

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΜΥΪΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
DROSOPHILA. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.

ΞΗΡΟΥ Β. ΣΟΦΙΑ

Νευρολόγος, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αθήνα 2019

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Ημερομηνία αιτήσεως υποψηφίου: 09/03/2011

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 30/6/2011

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- Κόνσουλας Χρήστος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)-Επιβλέπων
- Κουτσιλιέρης Μιχαήλ (Διευθυντής, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)
- Λυμπέρη Μαρία (Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14/03/2012

Ο πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής: Πέτρος Π. Σφηκάκης

Η επταμελής επιτροπή:

- Κόνσουλας Χρήστος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)
- Κουτσιλιέρης Μιχαήλ (Καθηγητής – Διευθυντής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)
- Λυμπέρη Μαρία (Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)
- Μαυραγάνη Κλειώ (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)
- Αρμακόλας Αθανάσιος (Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)
- Φιλίππου Αναστάσιος (Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)
- Στραβοπόδης Δημήτριος (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ)

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 15/02/2019

Ὄρκος Ἱπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρῆζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρῆζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Πίνακας περιεχομένων

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	8
A. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
B. ΣΠΟΥΔΕΣ.....	8
Γ. ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	9
Δ. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ.....	9
E. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	10
1. Εργασίες δημοσιευμένες σε ξενόγλωσσα περιοδικά	10
2. Εργασίες δημοσιευμένες σε ελληνικά περιοδικά.....	12
3. Αναρτημένες ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια	13
4. Αναρτημένες ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια.....	14
5. Ομιλίες σε συνέδρια	16
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	20
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
1. Γονιδιωματική αστάθεια κατά τη γήρανση	22
1.1 Ατελής λειτουργία των οδών επισκευής του DNA.....	22
1.2 Μειωμένο μήκος τελομερών	22
2. Κυτταρικός μεταβολισμός.....	24
2.1 Μεταβολικά μονοπάτια	24
2.2 Η μη ρυθμισμένη σηματοδότηση IGF1 προκαλεί γήρανση	25
2.3 Η μειωμένη δραστηριότητα sirtuin και AMPK συμβάλλει στις ηλικιο- εξαρτώμενες ασθένειες	26
3. Μιτοχόνδρια και γήρανση	26
4. Αμφισβήτηση της θεωρίας των ελευθέρων ριζών.....	27
5. Πρωτεόσταση και πρωτεόλυση	28
5.1 Η αυτοφαγία βελτιώνει την επίδραση της γήρανσης στο Hutchinson–Gilford σύνδρομο πρόωρης γήρανσης.....	28
5.2 Διαταραχή της πρωτεόστασης και της αυτοφαγίας κατά τη γήρανση.....	29
6. Ομοιόσταση ασβεστίου	30
Γήρανση και <i>Drosophila melanogaster</i>	32
1. Καρδιακή λειτουργία.....	32
2. Κιρκάδιος ρυθμός.....	33
3. Κινητική λειτουργία – συμπεριφορά	34
4. Μνήμη – μάθηση.....	34
Γήρανση και <i>homo sapiens sapiens</i>	37

1. Τι είναι «φυσιολογικό» κατά τη γήρανση;.....	37
1.1 Εύρος, μοτίβο και χρονικό πλαίσιο των αλλαγών	37
1.2 Πώς γίνεται η καλύτερη ποσοτικοποίηση των αλλαγών του εγκεφάλου;	42
1.3. Αρχές των ηλικιοεξαρτώμενων περιοχικών αλλαγών: ανάπτυξη και εξέλιξη	43
1.4 Αρχές των ηλικιοεξαρτώμενων περιφερειακών αλλαγών του φλοιού: δίκτυο προεπιλεγμένης λειτουργίας (default mode network, DMN)	45
2. Φυσιολογική γήρανση vs NA: Πώς να οριστούν οι διαφορές;	46
3. Νευροπλαστικότητα στον γηράσκοντα εγκέφαλο – παράγοντας ευπάθειας;.....	50
4. Αμυλοειδές και αλλαγές του εγκεφάλου σε ασυμπτωματικούς ενήλικες: προσυμπτωματική άνοια ή μέρος της φυσιολογικής γήρανσης;	51
Νευροεκφυλιστικές νόσοι και ταυ πρωτεΐνη.....	58
1. Ο διπλός ρόλος της ταυ πρωτεΐνης ως φυσιολογικά απαραίτητης νευρωνικής πρωτεΐνης και ως νευροτοξικού παράγοντα	59
2.Ο ρόλος της πρωτεΐνης ταυ.....	60
3. Μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης ταυ	64
3.1 Ο-γλυκοζυλίωση	64
3.2 Φωσφορυλίωση	65
3.3 Κινάσες	66
3.4 Φωσφατάσες.....	67
4. Φωσφορυλίωση της Ταυ πρωτεΐνης και συνάθροιση των μικροσωληνίσκων.....	67
5. Η δράση της πρωτεΐνης ταυ ως νευροτοξικού παράγοντα	68
6. Παθολογικές μορφές της ταυ δημιουργούν ινίδια.....	72
7. Ταυ-πάθειες.....	73
<i>Drosophila melanogaster</i> και ταυ πρωτεΐνη	76
1.1 Η τοξικότητα της WT ισομορφής στο ΚΝΣ της <i>Drosophila melanogaster</i>	76
1.2 Επαγόμενη από WT ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΚΝΣ.....	79
1.3 Επαγόμενη από WT ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΠΝΣ	80
2.1 Επαγόμενη από μεταλλαγμένη ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΚΝΣ.....	82
2.2 Επαγόμενη από μεταλλαγμένη ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΠΝΣ	83
Σύστημα γιγαντιαίων αξόνων της <i>Drosophila melanogaster</i>	84
1. Εισαγωγή στο σύστημα γιγαντιαίων αξόνων.....	84
2. Μορφολογία και φυσιολογία του συστήματος γιγαντιαίων νευρώνων	86
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	93
1. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΓΙΑ <i>Drosophila melanogaster</i>	93
2. Σειρές <i>Drosophila melanogaster</i>	94

3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ- (Behavioral assays).....	95
3.1 Μελέτη της κινητικής κατάστασης και συμπεριφοράς σε γηρασμένα άτομα - Μελέτη αρνητικού γεωτακτισμού (negative geotaxis).....	95
4. ΔΙΑΤΑΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ (electrophysiological set-up).....	96
4.1 Προετοιμασία ηλεκτροδίων	97
4.2 Μέθοδοι ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών.....	97
4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.....	100
5. ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ	101
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	103
1. Αρνητικός γεωτακτισμός (Negative geotaxis)	104
1.1 Συμπεριφορική Μελέτη: Θέση στο χώρο προ του ερεθίσματος, κινητική αντίδραση σε μηχανικό ερέθισμα.....	105
1.2 Μοτίβο (Pattern) φυσιολογικής κινητικής κατάστασης σε σχέση με την κινητική έκπτωση της τελευταίας περιόδου ζωής	112
1.3 Τελικό στάδιο ζωής	113
2. Αξιολόγηση του ρόλου της γήρανσης στο Σύστημα των Γιγαντιαίων Αξόνων (ΣΓΑ)....	114
3. Αξιολόγηση του ρόλου της πρωτεΐνης ταυ στη λειτουργία του συστήματος γιγαντιαίων αξόνων.....	123
4. Ηλικιο- εξαρτώμενες επιδράσεις των ισομορφών hTau στις ιδιότητες του ΣΓΑ.....	136
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	142
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	148
SUMMARY	151
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	153

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Α.ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο:	Σοφία Ξηρού
Όνομα Πατρός:	Βασίλειος
Ημερομηνία Γεννήσεως:	10.11.1983
Τηλέφωνο:	6936852624
E-mail:	sorxir@hotmail.com
Διεύθυνση:	Σαχτούρη 3, Ναύπακτος

Β.ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2001-2007: Φοιτήτρια της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Πτυχίο: Λίαν Καλώς (βαθμός 7,48)
- 09/2010-12/2012: Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσεως στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Θέμα διπλωματικής εργασίας «Η λειτουργικότητα του νευρομυϊκού συστήματος στη *Drosophila melanogaster* κατά τη γήρανση.» Βαθμός: Άριστα
- 03/2012: Έναρξη διδακτορικής διατριβής με θέμα «Γήρανση του νευρομυϊκού συστήματος στη *Drosophila melanogaster*. Ο ρόλος του ασβεστίου.» στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών –Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Μορφολειτουργικός Τομέας (Αρ. Πρωτ:14/3/2012 – 5808)
- 01/2017: Λήψη Τίτλου Ειδικότητας Νευρολογίας (20/01/2017, Αρ. Πρωτοκόλλου: 22842/2016)

Γ. ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- 01/2008-02/2008 : Faculty Hospital of L. Pasteur, Medical University P.J. Safaric-Department of Plastic Surgery , Kosice, Slovak Republic
- 12/2008-06/2010: Ιατρός στο πρόγραμμα «Βοήθεια στο σπίτι» για το Δήμο Χάλκειας
- 05/2008-06/2010: Ιατρός στο πρόγραμμα «Βοήθεια στο σπίτι» για το Δήμο Ευπαλίου
- 7/2009-10/2009: Τρίμηνη Υποχρεωτική Εκπαίδευση σε Τακτικά Παθολογικά, Χειρουργικά και Καρδιολογικά Εξωτερικά Ιατρεία καθώς και στα αντίστοιχα Ιατρεία Επειγόντων Περιστατικών στο Γενικό Νοσοκομείο Μεσολογίου.
- 10/2009 -04/2010: Υπηρεσία Υπαίθρου ως Ιατρός του Π. Ι. Ελευθέριανης του Κ. Υ. Άνω Χώρας
- 5/2010 - 11/2010: Έξι μήνες Άσκηση στην Παθολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Άμφισσας
- 05/2012-10/2012: Ειδικευόμενη Νευρολογίας, 401 Γ.Σ.Ν.Α
- 11/2012-04/2013: Ειδικευόμενη Ψυχιατρικής στην Α΄ Ψυχιατρική κλινική ΕΚΠΑ, Αιγινήτειο Νοσοκομείο για την ειδικότητα της Νευρολογίας
- 05/2013-08/2016: Ειδικευόμενη Νευρολογίας στην Α΄ Νευρολογική Κλινική ΕΚΠΑ, Αιγινήτειο Νοσοκομείο
- 08/2016-05/2018: Παράταση εργασίας ως Νευρολόγος στην Α΄ Νευρολογική Κλινική ΕΚΠΑ, Αιγινήτειο Νοσοκομείο
- 05/2018- σήμερα: Επιστημονικός Συνεργάτης Α΄ Νευρολογική Κλινική ΕΚΠΑ, Αιγινήτειο Νοσοκομείο (22/6/2018, Αρ. Πρ: 464)

Δ. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά: Proficiency in English (University of Michigan), Επίπεδο: Άριστη Γνώση
- Γερμανικά: Zentrale Mittelstufenprüfung, Goethe Institut, Επίπεδο: Πολύ Καλή Γνώση

E. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1.Εργασίες δημοσιευμένες σε ξενόγλωσσα περιοδικά

- Papadimas GK, Kokkinis C, **Xirou S**, Chrysanthou M, Kararizou E, Papadopoulos C. Polymyositis with mitochondrial pathology or atypical form of sporadic inclusion body myositis: case series and review of the literature. (2019), υπό δημοσίευση
- Kadas D, Papanikolopoulou K, **Xirou S**, Consoulas C, Skoulakis EMC. Human Tau isoform-specific presynaptic deficits in a Drosophila Central Nervous System circuit. *Neurobiology of Disease*. (2018) Dec 8;124:311-321. doi: 10.1016/j.nbd.2018.12.004.
- Christidi F, Karavasilis E, Velonakis G, Rentzos M, Zambelis T, Zouvelou V, **Xirou S**, Ferentinos P, Efstathopoulos E, Kelekis N, Evdokimidis I, Karandreas N. Motor and extra-motor gray matter integrity may underlie neurophysiologic parameters of motor function in amyotrophic lateral sclerosis: a combined voxel-based morphometry and transcranial stimulation study. *Brain Imaging and Behavior*. (2018) Dec;12(6):1730-1741. doi: 10.1007/s11682-018-9841-0.
- Papadopoulos C, Kekou K, **Xirou S**, Kitsiou-Tzeli S, Kararizou E, Papadimas GK. Early onset posterior subscapular cataract in a series of myotonic dystrophy type 2 patients. *Eye (Lond)*. (2018) Mar;32(3):622-625. doi: 10.1038/eye.2017.280. Epub 2017 Dec 8.
- Christidi F, Karavasilis E, Ferentinos P, **Xirou S**, Velonakis G, Rentzos M, Zouvelou V, Zalonis I, Efstathopoulos E, Kelekis N, Evdokimidis I Investigating the neuroanatomical substrate of pathological laughing and crying in amyotrophic lateral sclerosis with multimodal neuroimaging techniques.

Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration. (2018) Feb;19(1-2):12-20. doi: 10.1080/21678421.2017.1386689.

- Christidi F, Karavasilis E, Riederer F, Zalonis I, Ferentinos P, Velonakis G, **Xirou S**, Rentzos M, Argiropoulos G, Zouvelou V, Zambelis T, Athanasakos A, Toulas P, Vadikolias K, Efstathopoulos E, Kollias S, Karandreas N, Kelekis N, Evdokimidis I. Gray matter and white matter changes in non-demented amyotrophic lateral sclerosis patients with or without cognitive impairment: A combined voxel-based morphometry and tract-based spatial statistics whole-brain analysis. *Brain Imaging Behavior*. (2018) Apr;12(2):547-563. doi: 10.1007/s11682-017-9722-y.
- Christidi F, Karavasilis E, Zalonis I, Ferentinos P, Giavri Z, Wilde EA, **Xirou S**, Rentzos M, Zouvelou V, Velonakis G, Toulas P, Efstathopoulos E, Poulou L, Argyropoulos G, Athanasakos A, Zambelis T, Levin HS, Karandreas N, Kelekis N, Evdokimidis I. Memory-related white matter tract integrity in amyotrophic lateral sclerosis: an advanced neuroimaging and neuropsychological study. *Neurobiology of Aging*. (2017) Jan;49:69-78. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.014
- **Xirou S**, Papadopoulos C, Papadimas GK Widespread Perifascicular Pathology in Juvenile Dermatomyositis (2017) *Journal of Muscle Health* 1(1): 1004.
- Bougea A, Spantideas N, Anagnostou E, Massou E, **Xirou S**, Thomaidis T, Evdokimidis I, Kararizou E. Understanding of headache patterns modification in an emergency department during the economic crisis of Greece. *Neurological Sciences*. (2016)Aug;37(8):1233-1239. doi: 10.1007/s10072-016-2572-3.
- Zis P, Artemiadis AK, Lykouri M, **Xirou S**, Roussopoulou A, Papageorgiou E, Bakola E, Anagnostopoulos F. Residency Training: Determinants of burnout of

neurology trainees in Attica, Greece. *Neurology*. (2015) Sep 15;85(11):e81-4. doi: 10.1212/WNL.0000000000001924.

- Zis P, Zis V, **Xirou S**, Kemanetzoglou E, Zambelis T, Karandreas N. Rapid Screening for Carpal Tunnel Syndrome: A Novel Method and Comparison With Established Others. *Journal of Clinical Neurophysiology*.(2015) Aug;32(4):375-9. doi: 10.1097/WNP.0000000000000180

2. Εργασίες δημοσιευμένες σε ελληνικά περιοδικά

- **Ξηρού Σ**, Κουππάρης Α, Αναγνώστου Ε, Τριανταφύλλου Ν, Καραρίζου Ε «Υποτροπιάζουσα πάρεση απαγωγού συνοδευόμενη από κεφαλαλγία: όχι πάντα οφθαλμοπληγική ημικρανία» *Νευρολογία* 2017, Τόμος 26, Τεύχος 3
- Παπαδόπουλος Κ , **Ξηρού Σ** , Κέκου Κ, Κίτσιου- Τζέλη Σ, Καραρίζου Ε, Παπαδήμας ΓΚ «Πρώιμης έναρξης καταρράκτης στη μυοτονική δυστροφία τύπου 2» *Νευρολογία* 2017, τόμος 26, τεύχος 3
- Παπαδήμας Γ, **Ξηρού Σ**, Παπαδόπουλος Κ., Χρυσάνθου – Πιτερού Μ, Τιφτικίδης Γ, Μελισσινού Ε, Καραρίζου Ε, Καρανδρέας Ν, Μαντά Π “Ο ρόλος της ανοσοϊστοχημείας στη διάγνωση των νευρομυϊκών παθήσεων”, *Νευρολογία* 2015 , Τόμος 24, τεύχος 3
- **Ξηρού Σ**, Παπαδήμας Γ, Χρυσάνθου – Πιτερού Μ, Παπαδόπουλος Κ, Τιφτικίδης Γ, Καραρίζου Ε, Καρανδρέας Ν “Πολυμυοσίτιδα με COX αρνητικές μυϊκές ίνες σε ασθενή με σύνδρομο Sjögren” *Νευρολογία* 2015 , Τόμος 24, τεύχος 3
- Ζης Π, **Ξηρού Σ** “ Ο Πόνος στη Νόσο Πάρκινσον: Ταξινόμηση και Θεραπευτική Προσέγγιση.” *Νευρολογία* 2015, Τόμος 24, Τεύχος 2

3. Αναρτημένες ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- Koupparis A, **Xirou S**, Papadopoulos C, Seves R. M., Garcia Arumi E, Kokkinis C, Pons R, Papadimas GK “Progressive External Ophthalmoplegia caused by mutation in *C10orf2* gene: a case study.» SSIEM 2018 Annual Symposium, Athens, Greece, Sept 4-7, 2018
- **Xirou S**, Papadimas GK “Perifascicular distribution of glycogen in juvenile dermatomyositis.” 2nd congress of the European Academy of Neurology, Copenhagen, Denmark, May 28-31 2016
- **Xirou S**, Papadopoulos C, Nikolakopoulou V, Michelakaki H, Spengos K, Karandreas N, Manta P, Papadimas G.K. “ERT efficacy in late onset Pompe disease” 21st International congress of the World Muscle Society, Granada, Spain, 4-8 October 2016
- Papadimas G, **Xirou S**, Papadopoulos C, Chrysanthou- Piterou M, Kararizou E, Karandreas N, Manta P “The role of immunohistochemistry in neuromuscular diagnostics” ,1st congress of the European Academy of Neurology, Berlin, Germany, June 20-23,2015
- **Xirou S**, Papadimas GK, Chrysanthou- Piterou M, Papadopoulos C, Kararizou E, Manta P, Karandreas N “Polymyositis with COX negative muscle fibers associated with Sjogren’s syndrome” 1st congress of the European Academy of Neurology, Berlin, Germany, June 20-23,2015
- **Xirou S**, Naoumis D, Anagnostou E, Bougea A, Gkiatas K, Evdokimidis I, Kararizou E «An unusual presentation of neurosyphilis as a probable migraine» 17th Congress of the International Headache Society (IHC 2015),14 - 17 May 2015, Valencia, Spain
 - Cephalalgia 2015, 35;1-296

- Bougea A, Constantinides VC, Anagnostou E, Gika L, **Xirou S**, Markou I, Giatas K., Kararizou E. "A rare coexistence of sexual cough and exertional headache in military personnel." 20th Congress of Balkan Military Medical Committee: 7-10 Μαΐου 2014, Φιλιππούπολη.
- Constantinides V, Liakakis G, **Xirou S**, Totsika V, Paraskevas G, Evdokimidis I, Kapaki E. CSF biomarkers in demented patients with prominent behavioural disturbances. 14th International Athens / Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy
- Gaitanidis A, Kadas D, **Xirou S**, Raikou S, Dimitriadou A, Dowse H, Sanyal S, Consoulas C "Age-dependent, pre-death morbidity in Drosophila." NeuroFly 2014, Hersonisos, Crete, 2014

4. Αναρτημένες ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

- **Ξηρού Σ**, Παπαδόπουλος Κ, Ζαμπέλης Θ, Καραρίζου Ε, Παπαδήμας ΓΚ. «Ο ρόλος της ηλεκτροφυσιολογίας στη μελέτη των συγγενών μυασθενικών συνδρόμων: Παρουσίαση Περιστατικού» 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Νευροφυσιολογίας, Κρήτη 18-21 Οκτωβρίου 2018. 21 Οκτωβρίου 2018
- **Ξηρού Σ**, Κουμπάρης Α, Κουτσουδάκη Π, Κοκότης Π, Ζαμπέλης Θ, Αναγνώστου Ε. «Η ευαισθησία του διαπασών Rydel- Seiffer στη διάγνωση της πολυνευροπάθειας» 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Νευροφυσιολογίας, Κρήτη 18-21 Οκτωβρίου 2018. 21 Οκτωβρίου 2018
- **Ξηρού Σ**, Κουμπάρης Α, Αναγνώστου Ε, Τριανταφύλλου Ν, Καραρίζου Ε «Υποτροπιάζουσα πάρεση απαγωγού συνοδευόμενη από κεφαλαλγία: όχι πάντα οφθαλμοπληγική ημικρανία» 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων, 8-11 Ιουνίου 2017, Καλαμάτα

- Παπαδόπουλος Κ, **Ξηρού Σ**, Κέκου Κ, Κίτσιου- Τζέλη Σ, Καραρίζου Ε, Παπαδήμας Γ.Κ. «Πρώιμης έναρξης καταρράκτης στη μυοτονική δυστροφία τύπου 2» 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων, 8-11 Ιουνίου 2017, Καλαμάτα
- **Ξηρού Σ**, Παπαδόπουλος Κ, Κέκου Κ, Παπαδήμας ΓΚ. «Πρόσωπο- ώμο-βραχιόνιος μυϊκή δυστροφία: παρουσίαση περίπτωσης γαμετικού μωσαϊκισμού» 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Κλινικής Νευροφυσιολογίας – Ημέρες Κλινικής Νευροφυσιολογίας, Καστοριά 9-12 Νοεμβρίου 2017
- **Ξηρού Σ**, Κουμπάρης Α, Κουτσουδάκη Π, Κοκότης Π, Ζαμπέλης Θ, Αναγνώστου Ε. «Η σχέση της νευρογραφίας του γαστροκνημιαίου νεύρου με την παλλαισθησία χρησιμοποιώντας διαπασών Rydel-Seiffer» 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Κλινικής Νευροφυσιολογίας – Ημέρες Κλινικής Νευροφυσιολογίας, Καστοριά 9-12 Νοεμβρίου 2017
- **Ξηρού Σ**, Ζούβελου Β, Ρέντζος Μ , Παπαδόπουλος Κ, Ζαμπέλης Θ, Παπαδήμας ΓΚ. «Πλάγια μυατροφική σκλήρυνση vs μυοπάθειας εξ εγκλείστων: παρουσίαση περιστατικού» 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Κλινικής Νευροφυσιολογίας – Ημέρες Κλινικής Νευροφυσιολογίας, Καστοριά 9-12 Νοεμβρίου 2017
- Kadas D, **Xirou S**, Papanikolopoulou K, Skoulakis E, Consoulas C. “Differential electrophysiological phenotypes of human tau isoforms in an identified neural circuit in drosophila. “ 27th Meeting of the Hellenic Neuroscience Society, 8–10 December 2017.

- Παπαδήμας Γ, Ξηρού Σ, Παπαδόπουλος Κ, Χρυσάνθου – Πιτερού Μ, Τιφτικίδης Γ, Μελισσινού Ε, Καραρίζου Ε, Καρανδρέας Ν, Μαντά Π. “Ο ρόλος της ανοσοϊστοχημείας στη διάγνωση των νευρομυϊκών παθήσεων” 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων, 6-9 Ιουνίου 2015, Αλεξανδρούπολη
- Ξηρού Σ, Παπαδήμας Γ, Χρυσάνθου – Πιτερού Μ, Παπαδόπουλος Κ, Τιφτικίδης Γ, Καραρίζου Ε, Καρανδρέας Ν. “Πολυμυοσίτιδα με COX αρνητικές μυϊκές ίνες σε ασθενή με σύνδρομο Sjögren” 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων, 6-9 Ιουνίου 2015, Αλεξανδρούπολη
- Καραρίζου Ε, Μπουγέα Α, Παπαδήμας ΓΚ, Παπαδόπουλος Κ, Ξηρού Σ, Καλφάκης Ν, Ευδοκίμης Ι, Μαντά Π. “Μορφομετρικά χαρακτηριστικά των μυων που συσχετίζονται με την ηλικία υγιών ενηλίκων αρρένων.” 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων, 6-9 Ιουνίου 2015, Αλεξανδρούπολη
- Xirou S, Consoulas C. “Age Dependent changes in motor function of drosophila”, 26th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, November 29-December 1, 2013

5.Ομιλίες σε συνέδρια

- Κουππάρης Α., Ξηρού Σ., Αναγνώστου Ε., Καραρίζου Ε. Παρουσίαση περιστατικού με καλοήγη ενδοκράνια υπόταση. Βιβλιογραφική ανασκόπηση. « Ημέρες Νευρολογίας. Από την παθογένεια στη θεραπεία» Ημερίδα 1 «Κεφαλαλγία – 2018» Αθήνα, 27, Ιανουαρίου 2018, Στράτος Βασιλικός.
- Ξηρού Σ., Κουππάρης Α., Αναγνώστου Ε., Καραρίζου Ε. Αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες - παρουσίαση περιστατικού με άτυπα χαρακτηριστικά.

Βιβλιογραφική ανασκόπηση « Ημέρες Νευρολογίας. Από την παθογένεια στη θεραπεία» Ημερίδα 1 «Κεφαλαλγία – 2018» Αθήνα, 27, Ιανουαρίου 2018, Στράτος Βασιλικός.

- **Ξηρού Σ.** Παρουσίαση περιστατικών στο στρογγυλό τραπέζι με θέμα: "Η προσέγγιση της Κεφαλαλγίας από τον Κλινικό Νευρολόγο" Ημερίδα Κεφαλαλγίας 13 Φεβρουαρίου 2016. Πολυχώρος Gazarte, Γκάζι, Αθήνα
- **Ξηρού Σ., Κλώνος Ε.** Νευρική Ανορεξία-Βουλιμία: 11^ο Επιστημονικό Συνέδριο & 9η Ολυμπιάδα Ιατρικής Γνώσης, Αλεξανδρούπολη, 13-14 Μαΐου 2005

Στους γονείς μου,

Βασίλειο και Γεωργία

Στην αδερφή μου, Ερμίνια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα θερμά να ευχαριστήσω για τη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσης μελέτης όλους όσους συνέβαλαν στην επίτευξη της.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Κόνσουλα για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Υπήρξε πάντα πολύτιμος σύμβουλος σε όλη την πορεία εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Πάνω από όλα όμως θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί μου δίδαξε τον τρόπο που συνδυάζεται το ιατρικό έργο με τη βασική έρευνα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή-Διευθυντή της Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής κ. Μιχαήλ Κουτσιλιέρη για την υποστήριξη του και τη δυνατότητα που μου προσέφερε να εργαστώ στο εργαστήριο του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τα υπόλοιπα μέλη της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής: την Καθηγήτρια κα Μαρία Λυμπέρη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Αθανάσιο Αρμακόλα, τον Επίκουρο καθηγητή κο Αναστάσιο Φιλίππου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μαυραγάνη Κλειώ και τον Επίκουρο καθηγητή κο Στραβοπόδη Δημήτριο τόσο για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή, όσο και για την συμβολή τους στην εξέλιξη της επιστημονικής μου πορείας.

Από τους πολλούς συνεργάτες στο Εργαστήριο, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δημήτριο Καδά, που κατά το μεγαλύτερο μέρος της πραγματοποίησης της διατριβής υπήρξε ο βασικότερος συνεργάτης. Η βοήθεια και η συμπαράσταση του ήταν πολύτιμη στην πρώτη μου επαφή με το εργαστήριο και σε όλες τις κρίσιμες στιγμές εκπόνησης της παρούσης διατριβής.

Ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής για την καλή συνεργασία και την κατανόηση που έδειξαν καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσης διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και την αδερφή μου για την υπομονή και τη στήριξή τους σε αυτήν μου την πορεία.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η γήρανση είναι μία βιολογική διεργασία που χαρακτηρίζεται από λειτουργική έκπτωση, η οποία οδηγεί στη διαταραχή της ομοιόστασης και συνεπακόλουθα αυξάνει την πιθανότητα νόσησης με την πάροδο του χρόνου. Οι πολύπλοκες διεργασίες που διέπουν τη διαδικασία της γήρανσης διαφαίνονται από το γεγονός ότι ο φαινότυπος και ο ρυθμός ανάπτυξης της ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ειδών, των οργανισμών του ίδιου είδους, μεταξύ των οργάνων και των ιστών του ίδιου οργανισμού ακόμα και μεταξύ των κυττάρων του ίδιου οργάνου [1]. Δεδομένης της πολυπλοκότητας της γηραντικής διαδικασίας, η προέλευση, η έναρξη, η εξέλιξη και οι συνέπειες της γήρανσης δεν θα μπορούσαν να είναι μονοπαραγοντικές αλλά αντιθέτως βασίζονται σε μια πληθώρα μηχανισμών και γεγονότων που οδηγούν στην εμφάνιση της, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες, το οξειδωτικό στρες, η αλλαγή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, η συσσώρευση πρωτεϊνών, η ανεπαρκής απομάκρυνση προϊόντων του μεταβολισμού και η συσσώρευση μεταλλάξεων [2] [3]. Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί οδηγούν αρχικά σε μοριακή ετερογένεια, ακολούθως σε δυσλειτουργία του κυττάρου, ελάττωση της ικανότητας αναγέννησης και εν τέλει στον θάνατο. Η κυτταρική γήρανση και η φθορά εξηγεί την παρατήρηση ότι σε πολλές σχετιζόμενες με τη γήρανση ασθένειες όχι μόνο ο πρωταρχικά επηρεαζόμενος ιστός βλάπτεται, αλλά και άλλοι ιστοί υφίστανται ταυτόχρονα λειτουργική έκπτωση.

Η διευκρίνιση και η κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στη γήρανση θα αποτελούσε τη βάση της ανάπτυξης μέσων ερμηνείας, πρόληψης ή ακόμη και επιβράδυνσης της εξέλιξης και ανάπτυξης της.

Στο κείμενο που ακολουθεί, περιγράφονται μερικοί από τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στη γήρανση και συνεπακόλουθα στην ανάπτυξη εκφυλιστικών παθολογικών καταστάσεων.

1. Γονιδιωματική αστάθεια κατά τη γήρανση

Το ανθρώπινο γονιδίωμα βρίσκεται συνεχώς υπό την επίδραση παραγόντων που βλάπτουν το DNA και απειλούν την κυτταρική ομοιόσταση. Αυτοί οι δυνητικά βλαπτικοί παράγοντες εξουδετερώνονται από μηχανισμούς που επιδιορθώνουν βλάβες του DNA και προστατεύουν τα χρωμοσωμικά άκρα, των οποίων όμως η λειτουργικότητα ελαττώνεται με την πάροδο της ηλικίας, οδηγώντας σε κυτταρικές αλλοιώσεις.

1.1 Ατελής λειτουργία των οδών επισκευής του DNA

Τα διάφορα «μονοπάτια» που ως σκοπό έχουν την επισκευή βλαβών του DNA βοηθούν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Η επισκευή μέσω εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide excision repair -NER) είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών μονής έλικας DNA, ενώ οι διπλής έλικας διακοπές (double-strand breaks -DSB), οι οποίες προωθούν μεγάλες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που απειλούν την κυτταρική επιβίωση, επισκευάζονται με ομόλογο ανασυνδυασμό, αλλά μπορεί επίσης να επιδιορθωθούν με μη ομόλογη σύνδεση άκρου (non-homologous end joining (NHEJ)). Η αποτελεσματικότητα αυτών των μηχανισμών μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας, έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες [4].

1.2 Μειωμένο μήκος τελομερών

Τα τελομερή είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα τελικά άκρα των χρωμοσωμάτων που καλύπτονται από το σύμπλεγμα σελτερίνης, το οποίο περιλαμβάνει τον παράγοντα σύνδεσης επαναλήψεως τελομερούς 1 (telomeric repeat binding factor 1-TERF1) και 2 (telomeric repeat binding factor 2- TERF2) και προστατεύει τα χρωμοσωμικά άκρα από το να αναγνωρίζονται ως DSBs. Το μήκος των τελομερών είναι μέγιστο κατά τη γέννηση και μειώνεται σταδιακά με την πάροδο της ηλικίας, καθιστώντας τοιούτοτρόπως το μήκος των τελομερών βιοδείκτη της χρονολογικής γήρανσης. [5]. Τα τελομερή βραχύνονται επίσης κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης και μπορεί να προκαλέσουν σηματοδότηση βλάβης του DNA και κυτταρική γήρανση όταν φτάνουν σε ένα κριτικά μικρό μήκος. Η τελομεράση, ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από την αντίστροφη τελομερική

μεταγραφάση (telomerase reverse transcriptase -TERT) και την RNA τελομεράση (TERC), επιμηκώνει τα τελομερή σε κάθε κυτταρικό κύκλο, εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, ωστόσο, δεν είναι ανιχνεύσιμη στα υπόλοιπα ανθρώπινα κύτταρα.

Η συσχέτιση μεταξύ του μήκους των τελομερών και των ηλικιο- εξαρτώμενων ασθενειών αποτελεί πλέον παγιωμένη γνώση όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω και μελέτες υποδηλώνουν έναν αιτιολογικό ρόλο της βράχυνσης των τελομερών στα νοσήματα που σχετίζονται με τη γήρανση [5]. Η βλάβη των τελομερών μπορεί να ενεργοποιήσει τη σύνθεση της προγηρίνης σε wild type κύτταρα και η βλάβη της λειτουργίας του συμπλέγματος της τελομεράσης προκαλεί ένα από τα σύνδρομα πρόωρης γήρανσης - αυτό της συγγενούς δυσκεράτωσης (ΣΔ).

Η γενετική απόσπαση της TERC σε ποντίκια βραχύνει τα τελομερή τόσο ώστε να προκαλείται υπερτροφία του μυοκαρδίου, μειωμένη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας και αυξημένη συστολική αρτηριακή πίεση, διαταραχές οι οποίες συνδέονται με την πάροδο της ηλικίας. Επιπλέον, τα Terf2-knockout ποντίκια παρουσιάζουν αυξημένη απόπτωση καρδιακών μυοκυττάρων. Ο ρόλος της βράχυνσης των τελομερών στο καρδιαγγειακό σύστημα υποστηρίζεται περαιτέρω από TERC-knockout ποντίκια που παρουσιάζουν αθηροσκληρυντικό φαινότυπο και από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα αγγειακών ασθενών που παρουσιάζουν αυξημένο αιμοδυναμικό στρες και οι αθηροσκληρωτικές περιοχές αυτών έχουν βραχύτερα τελομερή. Επιπλέον, ο ρυθμός βράχυνσης των τελομερών στα λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος συσχετίζεται με τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα σε ηλικιωμένους άνδρες [6]. Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί η διαπίστωση ότι η κατάθλιψη συσχετίζεται με μικρά τελομερή λευκοκυττάρων και υψηλά επίπεδα ιντερλευκίνης (IL) -6 σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [7].

Το μήκος των τελομερών αποδείχθηκε επίσης ότι ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, όπως το από ιντερφερόνη διεγερόμενο γονίδιο 15 (*ISG15*). Τα βραχέα τελομερή αυξάνουν την έκφραση του *ISG15* ανεξαρτήτως των βλαβών του DNA. Αυτό το εύρημα κατέδειξε για πρώτη φορά ότι το μήκος των τελομερών μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση ενός ανθρώπινου γονιδίου, πριν την έναρξη της

δυσλειτουργίας τους και της εμφάνισης βλαβών στο DNA. Ίσως, κατόπιν τούτων η αύξηση της έκφρασης του *ISG15* μέσω της βράχυνσης των τελομερών μπορεί να συμβάλει στη χρόνια φλεγμονή που συνδέεται με την ανθρώπινη γήρανση [8]. Επίσης, αποδείχθηκε ότι η έκκριση των φλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-6 και η IL-8 από γηρασμένα κύτταρα, είτε οφείλεται σε δυσλειτουργικά τελομερή είτε σε βλάβες του DNA, καταστέλλεται από δύο μικρο-RNAs (miR-146a και 146b) που ρυθμίζουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις επηρεάζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που συμβάλλουν στη γήρανση [9].

Αποδείχθηκε τέλος ότι η δυσλειτουργία μιας δεσμευτικής πρωτεΐνης τελομερών είναι επαρκής για να προκαλέσει σοβαρή βλάβη των τελομερών ελλείψει βράχυνσης αυτών, με αποτέλεσμα την πρόωρη εκφύλιση των ιστών και την ανάπτυξη νεοπλασματικών βλαβών σε ποντίκια [10]. Ομοίως κατεστραμμένα τελομερή βρέθηκε να είναι ο κύριος παράγοντας που συμβάλλει στη μεγάλη μεταβλητότητα των βλαβών που παρατηρούνται σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, ευρήματα που μπορούν να συμβάλουν στην αποσαφήνιση του ρόλου των κατεστραμμένων τελομερών στην αστάθεια του γονιδιώματος [11].

2. Κυτταρικός μεταβολισμός

Η μεταβολική σηματοδότηση είναι ζωτικής σημασίας για τη συντήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, καθώς η σηματοδότηση αυτή εκχωρεί ενέργεια σε βασικούς μηχανισμούς προστασίας που διασφαλίζουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος, των πρωτεοσωμάτων και των κυτταρικών οργανιδίων. Η μη ρυθμισμένη μεταβολική σηματοδότηση, προκαλεί μια σειρά καταστροφικών κυτταρικών συμβάντων, που εμπλέκονται ευρέως σε ηλικιο – εξαρτώμενες ασθένειες.

2.1 Μεταβολικά μονοπάτια

Η διατήρηση μιας σωστής ισορροπίας μεταξύ καταβολικών και αναβολικών μονοπατιών είναι απαραίτητη για τη διατήρηση επαρκών επίπεδων κυτταρικής ενέργειας. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας κλονίζει την κυτταρική ομοιόσταση

και οδηγεί στην κυτταρική γήρανση και την ανάπτυξη ηλικιο- εξαρτώμενων ασθενειών. Τα μεταβολικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένης της οδού της ινσουλίνης (IIS), του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης 1 (IGF1), της sirtuin 1 (SIRT1) και της AMP ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK), ρυθμίζουν τη μεταβολική κατάσταση των κυττάρων και έχουν εξέχουσα θέση στη φυσιολογική γήρανση.

2.2 Η μη ρυθμισμένη σηματοδότηση IGF1 προκαλεί γήρανση

Το μονοπάτι IIS ενεργοποιείται όταν υπάρχει μια περίσσεια θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης της ινσουλίνης, του IGF1 και των ελεύθερων αμινοξέων και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης πρωτεϊνών και την προώθηση άλλων αναβολικών διεργασιών. Η μειωμένη σηματοδότηση του IIS, είτε προκαλείται από γενετικούς πολυμορφισμούς είτε ακολουθεί θερμιδικό περιορισμό, προάγει τη μακροζωία και την υγεία. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα της μειωμένης σηματοδότησης του IIS εξαρτώνται από την ηλικία του οργανισμού, τη διάρκεια και το βαθμό καταστολής καθώς και τα επίπεδα κυτταρικής φλεγμονής. Ενώ η σύντομη και μέτρια καταστολή του IIS μπορεί να είναι επωφελής με την ελαχιστοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης για να κατευθύνει την ενέργεια προς την επισκευή κυτταρικών βλαβών, η παρατεταμένη εξασθένηση είναι επιβλαβής και προωθεί τη γήρανση [12].

Στο μοντέλο προγηρίας ποντικού Zmpste24-knockout, τα επίπεδα IGF1 είναι δραστικά μειωμένα από τη νεογνική ηλικία και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής και η θεραπεία με IGF1 επεκτείνει τη διάρκεια ζωής και καθυστερεί την εκδήλωση των χαρακτηριστικών της νόσου.

Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του IIS μπορεί επίσης να αποβεί επιζήμια για την κυτταρική υγεία. Οι νευρώνες είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στις διαταραχές της σηματοδότησης του IIS λόγω του αυξημένου μεταβολικού ρυθμού τους και την εξάρτηση από τη γλυκόζη [13].

2.3 Η μειωμένη δραστηριότητα sirtuin και AMPK συμβάλλει στις ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες

Η πρωτεΐνη αποακετυλάση SIRT1 ενεργοποιεί μονοπάτια που αυξάνουν τα επίπεδα κυτταρικής ενέργειας και προάγουν την κυτταρική επιβίωση υπό συνθήκες στρες και αυξημένων επιπέδων NAD⁺. Κατά τη διάρκεια της γήρανσης, οι αυξημένες βλάβες του DNA οδηγούν στην εξάντληση του NAD⁺, μειώνοντας τη δραστηριότητα της SIRT1. Η σημασία της μείωσης αυτής υποστηρίζεται από τη διαπίστωση ότι σε μοντέλα προγηρίας ποντικών Zmpste24-knockout όπου αποκαταστάθηκε η λειτουργία της, βελτιώθηκαν οι οστεοπορωτικές αλλοιώσεις και επεκτάθηκε η διάρκεια ζωής [14]. Η ενεργοποίηση της SIRT1 ελαττώνει επίσης τα συμπτώματα της νόσου Alzheimer, καθώς αναστέλλει το μονοπάτι TOR (target of rapamycin), το οποίο είναι υπερενεργοποιημένο στη νόσο Alzheimer, και επάγει την αμυλοειδική διάσπαση και αποικοδόμηση της πρωτεΐνης ταυ [15].

Η ενεργοποίηση του SIRT1 προάγει επίσης την υγεία μέσω της ενεργοποίησης του AMPK. Σε απάντηση στο αυξημένο AMP, το AMPK αναστέλλει το mTOR, προάγει τον καταβολισμό λιπιδίων και τη γλυκονεογένεση και μέσω θετικής ανατροφοδότησης ενεργοποιεί το SIRT1 [4]. Όπως συμβαίνει με το SIRT1, έτσι και η δραστηριότητα AMPK μειώνεται με την ηλικία. Συνεπώς με αυτή τη μείωση, η θεραπεία με τον ενεργοποιητή AMPK μετφορμίνη επεκτείνει τη διάρκεια ζωής των *C. elegans* και των ποντικών και ασκεί αντιδιαβητικές επιδράσεις [16].

Αν και είναι προφανές ότι η γήρανση συνδέεται με τα προαναφερθέντα μονοπάτια IIS, AMPK και SIRT1 ο τρόπος με τον οποίο οι ενεργοποιητές αυτών των μονοπατιών επηρεάζουν την κυτταρική γήρανση σε ασθένειες είναι μόνο εν μέρει κατανοητός. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει επιπροσθέτως την κυτταρική γήρανση σε αυτό το πλαίσιο είναι ο μεταβολικός έλεγχος της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων.

3. Μιτοχόνδρια και γήρανση

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της γήρανσης και αυτό διότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα «εργοστάσια»

παραγωγής ενέργειας των κυττάρων [17, 18]. Η δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσού, η συσσώρευση μεταλλάξεων και το οξειδωτικό στρες οδηγούν σε μια έκπτωση της σύνθεσης ATP και συνεπακόλουθα σε ελαττωμένη παραγωγή ενέργειας επηρεάζοντας τις κυτταρικές λειτουργίες και ειδικότερα αυτές που απαιτούν ATP, όπως είναι η μυϊκή σύσπαση, η πρωτεϊνοσύνθεση κ.α. [19]. Στα θηλαστικά το 20% της παραγόμενης ενέργειας καταναλώνεται στην πρωτεϊνοσύνθεση, η οποία είναι ιδιαίτερα ευάλωτη στις αλλαγές της αναλογίας ATP/ ADP στα κύτταρα [20] και κατ' αυτόν τον τρόπο, η έκπτωση της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσού κατά τη γήρανση δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια ενέργειας στο κύτταρο, γεγονός το οποίο θα διατάρασσε τη σωστή λειτουργία του [21].

Τα κύτταρα βάσει των ανωτέρω, στην προσπάθεια τους να αντισταθμίσουν την έκπτωση λειτουργίας των μιτοχονδρίων, ωθούνται στην παραγωγή νέων, χωρίς όμως κατ' αυτόν τον τρόπο να επιδιορθώνεται πλήρως το έλλειμμα [21, 22]. Αντιθέτως, η αύξηση των μιτοχονδρίων οδηγεί σε μια αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τα οποία προκαλούν επιπλέον οξειδωτικό στρες οδηγώντας σε μια περαιτέρω δυσλειτουργία των κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στη διαδικασία της γήρανσης [23].

Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η συσσώρευση μη λειτουργικών μιτοχονδρίων, λόγω διαταραχής της λειτουργίας της μακροαυτοφαγίας, η οποία ελαττώνεται όπως προαναφέρθηκε κατά τη γήρανση, οδηγεί σε διατάραξη της ομοιόστασης των κυττάρων και συνεπακόλουθα στην απόπτωση τους συμβάλλοντας τοιούτοτρόπως στη διαδικασία της γήρανσης και στην εμφάνιση νευρο – εκφυλιστικών παθήσεων [21, 24].

4. Αμφισβήτηση της θεωρίας των ελευθέρων ριζών

Η θεωρία των ελευθέρων ριζών, σύμφωνα με την οποία η γήρανση οφείλεται σε συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών, αμφισβητήθηκε σθεναρά το 2009, διότι πρώτον, η υπερέκφραση των μεγάλων αντιοξειδωτικών ενζύμων, τα οποία μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες, δεν παρατείνουν τη διάρκεια ζωής σε μελέτες με

ποντίκια [25], δεύτερον, η διαγραφή της μιτοχονδριακής υπεροξειδωτικής δισμουτάσης (Sod-2) αντί να ελαττώσει, παράτεινε τη διάρκεια ζωής στο *Caenorhabditis elegans* [26] σε αντίθεση με τις προηγηθείσες μελέτες σε μύγες και ποντίκια και τρίτον, η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης μέσω διαιτητικού περιορισμού δεν έδρασε προστατευτικά έναντι των βλαβών του σωματικού DNA στη *Drosophila melanogaster* [27]. Τέλος, η ανεπάρκεια της Sod-2 δεν επιτάχυνε τη διαδικασία της γήρανσης ακόμη και σε ποντίκια με δυσλειτουργικά τελομερή [28].

Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι η υπερέκφραση αντιοξειδωτικών έχει μικρή επίδραση στο προσδόκιμο επιβίωσης σε ζυμομύκητες, μύγες και ποντικούς σε σύγκριση με αυτές που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε γονίδια μεταγωγής σήματος. Είναι πιθανό λοιπόν ότι η αυξημένη προστασία έναντι του υπεροξειδίου θα πρέπει να συνοδεύεται και από άλλες μεταβολές για να είναι αποτελεσματική στην παράταση της διάρκειας ζωής.

5. Πρωτεόσταση και πρωτεόλυση

Η πρωτεόσταση ορίζεται ως η διατήρηση ενός λειτουργικού πρωτεώματος μέσω ισορροπημένης ρύθμισης της πρωτεϊνικής σύνθεσης, επισκευής και πρωτεόλυσης. Η ακεραιότητα του πρωτεώματος εξαρτάται από τη συνεχή ροή πρωτεϊνών, η οποία εξασφαλίζεται με την καταστροφή των κατεστραμμένων πρωτεϊνών και αυτών που δεν είναι σωστά αναδιπλωμένες μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας και του συστήματος του πρωτεασώματος της ουβικουϊτίνης (ubiquitin proteasome system, UPS), αμφότερα τα οποία επηρεάζονται στη φυσιολογική γήρανση, στα νοσήματα που σχετίζονται με τη γήρανση και στα σύνδρομα προγηρίας.

5.1 Η αυτοφαγία βελτιώνει την επίδραση της γήρανσης στο Hutchinson–Gilford σύνδρομο πρόωρης γήρανσης

Η μεταβολικά δημιουργούμενη συσσώρευση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και των οξειδωμένων συσσωματωμάτων πρωτεϊνών στη γήρανση και τις ηλικιακά – εξαρτώμενες νόσους υποδεικνύει μια διαταραχή της λειτουργίας των πρωτεολυτικών οδών που απομακρύνουν δυσλειτουργικά οργανίδια και

συσσωματώματα πρωτεϊνών. Η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός αποικοδόμησης στον οποίο τα αυτοφαγώσιμα περικλείουν κατεστραμμένα κυτταρικά συστατικά και προωθούν την πρωτεολυτική αποικοδόμησή τους. Είναι ενδιαφέρον ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού IIS υποβαθμίζει την αυτοφαγία ενεργοποιώντας το μονοπάτι mTOR. Ενώ η προσωρινή εξασθένιση της αυτοφαγίας μέσω του mTOR μπορεί να είναι ευεργετική για την κυτταρική υγεία, προάγοντας τον αναβολισμό, η διατήρηση αυτής της διαταραχής έχει ως αποτέλεσμα την τοξική συσσώρευση πρωτεϊνών σε έγκλειστα, τα οποία δε δύναται να αποδομηθούν. Τα έγκλειστα αυτά περιέχουν τόσο την αυτοφαγική πρωτεΐνη p62 (επίσης γνωστή ως SQSTM1) καθώς και ουβικουΐτίνη, που συνήθως προσελκύουν και προάγουν την πρωτεολυτική αποικοδόμηση των συσσωματωμάτων [29]. Στο σύνδρομο πρόωρης γήρανσης Hutchinson–Gilford (Hutchinson–Gilford progeria syndrome, HGPS) στα συσσωματώματα προγηρίνης έχει εντοπιστεί τόσο p62 όσο και ουβικουΐτίνη [4].

Τα συσσωματώματα προγηρίνης πιστεύεται ότι είναι επίσης επιβλαβή λόγω της παγίδευσης φυσιολογικών κυτταρικών πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας μέσω διαμεσολαβούμενης από ραπαμυκίνη αναστολής του mTOR προάγει τη διάλυση και την κάθαρση των συσσωματωμάτων προγηρίνης και έτσι ελαττώνει τις βλαπτικές επιδράσεις της κυτταρικής γήρανσης. Η θεραπεία με ραπαμυκίνη επεκτείνει τη διάρκεια ζωής των ποντικών καθώς και εκείνη του *C. elegans*, όπου η επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης μέσω της καταστολής της IIS εξαρτώνται από την αυτοφαγία [16].

5.2 Διαταραχή της πρωτεόστασης και της αυτοφαγίας κατά τη γήρανση

Υπάρχουν στοιχεία για τα οφέλη της ενεργοποίησης της αυτοφαγίας στις νόσους που επάγονται από τη γήρανση και αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν ως επί το πλείστον στην αυξημένη κάθαρση των τοξικών συσσωματωμάτων που προάγουν τις ασθένειες και σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του χρόνιου οξειδωτικού στρες. Στη νόσο Alzheimer, τα επίπεδα της λυσοσωμικής πρωτεάσης καζεψίνης D μειώνονται, μειώνοντας την κάθαρση του β-αμυλοειδούς και των αθροίσεων της φωσφορυλιωμένης ταυ πρωτεΐνης. Η ελάττωση της υπερδρανοποιημένης κατάστασης της σηματοδότησης IIS-mTOR αυξάνει την αυτοφαγική κάθαρση αυτών των συσσωματωμάτων και διασώζει τα

ελλείμματα μνήμης σε μοντέλα ποντικών της νόσου Alzheimer [30, 31]. Ασθενείς με νόσο Parkinson έχουν μειωμένα επίπεδα συνδεδεμένης με τη λυσοσομική μεμβράνη γλυκοπρωτεΐνης 2 (LAMP2), η οποία θεωρείται ότι διαταράσσει την κάθαρση των συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης και αυξάνει τον νευρωνικό θάνατο [32]. Επιπλέον, γενετικά ελαττώματα στην παρκίνη και την PINK1 παραβιάζουν την αυτοφαγική κάθαρση των μιτοχονδρίων που εμφανίζουν διαταραχή της λειτουργίας τους στην οικογενή νόσο του Πάρκινσον [29].

Η διαταραχή στη λειτουργία της LAMP2A και της καθεψίνης είναι επίσης γνωστές αιτίες καρδιομυοπάθειας και η διαταραχή της αυτοφαγίας μπορεί να επάγει την αθηροσκλήρωση προάγοντας τη γήρανση και εν συνεχεία τον κυτταρικό θάνατο [4].

6. Ομοιόσταση ασβεστίου

Το Ca^{2+} ελέγχει τις σημαντικότερες κυτταρικές λειτουργίες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μεταξύ αυτών τη γονιμοποίηση, τη μυϊκή συστολή, τις διάφορες φάσεις του μεταβολισμού, τη μεταγραφή των γονιδίων και την απόπτωση. Η εξωκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου είναι 10.000 φορές μεγαλύτερη από την ενδοκυττάρια. Λόγω αυτής της μεγάλης βαθμίδωσης τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου θα πρέπει να ελέγχονται αυστηρά, διότι υπέρβαση των ορίων μπορεί να προκαλέσει απόπτωση του κυττάρου. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με ρυθμιστικές πρωτεΐνες - αντλίες, οι οποίες διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, τις διαμεμβρανικές που βρίσκονται στις μεμβράνες είτε του κυττάρου είτε των ενδοκυττάρων οργανιδίων και τις μη μεμβρανικές που είναι διαλυτές στο κυτταρόπλασμα. Σήμερα είναι γνωστές εννέα, που ανήκουν σε τρεις πολυγονιδιακές οικογένειες. Οι τρεις του ενδο (sarco)-πλάσματικού δικτύου (SERCA) και οι τέσσερις αντλίες της πλασματικής μεμβράνης (PMCA) είναι γνωστές για δεκαετίες ενώ οι δύο Ca^{2+} ATPase (SPCA) έχουν γίνει γνωστές πρόσφατα. Ο αριθμός των ισομορφών των αντλιών αυξάνεται περαιτέρω μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος. Οι τρεις τύποι ενδοπλασματικών αντλιών μοιράζονται βασικά χαρακτηριστικά, αλλά διαφέρουν ως προς ορισμένες ιδιότητες που σχετίζονται με την κατανομή τους στους διάφορους ιστούς, τη ρύθμιση και το

ρόλο που διαδραματίζουν στην κυτταρική ομοιόσταση του Ca^{2+} . Η μοριακή κατανόηση της λειτουργίας όλων των αντλιών έχει λάβει μεγάλη ώθηση από την αναπαραστάση της τρισδιάστατης (3D) δομής της SERCA.

