**A PRELIMINARY STUDY ON CHEMOSENSATION AND OLFACTORY IMPRINTING OF *C. ELEGANS* FOR DETECTION OF**

**PARKINSON’S DISEASE BIOMARKERS**

Boonjong K.1, Jaemmee S.1, Meemon K.2, Leeboonngam T.1

*1Department of Biology, Kamnoetvidya Science Academy, Rayong 21210, Thailand 2Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400 Thailand Email: tanawan.l@kvis.ac.th*

**Relevance.** Parkinson's disease (PD) is a common progressive neurodegenerative disease in the elderly. Currently, most screening tests for Parkinson's patients are based on questionnaires and clinical examinations, which can be more accurate when the motor symptoms reveal. Other conventional techniques such as blood tests and MRI are used for diagnosis; however, they are either invasive or expensive. Therefore, it is important to find a new screening method that could provide early detection of the disease in order to administer PD medications more effectively. A recent study has suggested the presence of volatile organic compounds in sebum taken from the skin of a PD patient [1]. It also reported that people with a hypersensitive sense of smell could detect such odor from PD sebum. This led to our interest in a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans* or *C. elegans*, known for its well-developed chemosensory system [2] and ability to adapt from olfactory cues in its environment by imprinting [3]. The nematode possesses a high sensitivity to a wide range of volatile odorants and is inexpensive to breed on a large scale. Hence, employing the natural capabilities of the nematode would make possible a high-throughput, non-invasive, and low-cost detection of PD.

**Purpose.** We aim to study the olfactory sensation of *C. elegans* and its ability to learn new odors by imprinting, which would potentially be developed into a new screening method for PD in the future.

**Method.** For *in silico* study, we primarily investigate d the binding of PD biomarkers to the olfactory receptors, namely seven-transmembrane receptor-1 (str-1) and seven transmembrane receptor-2 (str-2) [4], using Chimera and AutoDock Vina tool, then the binding score would be evaluated. For the behavioral study, we used the wild-type N2 strains *C. elegans*. Nematodes were cultured on Nematode Growth Media (NGM) plates seeded with OP50 *E. coli* as a food source [5]. Animals were maintained at 20°C. The chemotaxis assay was conducted by transferring the nematodes to a circular region at the center of the plate, after which the odorants were added to quadrants of the plate [6]. For each experiment, the chemotaxis index (CI) was calculated to evaluate the type of response of the nematodes to whether attractive (CI>0), neutral (CI≈0), or repulsive (CI<0). Chemicals, including isoamyl alcohol, ethanol, and 1-octanol, were used as test compounds in standard protocol to ensure assay reproducibility. Statistical analysis was performed using a two-tailed Student *t-*test (unequal variance) at α = 0.05. For imprinting assay, synchronized nematodes at the L1 larval stage, which is the critical period, were grown with the presence of odorant on the lid of the plate to induce imprinting behavior. All chemotaxis experiments were performed when nematodes reached the young adult stage.

**Results and discussion.** The molecular docking showed that the PD biomarkers, including hippuric acid and eicosane, can bind to both olfactory receptors at similar binding sites with considerable binding energies compared to the known ligands (isoamyl alcohol and 1-octanol for str-1 and str-2 receptors, respectively). Thus, the nematode might be able to sense the odor of the compounds. Then, as we tested the worms' innate chemotactic response to PD biomarkers, the results showed that hippuric acid significantly repelled the worms while eicosane acted as a neutral odorant. After worms were induced to imprint the odor of the

biomarkers, they became more attracted by hippuric acid and eicosane. Therefore, it may imply that imprinting has an effect on the nematodes’ odor preference for the biomarkers.

 **a b**

****

 **str-1 str-2**

**Fig 1. Molecular docking of PD biomarkers on str-1 and str-2 olfactory receptors of *C. elegans*.** (a) 1-octanol alcohol (red), hippuric acid (purple), and eicosane (yellow) bind at the same site of str-1 with -7.4 -5.4, and -9.8 kcal/mol, respectively. (b) isoamyl alcohol (purple), hippuric acid (green), and eicosane (orange) bind at the same site of str-2 with -4.3, -5.3, and -9.2 kcal/mol, respectively.





**Fig 2. Odor preference of wild-type *C. elegans* to hippuric acid and eicosane differs in the innate and imprinted conditions.** (a) Chemotaxis indexes calculated for adult *C. elegans* exposed to different concentrations (10, 5, 0.5, 0.05, 0.005 mM) of PD volatile biomarkers - hippuric acid and eicosane. Ethanol was used as the negative (neutral) control. Isoamyl alcohol and 1-octanol were used as an attractant and repellent, respectively. Chemotaxis to different concentrations of hippuric acid (b) and eicosane (c) by imprinted adult *C. elegans* compared to the innate response. Each experiment was performed in replicates (n = 4-6 trials). Error bars = S.E.M. Starred bars indicate statistically significant difference in a two-tailed Student t-test for unequal variance (ns: not significant; \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001).

