

***Λειτουργικός χαρακτηρισμός των θέσεων
φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Ταυ που διέπουν
την τοξικότητα της στο μοντέλο της *Drosophila
melanogaster****

Ιάσων Κεραμίδης

Δεκέμβριος 2015

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Φωτεινή Στυλιανοπούλου Ph.D

Καθηγήτρια Βιολογίας Τμήματος Νοσηλευτικής, Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Φωτεινή Στυλιανοπούλου

Καθηγήτρια Βιολογίας Τμήματος Νοσηλευτικής, Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευθύμιος Σκουλάκης M.C., Ph.D

Α' Ερευνητής, Ε.Κ.Ε.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμινγκ

Αντώνης Σταματάκης Ph.D

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας και Βιολογίας της Συμπεριφοράς Τμήματος Νοσηλευτικής, Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Αντί προλόγου

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γνωστικής Βιολογίας, του τομέα Νευροβιολογίας του Ε.Κ.Ε.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμινγκ υπό την επίβλεψη του Α' Ερευνητή Ευθύμιου Σκουλάκη κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015.

Από την θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω, ως ελάχιστο δείγμα της ευγνωμοσύνης μου, τις ευχαριστίες μου προς τον κ. Ευθύμιο Σκουλάκη που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και μου ανέθεσε να διεκπεραιώσω την παρούσα διπλωματική εργασία έτσι ώστε να διευρύνω τις θεωρητικές και πρακτικές μου γνώσεις στην νευροβιολογία της συμπεριφοράς και τη νευροεκφύλιση. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια που βρέθηκα στο εργαστήριο του, καθώς και για την ακόρεστη διάθεση του να μου προσφέρει επιστημονική καθοδήγηση και εκπαίδευση ώστε να αποκτήσω ανεξάρτητη και ισχυρή επιστημονική σκέψη, ένα εφόδιο απαραίτητο για το επόμενο βήμα των σπουδών μου. Εκτιμώ απεριόριστα την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου.

Συγχρόνως, θα ήθελα να ευχαριστήσω ένθερμα την κα. Φωτεινή Στυλιανοπούλου που δέχθηκε να αναλάβει το ρόλο της επιβλέπουσας καθηγήτριας από την μεριά του πανεπιστημίου κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Τις ίδιες θερμές ευχαριστίες επιθυμώ να εκφράσω και προς το πρόσωπο του κ. Αντώνη Σταματάκη που δέχθηκε να ολοκληρώσει την εξεταστική επιτροπή μου ως το τρίτο μέλος της. Ταυτόχρονα, τους ευχαριστώ αμφότερους για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφεραν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου αλλά και για όσο καιρό βρέθηκα στο εργαστήριο τους στα πλαίσια της μιας εκ των δύο τρίμηνων εργαστηριακών κυκλικών ασκήσεων του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την Κατερίνα Παπανικολοπούλου που με εμπιστεύτηκε ώστε να συνεχίσω μέρος του ερευνητικού project της, για την εκπαίδευση και την καθοδήγηση που μου πρόσφερε αλλά και για την ακόρεστη υπομονή της στο να με βοηθά να επιλύσω τα όποια προβλήματα συναντούσα στο εργαστήριο. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Jean Y Gouzi που με μύησε στο μαγικό κόσμο των συμπεριφορικών πειραμάτων μνήμης και μάθησης στην *Drosophila* καθώς επίσης και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για το άριστο κλίμα συνεργασίας και την προθυμία τους να βοηθήσουν ανά πάσα στιγμή.

Τέλος θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και ειδικά τους φίλους μου, Χρήστο, Ελευθερία, Αγγελική και Χρήστο, που πίστεψαν σε εμένα, μοιράστηκαν τα όνειρα μου και τις φιλοδοξίες μου και με στήριξαν ψυχολογικά καθ' όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Σας ευχαριστώ όλους

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
1. Εισαγωγή	5
2. Μέθοδοι και Υλικά	6
2.1. Καλλιέργεια και στελέχη <i>Drosophila</i>	6
2.2. Western blot και αντισώματα	6
2.3. Ιστολογία	7
2.4. Ανάλυση θνησιμότητας.....	7
2.5. Συμπεριφορική ανάλυση	8
3. Αποτελέσματα	9
3.1. Προσδιορισμός των φαινοτύπων τοξικότητας και μαθησιακών ελλειμμάτων για το διαγονιδιακό στέλεχος $h\tau au^{ON4R-II}$	9
3.1.1. Το διαγονιδιακό στέλεχος $h\tau au^{ON4R-II}$ δεν αναπαράγει το φαινότυπο απώλειας των MBs	9
3.1.2. Ο φαινότυπος των αδρών οφθαλμών αναπαράγεται για το διαγονιδιακό στέλεχος $h\tau au^{ON4R-II}$	10
3.1.3. Η έκφραση της ON4R-II παν-νευρωνικά προκαλεί μαθησιακά ελλείμματα	10
3.2. Διαφορετικές προσεγγίσεις για την αύξηση της συσσώρευσης της Ταυ στο διαγονιδιακό στέλεχος $h\tau au^{ON4R-II}$	12
3.2.1. Η έκφραση της ON4R-II από δύο αντίγραφα του διαγονιδίου οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα.....	12
3.2.2. Η αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία μεγαλώνουν οι μύγες δεν μεταβάλλει την συσσώρευση της Ταυ	12
3.2.3. Η έκφραση της ON4R από διαφορετικούς παν-νευρωνικούς οδηγητές μπορεί να μεταβάλλει την συσσώρευση της Ταυ	13
3.3. Η εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων για το διαγονιδιακό στέλεχος $h\tau au^{ON4R-II}$ φαίνεται να είναι ανεξάρτητη των επιπέδων συσσώρευσης της Ταυ.....	16
3.4. Τα αλληλόμορφα των Ser^{238} , Thr^{245} και Ser^{262} εμφανίζουν το φαινότυπο των αδρών οφθαλμών όχι όμως αυτόν της απώλειας των MBs	18
3.5. Η διατήρηση της φωσφορυλίωσης της Ser^{262} είναι απαραίτητη για τα Ταυ-εξαρτώμενα μαθησιακά ελλείμματα όχι όμως αυτή της Thr^{245}	19
3.6. Φώσφο-αποτύπωμα των μεταλλάξεων για τις Ser^{238} , Thr^{245} και Ser^{262} σε άλλους παθογενείς επιτόπους της Ταυ	21
4. Συζήτηση	22
5. Αναφορές	27

Λειτουργικός χαρακτηρισμός των θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Tau που διέπουν την τοξικότητα της στο μοντέλο της *Drosophila melanogaster*.

Κεραμίδης Ιάσων

Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, ΠΜΣ Μοριακή Ιατρική (Α.Μ.: 20130700)

Περίληψη

Οι υπερφωσφορυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης Tau αποτελούν το κύριο συστατικό των νευροϊνιδιακών δεματίων που εντοπίζονται στο εσωτερικό των νευρικών κυττάρων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) σε ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer και άλλες Ταυοπαθίες. Η *Drosophila melanogaster* χρησιμοποιείται ως μοντέλο μελέτης των ασθενειών αυτών μιας και η έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Tau (htau) στην *Drosophila* έχει αναδείξει τις παθολογικές επιπτώσεις της συσσώρευσης της στη μνήμη και την μάθηση καθώς και την τοξικότητα της πρωτεΐνης αυτής για συγκεκριμένες δομές του νευρικού συστήματος της μύγας ¹. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται διαγονιδιακά στελέχη της *Drosophila* για να χαρακτηριστούν σημαντικές θέσεις φωσφορυλίωσης της που καθορίζουν τη τοξικότητα της. Μέχρι στιγμής, έχει προσδιοριστεί πως η φωσφορυλίωσης της Ser²³⁸ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη τοξικότητα της Tau ². Ταυτόχρονα, η απουσία της φωσφορυλίωσης στην Ser²⁶² περιορίζει την εμφάνιση μαθησιακών ελλειμμάτων σε ενήλικες *Drosophila* με την φωσφορυλίωση αυτή να έχει δειχθεί πως προηγείται χρονικά της φωσφορυλίωσης της Ser²³⁸ ^{2,3}. Για το λόγο αυτό μελετάται η σύνδεση των Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶² μέσω διαγονιδιακών σειρών στις οποίες οι εν λόγω Ser/Thr έχουν αντικατασταθεί από την φώσφο-ανθεκτική αλανίνη ή το φώσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ. Μέσω αυτών των αλληλομόρφων επιβεβαιώνεται ο ρόλος της Ser²⁶² στην εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων αλλά και η ανάγκη της διατήρησης της φωσφορυλίωσης της Thr²⁴⁵ ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση της μαθησιακής δυσλειτουργίας αυτής. Τέλος, με μια σειρά πειραμάτων ανοσο-αποτυπώματος κατά Western προσδιορίζεται ο ρόλος της Ser²⁶² ως θεματοφύλακας της φωσφορυλίωσης απομακρυσμένων καταλοίπων φωσφορυλίωσης αλλά και του ελέγχου της φωσφορυλίωσης των Ser²⁰²/Thr²⁰⁵ (AT8) και Thr²¹²/Ser²¹⁴ (AT100) από την φωσφορυλίωση της Thr²⁴⁵.

1. Εισαγωγή

Η Ταυ είναι μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους (MAP) και κωδικοποιείται από το γονίδιο MAPT (OMIM: 157140). Προωθεί την κυτταροσκελετική οργάνωση και σταθερότητα, ενώ για το νευρικό σύστημα εδραιώνει την αξονική μετατόπιση^{4,5}. Έξι ισομορφές της εντοπίζονται στο ανθρώπινο ΚΝΣ μέσω εναλλακτικού ματίσματος του αρχικού μεταγράφου της⁴. Οι ισομορφές αυτές μπορεί να περιέχουν τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (3R ή 4R) στο καρβοξυτελικό τους άκρο ενώ στο αμινοτελικό μπορούν να περιέχουν από καμία έως και δύο N-τελικές επικράτειες (0N, 1N και 2N)⁶. Ο αριθμός των επαναλήψεων πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους μεταβάλλει την συγγένεια της Ταυ με τους μικροσωληνίσκους, με τις 4R ισομορφές να εμφανίζουν υψηλότερη ικανότητα πρόσδεσης⁷, ενώ η αμινοτελική επικράτεια θεωρείται σημαντική για την αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη⁸ και τον πυρήνα⁹.

Η υπερφωσφορυλίωση της Ταυ στα 84 διαφορετικά πιθανά κατάλοιπα της (παρόντα στην μεγαλύτερη σε μέγεθος ισομορφή της Ταυ, 2N4R)¹⁰ οδηγεί σε μειωμένη συνάφεια πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους και οδηγεί σε απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας της Ταυ⁴. Η ελεύθερη Ταυ μπορεί έτσι να δημιουργήσει τοξικά κυτταροπλασματικά συσσωματώματα που προκαλούν νευρωνική δυσλειτουργία ή νευροεκφύλιση⁷. Στους ανθρώπους τα υψηλά επίπεδα της αγρίου τύπου Ταυ στο ΚΝΣ χαρακτηρίζουν Ταυοπαθίες όπως τη νόσο του Alzheimer's (AD), τη νόσο του Pick's και τη προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (Progressive Supranuclear Palsy)^{7,11}. Αντίθετα, μεταλλάξεις που επηρεάζουν την πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους ή αυξάνουν τα επίπεδα της 4R Ταυ¹² σχετίζονται με την κροταφομετωπιαία άνοια με παρκινσονισμό που συνδέεται με το χρωμόσωμα 17 (FTDP-17).

Μέχρι στιγμής δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η υπερφωσφορυλίωση αυτή καθ' αυτή ή η φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα οδηγεί την Ταυ ώστε να γίνει παθογενής. Έτσι, ο προσδιορισμός θέσεων φωσφορυλίωσης που μεσολαβούν στην παθογένεια της είτε προκαλώντας την είτε διατηρώντας την είναι κεντρικής σημασίας για την κατανόηση της νευρωνικής τοξικότητας της Ταυ. Παρόλα αυτά οι συγκριτικές μελέτες που στοχεύουν στον προσδιορισμό τέτοιων θέσεων φωσφορυλίωσης¹⁰ δεν επιτρέπουν τον συστημικό προσδιορισμό της σειράς ή της πιθανής επίπτωσης της εμφάνισής τους. Για το λόγο αυτό μελετάμε τον ρόλο των φώσφο-επιτόπων της Ταυ στην ανάπτυξη και την λειτουργία του νευρικού συστήματος της *Drosophila*^{3,13} στην οποία είναι δυνατός ο έλεγχος χωροχρονικά της έκφρασης διαφόρων διαγονιδίων αλλά και της δημιουργίας αλληλομόρφων της Ταυ που φέρουν αμινοξικές αντικαταστάσεις που μπλοκάρουν ή μιμούνται την φωσφορυλίωση ενός ή πολλών καταλοίπων^{14,15}.

Στο εργαστήριο μας έχει προσδιοριστεί πως η έκφραση ισομορφών της αγρίου τύπου Ταυ (WT Ταυ) οδηγεί σε διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας για τα νευρικά κύτταρα των μισχοειδών σωματίων (Mushroom Bodies, MBs)³. Ταυτόχρονα έχουν προσδιοριστεί δύο φώσφο-επιτόποι που μεσολαβούν την τοξικότητα της Ταυ, η Ser²³⁸ και η Thr²⁴⁵³, με την Ser²³⁸ να είναι φωσφορυλιωμένη σε όλα τα τοξικά για τα MBs αλληλόμορφα της Ταυ².

Εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση των δύο καταλοίπων αυτών διατηρούνται άθικτες οι δομές των MBs, παρόλα αυτά τα ζώα αυτά εμφανίζουν μαθησιακά ελλείμματα³. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως η τοξικότητα της Ταυ για τα νευρικά κύτταρα της *Drosophila* διαχωρίζεται από την δυσλειτουργία των νευρικών κυττάρων αυτών για την δημιουργία μνήμης και μάθησης στα ζώα που εκφράζουν την ανθρώπινη Ταυ^{3,18}. Μάλιστα, στο πλαίσιο αυτό προσδιορίστηκε πως η φωσφορυλίωση για την Ser²⁶² από την άλλη μεριά φαίνεται να είναι απαραίτητη για την εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων που οφείλονται στην Ταυ μιας και το μπλοκάρισμα της φωσφορυλίωσης για αυτό το κατάλοιπο οδηγεί στην δημιουργία φυσιολογικής οσφρητικής μάθησης^{2,3,18}.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται για πρώτη φορά αλληλόμορφα της Ταυ τα οποία εμφανίζουν αντικαταστάσεις για μόνο μια θέση φωσφορυλίωσης κάθε φορά. Οι επίτοποι που αναλύονται είναι οι Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶² για αλληλόμορφα στα οποία είτε μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση τους μέσω αντικατάστασης σε αλανίνη είτε ψευδο-φωσφορυλιώνοντας τους μέσω αντικατάστασης τους από γλουταμικό οξύ, χειρισμοί που έχουν περιγραφεί εκτενώς^{3,14,15}. Για αυτά τα αλληλόμορφα γίνεται ανάλυση της τοξικότητας τους για τα νευρικά κύτταρα των MBs, της αλληλεπίδρασης τους με άλλες θέσεις φωσφορυλίωσης μέσω της χρήσης συγκεκριμένων φώσφο-αντισωμάτων αλλά και της επίδοσης τους στην οσφρητική μάθηση.

