ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τροποποιητές Τ-πρωτεϊνοπαθητικών μηχανισμών

ΒΟΥΡΚΟΥ ΕΡΓΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2022

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ

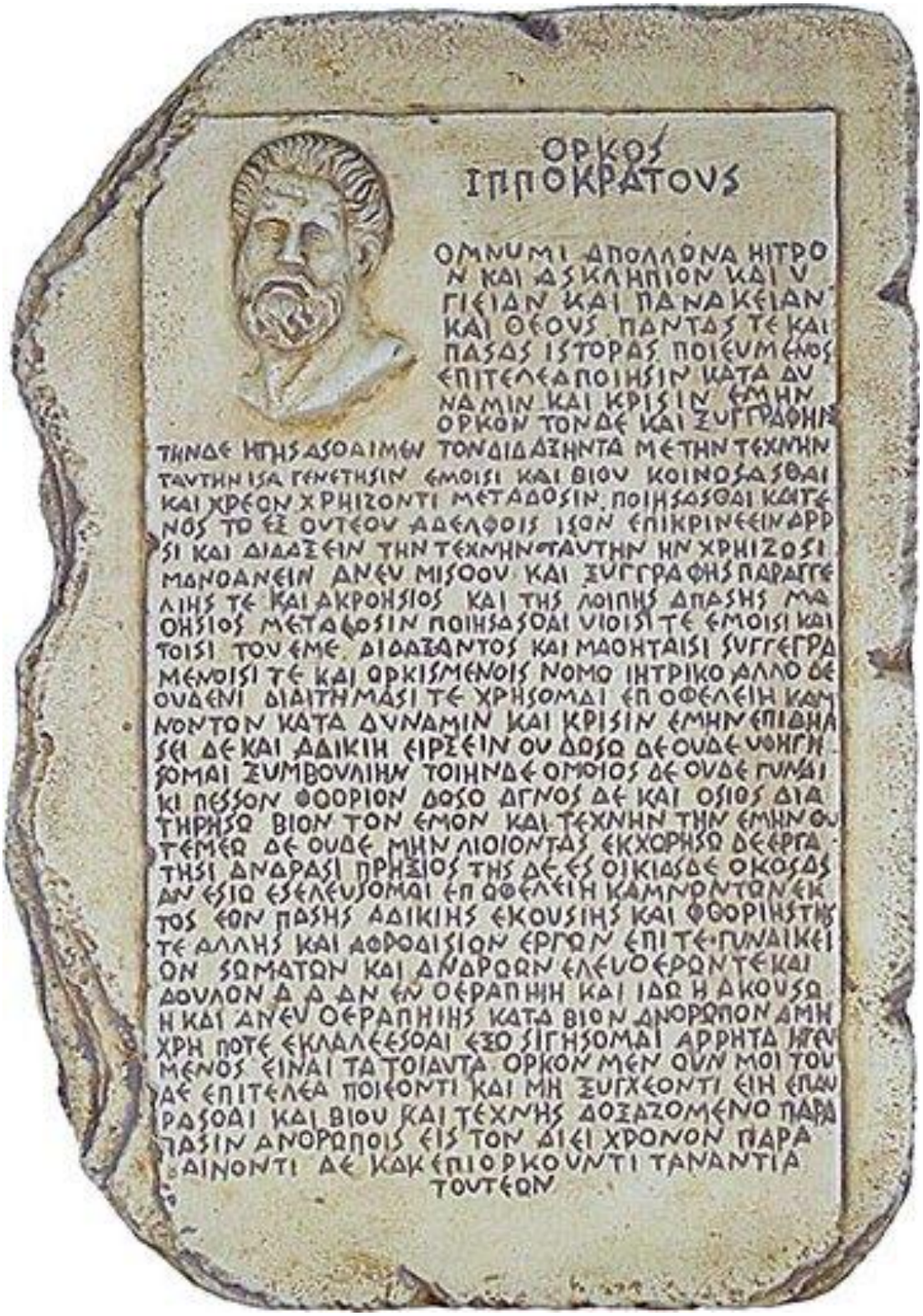
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τροποποιητές Τ-πρωτεϊνοπαθητικών μηχανισμών

ΒΟΥΡΚΟΥ ΕΡΓΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2022


ΟΡΚΟΣ
ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ
ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟ
Ν ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ Υ
ΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥ
ΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ
ΤΗΝΔΕ ΙΗΤΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΟΣΑΣΘΑΙ
ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΚΑΤΕ
ΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΟΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡ
ΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ
ΜΑΘΗΣΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕ
ΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑ
ΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ
ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑ
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ
ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΔΑΞΩ ΓΝΩΜΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΕΠΙΔΗΜ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ ΕΙΡΕΙΝ ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗ
ΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙ
ΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑ
ΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥ
ΤΕΜΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑ
ΤΗΣΙ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣ ΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ
ΑΝ ΕΣΙΩ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΕΚ
ΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣΤΙΟΣ
ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙ
ΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ Α Δ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΗΙΗ ΚΑΙ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ
Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΑΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΟ ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥ
ΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΥ
ΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥ
ΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΟ ΠΑΡΑ
ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑ
ΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΚ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ
ΤΟΥΤΕΩΝ

Διδακτορική διατριβή της Εργίνας Βούρκου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής Ψυχιατρικής και Νευρολογίας, με θέμα: «Τροποποιητές Τ-πρωτεϊνοπαθητικών μηχανισμών».

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 10-07-13

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-02-14

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 24-06-22

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Επιτροπής: 06-07-22

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παρασκευάς Γεώργιος	Καθηγητής Νευρολογίας-Νευροψυχολογίας ΕΚΠΑ (επιβλέπων)
Καπάκη Ελισσάβετ	Καθηγήτρια Νευρολογίας ΕΚΠΑ
Σκουλάκης Ευθύμιος	Ερευνητής Α΄, Ε.ΚΕ.ΒΕ. Άλ.Φλέμιγκ΄

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παρασκευάς Γεώργιος	Καθηγητής Νευρολογίας-Νευροψυχολογίας, ΕΚΠΑ (επιβλέπων)
Καπάκη Ελισσάβετ	Καθηγήτρια Νευρολογίας ΕΚΠΑ
Σκουλάκης Ευθύμιος	Ερευνητής Α΄, Ε.ΚΕ.ΒΕ. Άλ. Φλέμιγκ΄
Βουμβουράκης Κωνσταντίνος	Καθηγητής Νευρολογίας ΕΚΠΑ
Τσιβγούλης Γεώργιος	Καθηγητής Νευρολογίας ΕΚΠΑ
Ευθυμιόπουλος Σπύρος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου - Νευροβιολογίας ΕΚΠΑ
Κόνσουλας Χρήστος	Αναπληρωτής Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας ΕΚΠΑ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Σιάσος Γεράσιμος, Καθηγητής Καρδιολογίας ΕΚΠΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Επώνυμο: Βούρκου