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διεξαχθεί η διαδικασία της γήρανσης συνάδει με διαταραχή της ομοιόστασης του Ca^{2+} . Ένα παράδειγμα που υποστηρίζει τα ανωτέρω είναι ότι τα επίπεδα ασβεστίου του κυτταροπλάσματος σε γηρασμένους νευρώνες ύστερα από διέγερση είναι σαφώς υψηλότερα από τα αναμενόμενα. Αυτό όμως το οποίο παραμένει άγνωστο είναι ο υποκείμενος μηχανισμός αυτής της διαταραχής, ήτοι οφείλεται σε αυξημένη εισροή ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα ή σε καθυστερημένη απομάκρυνσή αυτών [33, 34]. Μελέτες σε επίμυες έχουν δείξει ότι τα ηλικιωμένα άτομα παρουσιάζουν ελάττωση κατά 2 με 10 φορές της έκφρασης γονιδίων που αφορούν τις Ca^{2+} , Na^+/K^+ και H^+ ATPάσες, πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην ρύθμιση της ομοιόστασης του Ca^{2+} [35]. Αν η καθυστερημένη επαναφορά του Ca^{2+} στους γηρασμένους νευρώνες οφείλεται σε μια λειτουργική ή σε μια μη αναστρέψιμη μεταβολή μπορεί ενδεχομένως να εξηγηθεί από το γεγονός ότι όταν τα επίπεδα του Ca^{2+} του κυτταροπλάσματος ελαττώνονται μέσω μείωσης της διέγερσης, τα επίπεδα επαναφοράς στους γηρασμένους νευρώνες βελτιώνονται σημαντικά και προσεγγίζουν τις τιμές που έχουν καταγραφεί για τους νεαρούς νευρώνες [36].

Γήρανση και *Drosophila melanogaster*

Τα μοντέλα – συστήματα που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο για τη μελέτη της μοριακής και γενετικής βάσης της γήρανσης είναι το η *Drosophila melanogaster*, το *C. Elegans* και το ποντίκι.

Η *Drosophila melanogaster* θεωρείται ως ένα από τα πιο καταλληλότερα μοντέλα για τη μελέτη της γήρανσης λόγω της μικρής διάρκειας ζωής της, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 50 έως 80 ημερών , του μικρού μεγέθους του γονιδιώματός της, γεγονός το οποίο καθιστά πιο εύκολη τη γενετική ανάλυση σε σύγκριση με ανώτερους εξελικτικά οργανισμούς και τέλος λόγω του ότι διάφορες λειτουργίες στις μύγες είναι εύκολα αξιολογήσιμες στο εργαστήριο και πολλές από αυτές διαταράσσονται με την αύξηση της ηλικίας.

Η *Drosophila melanogaster* εμφανίζει καθώς αυξάνεται η ηλικία της δυσλειτουργίες, οι οποίες αφορούν την καρδιακή λειτουργία [37-39], τον κερκάρδιο ρυθμό [40-42], την κινητικότητα – συμπεριφορά [43], τη μνήμη[43] και την όσφρηση [44].

1. Καρδιακή λειτουργία

Η καρδιά της μύγας συνίσταται από μία σωληνοειδή δομή η οποία συστέλλεται σε όλη τη διάρκεια της ζωής του εντόμου και έχει ως κύρια λειτουργία την κυκλοφορία της αιμολέμφου από την κοιλιά στο θώρακα και το κεφάλι, έτσι ώστε να μεταφέρονται οι απαραίτητες ουσίες για την διατήρηση της ζωής[38] [45]. Η ύπαρξη ομόλογων γονιδίων μεταξύ της *Drosophila* και ποντικών που επηρεάζουν την ανάπτυξη της καρδιάς υποδεικνύει ότι ορισμένες πτυχές της βιολογίας που αφορούν την καρδιακή λειτουργία είναι κοινές, εύρημα το οποίο υποστηρίχθηκε και από την ταυτοποίηση της μετάλλαξης στο γονίδιο *HERG* , υπεύθυνης για το σύνδρομο μακρού QT στους ανθρώπους [46] και η οποία ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο ομόλογο γονίδιο της *Drosophila* “ether-a-go-go” [47, 48]. Τα παραπάνω κίνησαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας όσον αφορά την καρδιακή λειτουργία και διεξήχθησαν μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι η καρδιακή λειτουργία της *Drosophila* επηρεάζεται με την ηλικία [49, 50].

Ο καρδιακός ρυθμός σε κατάσταση ηρεμίας στην ηλικία των 10 ημερών είναι 286 ± 3 χτύποι/ λεπτό και μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας φτάνοντας τους 249 ± 5 χτύπους/λεπτό στην ηλικία των 30 ημερών και τους 220 ± 3 χτύποι / λεπτό σε ηλικία 50 ημερών [51]. Ο μέγιστος καρδιακός ρυθμός που επιτυγχάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι 339 ± 6 χτύποι / λεπτό σε ηλικία 10 ημερών, 301 ± 9 χτύποι / λεπτό σε ηλικία 30 ημερών και 254 ± 10 χτύποι / λεπτό σε ηλικία 50 ημερών [51]. Διεξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι η ικανότητα αύξησης του καρδιακού ρυθμού ελαττώνεται με την αύξηση της ηλικίας. Μια άλλη ιδιότητα η οποία μελετήθηκε είναι η μέγιστη καρδιακή συχνότητα που επιτυγχάνεται με την χρήση εξωτερικής βηματοδότησης και η οποία είναι 411 ± 13 χτύποι/λεπτό για άτομα ηλικίας 10 ημερών και μόλις $303 \pm$ χτύποι/λεπτό για άτομα ηλικίας 59 ημερών. Ενδιαφέρον επίσης προκαλεί το γεγονός ότι στο 20% των νεαρών ατόμων παρατηρείται ινιδισμός μετά την εξωτερική ηλεκτρική βηματοδότηση αλλά η καρδιακή λειτουργία ανακάμπτει μετά το πέρας της βηματοδότησης ενώ στα ηλικιωμένα άτομα το ποσοστό που εμφανίζει ινιδισμό ανέρχεται στο 70% και η επαναφορά της καρδιακής λειτουργίας σε φυσιολογικά επίπεδα παρατηρείται μόνο στο 60% των ηλικιωμένων ατόμων [51].

2. Κιρκάδιος ρυθμός

Μια από τις θεμελιώδεις αλλαγές που επέρχεται με την πάροδο του χρόνου και επηρεάζει την ποιότητα ζωής των ανθρώπων είναι οι διαταραχές του ύπνου [52, 53]. Η *Drosophila* είναι ένα μοντέλο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του κιρκάδιου ρυθμού. Μοριακοί μηχανισμοί του κιρκάδιου ρυθμού της *Drosophila* διατηρούνται στα θηλαστικά, γεγονός που αποδεικνύεται από την ανακάλυψη ότι το οικογενές προηγμένο σύνδρομο ύπνου, που εμφανίζεται στους ανθρώπους, έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις σε γονίδια που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε μύγες [54-56]. Η μελέτη του ύπνου στη *Drosophila* κατέδειξε διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία και οι οποίες συνίστανται σε διακοπτόμενο ύπνο. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τις μοριακές μεταβολές στην έκφραση που μπορεί να οδηγήσουν σε εξασθένηση των κιρκάδιων ρυθμών. [42, 57].

3. Κινητική λειτουργία – συμπεριφορά

Για την μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς στη *Drosophila* έχει χρησιμοποιηθεί ο αρνητικός γεωτακτισμός ο οποίος εμφανίζει σταδιακή έκπτωση κατά την διάρκεια της ζωής της μύγας. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο χρόνος που απαιτείται για την αναρρίχηση μιας μύγας σε συγκεκριμένο ύψος ως απάντηση σε συγκεκριμένο ερέθισμα, αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας καθώς επίσης και ότι το ποσοστό των μυγών που καταφέρνουν να ολοκληρώσουν την δοκιμασία αναρρίχησης μειώνεται. Ο αρνητικός γεωτακτισμός εξαρτάται και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, με πτώση της ικανότητας των μυγών για αναρρίχηση με την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο αρνητικός γεωτακτισμός σχετίζεται με τη φυσιολογική και όχι με την χρονολογική ηλικία [58, 59].

4. Μνήμη – μάθηση

Η γήρανση είναι γνωστό ότι σχετίζεται με δυσλειτουργίες που αφορούν τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες. Για τη μελέτη και αυτών των δυσλειτουργιών αυτών χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο σύστημα η *Drosophila*. Η μνήμη παίζει καίριο ρόλο στη διαμόρφωση της συμπεριφοράς του ζώου κατά τη διάρκεια της ζωής του και είναι σημαντική για την επιβίωση και την αναπαραγωγή του [60]. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε *Drosophila* έχουν βοηθήσει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση των μορφών μνήμης [61-63]. Στη *Drosophila*, μια μονήρης δοκιμή συνειρμικής μάθησης ή περισσότερες επαναλαμβανόμενες δοκιμές επάγουν τρία διαφορετικά είδη μνήμης: δύο ασταθείς μορφές – την βραχυπρόθεσμη (short term memory, STM) και τη μεσοπρόθεσμη μνήμη (middle term memory, MTM) και μια ενοποιημένη μνήμη – την anesthesia resistant memory (ARM). Δοκιμές που χωρίζονται από διαστήματα των 15-20 λεπτών επάγουν την μακροπρόθεσμη μνήμη (long term memory, LTM) [64]. Έχει αποδειχθεί ότι η μνήμη ξεκινά να δυσλειτουργεί κατά την 15η ημέρα της ζωής και η μορφή της μνήμης που είναι πιο ευάλωτη στον παράγοντα «ηλικία», είναι η μεσοπρόθεσμη μνήμη, MTM [65]. Έχει προταθεί ότι ο σχηματισμός της μακροπρόθεσμης, αλλά όχι της ARM μνήμης, εξαρτάται από το σχηματισμό της MTM [66]. Αυτά τα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι η

γήρανση μπορεί δυνητικά να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο την LTM από την ARM μνήμη, η οποία φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη στη γήρανση συγκριτικά με την τελευταία. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο είναι ότι οι υποδοχείς του NMDA (N-μεθυλ-D-ασπαρτικό) μειώνονται με την πάροδο της ηλικίας [67]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ελάττωση του NMDA επηρεάζει την LTM, αλλά όχι την ARM μνήμη[68, 69]. Η έναρξη της εξασθένησης της μνήμης, όπως προαναφέρθηκε συμβαίνει σε ηλικία 15 ημερών και επιδεινώνεται περαιτέρω. Μολονότι οι βλάβες που προκαλούνται από ROS εμπλέκονται στην εμφάνιση δυσλειτουργίας της μνήμης [70-72], δεδομένα δείχνουν ότι δεν προκαλείται από ROS στη *Drosophila*. Εάν τα ROS αποτελούσαν την αιτία, μια αύξηση των ROS θα έπρεπε να ενίσχυε περαιτέρω τις δυσλειτουργίες αυτές. Ωστόσο, ούτε η οξεία ούτε η χρόνια διατροφή με paraquat και H₂O₂ αύξησαν τις διαταραχές της μνήμης, παρόλο που μείωσαν τη διάρκεια ζωής.

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι νευρικές λειτουργίες που απαιτούνται για το σχηματισμό της MTM είναι ιδιαίτερα προστατευμένες από τα ROS μέσω ενός ισχυρού αντι-ROS συστήματος το οποίο περιλαμβάνει διάφορες πρωτεΐνες όπως Cat, SOD1, SOD2 και Hsp22. Ενώ η σίτιση με paraquat και H₂O₂ δεν επηρέασε τη μνήμη σε άγριου τύπου μύγες, στελέχη με ελαττωμένη δραστηριότητα Hsp22, cat και SOD1 παρουσίασαν διαταραχές της μνήμης σε ηλικία τριών ημερών ύστερα από σίτιση με paraquat και H₂O₂ και διαταραχή μνήμης σε ηλικία 10 ημερών, άνευ σίτισης με paraquat και H₂O₂. Τα ανωτέρω αποδεικνύουν ότι τα ROS προκαλούν προβλήματα μνήμης όταν η δραστηριότητα του αντι-ROS συστήματος παραβλάπτεται. Ωστόσο, η σίτιση με paraquat δεν προκάλεσε απόπτωση νευρώνων στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών μυγών. Ενώ τα προαναφερθέντα δείχνουν ότι τα ROS δεν εμπλέκονται στην έναρξη των διαταραχών της μνήμης, δεν αποκλείεται η πιθανότητα τα ROS να εμπλέκονται στην εξέλιξη των διαταραχών αυτών. Προς αυτήν την κατεύθυνση, συγκλίνουν τα ευρήματα από μελέτες σε *Drosophila* ότι παρόλο που η έκφραση της hsp22 αυξάνεται κατά την έναρξη των διαταραχών της μνήμης, η έκφραση της στον εγκέφαλο μειώνεται κατά την περαιτέρω γήρανση [73]. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι τα ROS μπορούν να δράσουν επιβαρυντικά στη δυσλειτουργία της μνήμης.

Η διασαφήνιση των μηχανισμών που οδηγούν σε ελλείμματα μνήμης θα

βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των γνωστικών ικανοτήτων κατά τη διάρκεια της γήρανσης, συμβάλλοντας στην διαφώτιση εάν η φυσική επιλογή ευνοεί τη διατήρηση κάποιας συγκεκριμένης μορφής μνήμης[74].

Γήρανση και *homo sapiens sapiens*

Ο κύριος παράγοντας κινδύνου για τη νόσο Alzheimer (NA) είναι η ηλικία, με απότομη αύξηση της επίπτωσης της μετά τα 60 έτη. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα που ασχολείται με τη μελέτη και τις αλλαγές των γνωστικών λειτουργιών να προτείνει ότι ο δρόμος για την κατανόηση της NA περνά μέσα από τη μελέτη της σχέσης της με τη φυσιολογική γήρανση, θέτοντας ερωτήματα όπως, γιατί ο γερασμένος εγκέφαλος είναι πιο επιρρεπής στη NA εν συγκρίσει με τον εγκέφαλο μεσηλικών ή νεαρών ατόμων; Ποια είναι τα χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις φυσιολογικές μεταβολές που παρατηρούνται κατά τη γήρανση από τις μεταβολές που παρατηρούνται στα αρχικά στάδια NA; Πολλές μελέτες έως τώρα έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο της εγκεφαλικής ατροφίας και της συσσώρευσης του αμυλοειδούς στον εγκέφαλο υγιών και ατόμων πασχόντων από NA αλλά από την προσπάθεια κατανόησης του παθογενετικού μηχανισμού της NA δεν μπορεί να λείπει η μελέτη των επιπτώσεων του κύριου αιτιολογικού παράγοντα της NA -της ηλικίας στον εγκέφαλο.

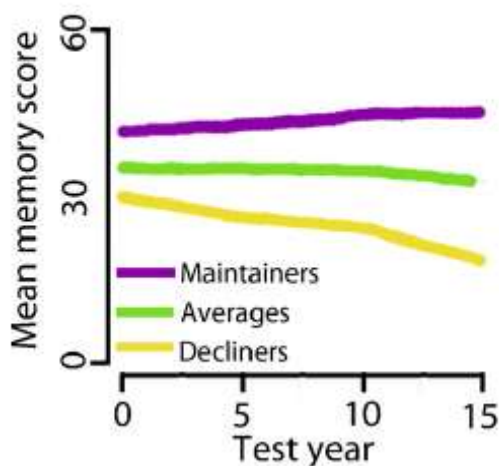
Ωστόσο, αυτή η υπόθεση μπορεί να αντιστραφεί: αν καταστεί κατανοητό γιατί ο γερασμένος εγκέφαλος είναι πιο ευαίσθητος στην ανάπτυξη NA, ίσως η κατανόηση της φυσιολογικής γήρανσης του εγκεφάλου να γίνει πιο εύκολη. Με την αύξηση του γηράσκοντος πληθυσμού, η κατανόηση των φυσιολογικών αλλαγών στον εγκέφαλο είναι αναμφίβολα εξίσου σημαντικές με την κατανόηση των αλλαγών που παρατηρούνται στη NA.

1. Τι είναι «φυσιολογικό» κατά τη γήρανση;

1.1 Εύρος, μοτίβο και χρονικό πλαίσιο των αλλαγών

Διαταραχές σε συγκεκριμένους γνωστικούς τομείς όπως στη νοητική ταχύτητα, στις επιτελεστικές λειτουργίες και στην επεισοδιακή μνήμη είναι συνήθεις κατά τη γήρανση, ενώ οι λεκτικές ικανότητες και η αντίληψη του περιβάλλοντος συνήθως διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, υπάρχει διαφωνία σχετικά με το κατά πόσο οι μεταβολές που παρατηρούνται στους ηλικιωμένους ενήλικες αντανakλούν διαδικασίες οι οποίες ξεκινούν από την νεανική ηλικία ή αν οι αλλαγές αυτές ξεκινούν από τη μέση ηλικία και έπειτα.

Αυτό που είναι ευρέως αποδεκτό είναι ότι η επεισοδιακή μνήμη διαταράσσεται μετά την ηλικία των 60 , χωρίς να αποκλείεται και διαταραχή αυτής πιο νωρίς. Σε μια διαχρονική μελέτη των Josefsson και συνεργατών [75], η οποία διήρκησε πάνω από 15 χρόνια με περισσότερους από 1500 συμμετέχοντες, οι συγγραφείς μπόρεσαν να χωρίσουν τους συμμετέχοντες σε τρεις ομάδες όσον αφορά την αλλαγή της επεισοδιακής μνήμης –στην ομάδα που οι συμμετέχοντες διατηρούσαν τη μνήμη τους (18%), σε εκείνους που εμφάνισαν διαταραχή σύμφωνη με την ηλικία τους (68%) και σε αυτούς που εμφάνισαν διαταραχή παραπάνω του αναμενόμενου (13%) (Εικόνα 1). Η σωματική δραστηριότητα, το θήλυ φύλο και η διαβίωση με κάποιον αυξάνουν την πιθανότητα κάποιος να ανήκει στην ομάδα των «διατηρητών» της μνήμης, ενώ το χαμηλό μορφωτικό επίπεδο, το άρρεν φύλο και το χαμηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο αυξάνουν την πιθανότητα κάποιος να παρουσιάζει διαταραχή μεγαλύτερη της αναμενόμενης για την ηλικία του.



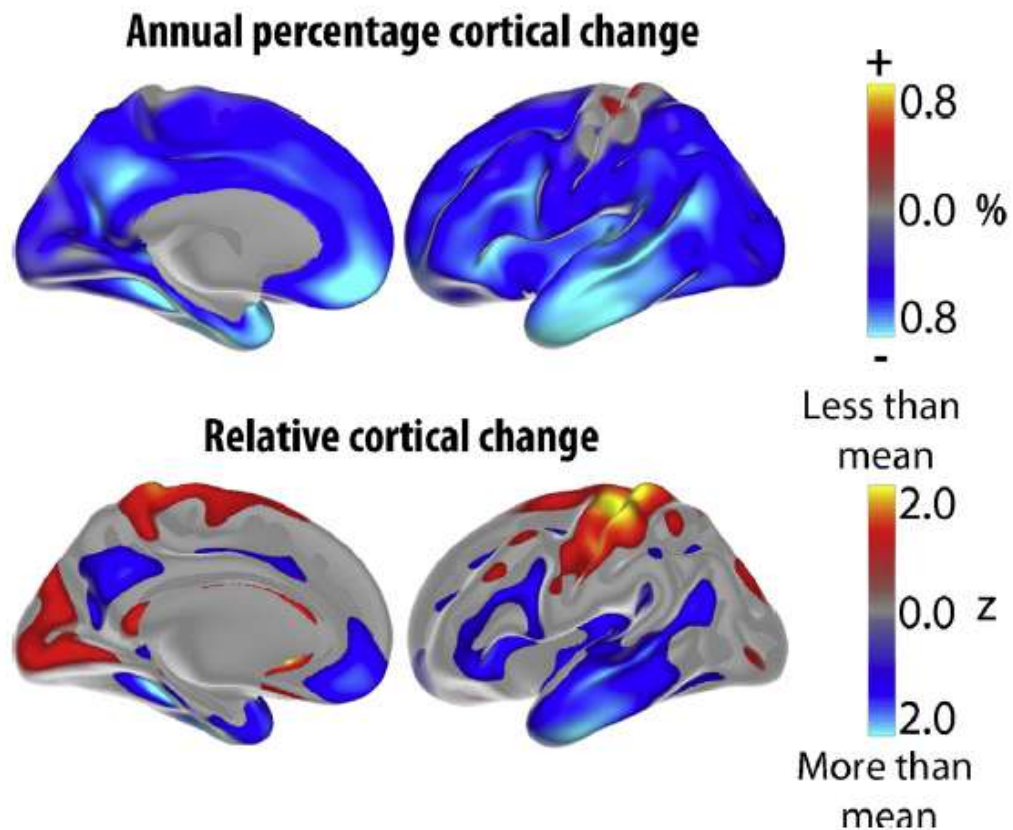
Εικόνα 1: Διαχρονική μείωση της επεισοδιακής μνήμης κατά τη γήρανση. Απεικονίζονται οι τρεις ομάδες συμμετεχόντων καθώς και οι αρχικές διαφορές (έναρξη στο 0 του άξονα χ) [76].

Μια δημοφιλής άποψη είναι ότι τουλάχιστον ένα μέρος των ηλικιο-εξαρτώμενων αλλαγών στη γνωστική λειτουργία προκαλείται από δομικές αλλαγές στον εγκέφαλο. Φυσικά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο εγκάρσιες (crosssectional) μελέτες συσχέτισης του όγκου του εγκεφάλου και των γνωστικών λειτουργιών, για να στηριχθούν τέτοιοι ισχυρισμοί. Είναι αναγκαία η χρήση

λεπτομερούς χαρτογράφησης των τμηματικών αλλαγών του εγκεφάλου με επιμήκεις μελέτες και εν συνεχεία συσχέτιση τους με διαχρονικές μελέτες των αλλαγών των γνωστικών λειτουργιών προκειμένου να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το νευροβιολογικό υπόβαθρο της ηλικιο-εξαρτώμενης διαταραχής των γνωστικών λειτουργιών.

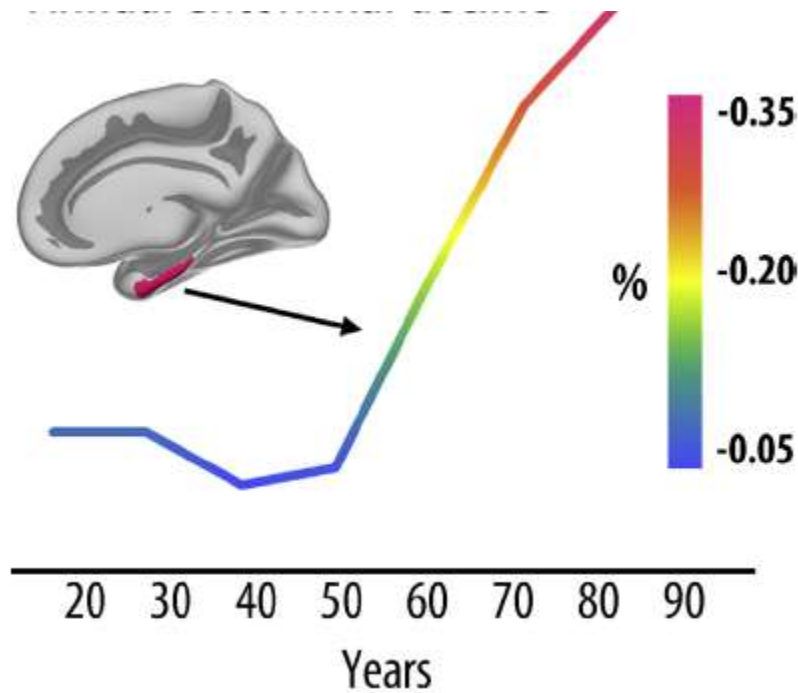
Τα τελευταία έτη με τη χρήση της μαγνητικής τομογραφίας (MRI) κατέστη εύκολος ο υπολογισμός της μείωσης του όγκου του εγκεφάλου, με ετήσια μείωση της τάξης του 0,2-0,5%. Σημαντική μεταβολή έχει παρατηρηθεί σχεδόν σε ολόκληρο τον εγκεφαλικό φλοιό, αλλά με σημαντική ετερογένεια μεταξύ των διάφορων περιοχών. Οι μετωπιαίοι λοβοί θεωρούνται ιδιαίτερα ευάλωτοι στις αλλαγές της ηλικίας, υποστηρίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις θεωρίες που βασίζουν τη γήρανση στους μετωπιαίους λοβούς. Ωστόσο, μελέτες δείχνουν ότι σε υγιείς ηλικιωμένους ενήλικες, οι κροταφικές περιοχές υφίστανται μειώσεις στον όγκο τους με την πάροδο του χρόνου εφάμιλλων με αυτών που παρατηρούνται στις μετωπιαίες περιοχές. Έχει αναφερθεί ότι ο ετήσιος ρυθμός ατροφίας για τον υπόκαμπο είναι της τάξης 0,79-2,0% και 0,3-2,4% για τον ενδορινικό φλοιό αντίστοιχα [77]. Έτσι, η ατροφία που σχετίζεται με την ηλικία δεν περιορίζεται στους μετωπιαίους λοβούς.

Οι ηλικιο-εξαρτώμενες αλλαγές του όγκου του φλοιού απεικονίζονται στην εικόνα 2 που δείχνει ποσοστιαία μεταβολή κατά τη διάρκεια ενός έτους σε υγιείς ηλικιωμένους. Οι συγκεκριμένοι συμμετέχοντες παρέμειναν ελεύθεροι ήπιας γνωστικής διαταραχής (mild cognitive impairment, MCI) ή διάγνωσης ΝΑ για τρία έτη μετά την αρχική απεικόνιση. Όπως φαίνεται, ο όγκος του φλοιού μειώνεται στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του εγκεφάλου, με ετήσιο ρυθμό περίπου 0,5% στις περισσότερες περιοχές. Οι μετωπιαίοι και οι κροταφικοί λοβοί ξεχωρίζουν με υψηλότερο βαθμό σχετικής αλλαγής, με ουσιαστική αλλαγή να παρατηρείται επίσης και στη μέση βρεγματική περιοχή (προσφηνοειδές λόβιο και στο γειτονικό φλοιό του προσαγωγίου). Αυτό το κυρίαρχο μετωπο-κροταφικό πρότυπο ατροφίας είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα αρκετών ανεξάρτητων επιμηκών μελετών, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της εγκεφαλικής ατροφίας.



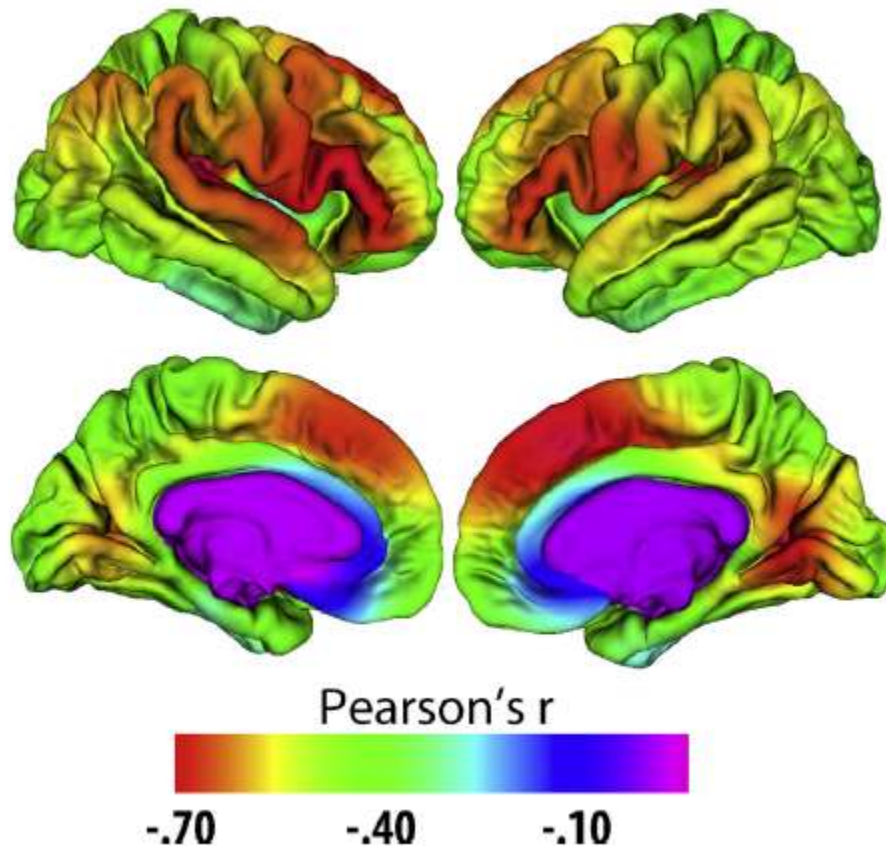
Εικόνα 2: Επιμήκεις ογκομετρικές μειώσεις του όγκου του φλοιού κατά τη γήρανση. Στο πάνω πλαίσιο φαίνεται η ετήσια ποσοστιαία μείωση του όγκου του εγκεφαλικού φλοιού σε ένα δείγμα 132 υγιών ηλικιωμένων (ηλικίας από 55-91 έτη κατά την έναρξη). Στο κάτω πλαίσιο καταδεικνύονται τα ίδια δεδομένα, αλλά οι τιμές έχουν επανεκτιμηθεί ώστε να αποδίδεται ένα μέσο μηδέν και μια τυπική απόκλιση, για καλύτερη απεικόνιση της περιοχικής κατανομής της αλλαγής. Τα μπλε-κυανά χρώματα αντιπροσωπεύουν περιοχές που μειώνονται περισσότερο σε ένα χρόνο από ό,τι το υπόλοιπο του φλοιού, ενώ τα κόκκινα-κίτρινα χρώματα αντιπροσωπεύουν περιοχές με μικρότερη μείωση από το μέσο όρο. Το συχνά παρατηρούμενο μετωπο-κροταφικό πρότυπο της αυξημένης ατροφίας είναι εμφανές, με το μέσο βρεγματικό φλοιό / και το φλοιό του οπίσθιου προσαγωγίου ως επιπρόσθετες περιοχές με υψηλά ποσοστά ατροφίας κατά τη γήρανση [76].

Στο σημείο αυτό, τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ το σύνολο του όγκου του φλοιού μειώνεται σχεδόν γραμμικά από την ηλικία των 20 ετών, ο υπόκαμπος είναι σχετικά σταθερός έως την ηλικία των 60 ετών, μετά την οποία παρουσιάζει σημαντική μείωση (Εικόνα 3) [76].



Εικόνα 3: Ετήσια μείωση του όγκου του ενδορινικού φλοιού. Παρατηρείται σημαντική αύξηση της ατροφίας από τα 50 έτη. Η επιτάχυνση της μείωσης στους ηλικιωμένους επιβεβαιώθηκε με εγκάρσιες μελέτες, δεδομένα τα οποία επιβεβαιώθηκαν και με επιμήκεις μελέτες [78].

Εκτός από την ελάττωση του όγκου του εγκεφαλικού φλοιού, μελέτες έχουν δείξει ότι το πάχος του φλοιού ελαττώνεται με την πάροδο της ηλικίας υπερβαίνοντας το -70 στις πιο ευάλωτες περιοχές[76]. Στην εικόνα 4 φαίνεται η συσχέτιση Pearson μεταξύ ηλικίας και πάχους του φλοιού σε μεγάλο δείγμα υγιών ενηλίκων. Ισχυροί συσχετισμοί παρατηρούνται όχι μόνο στον μετωπιαίο φλοιό, αλλά και στον πλάγιο κροταφικό φλοιό, όπως φαίνεται και στην εικόνα.



Εικόνα 4: Συσχέτιση ηλικίας-πάχους φλοιού σε ένα υγιές δείγμα ενήλικων ($n = 1100$, ηλικία 18-94 ετών). Η συσχέτιση υπερβαίνει το -0.40 σε μεγάλες περιοχές, προσεγγίζοντας το -0.70 στον προμετωπιαίο και κροταφικό φλοιό.[78]

1.2 Πώς γίνεται η καλύτερη ποσοτικοποίηση των αλλαγών του εγκεφάλου;

Οι τεχνικές τμηματοποίησης βάσει επιφάνειας του εγκεφάλου επιτρέπουν τη μέτρηση των δομικών φλοιϊκών μεταβολών βάσει διαφόρων παραμέτρων, όπως του πάχους, της έκτασης, του όγκου και της ελίκωσης στη φαιά και λευκή ουσία. Ο όγκος είναι η πιο περίπλοκη παράμετρος ερμηνείας, δεδομένου ότι είναι προϊόν δύο γενετικά ανεξάρτητων μετρήσεων (του πάχους και του εμβαδού) και επηρεάζεται από διαφορετικές νευροβιολογικές ιδιότητες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της εξέλιξης. Το εμβαδόν έχει αυξηθεί πάρα πολύ κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, χωρίς συγκρίσιμη αύξηση του πάχους. Στους ενήλικες ανθρώπους, έχουν βρεθεί πτωχοί ή ακόμη και αρνητικοί συσχετισμοί μεταξύ του φλοιϊκού πάχους και της επιφάνειας. Για το γεγονός αυτό έχει προταθεί ότι η ανάπτυξη της μυελίνης, μπορεί να απωθήσει τον φλοιό προς την επιφάνεια. Αυτό υποτίθεται ότι

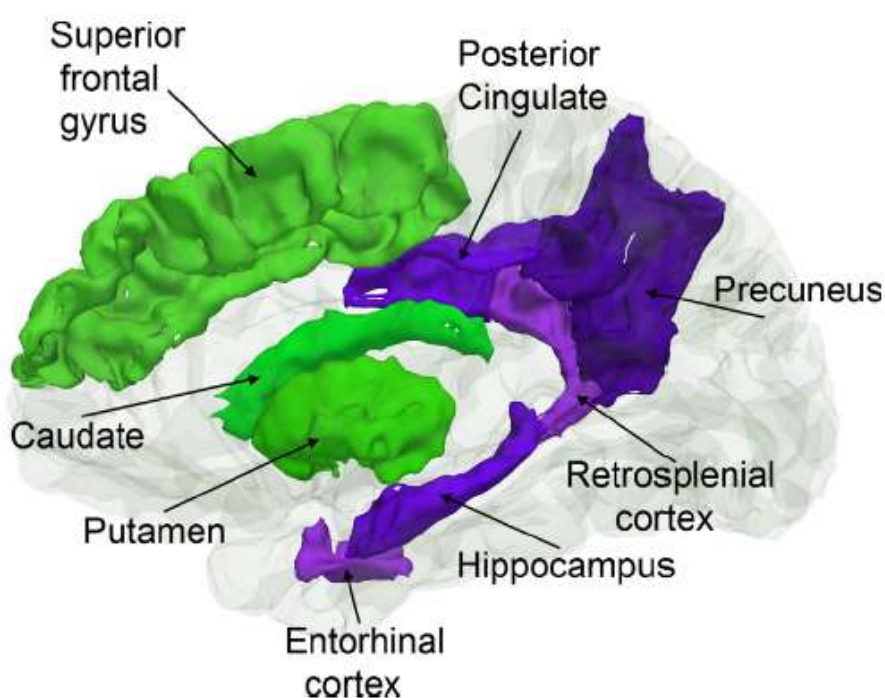
συμβάλλει στην απεμπλοκή των γειτονικών νευρωνικών στηλών και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων περιοχών του φλοιού για καλύτερη διαφοροποίηση των προσαγωγών σημάτων. Το μοντέλο αυτό παρέχει ένα πιθανό λειτουργικό μηχανισμό για την αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πάχους του φλοιού και της επιφάνειας του. Λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί που συγκρίνουν τις ηλικιοεξαρτώμενες διαφορές μεταξύ του πάχους, της επιφάνειας και του όγκου, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι το πάχος επηρεάζεται περισσότερο από το εμβαδόν. Εν ολίγοις, αν και ο όγκος μπορεί να είναι ένα ευαίσθητο μέτρο της ατροφίας και των διαφορών που σχετίζονται με την ηλικία τα υποκείμενα νευροβιολογικά αίτια που οδηγούν σε μείωση του όγκου είναι δύσκολο να προσδιοριστούν λόγω της ανεξαρτησίας των δύο παραμέτρων που τον συνιστούν.

Λόγος γίνεται και για τις αλλαγές στον μεταβολισμό της γλυκόζης κατά τη γήρανση όπως αυτός μελετάται με τη χρήση FDG-PET ,δηλ. για το εάν αυτές πραγματοποιούνται πριν από, κατά τη διάρκεια ή είναι συνέπεια της ατροφίας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης ελαττώνεται στη φυσιολογική γήρανση, π.χ. στην πρόσθια περιοχή του προσαγωγίου και έχει προταθεί ότι περιοχές με αυξημένο μεταβολισμό γλυκόζης εκπροσωπούν περιοχές όπου διατηρούνται οι γνωστικές λειτουργίες. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ νευροεκφυλισμού, γνωστικής λειτουργίας και μεταβολισμού δεν είναι απλή, καθώς άλλες μελέτες έχουν βρει υπερμεταβολισμό σε ασυμπτωματικούς ηλικιωμένους με αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς, π.χ. αμφοτερόπλευρα στην άνω κροταφική έλικα [79].

1.3. Αρχές των ηλικιοεξαρτώμενων περιοχικών αλλαγών: ανάπτυξη και εξέλιξη

Όπως προαναφέρθηκε, οι μεταβολές στον εγκέφαλο είναι σχετικά καθολικές κατά την κανονική γήρανση, χωρίς να περιορίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Παρόλα αυτά, παρατηρείται σημαντική ετερογένεια, με αρκετές μελέτες να καταδεικνύουν ότι ορισμένες περιοχές όπως οι μετωποκροταφικές, είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στις επιπτώσεις της γήρανσης. Έχουν γίνει προσπάθειες για να εξηγηθεί αυτή η αυξημένη ευπάθεια ορισμένων περιοχών με την πάροδο της ηλικίας

βασιζόμενες σε διαφορετικές αρχές. Μια ιδιαίτερως διαδεδομένη θεωρία είναι ότι οι περιοχές που ωριμάζουν τελευταίες είναι πιο ευάλωτες στην επίδραση της ηλικίας και συχνά αναφέρεται ως «*θεωρία της ρετρογονίας*». Αυτές οι περιοχές τείνουν να έχουν μια πιο περίπλοκη αρχιτεκτονική από εκείνες που αναπτύσσονται νωρίς. Η διαπίστωση ότι η αργή ωρίμανση των μέσων μετωπιαίων περιοχών, όπως του προμετωπιαίου φλοιού, τον καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτο στη γήρανση έχουν οδηγήσει στην διατύπωση μιας υπόθεσης σύμφωνα με την οποία υπάρχει μια πρόσθια προς οπίσθια κλίση της ηλικιακής ευπάθειας, η οποία προσπαθεί να εξηγήσει τη μείωση της εκτελεστικής λειτουργίας που παρατηρείται συχνά σε υγιή ηλικιωμένα άτομα. Για παράδειγμα, ενώ ο εκφυλισμός του μέσου κροταφο-βρεγματικού δικτύου μνήμης είναι χαρακτηριστικός για τη ΝΑ, η αλλαγή του μετωποραβδωτού δικτύου έχει προταθεί ως ο ακρογωνιαίος λίθος της φυσιολογικής γήρανσης (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μετωπο-ραβδωτό δίκτυο και κροταφο-βρεγματικό δίκτυο. Ενώ η κανονική γήρανση επηρεάζει το μετωπο-ραβδωτό δίκτυο (πράσινες δομές), η ΝΑ έχει επιπρόσθετες επιδράσεις στο κροταφο-βρεγματικό δίκτυο, σημαντικό για τη λειτουργία της επεισοδιακής μνήμης (μωβ δομές). Superior frontal gyrus: άνω μετωπιαία έλικα, posterior cingulate: οπίσθιο προσαγωγίο, caudate: κερκοφόρος πυρήνας, putamen: κέλυφος, precuneous : προσφηνοειδές λόβιο, Retrosplenial cortex: σπληνίο του μεσολοβίου, hippocampus: υπόκαμπος, Entorhinal cortex: ενδορινικός φλοιός) [76].

Η διαταραχή των επιτελεστικών λειτουργιών μπορεί να επηρεάσει και τη λειτουργία της μνήμης και να συμβάλλει σε προβλήματα μνήμης σε μη ανοϊκούς ηλικιωμένους. Αυτό μπορεί να συμβεί ακόμη και σε ασθενείς με MCI. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς με MCI έχουν καλύτερες επιδόσεις σε δοκιμασίες επεισοδιακής μνήμης, με την καλύτερη επίδοση στις δοκιμασίες αυτές να σχετίζεται με παχύτερο φλοιό σε περιοχές εκτός του κροταφικού λοβού, συμπεριλαμβανομένων των προμετωπιαίων περιοχών. Από αυτή την άποψη, παρόλο που η έκπτωση της επεισοδιακής μνήμης παρατηρείται και στη NA και στη φυσιολογική γήρανση, η έκπτωση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορετικό δομικό υπόβαθρο. Έτσι, η υπόθεση της ρетроγονίας έχει πολλές ομοιότητες με την παραδοσιακή "μετωπιαία θεωρία της γήρανσης".

Αν και το μοντέλο της ρетроγονίας είναι σύμφωνο με μερικά από τα δεδομένα σχετικά με τη γήρανση του εγκεφάλου, υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με την ωρίμανση του φλοιού και της γήρανσης. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση του μέσου κροταφικού λοβού. Οι δομές του μέσου κροταφικού λοβού τυπικά ωριμάζουν μετρίως μετά την εφηβεία αλλά επηρεάζονται σημαντικά από την ηλικία, ειδικά μετά από τα 60 έτη. Έτσι, η θεωρία της ρетроγονίας δεν ισχύει για την δομή που επηρεάζεται πιο πολύ κατά τη γήρανση – τη μέση κροταφική περιοχή.

1.4 Αρχές των ηλικιοεξαρτώμενων περιφερειακών αλλαγών του φλοιού: δίκτυο προεπιλεγμένης λειτουργίας (default mode network, DMN)

Είναι ενδιαφέρον ότι το προσφάτως περιγραφέν δίκτυο προεπιλεγμένης λειτουργίας (default mode network, DMN) εμπεριέχεται εξολοκλήρου στις περιοχές του εγκεφάλου που παρουσιάζουν τους υψηλότερους ρυθμούς ατροφίας. Το DMN αποτελείται από ένα σύνολο εγκεφαλικών περιοχών των οποίων η δραστηριότητα μειώνεται κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης ενός ευρέως φάσματος εργασιών και οι οποίες κατά κανόνα είναι επίσης ενεργές κατά τη διάρκεια περιόδων ανάπαυσης. Οι διαφορετικές δομές του DMN είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους και με το

μεταιχμιακό σύστημα και συνδέονται επίσης με κινητικές και αισθητικές περιοχές. Οι δομικές και λειτουργικές πτυχές του DMN επηρεάζονται τόσο στη ΝΑ όσο και στη φυσιολογική γήρανση. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν τουλάχιστον επτά σημαντικές περιοχές που εμπεριέχονται στο σύστημα ενεργοποίησης του DMN και της επεισοδιακής μνήμης: κεντρική μετωπιαία περιοχή, κατώτερος βρεγματικός φλοιός, ο μέσος κροταφικός λοβός, ο προμετωπιαίος λοβός, το προσφηνοειδές λόβιο, ο ενδορινικός φλοιός και ο υπόκαμπος. Αρχικά είχε προταθεί ότι το DMN αποτελείται από περιοχές υψηλής οργάνωσης που φθάνουν αργά σε υψηλά επίπεδα ωρίμανσης κάτι το οποίο δεν μπορεί να θεωρηθεί καθολικό διότι π.χ. το προσφηνοειδές λόβιο έχει υποστεί μικρή διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.

Φυσικά, το DMN έχει αποτελέσει πρωταρχικό στόχο για τη διερεύνηση της συσχέτισης των δομικών αλλαγών με τη διαταραχή των γνωστικών λειτουργιών τόσο στη ΝΑ όσο και στη φυσιολογική γήρανση. Έχει δειχθεί ότι τα ποσοστά ετήσιας φλοιώδους μείωσης του όγκου στις περιοχές αυτές είναι υψηλότερη από ότι στις άλλες φλοιώδεις περιοχές, υποδεικνύοντας ότι το DMN είναι ευάλωτο στη φυσιολογική γήρανση, οι λόγοι όμως για τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη [76]. Το DMN φαίνεται να παρέχει μια καλύτερη αιτιολόγηση της κατανομής των δομικών αλλαγών του φλοιού στη φυσιολογική γήρανση από τη θεωρία της ρετρογονίας.

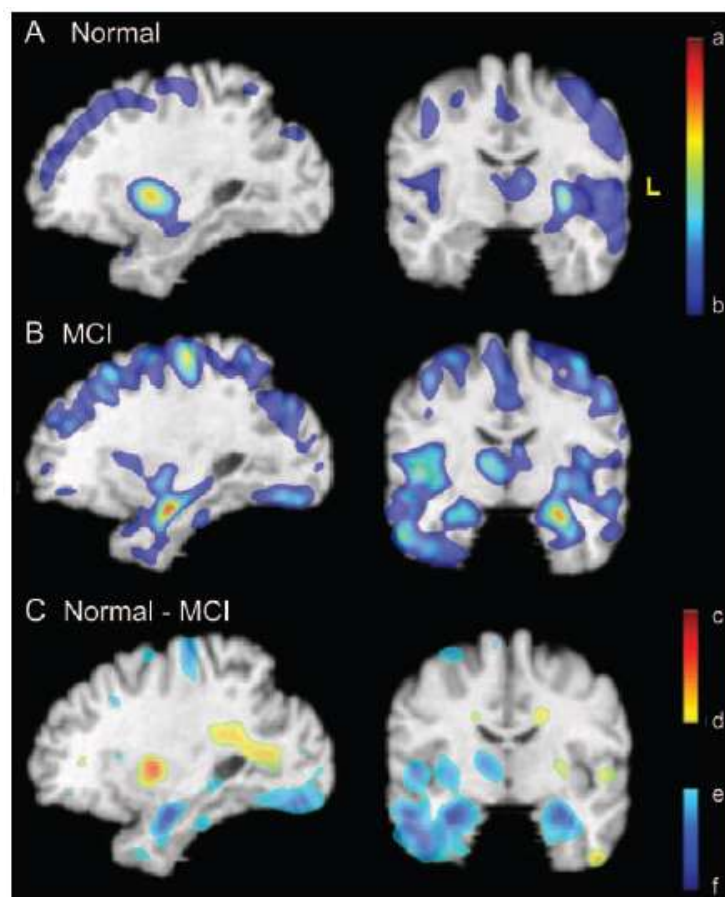
2. Φυσιολογική γήρανση vs ΝΑ: Πώς να οριστούν οι διαφορές;

Η άνοια που σχετίζεται με την ηλικία συνήθως έχει αργή και σταδιακή εμφάνιση, με την ατροφία να εκδηλώνεται χρόνια πριν από τα κλινικά συμπτώματα [80]. Κάποιοι υποστηρίζουν ότι η έκπτωση που παρατηρείται προκαλείται από μη ανιχνευθείσα υποκείμενη παθολογία και δεν αποτελεί χαρακτηριστικό της φυσιολογικής γήρανσης [81]. Μια σημαντική επίδραση του χρονικού χάσματος μεταξύ της ανιχνεύσιμης εγκεφαλικής και κλινικής έκφρασης της άνοιας είναι αυτές οι περιπτώσεις που δεν έχουν παρουσιάσει κλινική συμπτωματολογία άνοιας σε υποθετικά φυσιολογικά δείγματα τα οποία οδηγούν σε συμπεράσματα σχετικά με

τη φυσιολογική γήρανση του εγκεφάλου, τα οποία καταυτόν τον τρόπο δεν αντικατοπτρίζουν την πραγματικότητα. Αυτό αποτελεί έναν μεγάλο προβληματισμό, δεδομένου ότι το ποσοστό των ηλικιωμένων με μη ανιχνευμένη νευροεκφυλιστική νόσο αναμένεται να αυξηθεί με την αύξηση της ηλικίας του πληθυσμού. Ωστόσο, οι διαφορές στους βιοδείκτες που παρατηρούνται στη ΝΑ θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην επίλυση αυτού του θέματος.

Όσον αφορά το μοτίβο της ατροφίας στη ΝΑ, δεν είναι τυχαίο, αλλά συνήθως εξελίσσεται αργά, ακολουθώντας μια συγκεκριμένη πορεία που περιλαμβάνει πρώτα τον ενδορρινικό φλοιό και τον ιππόκαμπο, και στη συνέχεια εξαπλώνεται σε γειτονικές περιοχές όπως στο μέσο βρεγματικό λοβό, τον πλάγιο κροταφικό και τον μετωπιαίο, επηρεάζοντας τελικά όλες τις περιοχές του φλοιού. Στην εικόνα 6, φαίνεται ο ρυθμός ατροφίας σε υγιείς μάρτυρες έναντι ασθενών με MCI ή ΝΑ. Ακόμη και στο στάδιο της MCI, η ετήσια ατροφία είναι αρκετές φορές υψηλότερη από αυτήν που παρατηρείται στην κανονική γήρανση, με περαιτέρω αύξηση του ρυθμού ατροφίας όταν η διάγνωση της ΝΑ αποτελεί πλέον γεγονός.

Το συγκεκριμένο πρότυπο ατροφίας που παρατηρείται στον εγκέφαλο ασθενών με ΝΑ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαφοροποιηθούν οι ηλικιωμένοι χωρίς συμπτώματα άνοιας σε αυτούς που διατρέχουν χαμηλό κίνδυνο για την ανάπτυξη MCI ή ΝΑ και σε αυτούς που είναι υψηλού κινδύνου. Για παράδειγμα, ο Driscoll και οι συνεργάτες του, μελετώντας 138 άτομα για διάστημα δέκα ετών παρατήρησαν ότι η απώλεια όγκου ήταν καθολική τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς αλλά αναγνώρισαν ένα πρότυπο αλλαγών στον εγκέφαλο που είναι χαρακτηριστικό της ΝΑ, συμπεριλαμβανομένου του κροταφικού και του προμετωπιαίου φλοιού, και ισχυρίστηκαν ότι τα διάφορα πρότυπα ατροφίας που παρατηρήθηκαν στους συμμετέχοντες, οι οποίοι στη συνέχεια ανέπτυξαν MCI διαφέρουν από εκείνα των συμμετεχόντων που παρέμειναν σταθεροί- ασυμπτωματικοί [82]. Η διαπίστωση αυτή λοιπόν, δηλ. ότι όλοι οι συμμετέχοντες –υγιείς και συμπτωματικοί- παρουσίασαν ατροφία δείχνει ότι η ατροφία δεν σημαίνει απαραίτητα επικείμενη άνοια, και συνεπώς δεν μπορεί να αντανακλά κατ' ανάγκη λανθάνουσα ΝΑ.



Εικόνα 6: Μοτίβο απώλειας όγκου σε υγιείς και ασθενείς με NA. Με μπλε / πράσινο απεικονίζονται οι περιοχές στις οποίες τα άτομα με MCI εμφάνισαν υψηλότερο ρυθμό ατροφίας. Με κόκκινο/κίτρινο απεικονίζεται η περικοιλιακή νόσος των μικρών αγγείων. Οι προβολές χρωμάτων έχουν εκτιμηθεί με συντελεστές παλινδρόμησης και ορίστηκαν με τους ακόλουθους αριθμούς: a: 0,020, b: 0,0053, c: 0,026, d: 0,0053, e: 0,0053, f: 0.023 [82].

Επίσης, κατ' αυτόν τον τρόπο ο βαθμός της ατροφίας μπορεί να βοηθήσει στο διαχωρισμό της φυσιολογικής γήρανσης από τη NA. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρόλο που ο ιππόκαμπος και ο ενδορρινικός φλοιός είναι οι περιοχές που διακρίνουν καλύτερα τους ασθενείς με NA από την ομάδα ελέγχου επιδεικνύοντας μεγαλύτερη ατροφία, έχει παρατηρηθεί ότι και οι ηλικιωμένοι χαμηλού κινδύνου επιδεικνύουν επίσης επιτάχυνση της ατροφίας στις περιοχές αυτές. Οι Fjell και συνεργάτες έδειξαν ότι οι συμμετέχοντες και των δυο ομάδων, τόσο οι ασθενείς όσο και οι υγιείς, παρουσιάζουν αυξημένη ατροφία στους κροταφικούς λοβούς, η οποία υπερέβη τις δύο τυπικές αποκλίσεις πάνω από το μέσο όρο σε όλες τις ομάδες[83]. Ένα δεύτερο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό είναι το σχετικά υψηλό επίπεδο ατροφίας στον προμετωπιαίο φλοιό στην ομάδα των υγιών.

Στους ασθενείς, αυτή η περιοχή δεν είναι πιο ατροφική από τον υπόλοιπο φλοιό. Έτσι, το μετωπιαίο πρότυπο ατροφίας στους ηλικιωμένους χαμηλού κινδύνου αντικαθίσταται από ένα ακόμη πιο διακριτό κροταφικό πρότυπο ατροφίας στους ασθενείς. Σχετικά υψηλά επίπεδα ατροφίας παρατηρήθηκαν επίσης σε όλες τις ομάδες στο μέσο βρεγματικό λοβό, δηλ στο προσφηνοειδές λόβιο και στα οπίσθια τμήματα της έλικας του προσαγωγίου. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός, ότι η αυξημένη ατροφία του προμετωπιαίου φλοιού που παρατηρείται στην υγιή ομάδα επικαλύπτεται με μία από τις περιοχές του φλοιού που έχει αναπτυχθεί πολύ κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, ενώ δεν είναι μεταξύ των ευάλωτων για τη ΝΑ περιοχών. Έτσι, φαίνεται ότι η εξελικτική θεωρία, ακόμη και με τις αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν στο μέσο κροταφικό φλοιό, χαρακτηρίζει τις αλλαγές του εγκεφάλου στην υγιή γήρανση τόσο καλά όσο και η ατροφία που παρατηρείται στη ΝΑ.