2. Μέθοδοι και Υλικά

2.1. Καλλιέργεια και στελέχη *Drosophila*

Οι διασταυρώσεις της *Drosophila* πραγματοποιήθηκαν στην συνήθη τροφή από σιτάλευρο και ζάχαρη συμπληρωμένη με αλεύρι σόγιας και CaCl₂ και καλλιεργήθηκαν στους 25°C σε 50% υγρασία και σε 12 h κύκλο φωτός/σκοταδιού, εκτός των περιπτώσεων που υποδεικνύεται κάτι διαφορετικό. Ο Elav^{C155}-Gal4¹⁹⁻²¹, ο Ras2-Gal4²² αλλά και Elav^{C155}-Gal4;Ras2-Gal4, που κατασκευάστηκε μέσω διασταυρώσεων, χρησιμοποιήθηκαν για την παν-νευρωνική έκφραση των διαγονιδίων, ενώ ο Elav^{C155}-Gal4;tubGal80^{ts}³ χρησιμοποιήθηκε για ελεγχόμενη έκφραση. Η διαγονιδιακή σειρά UAS-htau^{ON4R} που περιέχει την ανθρώπινη Tau24 προσφέρθηκε από την M. Feany (Harvard Medical School, Boston, MA). Οι διαγονιδιακές σειρές UAS-htau^{ON4R-II}, UAS-htau^{ON4R-S238A}, UAS-htau^{ON4R-S238E}, UAS-htau^{ON4R-T245A}, UAS-htau^{ON4R-T245E}, UAS-htau^{ON4R-S262A} και UAS-htau^{ON4R-S262E} κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας έτσι ώστε να ενσωματωθούν όλα στην ίδια θέση στο γενετικό υλικό της *Drosophila* (attP site).

2.2. Western blot και αντισώματα

Τα επίπεδα της ολικής Ταυ και η φωσφορυλίωσή της προσδιορίστηκαν σε 2 κεφαλές θηλυκών ατόμων που ομογενοποιούνται σε 1x Laemmli διάλυμα εκτός των περιπτώσεων που υποδεικνύεται κάτι διαφορετικό. Χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα 5A6 (1:3000), T46 (Invitrogen, 1:3000), AT8 (1:1000), AT100 (Pierce Endogen 1:1000) αλλά και τα πολυκλωνικά αντισώματα pS396 (ProSci, 1:1000) και pS262 (Abcam 1:1000). Για την κανονικοποίηση και εξάλειψη σφαλμάτων φόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-Syntaxin (mAb 8C3, Developmental Studies Hybridoma Studies, 1:3000). Τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:5000 και 1:2000.

2.3. Ιστολογία

Η ανοσοϊστολογική ανάλυση ενήλικων κεφαλών *Drosophila* πραγματοποιείται σε τομές παραφίνης. Για τις τομές τα ζώα μονιμοποιούνται σε διάλυμα Carnoy's (60% αιθανόλη, 30% χλωροφόρμιο και 10% οξικό οξύ) για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου, επεξεργάζονται με μεθυλοβενζοϊκό για 12 h και ενσωματώνονται σε παραφίνη. Τομές 5 μm λαμβάνονται, αποπαραφινοποιούνται σε ξυλένιο, ενυδατώνονται με μεταφορά σε μια σειρά διαλυμάτων αιθανόλης από 100% σε 30% και κατόπιν ελέγχονται χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Leo (1:4000) όπως προηγουμένως έχει περιγραφεί²³.

2.4. Ανάλυση θνησιμότητας

Ο έλεγχος της θνησιμότητας των ζώων πραγματοποιήθηκε με το σχεδιασμό των επιθυμητών διασταυρώσεων και κατόπιν τον έλεγχο του πλήθους των απογόνων τους. Κάθε διασταύρωση αποτελούταν από 2 αρσενικά ομόζυγα ζώα για τον υπό έλεγχο γενότυπο και 4 παρθένες θηλυκές μύγες ετερόζυγες για τον οδηγητή της έκφρασης και διατηρούνταν σε φιαλίδια με τροφή για δύο μέρες στους 25°C. Μετά το πέρας των δύο ημερών τα ζώα μεταφέρονται σε καινούργια φιαλίδια με τροφή στα οποία αφήνονται για 5 ημέρες στους 25°C ώστε να εναποθέσουν τα θηλυκά ζώα τα αβγά των απογόνων τους. Την 15 ημέρα από την αρχική μεταφορά των γονέων διαχωρίζονται και μετρώνται τα αρσενικά άτομα των διαφορετικών γενοτύπων.

Η ικανότητα επιβίωσης των ζώων ως την ενηλικίωση τους προσδιορίστηκε για ζώα τα οποία εκφράζουν παν-νευρωνικά κάποια από τα αλληλόμορφα της ON4R. Οι διαγονιδιακές σειρές που χρησιμοποιούνται φέρουν το διαγονίδιο στο II χρωμόσωμα και η έκφραση ελέγχεται από τον *Elav-Gal4;Ras2-Gal4* ο οποίος είναι ετερόζυγος για το *Ras2-Gal4* στο II χρωμόσωμα μεταφέροντας το θνησιγόνο *Cyo* ενώ ο *Elav-Gal4* εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα (η πατρική γενιά έχει δηλαδή τους γενότυπους *Elav/Elav;Ras2/Cyo* και *+/γ;ON4R-II/ON4R-II*). Κατά αυτόν τον τρόπο είναι εύκολο να επιλεγούν οι αρσενικές μύγες που θα εκφράζουν τον διαγονίδιο υπό τον έλεγχο και του *Elav-Gal4* και του *Ras-Gal4* (*Elav/γ;Ras2/ON4R-II*) από τις αρσενικές μύγες που εκφράζουν το διαγονίδιο μόνο υπό τον έλεγχο του *Elav-Gal4* (*Elav/γ;ON4R-II/+*). Ο λόγος επιβίωσης υπολογίζεται ως το κλάσμα του αριθμού των αρσενικών απογόνων που εκφράζουν το εκάστοτε αλληλόμορφο της ON4R υπό τον έλεγχο και των δύο παν-νευρωνικών οδηγητών προς το σύνολο του αριθμού των αρσενικών απογόνων και λαμβάνει την τιμή 0 όταν δεν επιβιώνουν αρσενικά που να εκφράζουν την ON4R και τιμές πλησίον του 0.5 όταν η ικανότητα επιβίωσης των αρσενικών δεν μεταβάλλεται από την έκφραση του διαγονιδίου.

Ο λόγος επιβίωσης προσδιορίζεται ως η μέση τιμή του εκάστοτε λόγου που προκύπτει από τουλάχιστον τρεις διασταυρώσεις για τον κάθε αλληλόμορφο που ελέγχεται. Όλες οι διασταυρώσεις είναι σύγχρονες και κάθε πείραμα έχει επαναληφθεί τουλάχιστον για μια ανεξάρτητη φορά.

2.5. Συμπεριφορική ανάλυση

Τα τεστ συμπεριφοράς πραγματοποιούνται κάτω από δέσμη ερυθρού φωτός στους 24-26°C και επίπεδα υγρασίας 70-78%. Όλα τα ζώα ήταν 2-5 ημερών, συλλέχθηκαν μέσω ήπιας αναισθησίας υπό CO₂ μια μέρα πριν την διεξαγωγή του πειράματος και διατηρήθηκαν σε φιαλίδια με τροφή σε ομάδες των 50-70 στους 24-26°C. 1-1.5 ώρα πριν το πείραμα μεταφέρονται σε καινούργια φιαλίδια χωρίς αναισθησία. Για την εκτίμηση της ικανότητας μάθησης χρησιμοποιείται το παράδειγμα της αρνητικής οσφρητικής μάθησης συνδυάζοντας απωθητικές οσμές ως εξαρτημένο ερέθισμα (CS+ και CS-) με το ηλεκτρικό σοκ ως μη εξαρτημένο ερέθισμα (US). Οι απωθητικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι η βενζαλδεΰδη (BNZ) και η 3-οκτανόλη (OCT). Κατά την εκπαίδευση, 50-70 μύγες τοποθετούνται σε ένα σωλήνα υπενδεδυμένο με ηλεκτροφόρο πλέγμα και εκτίθενται σε αέρα (500 mL/min) για 15 s, κατόπιν η συνδεδεμένη με το σοκ οσμή μεταφέρεται στον αέρα για 30 s ταυτόχρονα με επαναλαμβανόμενα σοκ διάρκειας 1.25 s στα 90 V κάθε 5 s. Ακολουθώς, μεταφέρεται αέρας για 30 s, η οσμή ελέγχου για 30 s και ξανά αέρας για 30 s. Η χρονική στιγμή της παράδοσης του ερεθίσματος διατηρείται σταθερή, με 6 σοκ να παραδίδονται σε 30 s. Δύο ομάδες ζώων του ίδιου γενοτύπου εκπαιδεύονται ταυτόχρονα, μια ομάδα ώστε να αποφεύγει την BNZ ή άλλη την OCT, ενώ η αντίθετη οσμή χρησιμοποιούνταν κάθε φορά ως οσμή ελέγχου. Τα ζώα μεταφέρονται αμέσως μετά την ολοκλήρωση της εκπαίδευσης σε μια συσκευή T-λαβυρίνθου επιτρέποντας τους να διαλέξουν μεταξύ των δύο οσμών που συγκλίνουν στη μέση του λαβυρίνθου για 90 s. Αφού ο χρόνος μεταξύ της εκπαίδευσης και της σύζευξης του εξαρτημένου με το ανεξάρτητο ερέθισμα είναι 3 min, η αξιολόγηση αφορά την μνήμη 3 λεπτών, την οποία αναφέρουμε ως μάθηση.

Η απόδοση των ζώων υπολογίζεται μέσω ενός δείκτη (Performance Index, PI) που ισούται με το λόγο των μυγών που αποφεύγουν την συνδεδεμένη με το σοκ οσμή μείον το αυτών που αποφεύγουν την οσμή ελέγχου προς των συνολικό αριθμό των μυγών. Ο λόγος αυτός αντικατοπτρίζει την απόδοση μάθησης για το ένα εξαρτημένο ερέθισμα. Έτσι ο PI υπολογίζεται ως ο μέσος όρος των δύο ήμισυ λόγων για κάθε μία από τις δύο ομάδες ζώων που εκπαιδεύονται στα συμπληρωματικά εξαρτημένα ερεθίσματα και λαμβάνει τιμές μεταξύ 100 – 0 (τέλεια απόδοση και απουσία μάθησης αντίστοιχα). Όλα τα πειράματα συμπεριφοράς διεξήχθησαν έτσι ώστε όλοι οι γενοτύποι που εμπλέκονται σε ένα πείραμα να ελέγχονται κάθε ημέρα. Τα πειράματα αναπαράχθηκαν τουλάχιστον μια φορά με μύγες από διαφορετικές διασταυρώσεις και σε διαφορετική χρονική περίοδο.

Για τα πειράματα όπου γίνεται χρήση του συστήματος TARGET (μύγες που φέρουν Gal80ts), όλα ζώα έχουν εκτραφεί στους 18°C μέχρι την ενηλικίωση και τα UAS-ON4R διαγονίδια επάγονται τοποθετώντας μύγες 2-5 ημερών στους 30°C για 12 ημέρες. Τα ζώα κρατήθηκαν στην θερμοκρασία εκπαίδευσης (25°C) για 30 λεπτά πριν την εκπαίδευση.

3. Αποτελέσματα

3.1. Προσδιορισμός των φαινοτύπων τοξικότητας και μαθησιακών ελλειμμάτων για το διαγονιδιακό στέλεχος htau^{ON4R-II}

Όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι, τα διαγονιδιακά στελέχη που χρησιμοποιούνται για τους σκοπούς αυτής της εργασίας περιέχουν τα διαφορετικά αλληλόμορφα της ON4R σε μια συγκεκριμένη attP θέση ένθεσης²⁴. Η επιλογή αυτή έγινε, έτσι ώστε τα υπό εξέταση αλληλόμορφα να βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο και έτσι τα επίπεδα έκφρασης τους να είναι ίδια κάτι που επιτρέπει την συγκριτική μελέτη μεταξύ διαφορετικών διαγονιδίων. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως οι διάφορες attP θέσεις ενσωμάτωσης εμφανίζουν ποικιλοότητα ως προς το επίπεδο της έκφρασης ενός διαγονιδίου ή ακόμα και για την ίδια attP θέση η έκφραση μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα τον ιστό στον οποίο επιλέγεται να γίνει η επαγωγή της²⁵. Παράλληλα έχει βρεθεί πως η έκφραση της tau, συγκεκριμένα, από διαφορετικές θέσεις attP, μπορεί να μεταβάλει την τοξικότητα της για το περιφερικό νευρικό σύστημα, εξαλείφοντας ή επιδεινώνοντας τον φαινότυπο λόγω μεταβολής του επιπέδου έκφρασης του εκάστοτε διαγονιδίου²⁶. Παρόμοια δεδομένα προκύπτουν και από την χρήση πολλών διαφορετικών διαγονιδιακών στελεχών, στο εργαστήριο μας, στα οποία η ένθεση του διαγονιδίου έχει πραγματοποιηθεί σε μια attP θέση ενσωμάτωσης και δεν εμφανίζουν τα ίδια επίπεδα έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών διαγονιδίων. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να διερευνηθεί αρχικά αν το νέο διαγονιδιακό στέλεχος htau^{ON4R-II} αναπαράγει τους ήδη χαρακτηρισμένους φαινοτύπους τοξικότητας της ON4R όταν η έκφραση της οδηγείται στο νευρικό σύστημα της *Drosophila*^{1-3,18}.

3.1.1. Το διαγονιδιακό στέλεχος htau^{ON4R-II} δεν αναπαράγει το φαινότυπο απώλειας των MBs

Η συσσώρευση της ON4R ισομορφής της πρωτεΐνης Tau στον νευρικό σύστημα της *Drosophila* φαίνεται να οδηγεί σε ένα σύνολο φαινοτύπων που προσομοιάζουν τα συμπτώματα νευροεκφύλισης και των συμπεριφορικών διαταραχών που παρουσιάζουν οι ασθενείς με Ταυοπαθίες. Έτσι, εμφανίζουν προοδευτική νευροεκφύλιση, πρόωρο θάνατο, συσσώρευση παθολογικών μορφών της Tau και βλάβες στην διαδικασία της μάθησης και μνήμης^{1-3,18}. Η τοξικότητα της ON4R αξιολογήθηκε μέσω ιστολογικής ανάλυσης της ακεραιότητας των μισχοειδών σχηματισμών (Mushroom Bodies, MBs), η δομή των οποίων έχει βρεθεί να εκφυλίζεται υπό την έκφραση άλλων διαγονιδιακών στελεχών της ON4R³, με τις δομές αυτές να είναι απαραίτητες για την οσφρητική μνήμη και τη μάθηση στην *Drosophila* αλλά και σε άλλα έντομα^{16,27,28}. Παρόλα αυτά, η συσσώρευση της ON4R για τις διαγονιδιακές μύγες htau^{ON4R-II} δεν φαίνεται να επηρεάζει τη δομή των MBs, όπως παρατηρείται για τις διαγονιδιακές μύγες htau^{ON4R} (Εικόνα 1Α). Οι άθικτες δομές των MBs μπορούν να δικαιολογηθούν λόγω της καθυστερημένης ή μειωμένης συσσώρευσης της ON4R στο σύνολο των νευροβλαστών που θα οδηγήσουν στον σχηματισμό των MBs^{29,30,3}. Για να εμφανιστεί η απώλεια των MBs χρειάζεται η τοξική για τα νευρικά κύτταρα Tau να συσσωρευτεί στους νευροβλάστες το χρονικό διάστημα μεταξύ των 4 έως 6 ωρών της εμβρυογένεσης³ και στο μονωμένο σύστημα ενσωμάτωσης των attP θέσεων ίσως η επαγωγή της έκφρασης να μην είναι πιθανή από τόσο νωρίς στην ανάπτυξη.