**Conclusion:**

1. The olfactory receptors can detect the odorant biomarkers since the result from molecular docking showed that they bind to the receptor with high binding affinity at the same binding site to the known ligand.

2. Although the PD biomarkers might not naturally attract the nematodes, they can be trained by imprinting to detect and show attractive responses to the compounds. 3. Further study is needed to confirm the molecular change that can indicate the activation of the imprinting circuit of the nematodes. Nonetheless, our work suggests that they may be applied in detecting PD and other diseases, provided that the nematodes can sense their volatile biomarkers.

**Literature:**

1. Trivedi, D. K., Sinclair, E., Xu, Y., Sarkar, D., Walton-Doyle, C., Liscio, C., Banks, P., Milne, J., Silverdale, M., Kunath, T., Goodacre, R., & Barran, P. (2019). Discovery of Volatile Biomarkers of Parkinson’s Disease from Sebum. ACS Central Science, 5(4), 599–606. https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b0087

2. Bargmann, C. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. WormBook.

https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1

3. Vogt, M. C., & Hobert, O. (2017). Olfactory Imprinting: A Worm’s Memory of Things Past. Current Biology, 27(20), R1108–R1110.

https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.072

4. Troemel, E. R., Kimmel, B. E., & Bargmann, C. I. (1997). Reprogramming chemotaxis responses: Sensory neurons define olfactory preferences in C. elegans. *Cell*, *91*(2), 161–169. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80399-2

5. Stiernagle, T. Maintenance of C. elegans (February 11, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1 6. Margie, O., Palmer, C., & Chin-Sang, I. (2013). *C. elegans* Chemotaxis Assay. Journal of Visualized Experiments, 74. <https://doi.org/10.3791/50069>

**Предварительное исследование химической чувствительности и обонятельного импринтинга *Caenorhabditis elegans* для диагностики биомаркеров болезни Паркинсона.**

Бунджонг Х., Джеми С., под руководством Мимон К., Либунгам Т.

**Актуальность.** Болезнь Паркинсона (БП) – это распространенное среди пожилых людей нейродегенеративное заболевание. На данный момент большинство скрининговых тестов для пациентов с БП основаны на опросах и клинических осмотрах, которые могут быть более точными после проявления симптомов, связанных с моторикой. Для диагностики используются и другие стандартные методы (например, анализ крови и/или МРТ), но они либо инвазивные, либо дорогие. Следовательно, очень важно найти новый метод для скрининга, который мог бы диагностировать болезнь на более ранних стадиях для более эффективного применения лекарства от БП. Недавнее исследование выявило, что при БП в кожном сале пациента присутствуют волатильные органические соединения [1]. Также было обнаружено, что люди с гиперчувствительным обонянием могли обнаружить эти соединения по запаху. В связи с этим мы заинтересовались свободноживущим нематодом *Caenorhabditis elegans* или *C. elegans,* известным своей хорошо развитой системой химической чувствительности [2] и способностью адаптироваться к обонятельным сигналам в своей среде путём импринтинга [3]. *C. elegans* имеет высокую чувствительность к большому спектру волатильных запахов и дешев в производстве в промышленных масштабах. Следовательно, используя природные способности нематода, можно создать неинвазивный, дешёвый метод с большой пропускной способностью для обнаружения БП.

**Цель.** Мы хотим изучить обонятельную чувствительность *C. elegans* и его умение запоминать новые запахи с помощью импринтинга, что потенциально может помочь разработать новый метод скрининга для БП.

**Метод.** Во время компьютерного исследования мы прежде всего изучили связывание биомаркеров БП и обонятельных рецепторов, а именно seven-transmembrane receptor-1 (str-1) и seven transmembrane receptor-2 (str-2) [4], используя Chimera и AutoDock Vina, а затем оценили силу связей. Для поведенческого исследования мы использовали дикую разновидность N2 *C. elegans*. Нематоды были выведены в чашке Петри со средой для выращивания нематод (NGM), засеянной OP50 *E. coli* (выступающей в качестве пищи) [5]. Животных держали при температуре 20°C. Хемотаксический анализ был проведён путём перемещения нематодов в круглую зону в центре чашки, а затем добавлением ароматного вещества в каждый квадрант [6]. Для каждого эксперимента был вычислен показатель хемотаксиса, чтобы оценить реакцию нематодов: притяжение (CI>0), безразличие (CI≈0) и отторжение (CI<0). Химикаты, включая изоамиловый спирт, этанол и 1-октанол, были использованы как тестовые соединения со стандартным протоколом, чтобы обеспечить возможность воспроизводить исследование. Статистический анализ был произведен с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента (неравная дисперсия) при α = 0,05. Для исследования импринтинга, синхронизированные нематоды на личиночной стадии L1, являющимся критическим периодом, были выращены в присутствии источников запаха на крышке чашки Петри, для того чтобы вызвать импринтинг. Все хемотаксические эксперименты были проведены на стадии взросления.