Όνομα: Εργίνα

Όνομα Πατρός: Ιωάννης

Όνομα Μητρός: Ασημίνα

Ημερομηνία Γέννησης: 1 Ιουλίου 1984

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος

Εκπαίδευση

2013 – σήμερα	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής Ψυχιατρικής και Νευρολογίας και Ε.ΚΕ.ΒΕ. «Αλ. Φλέμιγκ». Διδακτορική διατριβή υπό την επίβλεψη του Γ. Παρασκευά, με θέμα «Τροποποιητές Τ-πρωτεϊνοπαθητικών μηχανισμών».
09/2009 – 03/2011	Μεταπτυχιακό Δίπλωμα: Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Μοριακή Γενετική- Διαγνωστικοί Δείκτες, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα Βαθμός Πτυχίου: Άριστα, 9,12
09/2002 - 10/2008	Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα Βαθμός Πτυχίου: Λίαν Καλώς, 6,65

Ερευνητική Εμπειρία

2013 - σήμερα

Εκπόνηση Διδακτορικής διατριβής με θέμα «Τροποποιητές Τ-πρωτεϊνοπαθητικών μηχανισμών», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επιβλέπων Καθηγητής: Παρασκευάς Γεώργιος, Καθηγητής Νευρολογίας-Νευροψυχολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

06/2019 - 12/2021

Εκπόνηση έργου στα πλαίσια του InfrafrontierGR/Phenotypos στα πλαίσια μελέτης και αξιολόγησης διαφόρων συμπεριφορικών διεργασιών στο ποντίκι

06/2010 - 04/2011

Εκπόνηση Διπλωματικής εργασίας με θέμα «Απομόνωση, Κινητικές Μελέτες και Κρυστάλλωση της οξειδάσης της ξανθίνης». Εργαστήριο λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Επιβλέπων Καθηγητής: Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητης Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

06/2009 – 06/2010

Εκπόνηση Έργου με θέμα «Μελέτη αναστολέων της Κυκλίνης Α2 και CDK2» στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Cell Cycle Specific CDK Inhibitors As Potential Anti-tumor Therapeutics Through REPLACE». Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Κοντοπίδης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

01/2007 - 12/2008

Εκπόνηση Διπλωματικής εργασίας με θέμα «Υπερέκφραση, Απομόνωση και Δομική Μελέτη του Καρβοξυτελικού Τμήματος 348-826 του Επαγόμενου από την Υποξία Παράγοντα-1α (HIF-1α)». Εργαστήριο λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Επιβλέπων Καθηγητής: Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

07/2004-08/2004

Πρακτική Άσκηση στο εργαστήριο Ιολογίας και Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας υπό τη γενική διεύθυνση της Δρ. Ματσα Ρεβέκκα, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα.

Συμμετοχή σε συνέδρια

2014 – Poster	Modifiers of learning and memory deficiencies in a Drosophila Tauopathy model. Vourkou, E., Tsarmpou, M., Papanikolopoulou, K. and Skoulakis, E.M.C. (European Drosophila Neurobiology Conference «Neurofly 2014», Crete, Greece)
2017- Poster	Modelling Tauopathy-associated learning and memory deficits in *Drosophila Melanogaster*. Vourkou, E., Papanikolopoulou, K. and Skoulakis, E.M.C. (Hellenic Society for Neuroscience, 2017, Athens, Greece)
2021- Poster	Differential functional specificity of human Tau isoforms. Paspaliaris V., Bourouliti A., Vourkou E., Papanikolopoulou K., Skoulakis E.M.C. (European Drosophila Neurobiology Conference «Neurofly 2020»)

Δημοσιεύσεις

1. Sealey, M. A., **Vourkou, E.**, Cowan, C. M., Bossing, T., Quraishe, S., Grammenoudi, S., Skoulakis E.M.C., Mudher, A. (2017). Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy. *Neurobiol Dis*, 105, 74-83. doi:10.1016/j.nbd.2017.05.003
2. Keramidis, I. [†], **Vourkou, E. [†]**, Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. C. (2020). Functional Interactions of Tau Phosphorylation Sites That Mediate Toxicity and Deficient Learning in Drosophila melanogaster. *Front Mol Neurosci*, 13, 569520. doi:10.3389/fnmol.2020.569520
3. Prifti, E., Tsakiri, E. N., **Vourkou, E.**, Stamatakis, G., Samiotaki, M., & Papanikolopoulou, K. (2021). The Two Cysteines of Tau Protein Are Functionally Distinct and Contribute Differentially to Its Pathogenicity in Vivo. *J Neurosci, 41*(4), 797-810. doi:10.1523/jneurosci.1920-20.2020
4. Prifti, E. [†], Tsakiri, E. N. [†], **Vourkou, E. [†]**, Stamatakis, G., Samiotaki, M., Skoulakis, E. M. C., & Papanikolopoulou, K. (2022). Mical modulates Tau toxicity via cysteine oxidation in vivo. *Acta Neuropathol Commun*, 10(1):44. doi: 10.1186/s40478-022-01348-1.
5. **Vourkou, E. [†]**, Paspaliaris V.[†], Bourouliti, A., Zerva, MC., Prifti, E., Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. C. (2022). Differential Effects of Human Tau Isoforms to Neuronal Dysfunction and Toxicity in the Drosophila CNS. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 26;23(21):12985. doi: 10.3390/ijms232112985.
6. **Vourkou, E.**, Rouiz Ortega, E.D., Mudher, A., & Skoulakis, E. M. C. Human Tau aggregates are permissive to Protein Synthesis dependent memory in Drosophila Tauopathy models. **Under revision**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τελειώνοντας την διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους των οποίων η συμβολή ήταν καθοριστική για την πραγματοποίησή της. Ευχαριστώ λοιπόν τον τομέα Κοινωνικής Ιατρικής Ψυχιατρικής και Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και ιδιαίτερα τον Καθηγητή Νευρολογίας-Νευροψυχολογίας κ. Παρασκευά Γεώργιο καθώς και την Καθηγήτρια Νευρολογίας κ. Καπάκη Ελισσάβετ, που ως μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, βοήθησαν σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής με τα εποικοδομητικά σχόλια τους. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους Καθηγητή κ. Βουμβουράκη, Καθηγητή κ. Τσιβγούλη, Καθηγητή κ. Ευθυμιόπουλο Σπύρο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κόνσουλα, οι οποίοι μαζί με τους παραπάνω συναποτελούν την επταμελή επιτροπή και βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Πολύ ιδιαίτερα θα ευχαριστήσω τον Ερευνητή κ. Σκουλάκη Ευθύμιο, στου οποίου το εργαστήριο πραγματοποίησα την διατριβή αυτή. Τον ευχαριστώ αρχικώς που με δέχτηκε και με εμπιστεύθηκε για την διεκπεραίωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η βοήθεια και η συμπαράσταση που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια που βρέθηκα στο εργαστήριο του ήταν πολύτιμη, καθώς και η ακόρεστη διάθεσή του να μου προσφέρει επιστημονική καθοδήγηση και εκπαίδευση, ώστε να αποκτήσω ανεξάρτητη και ισχυρή επιστημονική σκέψη. Δεν θα μπορούσα να μην επισημάνω τις ατελείωτες ώρες στο γραφείο του να μιλάμε για επιστημονικά θέματα, και όχι μόνο, παραμελώντας τις οποιεσδήποτε άλλες σημαντικές υποχρεώσεις του. Ήταν πάντα παρών σε οτιδήποτε και αν τον χρειάστηκα, ήταν παρών στις περιπέτειες των πειραμάτων, στις διάφορες αντιξοότητες που αντιμετώπισα, στις απογοητεύσεις μου αλλά και στις επιτυχίες μου. Θα θυμάμαι πάντα την ικανοποίησή του για το πρώτο αποτέλεσμα καθώς και την κάθε στιγμή που ζήσαμε στο εργαστήριο. Μέσα από τη διαδρομή αυτή με συνοδοιπόρο τον Δάσκαλο για μένα, τον Μάκη, διδάχθηκα πολλά όχι μόνο σε επιστημονικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο. Φυσικά μαζί του θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου του, παλιά και καινούργια, για την άριστη συνεργασία και την προθυμία να βοηθήσουν ανά πάσα στιγμή.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον άνθρωπο εκείνο που του οφείλω πολλά, την κ. Παπανικολοπούλου Κατερίνα. Το ευχαριστώ δεν φτάνει για να της εκφράσω όλα όσα της οφείλω. Με στήριξε ηθικά και επιστημονικά και η βοήθειά της ήταν καταλυτική για την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Πέρα όμως από την βοήθειά της, δεν θα μπορούσα να μην την ευχαριστήσω και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε μέρος της ερευνητικής της δουλειάς. Η συνεργασία μαζί της ήταν κάτι που θα θυμάμαι για πάντα. Φυσικά μαζί της, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου της, για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς τους ανθρώπους, τους φίλους μου, που μου στάθηκαν και με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια και ανέχτηκαν την απουσία μου λόγω των ατελείωτων ωρών στο εργαστήριο.