3.1.2. Ο εκφυλισμός του εξωτερικού χιτώνα των οφθαλμών αναπαράγεται για το διαγονιδιακό στέλεχος htau^{ON4R-II}

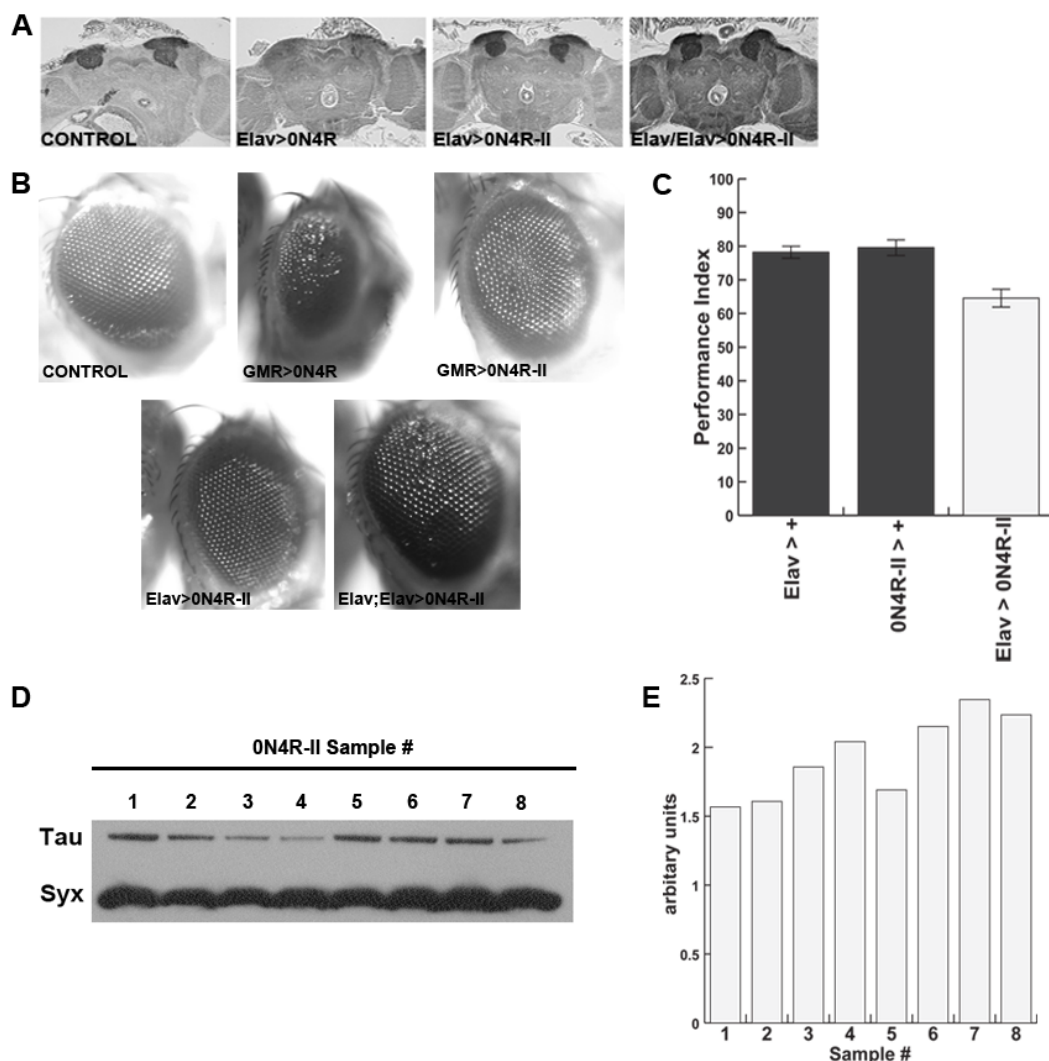
Η τοξικότητα της ON4R εξετάστηκε και για το περιφερικό νευρικό σύστημα της *Drosophila* παρατηρώντας την μορφολογία και οργάνωση των οματιδίων καθώς και το συνολικό μέγεθος των οφθαλμών των ζώων αυτών³¹. Οι οφθαλμοί των ζώων htau^{ON4R} εμφανίζουν έντονη αδρότητα και μειωμένο μέγεθος συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, όμως, τα έντονα αποτελέσματα τοξικότητας αυτά δεν παρατηρούνται για τα htau^{ON4R-II} ζώα όταν η έκφραση της Tau ελέγχεται από τον GMR-Gal4 (Εικόνα 1B), με τον οδηγητή της έκφρασης αυτόν να επιλέγεται για την αποκλειστική έκφραση των διαγονιδίων στους οφθαλμούς των ζώων³². Ακόμα, η αδρότητα εμφανίζεται μειωμένη και όταν για τα htau^{ON4R-II} ζώα η έκφραση γίνεται παν-νευρωνικά από ένα αντίτυπο του Elav-Gal4 (Elav>ON4R-II), επιδεινώνεται όμως όταν η έκφραση ελέγχεται από δύο αντίτυπα του Elav-Gal4 (Elav/Elav>ON4R-II) υποδεικνύοντας πως ο φαινότυπος αυτός ίσως να επηρεάζεται από τα επίπεδα συσσώρευσης της Tau (Εικόνα 1B). Βέβαια, για όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, η τοξικότητα για το περιφερικό νευρικό σύστημα είναι εμφανής. Η επιφάνεια των οφθαλμών της *Drosophila* δημιουργείται κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξης της και έτσι αποτελεί μια αναπτυξιακή διαδικασία η οποία υστερεί χρονικά πολύ σε σχέση με την αναπτυξιακή διαδικασία της διαίρεσης των νευροβλαστών των MBs και για αυτό είναι πιθανό ο φαινότυπος αυτός να αναπαράγεται για το στέλεχος htau^{ON4R-II}.

3.1.3. Η έκφραση της ON4R-II παν-νευρωνικά προκαλεί μαθησιακά ελλείμματα

Οι Ταυοπαθίες χαρακτηρίζονται, επίσης, από ελλείμματα γνωστικής ικανότητας για τους ασθενείς τους. Στην *Drosophila* η οσφρητική μάθηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για να προσδιοριστεί η γνωστική δυσλειτουργία των μυγών που εκφράζουν την hTau. Η οσφρητική μάθηση οφείλεται στην λειτουργία συγκεκριμένων δομών του νευρικού συστήματος της μύγας που αποτελούν τα MBs¹⁶. Η παρουσία των MBs σε ενήλικες μύγες, που εκφράζουν τα διάφορα αλληλόμορφα της Tau καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης τους, επιτρέπει τον έλεγχο της απόδοσης τους στην μάθηση με τη συσσώρευση της ON4R-II υπό τον έλεγχο του Elav-Gal4 να οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση του PI και συνεπώς σε μαθησιακή διαταραχή ($P < 0.0001$, Dunnett's test, Εικόνα 1C).

Όπως φαίνεται, λοιπόν, για το διαγονιδιακό στέλεχος htau^{ON4R-II} δεν αναπαράγεται ο φαινότυπος τοξικότητας και απώλειας των MBs παρόλα αυτά τα ζώα αυτά συνεχίζουν να εμφανίζουν διαταραχές στην μάθηση υποδεικνύοντας πως η συμπεριφορική δοκιμασία της εξαρτημένης οσφρητικής μάθησης είναι αρκετά ευαίσθητη και δεν επηρεάζεται από την ποικιλοότητα της έκφρασης που περιγράφεται στην βιβλιογραφία για τα attP διαγονιδιακά στελέχη^{25,26}. Δεν φαίνεται όμως να συμβαίνει το ίδιο και για τον φαινότυπο της αδρότητας των οφθαλμών, για τον οποίο η επιλογή διαφορετικών οδηγητών για την έκφραση του διαγονιδίου ON4R-II μεταβάλλει την έκταση της τοξικότητας της Tau. Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα αυτά και σε συνδυασμό με τις επαναλαμβανόμενες ανεξάρτητες παρατηρήσεις πως η συσσώρευση της πρωτεΐνης Tau που προκύπτει από την έκφραση του διαγονιδίου ON4R-II μεταβάλλεται έντονα (ενδεικτικά παρατίθεται η απεικόνιση μιας ανάλυσης κατά Western για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης Tau σε οκτώ ανεξάρτητα ομογενοποιημένα δείγματα κεφαλών και η ποσοτικοποίηση τους ως προς την Sych, Εικόνα 1D-E), επιλέχθηκε να διερευνηθεί αν η αύξηση της έκφρασης του διαγονιδιακού

στελέχους $htau^{ON4R-II}$ δύναται να μειώσει την ποικιλοότητα της έκφρασης και συσσώρευσης της Ταυ που παρατηρείται.



Εικόνα 1. Το διαγονιδιακό στέλεχος $htau^{ON4R-II}$ εμφανίζει μαθησιακά ελλείμματα χωρίς να παρουσιάζει απώλεια των MBs. (A) Μονιμοποιημένες σε διάλυμα Carnoy's μετωπιαίες τομές παραφίνης που έχουν υποβληθεί σε χρώση με anti-Leo στο επίπεδο των δενδριτών των MBs για τα δείγματα ελέγχου (control Elav;Ras2/+) και για μύγες που εκφράζουν το υποδεικνυόμενο διαγονίδιο της ON4R υπό τον Elav-Gal4 ή τον Elav-Gal4;Elav-Gal4/cyo. (B) Οφθαλμική τοξικότητα η οποία επάγεται από την έκφραση διαγονιδίων της ON4R στους οφθαλμούς υπό τον έλεγχο του GMR-Gal4 ή του Elav-Gal4 ή του Elav-Gal4;Elav-Gal4/Cyo. Οι μύγες μεγαλώνουν στους 25°C ταυτόχρονα, ενώ ομάδα ελέγχου αποτελούν οι ετερόγυζες μύγες για τον GMR-Gal4. Ο φαινότυπος του αδρού οφθαλμού είναι πολύ πιο έντονος για το διαγονίδιο ON4R, ενώ για τις διαγονιδιακές μύγες ON4R-II είναι εμφανής η διαταραχή της οργάνωσης των οματιδίων στις GMR>ON4R-II μύγες, ενώ ο φαινότυπος φαίνεται να επιδεινώνεται μεταξύ των Elav>ON4R-II και Elav/Elav>ON4R-II. (C) Απόδοση στην μάθηση σε μύγες που συσσωρεύουν παν-νευρωνικά την ON4R-II. Δείγματα ελέγχου (σκουρόχρωμες μπάρες) αποτελούν οι ElavGal4/+ ετεροζυγότες (ElavGal4 > +) και οι ετεροζυγότες για το διαγονίδιο (ON4R-II > +). Ο μέσος $\pm$ SEM υποδεικνύεται για $n > 9$ σε κάθε ομάδα. Οι στατιστικές διαφορές προσδιορίζονται με Dunnett's test για κάθε ομάδα. Οι διαφορές στην απόδοση μεταξύ των ομάδων ελέγχου και της ομάδας Elav>ON4R-II προσδιορίζονται ως στατιστικά σημαντικές ($P < 0.0001$). (D) Ενδεικτική απεικόνιση ανάλυσης κατά Western σε κεφάλια ζώων που εκφράζουν την ON4R-II παν-νευρωνικά υπό τον Elav-Gal4 για 8 διαφορετικά δείγματα με την χρήση του αντισώματος 5A6. Για τον προσδιορισμό οποιουδήποτε σφάλματος φόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιείται το αντίσωμα anti-Syx. Στα 8 διαφορετικά δείγματα της ίδιας συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης που φορτώνεται είναι εμφανής η ποικιλοότητα στην συσσώρευση της πρωτεΐνης Tau. (E) Ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης της Tau σε σχέση με την Syx για τα οκτώ δείγματα της Western blot ανάλυσης που παρατίθεται στο D.

3.2. Διαφορετικές προσεγγίσεις για την αύξηση της συσσώρευσης της Ταυ στο διαγονιδιακό στέλεχος htau^{ON4R-II}

3.2.1. Η έκφραση της ON4R-II από δύο αντίγραφα του διαγονιδίου οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα

Δεδομένου ότι η συνολική πρωτεΐνη που συσσωρεύεται στην διαγονιδιακή σειρά htau^{ON4R-II} είναι σχεδόν τέσσερις φορές λιγότερη από τη συσσώρευση της htau^{ON4R} (Εικόνα 1A και 1F) αναζητήθηκε κάποιος χειρισμός έτσι ώστε τα επίπεδα έκφρασης να αυξηθούν και ταυτόχρονα να εξαλειφθεί η έντονη ποικιλοότητα στα επίπεδα συσσώρευσης του παρατηρείται για αυτό το attP διαγονιδιακό στέλεχος. Έτσι, ως μια πρώτη προσέγγιση επιλέχθηκε να δημιουργηθούν ομόζυγες μύγες για το ON4R-II διαγονίδιο ώστε η έκφραση της ON4R να πραγματοποιείται από δύο αντίγραφα του, κάτι που αναμένεται να οδηγήσει σε αύξηση της συσσώρευσης της ON4R. Η επιλογή αυτή δεν ήταν δυνατή όμως, διότι, όταν η έκφραση των δύο αντιτύπων του διαγονιδίου htau^{ON4R-II} επάγεται παν-νευρωνικά από τον Elav-Gal4 δεν μεγαλώνουν ενήλικα άτομα λόγω εμβρυικής θνησιμότητας (Πίνακας 1) ακόμα και όταν οι απόγονοι μεγαλώνουν στους 18°C όπου η έκφραση του εκάστοτε διαγονιδίου είναι χαμηλή. Η εμβρυική θνησιμότητα αυτή μπορεί να δικαιολογηθεί μιας και το τελικό αποτέλεσμα της νεύρο-τοξικότητας της Ταυ αποτελεί ο θάνατος του οργανισμού και ενδεχομένως για ομόζυγα άτομα η συσσώρευση της Ταυ είναι υπερβολικά υψηλή καθιστώντας την θνησιγόνο για τα άτομα αυτά.

Genotype	18°C	RT	25°C
$\frac{elav}{+}; \frac{ON4R-II}{ON4R-II}$	LETHAL	LETHAL	LETHAL
$\frac{elav}{+}; \frac{S238A}{S238A}$	LETHAL	LETHAL	LETHAL
$\frac{elav}{+}; \frac{T245A}{T245A}$	LETHAL	LETHAL	LETHAL
$\frac{elav}{+}; \frac{S262A}{S262A}$	LETHAL	LETHAL	LETHAL
$\frac{elav}{+}; \frac{S238E}{S238E}$	LETHAL	LETHAL	LETHAL
$\frac{elav}{+}; \frac{T245E}{T245E}$	LETHAL	LETHAL	LETHAL
$\frac{elav}{+}; \frac{S262E}{S262E}$	VIALE	LETHAL	LETHAL

Πίνακας 1. Εμβρυική θνησιμότητα για τις διαγονιδιακές μύγες που εκφράζουν παν-νευρωνικά δύο αντίτυπα των αλληλομόρφων της Ταυ υπό τον Elav-Gal4. Για όλα τα αλληλόμορφα της Ταυ που υποδεικνύονται παρατηρείται εμβρυική θνησιμότητα με αποτέλεσμα να μην προκύπτουν ενήλικα άτομα για καμία από τις διαφορετικές θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν να μεγαλώσουν τα έμβρυα. Μόνο τα ομόζυγα έμβρυα για το αλληλόμορφο S262E δίνουν βιώσιμα ενήλικα άτομα.

3.2.2. Η αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία μεγαλώνουν οι μύγες δεν μεταβάλλει την συσσώρευση της Ταυ

Ένας διαφορετικός χειρισμός που φαίνεται να προκαλεί επαγωγή της έκφρασης των διαγονιδίων σε διαφορετικά διαγονιδιακά στελέχη της *Drosophila* αποτελεί η μεταβολή και συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία διατηρούνται οι απόγονοι της

διασταύρωσης μεταξύ ενός διαγονιδιακού στελέχους και κάποιου Gal-4 οδηγητή της έκφρασης. Στην περίπτωση μας, η διατήρηση ενήλικων $h\tau a u^{ON4R-II}$ στους 30°C για τέσσερις μέρες δεν φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της συσσώρευσης της πρωτεΐνης Tau σε σύγκριση με μύγες που διατηρούνται στους 25°C (Εικόνα 2A-B). Ταυτόχρονα, ούτε μύγες $h\tau a u^{ON4R-II}$ που μεγάλωσαν στους 30°C και διατηρήθηκαν σε αυτήν την θερμοκρασία μέχρι την ενηλικίωσή τους δεν εμφανίζουν υψηλότερο επίπεδο συσσώρευσης της πρωτεΐνης Tau συγκριτικά με μύγες που μεγάλωσαν στους 25°C (Εικόνα 2C-D). Όπως φαίνεται, λοιπόν, η έκφραση του διαγονιδίου υπό τον Elav-Gal4 δεν επάγεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία μεγαλώνουν ή διατηρούνται οι μύγες πιθανόν λόγω των μονωτών της attP θέσης ή των μονωτών των γειτονικών γονιδίων τις attP θέσης.