Η ευπάθεια των κροταφικών λοβών στη φυσιολογική γήρανση και τη ΝΑ εγείρει ερωτήματα για το αν οι μεταβολές που παρατηρούνται στον εγκέφαλο ηλικιωμένων ενήλικων χωρίς συμπτωματολογία γνωστικής διαταραχής προκαλούνται εν μέρει από μη ανιχνευμένες νευροεκφυλιστικές διαδικασίες τύπου Alzheimer. Στην ηλικία των 79 ετών, η πιθανότητα εμφάνισης σημαντικών νευροπαθολογικών αλλαγών τύπου ΝΑ στον εγκέφαλο είναι 30-40%, αλλά η πιθανότητα διάγνωσης ΝΑ είναι μόνο 15% [84]. Ήπια γνωστικά ελλείμματα εντοπίζονται 10 χρόνια πριν τη διάγνωση της άνοιας και το σύγχρονο υποθετικό μοντέλο βιοδεικτών υποδηλώνει ότι οι αλλαγές του εγκεφάλου είναι ανιχνεύσιμες πριν από τα πρώτα γνωστικά συμπτώματα. Έτσι, το ερώτημα αν η ατροφία του εγκεφάλου σε τυπικές για τη ΝΑ περιοχές, δηλαδή στους κροταφικούς λοβούς, μπορεί να αποδοθεί σε προκλινικές εκδηλώσεις της νόσου δεν είναι ασήμαντο. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά στοιχεία που δείχνουν ότι αυτές οι εγκεφαλικές αλλαγές πράγματι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής γήρανσης που δεν σχετίζονται με τη νόσο.

Σε μια μελέτη των Resnick και συνεργατών, μελετήθηκαν 92 υγιείς ηλικιωμένοι για τέσσερα χρόνια και βρέθηκαν σημαντικές μειώσεις στον όγκο του εγκεφάλου σε όλους τους λοβούς [85]. Μεγάλης σημασίας είναι το γεγονός ότι οι αλλαγές αυτές

παρατηρήθηκαν και σε μια υποομάδα 24 υγιών συμμετεχόντων με ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό και καμιά έκπτωση των ανώτερων γνωστικών λειτουργιών για τα επόμενα τέσσερα έτη μετά την αρχική εξέταση. Οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι η ομοιομορφία της εγκεφαλικής ατροφίας στους συμμετέχοντες δεν σχετίζεται με προκλινική άνοια, εκτός εάν όλοι οι συμμετέχοντες ήταν σε προκλινικό στάδιο, γεγονός ιδιαίτερος απίθανο. Έτσι, αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη ότι η εγκεφαλική ατροφία σε ηλικιωμένους ενήλικες δεν χρειάζεται να προκαλείται από ασυμπτωματική προκλινική άνοια. Σε αυτό το συμπέρασμα οδηγεί κ η επόμενη μελέτη της ίδιας ομάδας όπου οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν για δέκα έτη, ενισχύοντας περαιτέρω την άποψη ότι δεν γίνεται όλοι οι συμμετέχοντες να ήταν σε προκλινικό στάδιο άνοιας.

Τέλος, επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιοχές που είναι επιρρεπείς στη ΝΑ υφίστανται αλλαγές- ατροφία και σε ασυμπτωματικούς ασθενείς. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υποστηρίξουν ότι η ατροφία του εγκεφάλου στις περιοχές που είναι επιρρεπείς σε ΝΑ μπορεί να είναι μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας γήρανσης. Φυσικά, δεν υπάρχει καμία εγγύηση ότι τέτοιες αλλαγές οφείλονται σε παθολογία λόγω φυσιολογικής γήρανσης και δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι μπορεί να οφείλονται σε πολύ πρώιμα στάδια ΝΑ. Συνοψίζοντας τα ανωτέρω το μόνο βέβαιο συμπέρασμα που μπορεί να διεξαχθεί είναι ότι η ΝΑ δεν αποτελεί τη μοναδική συνιστώσα που οδηγεί σε αλλαγές του εγκεφάλου κατά τη γήρανση.

3. Νευροπλαστικότητα στον γηράσκοντα εγκέφαλο – παράγοντας ευπάθειας;

Μια άλλη παρατήρηση είναι ότι οι περιοχές που χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό πλαστικότητας είναι εκείνες που είναι πιο ευάλωτες στις επιζήμιες επιπτώσεις της φυσιολογικής και παθολογικής γήρανσης.

Για παράδειγμα, η νευρογένεση στον ιππόκαμπο είναι σημαντική για τη δομική πλαστικότητα και τη συντήρηση του δικτύου, και έχει προταθεί ότι η μεταβληθείσα νευρογένεση στον ιππόκαμπο είναι μια πρώιμη εκδήλωση στη ΝΑ. Καθώς όμως η

νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο πιθανόν να περιορίζεται στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπτου καθώς επίσης και στον οσφρητικό βολβό, είναι απίθανο να αποτελεί το βασικό παράγοντα στις αλλαγές που παρατηρούνται στον εγκέφαλο κατά τη γήρανση. Ωστόσο, άλλοι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη νευροπλαστικότητα θα μπορούσαν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στις αλλαγές που παρατηρούνται στις ηλικιακά ευάλωτες περιοχές. Οι δενδρίτες μπορεί να αντιπροσωπεύουν μια πιθανή θέση δομικής πλαστικότητας στον ενήλικο εγκέφαλο και η πλαστικότητα των δενδριτών φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μακροχρόνια μνήμη στα τρωκτικά. Η πλαστικότητα των δενδριτών στο προμετωπιαίο φλοιό μειώνεται στα ηλικιωμένα τρωκτικά καθώς επίσης και η πυκνότητα των δενδριτών πιθανόν να μειώνεται κατά τη γήρανση [76]. Σχετιζόμενη με την έννοια της πλαστικότητας είναι μια ιδέα που βασίζεται στην παρατηρούμενη αλληλεπικάλυψη μεταξύ της κατανομής της εναπόθεσης του αμυλοειδούς και του DMN και άρα ότι το ίδιο το επίπεδο της εγκεφαλικής δραστηριότητας μπορεί να σχετίζεται αιτιωδώς με την εναπόθεση του αμυλοειδούς. Οι εναποθέσεις αμυλοειδούς είναι μέρος της ιστοπαθολογίας της ΝΑ, αλλά ο ρόλος του αμυλοειδούς στη φυσιολογική γήρανση και στη μετάβαση από τη φυσιολογική γήρανση στον νευροεκφυλισμό εξακολουθεί να είναι ελάχιστα κατανοητή.

4. Αμυλοειδές και αλλαγές του εγκέφαλου σε ασυμπτωματικούς ενήλικες: προσυμπτωματική άνοια ή μέρος της φυσιολογικής γήρανσης;

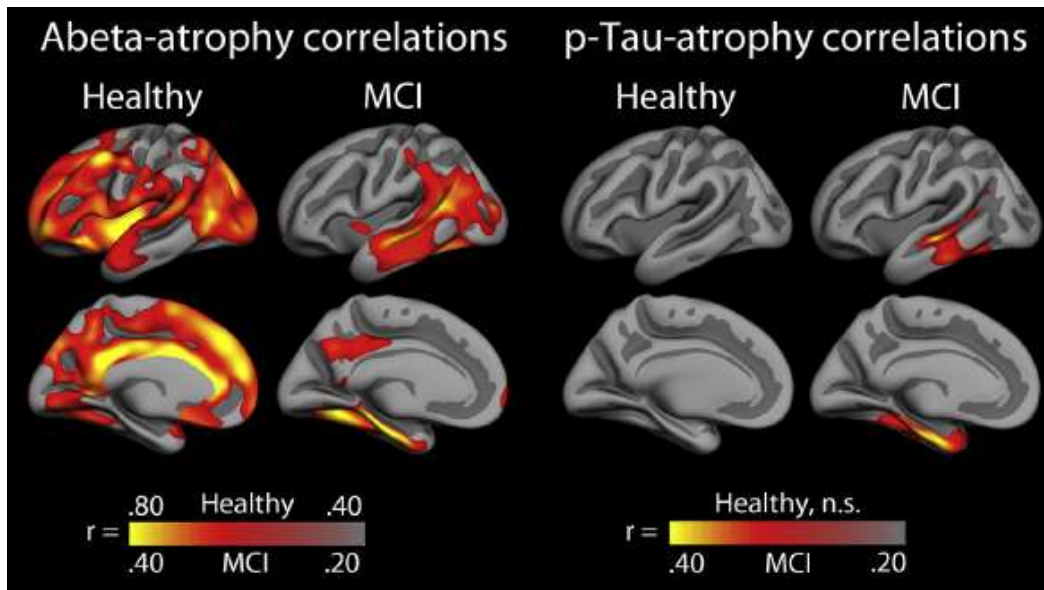
Οι εναποθέσεις αμυλοειδούς αποτελούν μέρος του παθολογοανατομικού υποστρώματος της ΝΑ όπως είναι γνωστό και γι αυτό το λόγο έχει δοθεί μεγάλη βαρύτητα στους αμυλοειδικούς βιοδείκτες. Το αμυλοειδές στο νευροεκφυλισμό θεωρείται ότι παίζει ρόλο από πολύ αρχικά στάδια, πολύ πιο πριν από την κλινική διάγνωση της ΝΑ. Είναι πλέον γνωστό ότι η ατροφία του εγκέφαλου στην ΝΑ υφίσταται πολύ πιο πριν από τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, αλλά ο εκφυλισμός

των νευρικών κυττάρων είναι ακόμη προγενέστερος. Βάσει των ανωτέρω έχει προταθεί ότι, μόλις ξεκινήσει ο νευροεκφυλισμός στη ΝΑ εξελίσσεται ανεξάρτητα από την ενεργοποίησή του αμυλοειδούς, οδηγώντας στην ανησυχία ότι το θεραπευτικό παράθυρο για τα φάρμακα που αναστέλλουν την εναπόθεση του

αμυλοειδούς μπορεί να κλείσει όταν η νευροεκφύλιση έχει αρχίσει να επιταχύνεται. Έτσι, είναι απολύτως απαραίτητη η άμεση κατανόηση της σχέσης μεταξύ του αμυλοειδούς, του εγκεφάλου και της μνήμης σε υγιείς ηλικιωμένους.

Η συσχέτιση Αβ αμυλοειδούς και ατροφίας έχει καταδειχθεί σε MCI / NA ασθενείς [76] και φυσιολογικούς ενήλικες, εγείροντας ερωτήματα σχετικά με το αν η ατροφία του εγκεφάλου που σχετίζεται με το αμυλοειδές σε υγιείς ηλικιωμένους σημαίνει πρώιμες αλλαγές που σχετίζονται με μελλοντική ανάπτυξη NA ή αν μπορεί να είναι μέρος της φυσιολογικής γήρανσης. Αυτό αφορά άμεσα και το ερώτημα στο κατά πόσο οι παράγοντες που οδηγούν την ατροφία στην NA παίζουν ρόλο επίσης στην κανονική γήρανση. Σύμφωνα με την Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, ADNI, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του Αβ₁₋₄₂ και της ατροφίας του φλοιού σε ασθενείς με MCI και σε υγιείς μάρτυρες [86]. Στους υγιείς, όμως, τα επίπεδα του Αβ₁₋₄₂ στο ENY προβλέπουν την εγκεφαλική ατροφία μόνο στην υποομάδα των συμμετεχόντων με πολύ χαμηλά επίπεδα Αβ₁₋₄₂ (ένδειξη υψηλού επιπέδου εναπόθεσης Αβ στον εγκέφαλο). Σε αυτούς τους συμμετέχοντες, ισχυροί συσχετισμοί μεταξύ Αβ₁₋₄₂ - ατροφίας μπορούν να παρατηρηθούν σε μεγάλες περιοχές του φλοιού, αλλά όχι στο μέσο κροταφικό λοβό (medial temporal lobe, MTL) [76]. Στους ασθενείς με MCI, οι συσχετίσεις είναι πιο αδύναμες και περιορίζονται μόνο στον κροταφικό λοβό, στη μέση βρεγματική περιοχή και στο οπίσθιο μέρος του προσαγωγίου. Έτσι, το μοτίβο συσχέτισης δεν είναι αλληλεπικαλυπτόμενο μεταξύ των υγιών ηλικιωμένων ενήλικων και των ασθενών με MCI.

Αντιθέτως, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ατροφίας και των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ταυ (p-tau) του ENY στους υγιείς ηλικιωμένους ενήλικες, ενώ παρατηρείται η αναμενόμενη συσχέτιση μεταξύ p-tau και κροταφικής ατροφίας σε ασθενείς με MCI (Εικόνα 7). Επίσης υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων p-tau και Αβ₁₋₄₂ στην κλινική επιδείνωση και την ενδορινική ατροφία σε υγιείς



Εικόνα 7: Συσχέτιση Βιοδεικτών στο ENY (Αβ αμυλοειδές και p-tau) με την ατροφία στη γήρανση και το MCI. Αριστερά: Συσχέτιση Αβ αμυλοειδούς – ατροφίας σε υγιείς ηλικιωμένους, όπου δεν παρατηρείται συσχέτιση στο μέσο κροταφικό λοβό ενώ παρατηρείται στην περιοχή αυτή σε ασθενείς με MCI, γεγονός που ίσως υποδεικνύει ότι η σχέση μεταξύ της ατροφίας και του αμυλοειδούς είναι διαφορετική στην υγιή γήρανση και το MCI. Δεξιά: Συσχέτιση p-tau και ατροφίας σε υγιείς ηλικιωμένους και σε ασθενείς με MCI [76].

ηλικιωμένους. Γενικότερα, η κατανομή της παθολογίας της ταυ ταιριάζει καλύτερα με την εξάπλωση της ατροφίας κατά τη διάρκεια της νόσου, αλλά και με τα πρώτα συμπτώματα διαταραχής των ανωτέρων γνωστικών λειτουργιών. Τα ιστοπαθολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η συσσώρευση παθολογικής ταυ είναι ένα προγενέστερο γεγονός από την εναπόθεση αμυλοειδούς [76]. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό είναι ότι το αμυλοειδές σχετίζεται ελάχιστα με την ηλικία, ενώ τα συνολικά επίπεδα της ταυ αυξάνονται σημαντικά. Καθώς η ηλικία είναι ο νούμερο ένα παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΝΑ, κατανοώντας τα γεγονότα που επισυμβαίνουν στον εγκεφάλου με την πάροδο της ηλικίας δίδεται η δυνατότητα καλύτερης κατανόησης του εξέχοντος ρόλου της γήρανσης στην ανάπτυξη ΝΑ.

Η σχέση μεταξύ του Αβ αμυλοειδούς και του σχηματισμού πλακών είναι επίσης ένα θέμα που σχετίζεται στενά με το ερώτημα ποιες αλλαγές του εγκεφάλου στη γήρανση είναι αποτέλεσμα πρώιμων διαδικασιών που σχετίζονται με τη ΝΑ και ποιες είναι ανεξάρτητες της νόσου.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η συσχέτιση Αβ αμυλοειδούς – ατροφίας παρατηρούνται σε ασθενείς με MCI κυρίως στον κροταφικό λοβό [86]. Παρατηρήθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ του αμυλοειδούς και του όγκου του ιππόκαμπου ή της ατροφίας του [86], αλλά σε σύγκριση με άλλες υποφλοιώδεις δομές, δεν ήταν ιδιαίτερα ισχυρή. Αυτό υποστηρίχθηκε επίσης σε μια επιμήκη μελέτη από την Australian Imaging, Biomarker and Lifestyle Study of Aging (AIBL). Οι υγιείς συμμετέχοντες με υψηλότερα επίπεδα εναπόθεσης αμυλοειδούς παρουσίαζαν μεγαλύτερη ατροφία στους ιππόκαμπους, αλλά επίσης και μεγαλύτερη συνολική απώλεια της λευκής ουσίας [87].

Ένας τρόπος να συνδυαστούν αυτά τα ευρήματα θα μπορούσε να είναι η υπόθεση ότι η εναπόθεση αμυλοειδούς αντικατοπτρίζει τις διαδικασίες που σχετίζονται με τις αλλαγές του εγκεφάλου σε ασυμπτωματικούς ηλικιωμένους, αλλά ότι αυτό συμβαίνει μόνο όταν αυτές οι διαδικασίες έχουν επιπτώσεις στο MTL και οδηγούν σε γνωστική έκπτωση που παρατηρείται στο MCI και τη NA. Ο ακριβής ρόλος του αμυλοειδούς στην νευροεκφύλιση δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη πλήρως και άρα ίσως οι μηχανισμοί της ατροφίας του εγκεφάλου στους υγιείς και στους ασθενείς να είναι οι ίδιοι. Τέλος ένα άλλο κρίσιμο ζήτημα μπορεί να είναι η περιοχική κατανομή του αμυλοειδούς και όχι μόνο η ποσότητα αυτού.

Συνοψίζοντας, οι περιοχές με σχετικά υψηλή δραστηριότητα, έχουν μια σύνθετη αρχιτεκτονική δομή και υψηλή λειτουργική συνδεσιμότητα, παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ωρίμανση και είναι οι περιοχές αυτές στις οποίες έχει παρατηρηθεί να παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά ατροφίας κατά τη γήρανση όπως περιεγράφηκε ανωτέρω. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο προμετωπιαίος φλοιός ο οποίος παρουσιάζει υψηλά επίπεδα ατροφίας κατά τη φυσιολογική γήρανση, αλλά δεν συγκαταλέγεται στις πιο ευάλωτες περιοχές στη NA. Ο εκφυλισμός σε αυτές τις διαφορετικής ηλικιακής ευαλωτότητας περιοχές είναι πιθανό να οφείλεται σε ένα πλήθος αιτιών που μπορεί να επηρεάσουν την εναπόθεση αμυλοειδούς, μέσω της αυξημένης παραγωγής ή μέσω μειωμένης ικανότητας απομάκρυνσης αυτού. Η αλυσίδα της αιτιολογικής συνάφειας εξακολουθεί να είναι άγνωστη. Για παράδειγμα, στην αμυλοειδική εγκεφαλοπάθεια, η εναπόθεση αμυλοειδούς βρίσκεται στα εσωτερικά τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου. Οι

αγγειακές εγκεφαλικές παθήσεις π.χ. η νόσος των μικρών αγγείων με συνοδευτικές εγκεφαλικές μικροαιμορραγίες, αυξάνουν τα επίπεδα της εναπόθεσης αμυλοειδούς στον εγκέφαλο όπως ανιχνεύεται με τη χρήση PiB-PET . Ωστόσο, η αιτία της ατροφίας και του εκφυλισμού, θα μπορούσε να σχετίζεται άμεσα με την αγγειακή πάθηση και όχι με την εναπόθεση αμυλοειδούς . Η αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των αγγειακών παραγόντων και της συσσώρευσης αμυλοειδούς δεν έχει ακόμη καθοριστεί, αλλά και οι δύο σχετίζονται με την απολιποπρωτεΐνη ε4 [88]. Οι αγγειακοί παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση, αποτελούν επίσης παράγοντες κινδύνου για NA και έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη δομή του εγκεφάλου και τη συσσώρευση του αμυλοειδούς σε μη ανοικούς ηλικιωμένους και ασθενείς με NA. Η ατροφία που παρατηρείται σε αυτές τις περιοχές στη φυσιολογική γήρανση μπορεί να είναι ανεξάρτητη από το αμυλοειδές, ενώ μια σταδιακή αύξηση της εναπόθεσης αμυλοειδούς ενδέχεται να παρατηρηθεί με την πάροδο του χρόνου στις ίδιες περιοχές. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί για τα ανωτέρω γεγονότα ίσως να είναι ή και να μην είναι οι ίδιοι που παρατηρούνται στη NA. Το σημαντικό δεν είναι να αποφασιστεί εάν οι αλλαγές που παρατηρούνται σε αυτές τις περιοχές με την πάροδο της ηλικίας σχετίζονται με άνοια, αλλά να γίνει προσπάθεια κατανόησης των υποκείμενων μηχανισμών με τους οποίους εμφανίζονται. Δεδομένου ότι παρατηρείται αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς στη NA, που σχετίζεται με την ατροφία του εγκεφάλου τόσο στους ασθενείς όσο και στους υγιείς ηλικιωμένους και εναποτίθεται κυρίως σε περιοχές που ευθύνονται για πολύπλοκες γνωστικές λειτουργίες όπως η επεισοδιακή μνήμη, θα μπορούσε κανείς να περιμένει τα επίπεδα αμυλοειδούς να σχετίζονται με τη γνωστική λειτουργία σε ηλικιωμένους ενήλικες. Ο έλεγχος της σχέσης μεταξύ των επιπέδων αμυλοειδούς και των γνωστικών λειτουργιών αποτελεί έναν πολύ σημαντικό τομέα έρευνας, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, με μέτρια συσχέτιση σε μερικές μελέτες και καμία σε άλλες.

Μια σημαντική συνιστώσα στην ερμηνεία του *in vivo* βιοδείκτη του αμυλοειδούς είναι ότι μπορεί να μην είναι ευαίσθητος στην πιο συχνή μορφή αμυλοειδούς. Τόσο τα επίπεδα του Aβ₁₋₄₂ στο ENY όσο και η απεικόνιση με PET αντανακλά τα ινδικά επίπεδα και τις πλάκες του αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. Οι διαλυτές ολιγομερείς

μορφές του αμυλοειδούς μπορεί να είναι πιο τοξικές από το ινώδες αμυλοειδές, αλλά είναι πολύ δύσκολο να μετρηθούν αξιόπιστα στο ENY. Κατά συνέπεια, το να είναι το αμυλοειδές αρνητικό με βάση in vivo απεικόνιση με PET ή τη μέτρηση στο ENY δεν εγγυάται ότι δεν υπάρχει παθολογία αμυλοειδούς στον εγκέφαλο.

Τέλος, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω ένα βασικό στοιχείο για την κατανόηση των συνόρων μεταξύ της κανονικής γήρανσης και των πρώιμων σταδίων της ΝΑ μπορεί να υπόκειται στη νευροπλαστικότητα. Η διαταραχή των ανώτερων γνωστικών λειτουργιών συμβαίνει όταν ο εγκέφαλος δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσει τις μεταβολές που συμβαίνουν. Ο κύριος παράγοντας γενετικού κινδύνου για την ΝΑ, η απολιποπρωτεΐνη ε4, σχετίζεται με την νευρική πλαστικότητα. Πιο υψηλά επίπεδα γνωστικών αποθεμάτων, όπως υποδεικνύεται από το επίπεδο εκπαίδευσης και την κοινωνικοοικονομική κατάσταση, προστατεύουν από την ανάπτυξη ΝΑ, καθώς τα άτομα με αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να διατηρήσουν τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες παρά τα αυξημένα επίπεδα αμυλοειδούς. Η πτωχή συσχέτιση αμυλοειδούς και γνωστικής λειτουργίας υποδηλώνουν ότι άλλοι μηχανισμοί, όπως αντιροπιστικοί μηχανισμοί μπορούν να επηρεάσουν τη γνωστική λειτουργία. Η άποψη αυτή, ότι δηλαδή οι γνωστικές λειτουργίες μπορούν να διατηρηθούν κατά τη γήρανση μέσω αντισταθμιστικών μηχανισμών, και ότι η διαταραχή αυτών παρατηρείται όταν ένα άτομο δεν είναι πλέον σε θέση να αντισταθμίσει τη μειωμένη λειτουργία των δομών και των κυκλωμάτων του πρωτεύοντος εγκεφάλου, έχει πλέον πολλούς υποστηρικτές.

Σύμφωνα με μια τέτοια άποψη, το μέγεθος των αλλαγών που μπορούν να αντιροπιστούν χωρίς έκπτωση των ανώτερων λειτουργιών ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ατόμων. Έτσι, είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό γιατί μερικοί ηλικιωμένοι αναπτύσσουν ΝΑ και μερικοί διατηρούν ανέπαφες τις γνωστικές λειτουργίες παρά την εναπόθεση αμυλοειδούς. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, είναι απαραίτητες γνώσεις σχετικά με τις ατομικές διαφορές που παρατηρούνται κατά τη ΝΑ. Για παράδειγμα, είναι πιθανό ότι η σχέση μεταξύ της ατροφίας του εγκεφάλου και του φορτίου του αμυλοειδούς να ποικίλει ουσιαστικά μεταξύ των διαφόρων ομάδων [86] και αυτή η διακύμανση δεν είναι πιθανότατα τυχαία. Ένα κλειδί για τη βελτίωση της διάγνωσης και της πρόγνωσης, καθώς και της καλύτερης

κατανόησης των ίδιων των μηχανισμών της νόσου, είναι η χαρτογράφηση των ατομικών διαφορών που παρατηρούνται σε σχέση με τα μεγάλα γεγονότα στα αρχικά στάδια ΝΑ. Για παράδειγμα, μια προσέγγιση που μπορεί να κλείσει την ψαλίδα μεταξύ υγιούς γήρανσης και ΝΑ είναι να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων που παρουσιάζουν (α) Κανονική νοητική λειτουργία και δομική ακεραιότητα όπως μετράται με MRI παρά τα αυξημένα επίπεδα βιοδεικτών της ΝΑ όπως το αμυλοειδές (β) Μειωμένες γνωστικές λειτουργίες και εγκεφαλική ακεραιότητα στις ευάλωτες περιοχές για ΝΑ με φυσιολογικούς βιοδείκτες αμυλοειδούς και γ) Υψηλά επίπεδα συντήρησης του εγκεφάλου με μετρήσεις που προκύπτουν από δομική και λειτουργική νευροαπεικόνιση.

Νευροεκφυλιστικές νόσοι και ταυ πρωτεΐνη

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι στον άνθρωπο είναι μια ετερογενής ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια νευρώνων, η οποία οδηγεί σε γνωστικά, συμπεριφορικά και σωματικά ελλείμματα που τελικά οδηγούν στο θάνατο όπως έχει προαναφερθεί.

Η νόσος Alzheimer (NA) είναι η πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσος που πλήττει τον γηράσκοντα πληθυσμό. Τα περισσότερα περιστατικά της NA είναι σποραδικά με λιγότερο από το 25% της νόσου να είναι οικογενή. Αν και φαινοτυπικά χαρακτηρίζεται από ετερογένεια, δυο είναι τα κύρια παθολογοανατομικά ευρήματα που χαρακτηρίζουν τη νόσο, οι “γεροντικές ή αμυλοειδικές πλάκες”, οι οποίες αποτελούνται από εξωκυττάρια εναποθέσεις αμυλοειδούς και οι νευροϊνιδιακές βλάβες (NB), οι οποίες αποτελούνται από ενδοκυττάρια ζεύγη ελικοειδώς περιεστραμμένων ινιδίων με κύριο συστατικό την υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη T (p tau). Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ανώμαλη συσσώρευση ταυ πρωτεΐνης ονομάζονται ταυ-πάθειες. Αυτές οι ασθένειες περιλαμβάνουν εκτός από τη NA, το σύνδρομο Down, την μυοσίτιδα με έγκλειστα, την φλοιοβασική εκφύλιση (Corticobasal Degeneration, CBD), τη νόσο του Pick, την προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση (Progressive Supranuclear Palsy, PSP), την ατροφία πολλαπλών συστημάτων (Multiple System Atrophy, MSA), την μετωποκροταφική άνοια (Frontotemporal dementia, FTD) και το μετωποκροταφικό σύνδρομο με παρκινσονισμό που συνδέεται με το χρωμόσωμα 17 (FTDP-17). Αν και η συσσώρευση υπερφωσφορυλιωμένης T πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί σε όλες αυτές τις νόσους, η FTDP-17 συνδέεται άμεσα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της ταυ πρωτεΐνης [89] και συνέβαλλε σημαντικά στην κατανόηση της πρόκλησης νόσου λόγω της διαταραχής της λειτουργίας της πρωτεΐνης ταυ.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι παρόλο που η παθολογία της ταυ στη NA είναι περιορισμένη στους νευρώνες, σε άλλες ταυ-πάθειες όπως η MSA, η CBD, η FTDP-17 και η PSP ανευρίσκονται έγκλειστα στα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα [90]. Ο καθοριστικής σημασίας ρόλος των ταυ βλαβών στον προοδευτικό εκφυλισμό του εγκεφάλου σε αυτές τις ασθένειες έχει γίνει προσπάθεια να αποσαφηνιστεί από διάφορα ζωικά μοντέλα. Ως είναι φυσικό από τη φάρετρα αυτή δεν θα μπορούσε να

λείπει η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster*, η οποία έχει αναδειχθεί ως χρήσιμο μοντέλο για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Η μικρή διάρκεια ζωής της, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 50 έως 80 ημερών, το μικρό γονιδίωμα της, το οποίο καθιστά πιο εύκολη τη γενετική ανάλυση σε σύγκριση με ανώτερους εξελικτικά οργανισμούς και τέλος λόγω του ότι διάφορες λειτουργίες στις μύγες είναι εύκολα αξιολογήσιμες στο εργαστήριο και πολλές από αυτές εξασθενούν με την αύξηση της ηλικίας την καθιστούν ως ένα από τα πιο κατάλληλα μοντέλα για τη μελέτη της γήρανσης του νευρικού συστήματος [91, 92]. Συγκεκριμένα, σε μελέτες που χρησιμοποίησαν ως μοντέλο σύστημα τη *Drosophila melanogaster* για την μελέτη των ταυ-παθειών αποκάλυψαν την αρνητική επίδραση α) της μεταλλαγμένης ταυ πρωτεΐνης, β) το ρόλο που παίζουν τα συσσωματώματα της γ) η αναδίπλωση της δ) η κάθαρση της και ε) η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της στις νευροεκφυλιστικές νόσους και εντόπισαν πιθανούς μελλοντικούς τροποποιητικούς παράγοντες που θα μπορούσαν εν δυνάμει να επιδράσουν σε αυτές τις νόσους.

1. Ο διπλός ρόλος της ταυ πρωτεΐνης ως φυσιολογικά απαραίτητης νευρωνικής πρωτεΐνης και ως νευροτοξικού παράγοντα

Η πρωτεΐνη ταυ είναι μια πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους που αποτελεί συστατικό του κυτταροσκελετού και ανήκει στις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated proteins, MAPs) [93, 94]. Βρίσκεται σε αφθονία στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, κυρίως στους νευράξονες και σε μικρότερο βαθμό στους δενδρίτες και τη γλοία. Η πρωτεΐνη ταυ είναι επίσης παρούσα σε μεγάλες ποσότητες στους όρχεις, όπου βοηθά στη διαμόρφωση του πυρήνα στα σπερματίδια [94]. Τέλος, η πρωτεΐνη εντοπίζεται και στον πυρήνα, όπου φαίνεται να είναι συμπυκνωμένη σε πυρηνίσκους. Ο ρόλος της ταυ πρωτεΐνης είναι να σταθεροποιηθεί τα νευρωνικά μικροσωληνάρια και να προωθεί τη νευρωνική ανάπτυξη.

Η υποκείμενη παθολογία των ταυ-παθειών συνδέεται άμεσα με το φυσιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης ταυ στα κύτταρα και ιδιαίτερα στους νευρώνες.

Σε αυτή την ενότητα θα αναφερθεί εν συντομία η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης ταυ καθώς και ο τρόπος κατά τον οποίο όταν η φυσιολογική λειτουργία αυτής διαταράσσεται οδηγεί σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

2.Ο ρόλος της πρωτεΐνης ταυ

Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ταυ εντοπίστηκε στο μακρό χρωμοσωμικό βραχίονα του χρωματοσώματος 17 (θέση 17q21) και περιέχει τουλάχιστον 16 εξόνια [93]. Τα εξόνια 4A και 8 στον ανθρώπινο εγκέφαλο απουσιάζουν και ανευρίσκονται μόνο στην περιφέρεια καθώς επίσης σε βοοειδή και τρωκτικά[95]. Κάθε μόριο ταυ πρωτεΐνης χωρίζεται σε τέσσερις περιοχές, την αμινοτελική περιοχή, μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, την περιοχή δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους, καθώς και μια καρβοξυτελική περιοχή.

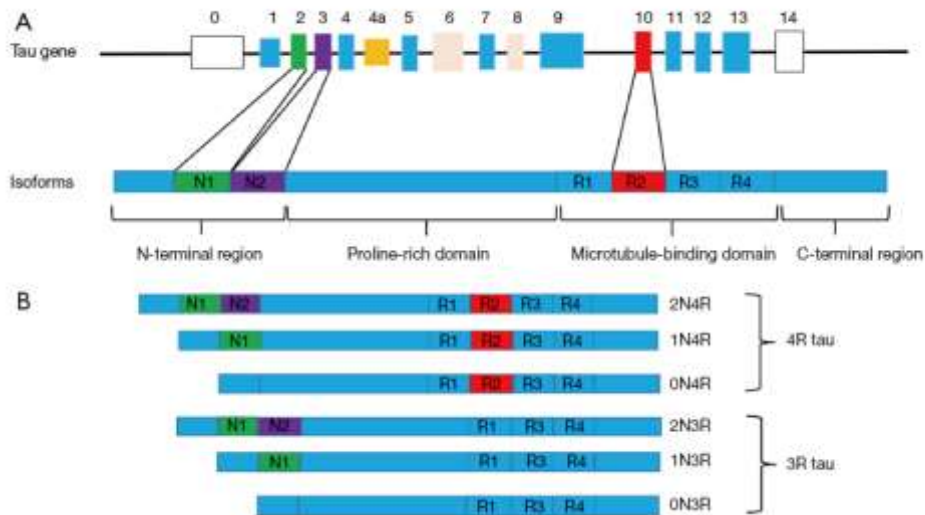
Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) των ανθρώπων υπάρχουν έξι ισομορφές της πρωτεΐνης ταυ που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων (εξόνια 2 και 3) στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και του εξονίου 10 μετά την πρώτη περιοχή δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους (microtubule binding repeat, MTBR) (Εικόνα 8) οι οποίες περιέχουν από 352 έως 441 αμινοξέα. Έτσι, προκύπτει η 0N ισομορφή (απουσία αμινοξέων), η ισομορφή 1N (παρουσία 29 παρεμβαλλόμενων αμινοξέων) και η ισομορφή 2N (παρουσία 58 παρεμβαλλόμενων αμινοξέων). Η αναλογία των 0N/1N/2N στον ενήλικα εγκέφαλο είναι 40%, 50% και 10% αντίστοιχα [96]. Κάθε μία από αυτές τις ισομορφές είναι πιθανό να έχει συγκεκριμένο φυσιολογικό ρόλο, διότι εκφράζονται διαφορετικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Για παράδειγμα, η ισομορφή 3R -0N εκφράζεται μόνο κατά το εμβρυικό στάδιο, ενώ οι έξι ισομορφές εκφράζονται κατά την ενηλικίωση [95].

Στη *Drosophila*, υπάρχει μόνο μία γνωστή ισομορφή της πρωτεΐνης ταυ. Ωστόσο, όλες οι ισομορφές της ταυ, ανεξάρτητα από τους ξενιστές, έχουν την ίδια λειτουργία στις περιοχές δεσμεύσεως με τους μικροσωληνίσκους. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μελέτες ταυ-πάθειας σε μοντέλα *Drosophila* έχουν αποδείξει ότι η υπερέκφραση διαφορετικών ισομορφών ταυ ποικίλλει ως προς την ικανότητα τους να προκαλέσουν δυσλειτουργία και θάνατο. Η μεγαλύτερη περιοχή απόκλισης της

πρωτεΐνης ταυ στα πρωτεύοντα σε σύγκριση με όλα τα άλλα είδη βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της.

Τα C-τελικά άκρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία τριών ή τεσσάρων περιοχών, ανάλογα αν παρεμβάλλεται το εξόνιο 10, που φέρουν παρόμοιες αλλά όχι πανομοιότυπες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 31-32 αμινοξέων,[94, 97]. Αυτή περιοχή επαναλήψεων αποτελεί την περιοχή σύνδεσης της πρωτεΐνης ταυ με τους μικροσωληνίσκους. Κάθε επανάληψη αποτελείται από μια αλληλουχία 18 αμινοξέων που φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα μικροσωληναριακής σύνδεσης, καθώς και από μια περιοχή που αποτελείται από 13-14 υπολείμματα αμινοξέων, που αντιπροσωπεύει τη ζώνη μεταξύ των επαναλήψεων[98]. Οι πρωτεΐνες ταυ που περιέχουν τέσσερις επαναλήψεις (4R), συνδέονται με υψηλότερη συγγένεια με τους μικροσωληνίσκους από εκείνες που περιέχουν τρεις επαναλήψεις (3R).

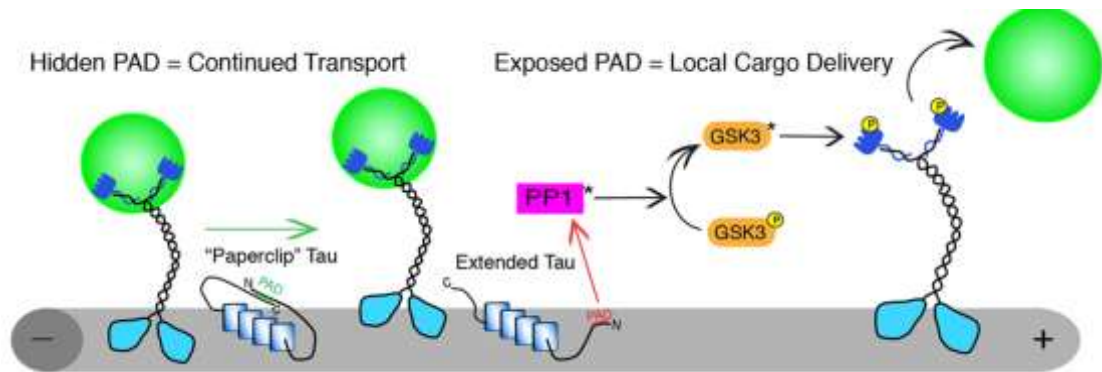
Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι γνωστή μια άλλη ισομορφή της πρωτεΐνης ταυ, γνωστή ως "μεγάλη" ταυ πρωτεΐνη και αυτή η ισομορφή συνεχίζει να εκφράζεται στο Περιφερικό νευρικό σύστημα των ενηλίκων [93]. Επιπροσθέτως, υπάρχουν και μη κανονικές ισομορφές της πρωτεΐνης ταυ που εμπεριέχουν το εξόνιο 6 που δεν έχουν πολλές από τις παραδοσιακές περιοχές και για τις οποίες δεν θα γίνει λόγος στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 8 : Απεικόνιση του γονιδίου της ταυ και των κύριων ισομορφών της ταυ του ΚΝΣ.Α) Το γονίδιο της ταυ, MAPT, αποτελείται από 16 εξόνια (E) Κάθε πρωτεΐνη ταυ περιέχει τέσσερις μεγάλες περιοχές που περιλαμβάνει την αμινοτελική περιοχή, μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, την περιοχή δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους (MTBR ή R) , καθώς και μια καρβοξυτελική περιοχή. Οι διαφορετικές περιοχές του μορίου περικλείουν μικρότερα λειτουργικά μοτίβα. Για παράδειγμα, η περιοχή που είναι πλούσια σε προλίνη είναι μια πολύ ευέλικτη περιοχή που επιτρέπει ή (όταν φωσφορυλιώνεται) αναστέλλει τις μεταβολικές μεταβολές της ταυ. Οι MTBR και τα επιπρόσθετα μικρά μοτίβα που πλαισιώνουν τις R1 και 4 είναι σημαντικά για τη σύνδεση με τους μικροσωληνίσκους. Το καρβοξυτελικό άκρο είναι μια περιοχή που μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό ινιδίων αποτελούμενων από πρωτεΐνη ταυ. Β)Υπάρχουν έξι ισομορφές της πρωτεΐνης ταυ στο ΚΝΣ των ανθρώπων. Οι ισομορφές προέρχονται από το εναλλακτικό μάτισμα σε τρία εξόνια. Τα εξόνια 2 και 3 βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο και κωδικοποιούν την N1 (πράσινη) και N2 (μωβ) περιοχή αντίστοιχα, ενώ το εξόνιο 10 κωδικοποιεί την R2 (κόκκινη) περιοχή. Τα E1, E4, E5, E7, E9, E11, E12, και E13 αποτελούν το βασικό συστατικό της ταυ πρωτεΐνης. Τα E0 και E14 δεν είναι κωδικοποιά εξόνια (λευκά). Το E4a (κίτρινο) βρίσκεται μόνο στους περιφερικούς ιστούς. Τα E6 και E8 δεν εκφράζονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο (ροζ).Οι ισόμορφες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, εκείνες με τέσσερις MTBRs (δηλ, 4Rtau) ή εκείνες με τρεις MTBRs (δηλ, 3Rtau). Το εναλλακτικό μάτισμα στο αμινοτελικό άκρο έχει ως αποτέλεσμα στις 4R και 3R ταυ ισομορφές είτε να εμπεριέχονται τα εξόνια 2 και 3 (2N), είτε να εμπεριέχεται μόνο το εξόνιο 2 (1N) ή κανένα από τα δύο εξόνια 2 ή 3 (0N). Στον ανθρώπινο εγκέφαλο υπάρχουν οι μορφές 3R και 4R στην ίδια αναλογία. Στις διάφορες όμως νευροεκφυλιστικές νόσους η ισορροπία αυτή διαταράσσεται.[99]

Ο αποσαφηνισμός του ρόλου της πρωτεΐνης ταυ έχει γίνει μέσω της διενέργειας διαφόρων μελετών, οι οποίες έδειξαν ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των μικροσωληναρίων. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης

ταυ με τους μικροσωληνίσκους είναι λειτουργικά σημαντική, αλλά η συσώρευση της υποδεικνύει ότι ο ρόλος της δεν είναι μόνο αυτός. Μελέτες έδειξαν ότι πρωτεΐνη ταυ που βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων συμμετέχει στη σταθεροποίηση – προστασία του DNA από το οξειδωτικό στρες και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. [100]. Επίσης η πρωτεΐνη ταυ ίσως παίζει ρόλο στη σταθεροποίηση της μεμβράνης και / ή ενεργεί ως συνδετικό μόριο μεταξύ των μικροσωληναρίων και άλλων κυτταρικών συστατικών, π.χ. της μεμβράνης, όπου μια τέτοια αλληλεπίδραση είναι πολύ σημαντική για τη νευρωνική ανάπτυξη[96] και / ή τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Είναι ενδιαφέρον σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι από παρατηρήσεις που είχαν γίνει στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα έγκλειστα πρωτεΐνης ταυ στη NA φάνηκε να προέρχονται από μεμβρανώδεις δομές . Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη ταυ παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αξονική μεταφορά με την τελευταία να διαταράσσεται με τις συναθροίσεις ή ακόμα και με μονομερή πρωτεΐνης ταυ οδηγώντας στην αποκάλυψη μιας περιοχής που είναι γνωστή ως PAD, στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης T [phosphatase-activating domain, PAD (αμινοξέα 2-18)]. Η έκθεση της PAD έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την κινάση σύνθεσης γλυκογόνου 3 (GSK3). Η ενεργός GSK3 φωσφορυλιώνει τις αλυσίδες κινεσίνης προκαλώντας αναστολή της γρήγορης αξονικής μεταφοράς [101], (εικόνα 9). Η δυσλειτουργία της αξονικής μεταφοράς εμπλέκεται ως βασικός παθογνωμονικός παράγοντας στη νόσο NA και σε άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.



Εικόνα 9:Προτεινόμενος ρόλος της περιοχής PAD στην αξονική μεταφορά και στη δυσλειτουργία της νευραξονικής μεταφοράς σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η πρωτεΐνη Τ είναι συνήθως συνδεδεμένη με τα μικροσωληνάρια όπου, εκτός από τη σταθεροποίησή τους, μπορεί να ρυθμίζει την τοπική παροχή φορτίου μέσω της μεσολαβούμενης από την περιοχή PAD ενεργοποίησης του μονοπατιού PP1-GSK3. Όταν η πρωτεΐνη τ έχει τη δομή "paperclip", τα συνδεδεμένα με τη μεμβράνη φορτία μεταφέρονται με την κινεσίνη κατά μήκος των μικροσωληνάρων επειδή η περιοχή PAD δεν είναι εκτεθειμένη. Αντίθετα, όταν η περιοχή PAD είναι εκτεθειμένη, ενεργοποιείται το μονοπάτι PP1-GSK3, φωσφορυλιώνονται οι ελαφρές άλυσες κινεσίνης και τα φορτία απελευθερώνονται, [101].

3. Μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης ταυ

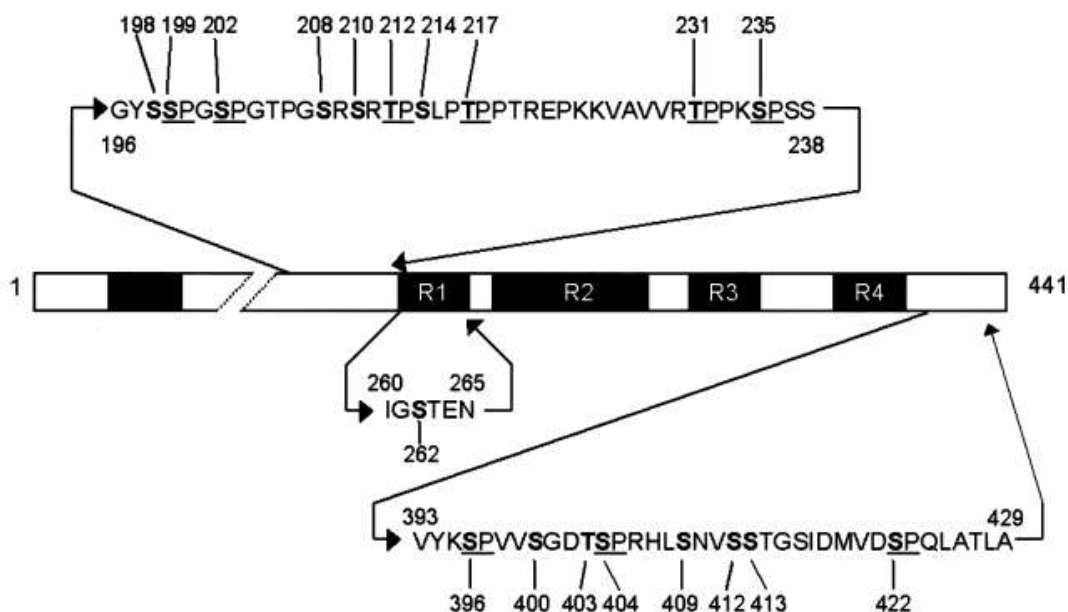
3.1 Ο-γλυκοζυλίωση

Η Ο-γλυκοζυλίωση είναι μια δυναμική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που χαρακτηρίζεται από την προσθήκη ενός υπολείμματος Ο- Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης (O-GlcNAc) σε σερίνη (Ser) ή θρεονίνη (Thr) κοντά σε υπολείμματα προλίνης (Pro) από την GlcNAc τρανσφεράση, η οποία αναγνωρίστηκε πρόσφατα. Παρόλο που η λειτουργική σημασία της τροποποίησης μέσω της γλυκοζυλίωσης δεν είναι πλήρως κατανοητή, εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση, την πρωτεϊνική αποικοδόμηση, την ενεργοποίηση των κυττάρων, την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη σωστή συνάθροιση συμπλεγμάτων πολυμερών πρωτεϊνών. Αυτή η τροποποίηση είναι συχνά αμοιβαία με φωσφορυλίωση. Γίνεται στα νευροϊνίδια και στις πρωτεΐνες που συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους, συμπεριλαμβανομένου της MAP2 και της ταυ. Ο αριθμός των θέσεων γλυκοζυλίωσης στην ταυ πρωτεΐνη είναι λιγότερες από τις θέσεις φωσφορυλίωσης. Στην πραγματικότητα, η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση μπορεί να έχουν αντίθετα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η

γλυκοζυλίωση της ταυ πρωτεΐνης και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα μικροσωληνάρια, υπαινίσσεται ένα ρόλο της γλυκοζυλίωσης στη διαμεσολάβηση της αλληλεπίδρασης με την τουμπουλίνη. Τέλος, η γλυκοζυλίωση ίσως παίζει ρόλο στην υποκυτταρική εντόπιση και αποικοδόμηση της πρωτεΐνης ταυ [95].

3.2 Φωσφορυλίωση

Υπάρχουν 80 θέσεις φωσφορυλίωσης Ser ή Thr στη μεγαλύτερη ισόμορφη της πρωτεΐνης ταυ στον ανθρώπινο εγκέφαλο (441 αμινοξέα). Χρησιμοποιώντας εξαρτώμενα από τη φωσφορυλίωση μονοκλωνικά αντισώματα και τη χρήση φασματομετρίας έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 30 θέσεις φωσφορυλίωσης, οι Thr39, Ser46Pro, Thr50Pro, Thr69Pro, Thr153Pro, Thr175Pro, Thr181Pro, Ser198, Ser199Pro, Ser202Pro, Thr205Pro, Ser208, Ser210, Thr212Pro, Ser214, Thr217Pro, Thr231Pro, Ser235Pro, Ser237, Ser241, Ser262, Ser285, Ser305, Ser324, Ser352, Ser356, Ser396-Pro, Ser400, Thr403, Ser404Pro, Ser409, Ser412, Ser413, Ser416 και Ser422Pro. Οι περισσότερες από αυτές τις θέσεις εδράζονται εκτός των περιοχών δέσμευσης με τους μικροσωληνίσκους και επομένως τεκμαίρεται ότι η φωσφορυλίωση αυτών των θέσεων επηρεάζει τη δέσμευση της ταυ στους μικροσωληνίσκους [102], με κάποιες εξαιρέσεις βέβαια των Ser 262 (R1), Ser285 (μεταξύ R1-R2), Ser305 (R3), Ser324 (R3), Ser352 (R4) και Ser356 (R4). Έχουν ταυτοποιηθεί θέσεις τόσο σχετιζόμενες με προλίνη Ser / Thr-Pro όσο και μη σχετιζόμενες με προλίνη Ser / Thr-Pro. Οι διάφορες καταστάσεις φωσφορυλίωσης της ταυ προκύπτουν από τη δράση συγκεκριμένων κινασών και φωσφατάσων προς αυτές τις θέσεις [95].



Εικόνα 10: οι θέσεις φωσφορυλίωσης της PHF-tau στον άνθρωπο. Οι αριθμοί αφορούν τη μεγαλύτερη ισομορφή με 441 αμινοξέα. Οι θέσεις π με προλίνη υποδεικνύονται με υπογράμμιση [95].

3.3 Κινάσες

Οι περισσότερες από τις κινάσες που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση της ταυ είναι μέρος των πρωτεϊνικών κινασών που κατευθύνονται από την προλίνη (PDPK), οι οποίες περιλαμβάνουν την πρωτεϊνική κινάση MAP, την πρωτεϊνική κινάση I (κινάση 3 της συνθετάσης του γλυκογόνου - GSK3), την TAU πρωτεϊνική κινάση II (κυκλο-εξαρτώμενη κινάση Cdk5), την JNK και άλλες. Στις μη προλινοκατευθυνόμενες κινάσες ανήκουν οι κινάσες MARK, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και η ασβέστιο-καλμοδουλινική κινάση II (CaM-II). Η κινάση συνθάσης γλυκογόνου 3 (GSK3) είναι μια κινάση ικανή να φωσφορυλιώνει θέσεις με και χωρίς προλίνη.

Πολυάριθμες κινάσες, κατευθυνόμενες με προλίνη και χωρίς προλίνη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν διαδοχικά για να παρατηρηθεί η πλήρης φωσφορυλίωση της Tau [95].

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι σε μελέτες που έγιναν σε *Drosophila melanogaster*, η έκφραση της GSK3 οδήγησε στη δημιουργία ινιδιακών πολυμερών [93].

3.4 Φωσφατάσες

Οι πρωτεΐνες ταυ από κύτταρα εγκεφάλου αποφωσφορυλιώνονται ταχέως από ενδογενείς φωσφατάσες . Όπως οι κινάσες, έτσι και οι φωσφατάσες έχουν πολλές άμεσες ή έμμεσες φυσιολογικές επιδράσεις και αντισταθμίζουν τη δράση των κινασών. Στις κύριες φωσφατάσες ανήκουν οι PPA, η PP2A, η PP2B και η PP5, οι οποίες διαπιστώθηκε ότι διατηρούν την ικανότητα να αποφωσφορυλιώνουν την ανώμαλα φωσφορυλιωμένη ταυ δρώντας σε διαφορετικά υποστρώματα[93]. Η PP2A θεωρείται η κύρια φωσφατάση , στην οποία αποδίδεται το 70% της συνολικής δραστηριότητας . Η μείωση της δραστηριότητας της PP2A, θα μπορούσε να οδηγήσει στην εμφάνιση υπερ-φωσφορυλιωμένων ταυ πρωτεϊνών, όχι μόνο εξαιτίας της ανεπάρκειας αποφωσφορυλίωσης, αλλά επίσης εξαιτίας της ενεργοποίησης των PP2A ρυθμιζόμενων πρωτεϊνικών κινασών, όπως η PKA, η CaMII και οι MAP κινάσες [95].

4. Φωσφορυλίωση της Ταυ πρωτεΐνης και συνάθροιση των μικροσωληνίσκων

Η πρωτεΐνη ταυ συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους μέσω της περιοχής δέσμευσης των μικροσωληνίσκων όπως έχει αναφερθεί. Ωστόσο, η συνάθροιση των μικροσωληνίσκων εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης ταυ αφού οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες ταυ είναι λιγότερο αποτελεσματικές από τις μη φωσφορυλιωμένες στον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων . Η φωσφορυλίωση στη θέση Ser262 μειώνει δραματικά τη συγγένεια της ταυ με τους μικροσωληνίσκους in vitro. Παρ'όλα αυτά, η περιοχή από μόνη της, η οποία υπάρχει στην εμβρυϊκή ταυ, στις πρωτεΐνες ταυ των ενηλίκων όπως επίσης και στις υπερφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες ταυ που βρίσκονται στις NB, είναι ανεπαρκής για την εξάλειψη της σύνδεσης της ταυ με τους μικροσωληνίσκους. Το επταπεπτίδιο 224KKVAVVR230 που βρίσκεται σε περιοχή πλούσια σε προλίνη έχει υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τους μικροσωληνίσκους σε συνδυασμό με τις περιοχές επαναλήψεων, γεγονός που

υποδηλώνει ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο περιοχών. Έτσι, η φωσφορυλίωση εκτός των περιοχών δέσμευσης με τους μικροσωληνίσκους μπορεί να επηρεάσει έντονα τη συγκέντρωση της τουμπουλίνης τροποποιώντας τη συγγένεια μεταξύ των πρωτεϊνών του και των μικροσωληνίσκων [95].

