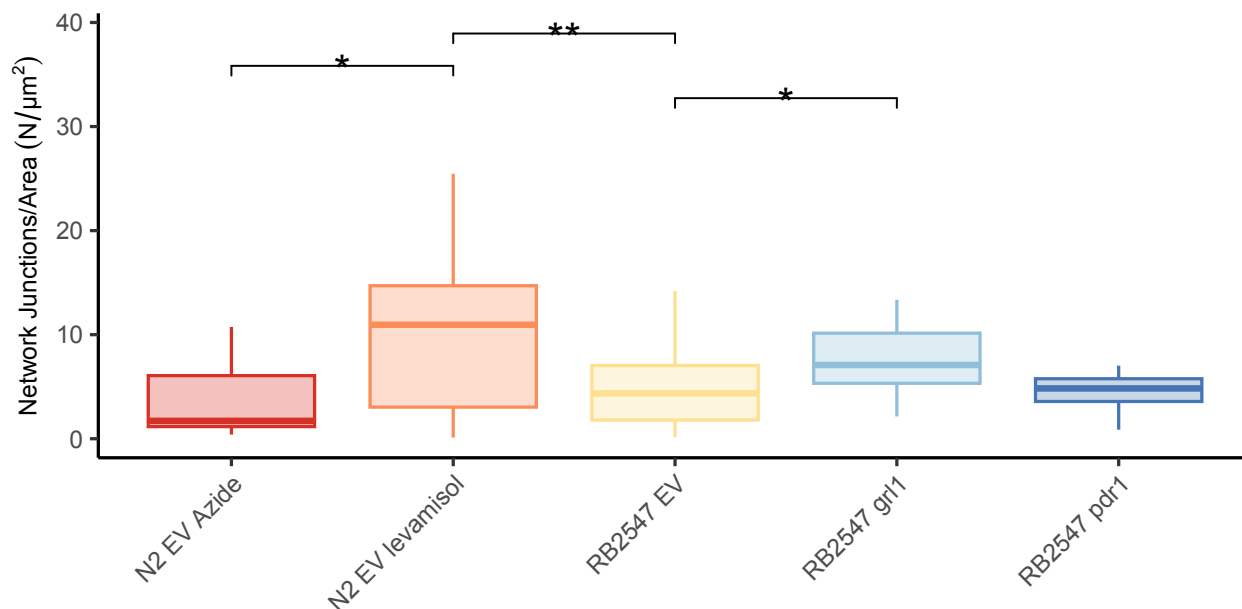
potentiel sammenhæng mellem Hh-signalering, PINK1 og mitokondrielle dynamikker, om end denne interaktion ikke er fuldt forstået (Yao *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2022). For at undersøge dette blev det mitokondrielle netværket kvantificeret via den fluorescerende probe MitoTracker Orange CMTMRos. Assayet blev udført på 6 dage gamle F1-orme, og resulterede i markører for mitokondrienetværket i form af Particle Area/Area, Network Junctions/Area og Total Branch Length/Area som markører for mitokondriesundheden. For alle tre markører forventes det, at højere værdier indikerer øget mitokondriel netværk (Valente *et al.*, 2017), som er korreleret med øget mitokondriesundhed (Luz *et al.*, 2015).

Stammen RB2547 har en deletions-mutation i *pink-1* (Wormbase, u.d.3) hvilket antageligt resulterer i loss of function af PINK-1-proteinet (ortholog til human *PINK1*), hvilket er en del af kvalitetssikringen af mitokondrierne i *C. elegans* (Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Campbell & Zuryn, 2024). Det forventes derfor, at RB2547 udviser nedsat sundhed af mitokondrienetværket, medieret af nedsat kvalitetssikring af mitokondrier af PINK-1, sammenlignet med kontrol.

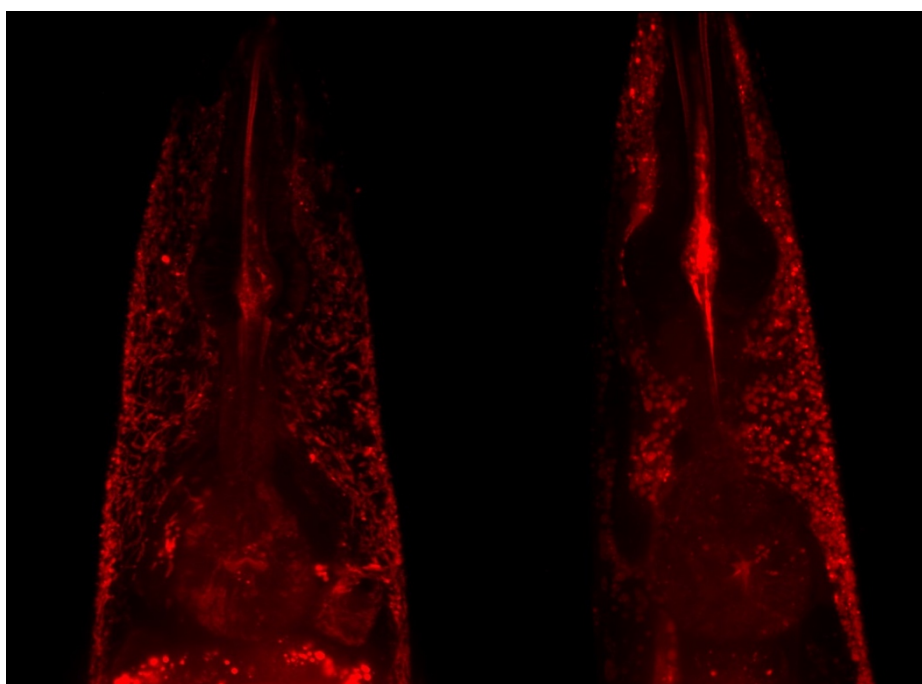
For at undersøge effekten af *grl-1* og *pdr-1* på mitokondrienetværket i en *pink-1* mutant, blev der udført RNAi medieret knockdown på begge gener i RB2547. N2 (WT) EV fungerede som negativ kontrol for *pink-1* mutationen i RB2547. N2 EV lammet i sodium azide fungerede som positiv kontrol for assayet, da MitoTracker proben er afhængig af membranpotentiale for at blive optaget, og fluorescens-signalet er derfor mindsket når ormene lammes i sodium azide frem for levamisol (Begelman *et al.*, 2022). Yderligere inducerer sodium azide mitokondriel depolarisering, hvilket er korreleret med fission gennem rekruttering af DRP-1 og dermed øget fragmentering af netværket (Luz *et al.*, 2015; Valente *et al.*, 2017). Det forventes derfor, at N2 EV med sodium azide har reduceret mitokondrienetværket.

3.3.1 Network Junctions/Area: *grl-1* knockdown beskytter mod *pink-1* relateret fragmentering af det mitokondrielle netværk og ingen effekt ved knockdown af *pdr-1*

Der ses statistisk signifikant flere Network Junctions i N2 EV end RB2547 EV (figur 3.7, tabel 3.7). Dette kan indikere at mutationen af *pink-1* i RB2547 øger fragmenteringen af det mitokondrielle netværk, formentlig medieret af nedsat kvalitetskontrol af PINK-1 som forventet. *grl-1* knockdown resulterer i statistisk signifikant øget Network Junctions/Area i RB2547 sammenlignet med EV. Dette tyder på, at nedsat *grl-1* ekspression øger sundheden af det mitokondrielle netværk, og potentielt modvirker noget af tabet på mitokondrienetværket der observeres i *pink-1* mutation. Ved *pdr-1* knockdown er der mod forventning ingen observeret forskel.



Figur 3:7: Sum af mitokondrie Network Junctions normaliseret til interesseområdet. Udregnet for Stammen RB2547 med knockdown af *grl-1* eller *pdr-1* eller EV (kontrol) ($n \geq 24$) lammet i levamisol, samt stammen N2 (WT) med EV og lammet i enten sodium azide eller levamisol ($n = 30$, begge behandlinger). Fotograferingen foregik af 6 dage gamle F1-orme. Statistisk analyse blev beregnet med en pairwise t-test med Bonferroni-korrektion vist med signifikansniveauer: $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$. Kun signifikante sammenligninger er vist.



Figur 3.8: Visuel repræsentation af forskellen mellem et sundt elongeret mitokondrienetværk til venstre (N2 i levamisol) og fragmenteret mitokondrienetværk til højre (N2 i sodium azide).

Derudover resulterer N2 EV lammet i levamisol i signifikant flere Network Junctions/Area sammenlignet med N2 EV i sodium azide, hvilket indikerer, at sodium azide har fragmenteret det mitokondrielle netværk (figur 3.8). N2 EV lammet i sodium azide fungerede som positiv kontrol for dette assay, hvilket dermed indikerer, at assayet har fungeret korrekt.

