



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία

**«Γενετική και βιοχημική προσέγγιση της αλληλεπίδρασης Mical-Tau
στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*»**

Κωνσταντίνα Καλύβα

Χημικός

Επιβλέπων: Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης

Αθήνα, 2020

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης

Αναπληρωτής καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη

Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης

Αναπληρωτής καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

Ευθύμιος Σκουλάκης

Αναπληρωτής Διευθυντής, Ερευνητής Α', Τομέας Νευροεπιστημών
Ινστιτούτο Βασικής Βιοϊατρικής Έρευνας Ε.ΚΕ.ΒΕ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΓΚ»

Περίληψη

Η εκθετική αύξηση του προσδόκιμου ζωής τα τελευταία χρόνια έχει φέρει στο προσκήνιο ασθένειες που σχετίζονται άμεσα με τη γήρανση του οργανισμού. Μεταξύ άλλων, οι Ταυ-πάθειες, όπως η νόσος Alzheimer και η μετωποκροταφική άνοια, που επηρεάζουν άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω, επιφέρουν αργά και βαθμιαία διαταραχές στη μνήμη, στην κρίση, στην ικανότητα κατανόησης και έκφρασης του λόγου, έκπτωση στην καθημερινή λειτουργικότητα και χωροχρονικό αποπροσανατολισμό. Οι Ταυ-πάθειες ως νοσολογικές οντότητες χαρακτηρίζονται ιστοπαθολογικά από την ενδονευρωνική συσσώρευση της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Ταυ, η οποία αλλάζει διαμόρφωση στο χώρο και δημιουργεί συσσωματώματα. Αυτό δεν είναι σε καμία περίπτωση αναμενόμενο για μία πρωτεΐνη τόσο υδατοδιαλυτή όσο η Ταυ, της οποίας η αλληλουχία είναι εγγενώς μη δομημένη, ανθεκτική στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της τιμής του pH, και πλούσια σε πολικά αμινοξέα. Παρόλα αυτά, κάτω από αδιευκρίνιστες μέχρι στιγμής συνθήκες, η Ταυ χάνει τη διαμόρφωση τύπου «συνδετήρα», που ευνοεί την πρόσδεση της αλληλουχίας της στους μικροσωληνίσκους. Αντ' αυτού, δημιουργεί β-πτυχωτές επιφάνειες, οι οποίες διαπλέκονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν ολιγομερή και στο καταληκτικό στάδιο της Ταυ-πάθειας ώριμα συσσωματώματα.

Η ερευνητική ομάδα της Δρ. Κατερίνας Παπανικολοπούλου στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» επιχείρησε να αποσαφηνίσει τον *in vivo* μηχανισμό συσσωμάτωσης της Ταυ. Στο πλαίσιο αυτής της προσπάθειας, αναζητήθηκαν πρωτεΐνες, που αλληλεπιδρούν με την ανθρώπινη, αγρίου τύπου Ταυ στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster* και που πιθανόν εμπλέκονται σε ειδικά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Μια σειρά πρωτεομικών πειραμάτων οδήγησε στην απροσδόκητη ταυτοποίηση της Δροσοφιλικής MICAL (Mical) ως κυτταρικού παρτενέρ της Ταυ. Η πρωτεΐνη Mical αποτελεί μία φλαβινική μονοοξυγενάση με πολλές δομικές επικράτειες, που οξειδώνει επιφανειακά κατάλοιπα κυστεΐνης ή μεθειονίνης σε κατάλληλα υποστρώματα. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχει τη δράση τους, ενώ παράλληλα εμπλέκεται σε αναπτυξιακά φαινόμενα του εγκεφάλου, όπως το δενδριτικό κλάδεμα και τη νευραξονική καθοδήγηση, ή σε παθολογικές καταστάσεις, που σχετίζονται με ακτινο-εξαρτώμενες διεργασίες. Μέσα από τον έλεγχο έκδυσης διαγονιδιακών μυγών, που εξέφραζαν παν-νευρωνικά Ταυ και ένα διαγονίδιο της δροσοφιλικής Mical ή του Mical-RNAi, διαπιστώθηκε ότι η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών είναι τοξική, δεδομένου ότι η υπερέκφραση της Mical οδηγούσε σε μείωση των ενήλικων μυγών που εξέρχονταν από τη νυμφική κάψα, ενώ η μειορρυθμισή της οδηγούσε σε αύξηση των ενήλικων απογόνων. Παράλληλα, βρέθηκε ότι

η MICAL-1 του ανθρώπου (ορθόλογη της δροσοφιλικής Mical) υπερεκφράζεται στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer και νόσο του Pick, όμως, συνεντοπίζεται μόνο με τις 3R ισομορφές της Tau στα σωματίδια του Pick και όχι με το μείγμα 3R και 4R ισομορφών στα νευροϊνιδιακά δεμάτια.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η γενετική αλληλεπίδραση Mical-Tau στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Drosophila melanogaster* για να διαπιστωθεί: 1) αν η Mical επηρεάζει διαφορετικά τις 3R και τις 4R ισομορφές, 2) αν διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία της Tau ως κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης και 3) αν επάγει την εξαρτώμενη από την Tau νευρωνική τοξικότητα. Για αυτό το σκοπό, δημιουργήθηκαν έξι σειρές διαγονιδιακών μυγών, οι οποίες εξέφραζαν παν-νευρωνικά ένα διαγονίδιο της Tau (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R) με τη βοήθεια του γενετικού συστήματος GAL4/UAS, ενώ παράλληλα αυξομειώνονταν τα επίπεδα της Mical (στελέχη ελέγχου, υπερέκφρασης και μειορρύθμισης της Mical). Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε απλά πειράματα western blot ή παραλλαγές αυτών, όπως είναι το πρωτόκολλο απομόνωσης συσσωματωμάτων και πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους. Σημειώνεται, ότι μόνο στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και οι έξι ισομορφές - σε όλα τα υπόλοιπα αξιοποιήθηκαν μόνο οι (2N) ισομορφές της Tau. Για τον έλεγχο της τοξικότητας της Tau συναρτήθηκε των επιπέδων της Mical, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μακροζωίας, αντίστασης στο οξειδωτικό στρες και παρατήρησης του rough eye φαινότυπου, ενώ αποκλειστικά και μόνο για την 2N4R ισομορφή προσδιορίστηκε το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της Tau, όταν η Mical μειορρυθμίζεται με ένα Mical-RNAi. Τα πειράματα μακροζωίας και μελέτης του δικτύου αλληλεπιδράσεων βασίστηκαν σε στελέχη της *Drosophila*, όπου ο έλεγχος της διαγονιδιακής έκφρασης γινόταν από το σύστημα TARGET.

Επιγραμματικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

- Η αυξομείωση των επιπέδων έκφρασης της Mical στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Drosophila* μεταβάλλει αναλογικά τα επίπεδα των 3R και των 4R ισομορφών της Tau
- Η Mical ενισχύει την τάση των 2N3R και 2N4R ισομορφών προς συσσωμάτωση στους νευρώνες
- Η σύνδεση των 2N ισομορφών στο *in vivo* δίκτυο των μικροσωληνίσκων της μύγας δεν επηρεάζεται από τη μεταβολή των επιπέδων της Mical στον εγκέφαλο
- Η αλληλεπίδραση Mical-Tau επιδεινώνει τον rough eye φαινότυπο της 2N4R ισομορφής
- Οι μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στις καμπύλες βιωσιμότητας των διαγονιδιακών στελεχών οφείλονται σε συστηματικό σφάλμα (αδυναμία διατήρησης σταθερής θερμοκρασίας στον επωαστήρα) και όχι στην πραγματική επίδραση της Mical επί της τοξικότητας των 2N3R και 2N4R ισομορφών.

- Η αντίσταση των μυγών στο οξειδωτικό στρες μειώνεται όταν η 2N3R ή η 2N4R συνεκφράζεται με τη Mical στο κεντρικό νευρικό τους σύστημα.
- Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της 2N4R ισομορφής μεταβάλλεται όταν μειορρυθμίζεται η Mical.

Abstract

During the past few years, the exponential increase in life expectancy has brought age-related diseases to the fore. Among others, Tauopathies such as Alzheimer's disease and frontotemporal dementia, which affect adults over 65 years of age, induce slow and gradual impairments in memory, judgment, comprehension and speech, impairment of daily functioning and spatiotemporal disorientation. Tauopathies, as nosological entities, are histopathologically characterized by intraneuronal accumulation of the hyperphosphorylated Tau protein, which changes its three-dimensional conformation and forms aggregates. This is by no means to be expected for a protein as water-soluble as Tau, whose sequence is natively disordered, stable in high temperatures and under acidic conditions, as well as rich in polar amino acids. However, under hitherto unexplained conditions, Tau loses its paperclip-like shaped conformation, which favors its binding to microtubules. Instead, Tau forms β -sheet structures, which interdigitate to form oligomers and in the final stage of Tauopathy mature aggregates.

The research team of Dr. Katerina Papanikolopoulou at the Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming" attempted to elucidate the *in vivo* mechanism of Tau aggregation. For this reason, proteins were sought that interact with the human, wild-type Tau in the central nervous system of *Drosophila melanogaster* and that may be involved in specific intracellular signaling pathways. A series of proteomic experiments led to the unexpected identification of the *Drosophila* MICAL (Mical) as a cellular partner of Tau. Mical protein is a multidomain flavin monooxygenase, which oxidizes cysteine or methionine residues that are located on the surface of suitable substrates. In this way, Mical controls their action and at the same time becomes involved in brain developmental processes, such as dendritic pruning and axonal guidance or in pathological conditions that are related to actin-dependent processes. The effect of Mical on Tau toxicity was assessed by an eclosion assay. Results are presented as the ratio of flies co-expressing Tau-Mical or Tau-Mical RNAi over the number of flies expressing Tau alone. Interestingly, Mical elevation enhanced Tau toxicity (decreased eclosion) whereas Mical reduction attenuated Tau-dependent developmental lethality. Given the effects of Mical in human Tau-expressing flies, the laboratory decided to investigate the levels and localization of MICAL in samples (frozen tissue and paraffin sections) from non-demented patients as well as in patients with Tauopathies, namely Alzheimer's disease and the distinctive form of Frontotemporal Dementia, Pick's disease. In humans, there are three MICAL proteins (MICAL1, MICAL2 and MICAL3). Phylogenetic analysis of MICAL family members showed that *Drosophila* MICAL and Human MICAL1 are clustered in the same clade, hence the laboratory

initially focused on this protein. A very exciting and novel result was that in the brain of Pick's disease patients, MICAL1 is significantly up-regulated compared to normal controls and co-localizes with Tau in the cytoplasmic inclusions known as Pick bodies. MICAL1 is also up-regulated in most of the AD samples tested but shows no immunoreactivity in paraffin sections.

The present thesis project was based on the genetic interactions between Mical and Tau with respect to a) Tau normal function as a cytoskeletal protein b) Tau isoform specific interactions c) Tau-associated neuronal toxic, as well as on the biochemical characterization of interaction between the two proteins. Six series of transgenic flies were created in a way that they could express a Tau transgene (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R) pan-neuronally using the GAL4/UAS system, by coexpression of a Mical transgene or by transgenic Mical RNAi respectively. These strains were used in simple western blot experiments or variants thereof, such as the aggregate isolation and microtubule binding protocol. Then, the toxicity of Mical-Tau interaction was tested in the adult *Drosophila* brain through longevity and resistance to oxidative stress assays and through observing the rough eye phenotype. Experiments on longevity and interaction study were based on *Drosophila* strains, where transgenic expression was monitored by the TARGET system.

In summary:

- Mical up-regulation increases all six Tau isoform levels in the CNS of *Drosophila*, while its down-regulation decreases their levels.
- Mical enhances the propensity aggregation of 2N3R and 2N4R Tau isoforms
- Mical does not affect the microtubule binding capacity of 2N3R and 2N4R, except from the case where 2N4R and MICAL-RNAi are co-expressed leading to the detachment of the 2N4R isoform from the microtubules
- Mical-Tau interaction exacerbates the 2N4R-mediated rough eye phenotype
- Mical overexpression or down-regulation seems to have no effect on Tau longevity curves, but this is due to a systematic error caused by incubator malfunction
- Mical overexpression increases the oxidative stress susceptibility of the flies expressing 2N3R or 2N4R pan-neuronally
- Mical down-regulation alters the interactome of Tau in the CNS of *Drosophila*

Ευχαριστίες

Η δουλειά που θα σας αναλύσω στις επόμενες σελίδες είναι η πρώτη επιστημονική μου απόπειρα να ασχοληθώ με τον τομέα των Νευροεπιστημών. Μία δουλειά συναρπαστική από άποψης περιεχομένου και επιστημονικής κατάρτισης για την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα και κύρια την υπεύθυνη μου Δρ. Κατερίνα Παπανικολοπούλου, Ερευνήτρια ΙΣΝ στον Τομέα Νευροεπιστημών του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Χωρίς την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την πρακτική βοήθειά της δε θα μπορούσα να φτάσω στο επιστημονικό επίπεδο που βρίσκομαι τώρα, δεδομένου ότι μου έμαθε πως να δουλεύω με τη *Drosophila* και να σκέφτομαι αυτόνομα ως μελλοντική ερευνήτρια.

Θερμά ευχαριστώ και τον Επικεφαλής του Τομέα Νευροεπιστημών και Ερευνητή Α' στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», Δρ. Ευθύμιο Σκουλάκη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στις ικανότητές μου, την ασφάλεια που με έκανε να νιώσω στο απαιτητικό περιβάλλον της έρευνας και τους υψηλούς επαγγελματικούς στόχους που με παρότρυνε να κυνηγήσω.

Επιπλέον, αισθάνομαι υπόχρεη στον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης του Τμήματος Βιολογίας στο ΕΚΠΑ Δημήτριο Στραβοπόδη, ο οποίος κατάλαβε την αντικειμενική δυσκολία του έργου που αναλάμβανα και για αυτό μου πρόσφερε όλο το διαθέσιμο χρόνο του μεταπτυχιακού προγράμματος για να φτάσω στο ανώτερο των δυνατοτήτων μου.

Ιδιαίτέρως ευχαριστώ τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για τη συνδρομή τους σε στιγμές που χρειαζόμουν βοήθεια, τους Βασίλη Πασπαλιάρη, Ελένη Τσακίρη και Έντζυ Πρίφτη, όπως επίσης και τη διδακτορικό Εργίνα Βούρκου για τις ώρες που έχουμε περάσει μαζί στο fly room δουλεύοντας και συζητώντας για τα πειράματα και τις ανησυχίες μας.

Ευχαριστώ, επίσης, όλους τους φίλους μου στο Φλέμινγκ μεταξύ των οποίων την Ελευθερία Μπίφσα, την Αναστασία Καραμολέγκου, τον Πέτρο Σταμούλη και τον Αποστόλη Γαλάρη για τα γέλια και τις ανάλαφρες στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός του εργαστηρίου, όπως επίσης και για την έμπρακτη συμπαράστασή τους.

Τέλος, δεν μπορώ να ξεχάσω τους γονείς μου, οι οποίοι ξυπνούσαν μαζί μου χαράματα και γύριζαν μαζί μου το βράδυ για να είμαι σε θέση να δουλεύω πάνω στο αντικείμενο που μου αρέσει, την αδερφή μου Καλύβα Μελπομένη, η οποία ανέλαβε την επιμέλεια του κειμένου ως φοιτήτρια Φιλολογίας με εξειδίκευση στη Γλωσσολογία και το αγόρι μου Μιχάλη, ο οποίος ήταν δίπλα μου σε κάθε στιγμή της προσπάθειάς μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	6
Ευχαριστίες.....	8
Κατάλογος Συντομογραφιών/Κατάλογος Συμβόλων.....	10
1. Εισαγωγή	11
1.1. Η πρωτεΐνη Tau	11
1.2. Η οικογένεια των πρωτεϊνών MICAL.....	15
1.3. Η <i>Drosophila</i> ως οργανισμός μοντέλο και ως μοντέλο Ταοπαθειών	17
1.4. Ο κύκλος ζωής της <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.5. Σύστημα GAL4/UAS.....	20
1.6. Το σύστημα TARGET	21
1.7. Η RNA παρεμβολή.....	22
2. Υλικά και μέθοδοι.....	24
2.1. Καλλιέργεια και στελέχη <i>Drosophila</i>	24
2.2. Ανοσοαποτύπωση - Western blotting (single-head)	25
2.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης συσσωματωμάτων.....	26
2.4. Ανάλυση πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (Microtubule binding assay)	27
2.5. Μελέτη μακροζωίας (Longevity assay)	28
2.6. Μελέτη αντίστασης στο οξειδωτικό στρες (Oxidative stress resistance assay)	28
2.7. Πρωτεομική ανάλυση με τη χρήση LC-MS/MS	29
2.7.1. Απομόνωση των επισημασμένων με ετικέτα FLAG πρωτεϊνών	29
2.8. Στατιστική ανάλυση	30
4. Αποτελέσματα	31
4.1. Γενετικοί χειρισμοί της Mical μεταβάλλουν αναλογικά τα επίπεδα των 3R και 4R Tau ισομορφών στους νευρώνες.....	31
4.2. Η Mical ενισχύει τη συσσωμάτωση των 2N ισομορφών της Tau.....	33
4.3. Η συγγένεια σύνδεσης των 2N ισομορφών στους μικροσωληνίσκους δεν επηρεάζεται από τη Mical 34	
4.1. Η αλληλεπίδραση Mical-Tau χειροτερεύει τον rough eye φαινότυπο της 2N4R ισομορφής ...	34
4.2. Ο έλεγχος βιωσιμότητας των 2N ισομορφών της Tau	36
4.3. Η αντίσταση των διαγονιδιακών μυγών στο οξειδωτικό στρες μειώνεται, όταν συνεκφράζουν μία (2N) ισομορφή της Tau με το διαγονίδιο της Mical.....	38

4.4. Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της (επισημασμένης με πεπτίδιο Flag) 2N4R μεταβάλλεται, όταν μειορρυθμίζεται η Mical στον εγκέφαλο της <i>Drosophila</i>	39
Συμπεράσματα - Συζήτηση	40
Βιβλιογραφία.....	43

Κατάλογος Συντομογραφιών/Κατάλογος Συμβόλων

MICAL	Molecule Interacting with CasL
RNAi	RNA interference
TARGET	Temporal and Regional Gene Expression Targeting
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau
MAP	Microtubule Associated Protein
mRNA	messenger RNA
E	Exon
aa	amino acids
MBD	Microtubule Binding Domain
SH3	Src homology 3
CBD	Corticobasal Degeneration
PSP	Progressive Supranuclear Palsy
FTD	Frontotemporal Dementia
FTDP-17	Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17
NES	Nuclear Export Signal
FMO	Flavin monooxygenase domain
CH	Calponin homology
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3
CC	Coiled coil
CasL	CRK-Associated Substrate-Related Protein
MICAL-L	MICAL-Like
L1	first-instar larva
L2	second-instar larva
L3	third-instar larva
GAL4	Beta-galactosidase
UAS	Upstream Activating Sequence
GAL80 ^{ts}	thermosensitive mutant of GAL80 gene
dsRNA	double-stranded RNA
shRNA	short hairpin RNA
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PTI	PAMP-triggered immunity
iPSC	Induced pluripotent stem cells
pre-miRNA	Precursor microRNA
miR	MicroRNA
DCR-1	Dicer-1
DCR-2	Dicer-2
siRNA	Small interfering RNA

Loqs PB	Loquacious PB
RISC	RNA induced silencing complex
AGO2	Argonaut protein 2
ATP	Adenosine Triphosphate
VIG	Vasa Intronic Gene
TSN	Tudor Staphylococcus Nuclease
dFMR1	Drosophila Fragile Mental Retardation 1
Elav	Embryonic lethal abnormal visual system
Ras	Rat sarcoma
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane
SDS	Sodium dodecyl sulfate
PVDF	Polyvinylidene fluoride ή Polyvinylidene difluoride
TBST	Tris-baffered saline with 0.1% Tween
Syx	Syntaxin
RT	Room Temperature
HRP	Horseradish peroxidase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid
PBS	Phosphate-buffed saline
S	Supernatant
P	Pellet

1. Εισαγωγή

1.1. Η πρωτεΐνη Tau

Η σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη Tau (Microtubule Associated Protein Tau, *MAPT*) είναι το μικρότερο μέλος (M.B. 55-62 kDa) της οικογένειας των MAP πρωτεϊνών, που ρυθμίζουν τη δυναμική συγκρότηση και αποσυγκρότηση του κυτταροσκελετού [1]. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *MAPT*, το οποίο εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q21.31), αποτελείται από 16 εξόνια (exons, E) [2], και μεταγράφεται σε τρία mRNA [3-7]. Τα *MAPT* mRNA έχουν μήκος 2kb, 6kb και 8kb αντίστοιχα και εκφράζονται διαφορετικά ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και τον τύπο του νευρώνα. Το 2kb μετάγραφο, που περιέχει ολόκληρη την κωδική αλληλουχία του γονιδίου, εκφράζει την Tau του πυρήνα [7]. Το 6kb μετάγραφο εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο και είναι εμπλουτισμένο στους νευρώνες [5, 6], ενώ το 8kb μετάγραφο κωδικοποιεί μόνο για την Tau του αμφιβληστροειδή χιτώνα και του περιφερικού νευρικού συστήματος [3, 4].