Δεν θα μπορούσα επίσης να μην πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου. Στον μπαμπά μου Ιωάννη, τη μητέρα μου Ασημίνα και τον αδερφό μου Φιλάρετο, οι οποίοι με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όμως το οφείλω στον άντρα μου Παναγιώτη για την ατελείωτη στήριξή του όλα αυτά τα χρόνια και για την τεράστια υπομονή του και φυσικά στην όμορφη μπέμπα μας…

Αφιερωμένο στον άντρα μου Παναγιώτη

και στην μπέμπα μας με αγάπη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ 15

Εικόνες και Πίνακες Γενικού και Ειδικού Μέρους 22

Εικόνες και Πίνακες Γενικού Μέρους 22

Εικόνες και Πίνακες Ειδικού Μέρους..... 23

Εικόνες και Πίνακες Συμπληρωματικών Δεδομένων Ειδικού Μέρους..... 24

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 26

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... 29

1. Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες..... 30

2. Πρωτεΐνη Τ..... 30

2.1. Γονίδιο τ..... 30

2.2. Ισομορφές της πρωτεΐνης Τ 32

2.3. Κυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών της πρωτεΐνης Τ..... 32

2.4. Φυσιολογικός Ρόλος της πρωτεΐνης Τ. 33

2.5. Λειτουργικές Περιοχές της πρωτεΐνης Τ. 34

2.6. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Τ 36

2.6.1. Φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ 36

2.6.1.1. Πρωτεϊνικές κινάσες της πρωτεΐνης Τ..... 37

2.6.1.1.1. Κινάση-3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3)..... 37

2.6.1.1.2. Εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 5 (CDK5)..... 38

2.6.1.1.3. Αμινοτελική κινάση C-Jun (JNK) 38

2.6.1.1.4. Κινάση της καζεΐνης 1 (CK1) 39

2.6.1.1.5. Κινάσες που ρυθμίζουν τη συγγένεια των μικροσωληνίσκων (MARKs). 39

2.6.1.1.6. Εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP (cAMP) πρωτεϊνική κινάση (PKA)..... 40

2.6.1.1.7. Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMPK)..... 40

2.6.1.1.8. Διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενη από τη φωσφορυλίωση τυροσίνης κινάση 1A (Dyrk1A) 40

2.6.1.1.9. TPKI και TPKII κινάσες 41

2.6.1.1.10. Src πρωτεϊνικές κινάσες 41

2.6.1.2. Πρωτεϊνικές φωσφατάσες της πρωτεΐνης Τ 41

2.6.1.2.1. Πρωτεϊνική φωσφατάση 2B (PP2B) 42

2.6.1.2.2. Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A) 42
2.6.1.2.3. Πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) 43
2.6.1.2.4. Πρωτεϊνική φωσφατάση 5 (PP5) 43
2.6.2. Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις 43
2.7. Ο φυσιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ 46
3. Παθολογία και τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ 48
3.1. Μηχανισμοί παθολογίας της πρωτεΐνης Τ 48
3.1.1. Υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ 48
3.1.2. Συσσωμάτωση πρωτεΐνης Τ. 51
3.1.2.1. Μονομερή πρωτεΐνης Τ 53
3.1.2.2. Διμερή/Τριμερή πρωτεΐνης Τ 53
3.1.2.3. Διαλυτά Ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ 54
3.1.2.4. Αδιάλυτα κοκκώδη ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ (GTOs). 54
3.1.2.5. Ινίδια πρωτεΐνης Τ 54
3.1.2.6. Νευροϊνιδικά πλέγματα (NFTs) 55
3.1.2.7. Μηχανισμοί συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης Τ 55
3.2. Μηχανισμοί τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ 57
3.2.1. Αποσταθεροποίηση μικροσωληνίσκων 57
3.2.2. Διάδοση της πρωτεΐνης Τ 59
4. Τ-πρωτεϊνοπάθειες 61
4.1. Βιοχημική Ανάλυση των Τ-πρωτεϊνοπαθειών 63
4.2. Η νόσος του Alzheimer 63
4.3. Φλοιοβασική Εκφύλιση (CBD) 67
4.4. Προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (PSP) 68
4.5. Νόσος του Pick 69
4.6. Μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό σχετιζόμενη με το χρωμόσωμα 17 (FTDP-17) 70
4.6.1. Μεταλλάξεις του γονιδίου τ που σχετίζονται με τη νόσο FTDP-17 70
4.6.2. Νευροπαθολογία και κλινική εικόνα των FTDP-17 ασθενειών 72
4.7. Πολυμορφισμοί γονιδίου τ 73
5. Ο οργανισμός μοντέλο *Drosophila melanogaster* 73
5.1. Κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster* 74
5.2. Σύστημα έκφρασης διαγονιδίων GAL4/UAS 76
5.3. Επαγόμενο σύστημα έκφρασης TARGET 77