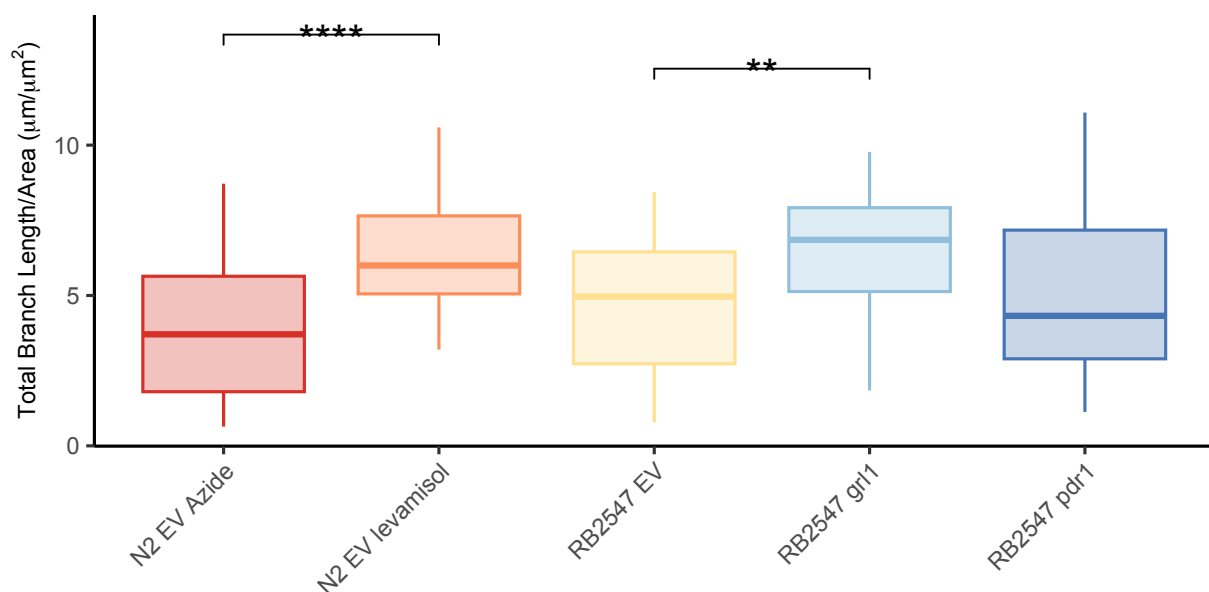
Tabel 3.7: Tabel over p-værdier og signifikansniveauer beregnet med Student's t-test med Bonferroni-korrektion for Network Junctions normaliseret til interesseområdet. Signifikansniveauer: * $p \leq 0,05$ og ** $p \leq 0,01$.

Network Junctions/Area: Student's t-test med bonferroni korrektion på forskel imellem EV og RNAi medieret gen knockdown af enten <i>grl-1</i> eller <i>pdr-1</i> og forskel i N2 (WT) EV lammet i enten levamisol eller sodium azide.			
Behandling	Korrigeret p-værdi	Signifikans-niveau	Betydning
N2 EV Azide / N2 EV levamisol	0,019	*	N2 EV har færre Network Junctions i sodium azide end levamisol
N2 EV levamisol / RB2547 EV	0,0021	**	RB2547 har færre Network Junctions end N2 EV
RB2547 EV / RB2547 <i>grl-1</i>	0,017	*	I RB2547 resulterer knockdown af <i>grl-1</i> i flere Network Junctions end EV
RB2547 EV / RB2547 <i>pdr-1</i>	0,7563		Ingen forskel

3.3.2 Total Branch Length/Area: *grl-1* knockdown beskytter mod fragmentering af det mitokondrielle netværk og ingen effekt ved knockdown af *pdr-1*

grl-1 knockdown resulterer i statistisk signifikant øget Total Branch Length/Area i RB2547 sammenlignet med EV (figur 3.9, tabel 3.8). Dette indikerer ligesom for Network Junctions/Area, at knockdown af *grl-1* øger mitokondriesundheden. Knockdown af *pdr-1* resulterer i ingen observeret forskel i Total Branch Length/Area.

Der ses statistisk signifikant større Total Branch Length/Area for N2 EV lammet i levamisol end i sodium azide, hvilket indikerer, at assayet har fungeret korrekt. Der er ingen observeret forskel mellem RB2547 EV og N2 EV i levamisol. Dette kan indikere, at *pink-1* mutationen i RB2547 ikke har effekt på Total Branch Length/Area.



Figur 3.9: Sum af mitokondrie Total Branch Length normaliseret til interesseområdet. Udregnet for Stammen RB2547 med knockdown af *grl-1* eller *pdr-1* eller EV (kontrol) ($n \geq 24$) lammet i levamisol,

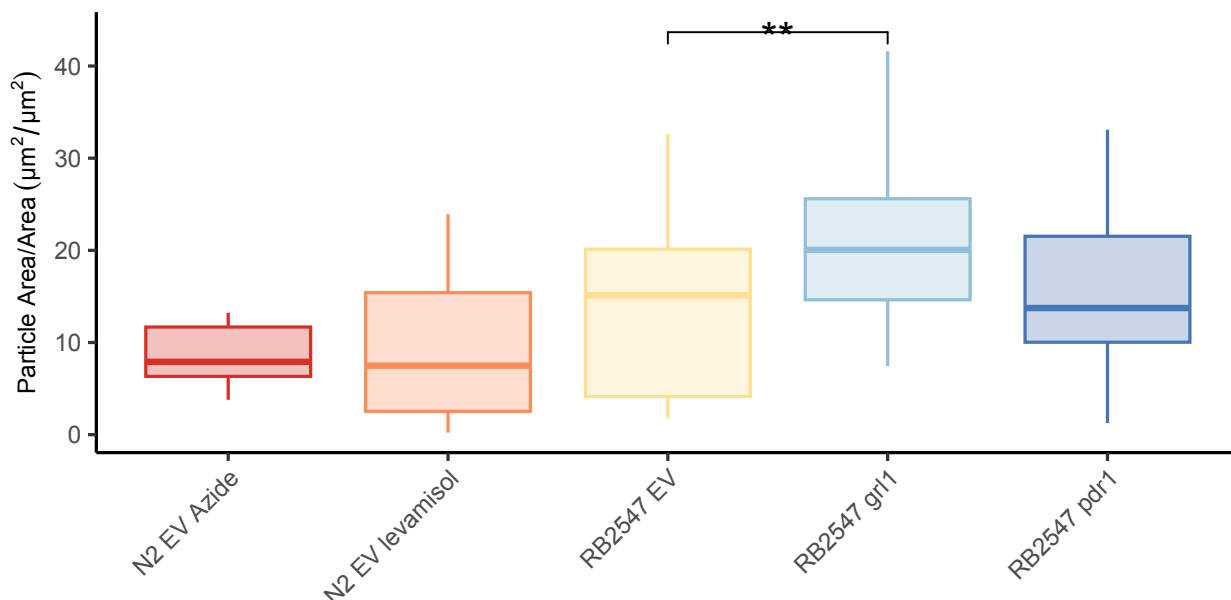
samt stammen N2 (WT) med EV og lammet i enten sodium azide eller levamisol ($n = 30$, begge behandlinger). Fotograferingen foregik af 6 dage gamle F1-orme. Statistisk analyse blev beregnet med en pairwise t-test med Bonferroni-korrektion vist med signifikansniveauer: $**p \leq 0,01$ og $****p \leq 0,0001$. Kun signifikante sammenligninger er vist.

Tabel: 3.8 Tabel over p-værdier og signifikansniveauer beregnet med Student's t-test med Bonferroni-korrektion for Total Branch Length normaliseret til interesseområdet. Signifikansniveauer: $*p \leq 0,05$ og $****p \leq 0,0001$.

Total Branch Length: Student's t-test med bonferroni korrektion på forskel mellem EV og RNAi medieret gen knockdown af enten <i>grl-1</i> eller <i>pdr-1</i> og forskel i N2 (WT) EV lammet i enten levamisol eller sodium azide.			
Behandling	Korrigeret p-værdi	Signifikans-niveau	Betydning
N2 EV Azide / N2 EV levamisol	0,000049	****	Større mitokondrienetværk lammet i levamisol end sodium azide
N2 EV levamisol / RB2547 EV	0,65		Ingen forskel
RB2547 EV / RB2547 <i>grl-1</i>	0,00904	**	Større mitokondrienetværk ved <i>grl-1</i> knockdown
RB2547 EV / RB2547 <i>pdr-1</i>	0,59		Ingen forskel

3.3.3 Network Junctions/Area: *grl-1* knockdown beskytter mod fragmentering af det mitokondrielle netværk og ingen effekt ved knockdown af *pdr-1*

grl-1 knockdown resulterer i statistisk signifikant større Particle Area/Area i RB2547, og ser derfor ud til at øge det mitokondrielle netværk (figur 3.10, tabel 3.9). Der ses ingen statistisk signifikant forskel i Particle Area/Area for N2 EV lammet i levamisol eller sodium azide. Som nævnt tidligere (afsnit 3.3) forventes det at Particle Area/Area reduceres ved brug af sodium azide. Der observeres dog ingen signifikant forskel mellem levamisol og sodium azide. Dette kan indikere, at der er sket en fejl i assayet, da N2 EV i sodium azide fungerede som positiv kontrol. Yderligere var der, tilsvarende med Total Branch Length/Area, ingen observeret forskel mellem N2 EV og RB2547 EV. Dette går imod forventningen, da nedsat kvalitetssikring af mitokondrier øger mitokondriel dysfunktion, som er korreleret med øget fragmentering, depolarisering og mitofagi, som mindsker netværket (Valente *et al.*, 2017).



Figur 3.10 Sum af Particle Area normaliseret til interesseområdet. Udregnet for Stammen RB2547 med knockdown af genet *grl-1*, *pdr-1* eller EV (kontrol) ($n \geq 24$), samt stammen N2 (WT) med EV og immobiliseret i enten sodium azide eller levamisol ($n = 30$, begge behandlinger). Fotograferingen foregik af 6 dage gamle F1. Statistisk analyse blev beregnet med en pairwise t-test med Bonferroni-korrektion vist med signifikansniveauer: $*p \leq 0,05$ og $**p \leq 0,01$. Kun signifikante sammenligninger er vist.