Από τα 16 εξόνια της κωδικής αλληλουχίας του *MAPT*, τα E1, E4, E5, E7, E9, E11, E12, E13 εκφράζονται συστηματικά στο κεντρικό νευρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, ενώ τα υπόλοιπα 8 εξόνια

μπορεί, για διαφορετικούς λόγους το καθένα, να εξαιρεθούν. Το E0, για παράδειγμα, αντιστοιχεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή του *MAPT* mRNA, που μεταγράφεται αλλά δε μεταφράζεται. Το ίδιο ισχύει και για το E14 που αντιστοιχεί στην 3' αμετάφραστη περιοχή του *MAPT* mRNA [5, 6, 8-10]. Το E4a εκφράζεται συστηματικά στο περιφερικό νευρικό σύστημα του ενήλικου ανθρώπου και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, όχι όμως και στο κεντρικό νευρικό σύστημα [3]. Το E6 εκφράζεται, κανονικά, σε χαμηλά επίπεδα σε όλους τους τύπους ενήλικων νευρώνων του ανθρώπου [11]. Ωστόσο, μπορεί να δώσει γένεση σε δύο μικρότερες παραλλαγές της Ταυ, την 6p και την 6d, οι οποίες δε συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους. Αυτό συμβαίνει, γιατί υπάρχουν δύο εναλλακτικές θέσεις ματίσματος εντός του E6, που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης και εισάγουν κωδικόνια λήξης [8, 11]. Το E8 εκφράζεται αποκλειστικά στο περιφερικό νευρικό σύστημα των βοοειδών [12, 13]. Τέλος, τα E2, E3 και E10 είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον άνθρωπο, καθώς η εναλλακτική συρραφή τους δίνει γένεση σε έξι νευρωνικού τύπου Ταυ ισομορφές [5, 6].

Οι ισομορφές της Ταυ διαφέρουν μεταξύ τους ως προς δύο σημεία. Το πρώτο αφορά τον αριθμό των ακραίων αμινοτελικών ενθέσεων μήκους 29 αμινοξέων (aa), που κωδικοποιούνται από τα E2 και E3. Το δεύτερο σημείο αφορά το πλήθος των καρβοξυτελικών επαναλήψεων πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (microtubule-binding domain, MBD), που κωδικοποιούνται από τα E9, E10, E11 και E12 [5, 6]. Αν, μάλιστα, ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι το E3 δεν εκφράζεται απουσία του E2, ενώ το αντίστροφο δεν ισχύει, και ότι το E10 κωδικοποιεί εξ ολοκλήρου τη δεύτερη επανάληψη πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους [5, 6], τότε οι ισομορφές της Ταυ μπορεί να περιέχουν: 0, 1 ή 2 ενθέσεις (N) στο αμινοτελικό άκρο και 3 ή 4 επαναλήψεις πρόσδεσης (R) στο καρβοξυτελικό [5, 6, 14-18]. Οι ισομορφές, τελικά, συμβολίζονται: 0N3R, 1N4R, 2N3R, 0N4R, 1N3R, 2N4R.

Η έκφραση των ισομορφών ρυθμίζεται αναπτυξιακά, ώστε ο ενήλικος εγκέφαλος του ανθρώπου να διαθέτει και τις έξι ισομορφές, ενώ ο εμβρυϊκός μόνο τη 0N3R [19]. Μάλιστα, η αναλογία των 3R:4R στον ενήλικο εγκέφαλο είναι 1:1, όμως η έκφραση των επιμέρους ισομορφών δε γίνεται ισόποσα. Για παράδειγμα, οι 0N ισομορφές αντιπροσωπεύουν το 37% περίπου της συνολικής έκφρασης της Ταυ στους νευρώνες, ενώ οι 1N και οι 2N ισομορφές αντιστοιχούν στο 54% και 9% αντίστοιχα. Η 2N4R είναι η ισομορφή της Ταυ, που υποαντιπροσωπεύεται περισσότερο από όλες τις άλλες [20]. Τα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών εξαρτώνται, επίσης, και από την περιοχή του εγκεφάλου, στην οποία βρίσκονται. Στο νεοφλοιό έχει αναφερθεί ότι τα mRNA και τα επίπεδα έκφρασης της Ταυ είναι γενικά δύο φορές υψηλότερα από τα αντίστοιχα στην λευκή ουσία και στην παρεγκεφαλίδα [21]. Το ίδιο ισχύει και για το εναλλακτικό μάτισμα, εφόσον η 0N3R ισομορφή ανιχνεύεται λιγότερο στην παρεγκεφαλίδα

σε σχέση με άλλες περιοχές του εγκεφάλου [21, 22]. Συνεπώς, φαίνεται ότι η παθολογική Tau δεν επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο όλες τις περιοχές ή ακόμη και όλους τους νευρωνικούς υπότυπους του εγκεφάλου, αλλά καθιστά κάποιους πιο ευάλωτους στην τοξικότητά της.

Η δομή της Tau διακρίνεται σε τέσσερις περιοχές: μία αμινοτελική περιοχή «προβολής» (projection domain) μία περιοχή πλούσια σε προλίνη (proline-rich domain), μία περιοχή συγκρότησης (assembly domain), η οποία περιλαμβάνει τις επαναλήψεις πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους, και ένα ακραίο καρβοξυτελικό τμήμα. Οι περιοχές προβολής και συγκρότησης είναι η πιο σημαντικές για τη λειτουργία της πρωτεΐνης, καθώς εδραιώνουν το ρόλο της Tau ως κυτταροσκελετικού ρυθμιστή. Η καθεμία αλληλεπιδρά διαφορετικά με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων και χαρακτηρίζεται από διαφορετική αμινοξική σύσταση. Η περιοχή προβολής, για παράδειγμα, φέρει στο αμινοτελικό της άκρο ~120 αμινοξέα όξινου χαρακτήρα, τα οποία σε συνδυασμό με τα ~40 ουδέτερα αμινοξέα της περιοχής συγκρότησης δημιουργούν την απαραίτητη ασυμμετρία φορτίων για την αλληλεπίδραση της Tau με τους μικροσωληνίσκους ή με άλλες πρωτεΐνες, για την εσωτερική αναδίπλωση της πρωτεΐνης ή ακόμη και για την συσσωμάτωσή της. Η περιοχή προβολής της Tau δεν έχει την ικανότητα να συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους, όμως, ρυθμίζει βάσει του πλήθους των N ενθέσεων (0N, 1N, 2N) την απόσταση μεταξύ τους. Η περιοχή συγκρότησης, αντίθετα, σταθεροποιεί τις δομές των μικροσωληνίσκων, με τις 4R ισομορφές να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης από τις 3R. Η ίδια περιοχή συμμετέχει και με την ιδιότητα του εναρκτή του πολυμερισμού στην κατευθυνόμενη συγκρότηση των μικροσωληνίσκων, όπως έχει αποδειχθεί με *in vitro* πειράματα. Τέλος, οι περιοχές προβολής και συγκρότησης της Tau χωρίζονται από μία περιοχή πλούσια σε προλίνη, η οποία δεν ευνοεί το σχηματισμό β-πτυχωτών επιφανειών και περιέχει επτά PXXP μοτίβα για την πρόσδεση σηματοδοτικών πρωτεϊνών, όπως είναι οι πρωτεΐνες της SH3 οικογένειας [23].

Με μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance) και σκέδασης ακτίνων X μικρής γωνίας (small-angle X-ray scattering) έχει αποδειχθεί ότι η Tau είναι μια εγγενώς μη δομημένη πρωτεΐνη, η οποία φυσιολογικά παρουσιάζει μικρή τάση προς συσσωμάτωση [24]. Η απεικόνιση της είναι θολή και τις περισσότερες φορές δίνει την εντύπωση ενός σφαιρικού «σύννεφου», που εναλλάσσει συνεχώς στερεοδιατάξεις στη μονάδα του χρόνου. Υπάρχει, όμως, και μία στερεοδιάταξη τύπου «συνδετήρα» κατά την οποία το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της Tau μαζί με τις επαναλήψεις πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους πλησιάζουν το ένα το άλλο. Η συγκεκριμένη διαμόρφωση της Tau είναι υπεύθυνη για τη συγκράτηση των μικροσωληνίσκων σε δεσμίδες και παράλληλα προστατεύει την Tau από τη συσσωμάτωση [25].

Ο κίνδυνος συσσωμάτωσης της Ταυ εντός των νευρώνων είναι φυσιολογικά πολύ μικρός χάρη στην εξαιρετικά πολική αλληλουχία της Ταυ, στην ανθεκτικότητά της απέναντι στις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας και στις ακραία όξινες τιμές του pH. Ωστόσο, έχει βρεθεί πως συγκεκριμένοι παράγοντες εμποδίζουν την Ταυ να λάβει τη διαμόρφωση συνδετήρα και έτσι αντί να συνδεθεί με τους μικροσωληνίσκους δημιουργεί η ίδια σωληνοειδείς δομές. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η σύντμηση της πρωτεΐνης Ταυ ή οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση [26, 27]. Επίσης, στην αρχή των R2 και R3 επαναλήψεων εδράζονται δύο εξαπεπτίδια, τα VQIVYK και VQIINK, που όταν αποκαλύπτονται και γίνονται προσβάσιμες, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας β-πτυχωτές επιφάνειες [28]. Τέλος, έχει δειχθεί *in vitro* ότι η οξειδωση της κυστεΐνης C322 επάγει τη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίες συμβάλλουν στη συσσωμάτωση της Ταυ [29].

Η συσσώρευση υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Ταυ έχει συσχετιστεί με μία ομάδα νευροεκφυλιστικών ασθενειών, γνωστών ως Ταυ-πάθειες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαφορετική ιστοειδική παθολογία καθώς και διαφορεική επίδραση στις γνωστικές λειτουργίες του εγκεφάλου. Η ετερογένεια στα κλινικοπαθολογικά προφίλ των διάφορων ασθενειών Ταυ υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί που τις διέπουν πρέπει να είναι μοριακά διαφορετικοί και πιθανότατα να εξαρτώνται από το είδος της ισομορφής (εξειδίκευση φυσιολογικών μορφών) αλλά και από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο συσσωρεύονται. Πιο συγκεκριμένα, η νόσος Alzheimer έχει ως κύριο σύμπτωμα την έκπτωση της μνήμης και χαρακτηρίζεται από τη συσσωμάτωση και των έξι ισομορφών στον υπόκαμπο και τον εγκεφαλικό φλοιό. Η φλοιοβασική εκφύλιση (Corticobasal Degeneration, CBD) είναι αρκετά σπάνια νόσος και χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρικών κυττάρων, συσσωμάτωση 4R ισομορφών και ατροφία (συρρίκνωση) του φλοιού και των βασικών γαγγλίων. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται γύρω στην ηλικία των 60 ετών και είναι κινητικά. Συνήθως είναι ετερόπλευρα αλλά καθώς η νόσος προχωρά επηρεάζεται ολόκληρο το σώμα. Στη συνέχεια εμφανίζονται και γνωστικά συμπτώματα. Η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (Progressive Supranuclear Palsy, PSP) είναι μια σπάνια νόσος κατά την οποία προσβάλλεται το ανώτερο τμήμα του στελέχους του εγκεφάλου και χαρακτηρίζεται από τη συσσωμάτωση 4R Ταυ ισομορφών. Το βασικό χαρακτηριστικό της είναι η λεγόμενη παράλυση του βλέμματος (το βλέμμα του ασθενούς παραλύει και δεν μπορεί να κοιτά παρά μόνο μπροστά) ενώ τα πιο συνηθισμένα πρώιμα συμπτώματα είναι η αστάθεια, ανεξήγητες πτώσεις και γενική δυσκαμψία του κορμού. Τέλος η μετωποκροταφική άνοια (Frontotemporal Dementia, FTD) είναι μια οικογένεια νόσων που προσβάλλουν κυρίως τον μετωπιαίο και τον κροταφικό λοβό του εγκεφάλου. Αποτελούν το 10% περίπου του συνόλου των περιστατικών άνοιας. Στη Μετωποκροταφική άνοια επηρεάζονται συνήθως οι ικανότητες λήψης αποφάσεων, ιεράρχησης, ελέγχου των κινήσεων κλπ. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει

και η νόσος του Pick το βασικό χαρακτηριστικό της οποίας είναι οι αλλαγές στη συμπεριφορά του ατόμου ενώ τα Ταυ συσσωματώματα στον εγκέφαλο των ασθενών αποτελούνται από 3R ισομορφές. Η σημασία διατήρησης της σωστής αναλογίας 3R:4R ισομορφών έγινε περισσότερο εμφανής ύστερα από γενετικές μελέτες που έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο tau προκαλούν το θάνατο των νευρώνων στις νόσους FTDP-17. Κάποιες από μεταλλάξεις ενώ δεν αλλάζουν την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης, επηρεάζουν το μάτισμα του εξονίου 10 και οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης των 4R ισομορφών ως προς αυτή των 3R.

1.2. Η οικογένεια των πρωτεϊνών MICAL

Οι φλαβινοπρωτεΐνες MICAL (*Molecule Interacting with CasL*) είναι μία εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια από πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, που ρυθμίζουν πολλές βιολογικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, γεφυρώνουν τον οξειδοαναγωγικό μεταβολισμό με την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, συμβάλλουν στον ελλιμενισμό και τη σύντηξη των μεμβρανικών κυστιδίων και δρουν ως αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όταν οι συνθήκες το απαιτούν [30] (Εικόνα 1). Η εμπλοκή τους στη διαφοροποίηση, στη μετανάστευση και στη διακυτταρική επικοινωνία καθιστά τη MICAL λειτουργία σημαντική για την ανάπτυξη και την ομοιοστασία των ιστών. Έτσι, στα θηλαστικά οι νευρωνικά εκφραζόμενες φλαβινοπρωτεΐνες συμμετέχουν στην καθοδήγηση της νευραξονικής αύξησης, στη χωροταξία των κινητικών νευρώνων και στη σύναψη χημικών επαφών [31-40]. Στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα οι MICAL ενεργοποιούνται για να διεγείρουν την ανοσοαπόκριση, ενώ στους δροσοφιλικούς ιστούς εκτελούν νευρωνικές και άλλες διαδικασίες του οργανισμού (δενδριτικό κλάδεμα, κατανομή συναπτικών κομβίων, πλοήγηση κινητικών νευρώνων, μυοϊνιδιακή διαμόρφωση, διασταύρωση σμηριγγών) [41-44].

Οι περισσότερες λειτουργίες, που εκτελούν οι MICAL στο ευκαρυωτικό κυτταροδιάλυμα, σχετίζονται με ακτινο-εξαρτώμενες διεργασίες, οι οποίες εκτυλίσσονται περιμετρικά της πλασματικής και της πυρηνικής μεμβράνης και, περιστασιακά, στα νηματοπόδια (*filopodia*) και στα ελασματοπόδια (*lamellipodia*) [31, 39]. Μόνο στην περίπτωση της MICAL-2 ισομορφής του ανθρώπου, η δυναμική ανασυγκρότηση του ακτινοσκελετού μπορεί να γίνει και μέσα στον πυρήνα, δεδομένου ότι το σήμα πυρηνικής εξαγωγής (*nuclear export signal, NES*), που φέρει στο καρβοξυτελικό της άκρο, επιτρέπει τη μεταφορά της MICAL-2 εντός και εκτός του πυρήνα [45]. Επίσης, οι λειτουργίες MICAL επηρεάζουν ένα σύνολο ιστών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με πρώτο και κύριο το νευρωνικό σύστημα. Στον άνθρωπο και στους ποντικούς, οι MICAL εκφράζονται στους πνεύμονες, στους νεφρούς, στη σπλήνα,

στους όρχεις και στο θύμο αδένια [31, 32], στη *Drosophila melanogaster* ανιχνεύονται στους μύες και στις σμήριγγες [44], ενώ στο zebrafish (*Danio rerio*) οι MICAL εκφράζονται στον καρδιακό ιστό και στις αρτηρίες [46].

Με κατεύθυνση από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο, μία τυπική αλληλουχία MICAL περιέχει τις εξής δομές: μία χαρακτηριστική επικράτεια ~500 αα με καταλυτική δραστικότητα φλαβινικής μονοοξυγενάσης (flavin monooxygenase domain, FMO), μία περιοχή ομόλογη της καλπονίνης - τύπου II (calponin homology domain, CH), μία περιοχή LIM (από τα αρχικά των μεταγραφικών παραγόντων Lin-11, Isl-1, Mec-3 [47, 48]) και μηδέν έως τρία μοτίβα υπερελικωμένης έλικας (coiled coil motifs, CC). Οι τρεις τελευταίες περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με μη συντηρημένες μεταβλητές ακολουθίες. Η MICAL-1 του ανθρώπου εκτός από τις παραπάνω δομές περιέχει ακόμα δύο μοτίβα: μια περιοχή πλούσια σε προλίνη με αμινοξική υπογραφή -Pro-Pro-Lys-Pro-Pro- [31] και μια περιοχή πλούσια σε γλουταμικό οξύ [33, 34]. Η πλούσια σε προλίνη περιοχή αναγνωρίζεται από SH3 δομικές περιοχές σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η CasL, από την οποία προκύπτει η ονομασία MICAL ως ακρωνύμιο του περιφραστικού όρου "Molecule Interacting with CasL [31]. Παρόμοιο δομικό πρότυπο με τις MICAL υιοθετούν και οι μερικά ομόλογες MICAL-Like (MICAL-L) πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν CH, LIM και CC περιοχές, όχι όμως τη σημαντικότερη λειτουργικά περιοχή της φλαβινο-μονο-οξυγενάσης (FMO) [41]. Για αυτό το λόγο, οι MICAL-L δεν μπορούν να συμμετάσχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, παρά μόνο να συγκρατήσουν σηματοδοτικούς παρτενέρ και να μεταβιβάσουν την πληροφορία τους στο εσωτερικό του κυττάρου.

Με τεχνικές σύγκρισης αλληλουχιών, γενετικές και δομικές αναλύσεις έχει αποδειχθεί, ότι η MICAL-FMO συγκρατεί ισχυρά, αλλά μη ομοιοπολικά, ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοσίδιο (flavin-adenine-dinucleotide, FAD). Η δέσμευση του FAD γίνεται στο κέντρο περίπου της επικράτειας χάρη σε τρία διακριτά μοτίβα εν είδη «δακτυλικών αποτύπων» [49-51]. Το πρώτο δακτυλικό αποτύπωμα αναφέρεται στο «μοτίβο αναδίπλωσης Rossmann» ή -G-X-G-X-X-G- (όπου G: γλυκίνη και X: ένα οποιοδήποτε αμινοξύ), η ακεραιότητα του οποίου είναι απολύτως απαραίτητη για την οξειδοαναγωγική δράση των πρωτεϊνών MICAL σε νευρωνικούς και μη νευρωνικούς κυτταρικούς τύπους. Το μοτίβο αυτό συνδέεται με την ADP ενότητα του FAD ή με νουκλεοσίδια πυριδίνης, ενώ διαφέρει πολύ από τα αντίστοιχα μοτίβα δέσμευσης ενός μονονουκλεοσιδίου (FMN) ή των μορίων NAD και NADP [51, 52]. Το δεύτερο δακτυλικό αποτύπωμα -G-D- (όπου G: γλυκίνη και D: ασπαρτικό οξύ) βρίσκεται καρβοξυτελικά του εξαπεπτιδικού μοτίβου -G-X-G-X-X-G-, είναι πολύ καλά συντηρημένο και δεσμεύει τη μονάδα ριβόζης του FAD [49, 50]. Τέλος, το τρίτο δακτυλικό αποτύπωμα -D-G- είναι επίσης συντηρημένο,

εντοπίζεται μεταξύ του πρώτου και δεύτερου δακτυλικού αποτυπώματος και αλληλεπιδρά με την πυροφωσφορική ομάδα του FAD [50].