5.4. Η μάθηση και μνήμη στη Drosophila melanogaster 78
5.4.1. Διάκριση φάσεων μνήμης στη *D. melanogaster* 78
5.4.2. Δοκιμασία οσφρητικής μάθησης και μνήμης στη *D. melanogaster* 79
5.5. Η *Drosophila melanogaster* ως μοντέλο για τη μελέτη των Τ-πρωτεϊνοπαθειών. 81
6. Βιβλιογραφία 83

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 112

1. Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις των θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ που διέπουν την τοξικότητα της και την ελλιπή μάθηση στο μοντέλο της *Drosophila melanogaster* 113

1.1. Περίληψη 113
1.2. Εισαγωγή 113
1.3. Υλικά και μέθοδοι 116
1.3.1. Καλλιέργεια και στελέχη *Drosophila melanogaster* 116
1.3.2. Ιστολογία 118
1.3.3. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western και αντισώματα: 118
1.3.4. Προσδιορισμός προσδόκιμου ζωής σε ενήλικα ζώα Drosophila 119
1.3.5. Οξειδωτικό στρες 119
1.3.6. Συμπεριφορική ανάλυση 120
1.3.7. Στατιστική Ανάλυση 121
1.4. Αποτελέσματα 121
1.4.1. Τα μαθησιακά ελλείμματα είναι ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ στη Drosophila 121
1.4.2. Διαφορικός ρόλος των Ser^{238} και Thr^{245} στη τοξικότητα της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ 124
1.4.3. Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης των θέσεων Ser^{238} και Thr^{245}. 129
1.4.4. Διαφορικός ρόλος των Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262} στα μαθησιακά ελλείμματα, τα οποία εξαρτώνται από την έκφραση της πρωτεΐνης Τ. 132
1.5. Συζήτηση 135
1.6. Συμπληρωματικά δεδομένα 138
1.7. Βιβλιογραφία 146

SCIENTIFIC PUBLICATION 150

2. Διαφορικοί μηχανισμοί τοξικότητας των ανθρωπίνων ισομορφών της πρωτεΐνης Τ με τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις στο μοντέλο Τ-πρωτεϊνοπαθειών *Drosophila melanogaster* 173

2.1. Περίληψη..... 173

2.2. Εισαγωγή..... 173

2.3. Υλικά και μέθοδοι..... 175

2.3.1. Καλλιέργεια και στελέχη Drosophila..... 175

2.3.2. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western..... 175

2.3.3. Δοκιμασία συνειρμικής μάθησης και μνήμης σε ενήλικες μύγες..... 176

2.4. Αποτελέσματα..... 177

2.4.1. Οι ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ προκαλούν διαφορετικούς φαινοτύπους..... 177

2.4.2. Οι ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ επάγουν διαφορετικούς μηχανισμούς τοξικότητας..... 180

2.5. Συζήτηση..... 182

2.6. Συμπέρασμα..... 184

2.7. Παράρτημα Α..... 185

2.8. Παράρτημα Β-Συμπληρωματικές εικόνες..... 190

2.9. Βιβλιογραφία..... 192

SCIENTIFIC PUBLICATION 196

3. Τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ δρουν επιτρεπτικά έναντι των διεργασιών που αποτελούν τη βάση για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSD-M, στη *Drosophila Melanogaster.* 210

3.1. Περίληψη..... 210

3.2. Εισαγωγή..... 211

3.3. Υλικά και μέθοδοι..... 213

3.3.1. Καλλιέργεια και στελέχη *Drosophila melanogaster*..... 213

3.3.2. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western..... 215

3.3.3. Δοκιμασία διαλυτότητας της πρωτεΐνης Τ για εμπλουτισμό των ολιγομερών..... 215

3.3.4. Εξαγωγή του RNA και RT-PCR..... 216

3.3.5. Προσδιορισμός προσδόκιμου ζωής σε ενήλικα ζώα Drosophila..... 216

3.3.6. Χρήση φαρμάκου..... 217

3.3.7. Δοκιμασία συνειρμικής μάθησης και μνήμης σε ενήλικες μύγες..... 217

3.3.8. Στατιστική Ανάλυση 219
3.4. Αποτελέσματα 219
3.4.1. Έκφραση της ανθρώπινης ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ στο ΚΝΣ ενηλίκων μυγών προκαλεί ελλείμματα στη συνειρμική μάθηση και στην εξαρτώμενη από τη πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη. 219
3.4.2. Η συσσώρευση αδιάλυτων συσσωματωμάτων πρωτεΐνης Τ συσχετίζεται με την αντιστροφή του ελλείμματος στην εξαρτωμένη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M. 223
3.4.3. Αναστολή σχηματισμού των αδιάλυτων hTau^{0N4R} συσσωματωμάτων οδηγεί σε ελλείμματα στην PSD-M. 227
3.4.4. Οι μύγες που εκφράζουν hTau^{0N3R} παρουσιάζουν φυσιολογική PSD-M και αυξημένο ποσό αδιάλυτων συσσωματωμάτων. 231
3.4.5. Ο σχηματισμός αδιάλυτων συσσωματωμάτων στα μισχοειδή σωμάτια προκαλεί φυσιολογική PSD-M, ενώ η ελάττωση τους έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελλειμματικής μνήμης. 235
3.5. Συζήτηση 237
3.5.1. Αντιστροφή ελλειμμάτων στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη σε ενήλικα ζώα που εκφράζουν τη πρωτεΐνη Τ. 237
3.5.2. Η αυξημένη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ στο ΚΝΣ ενηλίκων μυγών συσχετίζεται με την καταστολή των ελλειμμάτων PSD-M. 239
3.6. Συμπληρωματικά Δεδομένα 243
3.7. Βιβλιογραφία 258

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 264

1. Χαρακτηρισμός συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, οι οποίες και καθορίζουν την τοξικότητά της. 266
2. Μελέτη μηχανισμών τοξικότητας των 3R και 4R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ. 269
3. Μελέτη των γνωστικών δυσλειτουργιών των Τ-πρωτεϊνοπαθειών. 271
4. Τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι των διεργασιών που απαιτούνται για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη... 273