Som opsummering har *grl-1* knockdown resulteret i statistisk signifikant større værdier for alle 3 markører for mitokondrienetværket i RB2547 sammenlignet med kontrol. Øget mitokondrienetværk er et tegn på sunde mitokondrier, da høj grad af sammenbundne mitokondrier øger deres metaboliske aktivitet og potentiale (Luz et al., 2015). Dette indikerer, at knockdown af *grl-1* øger mitokondriesundheden og eller mindsker mitokondriedysfunktion. Dette tyder dermed på, at Hh-signaleret potentielt er involveret i regulering af mitokondrielle dynamikker. *pink-1* mutation resulterede kun i nedsat mitokondrienetværk i Network Junctions/Area, *pdr-1* knockdown har mod forventning ikke påvirket det netværket for nogen markører.

Tabel 3.9: Tabel over p-værdier og signifikansniveauer beregnet med Student's t-test med Bonferroni-korrektion for Particle Area/Area normaliseret til interesseområdet. Signifikansniveauer: $*P < 0,01$.

Particle Area/Area: Student's t-test med bonferroni korrektion på forskel mellem EV og RNAi medieret gen knockdown af enten <i>grl-1</i> eller <i>pdr-1</i> og forskel i N2 (WT) EV lammet i enten levamisol eller sodium azide.			
Behandling	Korrigeret p-værdi	Signifikans-niveau	Betydning
N2 EV Azide / N2 EV levamisol	0,4696		Ingen forskel
N2 EV levamisol / RB2547 EV	0,10036		Ingen forskel
RB2547 EV / RB2547 <i>grl-1</i>	0,00648	**	<i>grl-1</i> knockdown resulterer i større Particle Area/Area
RB2547 EV / RB2547 <i>pdr-1</i>	0,44863		Ingen forskel

4 Diskussion

4.1 Uventet opregulering af *tra-1* ekspression efter *grl-1* knockdown

DZ840 blev undersøgt som en potentiel reporter-stamme for Hh-signalering, i det den bærer et transgen, hvor TRA-1 er mærket med GFP og fungerer som en nedstrøms transkriptionsfaktor i Hh-signalvejen (Briscoe & Théron, 2013). For at undersøge om Hh-r gener har en nedstrøms effekt på TRA-1-niveauet, blev der udført knockdown af *grl-1* i DZ840. Det resulterede i statistisk signifikant større *tra-1* ekspression i 7 og 10 dage gamle orme (figur 3.1). Resultatet var overraskende, idet det var forventet, at nedregulering af *grl-1* ville føre til reduceret *tra-1* ekspression. At der observeres en effekt kan dog indikere, at *tra-1* er involveret i Hh-signalvejen via GRL-1 interaktion, men med en modsatrettet effekt end forventet. Dette udgør et originalt fund, da der hidtil ikke er dokumenteret ændringer i TRA-1 niveauet som følge af Hh-r aktivitet (VanDerMolen *et al.*, 2025).

4.1.1 Tolkning af *tra-1* opregulering ved *grl-1* knockdown i en fragmenteret Hh-signalvej

For at kunne fortolke effekten af *grl-1* knockdown i mitokondriemorfologi- og dopaminerge neurodegenerations-assays er det afgørende at klarlægge, hvorvidt *grl-1* knockdown fører til op- eller nedregulering af Hh-signalering i DZ840. Det kan dog diskuteres, om Hh-signalering i *C. elegans* kan opfattes som op- eller nedreguleret på baggrund af *tra-1* ekspression, på samme måde som i pattedyr, hvor Hh-ligander initierer en signaleringskaskade, der ender i Gli-medieret ekspression af Hh-målgener (Carballo *et al.*, 2018). I *C. elegans* er signaleringen mere kompleks og fragmenteret, idet der findes 60 forskellige Hh-r gener med varierende funktioner, hvor *grl-1* kun udgør ét af disse. For eksempel er *grd-1* en negativ regulator af udviklingshastighed medieret af mTORC2-aktivitet (Emans *et al.*, 2023). *qua-1* er essentiel for korrekt overgang mellem larvestadier, gennem positiv regulering af hamskifte (Burglin, 2006; Emans *et al.*, 2023). *wrt-10* fremmer health span ved inhibering af reproduktiv aldring (Templeman *et al.*, 2020). Antallet og funktionerne er derfor udvidet, og det er sandsynligt, at andre Hh-r proteiner op- eller nedreguleres som kompensatorisk respons på *grl-1* knockdown (Serra, Darwin & Sundaram, 2024). Hh-r associeret Hh-signalering er derfor involveret i forskellige fysiologiske processer, involverer flere adskilte signalveje, er kontekstafhængig og kan ikke beskrives som en samlet, binær tændt/slukket signaleringskaskade, som er tilfældet i pattedyr (Zhang & Beachy, 2023). Konsekvensen heraf er, at effekten af ét Hh-r gen, såsom *grl-1*, på *tra-1* ekspression, ikke nødvendigvis afspejler den samlede aktivitet i Hh-signaleringen, som Gli-niveauet i pattedyr (Heretsch, Tzagkaroulaki & Giannis, 2010). Det er derfor nødvendigt at analysere enkelte komponenter og deres funktion i den Hh-r associerede Hh-signalering separat.

På baggrund af ovenstående, kan den observerede øgede *tra-1* ekspression ved *grl-1* knockdown (figur 3.1) fortolkes ud fra flere potentielle forklaringsmodeller, hvoraf de tre formentlig mest sandsynlige er følgende:

i) *grl-1* fungerer som en negativ regulator i Hh-signalerings, og den øgede *tra-1* ekspresion skyldes en direkte kausal effekt. I modsætning til pattedyr, hvor Hh-liganderne Shh, Ihh alle er positive regulatorer, findes der flere eksempler i *C. elegans* på Hh-r, der fungerer som negative regulatorer i Hh-signalvejen (Burglin, 2006; Carballo *et al.*, 2018).

ii) *grl-1* knockdown medfører en indirekte opregulering af andre Hh-r gener med positiv regulatorisk funktion, hvilket kan forklare den øgede *tra-1* ekspresion.

iii) *grl-1* og *tra-1* er ikke funktionelt forbundet, men korrelerer via en tredje biologisk proces, såsom udvikling og levetid. Flere Hh-r proteiner, fx HHAT-2 og GRD-1, er involveret i regulering af levetid og udviklingshastighed (Kim & Sun, 2007; Emans *et al.*, 2023). Da *tra-1* ekspresion ser ud til at falde med alderen, kan den observerede opregulering ved *grl-1* knockdown være et resultat af forsinket udvikling (figur 3.1).

Det er dog hidtil ikke vist, at et Hh-r gen har en nedstrøms effekt på *tra-1*, hvorfor ii) opregulering af andre Hh-r synes mindre sandsynlig (VanDerMolen *et al.*, 2025). Under *tra-1* ekspresions-assay blev alle orme målt, og *grl-1* knockdown resulterede ikke i mindre individer (data ikke vist), hvorfor iii) synes mindre sandsynlig. På baggrund af disse overvejelser, vurderes det derfor mest sandsynligt, at i) *grl-1* fungerer som negativ regulator i Hh-signalerings med *tra-1* ekspresion som markør, om end det stadig er spekulativt. Dermed kan de observerede effekter i mitokondrie-morfologi- og dopaminerge neurodegenerations-assay potentielt tilskrives op- eller nedregulering af GRL-1 associeret Hh-signalerings.

4.1.2 DZ840 som Hh-reporterstamme: *tra-1* ekspresion som markør for komponenter af Hh-signalerings

Som diskuteret kan *tra-1* ekspresion formentlig ikke anvendes som markør for den samlede aktivitet i Hh-signalerings. Dog tyder resultaterne på, at *grl-1* interagerer med komponenter af signalvejen. *tra-1* er normalt ikke fundet til at være associeret med Hh-r aktivitet. En mulig forklaring er, at TRA-1 i *C. elegans* har divergeret funktionelt fra sin Gli-homolog, og i stedet primært fungerer som regulator af kønsdifferentiering (Shen & Hodgkin, 1988; Zugasti, Rajan & Kuwabara, 2005). At TRA-1 og Hh-signalerings er funktionelt adskilte, understøttes af, at orme med mutationer i *tra-1* og *ptc/ptr* udviser forskellige fænotyper (Jenkins, 2009). Desuden fandt VanDerMolen *et al.* (2025), at effekten af GRD-3 og GRD-4, to Hh-r proteiner i Groundhog familien, var uafhængig af TRA-1 aktivitet. Disse resultater baserer sig dog kun på to ud af 60 Hh-r proteiner, og det kan derfor ikke udelukkes, at andre Hh-r proteiner, herunder GRL-1, kan påvirke TRA-1 aktivitet gennem alternative mekanismer. Andre studier har desuden vist, at nogle Hh-r inducerede fænotyper medieres via andre transkriptionsfaktorer end TRA-1 (Lin & Wang, 2017; Emans *et al.*, 2023). Mange Hh-r proteiner fungerer derfor uafhængigt af TRA-1, men det er endnu uafklaret, om TRA-1 alligevel kan indgå som transkriptionsfaktor i Hh-signalerings medieret af andre Hh-r, der endnu ikke er funktionelt beskrevet (Emans *et al.*, 2023; VanDerMolen *et al.*, 2025).

Samlet set fremstår Hh-signalvejen i *C. elegans* kompleks og fragmenteret, uden en enkelt markør for dets samlede aktivitet. Dette projekts data tyder på, at GRL-1 er opstrøms for TRA-1, hvilket antyder, at *tra-1* muligvis kan anvendes som markør for enkelte komponenter i Hh-

signalvejen. DZ840 kan derfor fungere som potentiel Hh-reporterstamme for komponenter af Hh-signaleringsvejen.