Σε πολυάριθμες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, οι πρωτεΐνες του συσσωματώνονται δημιουργώντας ενδονευρωνικά έγκλειστα. Στη ΝΑ, οι βλάβες αυτές είναι ζεύγη ελικοειδών νημάτων (PHF) όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή και οι συστατικές πρωτεΐνες τους αναφέρονται ως PHF-tau πρωτεΐνες. Παρά το γεγονός ότι πολλά σημεία φωσφορυλίωσης είναι κοινά στις πρωτεΐνες PHF-tau και στις φυσιολογικές του, υπάρχουν βιοχημικά χαρακτηριστικά που τις διαφοροποιούν και υποστηρίζουν την έννοια των παθολογικών πρωτεϊνών του. Μελέτες ανοσοστυπώματος αποκαλύπτουν ότι οι PHF-tau πρωτεΐνες είναι πιο όξινες από τις φυσιολογικές του. Αδιάλυτα πολυμερή του είναι παρόντα αποκλειστικά σε εκχυλίσματα εγκεφάλου με ΝΑ. Ως εκ τούτου, η κύρια διαφορά μεταξύ βιοψίας εγκεφάλου και post mortem ιστών είναι ότι οι PHF-tau στους post mortem ιστούς είναι συγκεντρωμένες ενώ οι του από τις βιοψίες δεν είναι. Η χρήση αντισωμάτων που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση όπως τα AT100, AP422, 988, PHF-27 ανίχνευσαν μόνο τις PHF-tau, επιδεικνύοντας την παρουσία αφύσικα φωσφορυλιωμένων θέσεων. Με την εξαίρεση της Ser422, αυτές οι φωσφορυλιωμένες θέσεις που βρέθηκαν στις PHF-tau είναι επιπροσθέτως επίτοποι από τους οποίους εξαρτάται η διαμόρφωση των του πρωτεϊνών. Συνολικά, υπάρχει μια άμεση σχέση μεταξύ της υπερφωσφορυλίωσης, της ανώμαλης φωσφορυλίωσης και της συσσώρευσης του αλλά παραμένει να καθοριστεί εάν η φωσφορυλίωση είναι η αιτία ή η συνέπεια της διαδικασίας συσσωμάτωσης.

5. Η δράση της πρωτεΐνης του ως νευροτοξικού παράγοντα

Ο ρόλος της πρωτεΐνης του ως υπόβαθρο της νευροεκφύλισης είναι γνωστός πλέον, αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν στην απώλεια της φυσιολογικής της λειτουργίας και στη μετέπειτα δράση της ως τοξικού παράγοντα χρειάζονται περαιτέρω διευκρίνιση. Έχουν προταθεί πολλές υποθέσεις για το πώς η του δρα

τοξικά στα κύτταρα. Σε αυτές περιλαμβάνονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, μια αύξηση στην ποσότητα της αδέσμευτης του καθώς και αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης του.

Αναπόσπαστο μέρος των προτεινόμενων μηχανισμών της τοξικότητας της του στις του-πάθειες είναι η λανθασμένη διαμόρφωση της και η δημιουργία συσσωματωμάτων, αλλά οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την παραγωγή των νευροινιδιακών βλαβών και άλλων του εγκλείστων παραμένουν άγνωστοι. Εναρκτήριοι παράγοντες μπορεί να είναι ένα ευνοϊκό περιβάλλον για το σχηματισμό ολιγομερών μορφών συσσωματωμάτων (π.χ., διμερών και πολυμερών). Τα ολιγομερή φαίνεται να σχηματίζονται όταν τα μονομερή του ενώνονται σχηματίζοντας διμερή, εν συνεχεία ολιγομερή και τέλος ινίδια.

Η σημερινή ισχύουσα θεωρία υποστηρίζει ότι η «υπερφωσφορυλίωση» της πρωτεΐνης του είναι η κύρια αιτία για τη δημιουργία των βλαβών. Ευρήματα με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και ανοσοϊστοχημείας υποστηρίζουν ότι υπάρχει απώλεια μικροσωληναρίων καθώς και μείωση της σταθεροποιημένης μορφής αυτών σε εγκεφάλους ασθενών με NA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συσσωματωμάτων φωσφορυλιωμένων του που οδηγούν σε νευροτοξικότητα μέσω άγνωστων μηχανισμών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της φωσφορυλίωσης στην του αντιβαίνουν αυτήν την υπόθεση κατά κάποιο τρόπο, επειδή η τροποποίηση ορισμένων τοποθεσιών της του παρεμποδίζει τη δημιουργία συσσωματωμάτων *in vitro*. Επιπλέον, η αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων λόγω της αποσύνδεσης της του πρωτεΐνης προκαλεί διαταραχή στην αξονική μεταφορά. Η χρήση φαρμάκων που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους, όπως η πακλιταξέλη και η εποθιλόνη D (παράγωγο ταξόλης) αποδείχθηκε ότι βελτιώνει την αξονική μεταφορά, βελτιώνει την αξονική πυκνότητα και αυξάνει τον αριθμό των μικροσωληναρίων.

Πολλές από τις πρώτες υποθέσεις σχετικά με την τοξικότητα της του πρωτεΐνης επικεντρώθηκαν στις NB. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά στοιχεία που υποδηλώνουν ότι οι NB μπορεί να υπάρχουν στον εγκέφαλο ασθενών για δεκαετίες χωρίς την πρόκληση κυτταρικού θανάτου.

Μια μεγάλη ανοσοϊστοχημική μελέτη κατέδειξε μια συσχέτιση μεταξύ των χολινεργικών νευρώνων του τελεγκεφάλου και τη γνωστική έκπτωση χρησιμοποιώντας δείκτες που ανιχνεύουν πρώιμης έναρξης παθολογία στην ταυ πρωτεΐνη (pS422). Μελέτες ζωικών μοντέλων έδειξαν ότι γνωστικά ελλείμματα και απώλεια νευρώνων μπορεί να συμβεί εν τη απουσία οποιασδήποτε ταυ παθολογίας. Μια πιθανή εξήγηση για αυτά τα ευρήματα είναι ότι οι NB είναι αβλαβή συσσωματώματα που υπό άλλες συνθήκες θα αποτελούσαν τοξικές μορφές της ταυ (δηλαδή, μη φυσιολογικά τροποποιημένες και / ή ολιγομερή), και ίσως σχηματίζονται προς προστασία του επηρεασμένου νευρώνα [94].

Ίσως ένας πιο χρήσιμος τρόπος για να γίνει κατανοητός ο πιθανός ρόλος της ταυ στη νευροτοξικότητα είναι η εξέταση της δομής της. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης ταυ ίσως να είναι μη αντιστρεπτή λόγω φωσφορυλίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις, γεγονός το οποίο να μην ίσχυε υπό κανονικές συνθήκες. Σε καταστάσεις ασθένειας, η δραστηριότητα πολυάριθμων κινάσων και φωσφατασών διαταράσσεται, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές της διαμόρφωσης της που δεν ελέγχονται άμεσα από το κύτταρο. Υπάρχουν πολλά πειραματικά στοιχεία που υποστηρίζουν αυτό το υποθετικό μοντέλο δυσλειτουργίας της ταυ πρωτεΐνης.

Η διαταραχή της ομαλής λειτουργίας των κινασών και των φωσφατασών εμπλέκεται και στην διαταραχή της αξονικής μεταφοράς όπως προαναφέρθηκε ενεργοποιώντας το μονοπάτι PP1-GSK3. Στις παθολογικές καταστάσεις, η πρωτεΐνη ταυ φαίνεται να λαμβάνει μια διαμόρφωση όπου η περιοχή PAD βρίσκεται εκτεθειμένη. Η μέσω της PAD επαγόμενη ενεργοποίηση του PP1-GSK3 μονοπατιού τελικά προκαλεί το διαχωρισμό των μεταφερόμενων φορτίων από την κινεσίνη πριν τον τελικό προορισμό τους. Πειράματα που διερεύνησαν τις επιπτώσεις του πεπτιδίου PAD έδειξαν ότι είναι απαραίτητο και επαρκές για την αναστολή της οπισθόδρομης αξονικής μεταφοράς ενώ σε μεταλλαγμένες ταυ όπου η περιοχή PAD είχε διαγραφεί δεν επηρεάστηκε η οπισθόδρομη αξονική μεταφορά. [101].

Τα προ – ινιδιακά συσσωματώματα και τα ολιγομερή έχουν γίνει τώρα το επίκεντρο της ταυ επαγόμενης νευροτοξικότητας. Προσφάτως, δύο ταυ ολιγομερή-

επιλεκτικά αντισώματα αναπτύχθηκαν. Το πρώτο είναι το T22 το οποίο είναι ένα πολυκλωνικό αντίσωμα προερχόμενο από κουνέλι και το οποίο όταν επωάζεται με ολιγομερή του δεν παρατηρείται τοξικότητα [103] και το δεύτερο είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, το του ολιγομερές σύμπλοκο 1 (TOC1). Το TOC1 αναγνωρίζει επιλεκτικά διμερή του και συσσωματώματα υψηλότερης τάξης και η δράση του είναι σημαντικά αυξημένη στους εγκεφάλους ασθενών με NA σε σύγκριση με υγιή άτομα και επιπλέον «βάφει» τα έγκλειστα σε PSP και CBD.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η έκκριση της του στον εξωκυττάριο χώρο και η επακόλουθη πρόσληψη της μέσω συναπτικά συνδεδεμένων νευρώνων μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν μηχανισμό μετάδοσης της του παρόμοιο με prion στον εγκέφαλο. Την υπόθεση αυτή υποστηρίζουν μελέτες στις οποίες φάνηκε ότι οι παθολογικές μορφές της του που προέρχονται από προσυναπτικούς νευρώνες προσλαμβάνονται από μετασυναπτικούς νευρώνες και οι παθολογικές μορφές λειτουργούν ως πλαίσιο για τη διευκόλυνση της πρόσληψης φυσιολογικών του πρωτεϊνών σε νεοεμφανιζόμενα έγκλειστα. Υποστηρικτικά στα ανωτέρω, τα αποτελέσματα μιας μελέτης όπου πρωτεΐνη του που προερχόταν από εγκεφάλους ανθρώπων με διάφορες του-πάθειες (πχ., PSP και CBD) εγχύθηκε σε του διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι σε αυτά τα ποντίκια, σχηματίστηκαν έγκλειστα που μοιάζαν με τις υποκείμενες παθολογίες των ανθρώπινων του-παθειών από όπου προερχόνταν. Τέλος, σε ένα εξανθρωπισμένο μοντέλο ποντικού, όπου η έκφραση της του ήταν περιορισμένη στον ενδορρινικό φλοιό, εμφάνισαν επίσης ιδιότητες διασυναπτικής εξάπλωσης της του.

Ολοκληρώνοντας, θα πρέπει να αναφερθεί ότι πιθανότατα υπάρχει ένας αριθμός πρόσθετων παραγόντων που μπορεί να εμπλέκονται στη διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη του τοξικότητα. Για παράδειγμα, η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου εμπλέκεται σε πολλές του-πάθειες και από τη στιγμή που οι καλπαΐνες είναι ασβέστο-εξαρτώμενες πρωτεάσες είναι λογικό ότι η διάσπαση της του από την καλπαΐνη θα είναι διαταραγμένη και θα παίζει κάποιο ρόλο στην τοξικότητα. Σε νευροεκφυλιστικές νόσους, συμπεριλαμβανομένων των του-παθειών έχουν παρατηρηθεί, τέλος, διαταραχές στη μιτοχονδριακή λειτουργία.

6. Παθολογικές μορφές της ταυ δημιουργούν ινίδια

Όπως έχει προαναφερθεί η ταυ είναι μια φωσφοπρωτεΐνη, της οποίας η έκταση της φωσφορυλίωσης καθορίζει τις δεσμευτικές της ικανότητές με τους μικροσωληνίσκους και την πλασματική μεμβράνη, όσο μεγαλύτερη είναι η φωσφορυλίωση τόσο ασθενέστερη είναι η δέσμευση. Ωστόσο, η ανώμαλη φωσφορυλίωση της ταυ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της αδέσμευτης φωσφο-ταυ(p-tau) στο κυτταρόπλασμα, τη συσσώρευση της, το σχηματισμό ινιδίων και εν συνεχεία εγκλείστων τα οποία αρχικά ονομάστηκαν νευροινιδιακές βλάβες, NB. Ορισμένοι συγγραφείς χρησιμοποιούν τον όρο NB μόνο για τα έγκλειστα που παρατηρούνται στη NA ενώ άλλοι χρησιμοποιούν τον όρο NB για όλες τα ενδοκυττάρια έγκλειστα που αποτελούνται από ταυ. Στο παρόν κείμενο, θα αναφερθούμε σε αυτές τις δομές ως ινιδιακά έγκλειστα ταυ πρωτεΐνης, fibrillary tau inclusions (FTI).

Τρεις τύποι ινιδίων ταυ έχουν ταυτοποιηθεί στα FTI: ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (paired helical filaments, PHF), ευθεία ινίδια, (straight, SF) και τυχαίως εσπειραμένα ινίδια (randomly coiled filaments-RCF) . Η χαρακτηριστική δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών στα συσσωματώματα των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων είναι η β αναδίπλωση, αλλά η δευτεροταγής δομή αυτών των ινιδίων δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Τα ζεύγη ελικοειδών ινιδίων, PHF είναι τα πιο καλά μελετημένα, καθώς είναι παρόντα στις NB στη NA, η οποία είναι η πιο μελετημένη ταυ-πάθεια. Τα PHF δημιουργήθηκαν με επιτυχία *in vitro* από διάφορες μορφές ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ταυ. Τα *in vitro* πειράματα προτείνουν μια β αναδίπλωση του πυρήνα των PHF, η οποία θα έκανε τα ινίδια της ταυ μέρος της μεγάλης ομάδας των ινιδίων που είναι πλούσια σε δομές με β αναδίπλωση, τυπικά για διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ωστόσο, υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα ως προς τη δομή των PHF, που προήλθαν από εγκεφάλους ασθενών με NA: ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο πυρήνας των PHF είναι πλούσιος σε ινίδια με β αναδίπλωση ενώ άλλοι προτείνουν έναν πλούσιο σε άλφα αναδίπλωση πυρήνα PHF. Εάν ο τελευταίος ισχυρισμός επιβεβαιωθεί πειραματικά αυτό θα σήμαινε ότι ινίδια μη β αναδίπλωσης θα μπορούσαν να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο στο νευροεκφυλισμό. Τα

αποτελέσματα μελέτης με συνθετικά θραύσματα ταυ φαίνεται να υποστηρίζουν αυτήν την άποψη [104].

7. Ταυ-πάθειες

Οι ταυ-πάθειες χαρακτηρίζονται τόσο από διαφορετικά είδη ταυ ινιδίων στις βλάβες όσο και από διαφορετικούς συνδυασμούς ταυ ισομορφών με συγκεκριμένο μοτίβο φωσφορυλίωσης. Εξαιτίας λοιπόν των διαφορών στη φωσφορυλίωση και τη διαφορετική σύνθεση των βλαβών, με μελετες western blot που έχουν διενεργηθεί έχει ληφθεί συγκεκριμένο μοτίβο για κάθε νόσο ξεχωριστά, μια «ταυτότητα» για κάθε νόσο που τη χαρακτηρίζει, (Εικόνα 11). Κάθε σχέδιο υπερφωσφορυλίωσης μιας συγκεκριμένης ταυ ισομορφής σημαίνει μια διαφορετική ζώνη στην ηλεκτροφορητική γέλη, καθώς έχει τη δική της ειδική μοριακή μάζα. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, λοιπόν οι ταυ-πάθειες ταξινομούνται σε πέντε διαφορετικές κατηγορίες (βλ. πίνακα 1).

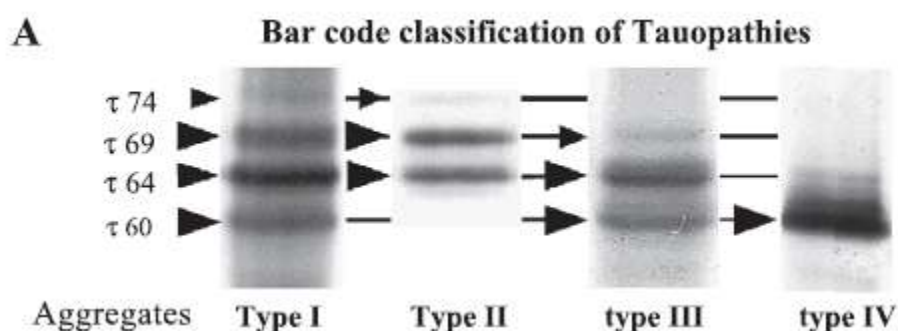
Η κατηγορία 0 χαρακτηρίζεται από απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης ταυ. Συνεπώς δεν παρατηρούνται έγκλειστα ταυ. Ο εκφυλισμός του μετωπιαίου λοβού (όχι νόσος Alzheimer ή νόσος Pick) είναι ένας εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας. Είναι η δεύτερη πιο συχνή προ-γεροντική άνοια μετά τη ΝΑ.

Η κατηγορία 1 χαρακτηρίζεται από τρεις μεγάλες μπάντες στα 60, 64 και 69kDa και μια μικρή στα 72/74 kDa. Οι μπάντες αυτές αντιπροσωπεύουν και τις έξι ισομορφές ταυ. Η πλειονότητα των ταυ-παθειών ανήκουν σε αυτή την τάξη. Η αντιπροσωπευτική ασθένεια αυτής της κατηγορίας είναι η ΝΑ, στην οποία ανευρίσκονται PHF και ευθεία ινίδια ταυ. Η κανονική γήρανση του ανθρώπινου εγκεφάλου και η ήπια γνωστική διαταραχή (mild cognitive impairment, MCI), η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε ΝΑ ταξινομούνται επίσης ως κατηγορία 1. Η κατηγορία 2 έχει δύο ζώνες στα 64 και 69 kDa που σχηματίζονται από 4R ταυ πρωτεΐνες. Παραδείγματα των ασθενειών κατηγορίας 2 είναι η προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση (PSP) και η φλοιοβασική εκφύλιση, CBD. Η κατηγορία 3 έχει δυο μπάντες στα 60 και 64 kDa που αποτελούνται από 3R ταυ. Η μόνη νευρολογική διαταραχή αυτής της κατηγορίας είναι η νόσος Pick, όπου υπάρχουν και ίσια και εσπειραμένα ινίδια. Η κατηγορία 4 έχει μία μεγάλη

μπάντα ταυ στα 60 kDa, που αποτελείται από την μικρότερη ισομορφή ταυ. Η μόνη ασθένεια σε αυτήν την κατηγορία είναι η μυοτονική δυστροφία τύπου I[95].

Η μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό που συνδέεται με το χρωμόσωμα 17 είναι μια ταυ-πάθεια που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της ταυ. Μπορεί να ανήκει στην κατηγορία 1, 2 και 3, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των ταυ εγκλείστων.

Το κοινό χαρακτηριστικό των ταυ-παθειών είναι ότι εξελίσσονται προοδευτικά. Ως εκ τούτου, τα διάφορα στάδια των νόσων μπορούν να παρατηρηθούν με βάση την κατανομή και την έκταση της παθολογίας σε ασθένειες όλων των κατηγοριών [104].



B

Class of tauopathy	Tau isoforms present and	Structure of tau filaments
0	loss of tau expression	
1	3R and 4R	PHF
2	4R	SF
3	3R	SF, RCF
4	3R	

Εικόνα 11: Η «ταυτότητα» των ταυ- παθειών A - Μια σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφορητικής κατανομής των ισομορφών της ταυ. Οι μπάντες της ταυ ονομάστηκαν βάσει του μοριακού τους βάρους (σε kDa) [95]. B: χαρακτηριστικά των κατηγοριών ταυ-πάθειας (αριθμός δέσμευσης μικροσωληνίσκων και δομή των ινιδικών συσσωματωμάτων): 3R: 3-repeat tau; 4R: 4-repeat tau, PHF: ζευγαρωμένο ελικοειδές ινίδιο, SF: ευθύγραμμο ινίδιο, RCF: τυχαίως εσπειραμένα ινίδια[104].

Ταυ-πάθεια	Κατηγορία
Νόσος Alzheimer	1
Πλαγία μυατροφική σκλήρυνση	1
Μετωποκροταφική ανοια	0
Προιούσα Υπερπυρηνική Παράλυση	2
Φλοιοβασική εκφύλιση	2
Νόσος Niemann Pick τύπου C	1
Μυοτονική δυστροφία τύπου I και II	4
Φυσιολογική γήρανση	1
Άνοια των πυγμάχων	1
Σύνδρομο Down	1
Μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό του χρωμοσώματος 17	1,2,3
Νόσος pick	3
Ατροφία πολλαπλών συστημάτων	2

Προσαρμοσμένο από [104].

***Drosophila melanogaster* και ταυ πρωτεΐνη**

Στους ανθρώπους, η συσσώρευση υπερ-φωσφορυλιωμένων ισομορφών ταυ πρωτεΐνης [άγριου τύπου (Wild Type - WT)] χαρακτηρίζει τις σποραδικές ταυ-πάθειες όπως η NA, η ασθένεια του Pick, η PSP και η CBD όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Στις περισσότερες από αυτές τις νόσους, είναι κυρίως ο λόγος των ισομορφών 4R και 3R που αλλάζει και είναι άγνωστο αν αυτή η αλλαγή στην ισομορφή 4R ή 3R είναι παθογόνος. Επομένως, δεν είναι σαφές εάν η έκφραση μιας ισομορφής θα έχει ισοδύναμα αποτελέσματα με την έκφραση της άλλης ισομορφής σε ζωικά μοντέλα ταυ-παθειών. Ωστόσο, θα ήταν λογικό να υπάρχουν πιθανές διαφορές μεταξύ των ισομορφών που εκφράζονται σε διαγονιδιακά συστήματα όταν κάθε μία από αυτές μελετάται μεμονωμένα. Επιπλέον, επειδή η FTDP-17 είναι η μόνη ταυ-πάθεια που χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις της ταυ [105], οι WT και οι ισομορφές της ταυ που φέρουν μεταλλάξεις δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως στα μοντέλα ταυ-οπάθειων όπως έχει επισημανθεί σε προηγούμενες μελέτες [105, 106], καθώς έχουν διαφορετικές συνέπειες δυσλειτουργίας [105-108] ή εκφυλισμού σε συγκεκριμένους νευρώνες. Ως εκ τούτου, το παρακάτω κείμενο έχει οργανωθεί με βάση τη διαγονιδιακή ισομορφή ταυ που χρησιμοποιήθηκε και τον τύπο των νευρώνων που εκφράστηκε. Κατά αυτόν τον τρόπο αυξάνει η χρησιμότητα της *Drosophila* στη μελέτη των ταυοπαθειών και άλλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών.

Αξιοσημείωτο είναι ότι η *Drosophila* συνοψίζει πολλά από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των νευροεκφυλιστικών ασθενειών που παρατηρούνται στους ανθρώπους όπως προοδευτικά εξελισσόμενα κινητικά ελλείμματα [108], εκφυλισμό στις πληγείσες περιοχές του εγκεφάλου, γνωστικές διαταραχές [105-107] και μειωμένη διάρκεια ζωής. Εδώ, είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι παρά την απλούστερη ανατομία του εγκεφάλου, το ΚΝΣ της *Drosophila* επιδεικνύει λειτουργίες παρόμοιες με αυτές των θηλαστικών, όπως την ανάπτυξη πολύπλοκων συμπεριφορών όπως η μάθηση και η μνήμη [109].

1.1 Η τοξικότητα της WT ισομορφής στο ΚΝΣ της *Drosophila melanogaster*

Με στόχο τη δημιουργία ενός μοντέλου ταυ-πάθειας που θα μπορούσε να υποστεί γενετική ανάλυση, ο Feany και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το

Σύστημα UAS / GAL4 [110] για την έκφραση της WT ανθρώπινης Ταυ ON4R ισομορφής σε όλο το ΚΝΣ της *Drosophila melanogaster* [111]. Το μοντέλο δεν μιμείται πλήρως τις σποραδικές ταυ- οπάθειες επειδή το διαγονίδιο της ταυ εκφράζεται στο ΚΝΣ από τη στιγμή που σχηματίζεται το έμβρυο. Παρ' όλα αυτά, αυτές οι μύγες εμφανίζουν φαινότυπο ταυ-πάθειας, πεθαίνοντας πολύ νωρίτερα από τους μάρτυρες, προφανώς εξαιτίας της προοδευτικής ανάπτυξης κενотоπίων και συσσώρευσης πρωτεΐνης ταυ στον εγκέφαλο τους [105]. Επιπλέον, όπως και με τους ασθενείς με NA, η ανάπτυξη κενотоπίων στον εγκέφαλο των μυγών που εξέφραζαν την ON4R ισομορφή ήταν εξαρτώμενη από την ηλικία, με προτίμηση τους χολινεργικούς νευρώνες και σχετιζόταν με αυξημένη χρώση με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας για μια σειρά συγκεκριμένων επιτόπων στα νευροϊνίδια.

Εκτός από τον εκλεκτικό εκφυλισμό των χολινεργικών νευρώνων, έτσι όπως και στους ανθρώπους, από την καθολική έκφραση της WT ταυ επηρεάστηκαν σοβαρά και τα mushroom bodies (MB) – τα οποία αποτελούν νευρωνικές δομές άνω των 2.000 νευρώνων ανά ημισφαίριο στον εγκέφαλο της *Drosophila* απαραίτητα για τη μάθηση και τη μνήμη στα έντομα και είναι λειτουργικά ανάλογες δομές με τον ιππόκαμπο των σπονδυλωτών. Καθολική έκφραση της 2N4R ή της ON4R ταυ κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, μειώνει σε σχεδόν πλήρη απώλεια τον αριθμό των νευρώνων των MB στους ενήλικους εγκεφάλους ενώ η ισομορφή ON3R δεν τα επηρεάζει, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι διαφορετικές ισομορφές έχουν διαφορετικές επιδράσεις.

Ένας άλλος τύπος κυττάρων του ΚΝΣ που επηρεάζεται σε ορισμένες ταυ-οπάθειες είναι η γλοία. Η γλοία στη *Drosophila* έχει παρόμοιες λειτουργίες με αυτή των σπονδυλωτών και είναι κρίσιμης σημασίας για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των νευρώνων [112]. Έκφραση της ισομορφής ON4R ελάττωσε το προσδόκιμο επιβίωσης και οδήγησε σε συσσώρευση υπερ-φωσφορυλιωμένης ταυ [105]. Η υπερ-φωσφορυλιωμένη ταυ στη νευρογλοία σχημάτισε συσσωματώματα ινιδίων, τα οποία είναι παρόμοια με τα νευροϊνίδια και τις πλάκες της γλοίας που παρατηρούνται σε ταυ-οπάθειες, όπως η CBD και η PSP.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι αν και η έκφραση WT ή μεταλλαγμένων ταυ ονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τον ηλικίο-εξαρτώμενο νευροεκφυλισμό, συμπεριφορικές διαταραχές και πρόωρο θάνατο στη *Drosophila*, ωστόσο, δεν είχε καταστεί δυνατό να ανιχνευθούν τυπικά NFTs σε αυτόν τον οργανισμό[113]. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι συσσωματώματα ταυ πρωτεΐνης με τη μορφή NFT εμφανίζονταν στην περίπτωση που συνεκφραζόταν η ταυ κινάση GSK-3β, η οποία ενισχύει περαιτέρω τον νευρωνικό θάνατο και τη σοβαρότητα της νόσου [114]. Βάσει των ανωτέρω, θεωρήθηκε ότι σε αντίθεση με τα μοντέλα των θηλαστικών, ο επαγόμενος από την πρωτεΐνη ταυ νευροεκφυλισμός στη *Drosophila* ίσως δεν απαιτούσε τη δημιουργία συσσωματωμάτων και τουλάχιστον στην περίπτωση της ταυ πρωτεΐνης, η νευροτοξικότητα να εξαρτάται από τις μεταβολές της πρωτεΐνης που συμβαίνουν πριν από το σχηματισμό συσσωματωμάτων και ίσως τα διαλυτά ολιγομερή της ταυ πρωτεΐνης θα μπορούσαν να προκαλέσουν νευροτοξικότητα και να οδηγήσουν στον κυτταρικό εκφυλισμό. Επιπλέον είχε προταθεί ότι ο μηχανισμός της εκφύλισης στη *Drosophila* ίσως διαφέρει από εκείνον του ανθρώπου λόγω του γεγονότος ότι οι νευρώνες είναι γενικά μικρότεροι από αυτούς των σπονδυλωτών, και επίσης δεν έχουν νευροϊνίδια. Επιπρόσθετα, εκτός από ένα εύρημα που καταδείκνυε δομές όμοιες με πλάκες στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες σε μοντέλα *Drosophila* νόσου Πάρκινσον [115], καμία άλλη μελέτη δεν είχε καθορίσει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ σχηματισμού ενδοκυττάρων NFTs και προκαλούμενου από ταυ νευροεκφυλισμού σε μοντέλα μύγας. Εδώ, είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι η αιτιολογία πολλών polyQ διαταραχών, όπως η χορεία του Huntington, είχε βρεθεί να διατηρείται μεταξύ μοντέλων θηλαστικών και μυγών και ο σχηματισμός εγκλείστων ήταν εύκολα ορατός στους νευρώνες της *Drosophila* που έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο σύστημα[109].

Περίεργως και ενώ διερευνάτο η κυτταρική διανομή της ολικής ανθρώπινης ταυ πρωτεΐνης (φωσφορυλιωμένης και μη φωσφορυλιωμένης) στη *Drosophila*, παρατηρήθηκε (εικόνα 12) και στη συνέχεια επικυρώθηκε με διάφορες προσεγγίσεις [116] σχηματισμός τυπικών NFTs διαφόρων σχημάτων, γεγονός το οποίο δεν είχε καταστεί δυνατό μέχρι προσφάτως όπως προαναφέρθηκε. Ο

σχηματισμός τέτοιων NFT οφειλόμενων σε ταυ πρωτεΐνη υπήρχε στους νευρώνες της *Drosophila* κατά την έκφραση είτε WT είτε μεταλλαγμένου γονιδίου [116]. Στο παραπάνω πλαίσιο είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο σχηματισμός NFT περιλαμβάνει και τις δύο μορφές, φωσφορυλιωμένη καθώς και μη φωσφορυλιωμένη ταυ πρωτεΐνη, διότι η χρώση με αντίσωμα που είναι ανεξάρτητο από την κατάσταση φωσφορυλίωσης προσδιόρισε τα είδη της ταυ που συμπεριλαμβάνονται στη δημιουργία NFT στη *Drosophila*.

Τα NFTs στη *Drosophila* παρουσιάζουν διάφορα μορφολογικά στάδια, δηλ. στάδιο της «προ – πλάκας» με πυκνά κυτταροπλασματικά έγκλειστα και πιο ώριμες ενδο- και εξω -ινιδιακές πλάκες που περιέχουν συσσωματώματα ινιδίων σε σχήμα φλόγας. Τα μορφολογικά στάδια των NFT αντιπροσωπεύουν το επίπεδο σοβαρότητας της νόσου. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, είναι το γεγονός ότι σε ήπια πάθηση παρατηρούνται λιγότερο τοξικές στρογγυλού / σφαιροειδούς σχήματος πλάκες ενώ σε σχήμα φλόγας έως συμπαγή συσσωματώματα ανιχνεύονται σε σχετικά βαριές μορφές ταυ-παθειών [116] . Είναι ενδιαφέρον ότι το μέγεθος και η συχνότητα εμφάνισης των πλακών καθώς και η σοβαρότητα της νόσου αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία και η πλειοψηφία των πλακών προσλαμβάνουν σταδιακά μορφολογία μορφής φλόγας, η οποία αντιπροσωπεύει τον πιο τοξικό τύπο NFTs. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι οι «ώριμες» NFTs και τα φωσφορυλιωμένα ινίδια ταυ συσσωρεύονται εκτενώς γύρω από κενοτόπια και εκφυλισμένους νευρώνες, γεγονός το οποίο καθιστά σαφές ότι σε μοντέλα μύγας οι νευροϊνιδιακές πλάκες έχουν σαφές αντίκτυπο στην υγεία και τη λειτουργία των νευρώνων.

1.2 Επαγόμενη από WT ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΚΝΣ

Το κυρίαρχο κλινικό σύμπτωμα των ταυ-παθειών είναι η γνωστική έκπτωση, η οποία μπορεί να συμβεί πριν από οποιαδήποτε ένδειξη νευρωνικού εκφυλισμού ή σχηματισμού συσσωματωμάτων . Επειδή τα MB είναι απαραίτητα για τη μάθηση και τη μνήμη στη *Drosophila melanogaster*, όπως προαναφέρθηκε, ερευνήθηκε η επίδραση της ανθρώπινης ταυ σε αυτούς τους νευρώνες. Συνολικά, τα

αποτελέσματα δείχνουν ότι η αύξηση της ON4R Ταυ ισομορφής στα MB προκαλεί διαταραχή στη λειτουργία τους. Στα νευροβλάστες των MB, η αύξηση της ταυ είτε εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό τους ή τους καταστρέφει. Ωστόσο, στους πλήρως διαφοροποιημένους νευρώνες των MB των ενήλικων, η αύξηση της ταυ οδηγεί σε δυσλειτουργία, αλλά δεν φαίνεται να προκαλεί τον εκφυλισμό τους.

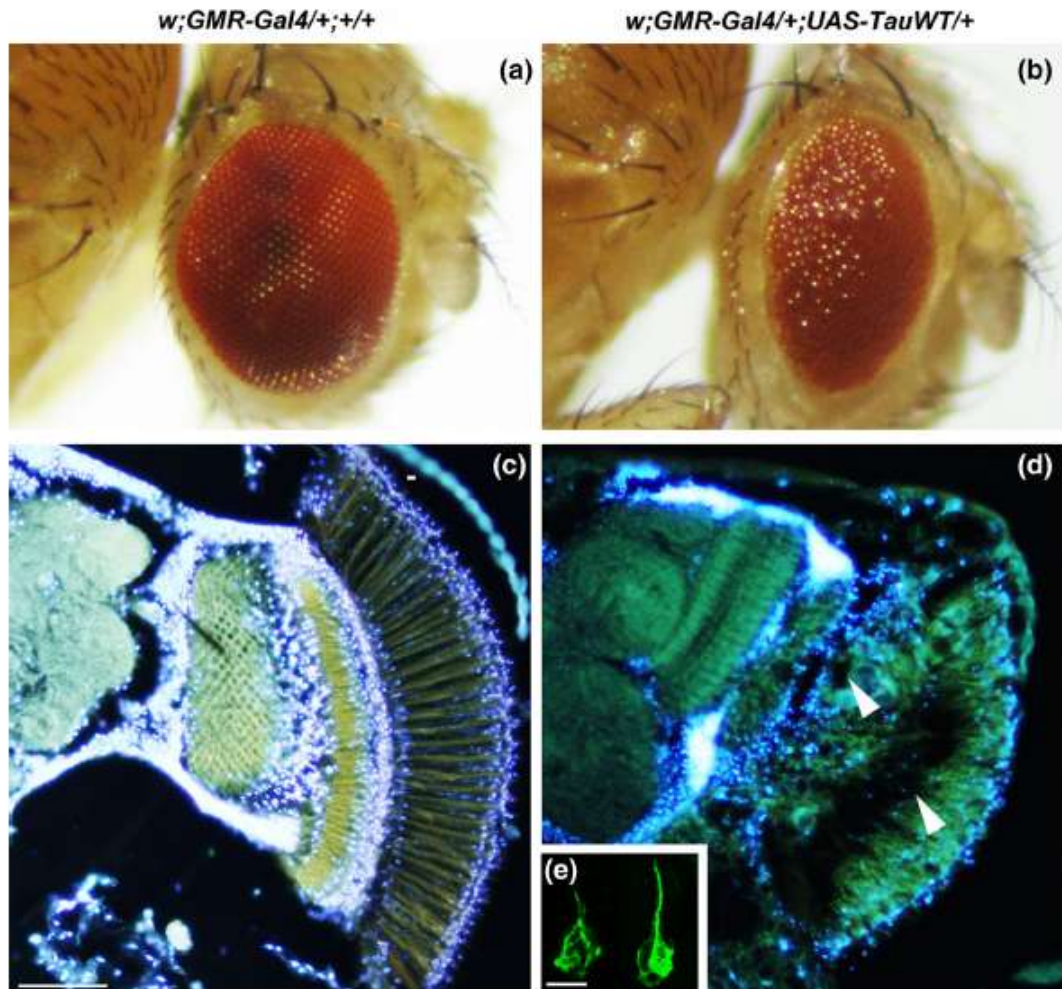
1.3 Επαγόμενη από WT ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΠΝΣ

Η *Drosophila* προσφέρει μια σειρά εργαλείων για την αξιολόγηση της τοξικότητας της ταυ πρωτεΐνης, αλλά ο αμφιβληστροειδής είναι μακράν ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ιστός για αυτόν τον τύπο αναλύσεων. Ο αμφιβληστροειδής των ενήλικων αποτελείται από περίπου 800 πανομοιότυπες μονάδες, τα ονομαζόμενα ομματίδια, τοποθετημένα σε εξαγωνική παράταξη. Σε αντίθεση με τα σπονδυλωτά, τα κύτταρα που αποτελούν τον αμφιβληστροειδή στα ενήλικα άτομα *Drosophila* προέρχονται από τον προνυμφικό οφθαλμό και όχι από τους νευροβλάστες του ΚΝΣ[117]. Ως εκ τούτου, οι φωτοϋποδοχείς και άλλοι τύποι κυττάρων που απαρτίζουν τον αμφιβληστροειδή θεωρούνται μέρος του περιφερικού νευρικού συστήματος, ΠΝΣ. Η τοξικότητα εκδηλώνεται στον αμφιβληστροειδή ως ένας "τραχύς" οφθαλμικός φαινότυπος, που χαρακτηρίζεται από μειωμένο μέγεθος των ματιών και απώλεια της κανονικής οργάνωσης των ομματιδίων. Συσσώρευση των 2N4R και ON4R ταυ σε αυτόν τον ιστό με τη χρήση του συστήματος UAS- GAL4, προκάλεσε δυσπλασία σε διαφορετικούς βαθμούς (Εικόνα 12).

Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η τοξικότητα της ταυ πρωτεΐνης έχει μοντελοποιηθεί και στη ραχιαία επιφάνεια του θώρακα[118] όπου έκφραση WT ταυ πρωτεΐνης και διάφορων μεταλλάξεων στο θώρακα είχαν ως αποτέλεσμα ποικίλου βαθμού απώλεια τριχών.

Είναι γνωστό ότι η υπερφωσφορυλιωμένη ταυ δεν μπορεί να δεσμευτεί στους μικροσωληνίσκους και αυτό θεωρείται ότι αποτελεί την απαρχή της διαταραχής των λειτουργιών που βασίζονται στα μικροσωληνάρια, συμπεριλαμβανομένης της αξονικής μεταφοράς και της συναπτικής μετάδοσης [105]. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτές οι διαταραχές μπορεί να γίνουν εμφανείς πριν από οποιαδήποτε απόδειξη

σχηματισμού ινιδίων ή νευρωνικό θάνατο. Το κινητικό σύστημα και η νευρομυϊκή σύναψη της προνύμφης της *Drosophila* αντιπροσωπεύουν ένα καλά χαρακτηρισμένο σύστημα για να μελετηθούν πιθανές επιπτώσεις της ταυ σε αυτά τα συστήματα. Υπερέκφραση της ON3R WT ταυ εντός των κινητικών νευρώνων της προνύμφης διατάραξε τη νευραξονική μεταφορά και προκάλεσε τη συσσώρευση κυστιδίων μεταφοράς με αποτέλεσμα να μειωθεί η κινητικότητα των προνυμφών [119]. Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα η καθολική έκφραση της ON4R ταυ είχε ως αποτέλεσμα ηλικιο- εξαρτώμενα ελλείμματα στην κινητικότητα των ενήλικων [108]. Τέλος η έκφραση της ON4R WT ταυ προκαλεί επίσης μεταβολές στη μορφολογία της νευρομυϊκής σύναψης και δυσλειτουργία στη συναπτική μετάδοση [120].



Εικόνα 12 : Σε σύγκριση με υγιή μάρτυρα (a, c), η έκφραση στα μάτια WT του διαγονιδίου προκαλεί τραχύτητα της επιφάνειας του οφθαλμού (b) και εκτεταμένο εκφυλισμό (βλ. βέλη) των εσωτερικών ιστών του αμφιβληστροειδούς (d) όπως φαίνεται από χρώση DAPI. ε) Συνολική χρώση της ταυ πρωτεΐνης αποκαλύπτει τυπικό σχηματισμό NFT σχήματος φλόγας σε εκφυλισμένους νευρώνες. Κλίμακα: c, d = 100 μm. e = 10 μm [109].

2.1 Επαγόμενη από μεταλλαγμένη ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΚΝΣ

Η έκφραση της μετάλλαξης R406W του FTDP-17, σε 0N4R *Drosophila* σε όλους τους νευρώνες είχε ως αποτέλεσμα περαιτέρω ελάττωση του προσδόκιμου επιβίωσης από αυτή που παρατηρήθηκε στα μοντέλα που έφεραν τη WT μορφή της ταυ καθώς και ηλικιο-εξαρτώμενη αύξηση των κενотоπίων και απώλεια χολινεργικών νευρώνων. Φαίνεται ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη R406W καθιστά τους νευρώνες του ΚΝΣ ιδιαίτερα επιρρεπείς στο οξειδωτικό στρες όχι όμως μέσω αύξησης της τοξικότητας της ταυ πρωτεΐνης μεταβάλλοντας την κατάσταση

φωσφορυλίωσης της, τουλάχιστον όχι σε γνωστές περιοχές, αλλά μάλλον προάγει την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου στους νευρώνες του ΚΝΣ που εκφράζουν αυτή την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Η ανωτέρω διαπίστωση ίσως αποτελεί μια επιπλέον έκφραση του μηχανισμού της εξαρτώμενης από την πρωτεΐνη ταυ τοξικότητας, ότι δηλ. οι πλήρως διαφοροποιημένοι νευρώνες που επιχειρούν την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο αποπίπτουν [105]. Ωστόσο, συχνές μεταλλάξεις όπως οι V377M και P301L του FTDP-17, δεν εξετάστηκαν σε αυτά τα πειράματα, οπότε είναι επί του παρόντος άγνωστο αν αυτές οι παρατηρήσεις είναι ειδικές για τη μετάλλαξη R406W ή χαρακτηρίζουν όλες τις μεταλλάξεις της ταυ πρωτεΐνης .

Εν αντιθέσει με τα ανωτέρω αποτελέσματα, οι μεταλλάξεις ON4R-R406W και V377M έχουν ηπιότερη επίδραση στους νευρώνες των MB από αυτή που παρατηρήθηκε στις WT ισομορφές. Τα προκύπτοντα MB των ενηλίκων δεν ήταν τόσο έντονα διαταραγμένα όπως στην έκφραση WT ταυ και στην περίπτωση των ζώων που φέρουν τη μετάλλαξη V377M, οι δομικές αλλαγές ήταν ελάχιστες. Οι λειτουργικές επιδράσεις των R406W και V377M στη μάθηση και τη μνήμη δεν έχουν μελετηθεί ακόμα μεμονωμένα ανεξαρτήτως των δομικών αλλαγών που προκαλούν. Ωστόσο, ακόμη και με τις συνδεδεμένες δομικές αλλαγές, τα αποτελέσματα αυτών των μεταλλάξεων στη μάθηση ήταν λιγότερο σοβαρά από εκείνα που παρατηρήθηκαν στα WT μοντέλα, υπογραμμίζοντας περαιτέρω τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των WT και μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.

2.2 Επαγόμενη από μεταλλαγμένη ταυ πρωτεΐνη δυσλειτουργία του ΠΝΣ

Η έκφραση των μεταλλάξεων FTDP-17 προκάλεσε σημαντικό βαθμό τοξικότητα στον αμφιβληστροειδή, η οποία ήταν γενικά πιο σοβαρή και διαφορετικής μορφολογίας από αυτή που παρατηρήθηκε στις WT ισομορφές.

Επιπροσθέτως, δύο επακόλουθες μελέτες που χρησιμοποίησαν τον αμφιβληστροειδή ως μέσο διεξαγωγής συμπερασμάτων εντόπισαν συστατικά του κυτταροσκελετού ακτίνης ως ενισχυτικά της νευροτοξικότητας της μετάλλαξης V377M [105]. Η γενετική μείωση των επιπέδων ακτίνης ελάττωσε την επαγόμενη από V377M τοξικότητα, ενώ η αύξηση των επιπέδων ακτίνης ενίσχυσε τον

φαινότυπο [121]. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε επίσης συσσώρευση νηματίων ακτίνης και σχηματισμός ραβδίων πλούσιων σε ακτίνη, στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή στη *Drosophila* κατά την υπερέκφραση της ταυ που φέρει τη μετάλλαξη R406W. Είναι ενδιαφέρον, ωστόσο, να σημειωθεί ότι οι αλλαγές στην ακτίνη δεν παρατηρήθηκαν σε μύγες που εξέφραζαν WT ταυ πρωτεΐνη, ενδεχομένως άλλη μια εκδήλωση των διαφορών συνεπεία της συσσώρευσης μεταλλαγμένων και WT πρωτεϊνών.

Σύστημα γιγαντιαίων αξόνων της *Drosophila melanogaster*

1. Εισαγωγή στο σύστημα γιγαντιαίων αξόνων

Η απογείωση της *Drosophila*, αποτελεί μία στερεοτυπική συμπεριφορά που έχει μελετηθεί εκτενώς. Γενικά, έχουν περιγραφεί δύο ξεχωριστοί τύποι έναρξης πτήσης: ο τύπος 1 και ο τύπος 2 [122, 123]. Ο τύπος 1 εμφανίζεται όταν η πτήση είναι “θεληματική” ή όταν προκαλείται από κάποια δυσάρεστη οσμή [123]. Σε αυτόν τον τύπο πτήσης, αρχικά παρατηρείται ανύψωση των φτερών και εν συνεχεία ακολουθεί η απογείωση της μύγας μέσω άλματος, το οποίο οφείλεται στη συγχρονισμένη έκταση των μεσοθωρακικών ποδιών και της βύθισης των φτερών. Από την άλλη πλευρά, η έναρξη πτήσης τύπου 2 οφείλεται κυρίως σε κάποιο οπτικό ερέθισμα, το οποίο οδηγεί στην απομάκρυνση του εντόμου αιφνιδίως και γι’ αυτό έχει χαρακτηριστεί ως συμπεριφορά διαφυγής (escape response). Εν αντιθέσει με την πτήση τύπου 1, τα φτερά παραμένουν σε θέση ηρεμίας, ενώ η μύγα απογειώνεται με άλμα, που οφείλεται στην έκταση των μεσοθωρακικών ποδιών [122]. Παρ’ όλα αυτά, μία έτερη εργασία υποστηρίζει ότι και η πτήση τύπου 2 άρχεται με ανύψωση των φτερών [124]. Χάρη στις παράλληλες καταγραφές που πραγματοποιήθηκαν από τον αυχενικό σύνδεσμο (cervical connective) και από τους αλτικούς ή πτητικούς μύες της *Drosophila*, κατά την έναρξη της πτήσης, διαπιστώθηκε ότι μόνο η έναρξη πτήσης τύπου 2 συντονίζεται από τους νευρώνες του συστήματος γιγαντιαίων αξόνων [125].

Το άλμα του ζώου προκαλείται από την έκταση των μεσοθωρακικών ποδιών του, μέσω της σύσπασης του αμφίπλευρου ζεύγους των δύο αλτικών μυών (AM) (tergotrochanteral muscle-TTM) [126, 127]. Ο AM είναι ο κύριος εκτείνων μυς του μηρού του μεσοθωρακικού ποδιού, αποτελούμενος από 22-29 μυϊκές ίνες, έχει κυλινδρική μορφή και εντοπίζεται στην πλευρική περιοχή του μεσοθωρακικού μεταμερούς, όπου εκτείνεται από τη ράχη προς την κοιλιά του δίπτερου. Ο μυς αυτός ομοιάζει με βεντάλια λόγω του ότι η πρόσφυση του είναι πλατύτερη στη ραχιαία περιοχή παρά στην κοιλιακή [70, 128, 129]. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στο άλμα διαφυγής φαίνεται να παίζει και η έκταση της μηρο-κνημιαίας άρθρωσης (femur-tibia joint) του μεσοθωρακικού ποδιού, η οποία ελέγχεται από τη σύσπαση του ανυψωτικού μυ της κνήμης (AMK) (tibial levator muscle-TLM)[130].

Για τις χαρακτηριστικές κινήσεις των φτερών είναι υπεύθυνες τρεις κατηγορίες αμφίπλευρων ζευγών πτητικών μυών οι οποίες ενεργοποιούνται αμέσως μετά την έκταση των μεσοθωρακικών ποδιών, κατά την συμπεριφορά διαφυγής. Η σύσπαση των 6 ραχιαίων επιμηκών μυών (PEM1-6) (Dorsal Longitudinal Muscles-DLMs) προκαλεί την βύθιση των φτερών. Αντιθέτως, η ανύψωση των φτερών επιτυγχάνεται με τη σύσπαση των 3 ινωδών ραχιαίων κοιλιακών μυών (PKMI, PKMII, PKMIII) (Dorsal Ventral Muscles- DVMs). Ο πρώτος μυς αποτελείται από τρεις μυϊκές ίνες (PKMIa-c), ενώ ο δεύτερος και ο τρίτος μυς από δύο (PKMIIa,b; PKMIIIa,b). Σε αντίθεση με τον AM και τους τρεις PKM, οι οποίοι απαρτίζονται από συγκεκριμένο αριθμό μυϊκών ινών, καθένας από τους 6 PEMs αποτελεί από μόνος του μία μυϊκή ίνα [70, 130]. Η ταλάντωση των φτερών (βύθιση και ανύψωση) κατά την πτήση επιτυγχάνεται με την εναλλασσόμενη σύσπαση των ανταγωνιστών πτητικών μυών, PEMs και PKMs[131]). Μία τρίτη κατηγορία πτητικού μυ, ο πρόσθιος πλευρικός μυς 3 (ΠΠΜ 3) (anterior pleural number 3 muscle-ra3), είναι υπεύθυνος για τις πλευρικές κινήσεις των φτερών [127, 132].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διέγερση του γιγαντιαίου νευρώνα (ΓΝ) του ΣΓΑ είναι επαρκής για να προκαλέσει τη διαδοχική σύσπαση όλων των προαναφερθέντων μυών [133]. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι το χρονικό διάστημα ενεργοποίησης κάθε μυ μετά από διέγερση του ΓΝ είναι σχετικά σταθερό [127], συμβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη συντονισμένη λειτουργία των

παραπάνω μυών που αποτελούν τη βάση του άλματος και της πτήσης στη συμπεριφοράς διαφυγής. Η σειρά ενεργοποίησης των μυών του ΣΓΑ, βάσει των τιμών βραχύχρονης απόκρισης που έχουν καταγραφεί από τους διάφορους μύες, έπειτα από διέγερση του ΓΝ, είναι η ακόλουθη: AM, PEMς ή AMK, PKMIII, PKMII και PKMI [127, 130].

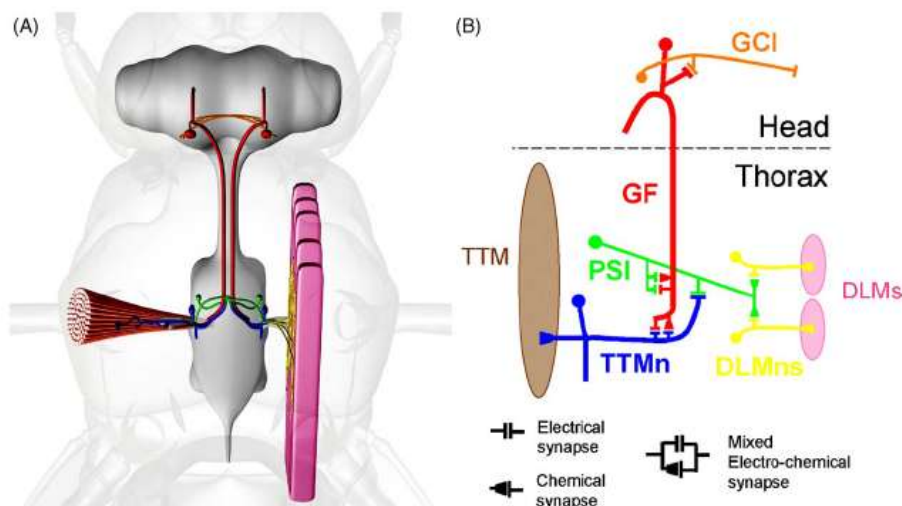
2. Μορφολογία και φυσιολογία του συστήματος γιγαντιαίων νευρώνων

Το σύστημα των γιγαντιαίων αξόνων απαρτίζεται από νευρώνες, των οποίων η ταυτοποίηση, τουλάχιστον όσον αφορά τα δυο υποκυκλώματα που συνδέουν το γιγαντιαίο νευρώνα με τους ραχιαίους επιμήκεις μύες (ΓΝ- PEMς) ή με το μυ για άλμα (ΓΝ-AM) πραγματοποιήθηκε, αρχικά, χάρη στο ιδιαίτερο μέγεθος ή σχήμα που διαθέτουν κάποιοι από τους νευρώνες αυτού του κυκλώματος [134, 135]. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραμάτισε και η παρουσία ηλεκτρικών συνάψεων μεταξύ των διαφόρων νευρώνων του συστήματος, οι οποίες αποτελούμενες από χασματοσυνδέσεις (gap junctions), επιτρέπουν τη διέλευση ουσιών μικρού μοριακού βάρους [136-138]. Η ύπαρξη ηλεκτρικών συνάψεων επιβεβαιώθηκε μέσω πειραμάτων, στα οποία η χρήση στελεχών που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *shaking – B* (*sha – B*), το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνες που σχηματίζουν διαύλους χασματοσυνδέσεων, αποτρέπει τη διακυτταρική μεταφορά των παραπάνω ουσιών. Το αποτέλεσμα αυτό, οφειλόταν σε μη λειτουργικούς διαύλους χασματοσυνδέσεων και όχι ελαττωματικής ανάπτυξης των νευρώνων του ΣΓΑ παρόλο που παρατηρήθηκαν μικρές αλλαγές στη δενδριτική μορφολογία του AMν[139]. Η διαλεύκανση της μορφολογίας των γιγαντιαίων νευρώνων, των μεταξύ τους συνάψεων, αλλά και των συνάψεων τους με άλλους νευρώνες διαλευκάνθηκε με την έγχυση ειδικών χρωστικών ουσιών (π.χ. κοβάλτιο, Lucifer Yellow)[136, 137, 140, 141]. Παράλληλα, η έγχυση ορθόδρομα (*forward fill*) ή οπισθόδρομα (*backfill*), μέσω νεύρων ή μυϊκών ινών, ανάλογων ουσιών (π.χ. κοβάλτιο, HRP, rhodamine-dextran, Biocytin), συνείσφερε στην ταυτοποίηση της μορφολογίας των κινητικών νευρώνων[130, 134, 137, 142]. Εκτός από τις παραδοσιακές αυτές τεχνικές, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον και ιστοειδικοί επαγωγείς, οι οποίοι εκφράζονται ειδικά σε νευρώνες του ΣΓΑ [136, 138, 143].