Συμπεράσματα 276
Βιβλιογραφία 278

OTHER SCIENTIFIC PUBLICATIONS 281

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

0N4R^{S238A}, S238A	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 0N4R, στην οποία η σερίνη (S) 238 έχει αντικατασταθεί με αλανίνη (A)
0N4R^{S238E}, S238E	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 0N4R, στην οποία η σερίνη (S) 238 έχει αντικατασταθεί με το φωσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ (Glu)
0N4R^{S262A}, S262A	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 0N4R, στην οποία η σερίνη (S) 262 έχει αντικατασταθεί με αλανίνη (A)
0N4R^{S262E}, S262E	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 0N4R, στην οποία η σερίνη (S) 262 έχει αντικατασταθεί με το φωσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ (Glu)
0N4R^{STA}	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 0N4R, στην οποία υπάρχει ταυτόχρονη αντικατάσταση της σερίνης 238 και της θρεονίνης 245 με την αλανίνη.
0N4R^{T245A}, T245A	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 0N4R, στην οποία η θρεονίνη (T) 245 έχει αντικατασταθεί με αλανίνη (A)
0N4R^{T245E}, T245E	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 0N4R, στην οποία η θρεονίνη (T) 245 έχει αντικατασταθεί με το φωσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ (Glu)

$2N4R^{STA}$	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 2N4R, στην οποία υπάρχει ταυτόχρονη αντικατάσταση της σερίνης 238 και της θρεονίνης 245 με την αλανίνη.
3R (three-repeat)	Ισομορφές της πρωτεΐνης Τ που περιέχουν τρεις επαναλήψεις στη περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους
4R (four-repeat)	Ισομορφές της πρωτεΐνης Τ που περιέχουν τέσσερις επαναλήψεις στη περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους
AD (Alzheimer's Disease)	Νόσος του Alzheimer
AGD (Argyrophilic grain disease)	Άνοια αργυλοφιλικών κόκκων
ALS (Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism- dementia complex of Guam)	Σύμπλεγμα πλάγιας μυατροφικής σκλήρυνσης και παρκινσονισμού του Guam
AMPK (Adenosine-monophosphate activated protein kinase)	Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη
APP (Amyloid precursor protein)	Πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς
ARM (Anaesthesia Resistant Memory)	Ανθεκτική στην αναισθησία μνήμη
CAMK (Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase)	Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το ασβέστιο/καλμοδουλίνη

CBD (Corticobasal degeneration)	Φλοιοβασική εκφύλιση
cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5)	Κινάση εξαρτώμενη από την κυκλίνη 5
CK1 (Casein kinase 1)	Κινάση καζεΐνης 1
CSF (Cerebrospinal fluid)	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
C-άκρο (C-terminal)	Καρβοξυ-τελικό άκρο
DS (Down's Syndrome)	Σύνδρομο Down
Dyrk1A (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A)	Διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενη από τη φωσφορυλίωση τυροσίνης κινάση 1Α
FTD (Frontotemporal dementia)	Μετωποκροταφική άνοια
FTDP-17 (Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17)	Μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό σχετιζόμενη με το χρωμόσωμα 17
GGT (Globular glial tauopathy)	Σφαιρική νευρογλοιακή Τ- πρωτεϊνοπάθεια
GSK-3 (Glycogen synthase kinase-3)	Κινάση-3 της συνθάσης του γλυκογόνου
GTOs (Granular tau oligomers)	Κοκκώδη ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ
JNK (C-Jun amino-terminal kinase)	Αμινοτελική κινάση C-Jun

LTM (Long Term Memory)	Μακροπρόθεσμη μνήμη
MAP (Microtubule associated protein)	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους
MAP2c (Microtubule associated protein 2c)	Ισομορφή c της πρωτεΐνης 2 που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους
MAPKs (Mitogen-activated protein kinases)	Πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα
MARKs (Microtubule-affinity regulating kinases)	Κινάσες που ρυθμίζουν τη συγγένεια των μικροσωληνίσκων
MB (Mushroom bodies)	Μισχοειδή σωμάτια
MetBlu (Methylene blue)	Μπλε του μεθυλενίου
MTB (Microtubule binding domain)	Περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους
MTM (Middle Term Memory)	Μεσοπρόθεσμη μνήμη
NFT (Neurofibrillary tangle)	Νευροϊνιδικό πλέγμα
N-άκρο (N-terminal)	Άμινο-τελικό άκρο
p (p-value)	Τιμή σημαντικότητας
P301L	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, 2N4R, στην οποία η προλίνη 301 έχει αντικατασταθεί με λευκίνη

PD (Parkinson’s disease)	Νόσος του Parkinson
PDPK (Proline-directed protein kinases)	Πρωτεϊνικές κινάσες κατευθυνόμενες από την προλίνη
PHFs (Paired helical filaments)	Ζεύγη ελικοειδών ινιδίων
PI (Performance Index)	Δείκτης απόδοσης
PiD (Pick’s Disease)	Νόσος του Pick
PKA (Cyclic AMP, cAMP-dependent protein kinase)	Εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP (cAMP) πρωτεϊνική κινάση
PP1 (Protein phosphatase 1)	Πρωτεϊνική φωσφατάση 1
PP2A (Protein phosphatase 2A)	Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A
PP2B (Protein phosphatase PP2B, calcineurin)	Πρωτεϊνική φωσφατάση 2B, καλσινευρίνη
PP5 (Protein phosphatase 5)	Πρωτεϊνική φωσφατάση 5
PSD-M (Protein-Synthesis-Dependent Memory)	Εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη
PSI-M (Protein-Synthesis-Independent Memory)	Ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη
PSP (Progressive Supranuclear Palsy)	Προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση

pT, pThr (Phospho-threonine)	Φωσφο-θρεονίνη
p-tau (Phospho-tau)	Φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ
SEM (Standard error of the mean)	Τιμή τυπικού σφάλματος
Ser, S (serine)	Σερίνη
SFs (Straight Filaments)	Ευθύγραμμα ινίδια
STA	Μεταλλαγμένη ισομορφή τ, στην οποία υπάρχει ταυτόχρονη αντικατάσταση της σερίνης 238 και της θρεονίνης 245 με την αλανίνη
STM (Short Term Memory)	Βραχυπρόθεσμη μνήμη
Thr, T (Threonine)	Θρεονίνη
TPK (Tyrosine protein kinases)	Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης
Αβ (β-amyloid)	β- αμυλοειδές
$Aβ_{40}$ (β-amyloid 40)	β-αμυλοειδές 40
$Aβ_{42}$ (β-amyloid 42)	β-αμυλοειδές 42
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΠΝΣ	Περιφερικό Νευρικό Σύστημα