For at kortlægge signalvejen og bestemme hvilke Hh-r proteiner der regulerer *tra-1*, kan der udføres et systematisk genetisk screen ved RNAi medieret knockdown af en lang række Hh-r gener, og bestemme om disse ændrer *tra-1* ekspressionen i DZ840. Alternativt kan der udføres knockdown af *hhat-2*, da den formentlig er involveret i modning af Hh-r proteiner, og derfor potentielt nødvendig for korrekt funktion af Hh-r (Kolotuev, Apaydin & Labouesse, 2009). En ændring i *tra-1* ekspression ved *hhat-2* knockdown vil derfor kunne understøtte hypotesen om, at TRA-1 indgår i Hh-signaleringsvejen. Af tidsmæssige årsager blev disse eksperimenter dog ikke gennemført i dette projekt.

4.2 Hedgehog-signaleringsvejen i PD: Neurotoksicitet og aldersbetingede effekter ved *hhat-2* og *grl-1* knockdown

Hh-signaleringsvejen ser ud til at være korreleret med udvikling af PD (Schmidt *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2024). Dette ses blandt andet i de præliminære data, som dette projekt er baseret på, at fibroblastceller fra PD-patienter har øget Hh-signaleringsvejen (afsnit 1.5.1). Det er endnu ikke afklaret, om dette er en kausal sammenhæng, og i så fald hvilke faktorer der påvirker hvilken (Bae *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2022)

grl-1 knockdown i UA196 viste ingen statistisk signifikant forskel for nogen dage (figur 3.3). Dette kan indikere, at *grl-1* ikke har en væsentlig rolle i aldersbetinget α Syn-induceret toksicitet i CEP-neuronerne. *grl-1* knockdown i RB2547 så dog ud til, at mindske noget af tabet i det mitokondrielle netværk i *pink-1* mutanten (figur 3.7). En alternativ forklaring kan som tidligere nævnt være en kompensatorisk op- eller nedregulering af de 59 andre Hh-r som potentielt reducerer fænotypen. Til sammenligning findes der i *C. elegans* kun to homologer til pattedyrs HHAT, herunder *hhat-2*, som hos pattedyr er involveret i modningen af Hh-ligander. Hvis HHAT-2 har lignende funktion i *C. elegans*, er det forventeligt, at *hhat-2* knockdown resulterer i mere udtalt fænotyper end *grl-1*. Det er dog ikke endnu ikke dokumenteret, at HHAT-2 er afgørende for korrekt Hh-signaleringsvejen gennem Hh-r palmitoylering. Imidlertid indeholder mange Hh-r dog Hedge-domænet, som tyder på, at de kan palmitoyleres (Kolotuev, Apaydin & Labouesse, 2009). Dette kan forklare, at *hhat-2* knockdown fører til statistisk signifikant sundere CEP-neuroner på de fleste dage i både UA196 og UA202 (figur 3.3; 3.4, tabel 3.2; 3.3). Resultaterne antyder således, at Hh-signaleringsvejen kan have en neurotoksisk effekt på CEP-neuroner, både ved aldersbetinget neurodegeneration og α Syn-induceret toksicitet. På baggrund heraf er det muligt, at den forhøjede Hh-signaleringsvejen der ses i de præliminære data, har toksisk effekt på de dopaminerge neuroner i PD-patienterne. Dette er i overensstemmelse med (Schmidt *et al.*, 2022), der viste, at øget Hh-signaleringsvejen havde en negativ effekt i en PD-model med hæmmet PINK1-aktivitet, mitokondriel dysfunktion og forkortede primære cilia. Ved inhibering af Hh-signaleringsvejen blev cilialængden normaliseret, og mitokondriernes funktion forbedret. Forfatterne konkluderede, at øget Hh-signaleringsvejen kan bidrage til udviklingen af PD via ændringer i cilialængden, der er relateret til PINK1-aktivitet. Disse resultater understøtter således

projektets observationer af, at Hh-signalerings potentielt kan være skadelig for dopaminerge neuroner, som illustreret ved *hhata-2* knockdown.

I UA202 resulterede *grl-1* knockdown i en statistisk signifikant forskel, hvor 4 dage gamle orme havde sundere CEP-neuroner, mens 10 dage gamle orme havde mere usunde (figur 3.4, tabel 3.3). Dermed udviste UA202 med *grl-1* knockdown den største forskel i middelværdi blandt samtlige behandlinger, med lavest middelværdi på dag 4 og næsthøjst på dag 10, hvilket indikerer en betydelig aldersbetinget neurodegeneration (figur 3.6). Disse observationer peger på, at GRL-1 har en aldersbetinget neurotoksisk eller -beskyttende effekt på aldersbetinget neurodegeneration af CEP-neuroner, ved fraværet af α Syn. Neurotoksisk effekt ved Hh-signalerings blev tilsvarende observeret af Khan *et al.* (2024) der fandt, at nedsat Hh-signalerings, medieret af tab af primære cilia, medførte lavere niveauer af GDNF, en neurobeskyttende faktor for bl.a. dopaminerge neuroner, som potentielt kan forværre PD-neuropatologi (Khan *et al.*, 2024). Tabet af primære cilia kan være relateret til nedsat PINK1-aktivitet, hvilket understøttes af Bagnoli *et al.*, 2025 som viste, at PINK1 *-/-* mus havde nedsat Hh-signalerings som følge af forkortede primære cilia – en effekt, der var betinget af reduceret PINK1-afhængig fosforylering af Rab8.

Samlet set er sammenhængen mellem Hh-signalerings og PD kompleks, og resultaterne samt litteraturen peger på en gensidig påvirkning (Khan *et al.*, 2024; Bagnoli *et al.*, 2025). Knockdown af *hhata-2* resulterede i sundere CEP-neuroner i UA196 og UA202, hvorimod *grl-1* knockdown viste aldersbetinget neurotoksisk og neurobeskyttende effekt ved fravær af α Syn. Om Hh-signalerings forværre eller beskytter mod PD-patologi, kan potentielt afhænge af graden af Hh-signalerings (Schmidt *et al.*, 2022), timing, kontekst og alder.

4.3 Reduceret neurodegeneration ved *hhata-2* knockdown skyldes sandsynligvis inhibering af Hedgehog-signalerings snarere end forlænget levetid

Den observerede reduktion i neurodegeneration ved *hhata-2* knockdown kan potentielt skyldes, at Hh-signalerings har neurotoksisk effekt på de dopaminerge neuroner. En alternativ forklaring kunne være, at *hhata-2* negativt regulerer levetid. Da neurodegeneration er aldersbetinget, vil UA196 og UA202 derfor udvise degeneration af CEP-neuronerne ubetinget af Syn (Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Kim & Sun (2007) fandt, at knockdown af *hhata-2* resulterede i forlænget levetid. Det er derfor muligt, at reduceret neurodegeneration ved *hhata-2* knockdown er et resultat af forlænget levetid og udskydelse af aldersbetinget forfald (Herndon *et al.*, 2017). Imidlertid udtrykker UA196 og UA202 kun *sid-1* genet i dopaminerge neuroner, og optager kun dsRNA hertil (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). Dette betyder, at effekten af *hhata-2* knockdown er lokaliseret til kun otte dopaminerge neuroner, i modsætning til systemisk nedsat ekspression som i (Kim & Sun, 2007). Det er derfor mindre sandsynligt, at lokaliseret knockdown alene kan føre til en forlænget levetid, selvom der mangler specifikke studier på dette. For at afgøre dette, kunne der i fremtiden udføres et kohorte-overlevels assay med *hhata-2* knockdown, for at undersøge, om ormene lever længere sammenlignet med kontrol (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020). Dette vil bidrage til at belyse, hvorvidt de sundere CEP-neuroner skyldes en

direkte dopaminerge RNAi-medieret effekt eller blot afspejler en forsinkelse i aldringsprocesserne. Hvis resultaterne viser en levetidsforlængelse, kunne fremtidige forsøg med fordel vurdere neurodegeneration i forhold ormenes maksimale levetid (biologiske alder) frem for kronologiske alder (Bénard & Doitsidou, 2017).

Effektstørrelse udregnet som Cramér's V (tabel 3.4) var større for sammenligningen mellem UA196 EV og UA196 *hhat-2* en UA202 EV og UA202 *hhat-2*. Dette indikerer, at de sundere CEP-neuroner ved *hhat-2* knockdown, ikke alene kan forklares ved potentiel forlænget levetid, men også direkte neurobeskyttende effekt mod α Syn-induceret toksicitet.

Sammenfattende tyder resultaterne på, at HHAT-2 har neurotoksisk effekt på dopaminerge neuroner i *C. elegans*, især i PD-modellen, og Hh-signalerings kan derfor være potentielt fremmende for PD-udvikling.

4.4 Mitokondrielle-dynamikker som nedstrøms effekt af Hedgehog-signalerings

Resultaterne fra dette projekt tyder på, at Hh-signalerings kan være involveret i udvikling af PD. Mitokondriel dysfunktion øger risiko for udvikling af PD, og det er muligt, at dette medieres af Hh-signalerings (Obeso *et al.*, 2010; Maiti, Manna & Dunbar, 2017; Schmidt *et al.*, 2022).