Η πρώτη περιγραφή της πορείας των ΓΝ, έγινε το 1948 από τον Wyman, ο οποίος είχε παρατηρήσει ότι οι δύο άξονες του αμφίπλευρου ζεύγους των ΓΝ περνούν από τον εγκέφαλο στο θωρακικό τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), μέσω του αυχενικού συνδέσμου. Η πρώτη λεπτομερής περιγραφή του συστήματος των γιγαντιαίων αξόνων, όμως, προήλθε από τους King και Wyman (1980) [135], οι οποίοι με τη βοήθεια της οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρατήρησαν ότι ο κάθε άξονας του ΓΝ, στο επίπεδο του μεσοθωρακικού νευρομερούς (T2), συνάπτεται τόσο με τον ομόπλευρο περιφερειακό ενδιάμεσο νευρώνα (ΠΕΝ) όσο με τον ομόπλευρο κινητικό νευρώνα του αλτικού μυός (ΑΜν). Οι τελικές νευρικές απολήξεις του ΠΕΝ, με τη σειρά τους, σχηματίζουν συνάψεις με τους κινητικούς νευρώνες των ραχιαίων επιμηκών μυών (ΡΕΜνς) κατά μήκος του περιφερειακού νεύρου ΟΡΜΝ.

Στην περιφέρεια, οι ΡΕΜς 1-4 νευρώνονται από τους 4 ομόπλευρους κινητικούς νευρώνες (ΡΕΜνς1-4), τα σώματα των οποίων βρίσκονται στην πλευρική επιφάνεια, στο όριο μεταξύ προθωρακικού (T1) και μεσοθωρακικού (T2) νευρομερούς. Αντιθέτως, οι δύο πιο ραχιαίοι πτητικοί μύες (ΡΕΜς5-6) νευρώνονται από τον άξονα του ετερόπλευρου ΡΕΜν5, ο οποίος διαθέτει ένα ιδιαίτερα ευμέγεθες και πεπλατυσμένο σώμα χωρίς να έχει σταθερή θέση ανάμεσα στην πλευρική επιφάνεια και τη μεσαία γραμμή [134, 135, 137, 142, 144]. Όσον αφορά τη νευρομυϊκή σύναψη του αλτικού μυός (ΑΜ), ο άξονας του κάθε κινητικού νευρώνα ΑΜν εξέρχεται από το μεσοθωρακικό νευρομερές, μέσω μίας διακλάδωσης του ομόπλευρου ΟΡΜΝ, και κατευθύνεται προς τον ομόπλευρο ΑΜ [135].

Ταυτοχρόνως, οι King και Wyman [135] περιγράφουν συνάψεις, στην περιοχή του νευρομερούς T2, μεταξύ των ετερόπλευρων αξόνων των δύο γιγαντιαίων νευρώνων (ΓΝ) (ζεύγη ΓΝ/ΓΝ), μεταξύ των δύο ΠΕΝ (ζεύγη ΠΕΝ/ΠΕΝ) καθώς επίσης και μεταξύ του κινητικού νευρώνα του αλτικού μυός (ΑΜν) και του περιφερειακού ενδιάμεσου νευρώνα (ΠΕΝ) (ζεύγη ΑΜν/ΠΕΝ). Επιπλέον, οι δύο ΓΝ επικοινωνούν και στην περιοχή του εγκεφάλου, μέσω ενδιάμεσων νευρώνων (Giant Commissural Interneurons- GCIs). Οι ενδιάμεσοι αυτοί νευρώνες (GCIs) σχηματίζουν εκατέρωθεν ηλεκτρικές συνάψεις με τους ραχιαίους διάμεσους δενδρίτες (Dorsal Medial Dendrites-DMDs) των δύο ΓΝ [136].



Εικόνα 13 : Το σύστημα γιγαντιαίων αξόνων (ΣΓΑ). (Α) Απεικόνιση του ΣΓΑ στο εσωτερικό του κεντρικού νευρικού συστήματος της *Drosophila*. Οι κινητικοί νευρώνες του συστήματος νευρώνουν τους πτητικούς μύες (PEMς-δεξιά) και το μυ για άλμα (AM-αριστερά). (Β) Παρουσίαση των νευρώνων και των συνάψεων τους (χημικές, ηλεκτρικές ή μεικτές), που απαρτίζουν το ΣΓΑ . GF: ΓΝ, DLMs: PEMς, DLMns: PEMνς, TTM: AM, TTMn: AMν, PSI: ΠΕΝ (Από Allen et al., 2006) [145].

Ο χαρακτηρισμός των συνάψεων των δύο υποκυκλωμάτων, ΓΝ-PEMς και ΓΝ-AM ως ηλεκτρικών ή χημικών έγινε μέσω πειραμάτων ηλεκτροφυσιολογίας. Η μέτρηση του απαιτούμενου χρόνου μετάδοσης του σήματος διενεργήθηκε μέσω ηλεκτρικής διέγερσης του ΓΝ και καταγραφής των δυναμικών ενέργειας από τους PEMς και τον AM (βραχύχρονη απόκριση)[70, 127].

Οι Tapouge και Wyman [127] υπολογίζοντας τη βραχύχρονη απόκριση από τους PEMς και AM, ύστερα από ηλεκτρική διέγερση του ΓΝ ή των κινητικών νευρώνων PEMνς και AMν, αλλά και αξιολογώντας την πιστότητα απόκρισης των συνάψεων σε υψηλής συχνότητας διέγερση, οδηγήθηκαν σε μία σειρά από συμπεράσματα σύμφωνα με τα οποία ο χρόνος της βραχυχρόνης απόκρισης (BA:~0.66msec) του μύ του άλματος AM σε ηλεκτρική διέγερση του κινητικού του νευρώνα AMν υποδηλώνει ότι η νευρομυϊκή σύνδεση AMν/AM είναι μία χημική σύνδεση. Η μικρή διαφορά (~0.15msec), ανάμεσα στη BA (~0.81msec) του υποκυκλώματος γιγαντιαίος νευρώνας-μυς για άλμα (ΓΝ-AM) και τη BA (~0.66msec) της νευρομυϊκής

σύναψης AMn/AM, υποδηλώνει ότι το υποκύκλωμα ΓN-AM δε θα μπορούσε να περιλαμβάνει περισσότερες από μία χημικές συνάψεις. Θεωρήθηκε, επομένως, ότι η σύναψη μεταξύ του ΓN και του AMn είναι μία ηλεκτρική σύναψη. Αφετέρου, η τιμή της BA (~1.25msec) που παρουσιάζει το υποκύκλωμα ΓN-PEM_s, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το υποκύκλωμα είναι δυνατόν να περιλαμβάνει δύο χημικές συνάψεις. Η μία χημική σύναψη, σύμφωνα με την εκτίμηση της BA (~0.83msec) από τους PEM_s, ύστερα από διέγερση των PEM_n, ήταν προφανώς η νευρομυϊκή σύναψη (PEM_n/PEM_s) του υποκυκλώματος ΓN- PEM_s. Από το γεγονός αυτό συνεπαγόταν ότι η δεύτερη χημική σύναψη θα ήταν είτε η ΓN/PEN είτε η PEN/PEM_n. Η λεπτομερής μορφολογική ανάλυση των νευρώνων του ΣΓΑ, στο σημείο αυτό, έδειξε ότι η κεντρική χημική σύναψη σχηματίζεται μεταξύ του PEN και των αξόνων των PEM_n. Επομένως, η εναπομείνασα σύναψη (ΓN/PEN) χαρακτηρίστηκε ως ηλεκτρική. Τα συμπεράσματα ότι οι νευρομυϊκές συνάψεις AMn/AM και PEM_n/PEM_s είναι χημικές, επιβεβαιώθηκαν αργότερα και από το γεγονός ότι η λειτουργία των συνάψεων αυτών δεν επηρεάζεται από μεταλλάξεις που διακόπτουν τη διαβίβαση στις ηλεκτρικές συνάψεις [133, 139].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η διέγερση ενός εκ των δύο ΓN είναι σε θέση να ενεργοποιήσει τόσο τους ομόπλευρους όσο και τους ετερόπλευρους μύες (PEM_s ή AM), πιθανόν λόγω των συνάψεων που φαίνεται να έχουν μεταξύ τους οι ετερόπλευροι νευρώνες (π.χ. ΓN/ΓN, PEN/PEN, PEN/AMn). Μετρήσεις της βραχύχρονης απόκρισης που διενεργήθηκαν μέσω πειραμάτων κατέδειξαν ότι οι συνάψεις, τόσο μεταξύ των ετερόπλευρων αξόνων των δύο ΓN ή των δύο PEN, όσο μεταξύ των PEN και AMn, είναι ηλεκτρικές [127, 135].

Σχεδόν 20 έτη αργότερα οι Blagburn και συνεργάτες [146] περιέγραψαν ότι μεταξύ του ΓN και των μετασυναπτικών PEN ή AMn, εντοπίζονται, εκτός από ηλεκτρικές και χημικές συνάψεις. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν T-bars και συναπτικά κυστίδια, στοιχεία ενδεικτικά χημικής διαβίβασης, στην προσυναπτική περιοχή του ΓN, κοντά στις συνάψεις ΓN/PEN και ΓN/AMn. Η διαπίστωση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι, ύστερα από διέγερση του ΓN, επιτυγχάνεται καταγραφή δυναμικών ενέργειας από τον AM ατόμων που φέρουν τη μεταλλάξη shak-B, η οποία προκαλεί διακοπή στη διαβίβαση των ηλεκτρικών συνάψεων του ΣΓΑ. Ιδιαίτερα, στην

περίπτωση αυτή, η ΒΑ των μεταλλαγμένων στελεχών είναι αυξημένη σε σχέση με εκείνη των μαρτύρων - ατόμων αγρίου τύπου [133, 139, 143]. Η παραπάνω διαπίστωση αφορά αποκλειστικά το υποκύκλωμα ΓΝ- ΑΜ, αφού όπως αποδεικνύεται, ο μοναδικός νευρώνας από τον εγκέφαλο που συνάπτεται με τον ΑΜν, είναι ο ΓΝ [143]. Συνεπώς, η αύξηση της ΒΑ δεν οφείλεται στην ενεργοποίηση κάποιου διαφορετικού κυκλώματος μεταξύ εγκεφάλου και θώρακα, αλλά στο γεγονός ότι η διαβίβαση του σήματος από το ΓΝ στον ΑΜν πραγματοποιείται μόνο μέσω χημικής σύναψης, στα συγκεκριμένα μεταλλαγμένα στελέχη. Αντιθέτως, δε λαμβάνεται καμία απάντηση από τους ΡΕΜνς των μεταλλαγμένων στελεχών, ύστερα από διέγερση του ΓΝ, παρόλο που η νευρομυϊκή σύναψη (ΡΕΜνς/ΡΕΜς) του υποκυκλώματος ΓΝ-ΡΕΜς λειτουργεί φυσιολογικά όπως αποδεικνύεται μετά από ενεργοποίηση των κινητικών νευρώνων ΡΕΜνς. Στην περίπτωση αυτή είναι πολύ πιθανό η χημική σύναψη, μεταξύ του ΓΝ και ΠΕΝ, να μην είναι λειτουργική ή τα δυναμικά να είναι υπό-ουδικά, άρα δεν είναι σε θέση να προκαλέσουν δυναμικό ενέργειας στον ΠΕΝ[133, 139, 143]. Συνάγεται, λοιπόν το συμπέρασμα ότι οι συνάψεις ΓΝ/ΑΜν και ΓΝ/ΠΕΝ είναι μεικτές, αποτελούμενες τόσο από χημικές όσο από ηλεκτρικές συνάψεις.

Κατά το παρελθόν υπήρξαν πολλές μελέτες οι οποίες συνέβαλλαν στη διαλεύκανση της φύσης των νευροδιαβιβαστών των νευρώνων του ΣΓΑ . Οι Gorczyca και Hall χρησιμοποιώντας θερμοευαίσθητα μεταλλαγμένα στελέχη του γονιδίου της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης, του συνθετικού ενζύμου της ακετυλοχολίνης, διεξήγαγαν το συμπέρασμα ότι η αξονοαξονική σύναψη μεταξύ του ΠΕΝ και των ΡΕΜνς είναι χολινεργική, διότι η αποσιώπηση του παραπάνω γονιδίου, η οποία αποτρέπει τη σύνθεση ακετυλοχολίνης, προκαλεί παύση της διαβίβασης στη σύναψη ΠΕΝ/ΡΕΜνς [147]. Πολύ αργότερα διαπιστώθηκε ότι η σύναψη μεταξύ του ΓΝ και του ΑΜν είναι επίσης χολινεργική. Συγκεκριμένα η αποσιώπηση του γονιδίου της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *shak-B*, είχε ως συνέπεια την παύση της διαβίβασης στη μεικτή σύναψη ΓΝ/ΑΜν. Σύμφωνα με τα παραπάνω, προκύπτει ότι ο ΓΝ είναι ένας χολινεργικός νευρώνας, γεγονός που υποδεικνύει ότι και η χημική σύναψη μεταξύ των ΓΝ και ΠΕΝ θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως χολινεργική

[148] . Οσον αφορά τις νευρομυϊκές συνάψεις του ΣΓΑ, όπως όλες οι νευρομυϊκές συνάψεις στη *Drosophila*, είναι γλουταμινεργικές, έχοντας ως διαβιβαστή το γλουταμινικό οξύ [128, 149, 150].

Η διέγερση του ΓΝ εκτός από τους ΡΕΜς και τον ΑΜ, ενεργοποιεί άλλες τρεις κατηγορίες μυών: τον ανυψωτικό μυ της κνήμης (ΑΜΚ), τους τρεις ραχιαίους κοιλιακούς μύες (ΡΚΜΙ, ΡΚΜΙΙ, ΡΚΜΙΙΙ) και τον πρόσθιο πλευρικό μυ 3. Ο κινητικός νευρώνας του ανυψωτικού μυ της κνήμης (ΑΜΚν), εντοπίζεται στο μεσοθωρακικό τμήμα του ΚΝΣ και διαθέτει ένα πλατύ κυτταρικό σώμα, ενώ το δενδριτικό του πεδίο εκτείνεται μέχρι τη πλευρική περιοχή του μεσοθωρακικού νευρομερούς. Η τιμή της ΒΑ (~1.46msec) του άγνωστου υποκυκλώματος ΓΝ-ΑΜΚ προσομοιάζει εκείνης του υποκυκλώματος ΓΝ- ΡΕΜς (ΒΑ ~1.29msec). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το υποκύκλωμα ΓΝ- ΑΜΚ περιλαμβάνει, εκτός από τη νευρομυϊκή σύναψη ΑΜΚν/ΑΜΚ, πιθανότατα και μία έτερη κεντρική χημική σύναψη. Εικάζεται η παρουσία ενός ενδιάμεσου νευρώνα μεταξύ του ΓΝ και ΑΜΚν, χωρίς να αποκλείεται ο ενδιάμεσος αυτός νευρώνας να είναι ο ΑΜν [130]. Το υποκύκλωμα που περιλαμβάνεται τόσο μεταξύ του ΓΝ και των ΡΚΜς, όσο μεταξύ του ΓΝ και του πρόσθιου πλευρικού μυ 3, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Παρ' όλα αυτά, η μέτρηση της ΒΑ (~3.36msec) από τους ΡΚΜς, ύστερα από διέγερση του ΓΝ, υπέδειξε ότι το υποκύκλωμα ΓΝ-ΡΚΜ περιλαμβάνει αρκετές χημικές συνάψεις [130, 135].

Εν αντιθέσει με τα δύο πολύ καλά μελετημένα υποκυκλώματα ΓΝ-ΡΕΜς και ΓΝ-ΑΜ του ΣΓΑ, το νευρωνικό κύκλωμα, διαμέσου του οποίου το οπτικό σήμα φθάνει στο ΓΝ και τον διεγείρει, δεν είναι ταυτοποιημένο σε επίπεδο αναγνωρισμένων νευρώνων αλλά εικάζεται ότι μεταξύ των φωτοϋποδοχέων του οφθαλμού και του ΓΝ παρεμβάλλονται περίπου τέσσερις, χημικές συνάψεις [151]. Μέχρι στιγμής, από μελέτες στη *Drosophila* αλλά και σε άλλα δίπτερα, έχουν αναγνωριστεί δύο τύποι νευρώνων, οι οποίοι σχηματίζουν μεικτές (ηλεκτρικές και χημικές) συνάψεις με τους δενδρίτες του ΓΝ [152-154]. Συγκεκριμένα, οι κοιλιακοί πλευρικοί δενδρίτες (Ventral Lateral Dendrites-VLDs) του ΓΝ λαμβάνουν τα οπτικά σήματα από τους κιονοειδείς νευρώνες της νευροπίλης (lobula columnar neurons) [155], οι οποίοι ονομάζονται και νευρώνες Col A [156, 157]. Από την άλλη πλευρά, οι οπίσθιοι πλευρικοί δενδρίτες (Posterior Lateral Dendrites-PLDs) του ΓΝ νευρώνονται από τους

μηχανοαισθητικούς νευρώνες του χορδοτονικού οργάνου της κεραίας [152-154]. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο το οπτικό σύστημα, όσο και το οσφρητικό, απαρτίζονται κατά κύριο λόγο από χολινεργικούς νευρώνες [158, 159]. Συνεπώς αποδεικνύεται, ότι οι συνάψεις που σχηματίζει ο ΓΝ με τους προσυναπτικούς του νευρώνες είναι χολινεργικές, παρόμοια με ότι έχει ήδη δειχθεί και για τις κεντρικές χημικές συνάψεις των υποκυκλωμάτων ΓΝ-PEMς και ΓΝ- AM.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΓΙΑ *Drosophila melanogaster*

Υλικά:

Άγαρ (Scharlau/Serva)

Ξηρή μαγιά (Γιώτης/Macmagic)

Αλεύρι καλαμποκιού (Φυσιοθεραπευτική-προϊόν βιολογικής γεωργίας)

Ζάχαρη καγιένα (Φυσιοθεραπευτική-προϊόν βιολογικής γεωργίας)

Γλυκόζη (D-glucose) (Gibco)

Προπιονικό οξύ (Sigma)

Methyl-4-hydroxybenzoate (nipagine) (Sigma)

Αιθανόλη (absolute) (Scharlau)

Αποσταγμένο H₂O

Συστατικά για 1000ml H ₂ O
Agar 7.5g
μαγιά 50g
αλεύρι 35 g
ζάχαρη 35g
γλυκόζη 20 g
προπιονικό 4 ml
10% nipagine in EtOH 25ml

Πίνακας 1 : Αναλογία συστατικών για την Παρασκευή 1000ml τροφής

Η τροφή διατηρείται στο ψυγείο (4⁰C) περίπου μια βδομάδα.

2. Σειρές *Drosophila melanogaster*

Η καλλιέργεια των μυγών (*Drosophila melanogaster*) τελέστηκε σε πλαστικά κυλινδρικά φιαλίδια (8x3 cm) που περιέχουν περίπου 12 ml θρεπτικού υλικού. Το θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε τόσο για τη θρέψη των ζώων όσο και για την εναπόθεση των αυγών τους. Τα φιαλίδια με τις μύγες διατηρούνταν σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (24°C) και υψηλής υγρασίας (60-80%) και τα έντομα διαβίωναν σε εικοσιτετράωρο κύκλο 12ώρες φως/12ώρες σκοτάδι. Τα άτομα μεταφερόντουσαν κάθε 3 ημέρες σε φιαλίδια με φρέσκια τροφή.

Το γενετικό υπόβαθρο για όλες τις σειρές μυγών ήταν το W¹¹¹⁸.

Για τα πειράματα του πρώτου μέρους αυτής της διατριβής χρησιμοποιήθηκε η σειρά W¹¹¹⁸. Η W¹¹¹⁸ σειρά προέρχεται ουσιαστικά από στελέχη Canton-S (CS) που φέρουν μία μετάλλαξη στο γονίδιο “white”, το οποίο καθορίζει το χρώμα των οφθαλμών. Τα W¹¹¹⁸ άτομα κατά συνέπεια έχουν λευκά κι όχι ερυθρά μάτια (OR-R και CS) και αποτελούν γενετικό υπόβαθρο για όλες τις διαγονιδιακές σειρές.

Για τα πειράματα του δευτέρου μέρους της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες σειρές: οι διαγονιδιακές σειρές ON3R, UAS-ON4R και τα μεταλλαγμένα στελέχη UAS-ON4R^{R406W} (Παπανικολοπούλου, Σκουλάκης -Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»).

Οι Brand and Perrimon [160] σχεδίασαν το σύστημα GAL4-UAS που επιτρέπει την έκφραση των επιθυμητών προς μελέτη κλωνοποιημένων γονιδίων αποκλειστικά σε μία συγκεκριμένη κατηγορία ιστών ή κυττάρων. Υπάρχει διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός ιστοειδικών επαγωγέων (GAL4-σειρών), όπου ο μεταγραφικός παράγοντας της μαγιάς GAL4 εκφράζεται ειδικά σε συγκεκριμένη κατηγορία κυττάρων, καθώς επίσης και ένας μεγάλος αριθμός UAS-σειρών, όπου η UAS (Upstream Activating Sequence) ακολουθία, η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του GAL4, έχει εισαχθεί μπροστά από τον υποκινητή ενός γονιδίου. Επομένως, η διασταύρωση μίας GAL4-

σειράς με μία UAS-σειρά επιτρέπει την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου στην επιθυμητή προς μελέτη ειδική κατηγορία κυττάρων.

Το OK307 Gal4 εκφράζεται ειδικά στο ΣΓΑ. HGF-splitGal4 line[7A04-p65ADZP(attp40); 68A06-ZpGdbd(attpZ)] έχει περιγραφεί ήδη [161] και επιτρέπει την έκφραση γονιδίων αποκλειστικά στους νευρώνες του ΣΓΑ.

3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ- (Behavioral assays)

3.1 Μελέτη της κινητικής κατάστασης και συμπεριφοράς σε γηρασμένα άτομα - Μελέτη αρνητικού γεωτακτισμού (negative geotaxis)

Για την συλλογή-απομόνωση των ατόμων, 20 ενήλικα άτομα W¹¹¹⁸70 ημερών αναισθητοποιήθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα με CO₂ και τοποθετήθηκαν μεμονωμένα ανά φιαλίδιο τροφής.

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της κινητικής κατάστασης και συμπεριφοράς των ατόμων αυτών από την ηλικία των 70 ημερών μέχρι το πέρας της ζωής τους ανά 24 ώρες. Μετά την απομόνωση τους στα φιαλίδια τροφής τα άτομα αφέθηκαν το λιγότερο 24 ώρες πριν από την πραγματοποίηση του πρώτου πειράματος προκειμένου να έχουν αρκετό χρόνο για την εξερεύνηση του χώρου του φιαλιδίου. Με την έναρξη της μελέτης, καταγράφεται μια σειρά παρατηρήσεων (βλ. Αποτελέσματα Πίνακας Παρατηρήσεων) και η θέση τους με βάση τα κριτήρια του Πίνακα 2 κατά την στιγμή της παρατήρησής τους. Εν συνέχεια το κάθε άτομο δέχεται ένα ερέθισμα, με κατακόρυφο χτύπημα της βάσης του φιαλιδίου στην επιφάνεια της πειραματικής τράπεζας και καταγράφεται η κινητική κατάσταση και συμπεριφορά του εντόμου με βάση τα εξής κριτήρια, α) αν δεν αντιδρά στο ερέθισμα ή αντιδρά μόνο με μερικά βήματα β) αν το έντομο εμφανίζει φυσιολογική συμπεριφορά διαφυγής ως απόκριση στο ερέθισμα, δηλαδή αν αναρριχάται ως την κορυφή του φιαλιδίου γ) αν εμφανίζει κάποιο κινητικό πρόβλημα. δ) αν το έντομο πέφτει μετά από αναρρίχηση μικρής απόστασης, ε) αν ελαττώνεται η διάρκεια του αρνητικού γεωτακτισμού στ) αν παρατηρήθηκε να πετά ή να πραγματοποιεί κάποιο άλμα ενώ τέλος καταγραφόταν ζ) αν το έντομο βρέθηκε σε ύπτια θέση ή ανίκανο να

περπατήσει. Προϋπόθεση για να θεωρηθεί ένα ερέθισμα ως επιτυχημένο είναι το έντομο να βρεθεί στον πάτο του φιαλιδίου αμέσως μετά το ερέθισμα.

4	4 ^ο τεταρτημόριο
3	3 ^ο τεταρτημόριο
2	2 ^ο τεταρτημόριο
1	1 ^ο τεταρτημόριο
0	Βάση φιαλιδίου

Πίνακας 2: Κριτήρια για την καταγραφή της θέσης και της κατάστασης για την μελέτη του αρνητικού γεωτακτισμού.

4. ΔΙΑΤΑΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ (electrophysiological set-up)

Τα ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα διεξήχθησαν σε αντικραδασική τράπεζα (περιβαλλόμενη από κλωβό Faraday), η οποία διαθέτει ένα στερεοσκόπιο και έξι μικροχειριστές (ηλεκτροφυσιολογικό σύστημα- electrophysiological set-up). Οι δύο από τους έξι μικροχειριστές παραμένουν σταθεροί και στηρίζουν, ο ένας την οπτική ίνα ψυχρού φωτισμού και ο άλλος το μεταλλικό στήριγμα με το παρασκεύασμα που βρίσκεται ακριβώς κάτω από το στερεοσκόπιο ενώ οι υπόλοιποι τέσσερις χρησιμεύουν για τη μετακίνηση των ηλεκτροδίων.

Δύο διεγερτικά μεταλλικά ηλεκτρόδια (που στηρίζονται σε δύο μικροχειριστές) συνδέονται, μέσω ενός κοινού καλωδίου, με έναν εξωκυτταρικό διεγέρτη τύπου GrassS88 (μονάδα απομόνωσης ερεθίσματος, Quincy, Mass. U.S.A.). Ομοίως, το

καταγραφικό ηλεκτρόδιο και το ηλεκτρόδιο γείωσης (στηριζόμενα στους άλλους δύο μικροχειριστές) συνδέονται, μέσω κοινού ηλεκτροδίου, με έναν ενισχυτή (ACamplifier, model 1700). Η μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό πραγματοποιείται μέσω του ψηφιακού μετατροπέα (analogue-digital converter; Digidata-1200 series interface, Axon Instruments Co.), ο οποίος συνδέεται με τη σειρά του στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και τα δεδομένα αποθηκεύονται στο σκληρό δίσκο αυτού με την χρήση του προγράμματος Clampex 8.1 (Axon Instruments).

Όλα τα μεταλλικά αντικείμενα πάνω στην αντικραδαστική τράπεζα, καθώς και όλες οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν, είναι γειωμένα στη βάση της τράπεζας.

4.1 Προετοιμασία ηλεκτροδίων

Τα μεταλλικά ηλεκτρόδια ('tungsten') λεπτύνονταν στην άκρη τους μέσω ηλεκτρόλυσης ώστε να μπορούν εύκολα να διαπεράσουν τον εξωσκελετό του εντόμου. Για την ηλεκτρόλυση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ηλεκτρόλυσης (3.4g KOH και 7.1g NaNO₂ σε 10ml dH₂O) με τη βοήθεια παλμών ρεύματος 20V, διάρκειας 4-5ms και συχνότητας 10Hz. Η διαδικασία της προετοιμασίας των ηλεκτροδίων λάμβανε χώρα κάτω από το στερεοσκόπιο ώστε να παρακολουθείται η σταδιακή λέπτυνση του ηλεκτροδίου.

4.2 Μέθοδοι ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών

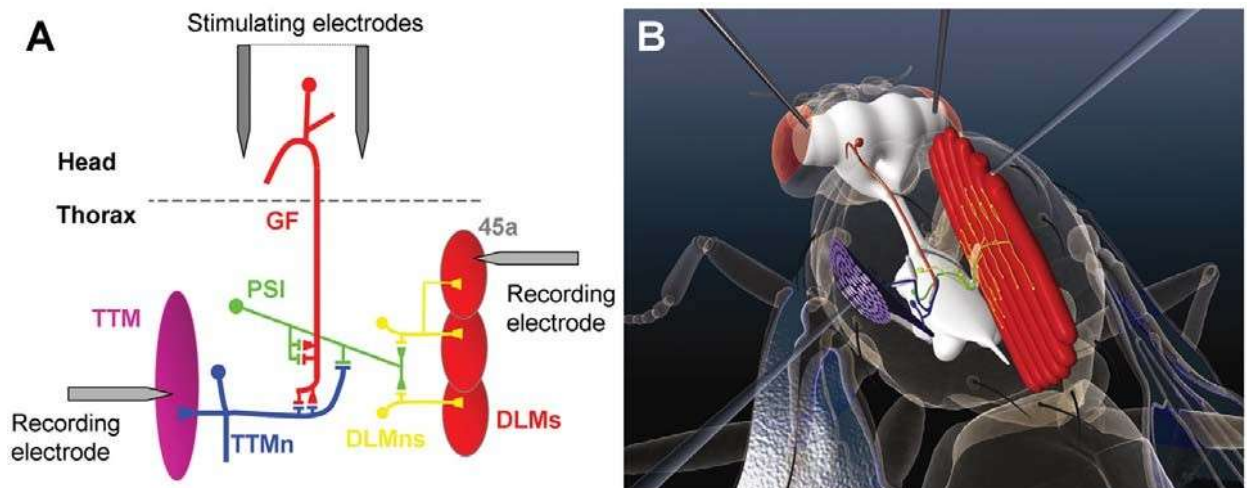
Για τα πειράματα του πρώτου μέρους αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα άτομα W¹¹¹⁸ (♀&♂) του εντόμου *Drosophila melanogaster*, ηλικίας 6-8 και 72 – 76 ημερών μετά την εκκόλαψη (eclosion).

Για το δεύτερο μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα άτομα (♀&♂) του εντόμου *Drosophila melanogaster*, τα διαγονιδιακά ON3R, ON4R και τα μεταλλαγμένα στελέχη UAS-ON4R^{R406W}, σε ηλικία 10, 30 και 45 ημερών μετά την εκκόλαψη τα οποία συγκρίθηκαν με μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Αρχικά τα άτομα αναισθητοποιούνταν πάνω σε πορώδη επιφάνεια με τη χρήση συνεχούς ρεύματος CO₂. Στη συνέχεια, μεταξύ κεφαλής και θώρακα του εντόμου στη ραχιαία πλευρά, προσκολλούνταν η άκρη ενός μεταλλικού τμήματος 'tungsten' (ίδιο υλικό από το οποίο κατασκευάζονται και τα ηλεκτρόδια) με κυανοακρυλική κόλλα. Πριν την έναρξη των πειραματικών πρωτοκόλλων, η ακινητοποιημένη μύγα παρέμενε για 30-60 min σε χώρο σταθερής θερμοκρασίας(24⁰C) και υψηλής υγρασίας (60-80%) και για να ανανήψει από την αναισθησία.

Η τοποθέτηση των ηλεκτροδίων πραγματοποιούνταν σε σχέση με το κύκλωμα που επρόκειτο να διεγερθεί. Σε κάθε έντομο, το ηλεκτρόδιο αναφοράς (γείωση) εισερχόταν στον θυρεό (scutellum), τη ραχιαία περιοχή μεταξύ θώρακα και κοιλιάς. Για τη διέγερση του ΓΝ τα διεγερτικά ηλεκτρόδια εισέρχονταν στους οφθαλμούς και η διέγερση με τάση 15-20V είχε ως συνέπεια την κατευθείαν διέγερση του ΓΝ (άμεση διέγερση - παράκαμψη των προσυναπτικών ενδονευρώνων του ΓΝ) [162]. Το καταγραφικό ηλεκτρόδιο εισερχόταν στη ραχιαία περιοχή του θώρακα για καταγραφή από τους ραχιαίους επιμήκεις μυς (PEMς) (Dorsal Longitudinal Muscles-DLMs)[162, 163]και στην πλευρική περιοχή του μεσοθωρακικού μεταμερούς [162, 163]στην περίπτωση που χρειαζόταν να καταγραφεί απάντηση από τον αλτικό μυ (AM) (Tergotrochanteral Muscle-TTM). Κατά συνέπεια, βάσει των παραπάνω, εφαρμόστηκαν οι εξής συνδυασμοί διέγερσης/καταγραφής:

- ΓΝ / PEMς: Διέγερση του ΓΝ και καταγραφή από τους PEMς.
- ΓΝ / AM: Διέγερση του ΓΝ και καταγραφή από το μυ για άλμα (AM).



Εικόνα 14: Το σύστημα γιγαντιαίων αξόνων, νευρώνες και μύες. Α) Σχηματική αναπαράσταση των συνάψεων του ΣΓΑ. Παρουσιάζεται ετερόπλευρα για λόγους σαφήνειας. Ο ΓΝ(GF, κόκκινο χρώμα), στο επίπεδο του μεσοθωρακικού νευρομερούς (T2), συνάπτεται τόσο με τον ομόπλευρο περιφερειακό ενδιάμεσο νευρώνα ΠΕΝ (PSI, πράσινο χρώμα) όσο με τον ομόπλευρο κινητικό νευρώνα του αλτικού μυός AMn (TTMn, μπλε χρώμα) που νευρώνει τον αλτικό μυ (TTM). Οι τελικές νευρικές απολήξεις του ΠΕΝ, με τη σειρά τους, σχηματίζουν συνάψεις με τους κινητικούς νευρώνες των ραχιαίων επιμηκών μυών ΡΕΜns, (DLMns, κίτρινο χρώμα) που νευρώνουν τους ραχιαίους επιμήκεις μύες ΡΕΜ (DLM). Παρουσιάζονται οι θέσεις τοποθέτησης των ηλεκτροδίων. Β) Σχηματική αναπαράσταση του ΣΓΑ στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Drosophila*. Παρουσιάζονται οι θέσεις των νευρώνων και των μυών καθώς και οι θέσεις τοποθέτησης των ηλεκτροδίων [164].



Εικόνα 15: Τοποθέτηση ηλεκτροδίων στη *Drosophila melanogaster in vivo*. Τα διεγερτικά ηλεκτρόδια τοποθετούνται στους οφθαλμούς και το ηλεκτρόδιο αναφοράς στον θυρεό. Το καταγραφικό ηλεκτρόδιο τοποθετείται στο θώρακα (για καταγραφή από τους ραχιαίους επιμήκεις μύες) και στην πλευρική περιοχή του μεσοθωρακικού μεταμερούς για καταγραφή από τον αλτικό μυ (AM). (DLM : ΡΕΜ, TTM: AM) [164].

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

4.3.1 Απόκριση (Α): (Latency Response-LR)

Μακρόχρονη απόκριση (MA) (Long-Latency Response-LLR): Πρόκειται για τον χρόνο (ms) που απαιτείται για τη μετάδοση του σήματος από τους προσυναπτικούς νευρώνες του ΓΝ (έμμεση διέγερση) στους ΡΕΜς, από τους οποίους καταγράφεται η απάντηση [165].

Βραχύχρονη απόκριση (BA) (Short-Latency Response-SLR): Πρόκειται για τον χρόνο (ms) που απαιτείται για τη μετάδοση του σήματος από τον ΓΝ (άμεση διέγερση) ή τους κινητικούς νευρώνες (ΡΕΜνς, ΑΜν) στους μύες ΡΕΜς ή ΑΜ, αντίστοιχα, αναλόγως το σημείο καταγραφής της απάντησης[162].

Σε αμφότερες τις περιπτώσεις (MA ή BA), ο χρόνος μετάδοσης του σήματος υπολογίστηκε μετρώντας το χρονικό διάστημα μεταξύ της αρχής του παράσιτου ερεθίσματος (stimulus artifact) και της έναρξης του μυϊκού δυναμικού ενέργειας. Η τελική τιμή του χρόνου μετάδοσης του σήματος (MA ή BA) προέκυψε από τον μέσο όρο 5 τιμών δυναμικών ενέργειας. Ο χρόνος αυτός (MA ή BA) περιλαμβάνει τόσο τον χρόνο διάδοσης των δυναμικών ενέργειας κατά μήκος των αξόνων των διαφόρων νευρώνων του ΣΓΑ, όσο και τον χρόνο διαβίβασης του σήματος μέσω των συνάψεων (χημικές ή ηλεκτρικές συνάψεις).

4.3.2 Ανερέθιστη περίοδος (ΑΠ) (Refractory Period-RP)

Ανερέθιστη περίοδος, στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι ο ελάχιστος δυνατός χρόνος (ms) που απαιτείται, ανάμεσα σε δύο συνεχόμενα ίδιας έντασης ερεθίσματα (twin pulse stimuli) που δίδονται στο ΓΝ (άμεσα ή έμμεσα) ή στους κινητικούς νευρώνες (ΡΕΜνς, ΑΜν), ώστε να προκληθούν δύο επιτυχείς απαντήσεις (δυναμικά ενέργειας) από τους μύς (ΡΕΜς ή ΑΜ). Στην περίπτωση που ο χρόνος ανάμεσα στα δύο ερεθίσματα (interstimulus interval) είναι μικρότερος της ανερέθιστης περιόδου, τότε επιτυχημένη απάντηση (δυναμικό ενέργειας) λαμβάνεται μόνο μετά το πρώτο ερέθισμα, κι όχι μετά το δεύτερο. Η μέτρηση της ανερέθιστης περιόδου πραγματοποιούνταν επιλέγοντας αρχικά ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα ανάμεσα στα δύο ερεθίσματα, (>>ΑΠ) ώστε να καταγραφούν με επιτυχία δύο

δυναμικά ενέργειας από τον μυ. Στη συνέχεια το χρονικό διάστημα ανάμεσα στα δύο ερεθίσματα, μειωνόταν σταδιακά, ελέγχοντας μέχρις ότου να μην λαμβάνονται δύο επιτυχημένες απαντήσεις (δυναμικά ενέργειας). Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας (trial) υπήρχε αναμονή 5sec, πριν την έναρξη της επόμενης, ώστε το αποτέλεσμα να μην αλλοιώνεται από πιθανή κόπωση του κυκλώματος [162].

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η διαδικασία μέτρησης της ΒΑ-ΑΠ ξεκινούσε με αρχικό διάστημα χρόνου 10ms, μεταξύ των δύο συνεχόμενων ερεθισμάτων και εν συνεχεία μειωνόταν σταδιακά κατά 1ms.

4.3.3 Επαγόμενη συχνότητα 50% (ΕΣ) (Following Frequency-FF50)

Επαγόμενη συχνότητα 50% (ΕΣ50) (Following Frequency-FF50): Πρόκειται για μέτρηση της πιστότητας μετάδοσης του σήματος σε υψηλές συχνότητες. Σύμφωνα με το αυτό το πειραματικό πρωτόκολλο, ο ΓΝ ή οι κινητικοί νευρώνες (PEM_{νς}, AM_ν) διεγείρονταν με 3 διαδοχικές ριπές (train), 10 ερεθισμάτων η καθεμία, όπου η πιστότητα μετάδοσης του σήματος μπορούσε να εκτιμηθεί επιλέγοντας τη συχνότητα (ΕΣ50) (Hz) εκείνη κατά την οποία ο μισός αριθμός των ερεθισμάτων (50%-15/30 για τις 3 ριπές) θα προκαλούσε δυναμικά ενέργειας. Μεταξύ των τριών διαδοχικών ριπών μεσολαβούσε χρόνος των 5sec, έτσι ώστε η τελική τιμή της συχνότητας (ΕΣ50) να μην επηρεάζεται από πιθανή κόπωση του κυκλώματος [162]. Η παράμετρος αυτή εφαρμόστηκε για τα υποκυκλώματα ΓΝ/PEM_ς, ΓΝ/AM, PEM_{νς}/PEM_ς και AM_ν/AM του ΣΓΑ.

5. ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

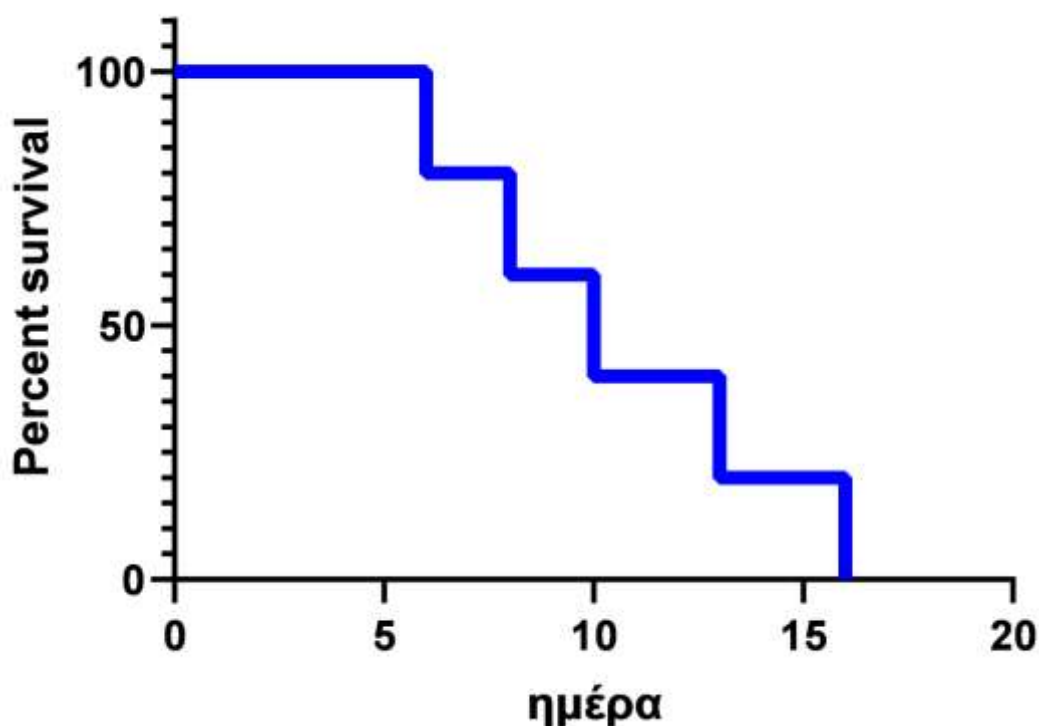
- **AxonClampex 8.1:** Το πρόγραμμα του ηλεκτρονικού υπολογιστή, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη και την ανάλυση των καταγραφών των ηλεκτροφυσιολογικών πειραμάτων.
- **CorelDRAW 12.0 Graphic:** Το γραφίστικο πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των καταγραφών και τη σχεδίαση των εικόνων.

- **Microsoft Excel:** Το πρόγραμμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευση των δεδομένων, το σχεδιασμό των διαγραμμάτων και τη στατιστική ανάλυση.
- **Graphpad 6:** Χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μετρήθηκαν ως εξής: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).
- **Microsoft Word:** Χρησιμοποιήθηκε για τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής.
- **EndNote X7:** Χρησιμοποιήθηκε για τη συγγραφή της βιβλιογραφίας της διδακτορικής διατριβής.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

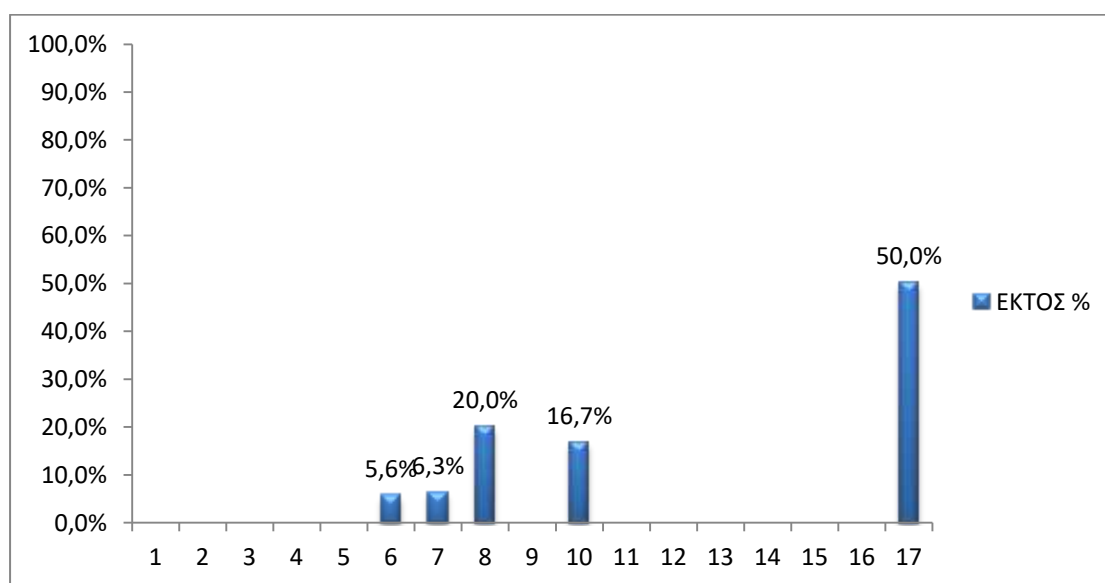
Ο μέσος χρόνος ζωής της *Drosophila melanogaster* κυμαίνεται μεταξύ 60 – 80 ημερών στους 25°C[51]. Πιο συγκεκριμένα για το στέλεχος Canton S, από το οποίο προκύπτει το στέλεχος W¹¹¹⁸ όπως προαναφέρθηκε, μελέτες έδειξαν ότι ο μέσος όρος ζωής ήταν είναι 37 ± 27 ημέρες για τα θηλυκά και 37 ± 40 ημέρες για τα αρσενικά ζώα[166].

Στην παρούσα εργασία, ο μέσος όρος ζωής ήταν 80 ± 4 ημέρες με το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας να παρατηρείται την 14^η, 15^η, 16^η και 17^η ημέρα πειραμάτων (25%, 50%, 50%, 50% στο σύνολο των ζώων που απέμεναν) ευρήματα τα οποία συνάδουν με τα αποτελέσματα της μελέτης των Izmaylov D. και Obukhova L [166].



Διάγραμμα 1 : Ποσοστό επιβίωσης ζώων κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης ανά ημέρα. Η μελέτη ξεκίνησε στην ηλικία των 70 ημερών.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης υπήρξαν ζώα τα οποία τέθηκαν εκτός αυτής λόγω ατυχημάτων, όπως π.χ. λόγω ακινητοποίησης τους πάνω στην τροφή πέραν αυτών τα οποία ανευρέθηκαν νεκρά. Τέτοιου είδους συμβάματα παρατηρήθηκαν ολοένα και πιο συχνά με την πάροδο των ημερών, με αύξηση του ποσοστού τους τις ημέρες που αντιστοιχούν στο μέσο όρο ζωής των ζώων, δηλαδή την όγδοη έως τη δέκατη ημέρα όπου το ποσοστό που τέθηκε εκτός πειραματικής διαδικασίας ήταν το 20% επί του συνόλου των ζώων, και τη δέκατη μέρα όπου το ποσοστό ήταν 16.7% επί του συνόλου των ζώων.



Διάγραμμα 2: Ποσοστό των ζώων που τέθηκαν εκτός πειραματικής διαδικασίας ανά ημέρα

1. Αρνητικός γεωτακτισμός (Negative geotaxis)

Ο αρνητικός γεωτακτισμός, δηλαδή η έμφυτη αντίδραση διαφυγής η οποία εκδηλώνεται ως κίνηση ενάντια στη βαρύτητα, ύστερα από χτύπημα του κυλινδρικού φιαλιδίου στην εξεταστική τράπεζα είναι ένας τρόπος αξιολόγησης της κινητικής συμπεριφοράς στη *Drosophila melanogaster*. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο αρνητικός γεωτακτισμός επηρεάζεται αρνητικά από την αύξηση της ηλικίας. Παρόλο που η παρατήρηση αυτή αποτελεί πλέον παγιωμένη γνώση, στην παρούσα δοκιμασία γίνεται η προσπάθεια κατανόησης αν ο αρνητικός γεωτακτισμός είναι ένα συμπεριφορικό χαρακτηριστικό το οποίο επηρεάζεται εντόνως λίγο πριν το θάνατο του ζώου, ανεξαρτήτως της γενικότερης ύφεσης που παρουσιάζει κατά τη γήρανση.

1.1 Συμπεριφορική Μελέτη: Θέση στο χώρο προ του ερεθίσματος, κινητική αντίδραση σε μηχανικό ερέθισμα

Σκοπός του πρώτου μέρους της μελέτης ήταν να ποσοτικοποιηθούν κινητικές συμπεριφορές στο φυσικό περιβάλλον (φιαλίδια με τροφή) των ατόμων. Αρχικές παρατηρήσεις υποδείκνυαν ότι η θέση που καταλάμβαναν τα ζώα ως προς τον κατακόρυφο άξονα του φιαλιδίου ήταν μια μετρήσιμη παράμετρος. Εξετάστηκε η αρχική θέση κάθε ατόμου μέσα στο φιαλίδιο προ του ερεθίσματος αλλά και αμέσως μετά το ερέθισμα σύμφωνα με τα κριτήρια του κατωτέρου πίνακα (βλ. Μέθοδοι και υλικά: Μελέτη αρνητικού γεωτακτισμού).

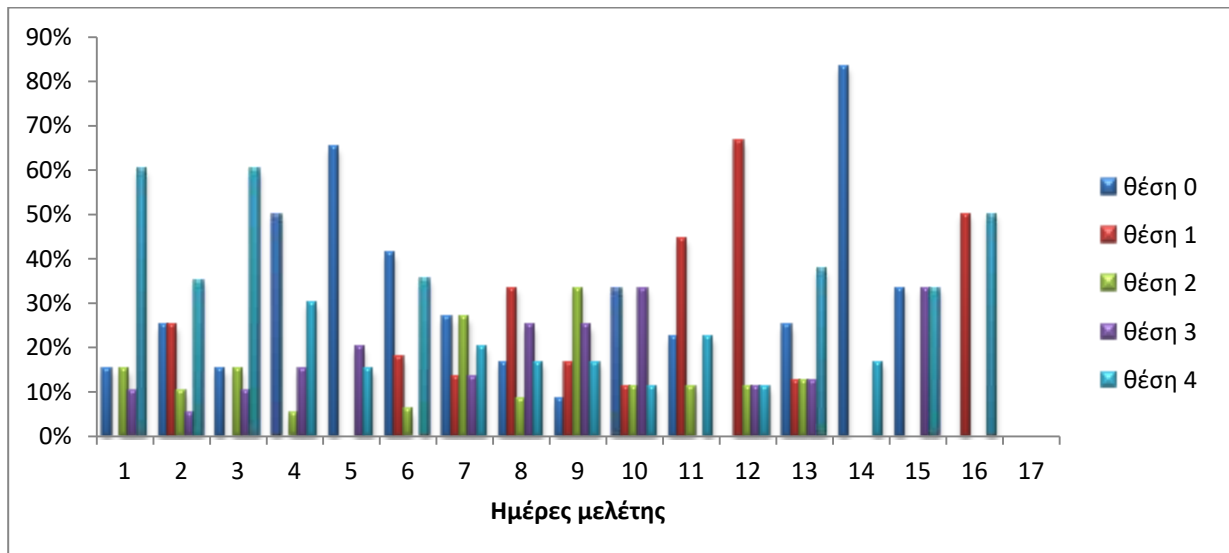
4	4 ^ο τεταρτημόριο
3	3 ^ο τεταρτημόριο
2	2 ^ο τεταρτημόριο
1	1 ^ο τεταρτημόριο
0	Βάση φιαλιδίου

Πίνακας 3 : Κριτήρια για την καταγραφή της αρχικής θέσης του ζώου (πριν το ερέθισμα).

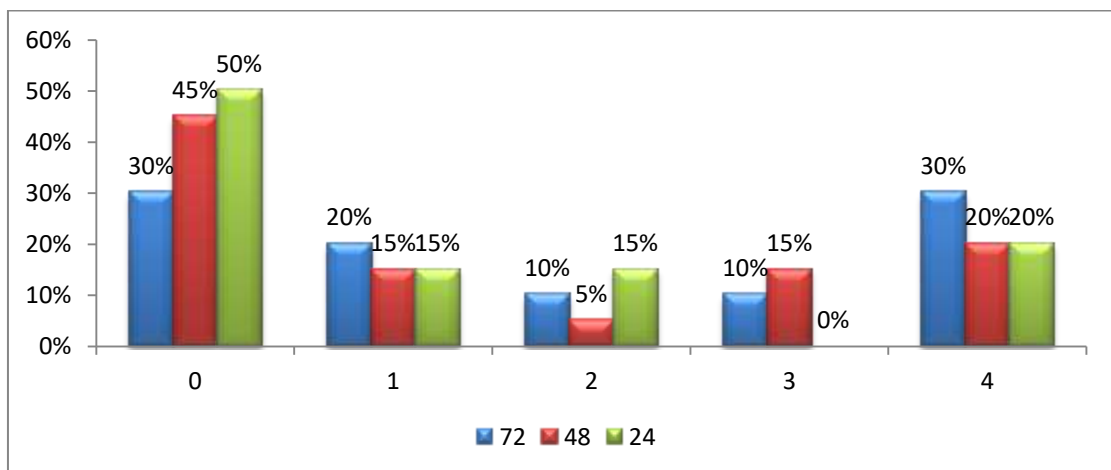
Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε άτομα (n=20) 70 ημερών. Τα υπό εξέταση άτομα δεν είχαν υποστεί καμία δοκιμασία στο παρελθόν. Η κάθε μύγα είχε τοποθετηθεί σε φιαλίδιο με φρέσκια τροφή τουλάχιστον 24 ώρες πριν από την πραγματοποίηση του πειράματος προκειμένου να έχει αρκετό χρόνο για να την εξερεύνηση του χώρου. Κάθε πειραματική ημέρα πριν την έναρξη της μελέτης του αρνητικού γεωτακτισμού, δηλαδή πριν την εφαρμογή ερεθίσματος, καταγραφόταν η θέση των ζώων με βάση τα κριτήρια του ανωτέρω πίνακα. Στη συνέχεια το κάθε άτομο δεχόταν ερέθισμα με κατακόρυφο χτύπημα της βάσης του φιαλιδίου στην επιφάνεια της πειραματικής τράπεζας και καταγραφόταν εάν το ζώο ανταποκρινόταν στο ερέθισμα και αν ανταποκρινόταν ποια ήταν η τελική- υψηλότερη θέση που καταλάμβανε στο φιαλίδιο σύμφωνα με τα

κριτήρια του πίνακα . Προϋπόθεση για να θεωρηθεί ένα ερέθισμα ως επιτυχημένο είναι η μύγα να βρεθεί στη βάση του φιαλιδίου αμέσως μετά το ερέθισμα.