 **Результаты и их обработка.** Молекулярная стыковка показала, что биомаркеры БП, включая бензоилглицин и эйкозан, могут присоединяться к обоим рецепторам обоняния на одном центре связывания. Энергии связей, образуемые при этом, являются значимыми в сравнении с энергиями связей известных нам лиганд (изоамиловый и октиловый спирты для str-1 и str-2 рецепторов соответственно). Благодаря этому, нематоды, возможно, могут учуять запах соединений. Результаты тестов врожденных рефлексов червей на биомаркеры БП показали, что бензоилглицин вызвал сильную реппелентную реакцию, в то время как эйкозан не вызывал реакции (реакция была нейтральна). После того как черви были помечены запахами биомаркеров на стадии личинок, их реакция являлась аттрактивной к бензоилглицину и эйкозану. Поэтому можно предположить, что импринтинг оказывает эффект на обонятельные реакции нематод на биомаркеры.

 **a b**

****

 **str-1 str-2**

**Рис. 1. Молекулярная стыковка биомаркеров БП и рецепторов обоняния str-1, str-2 *C. elegans.*** (a) октиловый спирт (красный), бензоилглицин (фиолетовый) и эйкозан (желтый) соединяются на одном центре связи рецептора str-1 c энергиями, которые можно представить в виде -7.4 -5.4 и -9.8 ккал/моль соответственно. (b) изоамиловый спирт (фиолетовый), бензоилглицин (зеленый) и эйкозан (оранжевый) соединяются на одном центре связи рецептора str-2 c энергиями, которые можно представить в виде -4.3, -5.3 и -9.2 ккал/моль соответственно.





**Рис. 2. Реакция на запахи бензоилглицина и эйкозана у диких *C. elegans* различается в зависимости от того, были ли они импринтированы ими или нет.** (a) Индекс хемотаксиса, подсчитанный для взрослых *C. elegans,* подверженных воздействию летучих биомаркеров БП в различных концентрациях (10, 5, 0.5, 0.05, 0.005 ммоль) - бензоилглицина и эйкозана. Этиловый спирт использовался как отрицательная контрольная проба. Изоамиловый и октиловый спирты были использованы как привлекающие и отталкивающие вещества соответственно. Хемотаксис импринтированных *C. elegans* с различными концентрациями бензоилглицина (b) и эйкозана (c) был приведен в сравнение с данными для обычных особей. Каждый эксперимент был проведен по нескольку раз (n = 4-6 опыта). Планка погрешности = стандартная ошибка среднего. Столбцы, отмеченные звездочками отображают статистически значимую разницу по двустороннему парному критерию Стьюдента для неодинаковой дисперсии (незнач.: незначимый; \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001).

**Вывод:**

1. Обонятельные рецепторы *C. elegans* могут чувствовать биомаркеры, имеющие запах, так как они присоединяются к рецепторам с высокой связывающей аффинностью на одном центре связывания по сравнению с известными лигандами.
2. Несмотря на то, что биомаркеры БП не привлекают обычных нематод, они могут быть натренированы аттрактивной реакции к данным соединениям при помощи импринтинга.
3. Требуется дальнейшее изучение, чтобы подтвердить молекулярные изменения, которые указывают на появление рефлекса у нематод. Тем не менее, наше исследование указывает на то, что *C. elegans* могут применяться для выявления БП и других болезней, при условии что нематоды могут чувствовать их летучие биомаркеры.

**Literature:**

1. Trivedi, D. K., Sinclair, E., Xu, Y., Sarkar, D., Walton-Doyle, C., Liscio, C., Banks, P., Milne, J., Silverdale, M., Kunath, T., Goodacre, R., & Barran, P. (2019). Discovery of Volatile Biomarkers of Parkinson’s Disease from Sebum. ACS Central Science, 5(4), 599–606. https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b0087

2. Bargmann, C. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. WormBook.

https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1

3. Vogt, M. C., & Hobert, O. (2017). Olfactory Imprinting: A Worm’s Memory of Things Past. Current Biology, 27(20), R1108–R1110.

https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.072

4. Troemel, E. R., Kimmel, B. E., & Bargmann, C. I. (1997). Reprogramming chemotaxis responses: Sensory neurons define olfactory preferences in C. elegans. *Cell*, *91*(2), 161–169. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80399-2

5. Stiernagle, T. Maintenance of C. elegans (February 11, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1 6. Margie, O., Palmer, C., & Chin-Sang, I. (2013). *C. elegans* Chemotaxis Assay. Journal of Visualized Experiments, 74. https://doi.org/10.3791/50069