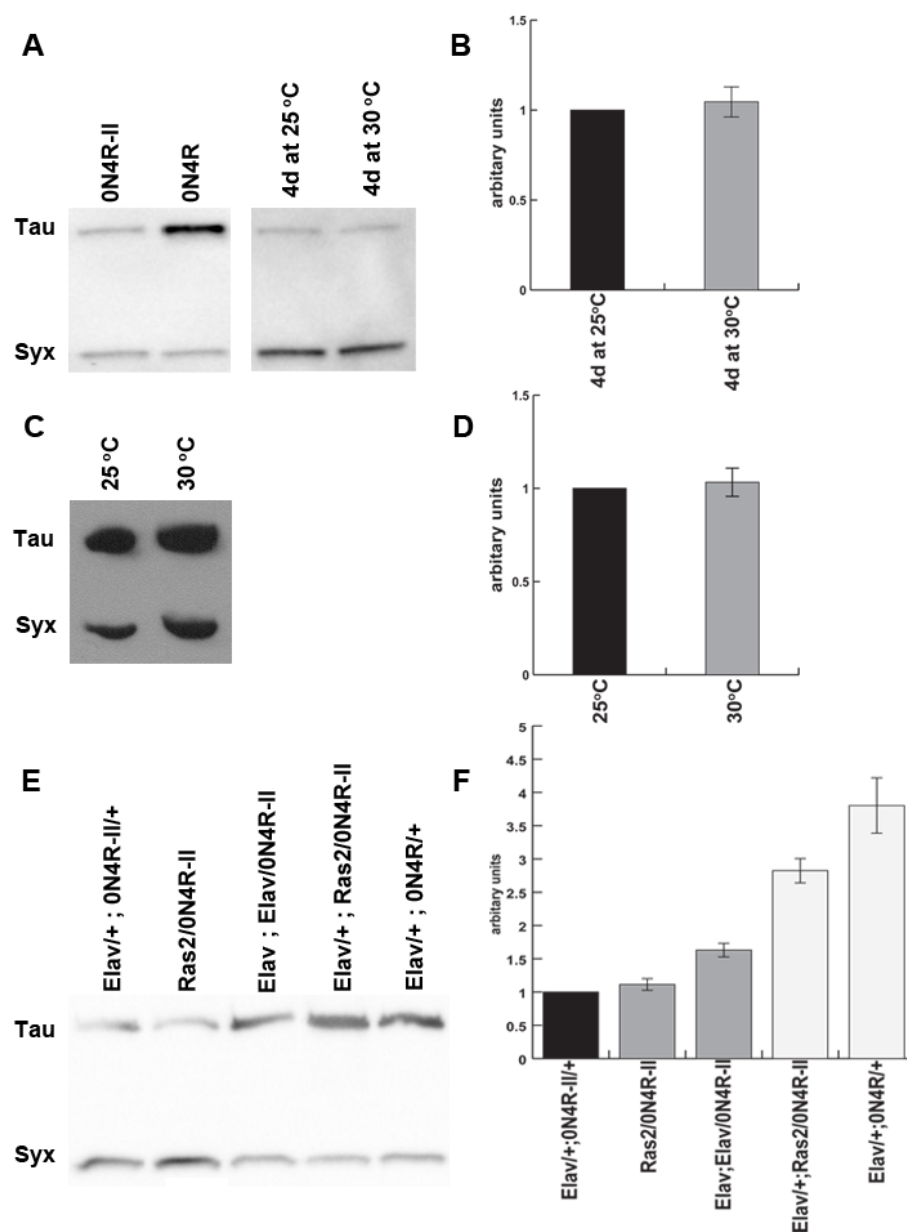
3.2.3. Η έκφραση της ON4R από διαφορετικούς παν-νευρωνικούς οδηγητές μπορεί να μεταβάλει την συσσώρευση της Tau

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα φαίνεται πως δεν παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του διαγονιδιακού στελέχους $h\tau a u^{ON4R-II}$ μέσω της θερμοκρασίας και έτσι επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί παν-νευρωνικοί οδηγητές της έκφρασης για να επιτευχθεί η επιθυμητή αύξηση και σταθεροποίηση στην συσσώρευση της Tau. Όταν η έκφραση του $h\tau a u^{ON4R-II}$ ελέγχεται παν-νευρωνικά από τον Ras2-Gal4, η συσσώρευση της πρωτεΐνης Tau δεν φαίνεται να μεταβάλλεται ($P = 0.9949$) (Εικόνα 2E-F). Ακόμα, όταν η έκφραση ελέγχεται από δύο αντίτυπα του Elav-Gal4 (μύγες με γενότυπο Elav/+;Elav/ON4R-II) η πρωτεΐνη που τελικά συσσωρεύεται είναι περισσότερη, συγκριτικά με την ολική πρωτεΐνη για τις μύγες Elav/+;ON4R-II/+ (Εικόνα 2E-F). Όταν όμως η έκφραση οδηγείται από τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4 η πρωτεΐνη που συσσωρεύεται είναι σχεδόν 2.8 φορές περισσότερη από την αντίστοιχη για τις μύγες ελέγχου και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P < 0.001$) και προσεγγίζει το επίπεδο συσσώρευσης για τις διαγονιδιακές μύγες ON4R (Εικόνα 2E-F).

Ο ίδιος χειρισμός φαίνεται να οδηγεί επίσης στην αύξηση του επιπέδου συσσώρευσης της πρωτεΐνης Tau κατά 2.2 φορές (Εικόνα 3A-B), και για ένα άλλο διαγονιδιακό στέλεχος, το $h\tau a u^{ON4R-III}$, το οποίο εμφανίζει επίσης χαμηλότερα επίπεδα συσσώρευσης σε σχέση με την $h\tau a u^{ON4R}$ (Εικόνα 3C), υποδεικνύοντας πως η χρήση του Elav-Gal4;Ras2-Gal4 φαίνεται να αυξάνει και να εξισώνει τα επίπεδα έκφρασης των σειρών που φέρουν το διαγονίδιο σε κάποια θέση ενσωμάτωσης attP. Βέβαια, επειδή η συσσώρευση της Tau για το διαγονιδιακό στέλεχος $h\tau a u^{ON4R-II}$ υπό τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4 είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη συσσώρευση της Tau για το στέλεχος $h\tau a u^{ON4R-III}$ επιλέχθηκε να γίνει χρήση του πρώτου διαγονιδίου στην παρούσα εργασία.

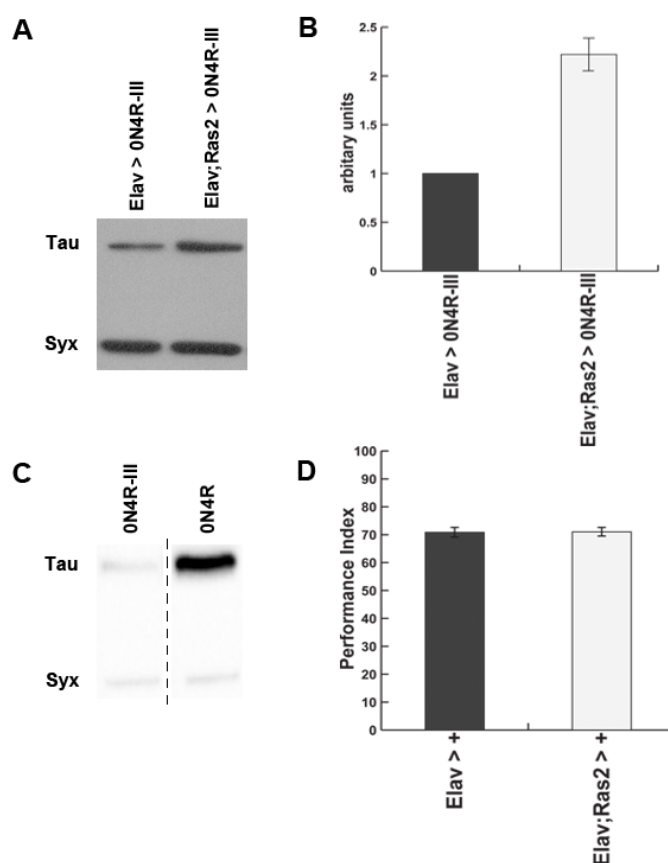
Ο διπλός αυτός παν-νευρωνικός οδηγητής της έκφρασης δεν έχει χαρακτηριστεί προηγουμένως και μιας και στα πλαίσια αυτής της εργασίας θα χρησιμοποιηθεί για να ελέγξει την έκφραση διαφορετικών διαγονιδίων σε ζώα τα οποία τελικά θα υποβληθούν σε έλεγχο της επίδοσης τους σε μια δοκιμασία οσφρητικής μάθησης, έπρεπε να προσδιοριστεί, αρχικά, αν οι ετεροζυγώτες για το Elav-Gal4;Ras2-Gal4 εμφανίζουν κάποια μεταβολή στο PI τους συγκριτικά με το έως τώρα χρησιμοποιούμενο Elav-Gal4. Δεν θα πρέπει να ξεχνάμε πως οι ομόζυγες θηλυκές μύγες για τον Elav-Gal4 εμφανίζουν μαθησιακά ελλείμματα (αδημοσίευτα δεδομένα, Skoulakis) και για αυτό επιλέχθηκε να δημιουργηθεί ο Elav-Gal4;Ras2-Gal4 ο οποίος και δεν φαίνεται να προκαλεί κάποιο μαθησιακό έλλειμμα

κατά την δοκιμασία οσφρητικής μάθησης (Εικόνα 3D). Συγκεντρώνοντας λοιπόν, όλα τα παραπάνω δεδομένα αποφασίστηκε να γίνει χρήση του Elav-Gal4;Ras2-Gal4 για την έκφραση των διαφορετικών διαγονιδίων που περιγράφονται σε αυτήν την εργασία καθώς επίσης και για όλες τις άλλες μελέτες που στοχεύουν στην παν-νευρωνική έκφραση διαγονιδίων που έχουν δημιουργηθεί μέσω ενσωμάτωσης τους εξωγενούς γενετικού υλικού σε κάποια attP θέση.



Εικόνα 2. Η χρήση του Elav-Gal4;Ras2-Gal4 εξισώνει τα επίπεδα συσσωμάτωσης της Tau μεταξύ της διαγονιδιακής σειράς $htau^{0N4R-II}$ και $htau^{0N4R}$. (A) Western Blot ανάλυση σε κεφάλια ζώων που εκφράζουν παν-νευρωνικά το διαγονίδιο της Tau που υποδεικνύεται αλλά και για δύο περιπτώσεις όπου εντοπίζεται η 0N4R-II σε κεφάλια ζώων που έχουν διατηρηθεί για τέσσερις μέρες στους 25°C και τους 30°C αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα 5A6 anti-Tau και την Syntaxin (Syx) για το έλεγχο του φορτώματος. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της 0N4R-II σε μύγες που διατηρούνται για 4 μέρες στους 25°C ή τους 30°C, αντίστοιχα. Ο μέσος λόγος των επιπέδων της 0N4R-II στις μύγες που διατηρήθηκαν στους 25°C σε σύγκριση με την ενδογενή Syx υπολογίστηκε σε τρία ανεξάρτητα διαλύματα ομογενοποιημένων κεφαλιών και διατηρεί την σχετική τιμή 1 (arbitrary unit 1). Ο μέσος λόγος της 0N4R-II στις μύγες που διατηρήθηκαν στους 30°C ως προς την Syx υπολογίστηκε επίσης και παρουσιάζεται μαζί με το standard error του ($\pm$ SEM). Τα επίπεδα της 0N4R-II στους 30°C για τέσσερις μέρες δεν φαίνεται να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από αυτά της 0N4R-II στους

25°C (Dunnett's test, $P = 0.7180$). (C) Ανοσοϊστοχημική ανάλυση κατά Western σε κεφάλια μυγών που εκφράζουν παν-νευρωνικά την Tau υπό την επίδραση δύο διαφορετικών θερμοκρασιών (25 και 30 °C) από τα πρώτα εμβρυικά στάδια τους μέχρι την ενηλικίωση, με την χρήση του αντισώματος 5A6 anti-tau και της Sych για την εξάλειψη σφαλμάτων φόρτωσης. (D) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της Tau σε σχέση με την Sych, όπως ακριβώς περιγράφεται παραπάνω. Ο μέσος όρος $\pm$ SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων παρουσιάζεται χωρίς να φαίνεται να υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των επιπέδων της Tau για τις δύο διαφορετικές συνθήκες ($P = 0.7685$). (E) Western blot ανάλυση επιλεγμένων γενοτύπων που υποδεικνύουν την αλλαγή των επιπέδων συσσώρευσης της Tau ανάλογα με τον παν-νευρωνικό οδηγητή που επιλέγεται να οδηγήσει την έκφραση της με την χρήση του αντισώματος 5A6 anti-Tau. (F) Συλλογική ποσοτικοποίηση των επιπέδων συσσώρευσης της Tau σε σχέση με την ενδογενή Sych όταν αυτή εκφράζεται από διαφορετικούς παν-νευρωνικούς οδηγητές αλλά και για διαφορετικά διαγονίδια. Η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης ON4R-II από τον Ras2-Gal4 αλλά και σε μύγες ομόζυγες για τον Elav-Gal4 δεν εμφανίζει στατιστική διαφορά από το επίπεδο ελέγχου που αποτελεί η συσσώρευση της Tau εκφραζόμενη από ένα αντίτυπο του Elav-Gal4. ($P = 0.9949$ και $P = 0.3134$ αντίστοιχα). Όταν, η ON4R-II εκφράζεται από τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4 η συσσώρευση της αυξάνεται κατά 2.8 φορές με την αύξηση αυτή να εμφανίζεται στατιστικά σημαντική ($P < 0.0001$), ενώ στατιστική διαφορά εμφανίζει και η συσσώρευση της Tau για το διαγονίδιο ON4R υπό τον έλεγχο του Elav-Gal4 ($P < 0.0001$).



Εικόνα 3. Η χρήση του Elav-Gal4;Ras-Gal4 φαίνεται να πολλαπλασιάζει την έκφραση και την συσσώρευση της Tau και για μια διαφορετική διαγονιδιακή σειρά. (A) Western blot ανάλυση σε ομογενοποιημένες κεφαλές ζώων που εκφράζουν παν-νευρωνικά το διαγονίδιο της Tau, ON4R-III χρησιμοποιώντας το αντίσωμα T46 anti-Tau και της Sych. (B) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της Tau σε μύγες που η έκφραση της ελέγχεται από τον Elav-Gal4 ή τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4. Ο μέσος λόγος του επιπέδου της Tau σε σχέση με την Sych προσδιορίστηκε για τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο της Tau στις μύγες που ελέγχουν την έκφραση της μέσω του Elav-Gal4;Ras2-Gal4 ήταν 2.2 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτό των μυγών που την εκφράζουν υπό τον Elav-Gal4 ($P < 0.0001$, Dunnett's test). (C) Western blot ανάλυση σε διαλύματα ομογενοποιημένων κεφαλών που εκφράζουν παν-νευρωνικά την htau^{HH587Fb} και την htau^{ON4R} υπό τον έλεγχο του Elav-Gal4;tub-Gal80^{ts} για 12 ημέρες χρησιμοποιώντας το αντίσωμα T46 anti-Tau. (D) Επίδοση στην μάθηση των ζώων που φέρουν ένα αντίγραφο του Elav-Gal4 και του Ras2-Gal4. Δείγμα ελέγχου αποτελούν οι Elav-Gal4/+ με τον μέσο $\pm$ SEM να υποδεικνύεται για $n > 8$ σε κάθε ομάδα. Δεν παρατηρείται στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($P = 0.9226$, Dunnett's test).

3.3. Η εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων για το διαγονιδιακό στέλεχος *htau*^{ON4R-II} φαίνεται να είναι ανεξάρτητη των επιπέδων συσσώρευσης της Tau.