Εικόνες και Πίνακες Γενικού και Ειδικού Μέρους

Εικόνες και Πίνακες Γενικού Μέρους

Εικόνα 1. Σχηματική Αναπαράσταση του ανθρώπινου γονιδίου τ, του πρώιμου μεταγράφου και των 6 ισομορφών της πρωτεΐνης στο ΚΝΣ. 31
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Τ στους ώριμους νευρώνες.. 32
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων ρόλων της πρωτεΐνης Τ. 34
Εικόνα 4. Λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης Τ. 35
Εικόνα 5. Σχηματική Αναπαράσταση των θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ.. 37
Εικόνα 6. Απεικόνιση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης Τ. 44
Εικόνα 7. Θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ..... 49
Εικόνα 8. Διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ.. 50
Εικόνα 9. Αλλαγή συνολικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης Τ, έπειτα από φωσφορυλίωση. 51
Εικόνα 10. Διαφορετικά είδη της πρωτεΐνης Τ. 52
Εικόνα 11. Αποσταθεροποίηση μικροσωληνίσκων ως αποτέλεσμα υπερ-φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ.. 58
Εικόνα 12. Στάδια Braak της παθολογίας του AD..... 60
Εικόνα 13. Υγιής εγκέφαλος σε σχέση με εγκέφαλο με σοβαρή νόσο Alzheimer. 64
Εικόνα 14. Απεικόνιση πλακών αμυλοειδους βήτα και νευροινιδικών πλεγμάτων της πρωτείνης Τ. 65
Εικόνα 15. Διάταξη των πρωτοινιδίων προς σχηματισμό των PHFs και SFs στη νόσο του Alzheimer..... 66
Εικόνα 16. Δομή ινιδίων της πρωτείνης Τ στη νόσο CBD και στη νοσο του AD. 68
Εικόνα 17. Δομή ινιδίων της πρωτείνης Τ στη νόσο του Pick και στη νοσο του AD. 70
Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων του γονιδίου τ.. 71
Εικόνα 19. Κύκλος ζωής της Drosophila melanogaster. 75
Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος έκφρασης GAL4/UAS και του συστήματος TARGET. 77
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών τύπων μνήμης στη D.melanogaster.. 79
Εικόνα 22. Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της παβλοβιανής αρνητικής οσφρητικής μάθησης στη D.melanogaster.. 80

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των πιο κοινών Τ-πρωτεϊνοπαθειών με βάση τις ισομορφές που εμπλέκονται σε κάθε ασθένεια. 62

Εικόνες και Πίνακες Ειδικού Μέρους

Εικόνα 1-1. Η έκφραση της πρωτεΐνης Τ στο ΚΝΣ της μύγας δεν προκαλεί δομικά ελλείμματα στα μισχοειδή σωμάτια (MB), ενώ επιφέρει μαθησιακά ελλείμματα ανεξαρτήτων των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης.. 124
Εικόνα 1-2. Διαφορική επίδραση των Ser^{238} και Thr^{245} στη πρόωρη θνησιμότητα 127
Εικόνα 1-3. Διαφορική επίδραση των Ser^{238} και Thr^{245} στο οξειδωτικό στρες..... 129
Εικόνα 1-4. Αλληλεπίδραση φωσφορυλιώσεων μεταξύ των Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262}..... 132
Εικόνα 1-5. Διαφορικά ελλείμματα στη μάθηση παρατηρούνται για τα μεταλλάγματα Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262}..... 134
Εικόνα 1-6. Σχηματική απεικόνιση της προτεινόμενης αλληλεπίδρασης του «κατασταλτικού θυροφύλακα» Thr^{245} και του «διευκολυντή θυροφύλακα» Ser^{262} 137

Εικόνα 2-1. Έκφραση της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη, ενώ η έκφραση της ανθρώπινης 0N3R ισομορφής όχι 179
Εικόνα 2-2. Παρόμοια επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ σε τρία ανεξάρτητα διαγονίδια. 180
Εικόνα 2-3. Σύγκριση επιπέδων φωσφορυλίωσης ανάμεσα στις δύο ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ σε συγκεκριμένες θέσεις.. 181

Εικόνα 3-1. Έκφραση της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί ελλείμματα στη μάθηση και στην εξαρτώμενη από τη πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο 220
Εικόνα 3-2. Έκφραση της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ παρουσιάζει φυσιολογική μάθηση έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση και φυσιολογική PSI-M 221
Εικόνα 3-3. Επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης Τ σε διαφορετικά διαγονίδια 0N4R 222
Εικόνα 3-4. Έκφραση του διαγονιδίου $0N4R^{2a}$ της πρωτεΐνης Τ προκαλεί ελλείμματα στη μάθηση και στην PSD-M..... 223
Εικόνα 3-5. Αυξημένος σχηματισμός συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ, έπειτα από καταστολή έκφρασής της..... 225
Εικόνα 3-6. Μεταγραφική καταστολή του διαγονιδίου της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD-M..... 226
Εικόνα 3-7. Ποσοτικοποίηση διαλυτών και αδιάλυτων μορφών $hTau^{0N4R}$, έπειτα από χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων MetBlu..... 228
Εικόνα 3-8. Καμία μεταβολή στο ποσοστό επιβίωσης, έπειτα από χορήγηση MetBlu σε μύγες $hTau^{0N4R}$ στους 18°C..... 229
Εικόνα 3-9. Χορήγηση συγκεκριμένης συγκέντρωσης MetBlu, σε ζώα που βρίσκονται υπό μεταγραφική καταστολή του διαγονιδίου της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί μείωση των αδιάλυτων συσσωματωμάτων και αυξημένα ελλείμματα στην PSD-M 230
Εικόνα 3-10. Χορήγηση του MetBlu σε μύγες που εκφράζουν την $hTau^{0N3R}$ για 12 ημέρες στους 30°C προκαλεί μείωση του ποσοστού των συσσωματωμάτων της 232

Εικόνα 3-11. Χορήγηση συγκεκριμένης συγκέντρωσης MetBlu, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau^{0N3R}, προκαλεί ελλείμματα ειδικά ως προς την απόδοση των ζώων στην PSD-M 234
Εικόνα 3-12. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ στα μισχοειδή σωμάτια δεν είναι επαρκή για τη δημιουργία ελλειμμάτων στην PSD-M 236
Εικόνα 3-13. Χορήγηση συγκεκριμένης συγκέντρωσης MetBlu, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau^{0N4R}, προκαλεί ελλείμματα στην PSD-M 237