Στο διάγραμμα 3 υπάρχουν τα δεδομένα ολόκληρου του πειράματος. Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα 4 φαίνονται τα ποσοστά των θέσεων εύρεσης των ατόμων προ του ερεθίσματος 72, 48 και 24 ώρες πριν το θάνατο του κάθε ζώου.



Διάγραμμα 3: Συνολικά ποσοστά θέσεων ανά πειραματική ημέρα πριν τη μελέτη του αρνητικού γεωτακτισμού

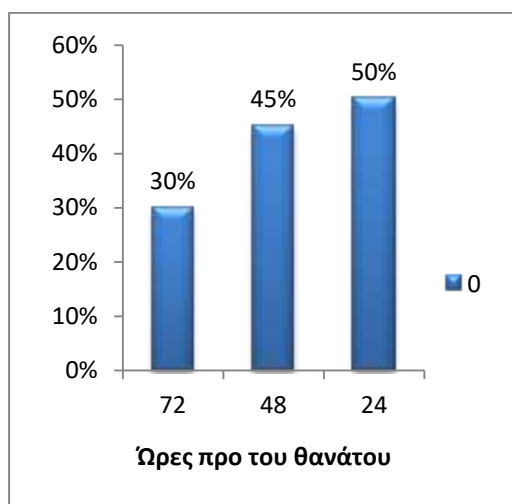


Διάγραμμα 4: Ποσοστά ευρισκόμενης θέσης των ζώων προ του ερεθίσματος 72, 48, 24 ώρες πριν το θάνατο τους

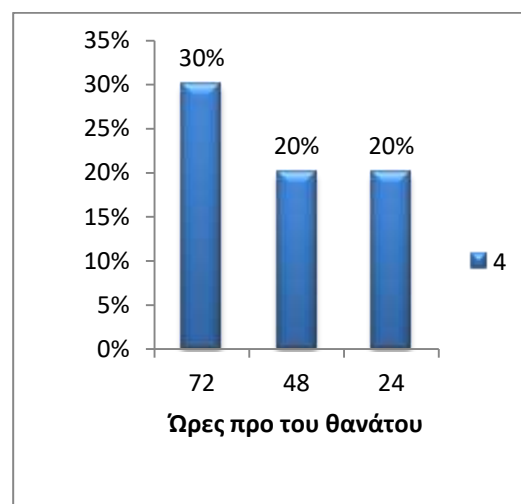
Αναλυτικότερα, το ποσοστό των ζώων που βρίσκεται στην κατώτερη θέση του φιαλιδίου 72 ώρες πριν το θάνατό του είναι το 30%, στη θέση 1 το 20%, στη θέση 2 το 10%, στη θέση 3 το 10% και στη θέση 4 το 30%.

Σαράντα οχτώ ώρες πριν το θάνατο τους, στην κατώτερη θέση βρίσκεται το 45% έναντι του 30% των ζώων που ήταν στις 72 ώρες, το 15% στη θέση 1, το 5% στη θέση 2, το 15% στη θέση 3 και το 20% στη θέση 4.

Ένα εικοσιτετράωρο πριν το θάνατο τους το 50% καταλαμβάνει αυθόρμητα κατώτερη θέση, 15% βρίσκεται στη θέση 1 και 2 ενώ το 20% στη θέση 4. Σύμφωνα λοιπόν με τα ανωτέρω διεξάγεται το συμπέρασμα ότι το ποσοστό των ζώων που καταλαμβάνουν αυθόρμητα κατώτερες θέσεις αυξάνεται καθώς οδεύουν προς το θάνατο ενώ συνεπακόλουθα το ποσοστό των ζώων που βρίσκονται αυθόρμητα σε υψηλότερες θέσεις μειώνεται.



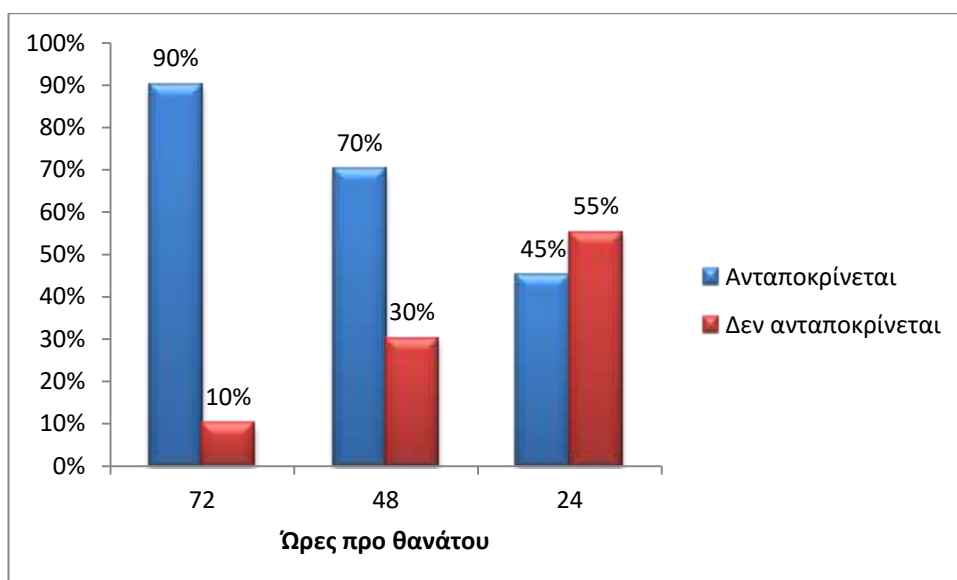
Διάγραμμα 5: Το ποσοστό των ζώων που ήταν στην κατώτερη περιοχή του φιαλιδίου αυξάνεται καθώς τα ζώα πλησιάζουν προς το θάνατο τους.



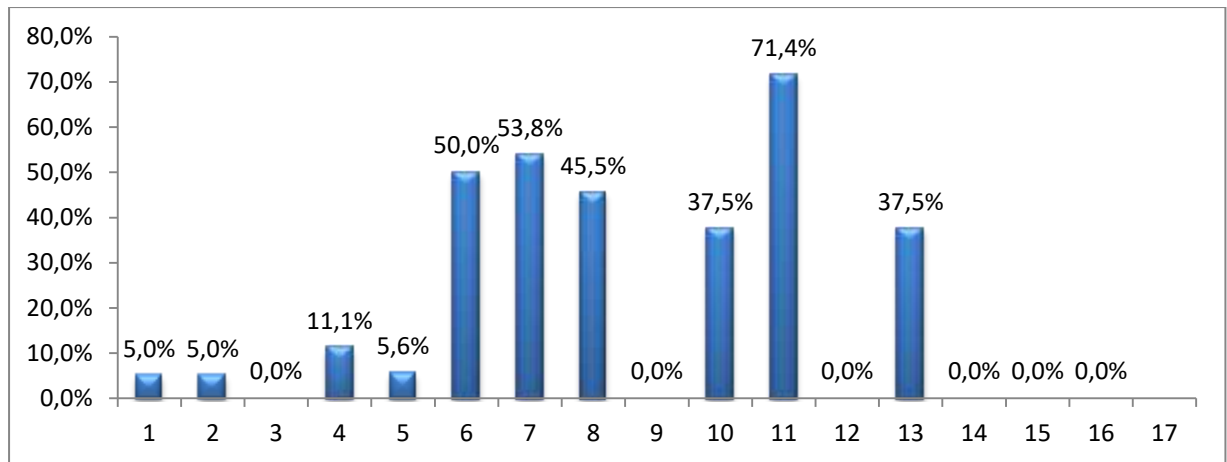
Διάγραμμα 6: Το ποσοστό των ζώων που ήταν στην ανώτερη περιοχή του φιαλιδίου πριν το ερέθισμα ελαττώνεται προ του θανάτου τους.

Εν συνεχεία, κάθε άτομο δεχόταν ερέθισμα, για την έκλυση της συμπεριφοράς διαφυγής, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω με κατακόρυφο χτύπημα του φιαλιδίου στην εξεταστική τράπεζα.

Στο διάγραμμα 7 παρουσιάζονται τα συνολικά ποσοστά απόκρισης ή μη στο ερέθισμα 72, 48, και 24 ώρες πριν το θάνατο των ζώων. Πιο αναλυτικά, το 90% του συνόλου των ζώων ανταποκρίνεται στο ερέθισμα για αρνητικό γεωτακτισμό 72 ώρες πριν το θάνατο τους. Το ποσοστό αυτό πέφτει στο 70% στις 48 ώρες πριν το θάνατο και ελαττώνεται μόλις στο 45% 24 ώρες πριν το θάνατο. Από τα ανωτέρω συμπεραίνεται ότι καθώς τα ζώα οδεύουν προς το τέλος της ζωής τους, αρχίζουν να χάνουν την έμφυτη συμπεριφορά διαφυγής, που εκδηλώνεται ως αρνητικός γεωτακτισμός.



Διάγραμμα 7: Συνολικά ποσοστά απόκρισης ή μη στο ερέθισμα 72, 48, και 24 ώρες πριν το θάνατο των εντόμων.

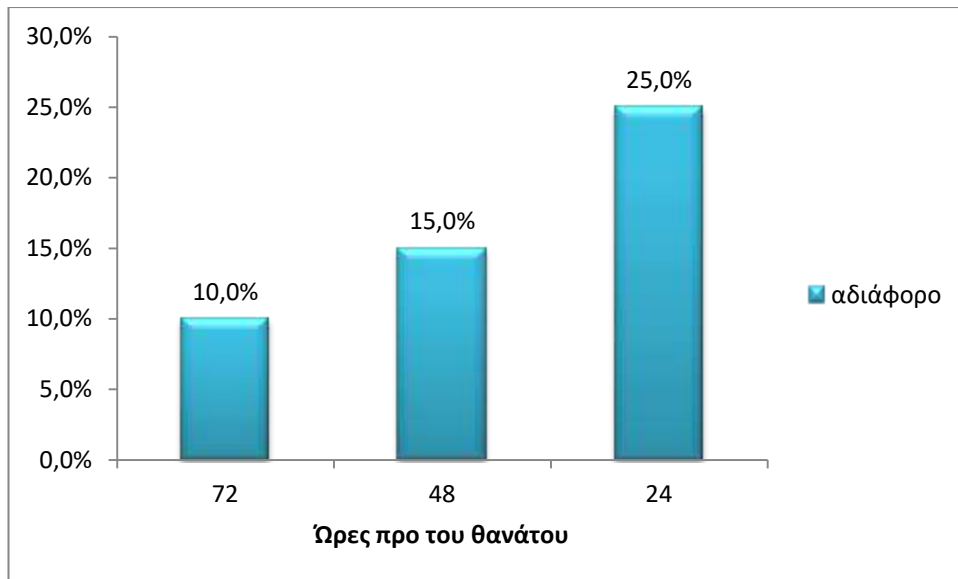


Διάγραμμα 8: Ποσοστό αδιάφορων εντόμων ανά πειραματική ημέρα

Ένα άλλο χαρακτηριστικό το οποίο παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της συμπεριφορικής μελέτης ήταν ότι με την πάροδο του χρόνου, καθώς δηλαδή τα ζώα μεγάλωναν παρουσίαζαν ένα χαρακτηριστικό το οποίο θα μπορούσε να ποσοτικοποιηθεί και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «αδιαφορία».

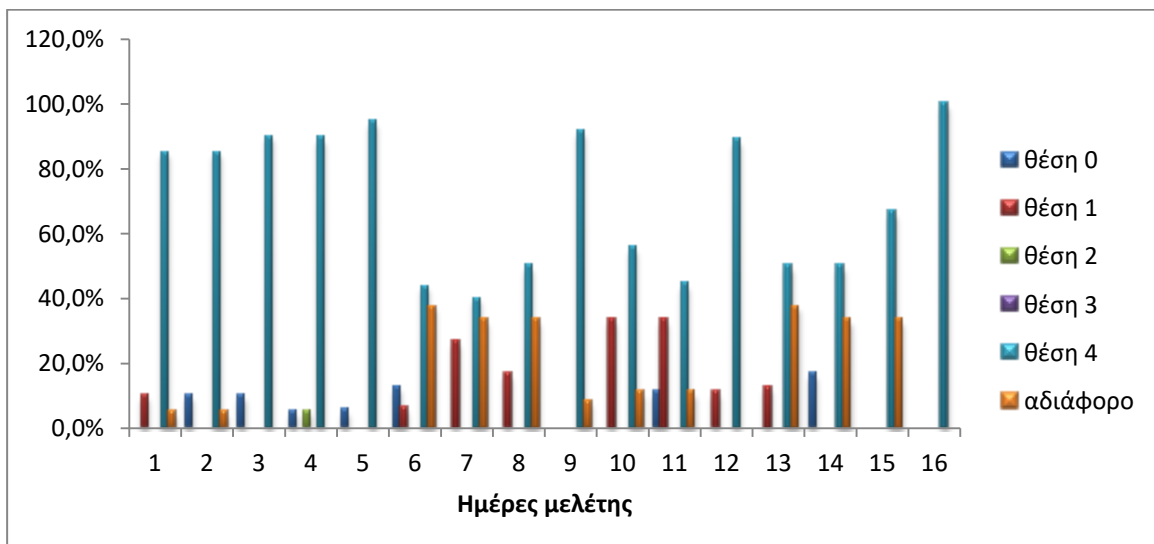
«Αδιαφορα» χαρακτηρίζονται τα ζώα τα οποία ενώ ανταποκρινόντουσαν στο ερέθισμα, δηλαδή στο κατακόρυφο χτύπημα του φιαλιδίου στην εξεταστική τράπεζα, εν συνεχεία έχαναν το ενδιαφέρον τους και δεν ολοκλήρωναν την άνοδο τους έως το 4^ο τεταρτημόριο του φιαλιδίου, όπου η έκλυση της συμπεριφοράς διαφυγής θεωρείται ολοκληρωμένη αλλά σταματούσαν σε κατώτερα σημεία και άρχιζαν να εξερευνούν τον περιβάλλοντα χώρο.

Από το διάγραμμα που καταδεικνύει το ποσοστό αδιαφορίας 72, 48 και 24 ώρες πριν το θάνατο των ζώων φαίνεται ότι καθώς τα ζώα πλησιάζουν στο τελικό στάδιο της ζωής τους αυξάνεται το ποσοστό αδιαφορίας τους, με αυτό να αγγίζει το 25% είκοσι τέσσερις ώρες πριν το θάνατο τους έναντι του 10 % που ήταν τρεις ημέρες προ του θανάτου.



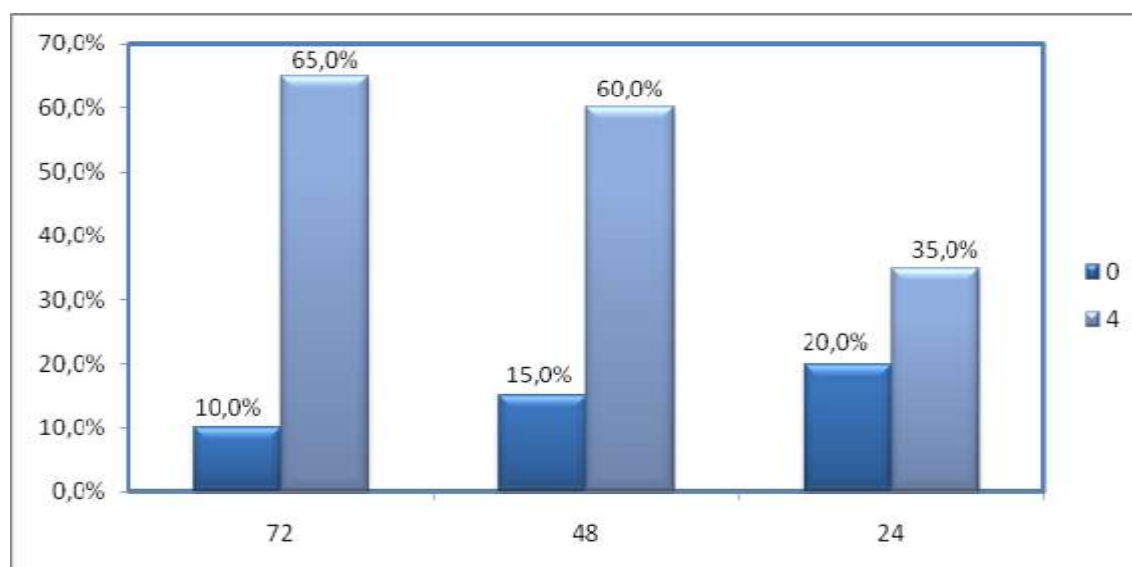
Διάγραμμα 9: Ποσοστό αδιαφορίας 72, 48 και 24 ώρες πριν το θάνατο των ζώων

Μια τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία συμπεριφορικής μελέτης ήταν η τελική θέση που καταλάμβαναν τα ζώα ύστερα από το ερέθισμα. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι με την πάροδο του χρόνου τα ζώα τα οποία καταλάμβαναν τις υψηλότερες θέσεις ελαττώνονταν ενώ αντίστοιχα αυξάνονταν αυτά τα οποία παρέμεναν σε κατώτερες θέσεις στα φιαλίδια.



Διάγραμμα 10: Συγκεντρωτικό ραβδόγραμμα του ποσοστού της τελικής θέσης – αντίδρασης των ζώων ύστερα από το ερέθισμα

Πιο συγκεκριμένα, 72 ώρες πριν το θάνατο τους το 65% των ζώων μετά το ερέθισμα φθάνουν στην υψηλότερη θέση έναντι του 35% που το επιτυγχάνει αυτό 24 ώρες πριν το τέλος της ζωής του. Αντιθέτως το 20% των ζώων μένει στη βάση του φιαλιδίου, 24 ώρες πριν το θάνατο του έναντι του 10% που παραμένει στη βάση 72 ώρες πριν.



Διάγραμμα 11: Ποσοστά των ζώων που καταλαμβάνουν την κατώτερη και την ανώτερη θέση μετά το ερέθισμα.

Συνοψίζοντας, συμπεραίνεται ότι όλες οι εξεταζόμενες παράμετροι μεταβάλλονται σε σχέση με την ηλικία των ατόμων. Το ποσοστό των ατόμων που βρίσκονται στην κορυφή του φιαλιδίου αυθόρμητα, χωρίς να δεχτούν κάποιο ερέθισμα, αλλά και το ποσοστό των ατόμων που βρίσκονται στην κορυφή του φιαλιδίου μετά το ερέθισμα μειώνεται με την ηλικία.

Η διαφορά των ποσοστών των ατόμων γίνεται πιο εμφανής στα συγκεντρωτικά διαγράμματα όπου παρουσιάζεται η κατανομή των ατόμων προ και μετά το ερέθισμα. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, τα ζώα με την πάροδο του χρόνου και καθώς οδεύουν προς το θάνατο καταλαμβάνουν κατωφρέστερες θέσεις από αυτές που καταλάμβαναν στην αρχή της μελέτης όντας πιο νεαρά.

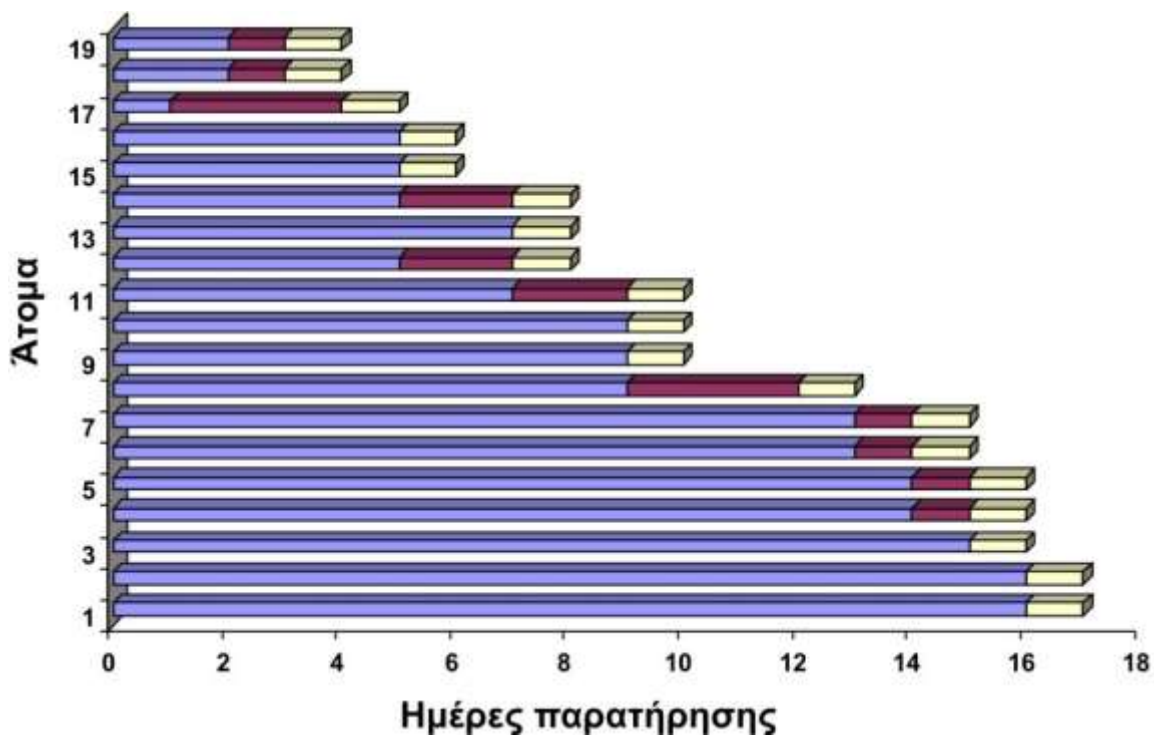
1.2 Μοτίβο (Pattern) φυσιολογικής κινητικής κατάστασης σε σχέση με την κινητική έκπτωση της τελευταίας περιόδου ζωής

Κατά τη διάρκεια της μελέτης (ξεκίνησε με 20 άτομα, ηλικίας 70 ημερών απομονωμένα το κάθε ένα σε ξεχωριστά φιαλίδια με τροφή και τελείωσε όταν πλέον όλα τα ζώα είχαν αποβιώσει, βλ. μέθοδοι και υλικά) πραγματοποιήθηκε λεπτομερής παρατήρηση και καταγραφή φυσιολογικών (π.χ. άλμα, αρνητικός γεωτακτισμός) και εκπτώτικων (π.χ. κινητικό πρόβλημα στα πόδια) κινητικών και συμπεριφορικών χαρακτηριστικών. Τα χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

c	Κινητικό πρόβλημα στα πόδια
g	Τελικό στάδιο ζωής
l	Αναρρίχηση έως την κορυφή παρόλη την ύπαρξη κινητικού προβλήματος
h	Μικρού μεγέθους απόκριση στα ερεθίσματα
o	Απουσία απόκρισης στα ερεθίσματα
w	Ολική ή μερική ανικανότητα αναρρίχησης
f	Φυσιολογική συμπεριφορά διαφυγής
a	Άλμα
b	Πτήση

Πίνακας 4 : Κριτήρια χαρακτηριστικών κινητικής ικανότητας εντόμων από 70 ημερών έως το τέλος της ζωής τους

Αν θεωρήσουμε τα κριτήρια: c, g, j, n, o, w σαν μια ομάδα ηλικιο- εξαρτώμενων παθολογικών χαρακτηριστικών και το κριτήριο f χαρακτηριστικό μιας υγιούς συμπεριφοράς διαφυγής, τότε μπορεί να δημιουργηθεί ένα ιστορικό της κινητικής ικανότητας για το κάθε άτομο μέχρι την στιγμή του θανάτου του το οποίο θα αποτελείται από αυτές τις δύο περιόδους (περίοδος υγιούς και μη υγιούς συμπεριφοράς διαφυγής) καθώς επίσης και από την χρονική στιγμή που το άτομο βρέθηκε νεκρό. Αυτό το ιστορικό απεικονίζεται στο διάγραμμα 12, στο οποίο η πρώτη παρατήρηση συμπεριφοράς- καταγραφή γίνεται στην ηλικία των 70 ημερών και επαναλαμβάνεται καθημερινά.



Διάγραμμα 12: Η κυανή περιοχή (υγιής κινητική κατάσταση) υπερέρχει σαφώς της ιώδους περιοχής (παθολογική κινητική κατάσταση). Αυτό το εύρημα παρέχει τη δυνατότητα υποστήριξης (με μετρήσιμο τρόπο) της υπόθεσης ότι το κινητικό σύστημα παραμένει λειτουργικό μέχρι τις τελευταίες ημέρες ζωής του οργανισμού.

1.3 Τελικό στάδιο ζωής

Κατά την διάρκεια της μελέτης, βρέθηκε μια κατηγορία ατόμων, τα μέλη της οποίας εμφάνιζαν μια συμπεριφορά με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, η οποία έχει περιγραφεί σε πρότερη εργασία, με πειράματα τα οποία διεξήχθησαν σε στελέχη Oregon-R (Gaitanidis et al., in press). Τα άτομα αυτά i) δεν μπορούσαν να σταθούν σε ορθή στάση και γύριζαν σε ύπτια θέση συνέχεια, ii) έκαναν ανεπιτυχείς προσπάθειες μεγάλης διάρκειας για επαναφορά σε ορθή στάση, iii) αποτυχημένες προσπάθειες για αναρρίχηση (πτώση μετά από αναρρίχηση μικρής απόστασης), iv) στα πόδια τους παρατηρούνταν συχνά κινήσεις που θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν ως κλονικοί σπασμοί, v) η προβοσκίδα τους επιτελούσε ανά διαστήματα ρυθμικές κινήσεις προεκβολής/απόσυρσης χωρίς φυσιολογική εξήγηση (ανεξάρτητα από τη λήψη τροφής) ενώ vi) παρατηρήθηκαν επίσης και περίοδοι που

τα άτομα βρισκόταν σε ύπτια θέση χωρίς να επιτελούν την παραμικρή αυθόρμητη κίνηση παρόλο που μπορούσαν να αντιδράσουν σε μηχανικό ερέθισμα. Η συμπεριφορά αυτή βρέθηκε ότι σχετίζεται με τον χρόνο επέλευσης του θανάτου του ζώου καθώς άτομα με τέτοιους είδους συμπεριφορά βρέθηκαν νεκρά στην επόμενη μέτρηση-παρατήρηση. Γι' αυτόν τον λόγο ονομάσαμε την περίοδο που παρατηρείται αυτή η συμπεριφορά «Τελικό στάδιο ζωής» του ατόμου (κριτήριο g). Παρέμενε άγνωστο αν τα στελέχη W^{1118} εμφανίζουν τη συμπεριφορά που χαρακτηρίσαμε σαν «Τελικό στάδιο ζωής». Για τον λόγο αυτόν κινηματογραφήσαμε την συμπεριφορά ηλικιωμένων μυγών. Τρία υγιή ηλικιωμένα άτομα τοποθετήθηκαν χωριστά σε ειδικές κατασκευές με τροφή που επέτρεπαν την συνεχή βιντεοσκόπηση της συμπεριφοράς τους μέχρι την στιγμή του θανάτου τους.

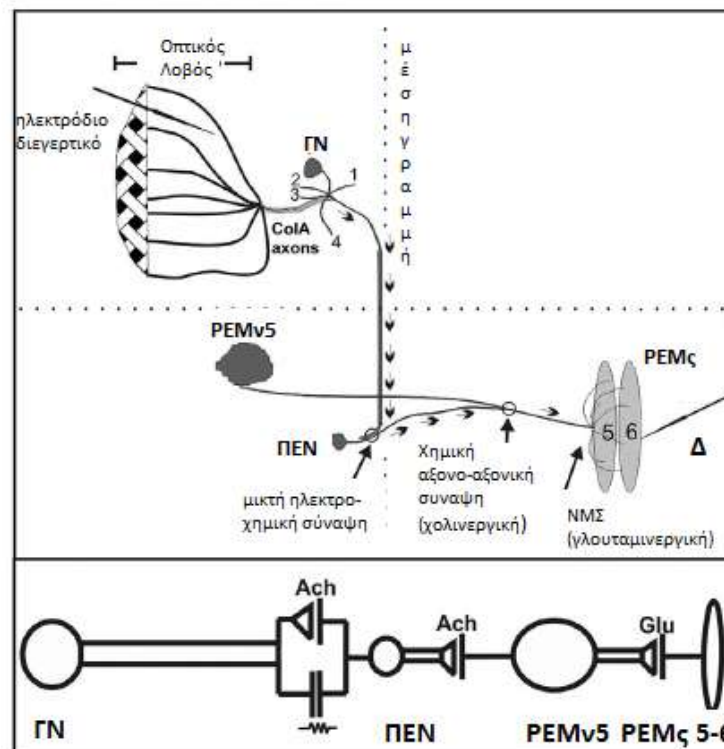
Η συνεχής παρακολούθηση της συμπεριφοράς των ζώων αυτών μέχρι την στιγμή του θανάτου τους μας αποκάλυψε μια στερεότυπη συμπεριφορά κατά την τελευταία φάση της ζωής του ατόμου, όπου αυτό παραμένει σε ύπτια θέση (supine) μη επιτελώντας παρά μόνο ελάχιστες και πολύ μικρής κλίμακας κινήσεις στα πόδια, κάνοντας ανεπιτυχείς προσπάθειες για επαναφορά σε ορθή στάση και αναρρίχηση. Τα αποτελέσματα αυτά, όπως και τα πρότερα ευρήματα της σειράς Oregon-R όπως προαναφέρθηκε επιτρέπουν την υποστήριξη της υπόθεσης ότι τα προθανάτια σημεία-χαρακτηριστικά είναι ανεξάρτητα του γενετικού υποβάθρου και πιθανώς αποτελούν γενικευμένη φυσιολογική διαδικασία.

2. Αξιολόγηση του ρόλου της γήρανσης στο Σύστημα των Γιγαντιαίων Αξόνων (ΣΓΑ)

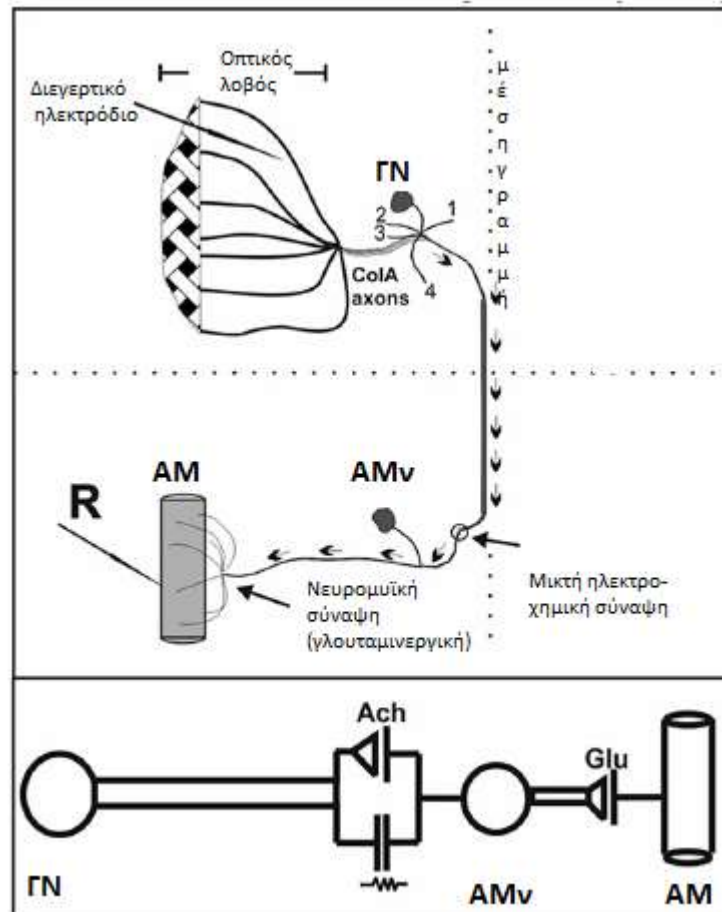
Το πρώτο υποκύκλωμα του συστήματος γιγαντιαίων αξόνων που μελετήθηκε κατά την γήρανση ήταν το υποκύκλωμα «Γιγαντιαίος Νευρώνας- Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες».

Η πρώτη περιγραφή της πορείας των ΓΝ όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή έγινε από τον Wyman [135], ο οποίος είχε παρατηρήσει ότι οι δύο άξονες του αμφίπλευρου ζεύγους των ΓΝ περνούν από τον εγκέφαλο στο θωρακικό τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), μέσω του αυχενικού συνδέσμου. Οι ΓΝ λαμβάνοντας ερεθίσματα από τους οπτικούς λοβούς και περνώντας μέσω του αυχενικού συνδέσμου στο θώρακα συνάπτονται περαιτέρω, στο επίπεδο του μεσοθωρακικού νευρομερούς

(T2), τόσο με τον ομόπλευρο περιφερειακό ενδιάμεσο νευρώνα (ΠΕΝ) (Εικόνα 18) όσο με τον ομόπλευρο κινητικό νευρώνα του αλτικού μυός (ΑΜν) (Εικόνα 19) [135]. Οι τελικές νευρικές απολήξεις του ΠΕΝ προβάλλουν, με τη σειρά τους, μέσω του οπισθίου ραχιαίου μεσοθωρακικού νεύρου (ΟΡΜΝ) και σχηματίζουν χολινεργικές συνάψεις με τους κινητικούς νευρώνες των ραχιαίων επιμηκών μυών (ΡΕΜνς) [145]. Αντιθέτως ο νευράξονας για τον ΑΜ συνδέεται απευθείας με τον ομώνυμο μυ (ΑΜ και η σύναψη αυτή είναι γλουταμινεργική (Εικόνα 19). Ως εκ τούτου, η καταγραφή των δυναμικών ενέργειας από τους ΡΕΜς μετά από διέγερση των ΓΝ αξιολογεί τη λειτουργικότητα του κυκλώματος ΓΝ- ΠΕΝ – ΡΕΜς που απαρτίζεται από τρεις νευρώνες (εικόνα 18) ενώ η καταγραφή από τον ΑΜ αξιολογεί τη λειτουργικότητα του υποκυκλώματος ΓΝ- ΑΜ (δύο νευρώνες) (εικόνα 19).



Εικόνα 18: Το υποκύκλωμα ΓΝ-ΡΕΜς του ΣΓΑ. Κάθε ΓΝ στο εσωτερικό του κεντρικού νευρικού συστήματος της *Drosophila melanogaster* συνάπτεται με τον ομόπλευρο περιφερειακό ενδιάμεσο νευρώνα (ΠΕΝ) ο οποίος εν συνεχεία συνάπτεται με τον ΡΕΜν5 που νευρώνει τους ΡΕΜς 5-6. Παρουσίαση των νευρώνων και των συνάψεων τους (χημικές, ηλεκτρικές ή μεικτές) που απαρτίζουν το υποκύκλωμα. (ΓΝ: Γιγαντιαίος Νευρώνας, ΠΕΝ: Περιφερειακός Ενδιάμεσος Νευρώνας, ΡΕΜς: Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες, ΡΕΜν5: νευρώνας του ΡΕΜ5, Ach : ακετυλοχολίνη, Glu : γλουταμινικό)



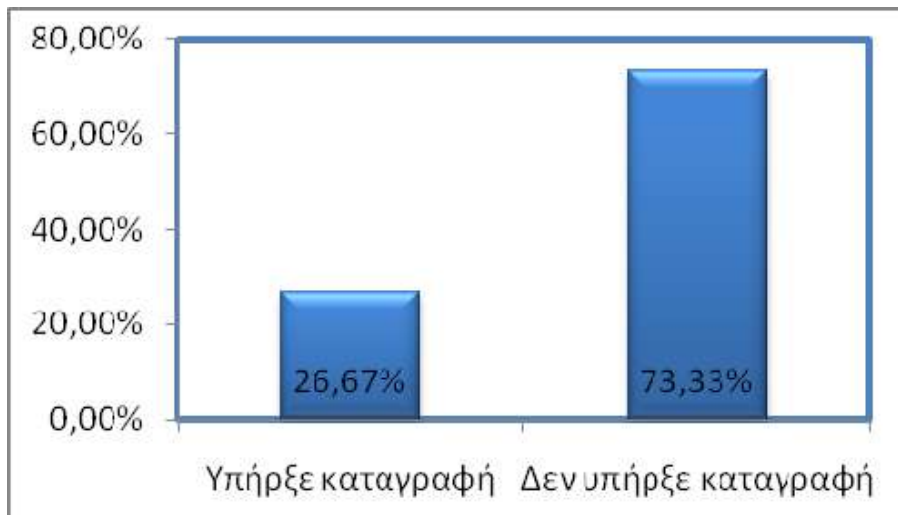
Εικόνα 19: Το υποκύκλωμα GN – AM του κυκλώματος ΣΓΑ. Κάθε GN συνάπτεται στο επίπεδο του μεσοθωρακικού νευρομερούς (T2) με τον ομόπλευρο κινητικό νευρώνα του αλτικού μύος (AMv), ο οποίος μέσω γλουταμινεργικής σύναψης νευρώνει τον AM. (GN: Γιγαντιαίος Νευρώνας, AM: Αλτικός Μυς, AMv: νευρώνας του AM, Ach : ακετυλοχολίνη, Glu : γλουταμινικό)

Στο υποκύκλωμα GN – PEM εξετάσθηκαν οι εξής παράμετροι: βραχύχρονη απόκριση, ανερέθιστη περίοδος και επαγόμενη συχνότητα 50% (βλ. Μέθοδοι και υλικά).

Η βραχύχρονη απόκριση όπως προαναφέρθηκε είναι ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της διέγερσης στον εγκέφαλο του εντόμου και της εκπόλωσης του μύος. Οι βραχύχρονες αποκρίσεις κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 0,7 – 1,2 ms για το τμήμα GN – AM (GF – TTM) και μεταξύ 1,3 – 1,7 ms για το τμήμα GN – PEM (GF – DLM) σε έντομα μάρτυρες . Οι αποκρίσεις δύναται να ποικίλλουν βάσει γενετικού υποβάθρου, ηλικίας και θερμοκρασίας [164].

Στο συγκεκριμένο υποκύκλωμα επιθυμούσαμε να μελετήσουμε αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της βραχύχρονης απόκρισης νεαρών υγιών ατόμων (ηλικίας 6- 8 ημερών) και αυτής ηλικιωμένων, φαινομενικά υγιών ατόμων (ηλικίας 73 – 75 ημερών).

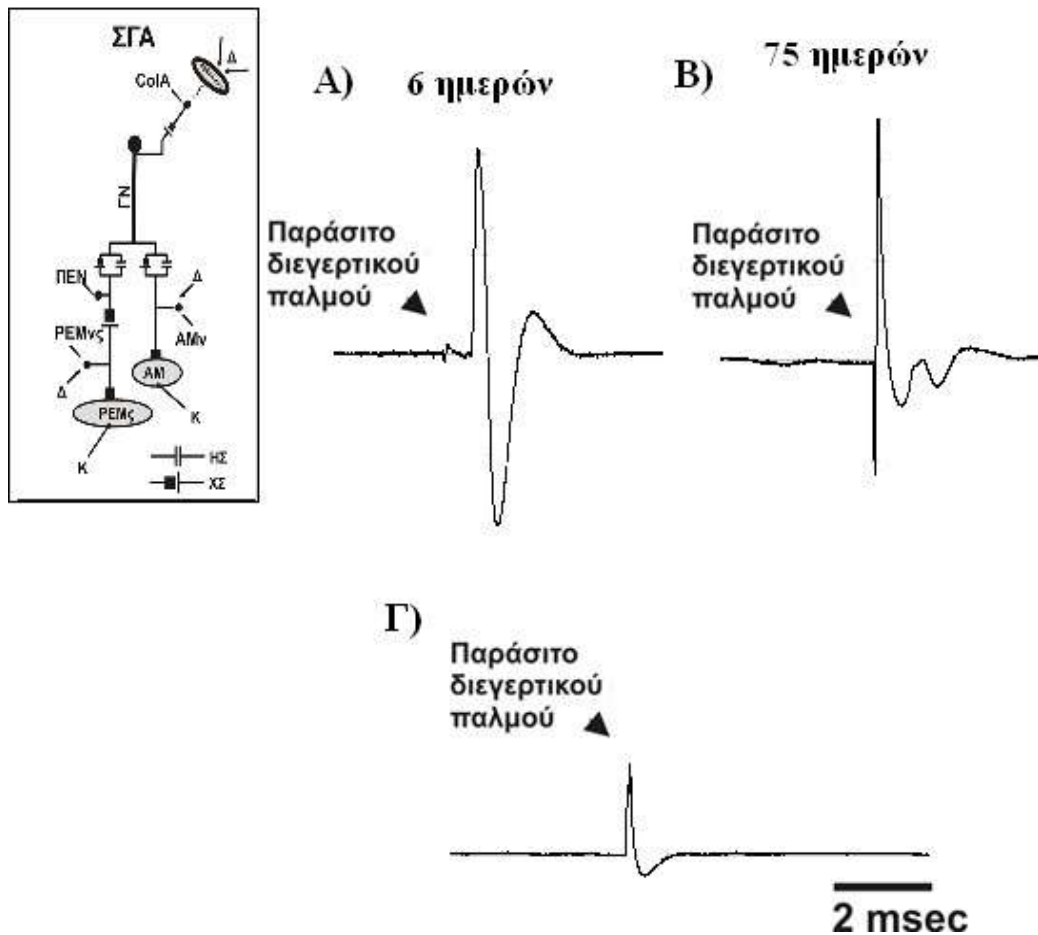
Αυτό το οποίο διαπιστώθηκε ήταν ότι στο 73,33% των ηλικιωμένων ατόμων εβδομήντα πέντε ημερών δεν πάρθηκαν καταγραφές έναντι των νεαρών ατόμων ηλικίας 6- 8 ημερών που δεν σημειώθηκε καμία αποτυχία (βλέπε διάγραμμα 12). Σε αυτές τις περιπτώσεις, αρχικά γινόταν έλεγχος του συστήματος των ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών για να αποκλειστεί η πιθανότητα τεχνικού προβλήματος αρχικά και εν συνεχεία για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο λανθασμένης τοποθέτησης του καταγραφικού ηλεκτροδίου και υπό – ουδικής διέγερσης, γινόταν αλλαγή της θέσης του καταγραφικού ηλεκτροδίου και ακολούθως αύξηση της έντασης της διέγερσης. Επιπρόσθετα, τα ίδια ηλεκτρόδια (διεγερτικά, καταγραφικό και γείωση) χρησιμοποιούνταν για καταγραφές από νεαρά άτομα, στις οποίες τη διέγερση του υποκυκλώματος, ακολουθούσε εκπόλωση του μυός. Στη συνέχεια, το ίδιο ηλικιωμένο άτομο τοποθετούνταν στο set-up με τα ίδια αποτελέσματα – αποτυχία καταγραφής, δηλαδή το stimulus artifact ήταν παρόν μη ακολουθούμενο όμως από εκπόλωση μυός. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα τα γηρασμένα έντομα, στα οποία δεν πάρθηκε απάντηση, μακροσκοπικά υπήρχε κίνηση ποδιών κατά τη διέγερση τους, γεγονός το οποίο οδηγεί στο εύλογο συμπέρασμα ότι το υποκύκλωμα GN – PEM (GF – DLM) θα πρέπει να εξετασθεί περαιτέρω. Τα ανωτέρω παρατηρήθηκαν σε διαφορετικές σειρές εντόμων W^{1118} , ίδιας ηλικιακής ομάδας, γεγονός που αποκλείει την ύπαρξη μεταλλαγμένων στελεχών [164]. Στο διάγραμμα 12 φαίνεται το ποσοστό των γηρασμένων εντόμων στο οποίο πάρθηκε απάντηση έναντι αυτών που δεν πάρθηκε.



Διάγραμμα 12: Ποσοστό των ατόμων 73 – 75 ημερών από τα οποία δεν πάρθηκαν καταγραφές έναντι αυτών που πάρθηκαν.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, δηλαδή της αποτυχίας καταγραφής από τους ΡΕΜ και συνεκτιμώντας προηγούμενες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η λειτουργικότητα του ΣΓΑ κατά τη γήρανση εκπίπτει, χωρίς να μπορεί να εντοπιστεί σαφώς το σημείο ή τα σημεία που μπορεί να είναι πιο ευάλωτα στις αλλαγές που επισυμβαίνουν κατά τη γήρας [59, 135] οδηγούμαστε στη διατύπωση μιας υπόθεσης ότι ίσως η έκπτωση της λειτουργικότητας αυτής δεν ελαττώνεται συνεχώς αλλά φτάνει ίσως σε έναν ουδό έκπτωσης πέρα από τον οποίο παρακλύεται πλήρως η λειτουργία του υποκυκλώματος ΓΝ – ΡΕΜ του ΣΓΑ. Ο ακριβής εντοπισμός της θέσης ή των θέσεων καθώς επίσης και το χρονικό σημείο πριν από τον θάνατο που συμβαίνει αυτή η έκπτωση αποτελεί πρόσφορο έδαφος για περαιτέρω έρευνα και μελέτη.

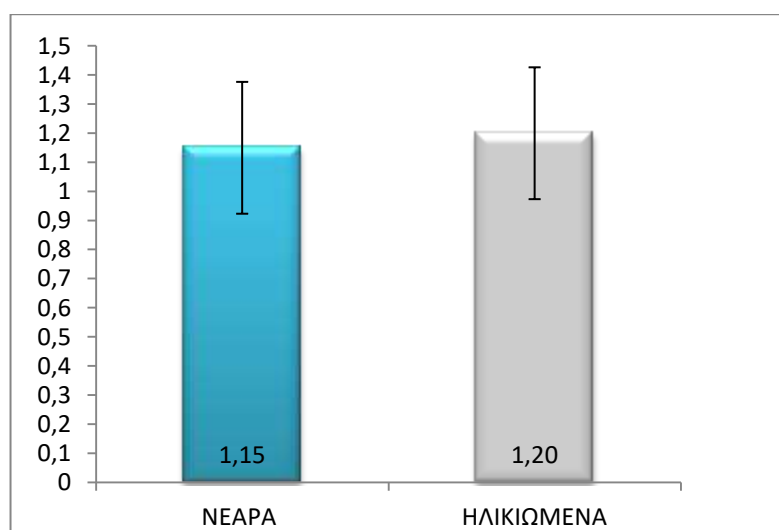
Βραχύχρονη απόκριση



Εικόνα20: Καταγραφές στο υποκύκλωμα ΓΝ/ΡΕΜς του ΣΓΑ (βλ. σχήμα), σε νεαρά (6 ημερών) και ηλικιωμένα (75 ημερών) έντομα τύπου (W^{1118}). Εξωκυτταρικές καταγραφές μεμβρανικών δυναμικών από τους ΡΕΜς ως απόκριση σε άμεση ηλεκτρική διέγερση του ΓΝ. (Σχήμα Α, και Β,) Παρουσιάζεται η αδυναμία καταγραφής στο σχήμα Γ, όπου παρουσιάζεται το παράσιτο του διεγερτικού παλμού. ΣΓΑ: Σύστημα Γιγαντιαίων Αξόνων, ΓΝ: Γιγαντιαίος Νευρώνας, ΠΕΝ: Περιφερειακός Ενδιάμεσος Νευρώνας, ΡΕΜς: Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες, ΡΕΜνς: νευρώνες των ΡΕΜ, ΑΜ: Αλτικός Μυς, ΑΜν: νευρώνας του ΑΜ, Δ: Διέγερση, Κ: Καταγραφή, ΗΣ: Ηλεκτρικές Συνάψεις, ΧΣ: Χημικές Συνάψεις

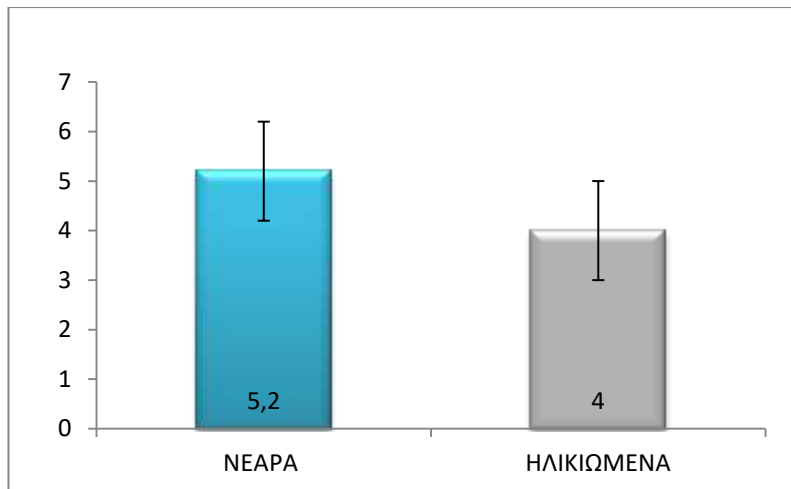
Όσον αφορά τα νεαρά άτομα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές εξετάστηκαν οι παράμετροι της βραχύχρονης απόκρισης, της ανερέθιστης περιόδου και της «επαγόμενης συχνότητας 50%» (βλ. Μέθοδοι και υλικά).

Η βραχύχρονη απόκριση βρέθηκε να είναι $1,15 \pm 0,22\text{ms}$ ενώ στα ηλικιωμένα στα οποία πάρθηκε απάντηση ήταν $1,20 \pm 0,11\text{ms}$. Το ποσοστό όμως των ηλικιωμένων εντόμων στα οποία πάρθηκε απάντηση όπως προαναφέρθηκε ήταν μικρό, οπότε δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ νεαρών και ηλικιωμένων εντόμων. Στην εικόνα 13 παραβάλλονται καταγραφές της βραχύχρονης απόκρισης για τα δυο ηλικιακά στάδια.



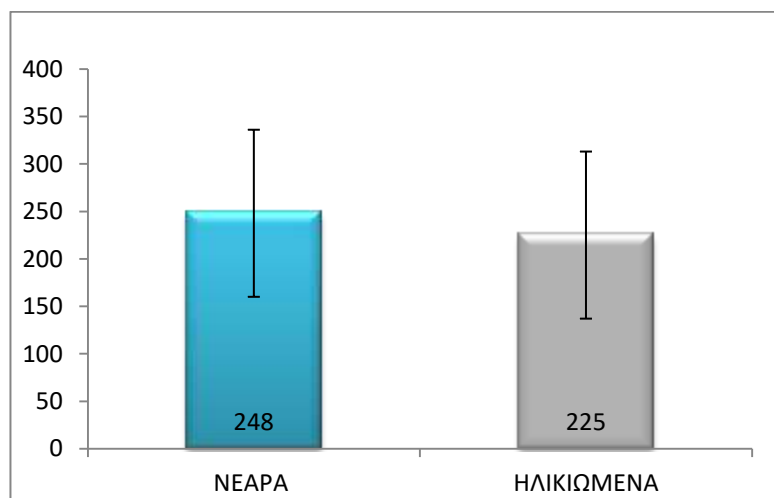
Διάγραμμα 13: Βραχύχρονη απόκριση (SLR) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM). (Y άξονας = ms)

Η δεύτερη παράμετρος, η οποία εξετάστηκε ήταν η ανερέθιστη περίοδος (Διάγραμμα 14), η οποία στα νεαρά ήταν $5.2 \pm 1.64\text{ms}$ και στα ηλικιωμένα $4 \pm 1\text{ms}$ μεταξύ των οποίων δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά. Στο διάγραμμα 14 παραβάλλονται καταγραφές της ανερέθιστης περιόδου για τα δυο ηλικιακά στάδια.

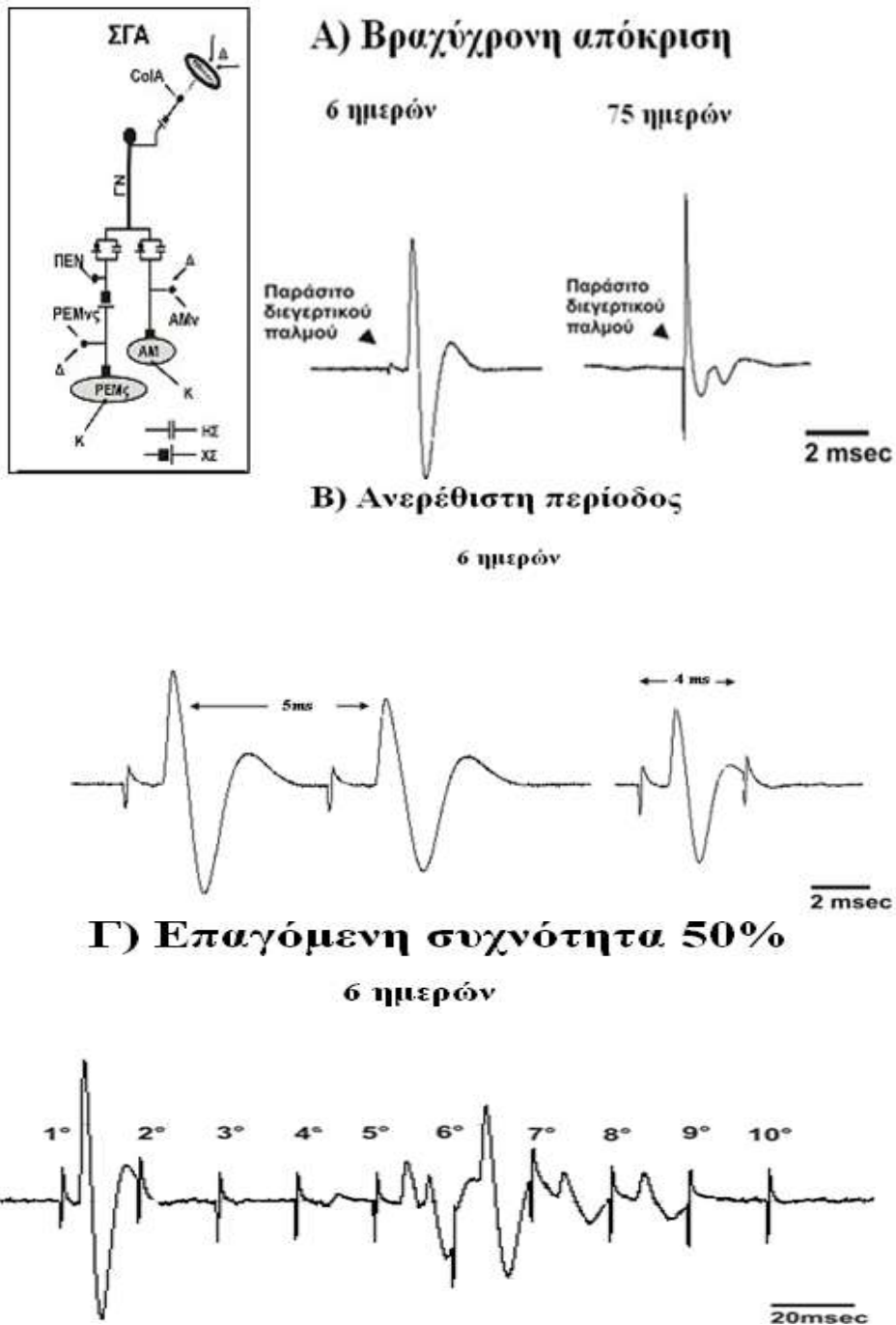


Διάγραμμα 14: Ανερέθιστη περίοδος (RP) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM). Υ άξονας = ms

Η τρίτη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η «επαγόμενη συχνότητα 50%», δηλαδή η συχνότητα ερεθισμού που παράγει 50% επιτυχείς απαντήσεις (βλ. Μέθοδοι και υλικά). Και σε αυτή την παράμετρο, όπως και στην ανερέθιστη περίοδο, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).