1.3. Η *Drosophila* ως οργανισμός μοντέλο και ως μοντέλο Ταοπαθειών

Η *Drosophila melanogaster*, γνωστή και ως «μύγα των φρούτων, του κρασιού ή του ξιδιού», αποτελεί το πρώτο μετάζωο που αναπτύχθηκε ποτέ σε μοντέλο βιολογικού συστήματος. Πριν από αυτήν οι επιστήμονες επέλεγαν κυρίως φυτά για να επιβεβαιώσουν τις θεωρίες τους, ιδιαίτερα όσες περιστρέφονταν γύρω από τη γενετική και την εξέλιξη. Όμως, η ανάγκη διεύρυνσης αυτών των θεωριών και σε ζωικά, πέρα από φυτικά, μοντέλα ώθησε τους επιστήμονες να πειραματιστούν με νέους οργανισμούς.

Έτσι λοιπόν, το 1901 ο W. E. Castle εισήγαγε για πρώτη φορά στη γενετική έρευνα τη *Drosophila*. Πρόκειται για μία μύγα, που σύμφωνα με το εμπειρικό της όνομα, συναντάται στην επιφάνεια αποσυνθεμένων φρούτων και δοχείων με ξίδι ή κρασί. Σε αντίθεση, όμως, με τις πραγματικές φρουτόμυγες της οικογένειας των Τεφριτιδών (Tephritidae), η *Drosophila* δεν αλλοιώνει τη σύσταση των παραπάνω τροφών. Απλώς, ελκύεται οσφρητικά από τα προϊόντα της ζύμωσης και καταναλώνει την αναπτυσσόμενη μαγιά. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το μικρό της μέγεθος (~3mm) δικαιολογεί απόλυτα τον Castle στην επιλογή του να δημιουργήσει το πρώτο «fly room», καθώς με λίγο εργαστηριακό χώρο, απλά μέσα παγίδευσης και ένα φθινό υλικό εκτροφής βασισμένο στη μπανάνα κατάφερε να συντηρήσει γενιές διασταυρώσεων και να απομονώσει αμιγή στελέχη [53].

Την ίδια οπτική συμμερίστηκε λίγα χρόνια αργότερα και ο T. H. Morgan, ο οποίος, όντας υπέρμαχος της εξελικτικής θεωρίας του Hugo De Vries και σκεπτικός απέναντι στους νόμους του Mendel, θέλησε να εξάγει τα δικά του συμπεράσματα ως προς την κληρονομικότητα και τη συνεισφορά αυτής στην ειδογένεση. Παρότρυνε, λοιπόν, τους φοιτητές του να αφοσιωθούν στη μελέτη της *Drosophila*, γιατί, αφενός δίνει μεγάλο αριθμό απογόνων και, άρα, τη δυνατότητα στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και, αφετέρου, γιατί ο κύκλος ζωής της είναι μικρός, επομένως, πειράματα που αφορούν πολλές γενιές μπορούν να ολοκληρωθούν σύντομα σε μερικές βδομάδες. Το εργαστήριο του Morgan πειραματίστηκε, τελικά, με διάφορους τρόπους στη *Drosophila* και κατάφερε μέσα σε δύο δεκαετίες να προσδιορίσει ένα μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων -όπως τη μετάλλαξη που προσδίδει λευκό χρώμα ματιών στα αρσενικά άτομα (*white eyes, w*)- τη γενετική δομή της *Drosophila* [54-57] και τις γενετικές επιπτώσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας [58]. Το σημαντικότερο επίτευγμά του, όμως, ήταν η τεκμηρίωση της

χρωμοσωμικής θεωρίας της κληρονομικότητας, για την οποία ο Morgan τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ το 1933 [59, 60].

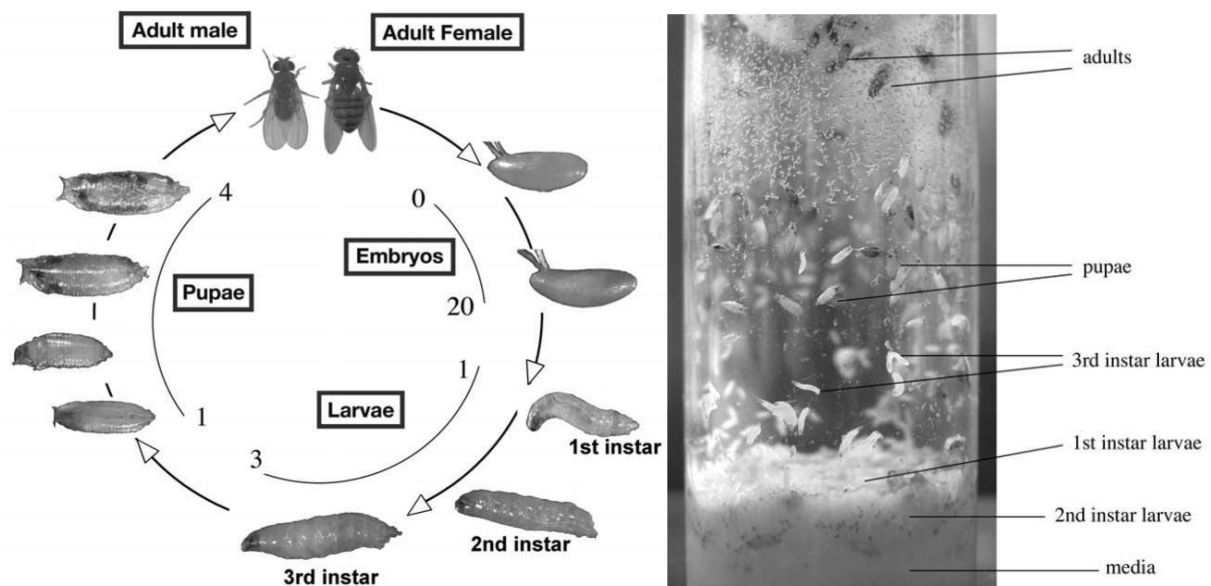
Έκτοτε, η *Drosophila* υιοθετήθηκε από πολλά εργαστήρια και το παράδειγμα του Morgan διευρύνθηκε πέρα από τα όρια της γενετικής προσέγγισης της κληρονομικότητας στο επίπεδο της γενετικής προσέγγισης κάθε αναπτυξιακού, μοριακού, συμπεριφορικού ή και παθολογικού φαινομένου. Για να απαντηθούν, όμως, τα νέα και δύσκολα ερωτήματα που έθεταν συχνά οι ερευνητές έπρεπε πρώτα να αναπτυχθούν εργαλεία και μέθοδοι, που θα απλοποιούσαν τους γενετικούς χειρισμούς της *Drosophila*. Έτσι, κατασκευάστηκαν τα χρωμοσώματα εξισορρόπησης (balancer chromosomes), τα οποία διατηρούσαν υπολειπόμενα ή θνησιγόνα γονίδια σε ετερόζυγη κατάσταση, επιτρέποντας την άμεση διασταύρωσή τους χωρίς προαπαιτούμενη γονοτύπηση [58, 61], ανακαλύφθηκε η επαγόμενη από μεταθετά στοιχεία/ακτίνες X μεταλλαξιγένεση [62, 63] και η κυτταρολογική χαρτογράφηση γονιδίων στα πολυταινικά χρωμοσώματα [64]. Ταυτόχρονα, δημιουργήθηκε μία αρκετά μεγάλη τράπεζα μεταλλαγμένων και διαγονιδιακών σειρών, αλληλουχήθηκαν τα γενώματα του ανθρώπου και της μύγας και αποκαλύφθηκε η ομοιότητα μεταξύ των δύο οργανισμών (60% γονιδιακή ομολογία ή ~75% όταν τα γονίδια αφορούν κληρονομικές ασθένειες [65]).

Στο καλά χαρακτηρισμένο γονιδίωμα της *Drosophila* οι ερευνητές, πλέον, προτυποποιούν ανθρώπινες ασθένειες με σύνθετο υπόβαθρο, όπως είναι για παράδειγμα οι Ταοπάθειες. Λόγω του μικρού κύκλου ζωής, της υψηλής γονιμότητας και της απουσίας ηθικών περιορισμών, η *Drosophila* επιτρέπει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού διαγονιδίων στον εγκέφαλο, ώστε να πραγματοποιηθούν συγκριτικές μελέτες. Ταυτόχρονα, μπορεί να αποκαλύψει νέα γονίδια που εμπλέκονται στη νευροεκφύλιση [66, 67], να αποσαφηνίσει τη λειτουργία τους με μεθόδους λειτουργικής γονιδιωματικής (functional genomics) [68-70] και να διαχωρίσει τα μονοπάτια σηματοδότησης, που οδηγούν σε γνωστικές και μυοσκελετικές δυσλειτουργίες [71, 72]. Η *Drosophila* προσφέρει, επίσης, τη δυνατότητα παρατήρησης τοξικών φαινότυπων σε όργανα του σώματός της, όπως είναι τα μάτια. Με αυτόν τον τρόπο, ανιχνεύονται γονίδια που προδιαθέτουν δια την ανάπτυξη της νόσου και φαρμακευτικοί στόχοι, που μπορούν αξιοποιηθούν σε προκλινικό επίπεδο [73]. Η ποσοτικοποίηση, όμως, της τοξικότητας ή της αποτελεσματικότητας μίας φαρμακευτικής ουσίας γίνεται συνήθως μοριακά ή συμπεριφορικά (υπάρχουν πολλά αυτοματοποιημένα και ημι-αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα). Τέλος, τα δροσοφιλικά μοντέλα Ταοπαθειών ευνοούν τη διερεύνηση των μοριακών γεγονότων που προηγούνται της συσσωμάτωσης και προάγουν το νευροεκφυλισμό, καθώς εμφανίζουν νευροτοξικότητα χωρίς το σχηματισμό νευροϊνιδιακών δεματίων ή συσσωματωμάτων, ενώ προσφέρουν το πλεονέκτημα της έκφρασης

ανθρώπινων διαγονιδίων της Ταυ, τα οποία φωσφορυλιώνονται στα ίδια κατάλοιπα με την υπερφωσφορυλιωμένη Ταυ του εγκεφάλου ασθενών με Alzheimer. Η νευροτοξικότητα στη *Drosophila* μελετάται με διάφορες μεθόδους, όπως είναι η παρατήρηση του rough eye φαινότυπου, ο έλεγχος βιωσιμότητας και αντίστασης στο οξειδωτικό στρες.

1.4. Ο κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster*

Η φρουτόμυγα είναι έντομο ολομετάβολο με μικρό κύκλο ζωής. Ξεκινάει την ανάπτυξή της ως *έμβρυο* σε γονιμοποιημένο ωοθυλάκιο και μεταμορφώνεται σταδιακά σε *προνύμφη* και *νύμφη* πριν αποκτήσει τα χαρακτηριστικά ενός *τέλειου εντόμου*. Η μετάβαση από το ένα αναπτυξιακό στάδιο στο άλλο γίνεται εύκολα αντιληπτή με γυμνό μάτι, ενώ η διάρκειά της εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος.



Εικόνα 1. Ο κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster* σχηματικά (αριστερά) και όπως φαίνεται πραγματικά μέσα σε ένα φιαλίδιο (δεξιά). **A)** Η μεταμόρφωση της *Drosophila* ολοκληρώνεται σε τέσσερα στάδια. Από το στάδιο του εμβρύου, που διαρκεί μερικές ώρες, το άτομο μετατρέπεται σε προνύμφη (larva), ακίνητη νύμφη (pupa) και τέλειο έντομο. Τα τελευταία στάδια ανάπτυξης μετρούνται σε μέρες και όχι ώρες. **B)** Οι προνύμφες πρώτου σταδίου (*1st instar larvae*) εντοπίζονται στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου, οι δεύτερου σταδίου βρίσκονται εντός της τροφής (οι μαύρες τελείες αντιστοιχούν στο στόμα τους), ενώ οι προνύμφες τρίτου σταδίου εξερευνούν ελεύθερα τα τοιχώματα. Στη μέση του φιαλιδίου, υπάρχουν ακινητοποιημένες νύμφες, ενώ πάνω πάνω κοντά στο βαμβάκι κυκλοφορούν πλέον τα ενήλικα άτομα. [Πηγή: *Fernández-Moreno, M.A., et al., Drosophila melanogaster as a model system to study mitochondrial biology, in Mitochondria. 2007, Springer. p. 33-49.*]

Στους 25°C (θερμοκρασία επιλογής για τις καλλιέργειες) το έμβρυο της *Drosophila* μετατρέπεται σε *προνύμφη πρώτου σταδίου* (first-instar larva, L1) εντός 24 ωρών. Χρειάζεται ακόμη ένα 24ωρο για να μετατραπεί σε *προνύμφη δευτέρου σταδίου* (second-instar larva, L2) και ένα επιπλέον 24ωρο για να εισέλθει στο *τρίτο προνυμφικό στάδιο* (third-instar larva, L3). Για τρεις μέρες, επομένως, η μύγα έχει σκληρόμορφο σώμα, χωρίς πόδια ή φτερά, και μετακινείται από την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού (L1) στο εσωτερικό του (L2-L3), τρεφόμενη καθόλη τη διάρκεια της μετακίνησής της με σάκχαρα και μικροοργανισμούς. Εκεί παραμένει μέχρι την έκτη μέρα της ανάπτυξής της, οπότε εξέρχεται από το θρεπτικό μέσο, σχηματίζει κουκούλι και μετατρέπεται σταδιακά σε ακίνητη νύμφη (pupa).

Από την όγδοη έως την δωδέκατη περίπου ημέρα η νύμφη μεταμορφώνεται πλήρως σε ακμαίο άτομο, ιστολύοντας τις προνυμφικές δομές και αντικαθιστώντας τις με νέες. Εξαιρέση αποτελούν οι εμβρυϊκοί δίσκοι, που δεν ιστολύονται, αλλά αναπτύσσονται προοδευτικά σε φτερά, πόδια, μάτια-κεραίες, αλτήρες και σε άλλες εξωτερικές δομές του σώματος. Η *Drosophila*, τελικά, βγαίνει από το κουκούλι της, έχοντας διπλωμένα και κολλημένα στο σώμα της φτερά, λευκό χρώμα και, στην περίπτωση που είναι θηλυκή, ανώριμο αναπαραγωγικό σύστημα. Η ανάπτυξή της ολοκληρώνεται, όταν μετά από τρεις ώρες έχει λάβει το τελικό σχήμα και χρώμα της και -στην περίπτωση που είναι θηλυκή- όταν μετά από δώδεκα ώρες είναι σε θέση να ζευγαρώσει, να γονιμοποιήσει τα ώριμα ωοκύτταρα των ωοθηκών της και να εκκινήσει μέσω των απογόνων της νέους κύκλους ζωής.

Σημειώνεται ότι λόγω θερμοκρασιακής εξάρτησης, η δροσοφιλική ανάπτυξη μπορεί να επιβραδυνθεί στους 18°C (θερμοκρασία επιλογής για τη συντήρηση των stock) και να επιταχυνθεί στους 28°C (συνήθως δεν προτιμάται λόγω αυξημένου κινδύνου αλλοίωσης της τροφής). Έτσι, αν στους 25°C ο κύκλος ζωής της *Drosophila* έχει διάρκεια 10-12 ημέρες, στους 18°C διαρκεί ~20 μέρες και στους 28°C ~7 μέρες, δίνοντας στους ερευνητές το περιθώριο οργάνωσης τόσο του διαθέσιμου πειραματικού χρόνου όσο και των πόρων, που έχουν απομείνει [74].

1.5. Σύστημα GAL4/UAS

Το δυαδικό σύστημα GAL4/UAS είναι ένα πολυδύναμο εργαλείο γενετικής μηχανικής, που επιτρέπει στους ερευνητές να ελέγχουν *in vivo* τη χωροχρονική έκφραση οποιουδήποτε διαγονιδίου. Η λειτουργία του βασίζεται στο μεταγραφικό ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα, GAL4, ο οποίος με την ιδιότητα του trans-ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης ενεργοποιεί γονίδια απομακρυσμένα από τη δική του κωδική αλληλουχία. Για να συμβεί, όμως, αυτό είναι απαραίτητο να υπάρχει μία ειδική για τον GAL4 περιοχή

πρόσδεσης ανοδικά του γονιδίου-στόχου. Η περιοχή αυτή ονομάζεται upstream activating sequence ή συντομογραφικά UAS. Το UAS είναι ένα cis-ρυθμιστικό στοιχείο ανάλογο του ευκαρυωτικού ενισχυτή (enhancer), που, όταν συνδεθεί με τον GAL4, αυξάνει την έκφραση του γειτονικού του γονιδίου.

Για να εφαρμοστεί το GAL4/UAS σύστημα στη *Drosophila melanogaster* θα πρέπει να δημιουργηθούν δύο διαγονιδιακές σειρές: μία σειρά «οδηγός», στην οποία το GAL4 γονίδιο θα εκφράζεται καθοδικά ενός ιστοειδικού επαγωγέα χωρίς να έχει κάποιο UAS στόχο, και μία σειρά «απόκρισης», που θα φέρει γονιδιωματικά την ένθεση UAS-υποκινητής-διαγονίδιο σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, όμως, δε θα μπορεί να εκφράσει το διαγονίδιο απουσία του GAL4. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη διασταύρωση των παραπάνω σειρών και τη δημιουργία ενός νέου στελέχους, που θα εκφράζει ιστοειδικά το επιθυμητό γονίδιο από τα πρώτα κιόλας στάδια εμβρυονικής ανάπτυξης.

Η θερμοκρασία καλλιέργειας και διασταύρωσης των στελεχών παίζει καθοριστικό ρόλο στη δραστηριότητα του συστήματος GAL4/UAS. Για πειράματα χρονικά καθορισμένα με σταθερά επίπεδα έκφρασης διαγονιδίων επιλέγουμε συνήθως τη θερμοκρασία των 25°C. Έχει παρατηρηθεί, ωστόσο, ότι στους 16°C η μεταγραφική ενεργότητα του GAL4 μειώνεται στο ελάχιστο, ενώ στους 29°C αποκτά τη μέγιστη δυνατή τιμή, χωρίς επιπτώσεις στη γονιμότητα ή τη βιωσιμότητα. Επομένως, υπάρχει η δυνατότητα αύξησης της θερμοκρασίας έως και τους 29°C σε περιπτώσεις όπου κρίνεται σκόπιμη η ενίσχυση της έκφρασης του διαγονιδίου ή/και η επίσπευση της ανάπτυξης του οργανισμού, προσέχοντας πάντα για το ενδεχόμενο ανάπτυξης βακτηρίων. Αντίθετα, όταν καλλιεργούνται στελέχη, που φέρουν τοξικά διαγονίδια, είναι στρατηγικά συμφέρον να μειώσουμε τη θερμοκρασία κατά την ανάπτυξη, αποφεύγοντας την εκδήλωση ανεπιθύμητων θνησιγόνων φαινοτύπων, και στη συνέχεια να την αυξήσουμε στους 29°C, ώστε να επάγουμε ισχυρή διαγονιδιακή έκφραση [75].