Knockdown af *grl-1* i *pink-1* mutanten resulterede i statistisk signifikant større Particle Area/Area, Network Junctions/Area og Total Branch Length/Area (figur 3.8; 3.9; 3.10). Disse tre parametre er markører for øget mitokondrienetværk og forbedret sundhed (Luz *et al.*, 2015). Dette tyder på, at *grl-1* knockdown har mitokondriel ødelæggende effekt og eller skaber mitokondrie-dysfunktion i *pink-1* mutanten. Disse resultater er opsigtsvækkende og bidrager med ny viden, ved at indikere at Hh-signalerings påvirker mitokondriel sundhed ved fravær af *pink-1*, selvom det endnu ikke er entydigt, om dette er som resultat af op- eller nedregulering af Hh-signalerings med *tra-1* ekspression som markør (afsnit 4.1.1). Såfremt *grl-1* knockdown øger Hh-signalerings, kan dette indikere, at Hh-signalerings har en skadelig effekt på mitokondrier, hvilket potentielt kunne øge risikoen for udvikling af PD, specielt for patienter med PINK1/PARK2 mutationer. Som nævnt havde PD-patienter øget Hh-signalerings i de præliminære resultater. Det er derfor muligt, at den forøgede Hh-signalerings i celler af disse patienter øger risiko for mitokondriel dysfunktion, som kan øge risiko for PD-patologi (Obeso *et al.*, 2010; Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Dog siger det ikke noget om, hvorfor Hh-signalerings er forøget til at starte med. Kun enkelte studier har vist, at Hh-signalerings spiller en direkte rolle i mitokondrie-dynamikker. Lin & Wang, (2017) fandt, at GRL-21 interagerer med PTR-21 og regulerer mitokondrienetværket, ved at fremme fission som fører til øget fragmentering i *C. elegans*. Dette er baseret på den samme Hh-familien som GRL-1, hvilket styrker argumentet, at *grl-1* knockdown potentielt kan fremme mitokondrienetværket, muligvis medieret af fission-regulerende aktivitet. Tilsvarende blev fundet i (Yao *et al.*, 2017), hvor aktivering af Hh-signalerings i hippocampale neuroner øgede det mitokondrielle netværk, membranpotentialet, mitokondriel masse og elongering ved delvis at inhibere det fission-regulerende protein Drp-1. Omvendt fandt Malhotra *et al.* (2016) dog det modsatte, hvor aktivering af Hh-signalerings i hjerneneuroner fra mus medførte en reduktion af de fusion-regulerende proteiner Mfn1 og

Mfn2, hvilket medførte fragmentering af det mitokondrielle netværk, reduceret membranpotentiale og ATP-produktion

Disse modstridende fund illustrerer, at Hh-signalering potentielt regulerer mitokondrielle dynamikker via fission- eller fusion-regulerende aktivitet (Malhotra *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2017). Fremtidige studier kunne med fordel undersøge membranpotentiale, ATP-produktion og FZO-1 (homolog til human MFN1 og MFN2) og DRP-1 niveauerne i *C. elegans*, evt. ved anvendelse af transgene stammer eller RNAi medieret knockdown (Leduc-Gaudet *et al.*, 2021; Campbell & Zuryn, 2024). Dette vil yderligere afklare, hvordan Hh-signalering påvirker mitokondrienetværket.

4.5 Hedgehog-signalering som nedstrøms effekt af mitokondrielle dynamikker og PINK1/PARK2 aktivitet

Tidligere afsnit har fremlagt argumenter for, at Hh-signalering påvirker mitokondrielle dynamikker og funktion. Der er dog evidens der tyder på, at det omvendte også er tilfældet, hvor ændringer i mitokondrielle dynamikker og PINK1/PARK2-aktivitet påvirker Hh-signaleringen (Yao *et al.*, 2017; Bagnoli *et al.*, 2025).

Knockdown af *pdr-1* i DZ840 resulterede i statistisk signifikant reduceret *tra-1* ekspression ved 4 dage gamle orme, men var ikke signifikant ved 7 og 10 dage gamle orme (figur 3.1). Dette kan indikere, at PDR-1/PARK2 enten direkte eller indirekte er involveret i positiv regulering af Hh-signalering, hvis *tra-1* ekspression anvendes som markør for niveauet af komponenter af Hh-signalering. Positiv regulering af Hh-signalering gennem PDR-1 aktivitet er originale fund. Bagnoli *et al.* (2025) fandt dog lignende resultater med PINK1, hvor PINK1 *-/-* mus havde nedsat Hh-signalering som følge af forkortede primære cilia – en effekt, der skyldes reduceret PINK1-afhængig fosforylering af Rab8, og effekten er derfor uafhængig af mitokondriel dysfunktion. Bae *et al.* (2019) fandt dog, at mitokondriel stress tilsvarende kan øge Hh-signalering, ved at stimulere til ciliogenese gennem ROS-produktion (Bae *et al.*, 2019). *C. elegans* har dog ikke cilia-afhængig Hh-signalering som pattedyr, så hvis PDR-1 regulerer Hh-signalering er det gennem en anden mekanisme (Briscoe & Théron, 2013). I dette projekt ser det dog ikke ud til, at ændret Hh-signalering ved *pdr-1* knockdown er medieret af mitokondriel dysfunktion, da mitokondriemorfologi-assay ikke var signifikant for nogen markører (figur 3.8; 3.9; 3.10). Denne observation kan dog skyldes, at PINK-1 og PDR-1 indgår i samme signalvej, hvor PINK-1 ophobning på depolariserede mitokondrier er nødvendig for rekruttering af PDR-1 (Pickrell & Youle, 2015). Det er derfor muligt, at yderligere mitofagi ikke opnås ved *pdr-1* knockdown i en *pink-1* mutant. En mere velegnet model var at udføre *pdr-1* knockdown i N2 kontrolstammen, og se om det mindsker det mitokondrielle netværk. Kubli *et al.* (2015) fandt dog i PINK1 *-/-* mus, at PINK1 ikke er nødvendig for PARK2-rekruttering til depolariserede mitokondrier og aktivering af mitofagi i muskelceller. Omvendt er det ikke sikkert, at der sker mitokondriel dysfunktion i *C. elegans* som følge af neddsat PINK-1/PDR-1 aktivitet. Lee *et al.* (2018) fandt, at PINK1 *-/-* og PARK2 *-/-* *D. melanogaster* ikke udviser nedsat basal mitofagi, blandt andet i dopaminerge neuroner. Som forfatterne selv pointerer, er det muligt at der sker kompensering af andre PINK1/PARK2-uafhængige mitofagi signalveje eller andre mekanismer af kvalitetskontrol (Lee

et al., 2018). Det er desuden muligt, at nedreguleret Hh-signalering ved *pdr-1* knockdown skyldes en mekanisme, der er uafhængig af mitokondriel funktion, men afhængig af PDR-1-aktivitet, idet PDR-1/PARK2 kan være involveret i andre cellulære funktioner end mitokondriel kvalitetskontrol (Ham et al., 2023).

Samlet set tyder resultaterne fra dette projekt og den eksisterende litteratur derfor på, at PINK1, PDR-1/PARK2 og mitokondriel funktion alle kan være involveret i reguleringen af Hh-signalering. Mitokondriel dysfunktion øger risiko for PD-udvikling (Obeso et al., 2010; Maiti, Manna & Dunbar, 2017). Det er derfor muligt, at den potentielle sammenhæng der ses mellem PD og Hh-signalering, er medieret af den tovejs interaktion der er mellem Hh-signalering og PINK1/PARK2 og mitokondrielle dynamikker.

4.6 Udfordringer ved MitoTracker og alternative metoder til visualisering af mitokondriemorfologi

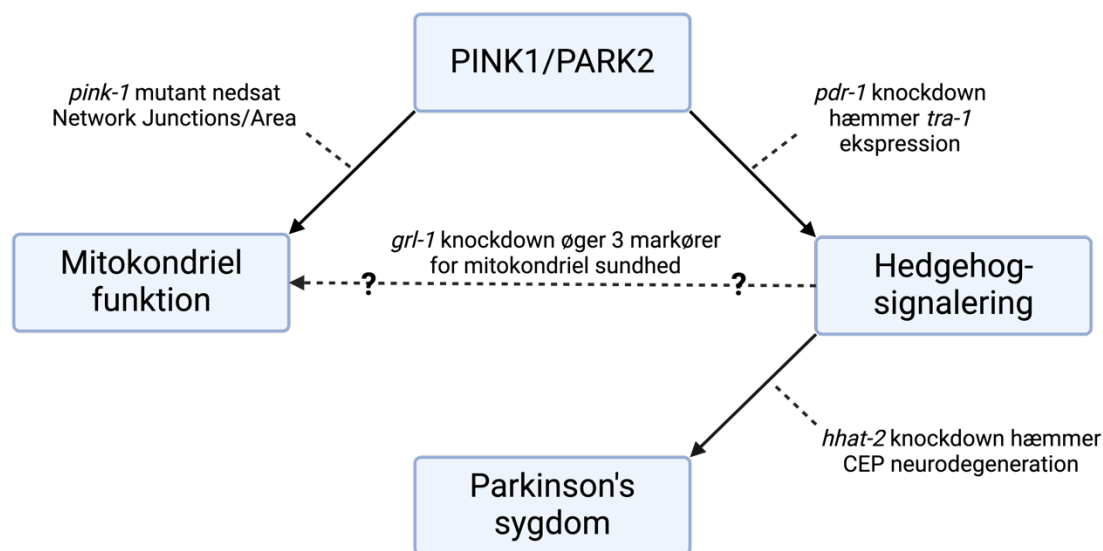
Network Junctions/Area var den eneste mitokondrielle markør i RB2547 sammenlignet med N2 EV, som var statistisk signifikant (figur 3.8). Dette kan enten indikere, at *pink-1* mutationen ikke har påvirket mitokondrienetværket. RB2547 blev dog ikke genotypisk verificeret, så det er muligt, at det er forkert stamme. I fremtiden bør stammen verificeres for deletions-mutationen i *pink-1*. Der var yderligere en forventning om, at N2 EV i sodium azide havde øget fragmentering af det mitokondrielle netværk, og fungerede som positiv kontrol i assayet (Luz et al., 2015; Valente et al., 2017). Overraskende var Particle Area/Area ikke statistisk signifikant mindre end kontrol (figur 3.10).