Διάγραμμα 15: Επαγόμενη συχνότητα 50%, (FF50) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM). Υ άξονας = Hz

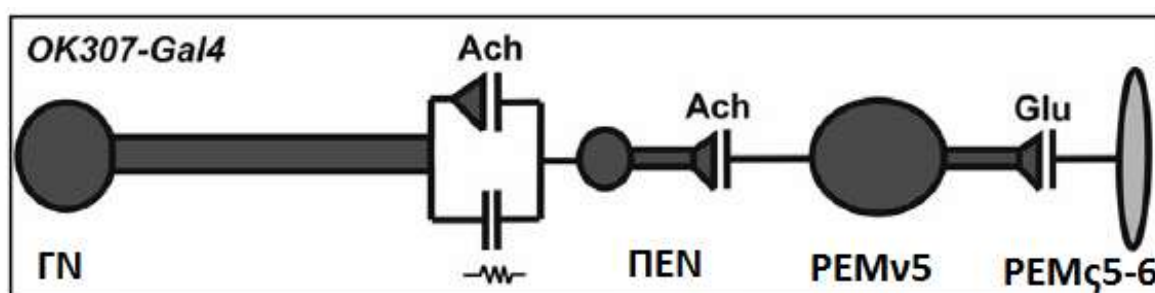


Εικόνα21: Υπολογισμός των τριών βασικών ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων στο υποκύκλωμα ΓΝ/ΠΕΜς του ΣΓΑ (βλ. σχήμα), σε νεαρά (6 ημερών) και ηλικιωμένα (75 ημερών) έντομα τύπου (W^{1118}). Εξωκυτταρικές καταγραφές μεμβρανικών δυναμικών από τους ΠΕΜς ως απόκριση σε άμεση ηλεκτρική διέγερση του ΓΝ. Από τα μυϊκά δυναμικά που καταγράφηκαν υπολογίστηκε (Α) η βραχύχρονη απόκριση (SLR), (Β) η ανερέθιστη περίοδος (RP) και (Γ) η επαγόμενη συχνότητα 50% (FF50). ΣΓΑ: Σύστημα Γιγαντιαίων Αξόνων, ΓΝ: Γιγαντιαίος Νευρώνας, ΠΕΝ: Περιφερειακός Ενδιάμεσος Νευρώνας, ΠΕΜς: Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες, ΠΕΜνς: νευρώνες των ΠΕΜ, ΑΜ: Αλτικός Μυς, ΑΜν: νευρώνας του ΑΜ, Δ: Διέγερση, Κ: Καταγραφή, ΗΣ: Ηλεκτρικές Συνάψεις, ΧΣ: Χημικές Συνάψεις

3. Αξιολόγηση του ρόλου της πρωτεΐνης ταυ στη λειτουργία του συστήματος γιγαντιαίων αξόνων

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) των ανθρώπων, η πρωτεΐνη ταυ όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή υπάρχει σε έξι ισομορφές αναλόγως του εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων 2 και 3 στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και του εξονίου 10 μετά την πρώτη περιοχή δέσμησης στους μικροσωληνίσκους (microtubule binding repeat, MTBR) (Εικόνα 8). Έτσι, προκύπτει η 0N ισομορφή (απουσία αμινοξέων), η ισομορφή 1N (παρουσία 29 παρεμβαλλόμενων αμινοξέων) και η ισομορφή 2N (παρουσία 58 παρεμβαλλόμενων αμινοξέων). Η αναλογία των 0N/1N/2N στον ενήλικα εγκέφαλο είναι 40%, 50% και 10% αντίστοιχα [96].

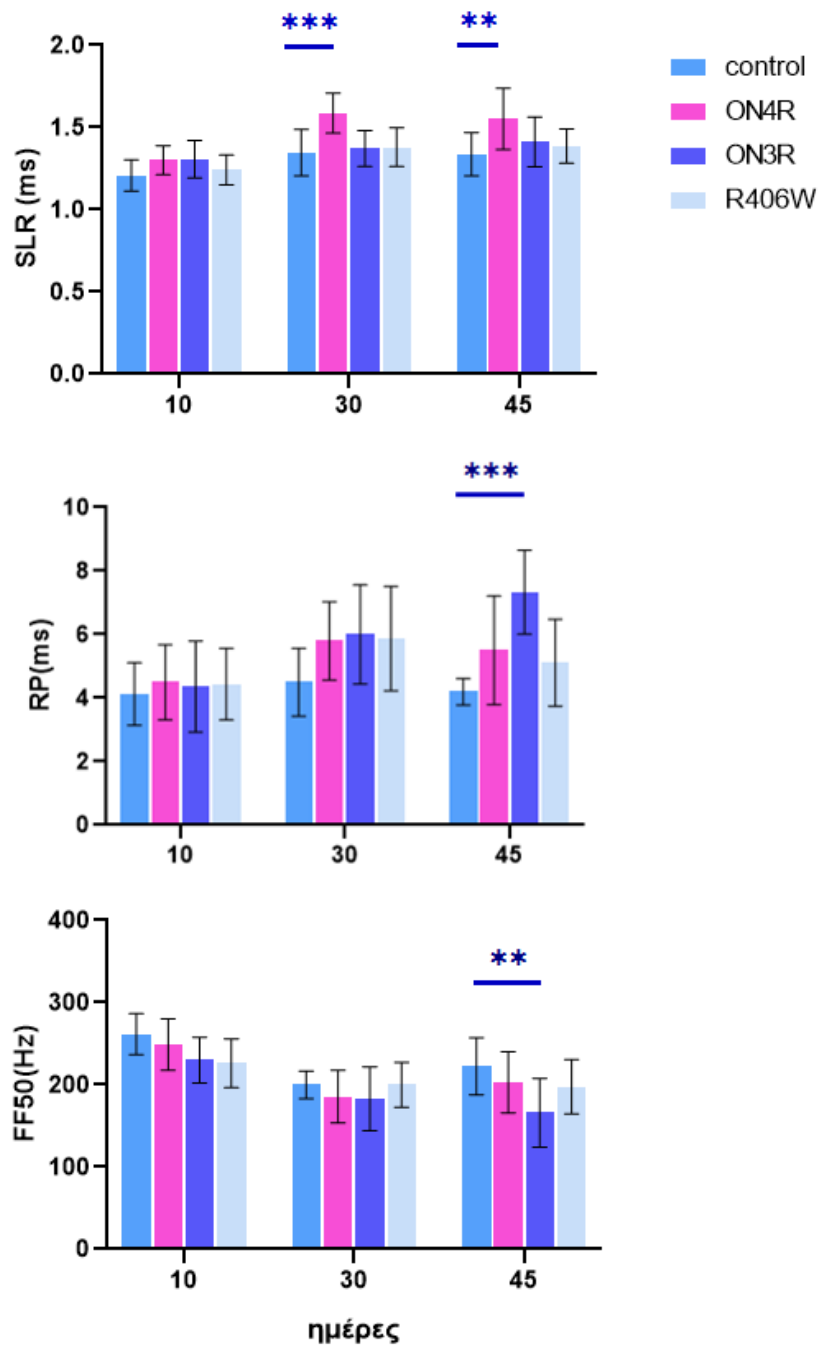
Για να προσδιοριστεί αν η συσσώρευση της ανθρώπινης ισομορφής 0N4R ή 0N3R ή της μεταλλαγμένης μορφής (ON4R^{R406W} ή R406W για συντομία) της πρωτεΐνης ταυ επηρεάζει τη λειτουργικότητα του ΣΓΑ με ηλικιο-εξαρτώμενο τρόπο αξιολογήθηκαν και σε αυτή τη σειρά πειραμάτων οι παράμετροι SLR, RP και FF50 σε μύγες - μάρτυρες και σε μύγες που εξέφραζαν hTau σε ηλικία 10, 30 και 45 ημερών αντιστοίχως. Αρχικά αξιολογήθηκε η επίδραση της hTau, η οποία εκφράστηκε υπό το σύστημα OK307Gal4, οδηγώντας την έκφρασή της κατ' αυτόν τον τρόπο σε όλο το μήκος του ΣΓΑ και καταγράφοντας από το PEM5-6 (Εικόνα 18).



Εικόνα 22: Στοχοκατευθυνόμενη έκφραση της hTau σε ολόκληρο το ΣΓΑ υπό OK307 Gal4. Οι νευρώνες GN, PEN, PEMv5 (Γιγαντιαίος Νευρώνας, PEN: Περιφερειακός Ενδιάμεσος Νευρώνας, PEMv5: νευρώνας των PEM) απεικονίζονται με σκούρο γκρι χρώμα. PEMcs: Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες. Καταγραφές από όλους τους γονότυπους για κάθε μια ηλικιακή ομάδα πραγματοποιήθηκαν στην ίδια συνεδρία (εξ).

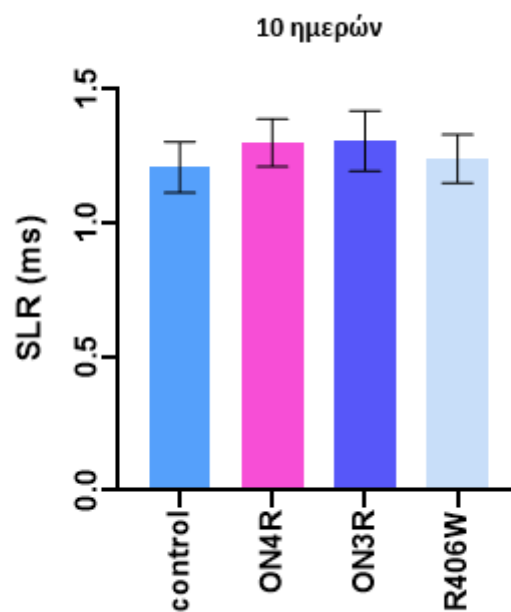
Για απλοποίηση της ανάλυσης και της χρήσης του πλέον ενδεδειγμένου και συντηρητικού μάρτυρα, αρχικά έγινε σύγκριση των μαρτύρων OK307 / + με τα ζώα που εξέφραζαν την 0N4R, την 0N3R και τη μεταλλαγμένη μορφή R406W (Πίνακας

5)όπως προαναφέρθηκε. Για ζώα ηλικίας 10 ημερών δεν αποκαλύφθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις εξεταζόμενες παραμέτρους SLR, RP ή FF50 (Διάγραμμα 16, 17, 18, 19).Όσον αφορά την ανερέθιστη περίοδο και την Επαγόμενη συχνότητα 50% (FF50%) σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των μαρτύρων και των ζώων με γονότυπο ON3R. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απόδοση των ON4R και ON3R ζώων ήταν καλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε στους μάρτυρες για την επαγόμενη συχνότητα FF50% . Επειδή υπήρχε η υπόθεση εξαρχής ότι η έκφραση της hTau θα οδηγούσε σε διαταραχή της λειτουργίας του ΣΓΑ, χρησιμοποιήθηκαν ετεροζυγωτικά ζώα για OK307 / + ως πιο συντηρητική προσέγγιση μαρτύρων σε όλα τα πειράματα για να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα εν συγκρίσει με μάρτυρες που ίσως είχαν σημαντικά καλύτερες επιδόσεις.



Διάγραμμα 16: Στοχευμένη έκφραση hTau σε όλο το ΣΓΑ υπό OK307 Gal4. Οι καταγραφές από τους διαφορετικούς γονότυπους για κάθε μία από τις ηλικιακές ομάδες πραγματοποιήθηκαν στην ίδια συνεδρία (εξ). Οι μέσες τιμές± σταθερή απόκλιση (SEM) απεικονίζονται σε κάθε γραφική παράσταση για κάθε επιλεγμένη παράμετρο. Α: Η SLR ήταν σημαντικά υψηλότερη στις ON4R μύγες ηλικίας 30-45 ημερών σε σύγκριση με τις μύγες μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Δεν προέκυψαν διαφορές για τις νεαρές μύγες (10 ημερών) όλων των γονοτύπων. Β, Γ: Η έκφραση της ON3R ισομορφής οδηγεί σε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της ανερέθιστης περιόδου RP (Β) και μείωση της επαγόμενης συχνότητας 50%(Γ) μόνο σε μύγες ηλικίας 45 ημερών. Αντιθέτως, η έκφραση της ON4R ισομορφής ή της μεταλλαγμένης R406W δεν είχε επίδραση σε αυτές τις παραμέτρους. [****** $p < 0,01$ ******* $p < 0,001$ τιμές από one-way ANOVA with post hoc Dunnett's tests].

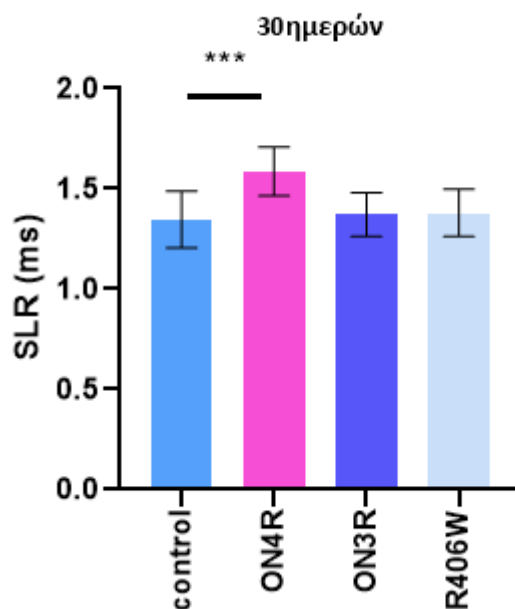
Πιο αναλυτικά, η μέση τιμή της βραχύχρονης απόκρισης για τους OK307/+ μάρτυρες και τα ζώα 10 ημερών στα οποία εκφράζεται η hTau ήταν 1,25ms.



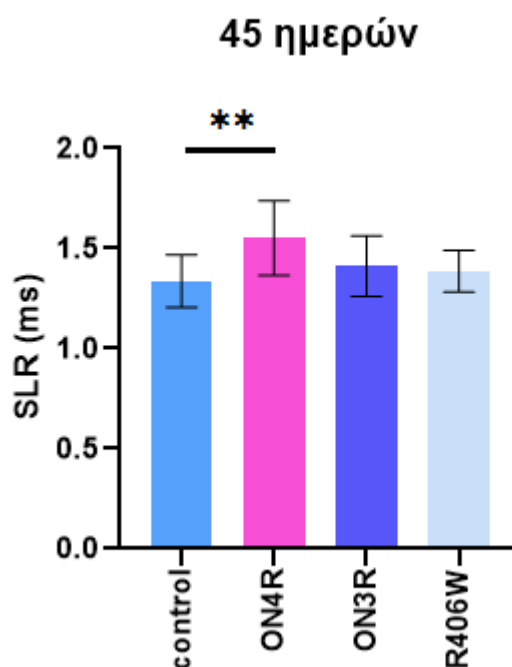
Διάγραμμα 17: Βραχύχρονη απόκριση (SLR) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (GN-PEM) σε όλους τους γονότυπους, ηλικίας 10 ημερών.

Ωστόσο η βραχύχρονη απόκριση αυξήθηκε με την πάροδο της ηλικίας στις μύες που εκφράζουν hTau (Διάγραμμα 18) και η στατιστική ανάλυση ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των μυών ηλικίας 30 ημερών (SLR: $1,34 \pm 0,14$ ms) και 45 ημερών (SLR: $1,33 \pm 0,13$ ms) που εξέφραζαν την ισομορφή ON4R (SLR: $1,58 \pm 0,12$ ms και $1,55 \pm 0,18$ ms αντιστοίχως) (διαγράμματα 18, 19). Είναι ενδιαφέρον, ωστόσο, ότι η βραχύχρονη απόκριση SLR δεν άλλαξε κατά τον ίδιο τρόπο μεταξύ των R406W και ON3R ζώων σε σχέση με τους μάρτυρες με την πάροδο της ηλικίας υποδεικνύοντας ότι το αποτέλεσμα είναι ειδικό για τα ζώα στα οποία εκφράζεται η ON4R hTau ισομορφή. Η αυξημένη SLR σε ζώα που εκφράζουν την ON4R ισομορφή είναι πιθανό να οφείλεται είτε σε αύξηση του χρόνου αγωγής στον

άξονα είτε / και σε συναπτική καθυστέρηση καθώς το σήμα μεταβιβάζεται μέσω του πολυσυναπτικού ΣΓΑ στους ΡΕΜς5-6.

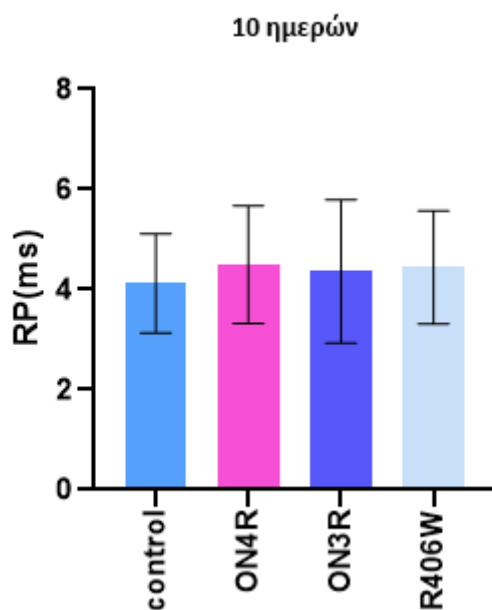


Διάγραμμα 18: Βραχύχρονη απόκριση (SLR) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-ΡΕΜ) σε όλους τους γονότυπους, ηλικίας 30 ημερών.

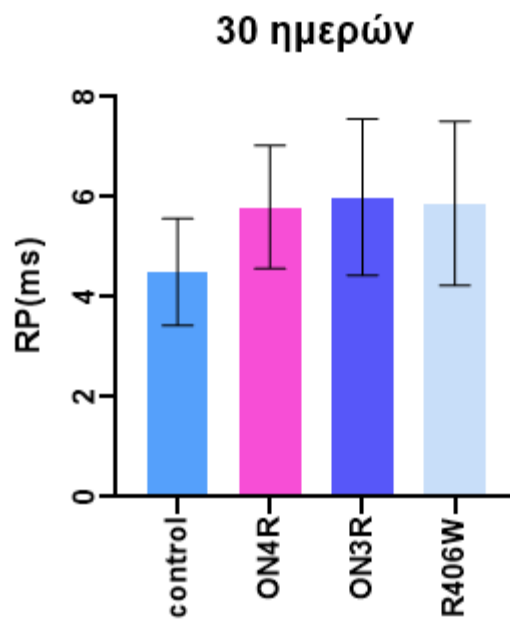


Διάγραμμα 19: Βραχύχρονη απόκριση (SLR) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-ΡΕΜ) σε όλους τους γονότυπους, ηλικίας 45 ημερών.

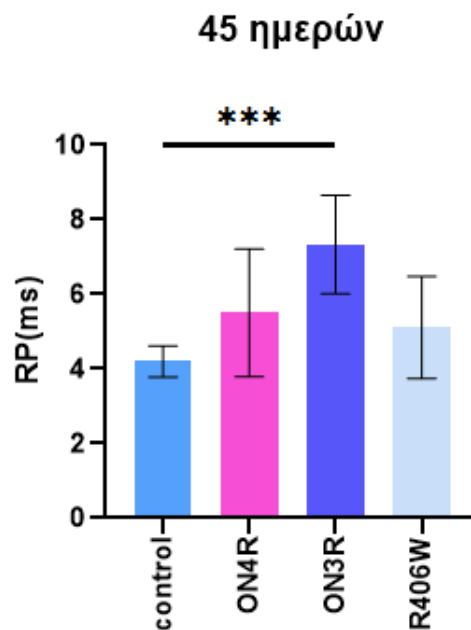
Η ανερέθιστη περίοδος (RP) ήταν περίπου 4 msec τόσο για τους μάρτυρες όσο και για τα υπόλοιπα ζώα ηλικίας 10 ημερών που εκφράζουν hTau (Διάγραμμα 16, 20, 21, 22) και δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Παρόλο που το RP αυξήθηκε σε 5 msec για τους μάρτυρες και τα υπόλοιπα ζώα ηλικίας 30 και 45 ημερών, στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε μόνο μεταξύ των μαρτύρων και των ζώων που εξέφραζαν την ON3R ισομορφή της ταυ πρωτεΐνης, όπου η RP αυξήθηκε στα 7 msec (Διάγραμμα 16, διάγραμμα 22).



Διάγραμμα 20: Ανερέθιστη περίοδος (RP) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) για όλους τους γονότυπους, ηλικίας 10 ημερών.



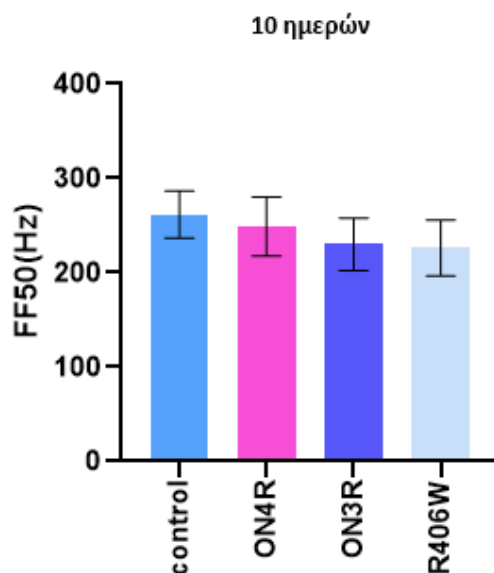
Διάγραμμα 21: Ανερέθιστη περίοδος (RP) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) για όλους τους γονότυπους, ηλικίας 30 ημερών.



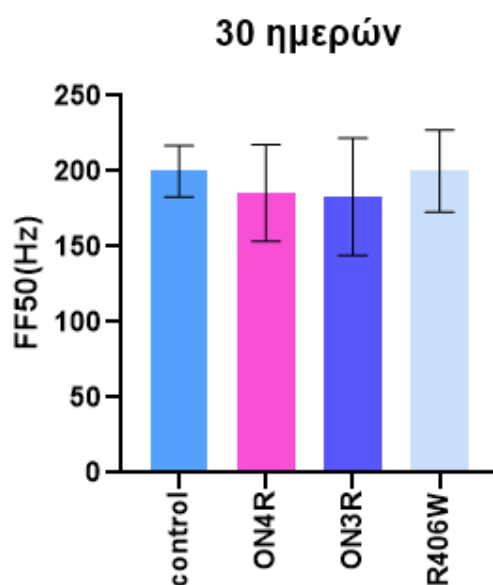
Διάγραμμα 22: Ανερέθιστη περίοδος (RP) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) για όλους τους γονότυπους, ηλικίας 45 ημερών.

Τέλος, η λειτουργική αξιοπιστία του ΣΓΑ που μετρήθηκε από την επαγόμενη συχνότητα 50% (FF50) ήταν μειωμένη καθώς τα ζώα γήρασκαν (διάγραμμα 16). Σε ηλικία 45 ημερών, στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε μεταξύ των μαρτύρων και

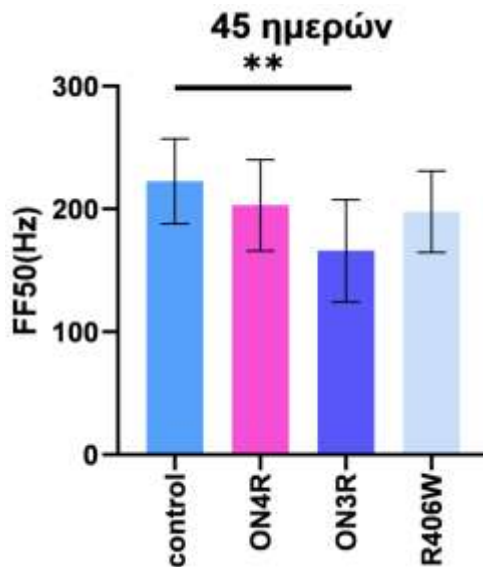
των ON3R μυγών, όπως και στην ανερέθιστη περίοδο, όπου το FF50% ήταν $225 \pm 34,53\text{Hz}$ στους μάρτυρες έναντι $166 \pm 41,68\text{Hz}$ στα ON3R ζώα (διάγραμμα 25).



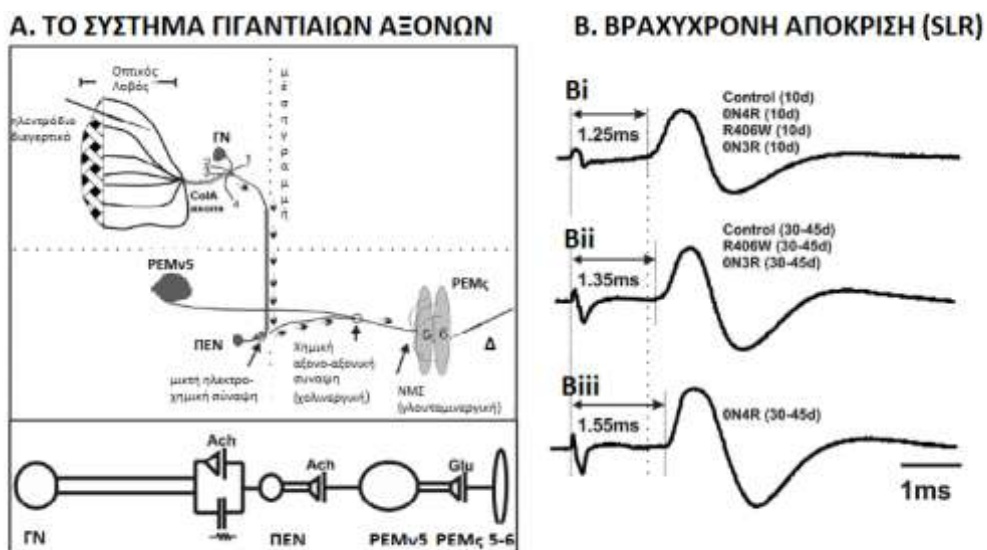
Διάγραμμα 23: Επαγόμενη συχνότητα 50%, (FF50) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας- Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (GN-PEM) σε όλους τους γονοτύπους, ηλικίας 10 ημερών.



Διάγραμμα 24: Επαγόμενη συχνότητα 50%, (FF50) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας- Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (GN-PEM) σε όλους τους γονοτύπους, ηλικίας 30 ημερών.

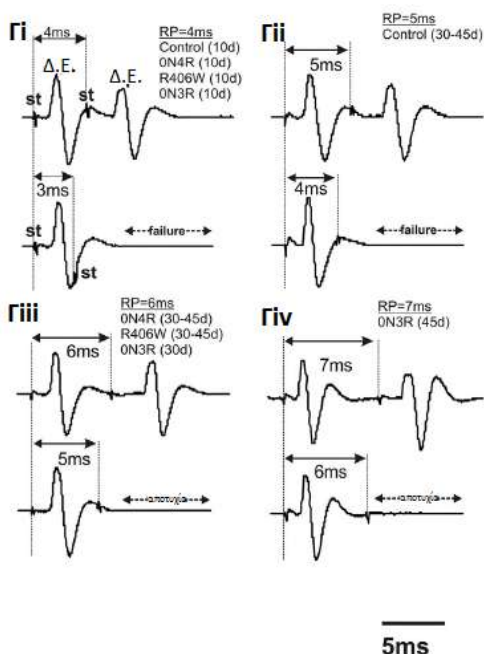


Διάγραμμα 25: Επαγόμενη συχνότητα 50%, (FF50) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) σε όλους τους γονοτύπους, ηλικίας 45 ημερών.

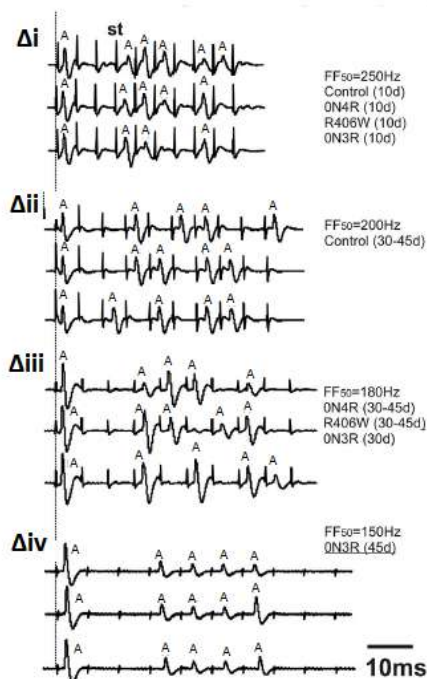


Εικόνα 23: Το υποκύκλωμα ΓΝ- PEMs 5/6 και οι λειτουργικές παράμετροι που αξιολογήθηκαν. Α. Το υποκύκλωμα ΓΝ- PEMs του ΣΓΑ απαρτίζεται από τρεις νευρώνες, το Γιγαντιαίο Νευρώνα (ΓΝ), τον ΠΕΝ: Περιφερειακός Ενδιάμεσος Νευρώνας και τον άξονα του κινητικού νευρώνα 5 (MN5). Β. Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από μύγες μάρτυρες 10, 30 και 45 ημερών και μύγες που εκφράζουν την ON4R, ON3R και τη R406W μεταλλαγμένη ισομορφή της hTau στους νευρώνες του ΣΓΑ (υπο OK307-Gal4)(καταδεικνύεται η θέση του διεγερτικού ηλεκτροδίου, Ach: ακετυλοχολίνη, Glu: γλουταμινικό, Β. Δυναμικό ενεργείας που καταγράφηκε από τους PEM5 ή 6 μετά από διέγερση του ΓΝ. Η SLR, το διάστημα μεταξύ του ερεθίσματος (st) και της έναρξης της ανερχόμενης φάσης του δυναμικού ενέργειας (μετάδοση σήματος μέσω 3 νευρώνων στον μυ, βέλη στο Α).

Γ. ΑΝΕΡΕΘΙΣΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ (RP)



Δ. ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ 50% (FF50)



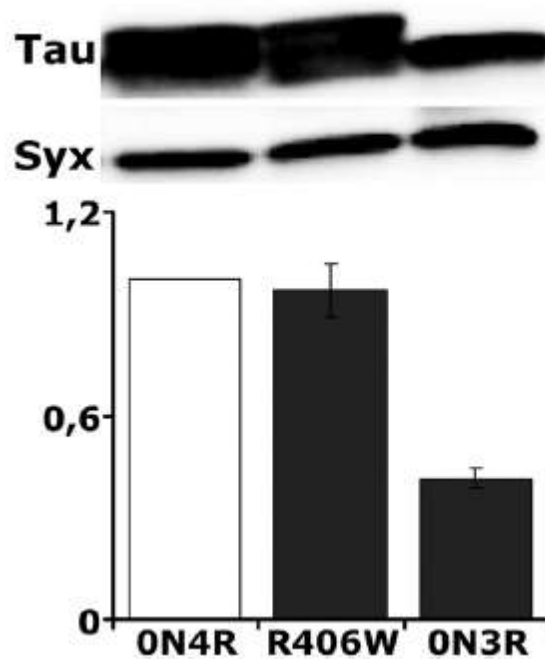
Εικόνα 23 (συνέχεια): Γ-Δ. Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από μύγες μάρτυρες 10, 30 και 45 ημερών και μύγες που εκφράζουν την 0N4R, 0N3R και τη R406W μεταλλαγμένη ισομορφή της hTau ειδικά στους νευρώνες του ΣΓΑ (υποOK307-Gal4) (καταδεικνύεται η θέση του διεγερτικού ηλεκτροδίου, Ach: ακετυλοχολίνη, Glu: γλουταμινικό, A:Απάντηση, d: ημέρα). Γ. Ανερέθιστη περίοδος (RP) είναι το ελάχιστο διάστημα παρεμβολής (σε ms) για το οποίο προκύπτει μια διπλή απάντηση. (Γi) Όταν εφαρμόστηκε διπλό ερέθισμα με καθυστέρηση 4 ms και τα δύο ερεθίσματα παρήγαγαν δυναμικά ενέργειας στο υποκύκλωμα ΓN-ΠEN-PEM5-6 (άνω εικόνα), αλλά όταν ο χρόνος μεταξύ των ερεθισμάτων μειώθηκε στα 3 ms, το δεύτερο ερέθισμα δεν ακολουθήθηκε από δυναμικό ενέργειας (Δ.Ε.) Δ. Η FF50 είναι η συχνότητα κατά την οποία 3 ριπές με 10 ερεθίσματα παράγουν 50% επιτυχείς απαντήσεις (15απαντήσεις σε 30 ερεθίσματα). Για παράδειγμα, στο Δi 10 ερεθίσματα (st) ακολουθούνται από 6 απαντήσεις (A) στην άνω αναπαράσταση, με 5 απαντήσεις στη μεσαία και με 4απαντήσεις στην κάτω αναπαράσταση. Έτσι, συνολικά 30 ερεθίσματα παρήγαγαν 15 αποκρίσεις.

Συλλογικά, οι στατιστικά σημαντικές αλλαγές στις RP και FF50 των νευρώνων ΣΓΑ στους οποίους εκφράζεται η 0N3R ισομορφή υποδεικνύουν μια συγκεκριμένη αύξηση του ρυθμού αποτυχίας μετά από υψηλής συχνότητας συναπτική μετάδοση και ίσως αντανακλούν δυσλειτουργία αυτής η οποία ίσως προκαλείται από δυσλειτουργία της αξονικής μεταφοράς. Αυτά τα ελλείμματα απουσίαζαν από τα ζώα

με γονότυπο R406W και ON4R, υποδεικνύοντας ότι αυτά οφείλονται στην ON3R hTau ισομορφή.

Ένα επιπλέον σημαντικό στοιχείο που προέκυψε από τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι η απουσία επιπτώσεων σε οποιαδήποτε από τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν για τη μεταλλαγμένη ισομορφή ON4R που φέρει τη μετάλλαξη R406W, ανεξαρτήτως της ηλικίας των ζώων (διάγραμμα 16). Μια πιθανή εξήγηση για αυτή τη διαφορά θα μπορούσε να είναι ότι η μεταλλαγμένη R406W ισομορφή εκφράζεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση από την ON4R ισομορφή. Για να διαλευκανθεί ο ανωτέρω ισχυρισμός διενεργήθηκε western blot ανάλυση για να προσδιοριστεί το επίπεδο έκφρασης των τριών ισομορφών hTau στους νευρώνες υπό του συστήματος OK307Gal4 [167]. Όπως φαίνεται στην εικόνα 24, τα επίπεδα έκφρασης των ON4R και R406W στους νευρώνες ήταν ισοδύναμα όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για την καθολική έκφραση τους στους νευρώνες [106, 168]. Η ευρεία ζώνη που παρατηρείται στην western blot αντιπροσωπεύει στην πραγματικότητα μερικώς ή ελλιπώς φωσφορυλιωμένη hTau εντός του ΣΓΑ όπως έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν για άλλους νευρωνικούς τύπους στη *Drosophila melanogaster* [169]. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι αν και η R406W μεταλλαγμένη ισομορφή εκφράζεται ισόποσα με την ON4R ισομορφή, δεν επηρεάζει τη λειτουργία του ΣΓΑ. Επιπλέον, αυτά τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι οι παρατηρούμενες διαταραχές δεν είναι απλά συνέπεια της εξωγενούς έκφρασης της hTau στο ΣΓΑ, αλλά μάλλον οφείλονται στη συγκεκριμένη ισομορφή. Είναι ενδιαφέρον, ωστόσο, ότι τα επίπεδα της μικρότερης ισομορφής ON3R μειώθηκαν σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα της ON4R, σε αντίθεση με αυτό που έχει αναφερθεί για την καθολική έκφραση τους στους νευρώνες [106, 108]. Παρόλο όμως τα μειωμένα επίπεδα της ON3R, η συσσώρευση της ισομορφής ON3R αύξησε το ποσοστό αποτυχίας του ΣΓΑ μετά από απαιτητική διέγερση με ηλικίο- εξαρτώμενο τρόπο. Το ποσοστό αποτυχίας δεν επηρεάστηκε από τις ισομορφές ON4R και R406W παρά την υψηλότερη συγκέντρωσή τους, γεγονός που υποδηλώνει τα ελλείμματα που παρατηρήθηκαν στις παραμέτρους RP και FF50 οφείλονται συγκεκριμένα στη συσσώρευση της ON3R ισομορφής. Τα ελαττωμένα επίπεδα της ON3R σε σχέση με

αυτά της ON4R δεν επιτρέπουν συγκρίσεις σχετικά με τη διαταραχή που παρατηρήθηκε στη βραχύχρονη απόκριση SLR μεταξύ αυτών των δύο ισομορφών.



Εικόνα 24 : Προφίλ συσσώρευσης ισομορφών hTau. Μεμονωμένες μύγες (κεφαλή και θώρακας) που εξέφραζαν wild type ταυ πρωτεΐνη ή τη σχετιζόμενη με την FTDP-17 μετάλλαξη R406W υπό του συστήματος OK307 υποβλήθηκαν σε ανάλυση με western blot με τη χρήση του αντισώματος 5A6. Τα συνολικά επίπεδα της ON3R ισομορφής ήταν κατά πολύ χαμηλότερα από τα επίπεδα των άλλων ισομορφών (test Dunnett $p < 0.001$) [167].

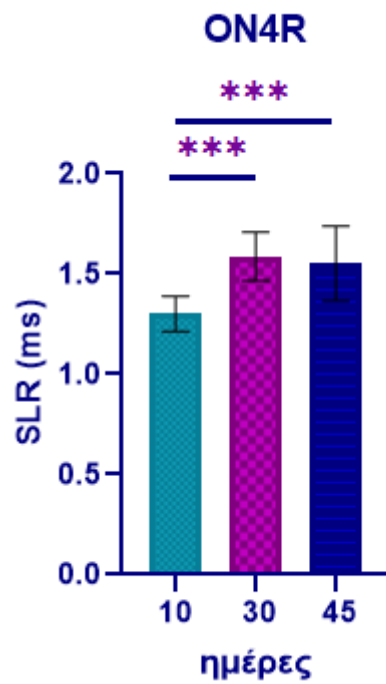
Γονότυπος/ ηλικία	SLR			RP			FF50%		
	M.O	SEM	p value	M.O	SEM	P value	M.O	SEM	P value
OK307/+ 10 ημερών	1.21	0.033763	-	4.12	0,350382	-	261.67	8,779711	-
ON4R/+ 10 ημερών	1,30	0,027991	0.130	4,5	0,372678	0,8437	248,88	9.930313	0,7136
ON3R/+ 10 ημερών	1,31	0,0341	0.090	4,3	0,432177	0,9480	230	8,819171	0,0993
R406W/+ 10 ημερών	1,24	0,026112	0.801	4.44	0,376796	0,9006	226,25	9.910312	0,0735
OK307/+ 30 ημερών	1,35	0,047008	-	4,5	0,356348	-	200	5,634362	-
ON4R/+ 30 ημερών	1,5	0,03804	0.0004	5,8	0,38873	0,14	185,55 5	10,13794	0,6425
ON3R/+ 30 ημερών	1.37	0,032778	0.9358	6	0,494413	0,0761	183	12,29724	0,5081
R406W/+ 30 ημερών	1,38	0,041365	0,8926	5,8	0,580563	0,1383	200	9,636241	>0,999
OK307/+ 45 ημερών	1,34	0,075932	-	4,2	0,243432	-	222,5	12,21094	-
ON4R/+ 45ημερών	1,55	0,058733	0,07	5,5	0,542627	0,0804	203	11,74261	0,5422
ON3R/+ 45ημερών	1,41	0,043728	0,5032	7,3	0,467707	<0.0001	166	13,18248	0,0078
R406W/+ 45 ημερών	1,39	0,034704	0,8023	5,1	0,454742	0.3077	197,77	11,02746	0,3786

Πίνακας 5 : Τιμές των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων σε μύγες μάρτυρες και σε μύγες που εκφράζουν τις ισομορφές της ταυ πρωτεΐνης ηλικίας 10-45 ημερών (σκίαση). Η απόδοση των ετεροζυγωτικών διαγονιδίων συγκρίθηκε με εκείνη των ετεροζυγωτικών μαρτύρων σε κάθε ηλικιακή ομάδα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές είναι με έντονους χαρακτήρες.

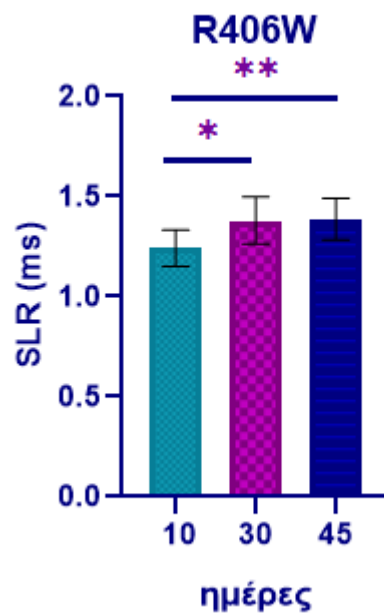
4. Ηλικιο- εξαρτώμενες επιδράσεις των ισομορφών hTau στις ιδιότητες του ΣΓΑ

Εκτός από τις συγκρίσεις των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων που διενεργηθήκαν για κάθε ηλικιακή ομάδα μεταξύ των μαρτύρων και των διαγονιδιακών ζώων, παρατηρήθηκε επίσης μια επιδείνωση της απόδοσης λόγω ηλικίας σε συγκεκριμένους γονότυπους που απουσίαζαν από τους μάρτυρες. Αυτές οι διαφορές ανά παράμετρο ποσοτικοποιήθηκαν ως διαφορά στη μέση απόδοση μεταξύ ζώων του ίδιου γονότυπου 10 ημερών και ηλικίας 30 και 45 ημερών αντίστοιχα (βλ. κάτωθεν διαγράμματα). Ενώ οι μάρτυρες δεν παρουσιάζουν ηλικιο-εξαρτώμενη έκπτωση στη βραχύχρονη απόκριση, ωστόσο τόσο τα ζώα που εξέφραζαν την ON4R ισομορφή όσο και αυτά που έφεραν τη μετάλλαξη R406W παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη βραχύχρονη απόκριση με την πάροδο της ηλικίας, δηλ. στις 30 και 45 ημέρες σε σύγκριση με τις τιμές της συγκεκριμένης παραμέτρου στις 10 ημέρες (Διαγράμματα 26,27). Αντιθέτως, τα ζώα που εξέφραζαν την ON3R ισομορφή δεν παρουσίασαν ηλικιο-εξαρτώμενη μεταβολή της SLR, αλλά εμφάνισαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ανερέθιστη περίοδο RP με την πάροδο της ηλικίας (Διάγραμμα 28, 30). Αντίθετα, οι μάρτυρες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική ηλικιο-εξαρτώμενη διαταραχή του FF50 (Διάγραμμα 32). Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να διεξαχθεί συμπέρασμα ότι αυτός ο αυξημένος ρυθμός αποτυχίας είναι ειδικός για τα πειραματόζωα. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε καμία από τις παραμέτρους σε μύγες 30 ημερών εν συγκρίσει με τις μύγες των 45 ημερών ανεξαρτήτως γονότυπου. Αυτό συμβαδίζει με την σημαντική μείωση των επιπέδων κατά 50% όλων των ισομορφών hTau που εκφράζονταν υπό OK307Gal4 μεταξύ της 30^{ης} και 45^{ης} ημέρας που παρατηρήθηκε (Εικόνα 24) και μπορεί να αντανακλά την ηλικιο-εξαρτώμενη μείωση στην έκφραση του OK307Gal4. Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ζημία που έχει προκληθεί στο ΣΓΑ μέχρι την τριακοστή ημέρα διατηρείται ακόμη και όταν μειώνονται τα επίπεδα hTau. Αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζει ότι η συνολική διαταραχή της λειτουργίας που έχει διενεργηθεί είναι μη αναστρέψιμη, ή εναλλακτικά, ότι η ηλικιο-εξαρτώμενη μεταβολή στις παραμέτρους SLR και RP στα

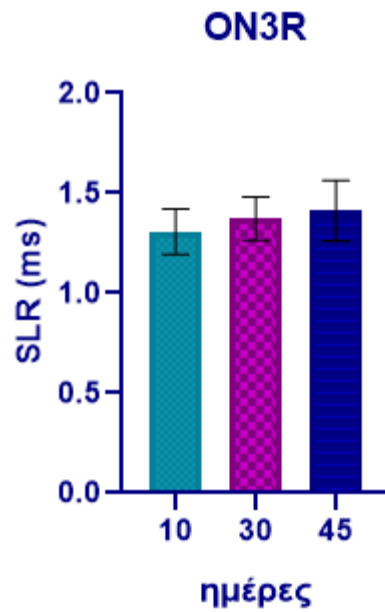
ON4R, R406W και ON3R ζώα δεν εξαρτάται από τα επίπεδα, αλλά από την ίδια την έκφραση της hΤau ισομορφής στο ΣΓΑ.



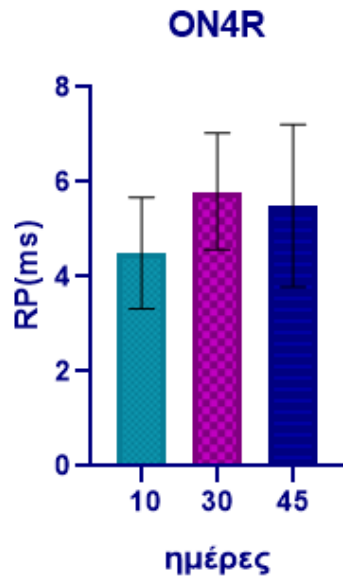
Διάγραμμα 26: Βραχύχρονη απόκριση (SLR) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) στα ζώα με γονότυπο ON4R.Απεικονίζεται η ηλικιοεξαρτώμενη μεταβολή της παραμέτρου.



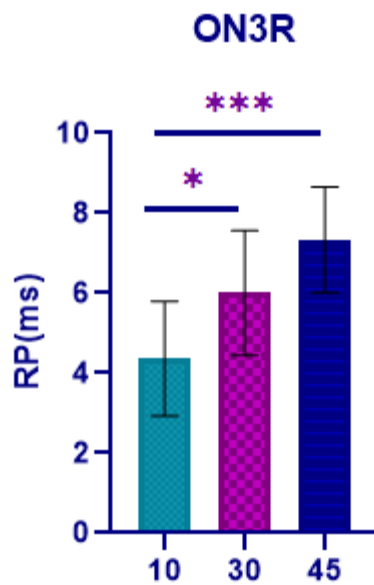
Διάγραμμα 27: Βραχύχρονη απόκριση (SLR) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) στα ζώα με γονότυπο ON4R- R406W.Απεικονίζεται η ηλικιο-εξαρτώμενη μεταβολή της παραμέτρου.



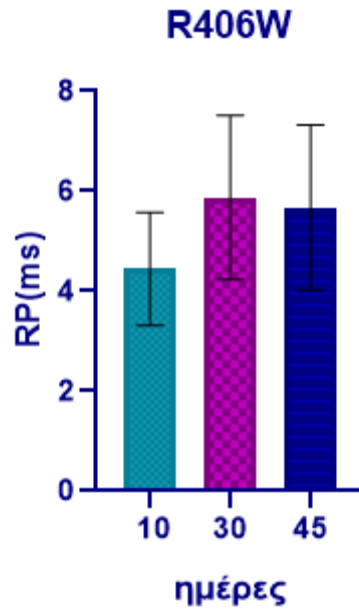
Διάγραμμα 28: Βραχύχρονη απόκριση (SLR) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας-Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) στα ζώα με γονότυπο ON3R.Δεν προκύπτει ηλικιο-εξαρτώμενη μεταβολή της παραμέτρου.



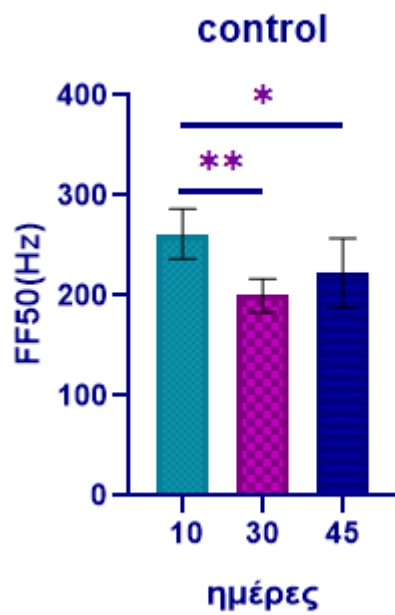
Διάγραμμα 29: Ανερέθιστη περίοδος (RP) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) στο γονότυπο ON4R.



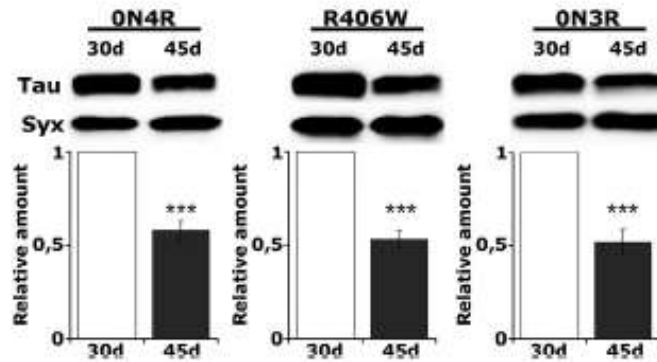
Διάγραμμα 30: Ανερέθιστη περίοδος (RP) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) στο γονότυπο ON3R. Καταδεικνύονται οι ηλικιο-εξαρτώμενες μεταβολές.



Διάγραμμα 31: Ανερέθιστη περίοδος (RP) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) στο γονότυπο R406W.



Διάγραμμα 32: Επαγόμενη συχνότητα 50%, (FF50) του υποκλυκλώματος Γιγαντιαίος Νευρώνας Ραχιαίοι Επιμήκεις Μύες (ΓΝ-PEM) στους μάρτυρες με την πάροδο της ηλικίας.



Εικόνα 24: Ηλικιοεξαρτώμενη μείωση των ισομορφών hTau στο ΣΓΑ. Σημαντική μείωση των επιπέδων παρατηρήθηκε από τις 30 ημέρες στις 45 για όλες τις ισομορφές hTau [167].

Driver	Παράμετρος	Γονότυπος	10 vs 30	10 vs 45	30 vs 45
OK307	SLR	control	ns (0.0849)	ns (0.1022)	ns (0.9869)
OK307	SLR	ON4R	0.0002	0.0011	ns(0.8344)
OK307	SLR	ON3R	ns (0.4697)	ns(0.1353)	ns (0.7284)
OK307	SLR	R406W	0.0172	0.0091	ns(0.9880)
OK307	RP	control	ns (0.6542)	ns(0.9810)	ns0.7383)
OK307	RP	ON4R	ns(0.1124)	ns(0.2621)	ns(0.8810)
OK307	RP	ON3R	0.0395	0.0003	ns(0.1302)
OK307	RP	R406W	ns(0.1060)	ns(0.5704)	ns(0.5019)
OK307	FF50	control	0.0011	0.0341	ns(0.2338)
OK307	FF50	ON4R	0.0015	0.0178	ns(0.5086)
OK307	FF50	ON3R	0.0209	0.0016	ns(0.5602)
OK307	FF50	R406W	ns (0.2149)	ns(0.1522)	ns (0.9875)

Πίνακας 6 : Τιμές των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων σε όλους τους γονοτύπους με την πάροδο της ηλικίας. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές είναι με έντονους χαρακτήρες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γήρανση είναι ένα σύνολο αλλαγών που προκαλούν διαταραχή των φυσιολογικών λειτουργιών και οδηγούν τελικά στο θάνατο. Η διαδικασία της γήρανσης ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ειδών ακόμα και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους.

Στους ανθρώπους η έκπτωση των ανώτερων γνωστικών λειτουργιών με την πάροδο της ηλικίας, η οποία επηρεάζει τη λειτουργικότητα των ατόμων αποτέλεσε και αποτελεί ένα πεδίο έρευνας που προσελκύει το επιστημονικό ενδιαφέρον.