1.6. Το σύστημα TARGET

Το σύστημα TARGET αποτελεί μία εξευγενισμένη παραλλαγή του συμβατικού GAL4/UAS συστήματος, το οποίο πέρα από υψηλή ιστοειδική στόχευση προσφέρει και έλεγχο επί της χρονικής στιγμής στην οποία θα εκφραστεί ένα διαγονίδιο. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται μία θερμοευαίσθητη μετάλλαξη της πρωτεΐνης GAL80 (GAL80^{ts}), η οποία εισάγεται καθοδικά ενός υποκινητή τουμπουλίνης και έκτοτε εκφράζεται καθολικά στα κύτταρα του οργανισμού. Όταν η *Drosophila* αναπτύσσεται στους 19°C, τότε η πρωτεΐνη GAL80^{ts} είναι λειτουργική και συνδέεται με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή GAL4,

αναστέλλοντας αποτελεσματικά τη δράση του. Όταν, όμως, η θερμοκρασία αυξηθεί στους 30°C, τότε η GAL80^{ts} πρωτεΐνη αδρανοποιείται και ο GAL4, ελεύθερος πλέον να δράσει, ενεργοποιεί ιστοειδικά την έκφραση του UAS-διαγονιδίου. Η θερμοκρασία επαγωγής του συστήματος TARGET είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχία ενός πειράματος καθώς η μέγιστη καταστολή επιτυγχάνεται στους 19°C ενώ η πλήρης επαγωγή του συστήματος στους 30°C. Με αυτό το σύστημα είναι δυνατόν να μελετηθούν συστηματικά τα κρίσιμα χρονικά διαστήματα στα οποία ένα διαγονίδιο θα πρέπει να εκφράζεται για να εμφανιστεί ένας συγκριμένος φαινότυπος. Επίσης, επάγει την αναπτυξιακή σίγαση διαγονιδίων τα οποία θα ήταν πολύ τοξικά έως και θνησιγόνα εάν εκφράζονταν στα προνυμφικά ή νυμφικά στάδια της *Drosophila* [76].

1.7. Η RNA παρεμβολή

Η παρεμβολή του RNA (RNA interference, RNAi) είναι μία φυσική μέθοδος σίγασης γονιδίων που εκτελείται σε μεταμεταγραφικό επίπεδο, όταν ώριμα mRNA -ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης- αναζητούν μη εξουσιοδοτημένη πρόσβαση στο μεταφραστικό μηχανισμό του κυττάρου. Πρόκειται για μία δικλίδα ασφαλείας του προγράμματος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης που συναντάται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ενεργοποιείται αποτελεσματικά από δίκλωνες ριβονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (double-stranded RNA, dsRNA) [77]. Οι αλληλουχίες αυτές μπορεί να έχουν είτε δομή στελέχους-βρόγχου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των πρόδρομων μικροRNA (precursor microRNA, pre-miRNA ή pre-miR) και των μικρών RNA σε σχήμα φουρκέτας (short hairpin RNA, shRNA), είτε γραμμική μορφή, όπως το δίκλωνο γονιδίωμα κάποιων RNA ιών. Πάντοτε, όμως, αναγνωρίζονται από τα κύτταρα ως μη ειδικά παθογόνο-συνδεδεμένα μοριακά μοτίβα (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), τα οποία αντιπροσωπεύουν κάποιο είδος απειλής.

Για οργανισμούς, όπως είναι τα φυτά και τα κατώτερα σπονδυλωτά που δεν έχουν αναπτύξει ειδική ανοσία, η απειλή συνίσταται στην εγκαθίδρυση κάποιας επίμονης ιικής λοίμωξης. Τέτοιου είδους λοιμώξεις προκαλούνται από dsRNA ιούς, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται και επιβιώνουν σε βάρος των κυττάρων, ενώ πυροδοτούν την RNA παρεμβολή ως μέρος του PAMP-επαγόμενου συστήματος (PAMP-triggered immunity, PTI) της φυσικής ανοσίας. Ανάλογο σύστημα υπάρχει και στα θηλαστικά, όμως, η δράση του επικαλύπτεται από ισχυρότερους αντιϊικούς φραγμούς (ιντερφερόνες [78, 79], αντι σώματα, ειδικά λεμφοκύτταρα). Η μόνη περίπτωση, στην οποία η RNA παρεμβολή παίζει έναν ουσιαστικά προστατευτικό ρόλο έναντι των ιών, είναι αυτή των αδιαφοροποίητων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (induced pluripotent stem cells, iPSC) και αυτό γιατί δεν εκφράζουν υψηλά επίπεδα ιντερφερονών [80].

Αλλά σε γενικές γραμμές το RNAi μονοπάτι στα θηλαστικά επωμίζεται το ρόλο της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, του περιορισμού της μετάθεσης των ρετροτρανσποζονίων και της καταστολής της μεταγραφής γονιδίων που βρίσκονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές.

Τα ένζυμα της RNAi οδού, που, συμπερασματικά, καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση, την εξάπλωση ενδογενών παρασιτικών ή εξωγενών παθολογικών γενετικών στοιχείων [81], είναι συντηρημένα σε όλα τα φυτά, τα ζώα και τους μύκητες. Η δράση τους οριοθετείται αυστηρά εντός του ευκαρυωτικού κυτταροδιαλύματος και μεθοδεύεται στρατηγικά, ώστε με μήτρα ένα δίκλωνο RNA, συμπληρωματικό προς το mRNA-στόχο, να κατασκευαστούν μικρά ρυθμιστικά RNA, που θα χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη στόχευση και παροδική αναστολή των παραβατικών πρωτεϊνοσυνθετικών συμβάντων [82-85]. Στη *Drosophila melanogaster*, η αναλυτική διαδικασία έχει ως εξής:

Όταν πρόδρομες μορφές μικρών ρυθμιστικών RNA (pre-miRNA, dsRNA, shRNA) βρεθούν στο κυτταροδιάλυμα, αναγνωρίζονται από ένζυμα της οικογένειας των RNασών III, Dicer-1 (DCR-1) και Dicer-2 (DCR-2). Το DCR-1 κόβει εξειδικευμένα pre-miRNAs κοντά στον τερματικό τους βρόγχο [86-90] με σκοπό να δημιουργήσει δίκλινα miRNA [91-94]. Το DCR-2, από την άλλη, τεμαχίζει εξειδικευμένα dsRNAs και shRNAs, για να δημιουργήσει, εξίσου δίκλινα, μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (small interfering RNA, siRNA) [95]. Η διαφορά των δύο προϊόντων αποκοπής έγκειται στην προέλευση και στο ρυθμιστικό τους ρόλο. Δηλαδή, τα miRNA παράγονται ενδογενώς από μη κωδικοποιούσες, ιντρονικές ή διαγονιδιακές (intergenic) περιοχές [96], με σκοπό να αποτρέψουν την υπέρμετρη ή την έκτοπη έκφραση μίας ενδογενούς πρωτεΐνης. Αντίθετα, τα siRNA είναι εξωγενούς προέλευσης, προκύπτοντας είτε από την έκφραση ιικών γονιδίων είτε, όπως συμβαίνει κατά κόρον στη *Drosophila*, από την πειραματική έκφραση πλασμιδιακών φορέων. Οι πλασμιδιακοί φορείς περιέχουν μία ανεστραμμένη επανάληψη (παλίνδρομη αλληλουχία) [86] καθοδικά ενός υποκινητή RNA πολυμεράσης II ή III [97-99], η οποία εκφράζεται χωρίς να περιορίζεται μακροπρόθεσμα από την κυτταρική διαίρεση [100, 101]. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η μακροπρόθεσμη μεταμεταγραφική σίγαση ενός γονιδίου, που είναι κομβικής σημασίας για δεδομένο φαινότυπο.

Ανεξάρτητα από τις διαφορές τους, τα miRNA και τα siRNA είναι δίκλινα μόρια μήκους ~21-23 ζευγών βάσεων με ασύμμετρα άκρα, καθώς δύο νουκλεοτίδια υπερεκτείνονται από το 3' άκρο κάθε συμπληρωματικού κλώνου. Από τους δύο κλώνους μόνο ο ένας συμμετέχει στο μονοπάτι της RNA παρεμβολής. Ο άλλος κλώνος γνωστός και ως «κλώνος επιβάτης» αποικοδομείται. Το DCR-1 με τη βοήθεια του συμπαραγόντα Loquacious PB (Loqs PB) [91-94] και το DCR-2 με τη βοήθεια του δικού του συμπαραγόντα, R2D2 [95], σχηματίζουν ετεροδιμερή συμπλέγματα και αναγνωρίζουν τη θερμοδυναμική

ασυμμετρία στα δίκλωνα miRNA και siRNA, αντίστοιχα. Ο θερμοδυναμικά ασταθής κλώνος (αντισημαίνων, antisense, 3' → 5') σχηματίζει τον «κλώνο οδηγό» και είναι μέρος του ενεργού συμπλέγματος RISC (RNA-induced silencing complex), το οποίο έχει ριβονουκλεοτιδική ικανότητα [102]. Τα δίκλωνα miRNA και siRNA που έχουν δεσμευτεί από τα DCR-1/Loqs PB και DCR-2/R2D2, αντίστοιχα, συνιστούν μαζί τους τα R1 συμπλέγματα, όπως αποκαλούνται, και έπειτα δημιουργούν παροδικά τα R2 συμπλέγματα. Τα συγκεκριμένα συμπλέγματα ενεργοποιούνται έπειτα από το ATP για να σχηματίσουν το επαγόμενο από RNA σύμπλοκο, RISC. Έχει αποδειχθεί, ότι η πρωτεΐνη Αργοναύτης, AGO2, αντικαθιστά τις πρωτεΐνες Loqs PB και R2D2 και ο κλώνος-επιβάτης (σημαίνων, sense, 5'→3') που έχει συνδεθεί μαζί τους καταστρέφεται [103-105]. Το ενεργό σύμπλοκο RISC περιέχει ένα μονόκλωνο miRNA ή siRNA συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη AGO2, την VIG (vasa intronic gene), την TSN (tudor staphylococcus nuclease) και την dFMR1 (Fragile-X-related) [106]. Το τελικό βήμα είναι η πρόσδεση του ενεργού RISC στο mRNA που είναι συμπληρωματικό ως προς το μονόκλωνο miRNA ή το siRNA και η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω αποικοδόμησης του παραβατικού μετάγραφου [107]

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Καλλιέργεια και στελέχη *Drosophila*

Τα διαγονιδιακά στελέχη της *D. melanogaster* κατασκευάστηκαν με το σύστημα ένθεσης PhiC31 (ΦC31), που επιτρέπει την ενσωμάτωση cDNA αλληλουχιών (έως 100kb) σε προκαθορισμένες attP θέσεις του γονιδιώματος της μύγας. Ως κοινός γενετικός τόπος επιλέχθηκε μία attP θέση στο II χρωμόσωμα της *Drosophila*, από τον οποίο οι κωδικές αλληλουχίες των ισομορφών της Tau (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R), της ενδογενούς φλαβινο-μονο-οξυγενάσης των μυγών (Mical) και του RNA παρεμβολής της Mical (R2) εκφράζονταν σε ίσα επίπεδα, καθιστώντας εφικτές τις μεταξύ τους συγκρίσεις. Έτσι, βάσει της μορφολογίας των φτερών αναγνωρίζονταν οι απόγονοι της πρώτης θυγατρικής γενιάς, που έφεραν τον επιθυμητό συνδυασμό διαγονιδίων. Στα περισσότερα πειράματα αξιοποιήθηκε ο ενδογενής παν-νευρωνικός επαγωγέας της *D. melanogaster*, *Elav^{C155}*, για την κατεύθυνση της διαγονιδιακής έκφρασης στους μετα-μιτωτικούς νευρώνες του εντόμου υπό τον έλεγχο του δυαδικού συστήματος GAL4/UAS. Εξάιρεση αποτέλεσαν τα πειράματα πρωτεομικής, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο διπλός επαγωγέας *Elav^{C155}/Ras*, αντί του απλού *Elav^{C155}*, και η μελέτη της μακροζωίας, στην οποία τα διαγονίδια έπρεπε να εκφραστούν κατά την ενήλικη ζωή της μύγας υπό τον χωροχρονικό έλεγχο του συστήματος TARGET. Όλες οι καλλιέργειες και οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε τροφή από σιτάλευρο και ζάχαρη, εμπλουτισμένη με αλεύρι σόγιας και CaCl₂ (πίνακας), ενώ εντός των επωαστικών

κλιβάνων επικρατούσαν σταθερές συνθήκες με 50-70% σχετική υγρασία, 12ωρη εναλλαγή φωτός-σκοταδιού και θερμοκρασία 25 °C (GAL4/UAS) ή 30 °C (TARGET, ενίσχυση έκφρασης με GAL4/UAS).

Σχήμα τροφής μυγών

<i>dH₂O</i>	8500mL
<i>Σιμιγδάλι</i>	140g
<i>Αλεύρι ολικής άλεσης</i>	180g
<i>Καστανή ζάχαρη</i>	180g
<i>Φρουκτόζη</i>	72g
<i>Αλεύρι σόγιας</i>	15g
<i>CaCl₂</i>	6g
<i>Ξηρή μαγιά</i>	210g
<i>Άγαρ</i>	45g
<i>Niragen (2% σε αιθανόλη)</i>	21mL
<i>Προπιονικό οξύ</i>	35mL

2.2. Ανοσοαποτύπωση - Western blotting (single-head)

1 κεφαλή ενήλικης, θηλυκής μύγας (0-3 ημέρες μετά από την έκδυση) ομογενοποιείται σε 20μL διαλύματος 1 × Laemmli (100mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 2% bromophenol blue). Το ομογενοποίημα θερμαίνεται (89°C × 3min), φυγοκεντρείται για ελάχιστα δευτερόλεπτα (spin down) και αναδεύεται ήπια, ώστε 14μL του όγκου του να φορτωθούν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (v/v). Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (120V), οι πρωτεΐνες του δείγματος μεταναστεύουν εντός του πηκτώματος σε αποδιαταγμένη κατάσταση με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Έτσι, πολυπεπίδια ίδιου μεγέθους συγκεντρώνονται και δημιουργούν μπάντες, που ηλεκτρομεταφερόμενες (120V, 75min) σε PVDF μεμβράνη (7.5cm × 5cm), μπορούν να ανοσοεντοπιστούν και να προσδιοριστούν. Για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε αραιό διάλυμα γάλατος (10% w/v σκόνη γάλατος σε 1 × TBST) επί τουλάχιστον 30min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το γάλα αποχύνεται και μία πιο αραιή εκδοχή του (3% w/v σκόνη γάλατος σε 1 × TBST) προστίθεται στη μεμβράνη, εμπλουτισμένη με πρωτογενή, μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού. Το πρώτο αντίσωμα αναγνωρίζει τις ισομορφές της ανθρώπινης πρωτεΐνης Tau (5A6, αραιώση 1:1667, Developmental Studies Hybridoma Bank), ενώ το δεύτερο την ενδογενή συνταξίνη

(Syx) της *D. melanogaster* (8C3, αραιώση 1:3000, Developmental Studies Hybridoma Bank). Η επώαση πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C.

Την επόμενη ημέρα, το διάλυμα αποχύνεται, η μεμβράνη εκπλένεται με 1 × TBST (3 × 10min) και τα πρωτογενή αντισώματα, που έχουν δεσμευτεί στην επιφάνειά της, επώάζονται (2h, RT) σε διάλυμα γάλατος 3% (w/v) με δευτερογενή, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι ποντικού (αM, αραιώση 1:5000, Jackson Immunoresearch). Τα αντισώματα, συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase, HRP), έχουν την ικανότητα παρουσία κατάλληλου υποστρώματος να δημιουργούν προϊόν, που εκπέμπει φως. Για αυτό, μετά την επώαση η μεμβράνη εκπλένεται τρεις φορές (10min) με 1 × TBST και προστίθεται στην επιφάνειά της εμφανιστικό διάλυμα (Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). Η ενδεδειγμένη ποσότητα εμφανιστικού ανά μεμβράνη (1.5mL) προκύπτει από την ανάμιξη δύο συστατικών διαλυμάτων: ενός, που περιέχει H₂O₂, το ειδικό υπόστρωμα της HRP, και ενός δεύτερου, που περιέχει ενισχυτή σήματος με λουμινόλη. Με πεντάλεπτη επώαση της μεμβράνης στο εμφανιστικό, οι πρωτεϊνικές ζώνες αποκαλύπτονται και το σήμα, που δίνουν, ορατό στο UV, ψηφιοποιείται από ένα κατάλληλο σύστημα απεικόνισης (ChemiDoc™ XRS+ Imager, Bio-Rad).

2.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης συσσωματωμάτων

Σημείωση: Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας και της επεξεργασίας ενός δείγματος, που προορίζεται για διαφορική φυγοκέντρηση, είναι σημαντικό να διατηρείται η θερμοκρασία σε χαμηλά επίπεδα (4 °C), γιατί τα πρωτεολυτικά ένζυμα των εγκεφαλικών ιστών μπορούν να αποικοδομήσουν την Tau. Με εξαίρεση, λοιπόν, τις περιπτώσεις, που υποδεικνύεται κάτι διαφορετικό, δουλεύουμε σε πάγο ή με ψυχόμενες συσκευές. Η διαδικασία παρατίθεται παρακάτω όπως προτάθηκε από τους Cowan et al [108].

10 κεφαλές ενήλικων, θηλυκών μυγών (0-3 ημέρες μετά από την έκδυση) ομογενοποιούνται σε 50μL υδατικού διαλύματος A (50mM Tris-HCl pH 7.4, 175mM NaCl, 1M sucrose, 5mM EDTA, 10μL/mL phosphatase inhibitor, 10μL/mL protease inhibitor). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται (3000g × 5min, 4 °C) και το υπερκείμενο (40μL) απαλλαγμένο από κυτταρικά υπολείμματα υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρηση (186000g × 2h, 4 °C). Από αυτή τη διαδικασία προκύπτει ένα νέο υπερκείμενο, 40μL του οποίου παραλαμβάνονται και αποθηκεύονται στους -20 °C. Πρόκειται για το S1 κλάσμα της Tau, που είναι πλήρως υδατοδιαλυτό. Το ίζημα του διαχωρισμού διαλυτοποιείται σε 40μL υδατικού διαλύματος B (50mM Tris-HCl pH 7.4, 175mM NaCl, 5% v/v SDS) και υπερφυγοκεντρείται εκ νέου (186000g×2h, 25 °C),

δίνοντας ένα S2 υπερκείμενο, που αντιπροσωπεύει το διαλυτό στο SDS κλάσμα της Ταυ. Το νέο ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 40μL υδατικού διαλύματος B, στη συνέχεια υπερφυγοκεντρείται (186000g×2h, 25 °C) και το τελευταίο υπερκείμενο απορρίπτεται. Με ήπια αναρρόφηση και 20μL διαλύματος ουρίας (50μL Tris pH 7.4, 35μL NaCl, 800μL SDS 10% w/v, 8M urea) το ίζημα αποκολλάται από τα τοιχώματα του γυάλινου σωληναρίου και μεταφέρεται ποσοτικά σε νέο σωληνάριο (Eppendorf, 1.5mL) για ολονύκτια περιστροφή σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό είναι πλέον το S3 κλάσμα της Ταυ, που περιέχει αδιάλυτη στην ουρία πρωτεΐνη.

Το επόμενο πρωί, προσθέτουμε στα δείγματα S1, S2 και S3 τόση ποσότητα διαλύματος 5×Laemmli (χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη), ώστε επί του τελικού όγκου να γίνει η συγκέντρωσή του 1×Laemmli (στα 40μL δείγματος > 10μL 5×Laemmli, στα 20μL > 5μL 5×Laemmli). Τα δείγματα ομογενοποιούνται και φορτώνονται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου 10% χωρίς θέρμανση για να ακολουθήσει η ανάλυση western blot με τον τρόπο, που αναφέρεται παραπάνω. Τα πρωτογενή, μονοκλωνικά αντισώματα, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών ήταν το 5A6 (αραίωση 1:1700, Developmental Studies Hybridoma Bank) και το 8C3 (αραίωση 1:3000, Developmental Studies Hybridoma Bank), ενώ από τα δευτερογενή χρησιμοποιήθηκε το aM (αραίωση 1:5000, Jackson Immunoresearch).