En begrænsning ved anvendelse af MitoTracker er, at optaget af proben er afhængig af *C. elegans*' pumperate i pharynx, hvilket varierer med alder og potentielt mellem stammer (Huang, Xiong & Kornfeld, 2004). Desuden er MitoTracker Orange afhængig af membranpotentiale, hvorfor brug af sodium azide som positiv kontrol kan være problematisk, idet det reducerede signal ikke nødvendigvis repræsenterer den reelle morfologi af mitokondrienetværket (Begelman et al., 2022).

Alternativer til MitoTracker omfatter transgene *C. elegans* stammer, som udtrykker ACO-2 mærket med GFP (ACO2 human homolog), hvilket specifikt lokaliseres til mitokondriens matrix. Det muliggør at visualisere mitokondrienetværket med fluorescensmikroskopi, og er ikke aldersbetinget via pumperate som ved brug af MitoTracker (Begelman et al., 2022). Et andet alternativ er at anvende en reporterstamme for mitokondriemorfologi og mitofagi, der indeholder et ekstrakromosomalt array, som udtrykker mito-mKeima under kontrol af *Pmec-4*. Mito-mKeima er et pH-følsomt fluorescerende protein, der muliggør samtidig visualisering af både mitokondriemorfologi og mitofagi, da proteinets fluorescerende egenskaber varierer afhængigt af pH-forskelle mellem mitokondriematrix og lysosomer (Guha et al., 2020). Dette vil bidrage til at belyse, om ændringer i mitokondrienetværket medieres af ændret mitofagi.

4.7 Komplekst samspil mellem PINK1/PARK2, mitokondriel dysfunktion og Hedgehog-signalering i Parkinsons sygdom

På baggrund af dette projekts resultater, ser det ud til, at Hh-signalering potentielt kan fremme udvikling af PD, da knockdown af *hhat-2* ser ud til at have neurobeskyttende effekt på dopaminerge neuroner i *C. elegans* (figur 4.1). Dette kan potentielt medieres af PINK1/PARK2-aktivitet, da det tyder på, at PDR-1 kan opregulere Hh-signalering, om end det ikke ser ud til, at dette er medieret af mitokondriel dysfunktion. Yderligere ser det ud til, at Hh-signalering er involveret i regulering af mitokondriel funktion, da *grl-1* knockdown fremmede mitokondrie-netværket.



Figur 4.1: Interaktion mellem Parkinson's sygdom, Hedgehog-signalering, mitokondriel funktion og PINK1/PARK2 på baggrund af resultater. Sort pil symboliserer positiv regulering, hvor sort pil med stiplede linje symboliserer ukendt regulering.

Yderligere viser andet litteratur, at PINK1/PARK2-aktivitet og mitokondrielle dynamikker og Hh-signaleringen har gensidig interaktion (Bae *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2022; Bagnoli *et al.*, 2025). Tilsvarende ses en sammenhæng mellem PD og Hh-signalering, hvor disse ligeledes synes at påvirke hinanden (Schmidt *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2024). Samlet set er der derfor tale om et komplekst samspil, hvor yderligere studier er nødvendig for at klarlægge interaktionen og de underliggende molekulære mekanismer.

4.8 Fremtidige perspektiver

Tabel 5.1: Liste over fremtidige perspektiver der kan undersøges eksperimentelt.

Eksperiment og formål	Eksperimental metode
Hh-r RNAi screen Systematisk RNAi screen. Bestemme om andre Hh-r, ligesom, <i>grl-1</i> korrelerer med <i>tra-</i>	RNAi medieret knockdown af en lang række Hh-r gener i DZ840 ved kvantificering af <i>tra-1</i> ekspression i F1 orme.

1 ekspression, og undersøge brugbarheden af DZ840 som Hh-reporterstamme	
Undersøge om HHAT-2 regulerer levetid Bestemme om mindre neurodegeneration ved <i>hhat-2</i> knockdown skyldes reduceret levetid	Kohorte-overlevelsasses-assay for at bestemme levetid for <i>hhat-2</i> knockdown orme (Caldwell, Willicott & Caldwell, 2020)
Undersøge DZ840 som Hh-reporterstamme Noget GFP-signal i halen kan muligvis tilskrives autofluorescens. Hvis korrekte neurale strukturer verificeres kan dette undgås.	Farve PHA og PHB neuroner med DiD / Dil farvning og kvantificer <i>tra-1</i> ekspression i DZ840 (Salzberg <i>et al.</i> , 2020)
Undersøge Hh-signalerings påvirkning af mitokondrienetværket Bestemme om <i>hhat-2</i> knockdown har samme beskyttende effekt af mitokondrienetværket som <i>grl-1</i> knockdown.	Knockdown af <i>hhat-2</i> og kvantificering af mitokondrienetværket via MitoTracker.
Undersøge rollen af <i>tra-1</i> i Hh-signalerings Bestemme om <i>tra-1</i> er involveret i Hh-signalerings nedstrøms for <i>hhat-2</i>	Knockdown af <i>hhat-2</i> i DZ840 og kvantificering af <i>tra-1</i> ekspression.
Genotypisk verificering af RB2547, DZ840, UA196 og UA202 Verificerer genotypisk at det er korrekte stammer.	PCR for <i>pink-1</i> deletion i RB2547. PCR for <i>tra-1::GFP</i> i DZ840. PCR for tilstedeværelsen af <i>Pdat-1::α-syn</i> i UA196 og fravær i UA202.
Undersøge effekten af PD på Hh-signalerings Bestemme effekten af PD (αSyn i dopaminerge neuroner) på Hh-signalerings	Kryds af transgene stammer: DZ840 med UA44 eller anden PD-model. Kvantificering af <i>tra-1</i> ekspression.
Undersøge MitoTracker alternativ og Hh-signalerings effekt på mitokondrienetværket Undersøge GL390 som potentielt alternativ til MitoTracker, og effekten af Hh-signalerings på mitokondrienetværket.	Knockdown af <i>hhat-2</i> og <i>grl-1</i> i transgen stamme: GL390 <i>aco-2</i> (rf40[<i>aco-2::GFP</i>]) III. ACO-2 lokaliseres til mitokondriernes matrix, og muliggør dermed visualisering af mitokondrienetværket (Begelman <i>et al.</i> , 2022).
Undersøge Hh-signalerings effekt på mitofagi Bestemme om Hh-signalerings effekt på mitokondrienetværket skyldes regulering af mitofagi.	Knockdown af <i>hhat-2</i> og <i>grl-1</i> i transgen stamme: KWN796 rnyEx336 [pSKG1 (<i>Pmec-4::mito-mKeima</i>), pCFJ90 (<i>Pmyo-2::wCherry</i>), pCI (<i>pha-1+</i>)] Kvantificering af pH-følsom fluorofor, som exciteres ved 440 nm (mitokondrier) og 550

	(lysosomer), forholdet mellem emissionen er udtryk for graden af mitofagi.
Gentagelse af forsøg For at drage stærkere konklusioner og sikre korrekt observeret sammenhæng, bør forsøg gentages ≥ 3 gange.	
Verificering af RNAi som metode Bestemme om RNAi har fungeret korrekt med positiv kontrol, evt. i specifikt væv fx i UA196 og UA202.	<i>E. coli</i> (HT115(DE3)), der udtrykker dsRNA målrettet mod GFP transgen, hvilket medfører nedregulering af GFP i transgene orme. Mindre signal = RNAi har virket.

5. Konklusion

Formålet med dette projekt var at undersøge en potentiel sammenhæng mellem Hedgehog-signalering og PINK1/PARK2-medieret mitokondriel kvalitetskontrol, og om denne interaktion kunne bidrage til udvikling af PD. Ved brug af *C. elegans* som modelorganisme blev der udført RNAi-medieret knockdown af generne *pdr-1*, *grl-1* og *hhat-2* i flere transgene *C. elegans* stammer, hvis effekt blev undersøgt i *tra-1* ekspressions-, dopaminerge neurodegenerations- og mitokondriemorfologi-assay. Resultaterne af *tra-1* ekspressions-assay viste opregulering af *tra-1* ved *grl-1* knockdown, hvilket muligvis antyder, at GRL-1 fungerer som positiv regulator af *tra-1* og komponenter af Hh-signaleringen. Dette kunne dog ikke konkluderes grundet den fragmenterede natur af Hh-signalvejen i *C. elegans*, om end det viser, at TRA-1 niveauet ændres som følge af GRL-1 aktivitet. Dette udgør et originalt fund, da det er første gang der er dokumenteret ændringer i TRA-1 niveauet som følge af Hh-r aktivitet. Dopaminerge neurodegenerations-assay viste, at *hhat-2* knockdown både reducerede α Syn-induceret toksicitet og aldersbetinget neurodegeneration i CEP-neuroner, hvilket indikerer en mulig neurotoksisk effekt af Hh-signalering på dopaminerge neuroner. Dette peger på, at Hh-signalering potentielt kan fremme PD-udvikling. Overraskende havde PDR-1 ingen effekt på neurodegeneration i PD-modellen. *grl-1* knockdown viste ingen signifikant effekt af neurodegeneration i PD-modellen, om end den resulterede i både neurotoksisk og neurobeskyttende effekt afhængig af alder, ved fraværet af α Syn. Derudover viste *pdr-1* knockdown en reduktion i *tra-1* ekspression, hvilket antyder en potentiel kobling mellem PINK1/PARK2-systemet og komponenter af Hh-signalvejen. Dette kan indikere, at PINK1/PARK2-systemet potentielt kan fremme PD-udvikling, medieret af opregulering i Hh-signalering, som har neurotoksisk effekt på dopaminerge neuroner. Yderligere resulterede *grl-1* knockdown i øget mitokondriel netværk. Det kunne dog ikke konkluderes, om dette skyldes op- eller nedregulering af Hh-signalering, men antyder, at Hh-signalering påvirker mitokondriel sundhed.