Η πολυπλοκότητα των μηχανισμών που διέπουν αρχικά τις φυσιολογικές ηλικιοεξαρτώμενες μεταβολές και εν συνεχεία των συστημάτων που επηρεάζονται δευτερευόντως μας προέτρεψε να μελετήσουμε έναν οργανισμό με μικρό προσδόκιμο ζωής και γνωστό γενετικό υπόβαθρο όπου όλα τα άτομα είναι γονιδιακά ισοζυγισμένα. Η *Drosophila melanogaster* αποτελεί ένα ισχυρό μοντέλο – σύστημα στην κατανόηση των ηλικιοεξαρτώμενων μεταβολών της συμπεριφοράς που εκφράζονται πρωτίστως μέσω αλλαγών των κινητικών αντιδράσεων. Ενώ πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί επικεντρώνοντας στην αλλαγή συμπεριφοράς της μύγας όπως η αναρρίχηση και η πτήση, η κατανόηση των αλλαγών που συμβαίνουν σε επίπεδο νευρώνων δεν έχει ακόμη πλήρως διαλευκανθεί.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, στην πρώτη σειρά πειραμάτων σκοπός ήταν να εξεταστεί η μεταβολή της κινητικής κατάστασης (αρνητικός γεωτακτισμός) της *Drosophila melanogaster* με την ηλικία. Αρχικά εξετάστηκε η αυθόρμητη θέση που καταλάμβαναν τα έντομα ύστερα από 24ωρη παραμονή μέσα στο φιαλίδιο, πριν την εφαρμογή οποιουδήποτε ερεθίσματος. Διαπιστώθηκε ότι στην αρχή της μελέτης, όντας τα ζώα μικρότερης ηλικίας καταλάμβαναν υψηλότερες θέσεις μέσα στο φιαλίδιο ενώ το ποσοστό αυτό μειωνόταν με την ηλικία φτάνοντας μόλις ένα στα πέντε άτομα να καταλαμβάνουν υψηλή θέση ένα εικοσιτετράωρο προ του θανάτου τους. Παρομοίως πτωτική πορεία ακολούθησε και το ποσοστό των ατόμων που ανταποκρινόταν στο ερέθισμα έναντι αυτού που δεν ανταποκρινόταν. Το ποσοστό των εντόμων που ανταποκρίνονταν στο ερέθισμα ήταν 90% εβδομήντα δυο ώρες πριν το θάνατο τους έναντι του 45% είκοσι τέσσερις ώρες πριν. Μια άλλη

παράμετρος η οποία μελετήθηκε ήταν το ποσοστό των εντόμων τα οποία με την πάροδο της ηλικίας αντιδρούσαν μεν στο ερέθισμα με έναρξη αναρρίχησης αλλά πολύ σύντομα έχαναν το ενδιαφέρον τους και άρχιζαν να εξερευνούν τον περιβάλλοντα χώρο, τα «αδιάφορα» έντομα όπως ονομάστηκαν. Παρατηρήθηκε και σε αυτήν την παράμετρο μια αύξηση του ποσοστού των αδιάφορων ατόμων με την πάροδο της ηλικίας υποδηλώνοντας όπως όλα τα ανωτέρω αποτελέσματα έκπτωση της λειτουργικότητας άλλοτε άλλης αιτιολογίας.

Το συμπέρασμα ότι το κινητικό σύστημα παραμένει εξαιρετικά λειτουργικό μέχρι σχεδόν το τέλος της ζωής των W^{1118} επιβεβαιώνει τα ευρήματα των Oregon-R στελεχών (Gaitanidis et al., 2019 in press) και πλέον κατέχει θέση γενικευμένης θεωρίας για τη *Drosophila melanogaster*. Το μοντέλο-σύστημα της *Drosophila* παρέχει την δυνατότητα να αναλύσουμε ηλικιο-εξαρτώμενες φυσιολογικές λειτουργίες οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την κατανόηση και διασαφήνιση των κινητικών αλλαγών σε ανθρώπους και θηλαστικά. Η σύμπτωση επίσης των προθανάτιων κινητικών και συμπεριφορικών χαρακτηριστικών μεταξύ των δύο γενετικών σειρών επιτρέπει τη γενίκευση αυτής της συμπτωματολογίας για τη *Drosophila melanogaster* και πλέον μπορεί να τεθεί προς εξέταση σε άλλα είδη. Αυτά τα χαρακτηριστικά υπόκεινται συγκεκριμένων γονιδιακών και μορφολειτουργικών αλλαγών που εξηγούν τη ραγδαία κατάρρευση του οργανισμού. Η κατανόηση αυτών των αλλαγών, το μοτίβο ιεραρχικής κατάρρευσης δομών, συστημάτων και λειτουργιών είναι προφανές ότι αποτελεί ένα σημαντικό ερευνητικό στόχο.

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων, περιελάμβανε ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από το σύστημα γιγαντιαίων αξόνων, ΣΓΑ, στα πλαίσια διερεύνησης των αλλαγών που μπορεί να επισυμβαίνουν σε επίπεδο νευρώνων όπως προαναφέρθηκε. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι σχεδόν από το 75% των ατόμων εβδομήντα πέντε ημερών δεν πάρθηκαν καταγραφές έναντι των ατόμων έξι ημερών που δεν σημειώθηκε καμία αποτυχία. Τα ανωτέρω αποτελέσματα συνάδουν με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, ότι υπάρχει έκπτωση ή ακόμη και παρακώλυση σε επίπεδο νευρώνων στην κινητική συμπεριφορά των εντόμων, όπως έχει περιγραφεί όχι μόνο στη συγκεκριμένη εργασία αλλά και σε άλλες μελέτες [170]. Λαμβάνοντας

τα ανωτέρω υπόψη, ήτοι την ηλικιο –εξαρτώμενη έκπτωση στην κινητική συμπεριφορά (αρνητικός γεωτακτισμός) και τα αποτελέσματα των ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών στο καλά καθορισμένο νευρωνικό κύκλωμα των γιγαντιαίων αξόνων στη *Drosophila melanogaster*, η αδιαμφισβήτητη άποψη που μπορεί να διατυπωθεί είναι ότι αποκαλύπτονται δυνητικοί στόχοι περαιτέρω έρευνας στο ΣΓΑ. Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να ερευνηθούν οι γενετικοί μηχανισμοί που επηρεάζουν τον αρνητικό γεωτακτισμό και το ΣΓΑ κατά τη γήρανση και να διερευνηθεί εάν αυτοί οι μηχανισμοί παίζουν κάποιο ρόλο στην κινητική – συμπεριφορική γήρανση σε άλλα είδη.

Είναι πλέον γνωστό, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή ότι η συσσώρευση υπερ-φωσφορυλιωμένων ισομορφών της ταυ πρωτεΐνης χαρακτηρίζει τις σποραδικές ταυ-πάθειες όπως τη NA, την ασθένεια του Pick, την PSP και τη CBD στους ανθρώπους όπου αλλάζει ο λόγος των ισομορφών και είναι ακόμη άγνωστο αν αυτή η αλλαγή στην ισομορφή 4R ή 3R είναι παθογόνος . Παρόλο που ορισμένες λειτουργικές διαφορές έχουν αρχίσει να διαφαίνονται, εξακολουθεί να είναι σε μεγάλο βαθμό ασαφές εάν οι φυσιολογικές ή οι μεταλλαγμένες ισομορφές της ταυ πρωτεΐνης ασκούν διαφορετικές επιδράσεις στη συναπτική φυσιολογία των νευρώνων του ΚΝΣ.

Επομένως, δεν είναι σαφές εάν η έκφραση μιας ισομορφής θα έχει ισοδύναμα αποτελέσματα με την έκφραση της άλλης ισομορφής σε ζωικά μοντέλα ταυ-παθειών. Ωστόσο, θα ήταν λογικό να υπάρχουν πιθανές διαφορές μεταξύ των ισομορφών που εκφράζονται σε διαγονιδιακά συστήματα όταν κάθε μία από αυτές μελετάται μεμονωμένα. Ορμώμενοι από τις ανωτέρω γκρίζες ζώνες οδηγηθήκαμε στη μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων του ΣΓΑ στη *Drosophila melanogaster* που εξέφραζαν την ON4R, την ON3R και τη μεταλλαγμένη R496W ισομορφή της ταυ πρωτεΐνης [167].

Εκτός από τη μελέτη της νευρομυϊκής σύναψης στην προνύμφη [171] η επίδραση της ταυ πρωτεΐνης στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των νευρώνων του ΣΓΑ είχε μελετηθεί ελάχιστα. Παρόλο που η συσσώρευση αμφότερων των ON3R και ON4R ανθρωπίνων ισομορφών προκαλεί λειτουργικά ελλείμματα, ωστόσο η επίδραση

τους στις ιδιότητες των νευρώνων του ΣΓΑ ήταν διαφορετική. Η συσσώρευση της ON3R ισομορφής προκάλεσε αύξηση των αποτυχιών σε υψηλής συχνότητας διέγερση, ενώ η ON4R ισομορφή επηρέασε την αγωγιμότητα και την ταχύτητα απόκρισης. Τα ανωτέρω ευρήματα είναι σύμφωνα με προηγηθείσα βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία παρόλο που και οι δύο ισομορφές διαταράσσουν την αξονική μεταφορά στους κινητικούς νευρώνες των προνυμφών, η διαταραχή αυτή είναι πιο έντονη για τα ζώα στα οποία εκφραζόταν η ON3R ισομορφή [172]. Σε αυτήν την παρατήρηση μπορεί να οφείλεται η αύξηση των αποτυχιών που παρατηρούνται σε υψηλής συχνότητας διέγερση, που αντιπροσωπεύεται από την αύξηση της ανερέθιστης περιόδου και τη μείωση της επαγόμενης συχνότητας FF50. Αυτά τα αποτελέσματα ενθαρρύνουν τη συστηματική διερεύνηση των επιδράσεων του συνόλου των ανθρώπινων ισομορφών της πρωτεΐνης ταυ σε αυτές τις λειτουργικές παραμέτρους του ΣΓΑ με την πάροδο της ηλικίας.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η συσσώρευση της μεταλλαγμένης μορφής της ON4R, R406W, που σχετίζεται με την FTDP-17 [89, 173] δεν προκάλεσε τις ίδιες επιδράσεις με τη συγγενική της μορφή (διάγραμμα 16). Επειδή η R406W είναι ακριβώς τόσο τοξική όσο και η ON4R ισομορφή [106, 174, 175] αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη εξομαλύνει τις επιδράσεις της ON4R συσσώρευσης στη λειτουργική φυσιολογία του ΣΓΑ. Αυτό είναι σύμφωνο με τις ήπιες αλλά σημαντικές ηλικιο-εξαρτώμενες μεταβολές του SLR που παρατηρήθηκαν τόσο στη μεταλλαγμένη R406W ισομορφή όσο και στην ON4R ισομορφή, υποδεικνύοντας ότι η wild type και η μεταλλαγμένη R406W ισομορφή στην πραγματικότητα επηρεάζουν τις ίδιες λειτουργικές παραμέτρους του ΣΓΑ. Η ανωτέρω παρατήρηση σε συνδυασμό με τα διαφορετικά αποτελέσματα των δύο wild type ισομορφών υποδεικνύουν ότι οι λειτουργικές επιδράσεις στις ιδιότητες του ΣΓΑ δεν είναι απλά συνέπεια της εξωγενούς συσσώρευσης hTau. Ως εκ τούτου, οι διαφορετικές επιδράσεις της ON3R και ON4R στη λειτουργικότητα του ΣΓΑ υποδηλώνουν ότι πιθανόν να εμπλέκονται με διαφορετικό τρόπο στους μηχανισμούς που απαιτούνται για τη μετάδοση του σήματος και την συναπτική πιστότητα, μια πιθανή αντανάκλαση των λειτουργικών διαφορών τους εγκέφαλο των ανθρώπων, υποδεικνύοντας πιθανή εμπλοκή των ισομορφών της hTau στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών ή στους μηχανισμούς

εξωκυττάρρρωσης με τη μεσολάβηση ασβεστίου. Παρομοίως, η συσσώρευση διαλυτής μορφής ταυ ισομορφής στο ενδορινικό φλοιό διαγονιδιακών ποντικών rTgTauEC, προκάλεσε σημαντικά προσυναπτικά ελλείμματα [176].

Οι συνέπειες της συσσώρευσης της hTau στο ΣΓΑ προσομοιάζουν την ηλικιακή – εξαρτώμενη συναπτική δυσλειτουργία στις ταυ-πάθειες που παρατηρούνται στους ανθρώπους και τα μοντέλα ποντικών [177]. Σαφής καθυστέρηση και διαταραχή στη συναπτική αξιοπιστία εμφανίζεται με τρόπο εξαρτώμενο από την ηλικία και δεδομένου ότι το κύκλωμα μεσολαβεί στις αντιδράσεις διαφυγής στη μύγα [145], μπορεί να εκφράζεται μέσω της διαταραχής στην αναρρίχηση και την κινητικότητα σε ηλικιωμένες μύγες που εκφράζουν τις hTau ισομορφές σε όλους τους νευρώνες [172].

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι καταγραφές που διενεργήθηκαν από Kadas D. και συνεργάτες [167] από τον AM σε ζώα που εξέφραζαν και τις τρεις ανωτέρω ισομορφές της ταυ πρωτεΐνης, ON4R, ON3R και R406W δεν αποκάλυψαν καμία επίδραση σε καμία από τις υπό μελέτη ηλεκτροφυσιολογικές παραμέτρους σε καμία ηλικιακή ομάδα. Ως εκ τούτου, διεξάγεται το συμπέρασμα ότι οι ισομορφές της hTau δεν διαταράσσουν την ομοιόσταση και τη φυσιολογική λειτουργία της σύνδεσης του ΓΝ με τον νευρώνα του AM (AMn) ούτε του AMn με τον AM. Δεδομένου ότι αυτό το κύκλωμα δεν περιλαμβάνει τον PEN, για την περαιτέρω μελέτη των επιδράσεων των ισομορφών της ταυ πρωτεΐνης στο υποκύκλωμα ΓΝ-PEM5 που παρατηρήθηκαν, όπως περιγράφηκαν ανωτέρω, μελετήθηκε η επίδραση των τριών ισομορφών όταν εκφράζεται μεμονωμένα υπό c380 Gal4 στο ΓΝ και τον PEMn αντιστοίχως. Η έκφραση των ισομορφών της ταυ πρωτεΐνης είτε στον ΓΝ είτε στον PEMn5 δεν ανέδειξε καμία επίδραση στο SLR, την RP ή το FF50 σε καμία διαγονιδιακή ομάδα ανεξαρτήτως ηλικίας. Εύλογα διεξάγεται το συμπέρασμα εν τέλει, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς και την περαιτέρω μελέτη των Kadas D και συνεργατών [167], ότι οι διαταραχές που παρατηρήθηκαν στη βραχύχρονη απόκριση στα ζώα που εξέφραζαν τη ON4R ισομορφή καθώς και αυτές που παρατηρήθηκαν στην ανερέθιστη περίοδο και την επαγόμενη συχνότητα 50% σε αυτά που εξέφραζαν την ON3R ισομορφή οφείλονται σε διαταραχή της σύναψης PEN – PEMn5 γιατί η έκφραση μεμονωμένα στον PEMn5

δεν επηρέασε καμία παράμετρο. Είναι σημαντικό ότι η προσυναπτική λειτουργία μια χολινεργική σύναψης επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο υπό τη συσσώρευση της ON4R ή της ON3R λόγω του ότι υποδηλώνει αλλαγή στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών πιθανόν μέσω ασβεστο-εξαρτώμενων μηχανισμών εξωκύτωσης σε αυτές τις ισομορφές άγριου τύπου και όχι στην μεταλλαγμένη R406W ισομορφή.

Τέλος, παρά τις διαφορετικές συνέπειες στις ηλεκτροφυσιολογικές παραμέτρους που έχει η έκφραση των διαφορετικών ισομορφών της ταυ πρωτεΐνης, είναι ενδιαφέρον ότι τόσο η ON4R όσο και η ON3R ισομορφή επηρεάζουν την ίδια χολινεργική σύναψη μεταξύ του ΠΕΝ και του ΡΕΜν5, προκαλώντας χολινεργική δυσλειτουργία όμοια με τη θεωρία που έχει προταθεί ως υποκείμενος παθοφυσιολογικός μηχανισμός για τη νόσο Alzheimer και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες [178-180]. Αυτό υποδηλώνει ότι, γενικά, οι χολινεργικές συνάψεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στα επίπεδα της ταυ πρωτεΐνης ή στις παθολογικές μορφές αυτής γεγονός στο οποίο στηρίζεται η χρήση αναστολέων χολινεστεράσης ως βελτιωτικών για τη νόσο Alzheimer.

Εν κατακλείδι, ίσως τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας αποτελέσουν το έναυσμα για μελλοντική έρευνα, που θα συνδράμει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών της ευαισθησίας των χολινεργικών συνάψεων που διέπουν γενικότερα τον νευροεκφυλισμό και πιο συγκεκριμένα τις ταυ-πάθειες και ενδεχομένως βοηθήσουν περαιτέρω στη δημιουργία θεραπευτικών παρεμβάσεων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γήρανση χαρακτηρίζεται από προοδευτική συσσώρευση αλλαγών που είναι υπεύθυνες ή εμπλέκονται κατά το μάλλον ή ήττον στην αυξημένη ευαισθησία έναντι ασθενειών. Ο εγκέφαλος φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη διαδικασία της γήρανσης αφού η εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της νόσου Alzheimer, αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας.

Οι μελέτες που αφορούν τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στη γήρανση του ανθρώπου είναι πολυπληθείς. Το γεγονός ότι ομόλογα γονίδια συντηρούνται εξελικτικά μεταξύ σπονδυλωτών και ασπόνδυλων έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σε έρευνες που χρησιμοποιούσαν ως μοντέλα συστήματα πιο απλούς οργανισμούς όπως είναι η *Drosophila Melanogaster* και το *C. Elegans* για τη μελέτη της γενετικής και μοριακής βάσης της γήρανσης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο σύστημα η *Drosophila Melanogaster* για τη μελέτη της επίδρασης της γήρανσης στην κινητική λειτουργία και συμπεριφορά του οργανισμού. Στον πρώτο κύκλο πειραμάτων, μελετήθηκε η συμπεριφορά διαφυγής, ο αρνητικός γεωτακτισμός ως αντίδραση σε μηχανικό ερέθισμα όπου διαπιστώθηκε ότι τα γηρασμένα άτομα χωρίς κάποιο ερέθισμα βρίσκονται αυθορμήτως στα κατώτερα σημεία του φιαλιδίου, δεν αντιδρούν στα ερεθίσματα ή χάνουν πολύ γρήγορα το ενδιαφέρον τους. Εν αντιθέσει με τα επαυξημένα επίπεδα αδιαφορίας (ελαττωμένη διάρκεια αναρρίχησης) μετά από ερέθισμα που παρουσίαζαν τα άτομα, η κινητική κατάσταση τους παρέμενε σε υψηλά λειτουργικά επίπεδα για το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους. Τα προθανάτια «φυσιολογικά» χαρακτηριστικά που περιέγραψε η μελέτη υπόκεινται σε συγκεκριμένες γονιδιακές και μορφολειτουργικές αλλαγές που εξηγούν τη ραγδαία κατάρρευση του οργανισμού. Η κατανόηση αυτών των αλλαγών, το μοτίβο ιεραρχικής κατάρρευσης δομών, συστημάτων και λειτουργιών είναι προφανές ότι αποτελεί ένα σημαντικό ερευνητικό στόχο.

Ως δείκτης των ηλικιο-εξαρτώμενων κινητικών αλλαγών στο νευρομυϊκό σύστημα (κεντρικές και νευρομυϊκές συνάψεις, ταχύτητα αγωγής κλπ) μελετήθηκε ηλεκτροφυσιολογικά το Σύστημα Γιγαντιαίων Αξόνων, το οποίο είναι υπεύθυνο για

τη συμπεριφορά διαφυγής. Αυτό το οποίο διαπιστώθηκε ήταν ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό των γηρασμένων εντόμων δεν ήταν εφικτό να παρθεί καταγραφή έναντι του συνόλου των νεαρών εντόμων που δεν διαπιστώθηκαν αποτυχίες. Κατόπιν τούτων και συνεκτιμώντας το γεγονός ότι κατά τη γήρανση της *Drosophila melanogaster* υπάρχει έκπτωση της λειτουργίας του ΣΓΑ, διεξάγεται το συμπέρασμα ότι η έκπτωση της λειτουργίας δεν είναι συνεχώς επιδεινούμενη αλλά το σύστημα υπόκεινται σε μια παρακώλυση της διάδοσης του σήματος.

Εν συνεχεία μελετήσαμε την επίδραση που έχει η συσσώρευση των φυσιολογικών ανθρώπινων ισομορφών ON4R και ON3R καθώς και της μεταλλαγμένης R406W ισομορφής της ταυ πρωτεΐνης στο ΣΓΑ ενήλικων ατόμων *Drosophila melanogaster*. Η ανώμαλη συσσώρευση της ταυ πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των νευροϊνιδιακών βλαβών στη νόσο Alzheimer καθώς επίσης αποτελεί το υπόστρωμα και για άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους που είναι γνωστές ως ταυ-πάθειες.

Παρόλο που ορισμένες λειτουργικές διαφορές έχουν αρχίσει να διαφαίνονται, εξακολουθεί να είναι σε μεγάλο βαθμό ασαφές εάν οι φυσιολογικές και οι μεταλλαγμένες ισομορφές της ταυ πρωτεΐνης επάγουν διαφορικές επιδράσεις στη συναπτική φυσιολογία των νευρώνων του ΚΝΣ. Από τα ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα αποκαλύφθηκε ότι οι ισομορφές ON3R και ON4R επηρεάζουν ξεχωριστές συναπτικές παραμέτρους. Ενώ η ισομορφή ON3R αύξησε το ρυθμό αποτυχίας κατά την υψηλής συχνότητας διέγερση, η ισομορφή ON4R επηρέασε την αγωγή του σήματος και την ταχύτητα απόκρισης σε μια συγκεκριμένη χολινεργική σύναψη με ηλικίο- εξαρτώμενο τρόπο. Αντιθέτως, η συσσώρευση της μεταλλαγμένης R406W ισομορφής προκάλεσε ήπια ηλικίο- εξαρτώμενη διαταραχή στην ταχύτητα αγωγής του ερεθίσματος. Επειδή η ON4R και η μεταλλαγμένη ισομορφή της εκφράζονται ισοδύναμα, αυτό καταδεικνύει ότι οι παρατηρούμενες διαταραχές δεν είναι απλώς επακόλουθα της εξωγενούς συσσώρευσης ανθρώπινης ταυ πρωτεΐνης και υποδηλώνουν διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες των ON3R και ON4R ισομορφών στις χολινεργικές συνάψεις.

Τα προαναφερθέντα θέτουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα στο ΣΓΑ και άλλων ισομορφών της ταυ πρωτεΐνης που θα συνδράμουν στην αποσαφήνιση των

μηχανισμών της ευαισθησίας των χολινεργικών συνάψεων που διέπουν γενικότερα τον νευροεκφυλισμό και πιο συγκεκριμένα τις ταυ-πάθειες και ενδεχομένως βοηθήσουν περαιτέρω στη δημιουργία θεραπευτικών παρεμβάσεων.

SUMMARY

Aging is characterized by progressive accumulation of changes that are responsible for or involved in an increased susceptibility to diseases. Brain appears to be particularly sensitive to the aging process, since the incidence of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease increases with aging.

Studies concerning the mechanisms contributing to aging are numerous. The fact that homologous genes are being maintained evolutionarily between vertebrates and invertebrates has turned the interest of the scientific community into researches that use simpler model system organisms such as *Drosophila Melanogaster* and *C. Elegans* in order to study the genetic and molecular basis of aging.

Drosophila Melanogaster was used as a model system to study the effect of aging on motor function and behavior. In the first round of experiments, the negative geotaxis, an escape behavior was studied, as a response to a mechanical stimulus where aging individuals without a stimulus were found spontaneously in the lower points of the vial and did not respond to the stimuli or they lost their interest very quickly. In contrast to the increased levels of indifference (reduced climbing tendency and duration) following a stimulus, their kinetic status remained at high operating levels for most of their lives. The premonitions "Normal" characteristics described by the study, subject to specific genetic and structural-functional changes that explain the rapid collapse of the organism. Understanding these changes, the pattern of hierarchical collapse of structures, systems and functions, is obviously an important research goal.

As an indicator of age-dependent motor changes, the Giant Fiber System, the neural circuit responsible for the escape behavior was studied electrophysiologically. It was found that for the majority of aged individuals it was not feasible to record the GFS output in response to electrical stimulation. In contrast all young insects exhibited robust responses. Following these and taking into account that in the aged *Drosophila melanogaster* there is a functional decay in GFS, it is concluded that signal transmission failure in aged flies is not a progressive event but the neural circuit is subject to an abrupt signal propagation blockade.

Subsequently, we studied the effect of the accumulation of normal human isoforms ON4R and ON3R as well as the mutant R406W isoform of tau protein in the adult *Drosophila melanogaster* CNS. The abnormal accumulation of tau protein is responsible for the formation of neurofibrillary lesions in Alzheimer's disease as well as forms the substrate for other neurodegenerative diseases known as tauopathies.

Although some functional differences have begun to emerge, it is still largely unclear whether the normal and mutated tau protein isoforms induce differential effects on the synaptic physiology of CNS neurons. From the electrophysiological experiments it was revealed that the ON3R and ON4R isoforms affect distinct synaptic parameters. Whereas ON3R increased failure rate upon high frequency stimulation, ON4R compromised stimulus conduction and response speed at a specific cholinergic synapse in an age-dependent manner. In contrast, accumulation of the R406W mutant of ON4R induced mild, age-dependent conduction velocity defects. Because ON4R and its mutant isoform are expressed equally, it demonstrates that the observed disorders are not merely a consequence of the exogenous accumulation of human tau protein and suggest different functional properties of the ON3R and ON4R isoforms in cholinergic synapses.

The above set the basis for further research investigating at the role of different isoforms of tau protein in the GFS and that will help to clarify the mechanisms of vulnerability of cholinergic synapses which generally regulate neurodegeneration and, in particular, tauopathies and lead to development of therapeutic interventions.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rattan SI, *Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals*. Free radical research, 2006. **40**(12): p. 1230-1238.
2. Santos AL, Sinha S, and Lindner AB, *The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New Insights on Aging and Aging-Related Diseases from Eukaryotic and Prokaryotic Model Organisms*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2018. **2018**.
3. Johnson FB, Sinclair DA, and Guarente L, *Molecular biology of aging*. Cell, 1999. **96**(2): p. 291-302.
4. Kubben N and Misteli T, *Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(10): p. 595-609.
5. Rizvi S, Raza ST, and Mahdi F, *Telomere length variations in aging and age-related diseases*. Curr Aging Sci, 2014. **7**(3): p. 161-167.
6. Epel ES, Merkin SS, Cawthon R, Blackburn EH et al., *The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(1): p. 81.
7. O'Donovan A, Lin J, Dhabhar F, Wolkowitz O et al., *Pessimism correlates with leukocyte telomere shortness and elevated interleukin-6 in post-menopausal women*. Brain, behavior, and immunity, 2009. **23**(4): p. 446-449.
8. Lou Z, Wei J, Riethman H, Baur JA et al., *Telomere length regulates ISG15 expression in human cells*. Aging, 2009. **1**(7): p. 608.
9. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK et al., *MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8*. Aging, 2009. **1**(4): p. 402.
10. Martínez P, Thanasoula M, Muñoz P, Liao C et al., *Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice*. Genes & development, 2009.
11. Nakamura AJ, Redon CE, Bonner WM, and Sedelnikova OA, *Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells*. Aging, 2009. **1**(2): p. 212.
12. Henrique Mazucanti C, Victor Cabral-Costa J, Rodrigues Vasconcelos A, Zukas Andreotti D, Scavone C, and Mitiko Kawamoto E, *Longevity pathways (mTOR, SIRT, Insulin/IGF-1) as key modulatory targets on aging and neurodegeneration*. Current topics in medicinal chemistry, 2015. **15**(21): p. 2116-2138.
13. Perluigi M, Di Domenico F, and Butterfield DA, *mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy*. Neurobiology of disease, 2015. **84**: p. 39-49.
14. Liu B, Ghosh S, Yang X, Zheng H et al., *Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria*. Cell metabolism, 2012. **16**(6): p. 738-750.
15. Mazucanti CH, Cabral-Costa JV, Vasconcelos AR, Andreotti DZ, Scavone C, and Kawamoto EM, *Longevity Pathways (mTOR, SIRT, Insulin/IGF-1) as Key Modulatory Targets on Aging and Neurodegeneration*. Curr Top Med Chem, 2015. **15**(21): p. 2116-2138.
16. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, and Kroemer G, *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-1217.

17. Ames BN, Shigenaga MK, and Hagen TM, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(17): p. 7915-7922.
18. Ozawa T, *Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging*. Physiological reviews, 1997. **77**(2): p. 425-464.
19. Brown GC, *Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells*. Biochemical Journal, 1992. **284**(1): p. 1-13.
20. Waterlow J, *Protein turnover with special reference to man*. Quarterly Journal of Experimental Physiology, 1984. **69**(3): p. 409-438.
21. Lee H-C and Wei Y-H, *Mitochondrial role in life and death of the cell*. Journal of biomedical science, 2000. **7**(1): p. 2-15.
22. Shigenaga MK, Hagen TM, and Ames BN, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10771-10778.
23. Wei Y-h, *Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1998. **217**(1): p. 53-63.
24. Kroemer G, Dallaporta B, and Resche-Rigon M, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 619-642.
25. Perez VI, Van Remmen H, Bokov A, Epstein CJ, Vijg J, and Richardson A, *The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice*. Aging Cell, 2009. **8**(1): p. 73-75.
26. Van Raamsdonk JM and Hekimi S, *Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. PLoS genetics, 2009. **5**(2): p. e1000361.
27. Edman U, Garcia AM, Busuttill RA, Sorensen D et al., *Lifespan extension by dietary restriction is not linked to protection against somatic DNA damage in Drosophila melanogaster*. Aging Cell, 2009. **8**(3): p. 331-338.
28. Guachalla LM, Ju Z, Koziel R, von Figura G et al., *Sod2 haploinsufficiency does not accelerate aging of telomere dysfunctional mice*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(3): p. 303-315.
29. Tanaka K and Matsuda N, *Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2014. **1843**(1): p. 197-204.
30. Di Domenico F, Tramutola A, and Perluigi M, *Cathepsin D as a therapeutic target in Alzheimer's disease*. 2016, Taylor & Francis.
31. Caccamo A, De Pinto V, Messina A, Branca C, and Oddo S, *Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature*. Journal of Neuroscience, 2014. **34**(23): p. 7988-7998.
32. Xilouri M, Brekk OR, Polissidis A, Chrysanthou-Piterou M, Kloukina I, and Stefanis L, *Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats*. Autophagy, 2016. **12**(11): p. 2230-2247.
33. Toescu EC and Verkhatsky A, *Parameters of calcium homeostasis in normal neuronal ageing*. The Journal of Anatomy, 2000. **197**(4): p. 563-569.
34. Xiong J, Verkhatsky A, and Toescu EC, *Changes in mitochondrial status associated with altered Ca²⁺ homeostasis in aged cerebellar granule neurons in brain slices*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(24): p. 10761-10771.
35. Jiang CH, Tsien JZ, Schultz PG, and Hu Y, *The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(4): p. 1930-1934.

36. Toescu E and Xiong J, *Metabolic substrates of neuronal aging*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1019**(1): p. 19-23.
37. Ocorr K, Reeves NL, Wessells RJ, Fink M et al., *KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in Drosophila that mimic the effects of aging*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(10): p. 3943-3948.
38. Ocorr K, Vogler G, and Bodmer R, *Methods to assess Drosophila heart development, function and aging*. Methods, 2014. **68**(1): p. 265-272.
39. Piazza N and Wessells R, *Drosophila models of cardiac disease*, in *Progress in molecular biology and translational science*. 2011, Elsevier. p. 155-210.
40. Yoon IY, Kripke DF, Elliott JA, Youngstedt SD, Rex KM, and Hauger RL, *Age-related changes of circadian rhythms and sleep-wake cycles*. Journal of the American Geriatrics Society, 2003. **51**(8): p. 1085-1091.
41. Hood B, Bruck D, and Kennedy G, *Determinants of sleep quality in the healthy aged: the role of physical, psychological, circadian and naturalistic light variables*. Age and Ageing, 2004. **33**(2): p. 159-165.
42. Driver C, *The circadian clock in old Drosophila melanogaster*. Biogerontology, 2000. **1**(2): p. 157-162.
43. Iliadi KG and Boulianne GL, *Age-related behavioral changes in Drosophila*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1197**: p. 9-18.
44. Ratliff EP, Mauntz RE, Kotzebue RW, Gonzalez A et al., *Aging and Autophagic Function Influences the Progressive Decline of Adult Drosophila Behaviors*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132768.
45. Rizki T, *circulatory system and associated cells and tissues*. Genetics and biology of Drosophila, 1978.
46. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincen GM, Green ED, and Keating MT, *A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome*. Cell, 1995. **80**(5): p. 795-803.
47. Warmke JW and Ganetzky B, *A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(8): p. 3438-3442.
48. Cavaliere S and Hodge JJ, *Drosophila KCNQ channel displays evolutionarily conserved electrophysiology and pharmacology with mammalian KCNQ channels*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23898.
49. Perrin L and Roder L, *[Cardiac pathologies and aging: lessons from a tiny heart]*. Med Sci (Paris), 2016. **32**(5): p. 470-477.
50. Blice-Baum AC, Guida MC, Hartley PS, Adams PD, Bodmer R, and Cammarato A, *As time flies by: Investigating cardiac aging in the short-lived Drosophila model*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018.
51. Paternostro G, Vignola C, Bartsch D-U, Omens JH, McCulloch AD, and Reed JC, *Age-associated cardiac dysfunction in Drosophila melanogaster*. Circulation research, 2001. **88**(10): p. 1053-1058.
52. Mander BA, Winer JR, and Walker MP, *Sleep and Human Aging*. Neuron, 2017. **94**(1): p. 19-36.
53. Zdanys KF and Steffens DC, *Sleep Disturbances in the Elderly*. Psychiatr Clin North Am, 2015. **38**(4): p. 723-741.
54. Wang GK and Sehgal A, *Signaling components that drive circadian rhythms*. Current opinion in neurobiology, 2002. **12**(3): p. 331-338.
55. Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR et al., *Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 640.

56. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ et al., *An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome*. *Science*, 2001. **291**(5506): p. 1040-1043.
57. Long DM and Giebultowicz JM, *Age-Related Changes in the Expression of the Circadian Clock Protein PERIOD in Drosophila Glial Cells*. *Front Physiol*, 2017. **8**: p. 1131.
58. Helfand SL and Rogina B, *Genetics of aging in the fruit fly, Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet*, 2003. **37**: p. 329-348.
59. Martinez VG, Javadi CS, Ngo E, Ngo L, Lagow RD, and Zhang B, *Age-related changes in climbing behavior and neural circuit physiology in Drosophila*. *Dev Neurobiol*, 2007. **67**(6): p. 778-791.
60. Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P, and Cook-Wiens E, *Functional senescence in Drosophila melanogaster*. *Ageing Res Rev*, 2005. **4**(3): p. 372-397.
61. DeZazzo J and Tully T, *Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics*. *Trends in neurosciences*, 1995. **18**(5): p. 212-218.
62. Dubnau J and Tully T, *Gene discovery in Drosophila: new insights for learning and memory*. *Annu Rev Neurosci*, 1998. **21**: p. 407-444.
63. Davis RL, *Olfactory learning*. *Neuron*, 2004. **44**(1): p. 31-48.
64. Tully T, Preat T, Boynton SC, and Del Vecchio M, *Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila*. *Cell*, 1994. **79**(1): p. 35-47.
65. Tamura T, Chiang A-S, Ito N, Liu H-P et al., *Aging specifically impairs amnesiac-dependent memory in Drosophila*. *Neuron*, 2003. **40**(5): p. 1003-1011.
66. Isabel G, Pascual A, and Preat T, *Exclusive consolidated memory phases in Drosophila*. *Science*, 2004. **304**(5673): p. 1024-1027.
67. Lu T, Pan Y, Kao S-Y, Li C et al., *Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain*. *Nature*, 2004. **429**(6994): p. 883.
68. Mery F, *Aging and its differential effects on consolidated memory forms in Drosophila*. *Experimental gerontology*, 2007. **42**(1-2): p. 99-101.
69. Xia S, Miyashita T, Fu T-F, Lin W-Y et al., *NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in Drosophila*. *Current Biology*, 2005. **15**(7): p. 603-615.
70. Levine JD and Hughes M, *Stereotaxic map of the muscle fibers in the indirect flight muscles of Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*, 1973. **140**(2): p. 153-158.
71. Murali G and Panneerselvam C, *Age-associated oxidative macromolecular damages in rat brain regions: role of glutathione monoester*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2007. **62**(8): p. 824-830.
72. Nicolle M, Gonzalez J, Sugaya K, Baskerville K et al., *Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents*. *Neuroscience*, 2001. **107**(3): p. 415-431.
73. Landis GN, Abdueva D, Skvortsov D, Yang J et al., *Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(20): p. 7663-7668.
74. Hirano Y, Kuriyama Y, Miyashita T, Horiuchi J, and Saitoe M, *Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in Drosophila*. *Genes, Brain and Behavior*, 2012. **11**(1): p. 79-86.
75. Josefsson M, de Luna X, Pudas S, Nilsson LG, and Nyberg L, *Genetic and lifestyle predictors of 15-year longitudinal change in episodic memory*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2012. **60**(12): p. 2308-2312.
76. Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, and Walhovd KB, *What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus*. *Prog Neurobiol*, 2014. **117**: p. 20-40.

77. Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK et al., *One-year brain atrophy evident in healthy aging*. J Neurosci, 2009. **29**(48): p. 15223-15231.
78. Fjell AM, Westlye LT, Grydeland H, Amlien I et al., *Accelerating cortical thinning: unique to dementia or universal in aging?* Cereb Cortex, 2014. **24**(4): p. 919-934.
79. Johnson SC, Christian BT, Okonkwo OC, Oh JM et al., *Amyloid burden and neural function in people at risk for Alzheimer's disease*. Neurobiology of aging, 2014. **35**(3): p. 576-584.
80. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC et al., *Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers*. Lancet Neurol, 2013. **12**(2): p. 207-216.
81. Burgmans S, van Boxtel MP, Vuurman EF, Smeets F et al., *The prevalence of cortical gray matter atrophy may be overestimated in the healthy aging brain*. Neuropsychology, 2009. **23**(5): p. 541-550.
82. Driscoll I, Davatzikos C, An Y, Wu X et al., *Longitudinal pattern of regional brain volume change differentiates normal aging from MCI*. Neurology, 2009. **72**(22): p. 1906-1913.
83. Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KB, and Initiative AsDN, *Brain changes in older adults at very low risk for Alzheimer's disease*. Journal of Neuroscience, 2013. **33**(19): p. 8237-8242.
84. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C et al., *Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature*. J Neuropathol Exp Neurol, 2012. **71**(5): p. 362-381.
85. Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, and Davatzikos C, *Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain*. Journal of Neuroscience, 2003. **23**(8): p. 3295-3301.
86. Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK et al., *Brain atrophy in healthy aging is related to CSF levels of A β 1-42*. Cerebral Cortex, 2010. **20**(9): p. 2069-2079.
87. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B et al., *Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study*. The Lancet Neurology, 2013. **12**(4): p. 357-367.
88. Song Y, Stampfer MJ, and Liu S, *Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease*. Ann Intern Med, 2004. **141**(2): p. 137-147.
89. Goedert M, *Tau gene mutations and their effects*. Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 2005. **20**(S12): p. S45-S52.
90. Delacourte A, *Tauopathies: recent insights into old diseases*. Folia Neuropathol, 2005. **43**(4): p. 244-257.
91. Papanikolopoulou K and Skoulakis EM, *The power and richness of modelling tauopathies in Drosophila*. Molecular neurobiology, 2011. **44**(1): p. 122-133.
92. Sang T-K and Jackson GR, *Drosophila models of neurodegenerative disease*. NeuroRx, 2005. **2**(3): p. 438-446.
93. Avila J, Lucas JJ, Perez M, and Hernandez F, *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions*. Physiol Rev, 2004. **84**(2): p. 361-384.
94. Kanaan NM, Himmelstein DS, Ward SM, Combs B, and Binder LI, *Tau protein: biology and pathobiology*, in *Movement Disorders (Second Edition)*. 2015, Elsevier. p. 857-874.
95. Sergeant N, Delacourte A, and Buee L, *Tau protein as a differential biomarker of tauopathies*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1739**(2-3): p. 179-197.
96. Ali Y, Ruan K, and Zhai RG, *Drosophila Models of Tauopathy*, in *Movement Disorders (Second Edition)*. 2015, Elsevier. p. 829-848.

97. Goedert M and Jakes R, *Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization*. *Embo j*, 1990. **9**(13): p. 4225-4230.
98. Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ et al., *Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly*. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(2): p. 353-365.
99. Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, and Yu JT, *Tau in neurodegenerative disease*. *Ann Transl Med*, 2018. **6**(10): p. 175.
100. Sultan A, Nessler F, Violet M, Begard S et al., *Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(6): p. 4566-4575.
101. Kanaan NM, Morfini GA, LaPointe NE, Pigino GF et al., *Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases*. *J Neurosci*, 2011. **31**(27): p. 9858-9868.
102. Higuchi M, Trojanowski JQ, and Lee VM-Y, *Tau protein and tauopathy*. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, 2002: p. 1339-1354.
103. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J et al., *Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease*. *Faseb j*, 2012. **26**(5): p. 1946-1959.
104. Mohorko N and Bresjanac M, *Tau protein and human tauopathies: an overview*. *Slovenian Medical Journal*, 2008. **77**(SUPPII).
105. Papanikolopoulou K and Skoulakis EM, *The power and richness of modelling tauopathies in Drosophila*. *Mol Neurobiol*, 2011. **44**(1): p. 122-133.
106. Kosmidis S, Grammenoudi S, Papanikolopoulou K, and Skoulakis EM, *Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 2010. **30**(2): p. 464-477.
107. Papanikolopoulou K and Skoulakis EM, *Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in Drosophila*. *Human molecular genetics*, 2014. **24**(7): p. 2065-2077.
108. Sealey MA, Vourkou E, Cowan CM, Bossing T et al., *Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy*. *Neurobiol Dis*, 2017. **105**: p. 74-83.
109. Sarkar S, *Neurofibrillary tangles mediated human neuronal tauopathies: insights from fly models*. *J Genet*, 2018. **97**(3): p. 783-793.
110. Brand AH and Dormand EL, *The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the Drosophila nervous system*. *Curr Opin Neurobiol*, 1995. **5**(5): p. 572-578.
111. Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM et al., *Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles*. *Science*, 2001. **293**(5530): p. 711-714.
112. Freeman MR and Doherty J, *Glial cell biology in Drosophila and vertebrates*. *Trends Neurosci*, 2006. **29**(2): p. 82-90.
113. Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM et al., *Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles*. *Science*, 2001. **293**(5530): p. 711-714.
114. Jackson GR, Wiedau-Pazos M, Sang TK, Wagle N et al., *Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in Drosophila*. *Neuron*, 2002. **34**(4): p. 509-519.
115. Wu TH, Lu YN, Chuang CL, Wu CL et al., *Loss of vesicular dopamine release precedes tauopathy in degenerative dopaminergic neurons in a Drosophila model expressing human tau*. *Acta Neuropathol*, 2013. **125**(5): p. 711-725.

116. Chanu SI and Sarkar S, *Targeted downregulation of dMyc restricts neurofibrillary tangles mediated pathogenesis of human neuronal tauopathies in Drosophila*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(9): p. 2111-2119.
117. Mishra M and Knust E, *Analysis of the Drosophila Compound Eye with Light and Electron Microscopy*. Methods Mol Biol, 2019. **1834**: p. 345-364.
118. Yeh PA, Chien JY, Chou CC, Huang YF et al., *Drosophila notal bristle as a novel assessment tool for pathogenic study of Tau toxicity and screening of therapeutic compounds*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(1): p. 510-516.
119. Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P et al., *GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in Drosophila*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(5): p. 522-530.
120. Chee FC, Mudher A, Cuttle MF, Newman TA et al., *Over-expression of tau results in defective synaptic transmission in Drosophila neuromuscular junctions*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(3): p. 918-928.
121. Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML et al., *Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo*. Nature cell biology, 2007. **9**(2): p. 139.
122. Trimarchi J and Schneiderman A, *Initiation of flight in the unrestrained fly, Drosophila melanogaster*. Journal of Zoology, 1995. **235**(2): p. 211-222.
123. Trimarchi J and Schneiderman A, *Flight initiations in Drosophila melanogaster are mediated by several distinct motor patterns*. Journal of Comparative Physiology A, 1995. **176**(3): p. 355-364.
124. Hammond S and O'Shea M, *Escape flight initiation in the fly*. Journal of Comparative Physiology A, 2007. **193**(4): p. 471-476.
125. Trimarchi JR and Schneiderman AM, *Different neural pathways coordinate Drosophila flight initiations evoked by visual and olfactory stimuli*. Journal of experimental biology, 1995. **198**(5): p. 1099-1104.
126. Mulloney B, *Interneurons in the central nervous system of flies and the start of flight*. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 1969. **64**(3): p. 243-253.
127. TANOUYE M. *Physiology of the jump response in Drosophila melanogaster*. in Soc. Neurosci. Abstr. 1977.
128. Koenig JH and Ikeda K, *Relationship of the reserve vesicle population to synaptic depression in the tergotrochanteral and dorsal longitudinal muscles of Drosophila*. Journal of neurophysiology, 2005. **94**(3): p. 2111-2119.
129. Schouest Jr L, Anderson M, and Miller T, *The ultrastructure and physiology of the tergotrochanteral depressor muscle of the housefly, Musca domestica*. Journal of Experimental Zoology, 1986. **239**(2): p. 147-158.
130. Trimarchi JR and Schneiderman AM, *Giant fiber activation of an intrinsic muscle in the mesothoracic leg of Drosophila melanogaster*. Journal of Experimental Biology, 1993. **177**(1): p. 149-167.
131. Miyan JA and Ewing AW, *How Diptera move their wings: a re-examination of the wing base articulation and muscle systems concerned with flight*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 1985. **311**(1150): p. 271-302.
132. Wisser A and Nachtigall W, *Functional-morphological investigations on the flight muscles and their insertion points in the blowfly Calliphora erythrocephala (Insecta, Diptera)*. Zoomorphology, 1984. **104**(3): p. 188-195.
133. Thomas JB and Wyman RJ, *Mutations altering synaptic connectivity between identified neurons in Drosophila*. Journal of Neuroscience, 1984. **4**(2): p. 530-538.
134. Consoulas C, Restifo LL, and Levine RB, *Dendritic remodeling and growth of motoneurons during metamorphosis of Drosophila melanogaster*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(12): p. 4906-4917.

135. King DG and Wyman RJ, *Anatomy of the giant fibre pathway in Drosophila. I. Three thoracic components of the pathway*. Journal of neurocytology, 1980. **9**(6): p. 753-770.
136. Phelan P, Nakagawa M, Wilkin MB, Moffat KG et al., *Mutations in shaking-B prevent electrical synapse formation in the Drosophila giant fiber system*. Journal of Neuroscience, 1996. **16**(3): p. 1101-1113.
137. Sun YA and Wyman RJ, *Passover eliminates gap junctional communication between neurons of the giant fiber system in Drosophila*. Journal of neurobiology, 1996. **30**(3): p. 340-348.
138. Jacobs K, Todman MG, Allen MJ, Davies JA, and Bacon JP, *Synaptogenesis in the giant-fibre system of Drosophila: interaction of the giant fibre and its major motorneuronal target*. Development, 2000. **127**(23): p. 5203-5212.
139. Baird DH, Koto M, and Wyman RJ, *Dendritic reduction in Passover, a Drosophila mutant with a defective giant fiber neuronal pathway*. Journal of neurobiology, 1993. **24**(7): p. 971-984.
140. Koto M, Tanouye MA, Ferrus A, Thomas JB, and Wyman RJ, *The morphology of the cervical giant fiber neuron of Drosophila*. Brain research, 1981. **221**(2): p. 213-217.
141. Krishnan SN, Frei E, Swain GP, and Wyman RJ, *Passover: a gene required for synaptic connectivity in the giant fiber system of Drosophila*. Cell, 1993. **73**(5): p. 967-977.
142. Ikeda K and Koenig J, *Morphological identification of the motor neurons innervating the dorsal longitudinal flight muscle of Drosophila melanogaster*. Journal of Comparative Neurology, 1988. **273**(3): p. 436-444.
143. Allen MJ, Shan X, and Murphey R, *A role for Drosophila Drac1 in neurite outgrowth and synaptogenesis in the giant fiber system*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2000. **16**(6): p. 754-765.
144. Sun YA and Wyman RJ, *Neurons of the Drosophila giant fiber system: I. Dorsal longitudinal motor neurons*. Journal of comparative neurology, 1997. **387**(1): p. 157-166.
145. Allen MJ, Godenschwege TA, Tanouye MA, and Phelan P. *Making an escape: development and function of the Drosophila giant fibre system*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2006. Elsevier.
146. Blagburn JM, Alexopoulos H, Davies JA, and Bacon JP, *Null mutation in shaking-B eliminates electrical, but not chemical, synapses in the Drosophila giant fiber system: A structural study*. Journal of Comparative Neurology, 1999. **404**(4): p. 449-458.
147. Gorczyca M and Hall JC, *Identification of a cholinergic synapse in the giant fiber pathway of Drosophila using conditional mutations of acetylcholine synthesis*. Journal of neurogenetics, 1984. **1**(4): p. 289-313.
148. Allen MJ and Murphey R, *The chemical component of the mixed GF-TTMn synapse in Drosophila melanogaster uses acetylcholine as its neurotransmitter*. European Journal of Neuroscience, 2007. **26**(2): p. 439-445.
149. DiAntonio A, *Glutamate receptors at the Drosophila neuromuscular junction*. International review of neurobiology, 2006. **75**: p. 165-179.
150. Kosaka T and Ikeda K, *Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in Drosophila*. Journal of neurobiology, 1983. **14**(3): p. 207-225.
151. Douglass JK and Strausfeld NJ, *Anatomical organization of retinotopic motion-sensitive pathways in the optic lobes of flies*. Microscopy research and technique, 2003. **62**(2): p. 132-150.
152. Bacon JP and Strausfeld NJ, *The dipteran 'Giant fibre' pathway: neurons and signals*. Journal of comparative Physiology A, 1986. **158**(4): p. 529-548.

153. Milde JJ and Strausfeld NJ, *Cluster organization and response characteristics of the giant fiber pathway of the blowfly Calliphora erythrocephala*. Journal of Comparative Neurology, 1990. **294**(1): p. 59-75.
154. Strausfeld N and Bassemir U, *Cobalt-coupled neurons of a giant fibre system in Diptera*. Journal of neurocytology, 1983. **12**(6): p. 971-991.
155. Fischbach K-F and Dittrich A, *The optic lobe of Drosophila melanogaster. I. A Golgi analysis of wild-type structure*. Cell and tissue research, 1989. **258**(3): p. 441-475.
156. Gilbert C and Strausfeld NJ, *The functional organization of male-specific visual neurons in flies*. Journal of Comparative Physiology A, 1991. **169**(4): p. 395-411.
157. Hausen K and Strausfeld N, *Sexually dimorphic interneuron arrangements in the fly visual system*. Proc. R. Soc. Lond. B, 1980. **208**(1170): p. 57-71.
158. Salvaterra PM and Kitamoto T, *Drosophila cholinergic neurons and processes visualized with Gal4/UAS-GFP*. Gene Expression Patterns, 2001. **1**(1): p. 73-82.
159. Yasuyama K and Salvaterra PM, *Localization of choline acetyltransferase-expressing neurons in Drosophila nervous system*. Microscopy research and technique, 1999. **45**(2): p. 65-79.
160. Brand AH and Perrimon N, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. development, 1993. **118**(2): p. 401-415.
161. Von Reyn CR, Breads P, Peek MY, Zheng GZ et al., *A spike-timing mechanism for action selection*. Nature neuroscience, 2014. **17**(7): p. 962.
162. Engel JE and Wu C-F, *Interactions of membrane excitability mutations affecting potassium and sodium currents in the flight and giant fiber escape systems of Drosophila*. Journal of Comparative Physiology A, 1992. **171**(1): p. 93-104.
163. Tanouye MA and Wyman RJ, *Motor outputs of giant nerve fiber in Drosophila*. Journal of neurophysiology, 1980. **44**(2): p. 405-421.
164. Allen MJ and Godenschwege TA, *Electrophysiological recordings from the Drosophila giant fiber system (GFS)*. Cold Spring Harbor Protocols, 2010. **2010**(7): p. pdb.prot5453.
165. Engel JE and Wu C-F, *Altered habituation of an identified escape circuit in Drosophila memory mutants*. Journal of Neuroscience, 1996. **16**(10): p. 3486-3499.
166. Izmaylov D and Obukhova L, *Life span variations in 128 successive generations of D. melanogaster: I. Evidence that the phenomenon exists and analysis of the variations mode*. Mechanisms of ageing and development, 2003. **124**(5): p. 589-597.
167. Kadas D, Papanikolopoulou K, Xirou S, Consoulas C, and Skoulakis EMC, *Human Tau isoform-specific presynaptic deficits in a Drosophila Central Nervous System circuit*. Neurobiol Dis, 2018. **124**: p. 311-321.
168. Papanikolopoulou K, Grammenoudi S, Samiotaki M, and Skoulakis EM, *Differential effects of 14-3-3 dimers on Tau phosphorylation, stability and toxicity in vivo*. Human molecular genetics, 2018. **27**(13): p. 2244-2261.
169. Grammenoudi S, Kosmidis S, and Skoulakis EM, *Cell type-specific processing of human Tau proteins in Drosophila*. FEBS letters, 2006. **580**(19): p. 4602-4606.
170. Simon AF, Liang DT, and Krantz DE, *Differential decline in behavioral performance of Drosophila melanogaster with age*. Mechanisms of ageing and development, 2006. **127**(7): p. 647-651.
171. Chee F, Mudher A, Newman T, Cuttle M, Lovestone S, and Shepherd D, *Overexpression of tau results in defective synaptic transmission in Drosophila neuromuscular junctions*. 2006, Portland Press Limited.
172. Sealey MA, Vourkou E, Cowan CM, Bossing T et al., *Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy*. Neurobiology of disease, 2017. **105**: p. 74-83.

173. Goedert M, Crowther RA, and Spillantini MG, *Tau mutations cause frontotemporal dementias*. *Neuron*, 1998. **21**(5): p. 955-958.
174. Khurana V, Lu Y, Steinhilb ML, Oldham S, Shulman JM, and Feany MB, *TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a Drosophila tauopathy model*. *Current Biology*, 2006. **16**(3): p. 230-241.
175. Reed LA, Wszolek ZK, and Hutton M, *Phenotypic correlations in FTDP-17*. *Neurobiology of aging*, 2001. **22**(1): p. 89-107.
176. Polydoro M, Dzhala VI, Pooler AM, Nicholls SB et al., *Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model*. *Acta neuropathologica*, 2014. **127**(2): p. 257-270.
177. Polydoro M, Acker CM, Duff K, Castillo PE, and Davies P, *Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology*. *Journal of Neuroscience*, 2009. **29**(34): p. 10741-10749.
178. Hamodat H, Cash M, Fisk J, and Darvesh S, *Cholinesterases in normal and Alzheimer's disease primary olfactory gyrus*. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2017. **43**(7): p. 571-583.
179. Kolisnyk B, Al-Onaizi M, Soreq L, Barbash S et al., *Cholinergic surveillance over hippocampal RNA metabolism and Alzheimer's-like pathology*. *Cerebral Cortex*, 2016. **27**(7): p. 3553-3567.
180. Pepeu G and Giovannini MG, *The fate of the brain cholinergic neurons in neurodegenerative diseases*. *Brain research*, 2017. **1670**: p. 173-184.