2.4. Ανάλυση πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (Microtubule binding assay)

Για την μελέτη της ικανότητας της Ταυ να προσδέεται στους μικροσωληνίσκους ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως προτάθηκε από τους Feuillet et al [109]. 50 κεφαλές ενήλικων, διαγονιδιακών μυγών (0-3 ημέρες μετά από την έκδυση) με αναλογία φύλου 1:1 ομογενοποιούνται σε 175μL υδατικού διαλύματος A (50mM Hepes pH 7.0, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA pH 8.0, 20μM taxol, 10μL/mL phosphatase inhibitor, 10μL/mL protease inhibitor) και φυγοκεντρώνται (1000g×10min, RT). Στο εναπομείναν διάλυμα A προστίθεται σουκρόζη, ώστε βάσει του αρχικού όγκου του να παρασκευαστεί ένα νέο διάλυμα σουκρόζης 50% (w/v). Σε γυάλινο σωληνάκι υπερφυγοκέντρου εγχύονται ήπια και διαδοχικά 2×150μL διαλύματος σουκρόζης 50% και 150μL υπερκείμενου από το δείγμα. Οι δύο φάσεις δεν πρέπει να αναμειχθούν, διαφορετικά θα επηρεαστεί η ποιότητα του διαχωρισμού κατά την υπερφυγοκέντρωση (100000g×30min, 25°C). Στο τέλος του μισάωρου, παραλαμβάνονται 80μL από το υπερκείμενο και αναμιγνύονται με 80μL διαλύματος 2×Laemmli (100mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 2% bromophenol blue). Το υπόλοιπο υπερκείμενο και το διάλυμα της σουκρόζης, που περιέχεται στο γυάλινο σωληνάριο, απομακρύνεται

χωρίς να επιμολυνθεί το ίζημα από την άνω στιβάδα του δείγματος. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε 100μL διαλύματος 2×Laemmli και αντιπροσωπεύει πλέον το κλάσμα «P» της Ταυ, που είναι προσδεμένο στους μικροσωληνίσκους των νευρώνων. Το «S» υπερκείμενο, αντίθετα, συμβολίζει την ελεύθερη Ταυ του κυτταροπλάσματος. Και τα δύο δείγματα θερμαίνονται (89°C × 3-5min), φυγοκεντρούνται σύντομα (spin down) και αναδεύονται ήπια, ώστε να 20 μL από το καθένα να φορτωθεί σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8% (v/v). Ακολουθεί ανάλυση ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας τα ίδια ακριβώς αντισώματα στις ίδιες ακριβώς αναλογίες με το πρωτόκολλο μονής κεφαλής (single – head), μόνο που αντί του 8C3 επιλέγουμε το E7, ένα πρωτογενές, μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης (αραίωση 1:200, Developmental Studies Hybridoma Bank).

2.5. Μελέτη μακροζωίας (Longevity assay)

Για κάθε γονότυπο, που εντάσσεται στη συγκριτική μελέτη, συλλέγονται 300 ενήλικες, αρσενικές μύγες (0-3 ημέρες μετά από την έκδυση). Οι πληθυσμοί τους χωρίζονται σε 15 υποομάδες των 20 εντόμων και μοιράζονται σε αριθμημένα vials με 3mL φρέσκιας, κανονικής τροφής. Μόλις συγκεντρωθεί το σύνολο των υποομάδων, το πείραμα ξεκινάει μεταφέροντας τις μύγες άπαξ στους 30°C για επαγωγή της διαγονιδιακής έκφρασης. Κάθε 2-3 μέρες τα vials αντικαθίστανται, ώστε να εξασφαλίζεται η καλή κατάσταση της τροφής, ενώ το περιεχόμενό της εμπλουτίζεται με 10μL υδατικού διαλύματος αμπικιλίνης (50mg/mL) προς αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων. Σε κάθε αλλαγή του θρεπτικού υλικού, ο πληθυσμός των μυγών μετρείται και καταγράφεται. Καθώς οι μέρες περνούν οι μύγες πεθαίνουν όλο και πιο μαζικά με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι χρονικές μετρήσεις του πειράματος, το οποίο ολοκληρώνεται, όταν όλες οι μύγες των vial έχουν πεθάνει φυσικά.

2.6. Μελέτη αντίστασης στο οξειδωτικό στρες (Oxidative stress resistance assay)

Το πείραμα αυτό μοιάζει αρκετά με τη μελέτη μακροζωίας. 300 ενήλικες, αρσενικές μύγες ανά γονότυπο συλλέγονται και μοιράζονται σε 15 υποομάδες των 20 εντόμων. Αυτή τη φορά, όμως, τοποθετούνται σε vials με 3mL τροφής, που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου (10% w/v sucrose, 1% w/v agar, 5% v/v H₂O₂, 1×PBS, dH₂O). Οι μύγες καλλιεργούνται στους 25°C με 50-70% σχετική υγρασία και εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12 ώρες. Η τροφή τους ανανεώνεται μία φορά την ημέρα και μετρείται ο αριθμός των μυγών, που πεθαίνουν ανά 24, 36, 48, 60, 65, 70, 82 και 87 ώρες από τη στιγμή της έναρξης του πειράματος. Η διαδικασία ολοκληρώνεται θεωρητικά στις 90 ώρες καλλιέργειας, μιας και κανένας

γονότυπος, ακόμη και εκείνος που χρησιμοποιείται ως στέλεχος ελέγχου, δεν επιβιώνει μετά από τέτοια έκθεση σε οξειδωτικό παράγοντα.

2.7. Πρωτεομική ανάλυση με τη χρήση LC-MS/MS

2.7.1. Απομόνωση των επισημασμένων με ετικέτα FLAG πρωτεϊνών

Η πειραματική ανάπτυξη του συγκεκριμένου πρωτόκολλου απαιτεί τη μεταχείριση ενήλικων, διαγονιδιακών μυγών, που καταλαμβάνουν όγκο 10-15mL σε σωληνάριο Falcon (50mL) υπό συνθήκες αναισθητοποίησης με CO₂. Επειδή ο όγκος αυτός είναι αρκετά μεγάλος, για να συγκεντρωθεί το σύνολο των απαραίτητων οργανισμών πραγματοποιούνται 10 διασταυρώσεις (σε μπουκάλια των 37mL) ανά γονότυπο και ανά δείγμα. Από την πρώτη θυγατρική γενιά (F1) των απογόνων συλλέγονται όλα τα έντομα ανεξαρτήτως φύλου και, ενόσω είναι ζωντανά, ψύχονται με υγρό άζωτο. Ο πλαστικός περιέκτης τους (Falcon, 50mL) ανακινείται έντονα και παρουσία του κρυογονικού υγρού ο αρθρωτός σκελετός της μύγας κατακερματίζεται. Με εργαστηριακό κόσκινο διπλού, ανοξειδωτού πλέγματος απομονώνονται οι κεφαλές των μυγών και 1-1.5mL εξ αυτών αναμιγνύονται με 2mL υδατικού διαλύματος λύσης (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 μL/mL protease inhibitor) σε νέο σωληνάριο Falcon (15mL). Σημειώνεται, πως όλα τα διαλύματα, τα δείγματα, τα επιμέρους εργαλεία και οι συσκευές πρέπει να είναι πάντα παγωμένα, διαφορετικά τα πρωτεολυτικά ένζυμα αποικοδομούν τις πρωτεΐνες τάχιστα και εισάγουν σφάλμα στην ανάλυση. Το εναιώρημα των κεφαλών ομογενοποιείται άμεσα και αφού το δείγμα μοιραστεί σε δύο σωληνάρια Eppendorf (1.5mL), συντηρείται σε πάγο μέχρι να εκτελεστεί το επόμενο βήμα. Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνται 5-6 φορές (5000g×30s, 4°C), ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υπολειμματική μάζα του ιστού και να παραμείνουν στο υπερκείμενο μόνο οι ολικές πρωτεΐνες του εγκεφαλικού εκχυλίσματος, μαζί με 2N4R Tau, που μας ενδιαφέρει.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρούν με την 2N4R (HH) Tau, επιλέγουμε σφαιρίδια αгарόζης επικαλυμμένα με αντι-FLAG αντίσωμα, τα οποία δεσμεύουν επιλεκτικά πρωτεΐνες με αλληλουχία σήμανσης FLAG (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C). Τα σφαιρίδια (ANTI-FLAG M2 affinity gel, SIGMA) συντηρούνται στους -20°C μέσα σε διάλυμα γλυκερόλης 50% (v/v), εμπλουτισμένο με 10mM Na₃PO₄, 150mM NaCl, 0.02% (w/v) NaN₃, pH 7.4 για μέγιστη σταθερότητα. Υπολογίζεται, ότι 75μL από το διάλυμα των σφαιριδίων αρκούν για την ποσοτική δέσμευση της 2N4R, που έχει επισημανθεί με ετικέτα FLAG. Για να αξιοποιηθούν, όμως, σωστά πρέπει πρώτα να φυγοκεντρηθούν (5000g×30s, 4°C), τα σφαιρίδια να εκπλυθούν στις ίδιες συνθήκες (5000g×30s, 4°C) με παγωμένο διάλυμα TBS (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.4), να προσαρμοστούν στη συνέχεια στο

περιβάλλον του αρχικού διαλύματος λύσης (5000g×30s, 4°C) και τέλος να επωαστούν στο εγκεφαλικό εκχύλισμα των μυγών. Τα σφαιρίδια εντός του δείγματος περιστρέφονται ολονύκτια στους 4°C και το επόμενο πρωί, που η επιφάνειά τους θα έχει κορεστεί με FLAG-tagged 2N4R πρωτεΐνες, υποβάλλονται σε έναν ακόμη κύκλο φυγοκεντρήσεων. Σκοπός τους είναι αφενός να απομακρυνθεί το υπερκείμενο, προσεκτικά, χωρίς απώλεια σφαιριδίων, και αφετέρου να εκπλυθούν τα σφαιρίδια τέσσερις φορές με παγωμένο διάλυμα TBS (5000g×30s, 4°C, 4 φορές). Το τελευταίο υπερκείμενο αφαιρείται ποσοτικά, ακόμη και αν χρειαστεί να αφαιρεθούν σφαιρίδια, γιατί το pH του TBS είναι πολύ υψηλό και δε θα καταφέρουν οι πρωτεΐνες να αποδεσμευτούν. Τέλος, 200μL φρέσκου διαλύματος έκλουσης (0.1M glycine HCl, pH 3.5) προστίθενται στο δείγμα και μετά από περιστροφή 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο μαζί με 20μL συμπυκνωμένου διαλύματος 10×TBS (1.5M NaCl, 100mM Tris) συλλέγονται σε νέο Eppendorf (1.5mL) για αποθήκευση στους -20 °C. Η ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της FLAG-tagged 2N4R έγινε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών (liquid chromatography with tandem mass spectrometry).

2.8. Στατιστική ανάλυση

Οι εντάσεις των σημάτων ποσοτικοποιήθηκαν με ανάλυση πυκνομετρίας χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image Lab™ 5.2 (Bio-Rad). Για να εξαλειφθεί κάθε πιθανό σφάλμα φόρτωσης των δειγμάτων, υπολογίστηκε ο λόγος των εντάσεων Tau/Syntaxin ή Tau/Tubulin ανά δείγμα και, στη συνέχεια, οι λόγοι αυτοί κανονικοποιήθηκαν ανά πείραμα ως προς τον αντίστοιχο λόγο του στελέχους ελέγχου (ορίστηκε ως 1). Στη μεθοδολογία «κλασματοποίηση των σφαιρικών ολιγομερών της Ταυ βάσει διαλυτότητας» υπολογίστηκαν επιπλέον οι λόγοι των εντάσεων S1/S2 για κάθε δείγμα και οι λόγοι αυτοί κανονικοποιήθηκαν ανά πείραμα ως προς το S1/S2 του στελέχους ελέγχου (ορίστηκε επίσης ως 1). Σε όλα τα πειράματα, πέραν της πρωτεομικής, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA με post-hoc έλεγχο (δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunnett, $\alpha=0.05$). Σε κάθε γραφική παράσταση παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM) από δεδομένα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας συμβολίζονται ως εξής: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και **** $p < 0.0001$. Στα πειράματα πρωτεομικής, τέσσερις βιολογικές και δύο τεχνικές επαναλήψεις ομαδοποιήθηκαν ανά γονότυπο (*Elav^{C155}/Ras ; 2N4R* και *Elav^{C155}/Ras ; 2N4R/R2*). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Perseus (έκδοση 1.6.10.0), ενώ ο έλεγχος της υπόθεσης με τη δοκιμασία t (t-test) δύο ανεξάρτητων δειγμάτων.

4. Αποτελέσματα

4.1. Γενετικοί χειρισμοί της Mical μεταβάλλουν αναλογικά τα επίπεδα των 3R και 4R Tau ισομορφών στους νευρώνες

Στην παρούσα εργασία, επιχειρήθηκε να εξεταστεί η γενετική αλληλεπίδραση Mical-Tau στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *D. melanogaster* για να διαπιστωθεί, αν η Mical αλληλεπιδρά διαφορετικά με τις ισομορφές της ανθρώπινης Tau, που φέρουν τρεις (3R) και όχι τέσσερις (4R) επαναλήψεις πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους. Για αυτό το λόγο σχεδιάστηκαν έξι σειρές αναλύσεων western blot, μία για κάθε ισομορφή της ανθρώπινης, αγρίου τύπου Tau ($hTau^{wt}$: 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R), στις οποίες η Mical είτε εκφραζόταν στα φυσιολογικά για τον οργανισμό επίπεδα (στέλεχος ελέγχου) είτε υπερεκφραζόταν συστηματικά (στέλεχος υπερέκφρασης) είτε μειορρυθμιζόταν συστηματικά μέσω ενός «R2» RNA παρεμβολής (στέλεχος αποσιώπησης). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, για να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς την ενδονευρωνική συσσώρευση της κάθε ισομορφής υπό τη διαφορεική επίδραση της πρωτεΐνης Mical.

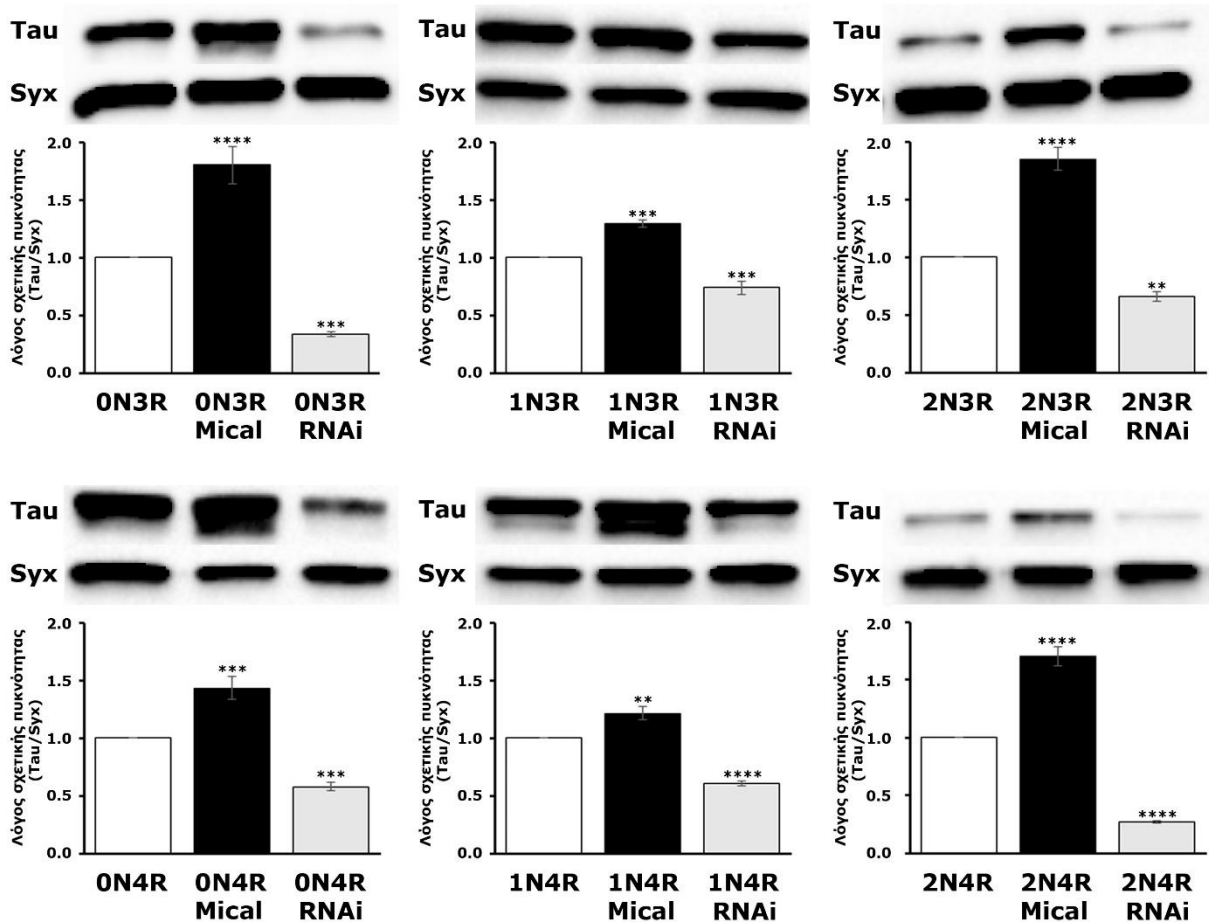
Στέλεχος ελέγχου	Στέλεχος υπερέκφρασης	Στέλεχος αποσιώπησης
$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{UAS - GFPMical}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{UAS - R2}; \frac{+}{+}$

Πίνακας 1. Οι γονότυποι των διαγονιδιακών σειρών, που χρησιμοποιήθηκαν στα βιοχημικά πειράματα. Όλα τα cDNA τοποθετήθηκαν στο II χρωμόσωμα της *D. melanogaster* είτε με τυχαία ένθεση (GFPMical, R2) είτε σε συγκεκριμένη attP θέση ($hTau^{wt}$: 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι για την άμεση και έγκυρη σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων εντός της κάθε τριπλέτας, ενσωματώθηκαν τα UAS-διαγονίδια της Tau στο γενετικό τόπο VK 18 (attP θέση στο II χρωμόσωμα) προκειμένου να εκφράζονται ισόποσα και παν-νευρωνικά υπό τον έλεγχο του επαγωγέα Elav-GAL4. Ένα αντίτυπο του συγκεκριμένου επαγωγέα αξιοποιήθηκε παρομοίως και για την ιστοειδική έκφραση των UAS-GFPMical (προϊόν συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) και UAS-R2 στα στελέχη υπερέκφρασης και αποσιώπησης. Τελικά, χρησιμοποιώντας το εκχύλισμα μίας κεφαλής ανά στέλεχος, προσδιορίστηκε το μοριακό αποτύπωμα της $hTau^{wt}$ με ανάλυση western blot. Σε κάθε πείραμα συγκρίθηκε ένα δείγμα ελέγχου, ένα δείγμα υπερέκφρασης και ένα δείγμα αποσιώπησης για κάθε Tau ισομορφή. Έπειτα από τη συλλογή τριών τέτοιων πειραμάτων έγινε εφικτή η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται σε όλα τα παρακάτω γραφήματα, η τροποποίηση της μεταγραφικής στοιχειομετρίας της Mical επηρεάζει άμεσα τη συσσώρευση της Tau στους νευρώνες. Σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, όταν η

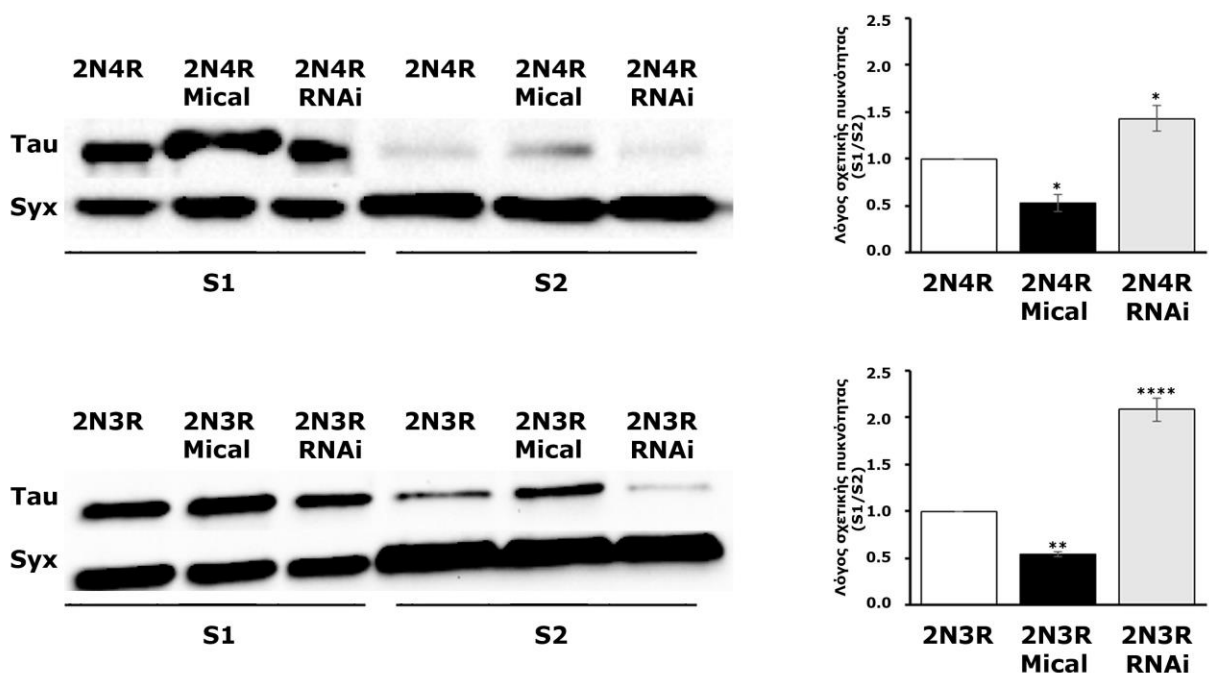
Mical υπερεκφράζεται, παρατηρείται αύξηση στη ποσότητα της ανθρώπινης αγρίου τύπου Tau (hTau^{wt}), ενώ όταν μειορρυθμίζεται, ανιχνεύεται αρκετά μικρότερη ποσότητα της Tau.