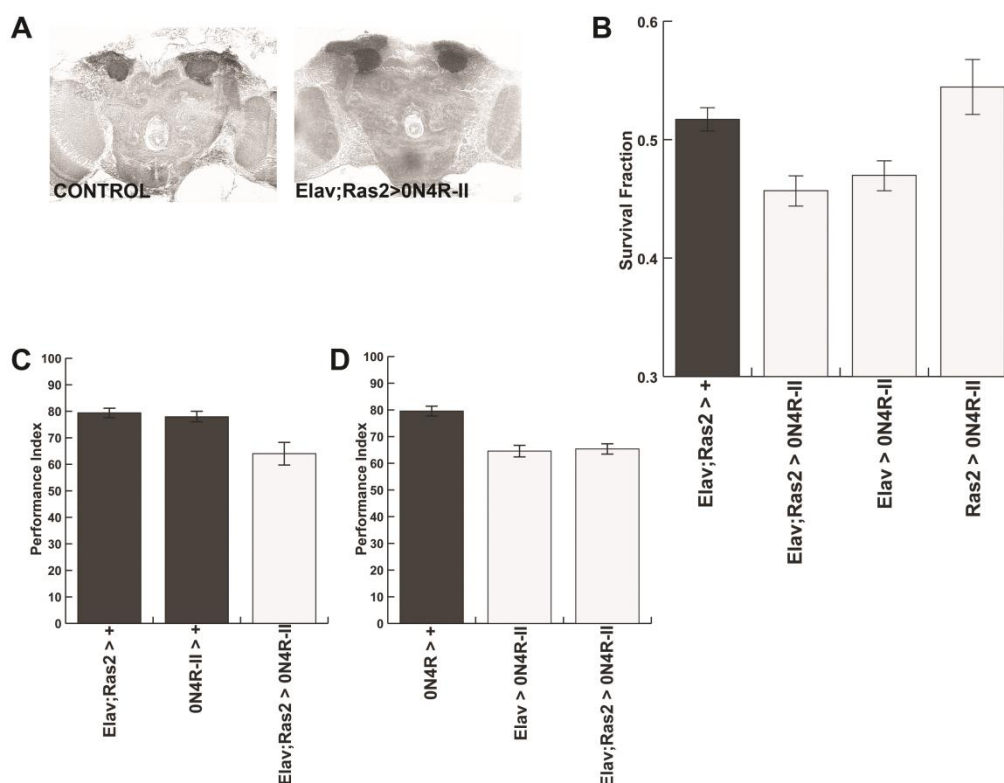
Παρότι η χρήση του διπλού οδηγητή της έκφρασης, *Elav-Gal4;Ras2-Gal4*, φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα συσσώρευσης της ON4R-II έως και τρεις φορές συγκριτικά με τον *Elav-Gal4* (Εικόνα 2F), η αύξηση αυτή της συσσώρευσης της Tau δεν είναι ικανή να προκαλέσει και πάλι το φαινότυπο απαλοιφής των MBs (Εικόνα 4A). Η μέση επιφάνεια που προκύπτει από την καταμέτρηση τουλάχιστον δέκα δομών καλύκων από διαφορετικές και ανεξάρτητες τομές κεφαλών για την ομάδα ελέγχου (*Elav/+;Ras2/+* μύγες) υπολογίζεται στα 0.1376 mm^2 ενώ για τους κάλυκες των μυγών που εκφράζουν την ON4R-II υπολογίζεται στα 0.1268 mm^2 , διαφορά που δεν χαρακτηρίζεται ως στατιστικά σημαντική ($P = 0.1716$, Dunnett's test). Η παρατήρηση αυτή, λοιπόν, ενισχύει την υπόθεση πως η παρουσία των MBs δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα συσσώρευσης της Tau αλλά από την χρονική στιγμή στην οποία η πρωτεΐνη θα αρχίσει να συσσωρεύεται στα νευρικά κύτταρα του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου της *Drosophila*.

Από την άλλη μεριά, η τοξικότητα της ON4R ισομορφής αναπαράγεται μέσω της ανάλυσης της θνησιμότητας που περιγράφεται στην ενότητα Μέθοδοι και Υλικά. Η έκφραση του ON4R-II διαγονιδίου από τον *Elav-Gal4;Ras2-Gal4* οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των ζώων που φτάνουν το ενήλικο στάδιο της ανάπτυξης τους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*Elav;Ras2 > +*) (Εικόνα 4B), όμως η μείωση αυτή δεν παρατηρήθηκε για τις μύγες που εκφράζουν την ON4R υπό τον *Elav-Gal4* ή τον *Ras2-Gal4*, οι οποίοι οδηγούν σε χαμηλότερη συσσώρευση της Tau, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Είναι λοιπόν πιθανό, να χρειάζεται η συνδυαστική έκφραση της ON4R στα διαφορετικά υποσύνολα κύτταρων στα οποία εκφράζονται οι *Elav-Gal4* και *Ras2-Gal4* για να προκληθεί θνησιμότητα ή απλά όσο υψηλότερη είναι η συσσώρευσης της τοξικής για τα νευρικά κύτταρα ON4R τόσο πιθανότερο είναι τα ζώα αυτά να μην καταφέρουν φτάσουν την ενηλικίωση και για αυτό να παρατηρείται θνησιμότητα μόνο για την ομάδα των *Elav;Ras2 > ON4R-II* ζώων (Εικόνα 4B).

Σε ότι αφορά την επίδοση των ζώων που εκφράζουν την ON4R-II υπό τον *Elav-Gal4;Ras2-Gal4* στην δοκιμασία εξαρτημένης οσφρητικής μάθησης, το μαθησιακό έλλειμμα που περιγράφεται για την ON4R ισομορφή¹⁸ αναπαράγεται και για αυτόν τον παν-νευρωνικό διπλό οδηγητή της έκφρασης (Εικόνα 4C), όπως αναμένονταν. Η αύξηση όμως της συσσώρευσης της ON4R-II που περιγράφεται μέσω της χρήσης του *Elav-Gal4;Ras2-Gal4* δεν φαίνεται να οδηγεί σε επιδείνωση των μαθησιακών ελλειμμάτων μιας και η τιμή των PI για τις δύο ομάδες ζώων (*Elav > ON4R-II* και *Elav;Ras2 > ON4R-II*) είναι η ίδια (Εικόνα 4D), καθιστώντας σαφές πως η εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων είναι ανεξάρτητη των επιπέδων συσσώρευσης της ON4R στο νευρικό σύστημα της *Drosophila* και κάποιο άλλο χαρακτηριστικό της παθογένειας αυτής της πρωτεΐνης είναι που τα προκαλεί.

Φαίνεται, λοιπόν, πως από τους φαινοτύπους που περιγράφονται παραπάνω και επιλέχθηκαν για να αξιολογηθεί η τοξικότητα της Tau στο νευρικό σύστημα της *Drosophila*, ορισμένοι από αυτούς εξαρτώνται από τα επίπεδα συσσώρευσης της Tau καθώς και το υποσύνολο των κυττάρων που θα οδηγηθεί η συσσώρευσης της, ενώ άλλοι είναι ανεξάρτητοι αυτών. Έτσι, η απώλεια των MBs δεν ήταν δυνατόν να αναπαραχθεί ούτε όταν η έκφραση της ON4R-II ελέγχεται από τον *Elav-Gal4* ούτε από τον *Elav-Gal4;Ras2-Gal4*. Από

την άλλη μεριά, η θνησιμότητα των ζώων που εκφράζουν την ON4R αλλά και η τοξικότητα της Ταυ για το περιφερικό σύστημα επηρεάζονται από τα επίπεδα συσσώρευσης της Ταυ. Τέλος, τα μαθησιακά ελλείμματα που περιγράφονται για την ON4R όταν αυτή εκφράζεται παν-νευρωνικά φαίνεται να είναι ανεξάρτητα της συσσώρευσης της Ταυ ή των κυττάρων στα οποία συσσωρεύεται.



Εικόνα 4. Η εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων για το διαγονιδιακό στέλεχος $htau^{ON4R-II}$ φαίνεται να είναι ανεξάρτητη της συσσώρευσης της Ταυ. (A) Μονιμοποιημένες σε διάλυμα Carnoy's μετωπιαίες τομές παραφίνης που έχουν υποβληθεί σε χρώση με anti-Lewy στο επίπεδο των δενδριτών των MBs για τα δείγματα ελέγχου (control Elav;Ras2/+) και για μύγες που εκφράζουν το διαγονίδιο ON4R-II. (B) Λόγος του αριθμού των αρσενικών ζώων που φτάνουν στο ενήλικο στάδιο της ανάπτυξης της *Drosophila* ενώ συσσωρεύουν την ON4R παν-νευρωνικά προς το σύνολο των αρσενικών ζώων που προκύπτουν από την διασταύρωση παρθένων θηλυκών ζώων γενотύπου Elav-Gal4;Ras2-Gal4/Cygo ή Elav-Gal4;ON4R-II/Cygo με αρσενικά ζώα γενотύπου ON4R-II. Ως λόγος ελέγχου υπολογίζεται αυτός των αρσενικών ζώων Elav-Gal4;Ras2/+ προς το σύνολο των αρσενικών που προκύπτουν από την διασταύρωση παρθένων θηλυκών Elav-Gal4;Ras2-Gal4/Cygo με αρσενικές μύγες W1118. Ο μέσος $\pm$ SEM υποδεικνύεται για $n > 6$ σε κάθε ομάδα και οι στατιστικές διαφορές προσδιορίζονται με Dunnett's test για κάθε ομάδα όπου και σημειώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του λόγου των Elav;Ras2>ON4R-II ζώων προς την ομάδα ελέγχου ($P = 0.0170$). (C) Απόδοση στην μάθηση σε μύγες που συσσωρεύουν παν-νευρωνικά την ON4R. Δείγματα ελέγχου (σκουρόχρωμες μπάρες) αποτελούν οι Elav-Gal4/+;Ras2-Gal4/+ ετεροζυγότες (Elav;Ras2 > +) και οι ετεροζυγότες για το διαγονίδιο (ON4R-II > +). ο μέσος $\pm$ SEM υποδεικνύεται για $n > 9$ σε κάθε ομάδα. Οι στατιστικές διαφορές προσδιορίζονται με Dunnett's test για κάθε ομάδα με στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.001$) να προσδιορίζεται μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και των πειραματικών δειγμάτων για την ON4R όταν εκφράζεται υπό τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4. (D) Σύγκριση της επίδοσης της ομάδας των ζώων που εκφράζουν παν-νευρωνικά την ON4R-II υπό τον Elav-Gal4 και αυτής που την εκφράζουν υπό τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4 όπως προκύπτουν από τα δύο ανεξάρτητα πειράματα που περιγράφονται στην Εικόνα 1C και στην Εικόνα 4C έχοντας υπολογίσει το λόγο κανονικοποίησης για την ομάδα ON4R-II > + (λόγος της μέσης τιμής της απόδοσης των δύο ομάδων) η οποία εμφανίζεται και για στα δύο πειράματα και κατόπιν για την ομάδα Elav-Gal4;Ras2-Gal4 > ON4R-II οι τιμές της απόδοσης έχουν πολλαπλασιαστεί με την τιμή του λόγου κανονικοποίησης. Το μηχανιστικό γράφημα που προκύπτει έτσι υποδεικνύει πως δεν περιγράφεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων Elav-Gal4 > ON4R-II και Elav-Gal4;Ras2-Gal4 > ON4R-II ($P = 0.7820$, Student's test).

3.4. Τα αλληλόμορφα των Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶² εμφανίζουν το φαινότυπο των αδρών οφθαλμών όχι όμως αυτόν της απώλειας των MBs

Η σύγκριση μεταξύ διαγονιδιακών στελεχών που φέρουν διαφορετικά αλληλόμορφα της Ταυ είναι δυνατή μόνο όταν τα διαφορετικά διαγονίδια βρίσκονται στην ίδια θέση του γενετικού υλικού της *Drosophila*. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να δημιουργηθούν τα διαγονίδια που περιγράφονται στην παρούσα εργασία στην ίδια attP θέση. Όμως, περάν αυτού θα πρέπει να εκφράζονται και σε παρόμοια επίπεδα και η έκφραση τους να είναι συγκρίσιμη με αυτή των διαγονιδίων που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος. Το σύνολο των δεδομένων που περιγράφονται παραπάνω υποδεικνύει πως η χρήση του Elav-Gal4; Ras2-Gal4 για την παν-νευρωνική έκφραση των διαγονιδίων καλύπτει τις παραπάνω απαιτήσεις και έτσι μας επιτρέπει να προχωρήσουμε στον προσδιορισμό του ρόλου των μεταλλάξεων της ON4R για τις Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶².

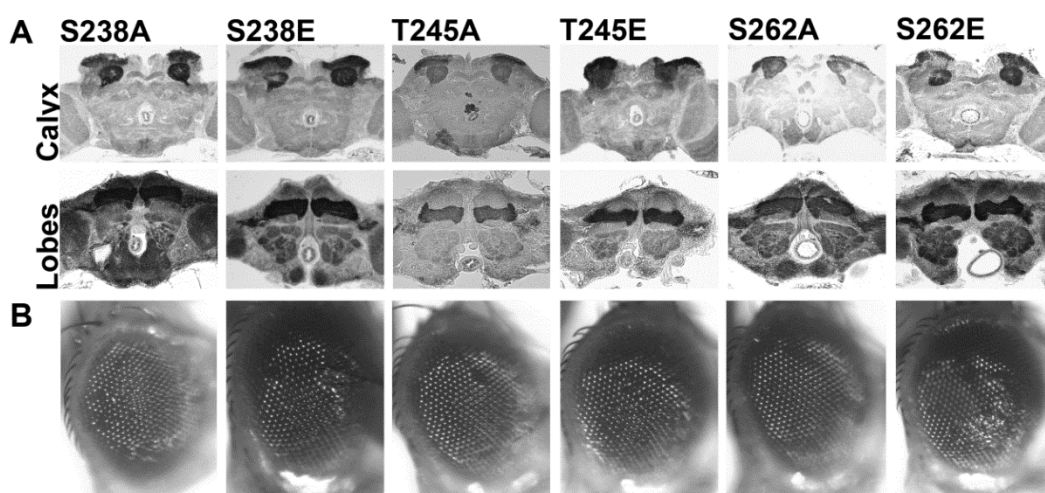
Εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση των Ser²³⁸ και Thr²⁴⁵ μέσω αντικατάστασης τους σε αλανίνη εξαλείφεται η τοξικότητα της Ταυ, ενώ ταυτόχρονα τα ζώα αυτά παρουσιάζουν έκπτωση στην δημιουργία εξαρτημένης μάθησης³. Μάλιστα, η Ser²³⁸ φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα της ON4R² όμως δεν έχει διερευνηθεί η συμμετοχή της δεύτερης θέσης φωσφορυλίωσης που εμφανίζεται μεταλλαγμένη στο htau^{FLAG-2N4RSTA} διαγονίδιο. Η Thr²⁴⁵ εντοπίζεται φωσφορυλιωμένη σε φυσιολογικούς εγκεφάλους^{33,34} και συνεπώς το μπλοκάρισμα της φωσφορυλίωσης αυτής ίσως να αποτελεί μια τροποποίηση που να επιδεινώνει την παθογένεια της Ταυ. Για να διερευνηθεί η συμμετοχή των συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης σε κάποιον φαινότυπο τοξικότητας ή δυσλειτουργίας της Ταυ χρησιμοποιήθηκαν διαγονίδια της ON4R στα οποία είτε έχει μπλοκαριστεί η φωσφορυλίωση για τις Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ ή Ser²⁶² ανεξάρτητα (φωσφό-ανθεκτικά αλληλόμορφα), είτε έχουν ψευδό-φωσφορυλιωθεί (φωσφό-μμητικά αλληλόμορφα).