Yderligere undersøgelser er dog nødvendig for at forstærke konklusionerne, samt klarlægge de underliggende molekylære mekanismer.

6. Litteraturliste

- Abeliovich, A. og Gitler, A.D. (2016) 'Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology og genetics', *Nature*, 539(7628), pp. 207–216. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1038/nature20414>.
- Agarwal, S. og Muqit, M.M.K. (2022) 'PTEN-induced kinase 1 (PINK1) og Parkin: Unlocking a mitochondrial quality control pathway linked to Parkinson's disease', *Current Opinion in Neurobiology*, 72, pp. 111–119. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.09.005>.
- Bae, J.-E. et al. (2019) 'Primary cilia mediate mitochondrial stress responses to promote dopamine neuron survival in a Parkinson's disease model', *Cell Death & Disease*, 10(12), p. 952. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2184-y>.
- Bagnoli, E. et al. (2025) 'Endogenous LRRK2 og PINK1 function in a convergent neuroprotective ciliogenesis pathway in the brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122(5), p. e2412029122. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1073/pnas.2412029122>.
- Bayne, A.N. og Trempe, J.-F. (2019) 'Mechanisms of PINK1, ubiquitin og Parkin interactions in mitochondrial quality control og beyond', *Cellular og Molecular Life Sciences*, 76(23), pp. 4589–4611. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03203-4>.
- Begelman, D.V. et al. (2022) 'An aco-2:: gfp knock-in enables the monitoring of mitochondrial morphology throughout C. elegans lifespan.' *microPublication Biology*, pp.10-17912. Tilgjengelig på: 10.17912/micropub.biology.000
- Bérnard, C. og Doitsidou, M. (2017) 'Nervous System Again', i: Olsen, A. og Gill, M.S. (eds) 'Ageing: Lessons from C. elegans'. Cham: Springer International Publishing (Healthy Ageing og Longevity). Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44703-2>.
- Bijwadia, S.R., Morton, K. og Meyer, J.N. (2021) 'Quantifying Levels of Dopaminergic Neuron Morphological Alteration og Degeneration in Caenorhabditis elegans', *Journal of Visualized Experiments*, (177), p. 62894. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.3791/62894>.
- Bornhorst, J. et al. (2014) 'The effects of pdr1, djr1.1 og pink1 loss in manganese-induced toxicity og the role of α -synuclein in C. elegans', *Metallomics*, 6(3), pp. 476–490. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1039/C3MT00325F>.
- Brand, M.D. et al. (2013) 'The role of mitochondrial function og cellular bioenergetics in ageing og disease: Mitochondrial function in ageing og disease', *British Journal of Dermatology*, 169, pp. 1–8. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1111/bjd.12208>.
- Brenner, S., 1974. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics*, 77(1), pp.71-94. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Briscoe, J. og Théron, P.P. (2013) 'The mechanisms of Hedgehog signalling og its roles in development og disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(7), pp. 416–429. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1038/nrm3598>.
- Burglin, T. (2006) 'Homologs of the Hh signalling network in C. elegans', *WormBook* [Preprint]. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.76.1>.

- Bürglin, T.R. (2008) 'The Hedgehog protein family', *Genome Biology*, 9(11), p. 241. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-11-241>.
- Caldwell, K.A., Willicott, C.W. og Caldwell, G.A. (2020) 'Modeling neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*', *Disease Models & Mechanisms*, 13(10), p. dmm046110. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1242/dmm.046110>.
- Camandola, S. og Mattson, M.P. (2017) 'Brain metabolism in health, aging, og neurodegeneration', *The EMBO Journal*, 36(11), pp. 1474–1492. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.15252/emj.201695810>.
- Campbell, D. og Zuryn, S. (2024) 'The mechanisms og roles of mitochondrial dynamics in *C. elegans*', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 156, pp. 266–275. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2023.10.006>.
- Carballo, G.B. et al. (2018) 'A highlight on Sonic hedgehog pathway', *Cell Communication og Signaling*, 16(1), p. 11. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0220-7>.
- Chege, P.M. og McColl, G. (2014) 'Caenorhabditis elegans: a model to investigate oxidative stress og metal dyshomeostasis in Parkinson's disease', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00089>.
- Chen, S.-D. et al. (2018) 'Emerging Roles of Sonic Hedgehog in Adult Neurological Diseases: Neurogenesis og Beyond', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), p. 2423. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.3390/ijms19082423>.
- Choong, C.-J. og Mochizuki, H. (2023) 'Involvement of Mitochondria in Parkinson's Disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), p. 17027. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.3390/ijms242317027>.
- Cooper, J.F. og Van Raamsdonk, J.M. (2018) 'Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*', *Journal of Parkinson's Disease*, 8(1), pp. 17–32. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.3233/JPD-171258>.
- Corsi, A.K., Wightman, B. og Chalfie, M. (2015) 'A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 200(2), pp. 387–407. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>.
- Da Silva, L.P.D. et al. (2024) 'Exploring Caenorhabditis elegans as Parkinson's Disease Model: Neurotoxins og Genetic Implications', *Neurotoxicity Research*, 42(1), p. 11. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1007/s12640-024-00686-3>.
- Dickson, D.W. (2012) 'Parkinson's Disease og Parkinsonism: Neuropathology', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), pp. a009258–a009258. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>.
- Dong-Chen, X. et al. (2023) 'Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms og therapeutic interventions', *Signal Transduction og Targeted Therapy*, 8(1), p. 73. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01353-3>.
- Emans, S.W. et al. (2023) 'GRD-1/PTR-11, the *C. elegans* hedgehog/patched-like morphogen-receptor pair, modulates developmental rate', *Development*, 150(24), p. dev201974. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1242/dev.201974>.

- Filograna, R. *et al.* (2021) 'Mitochondrial dysfunction in adult midbrain dopamine neurons triggers an early immune response', *PLOS Genetics*. Edited by R.J. Wiesner, 17(9), p. e1009822. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009822>.
- Friedman, J.R. og Nunnari, J. (2014) 'Mitochondrial form og function', *Nature*, 505(7483), pp. 335–343. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/nature12985>.
- Frøkjær-Jensen, C. *et al.* (2008) 'Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*', *Nature Genetics*, 40(11), pp. 1375–1383. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/ng.248>.
- Gaeta, A.L., Caldwell, K.A. og Caldwell, G.A. (2019) 'Found in Translation: The Utility of *C. elegans* Alpha-Synuclein Models of Parkinson's Disease', *Brain Sciences*, 9(4), p. 73. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.3390/brainsci9040073>.
- Guha, S. *et al.* (2020) 'Tauopathy-associated tau modifications selectively impact neurodegeneration og mitophagy in a novel *C. elegans* single-copy transgenic model', *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), p. 65. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00410-7>.
- Ham, S.J. *et al.* (2023) 'PINK1 og Parkin regulate IP3R-mediated ER calcium release', *Nature Communications*, 14(1), p. 5202. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40929-z>.
- Hao, L. *et al.* (2006) 'Comprehensive analysis of gene expression patterns of hedgehog-related genes', *BMC Genomics*, 7(1), p. 280. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-280>.
- Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L. og Giannis, A. (2010) 'Modulators of the hedgehog signaling pathway', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(18), pp. 6613–6624. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.038>.
- Herndon, L.A. *et al.* (2017) 'Effects of Ageing on the Basic Biology og Anatomy of *C. elegans*', i: Olsen, A. og Gill, M.S. (eds) 'Ageing: Lessons from *C. elegans*'. Cham: Springer International Publishing (Healthy Ageing og Longevity). Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44703-2>.
- Huang, C., Xiong, C. og Kornfeld, K. (2004) 'Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), pp. 8084–8089. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1073/pnas.0400848101>.
- Ingham, P.W. og McMahon, A.P. (2001) 'Hedgehog signaling in animal development: paradigms og principles', *Genes & Development*, 15(23), pp. 3059–3087. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1101/gad.938601>.
- Ingham, P.W., Nakano, Y. og Seger, C. (2011) 'Mechanisms og functions of Hedgehog signalling across the metazoa', *Nature Reviews Genetics*, 12(6), pp. 393–406. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/nrg2984>.