Πίνακας 1-1. Αντισώματα έναντι της ολικής πρωτεΐνης Τ και συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης 118

Εικόνες και Πίνακες Συμπληρωματικών Δεδομένων Ειδικού Μέρους

Συμπληρωματική Εικόνα 1-1. Ισόποση έκφραση των διαφορετικών μεταλλαγμάτων Ala και Glu που έχουν εισαχθεί στη θέση 55B2 με την πρωτεΐνη ελέγχου 0N4R 138
Συμπληρωματική Εικόνα 1-2. Το 0N4R^{STA} εκφράζεται στα ίδια επίπεδα με το 0N4R^{II} και δεν έχει τον επίτοπο pSer^{238} 138

Συμπληρωματική Εικόνα 2-1. Μύγες που εκφράζουν την ισομορφή 0N3R έχουν μικρότερο προσδόκιμο ζωής και μειωμένη ικανότητα αναρρίχησης σε σχέση με ένα ανεξάρτητο διαγονίδιο για την 0N4R ισομορφή 190
Συμπληρωματική Εικόνα 2-2. Έκφραση της πρωτεΐνης Τ προκαλεί βλάβη στην ακεραιότητα της μεμβράνης 191

Συμπληρωματική Εικόνα 3-1. Διαφορική επίδραση στην θνησιμότητα των διαφορετικών συγκεντρώσεων του MetBlu για τις μύγες πειραματικού ελέγχου και για τις μύγες που εκφράζουν τις ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ 243
Συμπληρωματική Εικόνα 3-2. Η χορήγηση MetBlu σε μύγες πειραματικού ελέγχου δεν προκαλεί αλλαγές στην απόδοση της PSD-M. 244

Συμπληρωματικός Πίνακας 1-1. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-1. 139
Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 Α. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-2Α. 140
Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 Β. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-2Β. 141
Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 C. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-2C. 142
Συμπληρωματικός Πίνακας 1-3. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-3. 143
Συμπληρωματικός Πίνακας 1-4. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-4. 144
Συμπληρωματικός Πίνακας 1-5. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-5. 145

Συμπληρωματικός Πίνακας 3-1. Στατιστική ανάλυση εικόνων 3-2 και 3-3 245
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-2. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-4 246

Συμπληρωματικός Πίνακας 3-3. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-5. 247
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-4. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-6 248
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-5. Στατιστική ανάλυση συμπληρωματικής εικόνας 3-1A. ... 249
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-6. Στατιστική ανάλυση συμπληρωματικής εικόνας 3-1B 250
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-7. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-7 251
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-8. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-9.. 252
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-9. Στατιστική ανάλυση συμπληρωματικής εικόνας 3-1C 254
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-10. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-10 254
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-11. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-11. 255
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-12. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-12. 256
Συμπληρωματικός Πίνακας 3-13. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-13. 257

Παράρτημα Α-Εικόνα 1. Έκφραση της hTau^{0N3R} και όχι της hTau^{0N4R} προκαλεί κινητικές αλλοιώσεις και βλάβη στην αξονική μεταφορά 185
Παράρτημα Α-Εικόνα 2. Διαφορετική τοξικότητα ανάλογα με την ισομορφή που εκφράζεται σε ενήλικες μύγες *Drosophila melanogaster*..... 186
Παράρτημα Α-Εικόνα 3. Η έκφραση της 0N4R ισομορφής προκαλεί ισχυρότερη τοξικότητα στους αισθητήριους υποδοχείς (R7 νευρώνες) σε σχέση με την 0N3R ισομορφή 187
Παράρτημα Α-Εικόνα 4. Οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης Τ δεν έχουν καμία διαφορά στο σχηματισμό των αδιάλυτων ολιγομερών. 188
Παράρτημα Α-Εικόνα 5. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης σε προνύμφες που εκφράζουν τις hTau^{0N3R} και hTau^{0N4R} 188
Παράρτημα Α-Εικόνα 6. Οξειδωτικό στρες σε μύγες που εκφράζουν τις hTau^{0N3R} και hTau^{0N4R} ισομορφές..... 189

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες περιλαμβάνουν ένα σύνολο ασθενειών που σχετίζονται με τη προοδευτική απώλεια της δομής ή της λειτουργίας των νευρώνων (εκφύλιση) και οδηγούν στο θάνατο των νευρώνων και των ιστών και συνεπώς στην επικείμενη δυσλειτουργία του εγκεφάλου. Σχετίζονται άμεσα με την ηλικία και εξελίσσονται χρονικά προκαλώντας προβλήματα στην κίνηση (αταξία) και στη νοητική λειτουργία (άνοια). Μια ιδιαίτερη κατηγορία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών αποτελούν οι Τ-πρωτεϊνοπάθειες, δηλαδή οι ασθένειες που σχετίζονται με την πρωτεΐνη Τ (με κυριότερη τη νόσο του Alzheimer) και χαρακτηρίζονται από υπερ-φωσφορυλιωμένη και μη φυσιολογικά φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ ή από μεταλλάξεις στο γονίδιο τ. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ θεωρείται ότι είναι ένα από τα πρώιμα συμβάντα της παθογένεσης που προκαλεί η πρωτεΐνη Τ, πριν ακόμα την εσφαλμένη αναδίπλωσή της ή την δημιουργία των συσσωματωμάτων της. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ εκδηλώθηκε έπειτα από την ανακάλυψη ότι τα ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) που βρίσκονται σε ασθενείς με AD αποτελούνται από φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ. Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί πληθώρα μελετών για την ανάδειξη των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους η πρωτεΐνη Τ οδηγεί σε νευροεκφυλισμό. Για το σκοπό αυτό έχουν δημιουργηθεί διάφορα διαγονιδιακά μοντέλα, όπως στο ποντίκι και στη *Drosophila Melanogaster*, στα οποία εκφράζονται διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ καθώς και διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές της. Η έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ στο Κεντρικό νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) της Drosophila οδηγεί σε αυξημένη τοξικότητα, πρόωρη θνησιμότητα και σε ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη.

Οι <u>στόχοι της παρούσης έρευνας</u> συνοψίζονται παρακάτω:

Αρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ που καθορίζουν την τοξικότητά της. Η κατανόηση του προτύπου και του τρόπου ρύθμισης της φωσφορυλίωσης της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ είναι σημαντική για την παρακολούθηση και εξέλιξη διαφόρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών. Η αναγνώριση συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης, οι οποίες δρουν ως «θυροφύλακες» για μια σειρά άλλων επικείμενων φωσφορυλιώσεων, μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο βιοδείκτη για την πρόγνωση των Τ-πρωτεϊνοπαθειών.