Εικόνα 2. Συγκεντρωτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων που επιφέρει η αλληλεπίδραση Mical-Tau στην ενδονευρική συσσώρευση κάθε ισομορφής. Οι αγρίου τύπου 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R εκφράστηκαν στον εγκέφαλο της *D. melanogaster* υπό τον έλεγχο του Elav-GAL4 οδηγού, όταν η ενδογενής Mical της *Drosophila* εκφραζόταν στα φυσιολογικά για τον οργανισμό επίπεδα (λευκή στήλη, δείγμα ελέγχου), όταν υπερεκφραζόταν (μαύρη στήλη, δείγμα υπερέκφρασης) και όταν μειορρυθμιζόταν από το «R2» Mical-RNAi (γκρι στήλη, δείγμα αποσιώπησης). Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μονής κεφαλής αναλύθηκαν με Western Blot και η ανθρώπινη Tau ανιχνεύθηκε με το μονοκλωνικό αντίσωμα 5A6. Το αντίσωμα 8C3 κατά της δροσοφιλικής συνταξίνης (Syx) χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβώσει ότι παρόμοιες ποσότητες πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναλύθηκαν σε κάθε περίπτωση. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με αντίδραση χημιοφωταύγειας και οι εντάσεις των σημάτων αναλύθηκαν πυκνομετρικά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageQ. Οι λόγοι Tau/Syx ορίστηκαν ως 1 και χρησιμοποιήθηκαν για την ομαλοποίηση των υπόλοιπων γονότυπων του κάθε πειράματος. Σε κάθε γραφική παράσταση παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου από δεδομένα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με t-test και στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνται αυτές με $p < 0.05$.

4.2. Η Mical ενισχύει τη συσσωμάτωση των 2N ισομορφών της Tau

Στη συνέχεια, περιορίστηκε το εύρος των ισομορφών από έξι σε δύο και έγινε μία προσπάθεια να εξεταστεί η επίδραση της Mical στην τάση των 2N ισομορφών της Tau προς συσσωμάτωση. Δέκα κεφάλια ανά στέλεχος ισομορφής χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία εκχυλισμάτων, που φυγοκεντρήθηκαν διαφορικά και διαχωρίστηκαν σε τρία μέρη. Το πρώτο μέρος (supernatant 1, S1) περιείχε το πλήρως υδατοδιαλυτό κλάσμα της Tau την 2N ισομορφή (2N3R ή 2N4R) που ήταν πλήρως υδατοδιαλυτή στο εσωτερικό του νευρώνα 2N ισομορφή, το δεύτερο (supernatant 2, S2) στα συσσωματώματά της που διαλύονται σε SDS και το τρίτο (pellet, P) στα συσσωματώματα που είναι αδιάλυτα στην ουρία. Τα κλάσματα κάθε δείγματος ελέγχου, υπερέκφρασης και αποσιώπησης [Πίνακας 1] αποτυπώθηκαν στη συνέχεια με τη μέθοδο western-blot και τα αποτελέσματα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από τρεις επαναλήψεις του πειράματος. Από το λόγο σχετικής συχνότητας της Tau/Syx του S1 κλάσματος προς την Tau/Syx του S2 κλάσματος προκύπτει ότι η υπερέκφραση της Mical στον εγκέφαλο της *Drosophila* μειώνει την υδατοδιαλυτότητα της εκάστοτε 2N ισομορφής, ενώ η μειορρύθμισή της την αυξάνει σημαντικά.



Εικόνα 2: Η επίδραση της πρωτεΐνης Mical στην ικανότητα των 2N ισομορφών της ανθρώπινης Tau να συσσωματώνονται. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα 10 κεφαλών από θηλυκές μύγες, οι οποίες εξέφραζαν παν-νευρωνικά τις αναγραφόμενες διαγονιδιακές πρωτεΐνες (Elav-Gal4) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση συσσωματωμάτων και έπειτα αναλύθηκαν με Western Blot. Το μονοκλωνικό αντίσωμα 5A6 χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της ανθρώπινης Tau, ενώ το μονοκλωνικό

αντίσωμα 8C3 κατά της συνταξίνης (Syc) χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβώσει ότι παρόμοιες ποσότητες πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναλύθηκαν σε κάθε περίπτωση. Με S1 (supernatant 1) συμβολίζεται το υδατοδιαλυτό κλάσμα της Tau και με S2 (supernatant 2) το κλάσμα της Tau που διαλύεται στο SDS. Υπάρχει στην πραγματικότητα και τρίτο υπερκείμενο (supernatant 3, S3) το οποίο δεν παρουσιάζεται, γιατί δε δίνει πρωτεϊνικό σήμα σε καμία μπάντα, ενώ αντιστοιχεί στην Tau, η οποία είναι αδιάλυτη στην ουρία. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με αντίδραση χημειοφωταύγειας και οι εντάσεις των σημάτων αναλύθηκαν πυκνομετρικά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageQ. Σε κάθε blot υπολογίστηκαν, αρχικά, οι λόγοι των εντάσεων Tau/Syc για το υπερκείμενο 1 και 2 κάθε δείγματος. Έπειτα, οι λόγοι διαιρέθηκαν μεταξύ τους (S1/S2) και κανονικοποιήθηκαν ως προς το δείγμα ελέγχου. Με αυτόν τον τρόπο, η τιμή του δείγματος ελέγχου έγινε ίση με τη μονάδα, ενώ οι τιμές των δειγμάτων υπερέκφρασης και αποσιώπησης απέκτησαν μία τιμή μεγαλύτερη ή μικρότερη αυτής. Σε κάθε γραφική παράσταση παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου από δεδομένα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με t-test και στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνται αυτές με $p < 0.05$.

4.3. Η συγγένεια σύνδεσης των 2N ισομορφών στους μικροσωληνίσκους δεν επηρεάζεται από τη Mical

Ένα σημαντικό ερώτημα, που τέθηκε από το εργαστήριο, αφορούσε την ικανότητα της αλληλεπίδρασης Mical-Tau να ρυθμίζει αρνητικά την προσκόλληση των 2N3R και 2N4R ισομορφών στους μικροσωληνίσκους του εγκεφάλου της *Drosophila*. Για να δοθεί μία ικανοποιητική απάντηση συλλέχθηκαν ισάριθμα κεφάλια αρσενικών και θηλυκών μυγών από κάθε 2N3R και 2N4R στέλεχος ελέγχου, υπερέκφρασης ή αποσιώπησης [Πίνακας 1], τα οποία ομογενοποιήθηκαν και τα εκχυλίσματά τους φυγοκεντρήθηκαν διαφορετικά για να δώσουν δύο κλάσματα: ένα υπερκείμενο (S), στο οποίο η Tau ήταν ελεύθερη, και ένα ιζηματικό (P), στο οποίο η Tau ήταν προσδεμένη στους ενδογενείς μικροσωληνίσκους της μύγας. Από την western blot ανάλυση των δειγμάτων προέκυψε πως ούτε η υπερέκφραση ούτε η αποσιώπηση της Mical είχε κάποια επίδραση πάνω στη συγγένεια σύνδεσης της των 2N ισομορφών [Εικόνα 3].

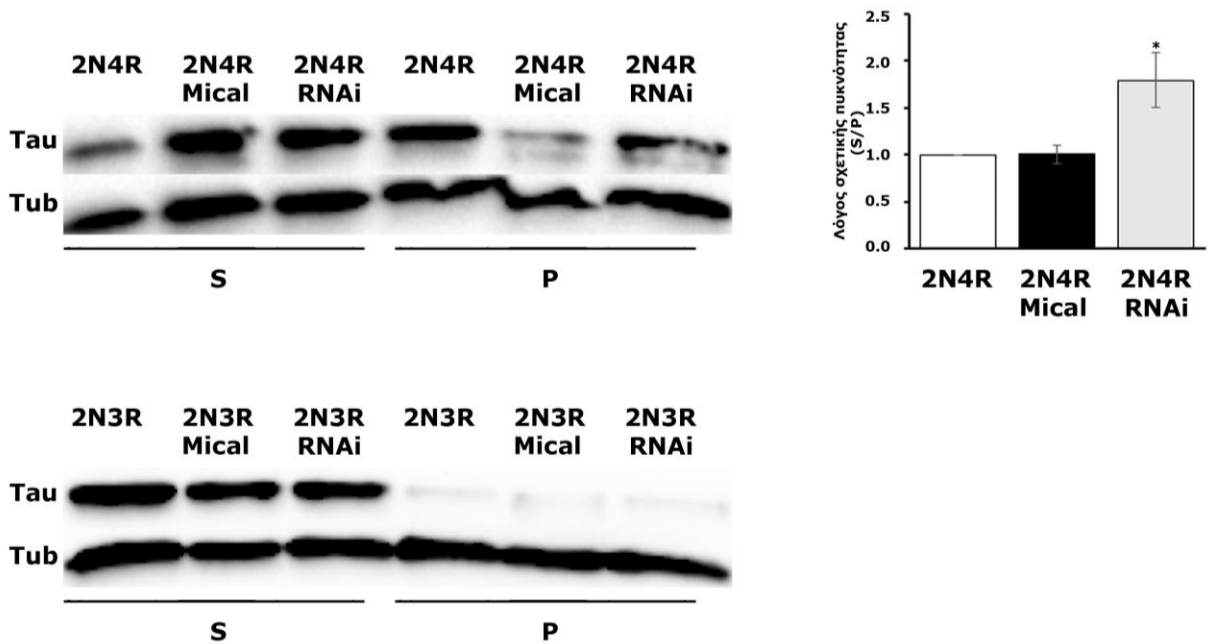
4.1. Η αλληλεπίδραση Mical-Tau χειροτερεύει τον rough eye φαινότυπο της 2N4R ισομορφής

Πραγματοποιήθηκε ένα σύνολο απλών διασταυρώσεων με σειρά οδηγό την Elav-GAL4 [Πίνακας 2], η οποία καθοδηγούσε την έκφραση των διαγονιδίων στον εγκέφαλο, αλλά και μάτι της μύγας. Εφόσον η έκφραση των επιθυμητών γονιδίων ξεκινούσε ήδη από τα πρώτα προνυμφικά στάδια της *Drosophila*, ήταν αναμενόμενο να επηρεαστεί σε κάποιες περιπτώσεις η ανάπτυξη του ματιού. Για να παρατηρηθεί ποιοτικά μέσω του rough eye φαινότυπου η πιθανή τοξικότητα της Tau, της Mical και της αλληλεπίδρασής τους, συλλέχθηκαν θηλυκές μύγες με ίσια φτερά από κάθε σύνολο απογόνων και αφού ψύχθηκαν για μία μέρα στους -20°C παρατηρήθηκαν με φωτογραφικό φακό υψηλής εστίασης. Η φωτογραφία κάθε φαινότυπου φαίνεται παρακάτω στην [Εικόνα 4]. Όλα τα στελέχη ελέγχου και αποσιώπησης εμφανίζουν φυσιολογική διάταξη ομματιδίων, ενώ το στέλεχος ελέγχου για την Mical

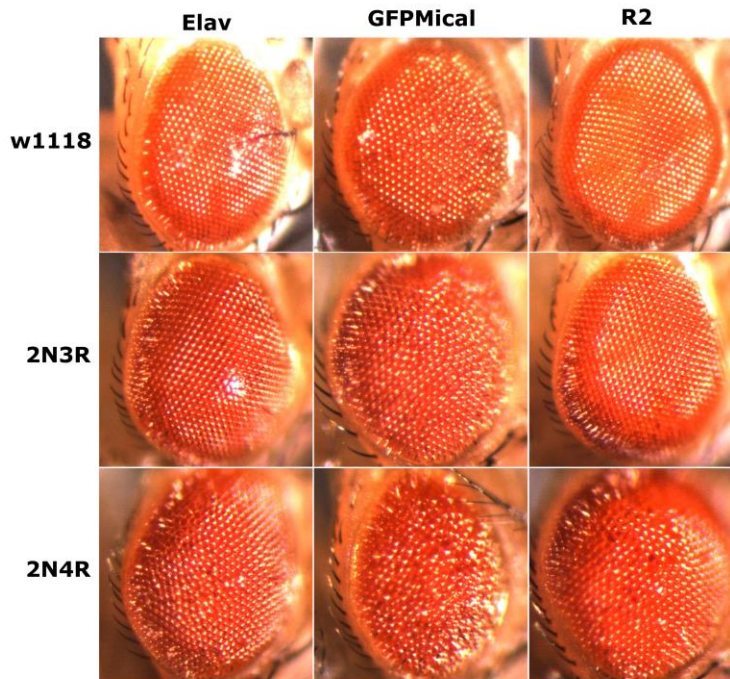
παρουσιάζει έναν ήπιο rough eye φαινότυπο. Παρόμοια αποδιοργάνωση του ματιού παρατηρείται και στο στέλεχος υπερέκφρασης της *Mical* για την 2N3R, ενώ σαφώς χειρότερη εικόνα δίνει το στέλεχος ελέγχου της 2N4R, το οποίο φτάνει στη χειρίστη εκδοχή του, όταν συνεκφράζεται με το UAS-GFPMical διαγονίδιο [Εικόνα 4].

Στέλεχος ελέγχου (w1118)	Στέλεχος ελέγχου (R2)	Στέλεχος υπερέκφρασης
$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - R2}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{+}; \frac{+}{+}$ $\frac{+}{+}; \frac{UAS - GFPMical}{+}; \frac{+}{+}$
Στέλεχος ελέγχου (GFPMical)	Στέλεχος ελέγχου (hTau ^{wt})	Στέλεχος αποσιώπησης
$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - GFPMical}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{+}; \frac{+}{+}$ $\frac{+}{+}; \frac{UAS - R2}{+}; \frac{+}{+}$

Πίνακας 3. Οι γονότυποι των διαγονιδιακών σειρών, που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του rough eye φαινότυπου. Όλα τα cDNA τοποθετήθηκαν στο II χρωμόσωμα της *D. melanogaster* είτε με τυχαία ένθεση (GFPMical, R2) είτε σε συγκεκριμένη attP θέση (hTau^{wt}: 2N3R, 2N4R).



Εικόνα 3: Η επίδραση της πρωτεΐνης *Mical* στην ικανότητα των 2N ισομορφών της ανθρώπινης *Tau* να προσδένονται στους μικροσωληνίσκους. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα 50 κεφαλών από αρσενικές και θηλυκές μύγες (1:1), οι οποίες εξέφραζαν πανευρωνικά τις αναγραφόμενες διαγονιδιακές πρωτεΐνες (*Elav-Gal4*) μελετήθηκαν ως προς την πρόσδεσή τους στους μικροσωληνίσκους και αναλύθηκαν έπειτα με Western Blot. Το μονοκλωνικό αντίσωμα 5A6 χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της ανθρώπινης *Tau*, ενώ το μονοκλωνικό αντίσωμα E7 κατά της τουμποουλίνης (*Tub*) χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβώσει ότι παρόμοιες ποσότητες πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναλύθηκαν σε κάθε περίπτωση. Με P (pellet) συμβολίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών που βρίσκονται προσδεμένες στην τουμποουλίνη (μικροσωληνίσκοι) και με S (supernatant) το σύνολο των πρωτεϊνών που παραμένει ελεύθερο στους νευρώνες. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με αντίδραση χημειοφωταύγειας και οι εντάσεις των σημάτων αναλύθηκαν πυκνομετρικά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageQ. Σε κάθε blot υπολογίστηκαν, αρχικά, οι λόγοι των εντάσεων *Tau/Tub* για το υπερκείμενο και το pellet κάθε δείγματος. Έπειτα, οι λόγοι διαιρέθηκαν μεταξύ τους (S/P) και κανονικοποιήθηκαν ως προς το δείγμα ελέγχου. Με αυτόν τον τρόπο, η τιμή του δείγματος ελέγχου έγινε ίση με τη μονάδα, ενώ οι τιμές των δειγμάτων υπερέκφρασης και αποσιώπησης απέκτησαν μία τιμή μεγαλύτερη ή μικρότερη αυτής. Σε κάθε γραφική παράσταση παρουσιάζεται ο μέσος όρος \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου από δεδομένα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με t-test και στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνται αυτές με $p < 0.05$.