Όπως και για το διαγονιδιακό στέλεχος αγρίου τύπου της ON4R, έτσι και για όλα τα αλληλόμορφα της, οι δομές των MBs, τόσο στο επίπεδο των δενδριτών όσο και σε αυτό των αξόνων των νευρικών κυττάρων τους, δεν βρέθηκαν να επηρεάζονται από την συσσώρευση κάποιου από αυτά (Εικόνα 4A). Μάλιστα, η παρατήρηση πως για έξι ακόμα διαγονιδιακά στελέχη της ON4R δεν προκαλείται η απαλοιφή των MBs, ενισχύει την υπόθεση πως για να εμφανιστεί ο φαινότυπος αυτός θα πρέπει η Ταυ να εκφράζεται νωρίς κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος της *Drosophila*.

Αντίθετα, σε ότι αφορά την τοξικότητα των μεταλλαγμένων μορφών της ON4R για το περιφερικό νευρικό σύστημα και για τους έξι διαφορετικούς γενοτύπους είναι εμφανής η διαταραχή της ομαλής οργάνωσης αλλά και της μορφολογίας των οματιδίων δίνοντας έτσι το φαινότυπο των αδρών οφθαλμών (Εικόνα 4B). Μάλιστα φαίνεται να εντοπίζεται μια διαφορά ως προς την ένταση του εκφυλισμού του εξωτερικού χιτώνα του οφθαλμού, με το αλληλόμορφο S262E να εμφανίζει την πιο έντονη τοξικότητα για τους οφθαλμούς (Εικόνα 4B).

3.5. Η διατήρηση της φωσφορυλίωσης της Ser²⁶² είναι απαραίτητη για τα Ταυ-εξαρτώμενα μαθησιακά ελλείμματα όχι όμως αυτή της Thr²⁴⁵

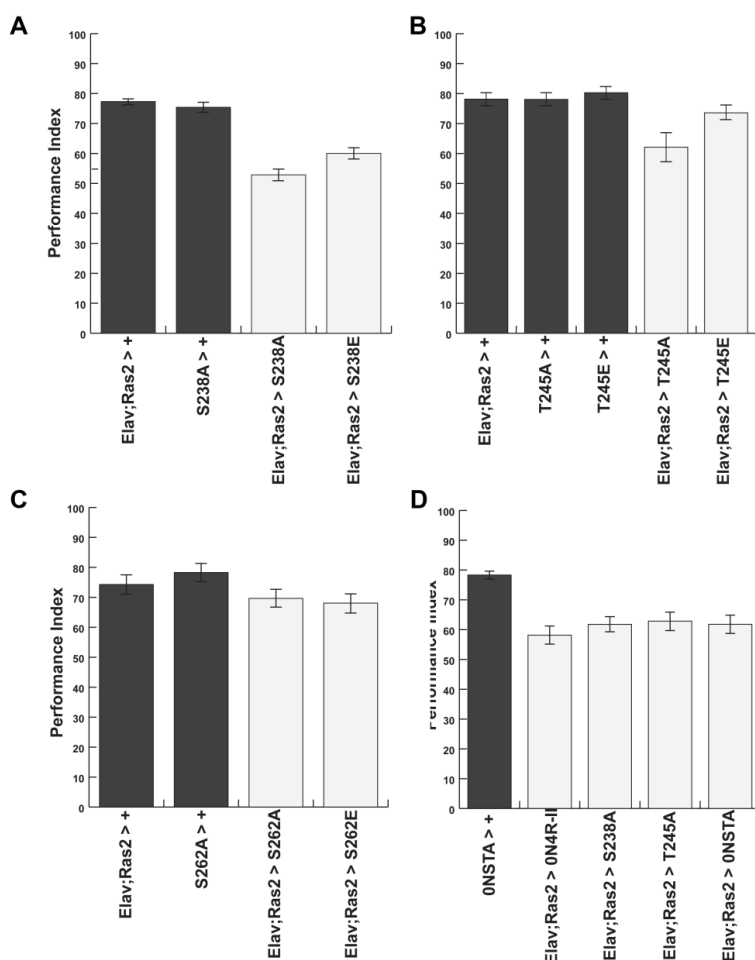
Η φωσφορυλίωση της Ser²⁶² έχει βρεθεί να συνδέεται με τα Ταυ-εξαρτώμενα μαθησιακά ελλείμματα μιας και η μετάλλαξη της εν λόγω θέσης φωσφορυλίωσης σε αλανίνη οδηγεί σε εξάλειψη τους². Ακόμα, το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από την απουσία αυτών των ελλειμμάτων σε δύο επιπλέον αλληλόμορφα, όπου Ser²⁶² είναι μπλοκαρισμένη, τα 2NS2A και RWS2A³. Παράλληλα, το μεταλλαγμένο διαγονίδιο htau^{FLAG-2N4RSTA} εμφανίζει φωσφορυλιωμένη την Ser²⁶² και παρουσιάζει τα μαθησιακά ελλείμματα³. Έτσι, ελέγχθηκε αν η διαφορετική διαγονιδιακή σειρά του αλληλομόρφου S262A που περιγράφεται στην παρούσα εργασία αναπαράγει τα αποτελέσματα αυτά, και ταυτόχρονα εξετάστηκε ο ενδεχόμενος ρόλος των δύο θέσεων φωσφορυλίωσης του STA αλληλομόρφου στην ταυ-εξαρτώμενη μαθησιακή έκπτωση.



Εικόνα 5. Έλεγχος της τοξικότητας της ON4R για τα μεταλλαγμένα διαγονίδια των Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶² στα νευρικά κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος της *Drosophila* (A) Μονιμοποιημένες σε διάλυμα Carnoy's μετωπιαίες τομές παραφίνης που έχουν υποβληθεί σε χρώση με anti-Leo στο επίπεδο των δενδριτών (Calyx) και των αξόνων των MBs (Lobes) για τα διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν το υποδεικνύον αλληλόμορφο της ON4R. Σε όλες τις περιπτώσεις οι δομές των MBs τόσο για τους δενδρίτες όσο και τους άξονες των νευρικών κυττάρων τους είναι άθικτες. (B) Τοξικότητα των αντίστοιχων μεταλλαγμένων μορφών της ON4R για τους οφθαλμούς των διαγονιδιακών ζώων όταν το διαγονίδιο εκφράζεται υπό τον έλεγχο του GMR-Gal4. Οι οφθαλμοί για όλους τους γενοτύπους εμφανίζουν ανωμαλία στην οργάνωση και μορφολογία των οματιδίων δίνοντας τον χαρακτηριστικό φαινότυπο των αδρών οφθαλμών.

Το αλληλόμορφο S262A βρέθηκε να εξαλείφει τα μαθησιακά ελλείμματα που παρατηρούνται στα διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την ON4R ενώ ταυτόχρονα δεν προσδιορίστηκε μαθησιακό έλλειμμα ούτε για το αλληλόμορφο S262E (Εικόνα 5C). Η παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης της Thr²⁴⁵ στο αλληλόμορφο T245A βρέθηκε να προκαλεί μείωση της μαθησιακής απόδοσης των διαγονιδιακών ζώων, ενώ αντίθετα η αντικατάσταση της θρεονίνης αυτής σε γλουταμινικό οξύ, στο αλληλόμορφο T245E, απομακρύνει τα Ταυ-εξαρτώμενα μαθησιακά ελλείμματα (Εικόνα 5B) ενισχύοντας την υπόθεση πως μια φυσιολογικά φωσφορυλιωμένη θέση όπως αυτή της Thr²⁴⁵ μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια της Ταυ περιορίζοντας την. Ακόμα, τα

αλληλόμορφα S238A και S238E δεν φαίνεται να μεταβάλλουν την εμφάνιση των μαθησιακών δυσκολιών που περιγράφονται για την ON4R.



Εικόνα 6. Το μπλοκάρισμα της φωσφορυλίωσης της Thr²⁴⁵ οδηγεί σε μαθησιακό έλλειμμα ενώ αντίθετα η διατήρηση της φωσφορυλίωσης στην Ser²⁶² χρειάζεται για το ταυ-εξαρτώμενο μαθησιακό έλλειμμα. (A-C) Μαθησιακή επίδοση σε μύγες που συσσωρεύουν παν-νευρωνικά τις μεταλλάξεις της ON4R για την Ser²³⁸ (A), την Thr²⁴⁵ (B) και την Ser²⁶² (C). Δείγματα ελέγχου (σκουρόχρωμες μπάρες) αποτελούν οι ElavGal4/+;Ras2Gal4/+ ετεροζυγώτες (Elav;Ras2 > +) και οι ετεροζυγώτες για το διαγονίδιο (S238A > +, T245A > +, T245E > +, S262A > +). Ο μέσος $\pm$ SEM υποδεικνύεται για n > 9 σε κάθε ομάδα. Οι στατιστικές διαφορές προσδιορίζονται με Dunnett's test για κάθε ομάδα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές (P < 0.001) μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και το πειραματικών δειγμάτων προσδιορίστηκαν για τα διαγονίδια S238A, S238E και T245A όταν εκφράζονται υπό τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4 όχι όμως για τα διαγονίδια T245E, S262A και S262E όταν εκφράζονται υπό τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4 (P = 0.6115, P = 0.5420 και P = 0.2965, αντίστοιχα). (D) Επίδοση στην μάθηση για τις μύγες που συσσωρεύουν την ON4R παν-νευρωνικά υπό τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4 και τις μεταλλάξεις της σε αλανίνη στην Ser²³⁸ (S238A) ή την Thr²⁴⁵ (T245A) ή και τις δύο μαζί (ONSTA). Δείγμα ελέγχου αποτελούν οι ετεροζυγώτες για το διαγονίδιο ONSTA (ONSTA > +) και ο μέσος $\pm$ SEM υποδεικνύεται και εδώ για n > 9 σε κάθε ομάδα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επίδοση παρατηρείται για όλες τις υπο εξέταση ομάδες, ON4R-II, S238A, T245A και ONSTA μέσω Dunnett's test συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (P < 0.0001, P = 0.0008, P = 0.0014 και P = 0.0006 αντίστοιχα), δεν παρατηρούνται όμως μεταξύ αυτών μέσω ανάλυσης Student's test.

Τέλος, για να επιβεβαιωθεί η διατήρηση των μαθησιακών ελλειμμάτων για τα διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή της ON4R και στην Ser²³⁸ και στην Thr²⁴⁵ ταυτόχρονα, όπως περιγράφεται από τον Kosmidis και τους συνεργάτες του³ για το htau^{FLAG-2N4RSTA}, κατασκευάσαμε ένα νέο διαγονιδιακό στέλεχος το οποίο φέρει την ON4R ισομορφή όπου έχει υποστεί αντικατάσταση των Ser²³⁸ και Thr²⁴⁵ σε αλανίνη (htau^{ON4R-STA})

στην ίδια attP θέση με τα άλλα διαγονίδια που περιγράφονται στην παρούσα εργασία. Όταν, λοιπόν, τα ζώα που εκφράζουν παν-νευρωνικά την ON4R-STA υπό τον Elav-Gal4;Ras2-Gal4, εξετάστηκαν ως προς την επίδοση τους σε μια δοκιμασία οσφρητικής μάθησης, βρέθηκαν να διατηρούν το μαθησιακό έλλειμμα που περιγράφεται για την ON4R (Εικόνα 6D). Μάλιστα, στο παρόν πείραμα εξετάστηκαν ταυτόχρονα τα ζώα που εκφράζουν την αγρίου τύπου ισομορφή της ON4R αλλά και τα αλληλόμορφα S238A και T245A με σκοπό να προσδιοριστούν τυχόν διαφορές μεταξύ αυτών, κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε (Εικόνα 6D).

3.6. Φώσφο-αποτύπωμα των μεταλλάξεων για τις Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶² σε άλλους παθογενείς επιτόπους της Tau

Η τροποποίηση συγκεκριμένων καταλοίπων φωσφορυλίωσης έχει βρεθεί να ελέγχει την φωσφορυλίωση συγκεκριμένων απομακρυσμένων θέσεων ³⁵. Έτσι, το μπλοκάρισμα της φωσφορυλίωσης της Ser²⁶², μέσω αντικατάστασης της από αλανίνη, οδηγεί σε μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης διαφόρων απομακρυσμένων επιτόπων ², ενώ η ταυτόχρονη αντικατάσταση των Ser²³⁸ και Thr²⁴⁵ από αλανίνη προκαλεί μια συνολική αύξηση της φωσφορυλίωσης για πολλούς επιτόπους που συνδέονται με την νόσο του Alzheimer's ³. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε κατά πόσο η αντικατάσταση των Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶² επηρεάζει την φωσφορυλίωση άλλων θέσεων που έχουν βρεθεί φωσφορυλιώμενες σε ασθενείς με Alzheimer's περιλαμβάνοντας τις pSer²⁰²/pThr²⁰⁵ (AT8), pThr²¹²/pSer²¹⁴ (AT100), pS262 και pS396. Το αντίσωμα AT100 αναγνωρίζει ζευγαρωμένες-ελικοειδείς-νηματοειδείς δομές της Tau (PHFs) και χρησιμοποιείται σε ιστολογικές αναλύσεις ³⁶ με την υπερφωσφορυλίωση των επιτόπων pThr²¹²/pSer²¹⁴ να σχετίζεται με νευροεκφύλιση στον άνθρωπο ¹¹. Η ίδια σύνδεση έχει περιγραφεί και για τους επιτόπους που αναγνωρίζει το αντίσωμα AT8. Τέλος, η φωσφορυλίωση στην Ser³⁹⁶ περιγράφεται ως ένα από τα πρώτα γεγονότα που συμβαίνουν στην Tau και οδηγούν στον σχηματισμό ανώμαλων δομών που εντοπίζονται στα νευροϊνιδιακά δεμάτια ³⁷.