- Jenkins, D. (2009) 'Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways', *Cellular Signalling*, 21(7), pp. 1023–1034. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.033>.
- Khan, S.S. *et al.* (2024) 'Loss of primary cilia og dopaminergic neuroprotection in pathogenic LRRK2-driven og idiopathic Parkinson's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(32), p. e2402206121. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1073/pnas.2402206121>.
- Kim, Y. og Sun, H. (2007) 'Functional genomic approach to identify novel genes involved in the regulation of oxidative stress resistance og animal lifespan', *Aging Cell*, 6(4), pp. 489–503. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00302.x>.
- Kitchen, C.M.R. (2009) 'Nonparametric vs Parametric Tests of Location in Biomedical Research', *American Journal of Ophthalmology*, 147(4), pp. 571–572. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.06.031>.
- Kolotuev, I., Apaydin, A. og Labouesse, M. (2009) 'Secretion of Hedgehog-Related Peptides og WNT During *Caenorhabditis elegans* Development', *Traffic*, 10(7), pp. 803–810. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00871.x>.
- Kubli, D.A. *et al.* (2015) 'PINK1 Is Dispensable for Mitochondrial Recruitment of Parkin og Activation of Mitophagy in Cardiac Myocytes', *PLOS ONE*. Edited by J. Sadoshima, 10(6), p. e0130707. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130707>.
- Leduc-Gaudet, J.-P. *et al.* (2021) 'Mitochondrial Dynamics og Mitophagy in Skeletal Muscle Health og Aging', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), p. 8179. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.3390/ijms22158179>.
- Lee, J.J. *et al.* (2018) 'Basal mitophagy is widespread in *Drosophila* but minimally affected by loss of Pink1 or parkin', *Journal of Cell Biology*, 217(5), pp. 1613–1622. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1083/jcb.201801044>.
- Li, J. og Le, W. (2013) 'Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*', *Experimental Neurology*, 250, pp. 94–103. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.024>.
- Lin, C.-C.J. og Wang, M.C. (2017) 'Microbial metabolites regulate host lipid metabolism through NR5A–Hedgehog signalling', *Nature Cell Biology*, 19(5), pp. 550–557. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/ncb3515>.
- Liu, Y.J. *et al.* (2020) 'Mitochondrial fission og fusion: A dynamic role in aging og potential target for age-related disease', *Mechanisms of Ageing og Development*, 186, p. 111212. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111212>.
- Luz, A.L. *et al.* (2015) 'Mitochondrial Morphology og Fundamental Parameters of the Mitochondrial Respiratory Chain Are Altered in *Caenorhabditis elegans* Strains Deficient in Mitochondrial Dynamics og Homeostasis Processes', *PLoS ONE*, 10(6). Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130940>.
- Maiti, P., Manna, J. og Dunbar, G.L. (2017) 'Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments', *Translational Neurodegeneration*, 6(1), p. 28. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0099-z>.

- Malhotra, A. *et al.* (2016) 'Sonic Hedgehog Signaling Drives Mitochondrial Fragmentation by Suppressing Mitofusins in Cerebellar Granule Neuron Precursors og Medulloblastoma', *Molecular Cancer Research*, 14(1), pp. 114–124. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0278>.
- Martinez, B.A. *et al.* (2015) 'A bacterial metabolite induces glutathione-tractable proteostatic damage, proteasomal disturbances, og PINK1-dependent autophagy in *C. elegans*', *Cell Death & Disease*, 6(10), pp. e1908–e1908. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.270>.
- Obeso, J.A. *et al.* (2010) 'Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle', *Nature Medicine*, 16(6), pp. 653–661. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/nm.2165>.
- Perry, S.W. *et al.* (2011) 'Mitochondrial Membrane Potential Probes og the Proton Gradient: A Practical Usage Guide', *BioTechniques*, 50(2), pp. 98–115. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.2144/000113610>.
- Pickrell, A.M. og Youle, R.J. (2015) 'The Roles of PINK1, Parkin, og Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease', *Neuron*, 85(2), pp. 257–273. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>.
- Poewe, W. *et al.* (2017) 'Parkinson disease', *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), pp. 1–21. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- Rash, B.G. og Grove, E.A. (2007) 'Patterning the Dorsal Telencephalon: A Role for Sonic Hedgehog?', *The Journal of Neuroscience*, 27(43), pp. 11595–11603. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3204-07.2007>.
- Rechavi, O. og Lev, I. (2017) 'Principles of Transgenerational Small RNA Inheritance in *Caenorhabditis elegans*', *Current Biology*, 27(14), pp. R720–R730. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.043>.
- Salzberg, Y. *et al.* (2020) 'Synaptic Protein Degradation Controls Sexually Dimorphic Circuits through Regulation of DCC/UNC-40', *Current Biology*, 30(21), pp. 4128–4141.e5. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.002>.
- Sawilowsky, S.S. (2005) 'Misconceptions Leading to Choosing the t Test Over the Wilcoxon Mann-Whitney Test for Shift in Location Parameter', *Journal of Modern Applied Statistical Methods*, 4(2), pp. 598–600. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.22237/jmasm/1130804700>.
- Schiavi, A. *et al.* (2015) 'Iron-Starvation-Induced Mitophagy Mediates Lifespan Extension upon Mitochondrial Stress in *C. elegans*', *Current Biology*, 25(14), pp. 1810–1822. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.059>.
- Schmidt, S. *et al.* (2022) 'Primary cilia og SHH signaling impairments in human og mouse models of Parkinson's disease', *Nature Communications*, 13(1), p. 4819. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32229-9>.
- Serra, N.D., Darwin, C.B. og Sundaram, M.V. (2024) '*Caenorhabditis elegans* Hedgehog-related proteins are tissue- og substructure-specific components of the cuticle og precuticle', *GENETICS*. Edited by D. Greenstein, 227(4), p. iyae081. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae081>.

Shen, M.M. og Hodgkin, J. (1988) 'mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression og a male-specific lineage in *C. elegans*', *Cell*, 54(7), pp. 1019–1031. Tilgængelig på: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90117-1).

Templeman, N.M. *et al.* (2020) 'CREB Non-autonomously Controls Reproductive Aging through Hedgehog/Patched Signaling', *Developmental Cell*, 54(1), pp.92-105.

Timmons, L., Court, D.L. og Fire, A. (2001) 'Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce speci^c og potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*', *Gene*, 263(1-2), pp.103-112. Tilgængelig på: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5).

Valente, A.J. *et al.* (2017) 'A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture', *Acta Histochemica*, 119(3), pp. 315–326. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.03.001>.

VanDerMolen, K.R. *et al.* (2025) 'Non-cell-autonomous regulation of mTORC2 by Hedgehog signaling maintains lipid homeostasis', *Cell Reports*, 44(1), p. 115191. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.115191>.

Walsh, J.D., Boivin, O. og Barr, M.M. (2020) 'What about the males? the *C. elegans* sexually dimorphic nervous system og a CRISPR-based tool to study males in a hermaphroditic species', *Journal of Neurogenetics*, 34(3–4), pp. 323–334. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1080/01677063.2020.1789978>.

Webb, J.L., Ravikumar, B. og Rubinsztein, D.C. (2004) 'Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), pp. 2541–2550. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.003>.

Wirdefeldt, K. *et al.* (2011) 'Epidemiology og etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence', *European Journal of Epidemiology*, 26 Suppl 1, pp. S1-58. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>.

Wormbase (n.d.1). *C. elegans* stamme UA196. URL: https://wormbase.org/species/c_elegans/strain/WBStrain00047168#03514--10 (besøgt d. 30/3/2025)

Wormbase (n.d.2). *grl-1*. URL: https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00001710#0-9f-10 (besøgt d. 30/3/2025)

Wormbase (n.d.3). *C. elegans* stamme RB2547. URL: https://wormbase.org/species/c_elegans/strain/WBStrain00033222#03514--10 (besøgt d. 30/3/2025)

Wormbase (n.d.4). *C. elegans* stamme UA202. URL: https://wormbase.org/species/c_elegans/strain/WBStrain00047167#03514--10 (besøgt d. 30/3/2025)

- Xilouri, M. *et al.* (2009) 'Abberant α -Synuclein Confers Toxicity to Neurons in Part through Inhibition of Chaperone-Mediated Autophagy', *PLoS ONE*. Edited by H.E. Gendelman, 4(5), p. e5515. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005515>.
- Yao, P.J. *et al.* (2017) 'Sonic hedgehog pathway activation increases mitochondrial abundance og activity in hippocampal neurons', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by E. Holzbaur, 28(3), pp. 387–395. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-07-0553>.
- Zhang, Y. og Beachy, P.A. (2023) 'Cellular og molecular mechanisms of Hedgehog signalling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(9), pp. 668–687. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00591-1>.
- Zhu, M., Chisholm, A.D. og Jin, Y. (2020) 'C. elegans VWA-8 is a mitochondrial protein', *microPublication Biology*, 2020, pp.10-17912. Tilgængelig på: [10.17912/micropub.biology.000264](https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000264)
- Zugasti, O., Rajan, J. og Kuwabara, P.E. (2005) 'The function og expansion of the Patched- og Hedgehog-related homologs in *C. elegans*', *Genome Research*, 15(10), pp. 1402–1410. Tilgængelig på: <https://doi.org/10.1101/gr.3935405>.

Bilag

Bilag 1

```
input = getDirectory("input folder where images are stored");

output = getDirectory("output folder for results");

list = getFileList(input);

setBatchMode(false);

for (i = 0; i < list.length; i++) {

    open(input + list[i]);

    image = getTitle();

    run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");

    setTool("polygon");

    waitForUser("Make selection\nClick 'OK' when satisfied");

    run("Measure");

    selectWindow("Results");

    saveAs("Results", output + image + "_ROI_Area.csv");

    run("Clear Results");

    close("Results");

    setAutoThreshold("Mean dark no-reset");

    run("Threshold...");

    waitForUser("Adjust threshold in thresholding window\nClick 'OK' when satisfied");

    run("Measure");

    run("Duplicate...", " ");

    copy = getImageID();

    selectWindow("Results");

    saveAs("Results", output + image + "_DensityResults.csv");
```

```
run("Clear Results");

close("Results");

selectImage(copy);

setMinAndMax(100, 30000);

setBackgroundColor(0, 0, 0);

run("Clear Outside");

run("Unsharp Mask...", "radius=1 mask=0.60");

run("Enhance Local Contrast (CLAHE)", "blocksize=127 histogram=256 maximum=3
mask=*None*");

run("Median...", "radius=2");

setOption("BlackBackground", true);

run("Convert to Mask");

run("Duplicate...", " ");

kopi = getImageID();

run("Analyze Particles...", "display clear add");

selectWindow("Results");

saveAs("Results", output + image + "_AreaResults.csv");

run("Clear Results");

close("Results");

selectImage(kopi);

run("Skeletonize");

run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=none");

selectWindow("Results");

saveAs("Results", output + image + "_SkeletonResults.csv");

run("Clear Results");

close("Results");
```

```
run("Close All");
```

```
close("*");
```

```
}
```