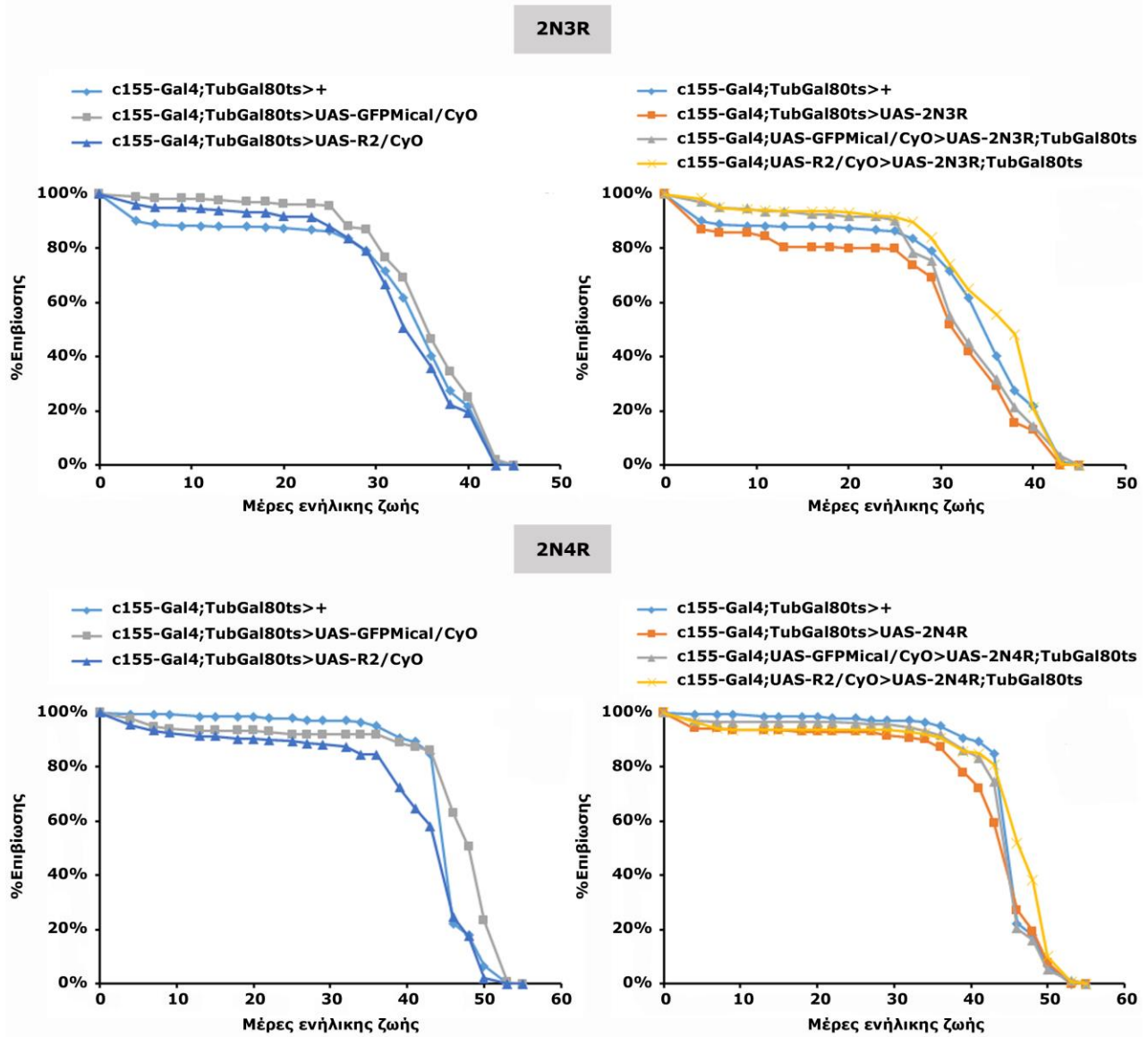


Εικόνα 4: Διαφορές στην ένταση του εκφυλισμού του εξωτερικού χιτώνα του ματιού. Όταν οι πειραματικές μύγες είναι ετερόζυγες για τον Elav-GAL4 επαγωγέα η διατάξη των ομματοειδίων είναι κανονική (πάνω, αριστερά). Η υπερέκφραση της ενδογενούς Mical είναι σε θέση να διαταράξει, όπως φαίνεται, τον φυσιολογικό φαινότυπο του ματιού (πάνω, μέση), όμως, η μειορρύθμισή της από το RNAi, R2, δεν επιφέρει το ίδιο αποτέλεσμα (πάνω, δεξιά). Σε ότι αφορά την 2N3R ισομορφή της ανθρώπινης Tau, δεν παρατηρείται τοξικότητα στο μάτι της μύγας, όταν το UAS-2N3R εκφράζεται μόνο του (μέση, αριστερά) ή όταν συνεκφράζεται με το UAS-R2 (μέση, δεξιά). Αντίθετα, η έκφραση του UAS-2N3R παρουσία του UAS-GFP^{Mical} οδηγεί σε rough eye φαινότυπο (κέντρο), αντίστοιχο με αυτόν της Mical στην ακριβώς από πάνω εικόνα. Ίσως, το αποτέλεσμα αυτό να οφείλεται μόνο στην τοξικότητα της Mical και όχι στην αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, όμως, για να διαπιστωθεί κάτι τέτοιο θα πρέπει η διάταξη των ομματοειδίων στις δύο περιπτώσεις να συγκριθεί με τη βοήθεια της μικροσκοπίας σάρωσης. Η 2N4R είναι σε θέση να προκαλέσει rough eye φαινότυπο στις μύγες που την εκφράζουν (κάτω, αριστερά). Η εικόνα του ματιού επιδεινώνεται δραματικά, όταν το UAS-2N4R συνεκφράζεται με το UAS-GFP^{Mical} (κάτω, μέση), ενώ επανέρχεται στα επίπεδα του control (Elav-GAL4>UAS-2N4R), όταν η Mical αποσιωπάται (κάτω, δεξιά).

4.2. Ο έλεγχος βιωσιμότητας των 2N ισομορφών της Tau

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος βιωσιμότητας σε διαγονιδιακά στελέχη της *Drosophila*, που εξέφραζαν παν-νευρωνικά την 2N3R ή την 2N4R ισομορφή της ανθρώπινης Tau, ενώ παράλληλα αυξάνονταν ή μειώνονταν τα επίπεδα της ενδογενούς Mical της μύγας. Η έκφραση των διαγονιδίων έγινε υπό τον ιστοειδικό και χρονικό έλεγχο του συστήματος TARGET. Για αυτό το λόγο, οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 18°C και μετά τη συλλογή των απαραίτητων εντόμων, τα στελέχη τοποθετήθηκαν στους 30°C για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης στον ενήλικο εγκέφαλο της μύγας. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, δεν έδειξαν κάποια διαφορά με ιδιαίτερη στατιστική σημαντικότητα, γεγονός

που οφείλεται στον χαλασμένο επωαστήρα (incubator) του εργαστηρίου και όχι στη φύση της Mical με την Tau.



Εικόνα 5: Βιωσιμότητα αρσενικών μυγών, οι οποίες εκφράζουν την 2N3R ή την 2N4R ισομορφή της Tau, ενώ παράλληλα αυξομειώνονται τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς Mical. Στα αριστερά διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες βιωσιμότητας για τα στελέχη ελέγχου, ενώ στα δεξιά διαγράμματα οι καμπύλες βιωσιμότητας για τα πειραματικά στελέχη.

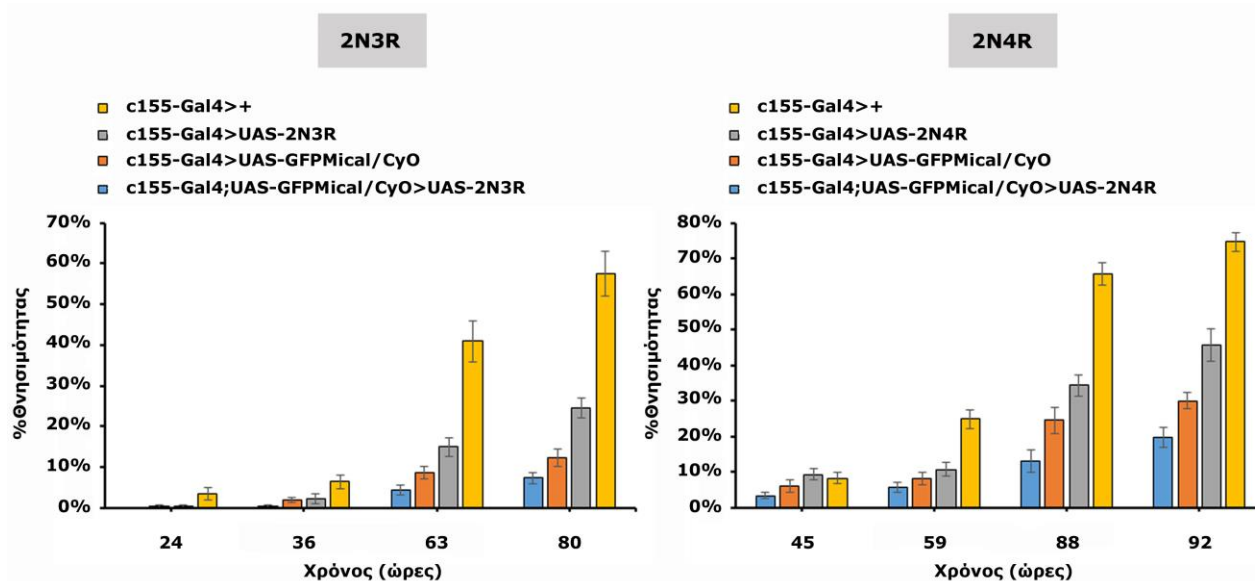
Στέλεχος ελέγχου	Στέλεχος ελέγχου
$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{Tub - GAL80^{ts}}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{+}; \frac{Tub - GAL80^{ts}}{+}$
Στέλεχος ελέγχου	Στέλεχος ελέγχου
$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - GFPMical}{+}; \frac{Tub - GAL80^{ts}}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - R2}{+}; \frac{Tub - GAL80^{ts}}{+}$

Στέλεχος υπερέκφρασης			Στέλεχος αποσιώπησης		
<i>Elav^{C155} - GAL4</i>	<i>UAS - hTau^{wt}</i>	<i>Tub - GAL80^{ts}</i>	<i>Elav^{C155} - GAL4</i>	<i>UAS - hTau^{wt}</i>	<i>Tub - GAL80^{ts}</i>
+	<i>UAS - GFPMical</i>	+	+	<i>UAS - R2</i>	+

Πίνακας 3: Οι γονότυποι των διαγονιδιακών σειρών, που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο βιωσιμότητας. Όλα τα cDNA τοποθετήθηκαν στο II χρωμόσωμα της *D. melanogaster* είτε με τυχαία ένθεση (GFPMical, R2) είτε σε συγκεκριμένη attP θέση (hTau^{wt}: 2N3R, 2N4R).

4.3. Η αντίσταση των διαγονιδιακών μυγών στο οξειδωτικό στρες μειώνεται, όταν συνεκφράζουν μία (2N) ισομορφή της Ταυ με το διαγονίδιο της Mical

Μετά τον έλεγχο της βιωσιμότητας, ένα δεύτερο πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της τοξικής αλληλεπίδρασης Mical-Tau στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Drosophila* είναι αυτό της αντίστασης στο οξειδωτικό στρες. Για όλες τις διασταυρώσεις χρησιμοποιήθηκε η σειρά οδηγός *Elav^{C155}-GAL4*, η οποία κατηύθυνε τη διαγονιδιακή έκφραση στον εγκέφαλο της μύγας, ενώ δε χρησιμοποιήθηκε για αυτή τη σύγκριση το διαγονίδιο του Mical-RNAi, R2. Οι μύγες έλαβαν μέσω της τροφής τους μία τοξική δόση υπεροξειδίου του υδρογόνου και τοποθετήθηκαν, στη συνέχεια, στους 25°C. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, που ακολουθούν, οι διαφορές στη θνησιμότητα των στελεχών γίνονται εμφανείς από την 63 ώρα και μετά, ενώ το στέλεχος με το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων είναι εκείνο που υπερεκφράζει τη Mical παρουσία της 2N3R ή της 2N4R.



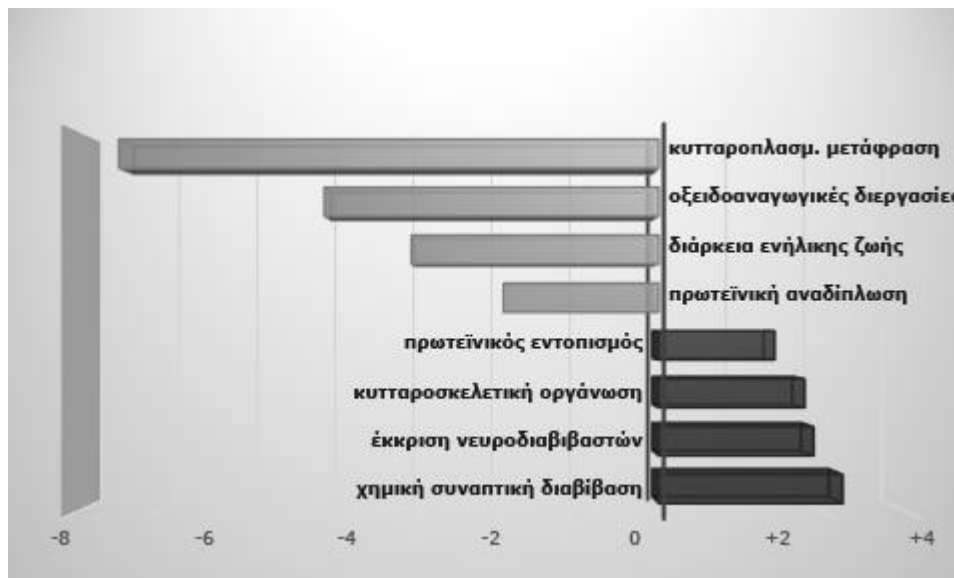
Εικόνα 6: Αντίσταση αρσενικών μυγών στο οξειδωτικό στρες, οι οποίες εκφράζουν την 2N3R ή την 2N4R ισομορφή της Ταυ, ενώ παράλληλα αυξομειώνονται τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς Mical.

Στέλεχος ελέγχου	Στέλεχος υπερέκφρασης
$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{+}; \frac{+}{+}$
Στέλεχος ελέγχου	Στέλεχος υπερέκφρασης
$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - GFPMical}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{Elav^{C155} - GAL4}{+}; \frac{UAS - hTau^{wt}}{UAS - GFPMical}; \frac{+}{+}$

Πίνακας 4: Οι γονότυποι των διαγονιδιακών σειρών, που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο αντίστασης στο οξειδωτικό στρες. Όλα τα cDNA τοποθετήθηκαν στο II χρωμόσωμα της *D. melanogaster* είτε με τυχαία ένθεση (GFPMical, R2) είτε σε συγκεκριμένη attP θέση (hTau^{wt}: 2N3R, 2N4R).

4.4. Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της (επισημασμένης με πεπτίδιο Flag) 2N4R μεταβάλλεται, όταν μειορρυθμίζεται η Mical στον εγκέφαλο της *Drosophila*

Τέλος, για να προσδιοριστούν οι αλλαγές στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων της 2N4R ισομορφής της Ταυ, όταν η Mical εκφράζεται στα φυσιολογικά για τον εγκέφαλο της *Drosophila* επίπεδα (στέλεχος ελέγχου) και όταν η Mical μειορρυθμίζεται (στέλεχος αποσιώπησης) πραγματοποιήθηκε μία δοκιμασία ανοσοκατακρίμησης, στην οποία η FLAG-tagged 2N4R απομονώθηκε μαζί με όλες τις πρωτεΐνες αλληλεπιδράσεώς της και το ίζημα κάθε στελέχους (ελέγχου ή αποσιώπησης) μελετήθηκε στη συνέχεια με φασματοσκοπία μάζας. Επισημαίνεται, ότι τα διαγονίδια της επισημασμένης με πεπτίδιο FLAG 2N4R και του Mical-RNAi, R2, εκφράστηκαν μόνο στον ενήλιο εγκέφαλο ($Elav^{C155}/Ras$) της *Drosophila* υπό τον έλεγχο του συστήματος GAL4/UAS. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι απουσία της Mical η νευρωνικά εκφραζόμενη 2N4R αλληλεπιδρά λιγότερο με τις πρωτεΐνες των ριβοσωμάτων, οι οποίες συμβάλλουν



Εικόνα 7: Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας για πρωτεΐνες, οι οποίες παρουσίασαν σημαντική μεταβολή στην αλληλεπίδρασή τους με την 2N4R ισομορφή της Ταυ. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για πρωτεΐνες που παρουσιάζουν σημαντική αύξηση ή μείωση της αλληλεπίδρασής.

στην κυτταροπλασματική μετάφραση. Επίσης, αλληλεπιδρά λιγότερο με πρωτεΐνες που σχετίζονται με οξειδοαναγωγικές διεργασίες, τη διάρκεια της ενήλικης ζωής και την πρωτεϊνική αναδίπλωση. Αντίθετα, αυξάνεται η αλληλεπίδραση της Tau με πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τον πρωτεϊνικό εντοπισμό, την κυτταροσκελετική οργάνωση, την έκκριση νευροδιαβιβαστών και τη χημική συναπτική διαβίβαση.

Συμπεράσματα - Συζήτηση

Σε παλιότερα πειράματα του εργαστηρίου είχε δειχθεί γενετικά, ότι η ενδογενής Mical της *Drosophila* μπορεί δυναμικά να οξειδώσει τις κυστεΐνες της ανθρώπινης Tau και συγκεκριμένα την κυστεΐνη C322, αυξάνοντας με στατιστικά σημαντικό τρόπο την *in vivo* τοξικότητά της [110]. Δεδομένου ότι η Tau περιέχει το πολύ δύο κυστεΐνες, εκ των οποίων η μία (C291) βρίσκεται στην εναλλακτικά συρραπτόμενη R2 επανάληψη πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους και η άλλη (C322) στη συστηματικά εκφρασμένη R3 [29], τέθηκε το ερώτημα αν η αυξομείωση των επιπέδων της Mical στον εγκέφαλο της μύγας θα μπορούσαν να επηρεάσουν διαφορετικά τα επίπεδα των 3R και των 4R ισομορφών. Για αυτό το λόγο, κατασκευάστηκαν έξι διαγονιδιακές σειρές του καλά εδραιωμένου μοντέλου Ταυπαθειών στη *Drosophila*, οι οποίες εξέφραζαν κάθε φορά μόνο μία ισομορφή της ανθρώπινης, αγρίου τύπου Tau (hTau^{wt}: 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R) υπό τον έλεγχο του συστήματος GAL4/UAS και του παν-νευρωνικού επαγωγέα E1av. Το στέλεχος ελέγχου κάθε ισομορφής συγκρίθηκε, στη συνέχεια, ως προς ένα στέλεχος υπερέκφρασης της Mical και ένα στέλεχος μειορρυθμίσεώς της, όπου το πρώτο συνεξέφραζε με την hTau^{wt} ένα διαγονίδιο της Mical, ενώ το δεύτερο ένα διαγονίδιο του Mical RNAi, R2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της Mical συνεπάγεται πάντα την αύξηση των επιπέδων της hTau^{wt}, ενώ η αποσιώπησή της τη μείωση των επιπέδων της hTau^{wt} – είτε πρόκειται για 3R είτε για 4R ισομορφή. Δεν υπάρχει, συνεπώς, κάποιο είδος ενζυμικής εκλεκτικότητας της Mical για συγκεκριμένο hTau^{wt} υπόστρωμα και οι παρατηρούμενες μικροδιαφορές προκύπτουν μάλλον από την εγγενή σταθερότητα της κάθε ισομορφής (οι 1N φαίνεται να είναι οι πιο σταθερές, ενώ οι 0N οι πιο ασταθείς). [Εικ.1]

Στη συνέχεια, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις 2N ισομορφές της πρωτεΐνης Tau και στην τάση που έχουν προς συσσωμάτωση, όταν η Mical εκφράζεται στα φυσιολογικά για τον εγκέφαλο της μύγας επίπεδα, όταν υπερεκφράζεται και όταν μειορρυθμίζεται με RNAi. Σημειώνεται ότι ο γονότυπος των διασταυρώσεων σε αυτό και τα επόμενα πειράματα είναι ο ίδιος με αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω, εκτός και αν δηλώνεται κάτι διαφορετικό. Από τα διαγράμματα της [Εικ.2] φαίνεται, ξεκάθαρα, ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της Mical καθιστούν μεγαλύτερο το κλάσμα της αδιάλυτης Tau στους

νευρώνες. Το αντίστροφο ισχύει για τη μείωση των επιπέδων της Mical, η οποία ωθεί την ισορροπία της συσσωμάτωσης προς την πλευρά της ενδονευρωνικής διαλυτοποίησης της Tau. Το πείραμα αυτό έχει πραγματοποιηθεί και για τις υπόλοιπες ισομορφές (0N, 1N) από μέλη του εργαστηρίου [110] που κατέληξαν στα ίδια συμπεράσματα. Επομένως, δεν θα ήταν υπερβολή να πει κάποιος ότι ο μηχανισμός συσσωμάτωσης της Tau από τη Mical είναι καθολικός, διότι επηρεάζει εξίσου τις 3R και τις 4R ισομορφές. Αν, μάλιστα, η αρχική ένδειξη του εργαστηρίου για την οξειδωση της Tau από τη Mical ισχύει και αφορά τα κατάλοιπα κυστεΐνης των δύο μεσαίων επαναλήψεων πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους, τότε, βάσει του συγκεκριμένου πειράματος θα πρέπει η κυστεΐνη που οξειδώνεται να είναι πάλι η C322, γιατί είναι κοινή και στις έξι ισομορφές.