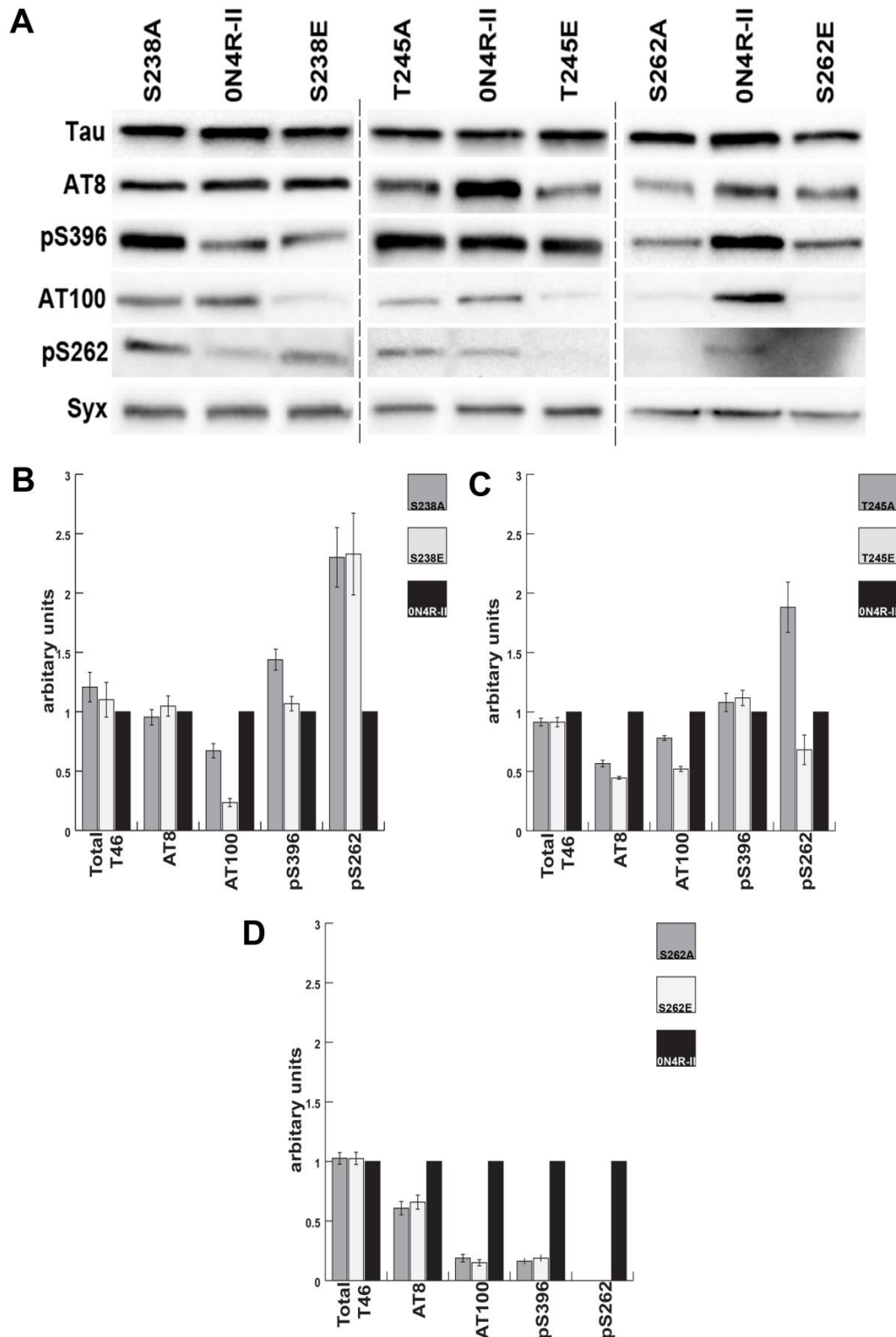
Τα επίπεδα της συσσώρευσης της Tau και για τις επτά διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές φαίνεται να είναι η ίδια όπως προσδιορίστηκε από το φώσφο-ανεξάρτητο αντίσωμα T46 (Εικόνα 6A, Tau) και ποσοτικοποιήθηκε στην Εικόνα 6B, 6C και 6D. Τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης και για τα δύο αλληλόμορφα όπου η Ser²⁶² έχει υποστεί αντικατάσταση (S262A και S262E) για όλους τους επιτόπους που ελέχθησαν βρέθηκαν στατιστικά μειωμένα συγκριτικά με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της αγρίου τύπου ON4R (Εικόνα 6A και 6D). Για το αποτύπωμα του AT8 η μείωση της φωσφορυλίωσης είναι 40% (P = 0.0009 και P = 0.0044 για τα S262A και S262E, αντίστοιχα) ενώ φτάνει το 80% για τους επιτόπους που αναγνωρίζουν τα AT100 και το pS396 (P < 0.0001 και για τα δύο αλληλόμορφα, S262A και S262E και για τα δύο αντισώματα που περιγράφονται). Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, η αντίδραση με το αντίσωμα που αναγνωρίζει την φωσφορυλίωση στην Ser²⁶² (Εικόνα 6A, pS262) δεν δίνει ανοσοαποτύπωμα για το αλληλόμορφο S262A και το S262E. Τα ευρήματα αυτά ταυτίζονται με την μείωση της φωσφορυλίωσης που έχει παρατηρηθεί και σε άλλη ανεξάρτητη διαγονιδιακή σειρά και επιβεβαιώνει την υπόθεση πως η Ser²⁶² δρα ως θεματοφύλακας ελέγχοντας την φωσφορυλίωση άλλων επιτόπων που μεσολαβούν την τοξικότητα της Tau στην Drosophila ².

Αναφορικά με τη φωσφορυλίωση των επιτόπων που αναγνωρίζει το αντίσωμα AT8 δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά σε σχέση με την φωσφορυλίωση της ON4R στα αλληλόμορφα S238A και S238E ($P = 0.9123$ και $P = 0.9006$, αντίστοιχα) (Εικόνα 6A και 6B), είναι όμως περίπου 40% και 60% υποφωσφορυλιωμένοι στα αλληλόμορφα T245A και T245E αντίστοιχα ($P < 0.0001$ και $P < 0.0001$, αντίστοιχα) (Εικόνα 6A και 6C). Η φωσφορυλίωση στους επιτόπους του AT100 βρέθηκε, επίσης, υποφωσφορυλιωμένη σε όλα τα αλληλόμορφα για την Ser²³⁸ και Thr²⁴⁵ (30% μειωμένη στο S238A, $P = 0.0002$, 80% μειωμένη στο S238E, $P < 0.0001$, 20% μειωμένη στο T245A, $P = 0.0064$ και 50% μειωμένη στο T245E, $P < 0.0001$) (Εικόνα 6A-C). Σε ότι αφορά την φωσφορυλίωση της Ser³⁹⁶ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα της για τα αλληλόμορφα T245A, T245E και S238E ($P = 0.6730$, $P = 0.4444$ και $P = 0.8466$, αντίστοιχα) παρατηρείται όμως μια υπερφωσφορυλίωση της για το αλληλόμορφο S238A ($P = 0.0159$ Dunnett's test) (Εικόνα 6A-C). Τέλος, τα ευρήματα για την φωσφορυλίωση της Ser²⁶² υποδεικνύουν πως για τα αλληλόμορφα S238A, S238E και T245A η κάλυψη του καταλοίπου αυτού ξεπερνά την αντίστοιχη για την αγρίου τύπου ON4R, αφού βρέθηκε σχεδόν 2.3 φορές υψηλότερη για τα S238A και S238E με την διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($P = 0.0024$ και $P = 0.0043$ αντίστοιχα) ενώ για το T245A η κάλυψη ήταν 2 φορές υψηλότερη ($P = 0.0056$) (Εικόνα 6A-C). Από το σύνολο των παραπάνω παρατηρήσεων προκύπτει πως η Thr²⁴⁵ επηρεάζει την φωσφορυλίωση των επιτόπων που αναγνωρίζουν τα AT8 και AT100 και όχι του pS396, μιας και το μπλοκάρισμα της οδηγεί στην μείωση της φωσφορυλίωσης των δύο αλλά όχι του τρίτου. Από την άλλη μεριά, η διατήρηση της φωσφορυλίωσης στην Ser²³⁸ χρειάζεται ώστε να διατηρηθεί η φωσφορυλίωση της Ser³⁹⁶ στα επίπεδα της ON4R.

4. Συζήτηση

Για να προσδιοριστούν οι θέσεις φωσφορυλίωσης που συμμετέχουν στην τοξικότητα της Ταυ έχει δημιουργηθεί ένα σύνολο διαγονιδιακών στελεχών που εκφράζουν διαφορετικά αλληλόμορφα της ON4R hTau ισομορφής όπου κάθε ένα έχει υποστεί αντικαταστάσεις μιας ή δύο Ser/Thr από το φώσφο-ανθεκτικό αμινοξύ αλανίνη¹⁵. Παρόλα αυτά, δεν φαίνεται να προκαλείται μείωση της τοξικότητας σε αυτά τα φώσφο-ανθεκτικά αλληλόμορφα της ON4R htau, όταν η τοξικότητα αξιολογείται μόνο μέσω του εκφυλισμού του εξωτερικού χιτώνα του οφθαλμού, και τα μόνα εμφανή αποτελέσματα που παρατηρούνται αφορούν ένα διαγονιδιακό στέλεχος όπου 14 Ser και Thr έχουν αντικατασταθεί ταυτόχρονα (htau^{AP})³⁸. Παράλληλα, η ψευδό-φωσφορυλίωση των 14 αυτών καταλοίπων, μέσω αντικατάστασής τους από γλουταμινικό οξύ (htau^{E14}) οδηγεί στην αύξηση της τοξικότητας^{39,40} υποδεικνύοντας πως η συνεργατικότητα πολλών θέσεων φωσφορυλίωσης μεσολαβεί την τοξικότητα της Ταυ. Πρόσφατα, όμως, το εργαστήριο μας συγκέντρωσε δεδομένα πως η ταυτόχρονη αντικατάσταση των Ser²³⁸ και Thr²⁴⁵ (htau^{FLAG-2N4RSTA}) οδηγεί σε απώλεια της τοξικότητας της ON4R, όταν εξετάζεται ιστολογικά η δομή των MBs, η οποία και παραμένει ανεπηρέαστη, παρόλα αυτά τα ζώα αυτά εμφανίζουν δυσλειτουργία στις δοκιμασίες οσφρητικής μάθησης³. Παράλληλα η αντικατάσταση της Ser²⁶² από αλανίνη εξαλείφει το μαθησιακό έλλειμμα που προκαλεί η ON4R² συνδέοντας έτσι συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης με συγκεκριμένους φαινοτύπους τοξικότητας

της Ταυ και ενισχύοντας την υπόθεση πως η φωσφορυλίωση για συγκεκριμένα κατάλοιπα και όχι η υπερφωσφορυλίωση της Ταυ αυτή καθ' αυτή, μεσολαβεί την τοξικότητα της.



Εικόνα 7. (Α) Ανοσοαποτύπωμα WB που αναπαριστά την κάλυψη των φώσφο-επιτόπων που υποδεικνύονται σε διαλύματα ομογενοποιημένων κεφαλών μυγών που εκφράζουν παν-νευρωνικά το αλληλόμορφο της Ταυ που

επίσης υποδεικνύεται. Τα επίπεδα της Ταυ αναγνωρίζονται μέσω του αντισώματος T46 ενώ η Sych χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου. (B) Ποσοτικοποίηση του επιπέδου φωσφορυλίωσης των αλληλομόρφων S238A και S238E ως προς την ON4R-II. Ο μέσος λόγος του επιπέδου της φωσφορυλίωσης του κάθε αλληλομόρφου υπολογίζεται ως προς την ενδογενή Sych και αυτός χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο λόγος ως προς την ON4R-II και αναπαριστάται μαζί με την $\pm$ SEM. Ο μέσος $\pm$ SEM προκύπτει από τουλάχιστον έξι ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο της φωσφορυλίωσης για τους επιτόπους που αναγνωρίζει το AT100 ήταν στατιστικά χαμηλότερα και για τα δύο αλληλομόρφα S238A και S238E ($P = 0.0002$ και $P < 0.0001$, Dunnett's test, αντίστοιχα), η φωσφορυλίωση για την Ser³⁹⁶ ήταν υψηλότερη για το αλληλόμορφο S238A ($P = 0.0159$, Dunnett's test) και η φωσφορυλίωση για την Ser²⁶² υψηλότερη και για τα δύο αλληλομόρφα ($P = 0.0024$ για το S238A και $P = 0.0043$ για το S238E, Dunnett's test). (C) Ποσοτικοποίηση του επιπέδου φωσφορυλίωσης των αλληλομόρφων T245A και T245E ως προς την ON4R-II. Ο μέσος λόγος της κάλυψης και ο $\pm$ SEM υπολογίζεται όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα αλληλομόρφα T245A και T245E αναγνωρίζονται υποφωσφορυλιωμένα για το AT8 ($P < 0.0001$ και $P < 0.0001$, αντίστοιχα, Dunnett's test) και το AT100 ($P = 0.0064$ και $P < 0.0001$ αντίστοιχα, Dunnett's test). Για το αντίσωμα pS262 βρέθηκε διαφορά μεταξύ των δύο αλληλομόρφων με το T245A να αναγνωρίζεται υπερφωσφορυλιωμένο σε σχέση με την ON4R ($P = 0.0056$, Dunnett's test) και το T245E όχι. (D) Ομοίως, ποσοτικοποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των αλληλομόρφων S262A και S262E ως προς την ON4R-II. Το επίπεδο κάλυψης του AT8 μειώνεται στατιστικά σημαντικά και για τα δύο αλληλομόρφα ($P = 0.0009$ για το S262A και $P = 0.0044$ για το S262E, Dunnett's test), όπως και για το AT100 ($P < 0.0001$ και για τα δύο αλληλομόρφα, Dunnett's test). Η Ser³⁹⁶ εντοπίζεται υποφωσφορυλιωμένη και για το S262A και για το S262E ($P < 0.0001$ και για τα δύο αλληλομόρφα, Dunnett's test), ενώ τέλος για το αντίσωμα pS262 δεν αναγνωρίζεται ανοσοαποτύπωμα για τα αλληλομόρφα αυτά.

Με γνώμονα τα δεδομένα που προκύπτουν από την εργασία με τα αλληλομόρφα htau^{FLAG-2N4RSTA} και htau^{S262A} κατασκευάστηκαν τα διαγονίδια για τις Ser²³⁸, Thr²⁴⁵ και Ser²⁶² στα οποία η αντίστοιχη Ser/Thr έχει αντικατασταθεί από αλανίνη είτε από γλουταμινικό οξύ και εξετάστηκαν ως προς την τοξικότητα τους. Το σύνολο των αποτελεσμάτων, όμως, που περιγράφονται παραπάνω υπαγορεύουν πως τα ψευδό-φωσφορυλιωμένα αλληλομόρφα δεν φαίνεται να συμπεριφέρονται ως φώσφο-μιμητικά, όπως αναμενόταν, αφού δεν δίνουν τα κατοπτρικά αποτελέσματα με αυτά των φώσφο-ανθεκτικών αλληλομόρφων. Μπορεί μεν το φορτίο της φωσφορικής ομάδας και του γλουταμινικού οξέος να είναι ίδιο, παρόλα αυτά η ενσωμάτωση του γλουταμινικού οξέως στην θέση της Ser ή Thr πιθανώς οδηγεί σε διαφορετική στερεοδιαμόρφωση της Ταυ δίνοντας έτσι αποτελέσματα τα οποία είναι σχεδόν αδύνατο να ερμηνευτούν χωρίς να γνωρίζουμε τη δομή των πρωτεϊνών αυτών. Από την άλλη μεριά, τα φώσφο-ανθεκτικά αλληλομόρφα φαίνεται να οδηγούν σε αποτελέσματα που αναπαράγονται σε περισσότερα από ένα ανεξάρτητα διαγονιδιακά στελέχη (βλ. την εξάλειψη του μαθησιακού ελλείμματος της ON4R για την htau^{S262A} στην εργασία των Paranikolopoulou & Skoulakis² και το διαγονιδιακό στέλεχος htau^{ON4R-S262A} της παρούσης εργασίας στην Εικόνα 6C) και ίσως να αποτελούν μια πιο ασφαλή προσέγγιση για να προσδιοριστεί ο ρόλος συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης στην τοξικότητα της Ταυ.

Η συσσώρευση της ON4R υπό τον Elav-Gal4 έχει περιγραφεί πως οδηγεί σε απώλεια των MBs³. Ο φαινότυπος αυτός φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα της Ταυ να διαταράσσει την διαίρεση των νευροβλαστών (MBNBs) που θα δώσουν γένεση στα νευρικά κύτταρα των MBs^{29,30}. Η συσσώρευση του Gal4 και της ON4R υπό τον Elav-Gal4 περιγράφεται από τα πρώτα εμβρυικά στάδια της ανάπτυξης της Drosophila^{21,41}, με το χρονικό διάστημα μεταξύ των 4 έως 6 ωρών της εμβρυογένεσης να αποτελεί την κρίσιμη περίοδο στην οποία πρέπει να εκφράζεται η ON4R (αλλά και η 2N4R) ώστε να προκληθεί η απαλοιφή των MBs³. Παρόλα αυτά, στις μύγες που εκφράζουν το διαγονίδιο ON4R-II, τα MBs είναι ακέραια όταν η δομή τους εκτιμάται με βάση το μέγεθος και την μορφολογία

τους στο επίπεδο των δενδριτών τους (κάλυκες) συγκριτικά με μύγες ελέγχου (Εικόνα 4Α). Η απώλεια του φαινοτύπου αυτού, επομένως, μπορεί να επεξηγηθεί λόγω καθυστέρησης της έκφρασης και συσσώρευσης της ON4R-II στους νευροβλάστες που θα δώσουν γένεση στα κύτταρα των MBs. Η καθυστέρηση αυτή είναι πιθανή διότι για την διαγονιδιακή σειρά αυτή, το διαγονίδιο έχει ενσωματωθεί σε μια θέση attP, οι οποίες, όπως περιγράφονται από τον Groth και τους συνεργάτες του, περιέχουν μονωτές στα άκρα τους²⁴, οι οποίοι μπορούν να περιορίσουν την έκφραση γειτονικών γονιδίων. Για να επιβεβαιωθεί πως η ON4R-II δεν συσσωρεύεται κατά την εμβρυογένεση μεταξύ των 4-6h και για αυτό δεν παρατηρείται η απώλεια των MBs, μπορεί να προσδιοριστεί η συσσώρευση της μέσω Western Blot συλλέγοντας και αναλύοντας έμβρυα σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης τους όπως περιγράφεται από τους Kosmidis και τους συνεργάτες του³. Το σύνολο των πειραμάτων αυτών ξεπερνά όμως τους στόχους της παρούσης εργασίας και για αυτό δεν πραγματοποιείται.