Βιβλιογραφικά είναι γνωστό πως κάθε μεταμεταφραστική τροποποίηση ή μετάλλαξη που συμβαίνει μέσα στις/γύρω από τις καρβοξυτελικές επαναλήψεις της Tau, εμποδίζει με τον έναν ή τον άλλο τρόπο την πρόσδεση της πρωτεΐνης στους μικροσωληνίσκους. Έγινε, λοιπόν, προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η επίδραση της Mical και στη λειτουργία των 2N ισομορφών της Tau ως κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, προσδιορίζοντας την αποτελεσματικότητα σύνδεσης τους με τους μικροσωληνίσκους του εγκεφάλου της μύγας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ούτε η υπερέκφραση ούτε η μειορρύθμιση της Mical ήταν τελικά ικανή να επηρεάσει την πρόσδεση των 2N ισομορφών στους μικροσωληνίσκους, όπως ακριβώς είχε αποδειχθεί παλιότερα για τις 1N ισομορφές [110]. Εξαίρεση αποτελεί μόνο η αποσιώπηση της Mical στην περίπτωση της 2N4R ισομορφής, που αποσπά την αλληλουχία της πρωτεΐνης από τους μικροσωληνίσκους και την ωθεί στο διαλυτό κλάσμα του κυττάρου. Αντίθετα, οι μικρότερου μήκους πρωτεΐνες, 0N3R και 0N4R, αποσπώνταν από τους μικροσωληνίσκους παρουσία της Mical και απουσία αυτής προσδένονταν πιο έντονα στο δίκτυό τους [110]. Η συγκριτική αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ισομορφές της Tau έχουν εγγενείς διαφορές που επηρεάζουν τη συγγένεια σύνδεσής τους με τους μικροσωληνίσκους.

Στον εξωτερικό χιτώνα του ματιού της *Drosophila* μπορεί κανείς να εξετάσει την τοξικότητα της Tau *per se*, αλλά και σε συνδυασμό με πρωτεΐνες «καταστολείς» (suppressors) ή «ενισχυτές» (enhancers) του παθογενετικού μηχανισμού της. Η τοξικότητα εκτιμάται ποιοτικά με απλή παρατήρηση λόγω του «rough eye» φαινότυπου, που αλλοιώνει τη μορφολογία του ματιού μειώνοντας το μέγεθός του, διαταράσσοντας τη φυσιολογική κατανομή των ομματαδίων και συχνά εκφυλίζοντας το νευροπίλημα στο μυελό. Με τη χρήση μίας $Elav^{C155}$ -GAL4 σειράς οδηγού εκφράστηκαν παν-νευρωνικά εννιά διαγονίδια, για τη δημιουργία πέντε στελεχών ελέγχου ($Elav^{C155}$ -GAL4>x, όπου x: +, GFPMical, R2, 2N3R, 2N4R), δύο υπερέκφρασης και δύο αποσιώπησης της πρωτεΐνης Mical [Εικόνα4]. Μεταξύ των στελεχών ελέγχου

μόνο εκείνα που αντιστοιχούν στην 2N4R ισομορφή και στο GFP*Mical* εμφανίζουν rough eye φαινότυπο. Μάλιστα, το rough eye του GFP*Mical* είναι συγκρίσιμο με το rough eye του στελέχους υπερέκφρασης για την 2N3R ισομορφή, η οποία από μόνη της δεν επάγει τοξικότητα στο μάτι της *Drosophila*. Επομένως, ίσως αυτός ο φαινότυπος να μην οφείλεται στην αλληλεπίδραση 2N3R-*Mical*, αλλά αποκλειστικά στη *Mical* (ο μόνος τρόπος για να επιβεβαιωθεί κάτι τέτοιο είναι με εξέταση των ματιών της μύγας από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης). Τέλος, η αλληλεπίδραση 2N4R-*Mical* χειροτερεύει το φαινότυπο του ματιού σε σχέση με το 2N4R στέλεχος ελέγχου, ενώ όλοι οι rough eye φαινότυποι βελτιώνονται, όταν εκφράζεται το R2 στον εγκέφαλο της μύγας.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας επιβεβαιώθηκαν ποσοτικά μέσα από τον έλεγχο μακροζωίας της *Drosophila* και τον έλεγχο αντίστασής της στο οξειδωτικό στρες. Για τις ανάγκες του πρώτου πειράματος, η έκφραση των διαγονιδίων κατευθύνθηκε στο ενήλικο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Drosophila* με τη βοήθεια του γενετικού εργαλείου TARGET. Τα αποτελέσματα δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα λόγω συστηματικού σφάλματος, που προκλήθηκε από την αδυναμία του επωαστή (incubator) να διατηρήσει μία σταθερή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια εκτέλεσης αυτού του πολύ θερμοευαίσθητου πειράματος. Πιστεύεται, ωστόσο, πως αν η πειραματική διαδικασία επαναληφθεί υπό τις σωστές συνθήκες τότε θα αποκαλυφθεί με σαφήνεια η τοξικότητα της *Mical* πάνω στη δράση των 2N3R και 2N4R ισομορφών. Αντίθετα, η δοκιμασία αντίστασης στο οξειδωτικό στρες ανέδειξε επακριβώς την παθολογία της αλληλεπίδρασης *Mical*-*Tau*, καθώς οι μύγες που συνεξέφραζαν τις δύο πρωτεΐνες μαζί είχαν μεγαλύτερη θνησιμότητα από το ήδη ευάλωτο στέλεχος ελέγχου της *Tau* και φυσικά από το στέλεχος ελέγχου *Elav*^{C155}-*GAL4*>+.

Το τελευταίο πείραμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η μελέτη του δικτύου αλληλεπίδρασης της *Tau* με πρωτεΐνες του εγκεφάλου της *Drosophila*, όταν 1) η επισημασμένη με πεπτίδιο FLAG 2N4R ισομορφή της *Tau* εκφράζεται παν-νευρωνικά υπό τον έλεγχο του συστήματος έκφρασης *GAL4/UAS* και των παν-νευρωνικών επαγωγέων *Elav/Ras* χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης της *Mical* και όταν 2) η FLAG-tagged 2N4R συνεκφράζεται με το *UAS-R2* διαγονίδιο σίγασης της *Mical*. Από την ανάλυση των δειγμάτων έκλουσης με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών προέκυψαν 117 πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούσαν περισσότερο ή λιγότερο με την 2N4R σε *Mical*-RNAi background συγκριτικά με το control, όμως πάντοτε με στατιστική ακρίβεια. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν σημαντικά ευρήματα, όπως το γεγονός ότι απουσία της *Mical* η 2N4R συσχετίζεται λιγότερο με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες που απαρτίζουν τη μικρή και τη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος ή συνδέονται άμεσα με το rRNA, αλλά περισσότερο με τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χημική

συναπτική διαβίβαση ή την έκκριση των νευροδιαβιβαστών. Αυτές οι μεταβολές θα μπορούσαν να μελετηθούν διεξοδικά στο μέλλον για να γίνει κατανοητός ο ρόλος της Mical στη λειτουργία των νευρώνων.

Βιβλιογραφία

1. Weingarten, M.D., et al., *A protein factor essential for microtubule assembly*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1975. **72**(5): p. 1858-1862.
2. Andreadis, A., *Misregulation of tau alternative splicing in neurodegeneration and dementia*, in *Alternative Splicing and Disease*. 2006, Springer. p. 89-107.
3. Couchie, D., et al., *Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(10): p. 4378-4381.
4. Georgieff, I.S., et al., *Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems*. Journal of cell science, 1993. **105**(3): p. 729-737.
5. Goedert, M., et al., *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease*. Neuron, 1989. **3**(4): p. 519-526.
6. Goedert, M., et al., *Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain*. The EMBO journal, 1989. **8**(2): p. 393-399.
7. Wang, Y., et al., *A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau*. The Journal of cell biology, 1993. **121**(2): p. 257-267.
8. Andreadis, A., *Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis Of Disease, 2005. **1739**(2-3): p. 91-103.
9. Andreadis, A., W.M. Brown, and K.S. Kosik, *Structure and novel exons of the human tau gene*. Biochemistry, 1992. **31**(43): p. 10626-10633.
10. Sawa, A., et al., *Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau*. Molecular brain research, 1994. **27**(1): p. 111-117.
11. Luo, M.h., M.L. Leski, and A. Andreadis, *Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation*. Journal of cellular biochemistry, 2004. **91**(5): p. 880-895.
12. Chen, W.-T., W.-K. Liu, and S.-H. Yen, *Expression of tau exon 8 in different species*. Neuroscience letters, 1994. **172**(1-2): p. 167-170.
13. Himmler, A., *Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family*. Molecular and Cellular Biology, 1989. **9**(4): p. 1389-1396.
14. Ittner, L.M. and J. Götz, *Amyloid-β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease*. Nature Reviews Neuroscience, 2011. **12**(2): p. 67-72.
15. Kolarova, M., et al., *Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease*. International journal of Alzheimer's disease, 2012. **2012**.
16. Martin, L., X. Latypova, and F. Terro, *Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease*. Neurochemistry international, 2011. **58**(4): p. 458-471.
17. Pedersen, J.T. and E.M. Sigurdsson, *Tau immunotherapy for Alzheimer's disease*. Trends in molecular medicine, 2015. **21**(6): p. 394-402.
18. Song, L., et al., *Analysis of tau post-translational modifications in rTg4510 mice, a model of tau pathology*. Molecular neurodegeneration, 2015. **10**(1): p. 14.

19. Kosik, K.S., et al., *Developmentally regulated expression of specific tau sequences*. Neuron, 1989. **2**(4): p. 1389-1397.
20. Goedert, M. and R. Jakes, *Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization*. The EMBO journal, 1990. **9**(13): p. 4225-4230.
21. Trabzuni, D., et al., *MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies*. Human molecular genetics, 2012. **21**(18): p. 4094-4103.
22. Boutajangout, A., et al., *Expression of tau mRNA and soluble tau isoforms in affected and non-affected brain areas in Alzheimer's disease*. FEBS letters, 2004. **576**(1-2): p. 183-189.
23. Lee, G., et al., *Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases*. Journal of cell science, 1998. **111**(21): p. 3167-3177.
24. Mukrasch, M.D., et al., *Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution*. PLoS Biol, 2009. **7**(2): p. e1000034.
25. Jeganathan, S., et al., *Global hairpin folding of tau in solution*. Biochemistry, 2006. **45**(7): p. 2283-2293.
26. Braak, F., H. Braak, and E.-M. Mandelkow, *A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads*. Acta neuropathologica, 1994. **87**(6): p. 554-567.
27. Alonso, A.d.C., et al., *Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(12): p. 6923-6928.
28. Sawaya, M.R., et al., *Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 453-457.
29. Schweers, O., et al., *Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(18): p. 8463-8467.
30. Ventura, A. and P.G. Pelicci, *Semaphorins: green light for redox signaling?* Science's STKE, 2002. **2002**(155): p. pe44-pe44.
31. Suzuki, T., et al., *Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(4): p. 2437-2443.
32. Fischer, J., T. Weide, and A. Barnekow, *The MICAL proteins and rab1: a possible link to the cytoskeleton?* Biochemical and biophysical research communications, 2005. **328**(2): p. 415-423.
33. Pasterkamp, R.J., et al., *MICAL flavoprotein monooxygenases: expression during neural development and following spinal cord injuries in the rat*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2006. **31**(1): p. 52-69.
34. Weide, T., et al., *MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins*. Biochemical and biophysical research communications, 2003. **306**(1): p. 79-86.
35. Ashida, S., et al., *Expression of novel molecules, MICAL2-PV (MICAL2 prostate cancer variants), increases with high Gleason score and prostate cancer progression*. Clinical cancer research, 2006. **12**(9): p. 2767-2773.
36. Bron, R., et al., *Boundary cap cells constrain spinal motor neuron somal migration at motor exit points by a semaphorin-plexin mechanism*. Neural development, 2007. **2**(1): p. 1-22.
37. Grigoriev, I., et al., *Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers*. Current Biology, 2011. **21**(11): p. 967-974.
38. Morinaka, A., et al., *Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse*. Science signaling, 2011. **4**(170): p. ra26-ra26.

39. Schmidt, E.F., S.-O. Shim, and S.M. Strittmatter, *Release of MICAL autoinhibition by semaphorin-plexin signaling promotes interaction with collapsin response mediator protein*. Journal of Neuroscience, 2008. **28**(9): p. 2287-2297.
40. Zhou, Y., et al., *MICALs in control of the cytoskeleton, exocytosis, and cell death*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011. **68**(24): p. 4033-4044.
41. Terman, J.R., et al., *MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion*. Cell, 2002. **109**(7): p. 887-900.
42. Beuchle, D., et al., *Drosophila MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure*. Mechanisms of development, 2007. **124**(5): p. 390-406.
43. Kirilly, D., et al., *A genetic pathway composed of Sox14 and Mical governs severing of dendrites during pruning*. Nature neuroscience, 2009. **12**(12): p. 1497-1505.
44. Hung, R.-J., et al., *Mical links semaphorins to F-actin disassembly*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 823-827.
45. Zhou, W., et al., *MICAL2 is a novel nucleocytoplasmic shuttling protein promoting cancer invasion and growth of lung adenocarcinoma*. Cancer Letters, 2020.
46. Xue, Y., et al., *Identification and expression analysis of mical family genes in zebrafish*. Journal of Genetics and Genomics, 2010. **37**(10): p. 685-693.
47. Bach, I., *The LIM domain: regulation by association*. Mechanisms of development, 2000. **91**(1-2): p. 5-17.
48. Kadmas, J.L. and M.C. Beckerle, *The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus*. Nature reviews Molecular cell biology, 2004. **5**(11): p. 920-931.
49. Eggink, G., et al., *Rubredoxin reductase of Pseudomonas oleovorans: structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints*. Journal of molecular biology, 1990. **212**(1): p. 135-142.
50. Eppink, M.H., W.J.V. Berkel, and H.A. Schreuder, *Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD (P) H binding*. Protein Science, 1997. **6**(11): p. 2454-2458.
51. Wierenga, R.K., P. Terpstra, and W.G. Hol, *Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint*. Journal of molecular biology, 1986. **187**(1): p. 101-107.
52. Vallon, O., *New sequence motifs in flavoproteins: evidence for common ancestry and tools to predict structure*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2000. **38**(1): p. 95-114.
53. Powell, J.R., *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model (Oxford Series in Ecology & Evolution)*. 1st Edition ed. 1997: Oxford University Press.
54. Bridges, C.B., *Direct proof through non-disjunction that the sex-linked genes of Drosophila are borne by the X-chromosome*. Science, 1914. **40**(1020): p. 107-109.
55. Bridges, C., *Proof of non-disjunction for the fourth chromosome of Drosophila melanogaster*. Science, 1921. **53**(1370): p. 308-308.
56. Bridges, C.B., *Genetical and cytological proof of non-disjunction of the fourth chromosome of Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1921. **7**(7): p. 186.
57. Bridges, C.B., *Current maps of the location of the mutant genes of Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1921. **7**(4): p. 127.
58. Muller, H.J., *Artificial transmutation of the gene*. Science, 1927. **66**(1699): p. 84-87.
59. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1933*. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1933/summary/>.

60. Morgan, T.H., *Localization of the hereditary material in the germ cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1915. **1**(7): p. 420.
61. Muller, H.J., *Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors*. Genetics, 1918. **3**(5): p. 422.
62. Stern, C., *Somatic crossing over and segregation in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1936. **21**(6): p. 625.
63. Poulson, D., *Histogenesis, organogenesis, and differentiation in the embryo of Drosophila melanogaster* Meigen. Biology of Drosophila, 1950: p. 168-274.
64. Bridges, C.B., *Salivary chromosome maps: with a key to the banding of the chromosomes of Drosophila melanogaster*. Journal of Heredity, 1935. **26**(2): p. 60-64.
65. Ugur, B., K. Chen, and H.J. Bellen, *Drosophila tools and assays for the study of human diseases*. Disease models & mechanisms, 2016. **9**(3): p. 235-244.
66. Rogina, B., S. Benzer, and S.L. Helfand, *Drosophila drop-dead mutations accelerate the time course of age-related markers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(12): p. 6303-6306.
67. Kretschmar, D., et al., *The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in Drosophila*. Journal of Neuroscience, 1997. **17**(19): p. 7425-7432.
68. Warrick, J.M., et al., *Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in Drosophila*. Cell, 1998. **93**(6): p. 939-949.
69. Jackson, G.R., et al., *Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons*. Neuron, 1998. **21**(3): p. 633-642.
70. Feany, M.B. and W.W. Bender, *A Drosophila model of Parkinson's disease*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 394-398.
71. Bilen, J. and N.M. Bonini, *Drosophila as a model for human neurodegenerative disease*. Annu. Rev. Genet., 2005. **39**: p. 153-171.
72. Marsh, J.L. and L.M. Thompson, *Drosophila in the study of neurodegenerative disease*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 169-178.
73. Newman, T., et al., *Using Drosophila models of neurodegenerative diseases for drug discovery*. Expert Opinion on Drug Discovery, 2011. **6**(2): p. 129-140.
74. Fernández-Moreno, M.A., et al., *Drosophila melanogaster as a model system to study mitochondrial biology*, in *Mitochondria*. 2007, Springer. p. 33-49.
75. Duffy, J.B., *GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife*. genesis, 2002. **34**(1-2): p. 1-15.
76. McGuire, S.E., et al., *Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1765-8.
77. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. nature, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
78. Maillard, P.V., et al., *Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells*. The EMBO journal, 2016. **35**(23): p. 2505-2518.
79. Seo, G.J., et al., *Reciprocal inhibition between intracellular antiviral signaling and the RNAi machinery in mammalian cells*. Cell host & microbe, 2013. **14**(4): p. 435-445.
80. Berkhout, B., *RNAi-mediated antiviral immunity in mammals*. Current opinion in virology, 2018. **32**: p. 9-14.
81. *RNA Interference (RNAi)*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/technai/>.
82. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. nature, 2001. **411**(6836): p. 494-498.

83. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs*. *Genes & development*, 2001. **15**(2): p. 188-200.
84. Elbashir, S.M., et al., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. *The EMBO journal*, 2001. **20**(23): p. 6877-6888.
85. Hammond, S.M., *Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway*. *FEBS letters*, 2005. **579**(26): p. 5822-5829.
86. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 363-366.
87. Grishok, A., et al., *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing*. *Cell*, 2001. **106**(1): p. 23-34.
88. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 834-838.
89. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans*. *Genes & development*, 2001. **15**(20): p. 2654-2659.
90. Knight, S.W. and B.L. Bass, *A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001. **293**(5538): p. 2269-2271.
91. Förstemann, K., et al., *Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein*. *PLoS Biol*, 2005. **3**(7): p. e236.
92. Jiang, F., et al., *Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in Drosophila*. *Genes & development*, 2005. **19**(14): p. 1674-1679.
93. Saito, K., et al., *Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1–Loquacious complex in Drosophila cells*. *PLoS Biol*, 2005. **3**(7): p. e235.
94. Miyoshi, K., et al., *Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in Drosophila*. *Rna*, 2010. **16**(3): p. 506-515.
95. Lee, Y.S., et al., *Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways*. *Cell*, 2004. **117**(1): p. 69-81.
96. Nelson, P., et al., *The microRNA world: small is mighty*. *Trends in biochemical sciences*, 2003. **28**(10): p. 534-540.
97. Chang, K., S.J. Elledge, and G.J. Hannon, *Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries*. *Nature methods*, 2006. **3**(9): p. 707-714.
98. Silva, J., et al., *RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age*. *Oncogene*, 2004. **23**(51): p. 8401-8409.
99. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. *Nature Reviews Genetics*, 2007. **8**(3): p. 173-184.
100. Tokatlian, T. and T. Segura, *siRNA applications in nanomedicine*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2010. **2**(3): p. 305-315.
101. Siolas, D., et al., *Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers*. *Nature biotechnology*, 2005. **23**(2): p. 227-231.
102. Ui-Tei, K., et al., *Thermodynamic Control of Small RNA-Mediated Gene Silencing*. *Frontiers in Genetics*, 2012. **3**(101).
103. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. *Genes & development*, 2002. **16**(6): p. 720-728.
104. Tabara, H., et al., *The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in C. elegans*. *Cell*, 2002. **109**(7): p. 861-871.
105. Hammond, S.M., et al., *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1146-1150.

106. Cady, A.A., et al., *Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery*. *Genes & development*, 2002. **16**(19): p. 2491-2496.
107. Kennerdell, J.R. and R.W. Carthew, *Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway*. *Cell*, 1998. **95**(7): p. 1017-1026.
108. Cowan, C.M., et al., *Rescue from tau-induced neuronal dysfunction produces insoluble tau oligomers*. *Scientific reports*, 2015. **5**: p. 17191.
109. Feuillette, S., et al., *Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein*. *Journal of neurochemistry*, 2010. **113**(4): p. 895-903.
110. Papanikolopoulou, K., *Manuscript in preparation*. 2020.

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.

ΥΠΟΓΡΑΦΗ