Σε ότι αφορά τον φαινότυπο των αδρών οφθαλμών, η τοξικότητα της Tau και συγκεκριμένα της ON4R αναπαράγεται για την διαγονιδιακή σειρά hTau^{ON4R-II} με το αποτέλεσμα όμως της τοξικότητας να είναι εμφανώς πιο ασθενές σε σχέση με τις hTau^{ON4R}. Η επιφάνεια των οφθαλμών της *Drosophila* δημιουργείται κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξης της και έτσι αποτελεί μια αναπτυξιακή διαδικασία καθιστώντας την αδρότητα των οφθαλμών ένα φαινότυπο που μπορεί να χαρακτηριστεί ως αναπτυξιακός και ίσως να μην αποτελεί μια ορθή επιλογή για το πεδίο της έρευνας που αφορά τις Ταυοπαθίες οι οποίες στο σύνολο τους, παρά της FTDP-17, δεν οφείλονται σε μεταλλάξεις και επομένως δεν εμφανίζουν αναπτυξιακό φορτίο. Ακόμα, δεν θα πρέπει να ξεχνάμε πως η διαγονιδιακή σειρά UAS-hTau^{ON4R} που πρωτοπεριγράφεται από τους Wittmann και τους συνεργάτες του¹, όπως και κάθε άλλη διαγονιδιακή σειρά της έως τώρα βιβλιογραφίας, επιλέχθηκε με βάση τον φαινότυπο αυτό ώστε να αποτελέσει μια κατάλληλη διαγονιδιακή σειρά για την μελέτη της Tau στη *Drosophila*. Τέλος, είναι εμφανές από τα αποτελέσματα που περιγράφονται παραπάνω πως η σοβαρότητα του φαινοτύπου επηρεάζεται από τα επίπεδα συσσώρευσης της εκάστοτε πρωτεΐνης.

Το τελικό αποτέλεσμα της νεύρο-τοξικότητας της Tau αποτελεί ο θάνατος του οργανισμού, ο οποίος μπορεί να παρατηρηθεί καταμετρώντας των αριθμό των ατόμων που ξεπερνούν την τελευταία έκδυση και φτάνουν το ενήλικο στάδιο της ανάπτυξης της *Drosophila*. Έτσι, μέσω του ελέγχου της θνησιμότητας που εμφανίζουν τα άτομα που εκφράζουν την ON4R-II ώσπου να φτάσουν στο ενήλικο στάδιο της ανάπτυξης τους είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η τοξικότητα της ισομορφής αυτής, αλλά και των διαφόρων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων της (Εικόνα 4B). Ταυτόχρονα, η τοξικότητα μπορεί να προσδιοριστεί μέσω του ελέγχου της μακροζωίας των ατόμων που εκφράζουν την Tau όπως περιγράφεται εκτενώς στην βιβλιογραφία^{1,2,42}. Τα πειράματα, όμως, έλεγχου της μακροζωίας θα ήταν προτιμότερο να αφορούν μύγες που εκφράζουν το διαγονίδιο της Tau μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος τους, όπως συμβαίνει και στους ασθενείς των Ταυοπαθιών, και για τον λόγο αυτό είναι προτιμότερο να ελέγχεται η έκφραση του εκάστοτε διαγονιδίου από κάποιον παν-νευρωνικό οδηγητή της έκφρασης με τον οποίο να ελέγχεται και χρονικά, πέραν από τοπικά, η έκφραση του διαγονιδίου. Η απουσία του Elav-Gal4; Ras2-Gal4, tub-Gal80^{ts} δεν επιτρέπει να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της μακροζωίας των διαγονιδίων που περιγράφονται σε αυτήν την εργασία.

Προηγούμενες εργασίες υποδεικνύουν πως, στο μοντέλο της *Drosophila*, συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης μεσολαβούν την Ταυ-εξαρτώμενη τοξικότητα για τους αναπτυσσόμενους MBs νευρώνες, ενώ δεν φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη μαθησιακή δυσλειτουργία που εμφανίζουν οι ενήλικες μύγες που εκφράζουν την Ταυ^{3,18}. Οι μύγες που εκφράζουν την htau^{FLAG-2N4RSTA} είναι εμφανώς υπερφωσφορυλιωμένες για διάφορους επιτόπους παρόλα αυτά η συσσώρευση αυτού του αλληλομόρφου δεν προκαλεί τοξικότητα στα αναπτυσσόμενα MBs υποδεικνύοντας καθαρά πως η υπερφωσφορυλίωση αυτή καθ' αυτή δεν είναι τοξική². Παρόλα αυτά, στα αλληλόμορφα S238A και T245A δεν αναπαράγεται η χαρακτηριστική υπερφωσφορυλίωση των htau^{FLAG-2N4RSTA} υποδεικνύοντας πως και οι δύο φωσφορυλίώσεις στα κατάλοιπα αυτά θα πρέπει να παρεμποδιστούν για να παρατηρηθεί η υπερφωσφορυλίωση του STA αλληλομόρφου οδηγώντας σε μια ανώμαλη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης που επιτρέπει την φωσφορυλίωση των υπόλοιπων απομακρυσμένων καταλοίπων. Επιπρόσθετα, ορθό θα ήταν να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της υπερφωσφορυλίωσης της Ταυ λόγω της ταυτόχρονης αντικατάστασης των Ser²³⁸ και Thr²⁴⁵ σε μια ανεξάρτητη διαγονιδιακή σειρά που θα φέρει ένα αλληλόμορφο της ON4RSTA στην ίδια γενετική θέση με τα υπόλοιπα μονά διαγονίδια ώστε να αποκλειστεί πιθανή διαφορά που μπορεί να οφείλεται στον αριθμό των αμινοτελικών επαναλήψεων της Ταυ (η htau^{FLAG-2N4RSTA} βρίσκονται σε 2N4R υπόβαθρο). Σημαντική βέβαια θα ήταν η παρατήρηση του αν κάποια από τις εν λόγω θέσεις φωσφορυλίωσης ελέγχει την φωσφορυλίωση της άλλης, κάτι που θα μπορούσε εύκολα να αποσαφηνιστεί με την χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την φωσφορυλίωση της Thr²⁴⁵ στο S238A αλληλόμορφο και της Ser²³⁸ στο T245A αλληλόμορφο. Αναλογιζόμενοι το δεδομένο ότι η Thr²⁴⁵ περιγράφεται φωσφορυλιωμένη σε φυσιολογικές συνθήκες^{33,34}, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως στο αλληλόμορφο T245A η Ser²³⁸ είναι φωσφορυλιωμένη και η φωσφορυλίωση αυτή είναι που στην συνέχεια επιτρέπει την φωσφορυλίωση των υπολοίπων απομακρυσμένων θέσεων φωσφορυλίωσης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επίσης από την παρατήρηση πως η φωσφορυλίωση της Ser²³⁸ εμφανίζεται καθυστερημένα και η εμφάνιση της σηματοδοτεί την τοξικότητα της Ταυ για το μοντέλο της *Drosophila*² και επομένως η φωσφορυλίωση της Thr²⁴⁵ ίσως να διατηρεί τα βασικά επίπεδα της φωσφορυλίωσης της Ταυ και να εμποδίζει την υπερφωσφορυλίωση της.

Τα δεδομένα μας, επίσης, επαληθεύουν το ρόλο της Ser²⁶² ως θεματοφύλακα της διαδοχικής υπερφωσφορυλίωσης της Ταυ μιας και το αλληλόμορφο S262A περιορίζει την φωσφορυλίωση των AT8, AT100 όσο και pS396 (Εικόνα 6A και 6D). Παράλληλα, η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο αυτό φαίνεται να ελέγχει την εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων που περιγράφονται για την ON4R¹⁸, αφού, αρχικά, ο μπλοκάρισμα της στο αλληλόμορφο S262A οδηγεί στην εξάλειψη της μαθησιακής δυσλειτουργίας (Εικόνα 5C) αλλά και η φωσφορυλίωση της χαρακτηρίζει όλα τα αλληλόμορφα για τα οποία περιγράφεται έλλειμμα στην μαθησιακή απόδοση τους (S238A, S238E και T245A, Εικόνα 5A, 5B, 6A) ενώ δεν εμφανίζεται υπερφωσφορυλιωμένη για το αλληλόμορφο T245E που δεν παρουσιάζει ελλείμματα.

Φαίνεται έτσι, λοιπόν, να προκύπτει ένα μοντέλο που θα μπορούσε να περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται η φωσφορυλίωση της Ταυ ώστε να καταστεί τοξική για τα νευρικά κύτταρα. Μιας και η Thr²⁴⁵ αποτελεί ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο σε δείγματα υγείων ανθρώπων και ταυτόχρονα φαίνεται να ελέγχει την φωσφορυλίωση της

Ser²⁶² είναι πιθανό το πρώτο συμβάν μετατροπής της φωσφορυλίωσης της Tau να αποτελεί η απώλεια αυτής της φυσιολογικά φωσφορυλιωμένης θρεονίνης, με την αλλαγή αυτή να προκαλεί τη φωσφορυλίωση της Ser²⁶², η οποία με την σειρά της να προκαλεί την φωσφορυλίωση των υπόλοιπων καταλοίπων που περιγράφονται παραπάνω και συνδέονται με την παθογένεια της Tau συμπεριλαμβανομένης της Ser²³⁸. Είναι, επομένως, κρίσιμο για την επαλήθευση του μοντέλου αυτού να προσδιοριστεί αν χρονικά η απώλεια της φωσφορυλίωσης της Thr²⁴⁵ προηγείται της φωσφορυλίωσης της Ser²⁶², η οποία σε ότι αφορά την *Drosophila*, όταν εκφράζεται η ON4R παν-νευρωνικώς, η φωσφορυλίωση αυτή εμφανίζεται μετά τις 12 ημέρες έκφρασης του διαγονιδίου της ON4R ².

Συγκεντρωτικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν πως η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων ελέγχει την φωσφορυλίωση άλλων απομακρυσμένων καταλοίπων τα οποία μπορούν να διαδραματίζουν κάποιο συγκεκριμένο ρόλο στην πρόοδο της τοξικότητας της Tau. Έτσι, ο μηχανισμός της διαδοχικής φωσφορυλίωσης σε σημαντικές θέσεις φωσφορυλίωσης, οι πιθανές ανεξάρτητες διαδικασίες της εμφάνισης γνωστικών, συνειδησιακών δυσλειτουργιών και νευροτοξικότητας αλλά και η πιθανή εφαρμογή τους στην διάγνωση και την θεραπεία των διαφόρων Tauopathies, πρέπει να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

5. Αναφορές

1. Wittmann, C. W., et al. Tauopathy in *Drosophila*: Neurodegeneration Without Neurofibrillary Tangles. *Science* (80-.). **293**, 711–714 (2001).
2. Papanikolopoulou, K. & Skoulakis, E. M. C. Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 1–13 (2014). doi:10.1093/hmg/ddu726
3. Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K. & Skoulakis, E. M. C. Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **30**, 464–477 (2010).
4. Avila, J. et al. Looking for novel functions of tau. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 653–5 (2012).
5. Wang, J.-Z. & Liu, F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog. Neurobiol.* **85**, 148–75 (2008).
6. Andreadis, A., Brown, W. M. & Kosik, K. S. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* **31**, 10626–33 (1992).
7. Geschwind, D. H. Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg? *Neuron* **40**, 457–60 (2003).
8. Arrasate, M., Pérez, M. & Avila, J. Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem. Res.* **25**, 43–50 (2000).
9. Liu, C. & Götz, J. Profiling murine tau with ON, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS One* **8**, e84849 (2013).
10. Martin, L., Latypova, X. & Terro, F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **58**, 458–71 (2011).

11. Lee, V. M., Goedert, M. & Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1121–59 (2001).
12. Reed, L. A., Wszolek, Z. K. & Hutton, M. Phenotypic correlations in FTDP-17. *Neurobiol. Aging* **22**, 89–107
13. Grammenoudi, S., Kosmidis, S. & Skoulakis, E. M. C. Cell type-specific processing of human Tau proteins in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **580**, 4602–6 (2006).
14. Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L. & Feany, M. B. Tau Phosphorylation Sites Work in Concert to Promote Neurotoxicity In Vivo. *Mol. Biol. Cell* **18**, 5060–5068 (2007).
15. Steinhilb, M. L. *et al.* S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1271–8 (2007).
16. Davis, R. L. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**, 275–302 (2005).
17. Heisenberg, M. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 266–275 (2003).
18. Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S. & Skoulakis, E. M. C. Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 981–7 (2010).
19. Robinow, S. & White, K. The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev. Biol.* **126**, 294–303 (1988).
20. Robinow, S. & White, K. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J. Neurobiol.* **22**, 443–61 (1991).
21. Berger, C., Renner, S., Lüer, K. & Technau, G. M. The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev. Dyn.* **236**, 3562–8 (2007).
22. Salzberg, A., Cohen, N., Halachmi, N., Kimchie, Z. & Lev, Z. The *Drosophila* Ras2 and Rop gene pair: a dual homology with a yeast Ras-like gene and a suppressor of its loss-of-function phenotype. *Development* **117**, 1309–19 (1993).
23. Skoulakis, E. M. . & Davis, R. L. Olfactory Learning Deficits in Mutants for leonardo, a *Drosophila* Gene Encoding a 14-3-3 Protein. *Neuron* **17**, 931–944 (1996).
24. Phage, F., Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. & Calos, M. P. Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase. **1782**, 1775–1782 (2004).
25. Markstein, M., Pitsouli, C., Villalta, C., Celniker, S. E. & Perrimon, N. Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nat. Genet.* **40**, 476–83 (2008).
26. Povellato, G., Tuxworth, R. I., Hanger, D. P. & Tear, G. Modification of the *Drosophila* model of in vivo Tau toxicity reveals protective phosphorylation by GSK3 β . *Biol. Open* **3**, 1–11 (2014).
27. Menzel, R. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.* **8**, 53–62
28. Heisenberg, M. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 266–75 (2003).
29. Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. & Yamamoto, D. The *Drosophila* mushroom body is a

- quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761–71 (1997).
30. Ito, K. & Hotta, Y. Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **149**, 134–48 (1992).
 31. Jackson, G. R. *et al.* Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* **34**, 509–19 (2002).
 32. Hay, B. A., Maile, R. & Rubin, G. M. P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5195–200 (1997).
 33. Sergeant, N. *et al.* Biochemistry of Tau in Alzheimer’s disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* **5**, 207–24 (2008).
 34. Hanger, D. P., Seereeram, A. & Noble, W. Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Expert Rev. Neurother.* **9**, 1647–66 (2009).
 35. Nishimura, I., Yang, Y. & Lu, B. PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* **116**, 671–682 (2004).
 36. Zheng-Fischhöfer, Q. *et al.* Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur. J. Biochem.* **252**, 542–52 (1998).
 37. Mondragón-Rodriguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Aceveda-Aquino, M. C. & Williams, S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer’s disease and Down syndrome. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 121–135 (2014). doi:10.1111/nan.12084
 38. Steinhilb, M. L., Dias-santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L. & Feany, M. B. Tau Phosphorylation Sites Work in Concert to Promote Neurotoxicity In Vivo □. **18**, 5060–5068 (2007).
 39. Khurana, V. *et al.* TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a *Drosophila* tauopathy model. *Curr. Biol.* **16**, 230–41 (2006).
 40. Fulga, T. A. *et al.* Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.* **9**, 139–148 (2007).
 41. Tzortzopoulos, A. & Skoulakis, E. M. C. Paternally and maternally transmitted GAL4 transcripts contribute to UAS transgene expression in early *Drosophila* embryos. *Genesis* **45**, 737–43 (2007).
 42. Khurana, V. *et al.* Lysosomal dysfunction promotes cleavage and neurotoxicity of tau in vivo. *PLoS Genet.* **6**, 1–11 (2010).