Στη συνέχεια, με γνώμονα το γεγονός ότι οι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ εμπλέκονται ποικιλοτρόπως στη παθογένεση των διαφορετικών Τ-πρωτεϊνοπαθειών κρίθηκε απαραίτητη η αξιολόγηση των φαινοτύπων που είναι ειδικοί για την κάθε ισομορφή της πρωτεΐνης Τ στη *D. melanogaster*. Οι έξι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ πολλές φορές θεωρούνται ως η ίδια πρωτεΐνη και πράγματι πολλά από τα φυσιολογικά αλλά και παθολογικά χαρακτηριστικά τους είναι παρόμοια. Ωστόσο, υπάρχουν σαφείς διαφορές στη

λειτουργία των ισομορφών, οι οποίες προκύπτουν από τις μεταβλητές Ν-τελικές περιοχές και από τις 3 ή 4 περιοχές πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους. Οι διαφορές που εξαρτώνται από την ισομορφή, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία ερευνητικών δεδομένων στα μοντέλα των Τ-πρωτεϊνοπαθειών και μπορεί να ρίξουν φως στον διαφορετικό ρόλο της κάθε ισομορφής στη παθογένεση των ασθενειών, ειδικά σε αυτές όπου μόνο μια από αυτές τις ισομορφές κυριαρχεί.

Τέλος, ένα από τα πιο κοινά χαρακτηριστικά των περισσοτέρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν εμπλέκουν μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Τ, όπως η νόσος του Alzheimer, είναι τα χρονο-εξαρτώμενα ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη. Συνεπώς, ως τελικός στόχος της παρούσας εργασίας κρίθηκε απαραίτητο να διερευνηθεί εάν αυτές οι γνωστικές δυσλειτουργίες των Τ-πρωτεϊνοπαθειών είναι απόρροια δυσλειτουργικών και εκφυλισμένων ή άθικτων νευρώνων, καθώς και του ρόλου που διαδραματίζουν τα συσσωματώματα στις διεργασίες που απαιτούνται για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη. Η περίπτωση τα γνωστικά ελλείμματα που προκύπτουν να είναι απόρροια ναι μεν δυσλειτουργικών νευρώνων, αλλά άθικτων δομικά, δίνει επίσης πιθανότητες να είναι εφικτή και η αναστροφή των γνωστικών ελλειμμάτων με φάρμακα και σε ασθενείς, τουλάχιστον πριν τα μεταγενέστερα εκφυλιστικά στάδια της νόσου. Ενώ, η διερεύνηση του ρόλου των συσσωματωμάτων σε συγκεκριμένες γνωστικές λειτουργίες μπορεί να υποδείξει πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους (π.χ φάρμακα που επάγουν ή αναστέλλουν τη συσσωμάτωση), ως καταλληλότερους για την θεραπεία των γνωστικών δυσλειτουργιών και στον άνθρωπο.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι μια γενική έννοια, η οποία περιλαμβάνει ένα σύνολο ασθενειών που σχετίζονται με τη προοδευτική απώλεια της δομής ή της λειτουργίας των νευρώνων (εκφύλιση) και οδηγούν στο θάνατο των νευρώνων και των ιστών και συνεπώς στην επικείμενη δυσλειτουργία του εγκεφάλου. Σχετίζονται άμεσα με την ηλικία και εξελίσσονται χρονικά προκαλώντας προβλήματα στην κίνηση (αταξία) και στη νοητική λειτουργία (άνοια). Το ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού που προσβάλλεται από τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες αυξάνεται συνεχώς και αναμένεται ο διπλασιασμός των πασχόντων κάθε 20 χρόνια. Οι πιο συχνές νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι η νόσος του Alzheimer και του Parkinson, πολυγλουταμινικές ασθένειες όπως η νόσος του Huntington, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, η νωτιαία μυϊκή ατροφία και οι νόσοι του κινητικού νευρώνα. Κοινό χαρακτηριστικό των περισσοτέρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι η μη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η συσσώρευση αυτών δημιουργώντας χαρακτηριστικά ενδονευρωνικά έγκλειστα ή πλάκες καθώς και η ύπαρξη γνωστικών δυσλειτουργιών. Η μεγάλη ποικιλομορφία που παρατηρείται στα παθολογικά χαρακτηριστικά της κάθε νόσου υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών παθογένεσης.

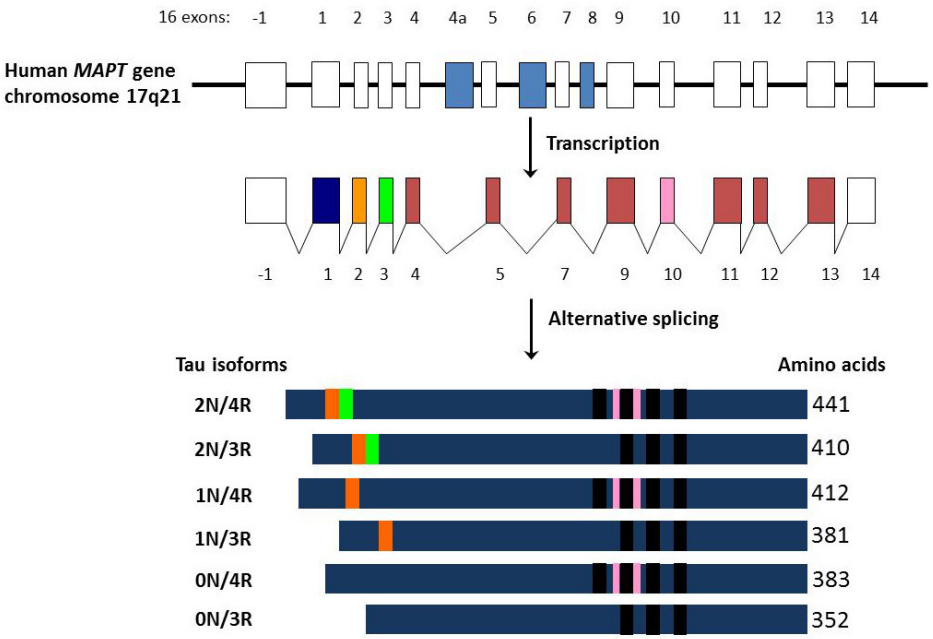
Μια ιδιαίτερη κατηγορία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών αποτελούν οι Τ-πρωτεϊνοπάθειες, δηλαδή οι ασθένειες που σχετίζονται με την πρωτεΐνη Τ (με κυριότερη τη νόσο του Alzheimer) και χαρακτηρίζονται από υπερ-φωσφορυλιωμένη και μη φυσιολογικά φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ ή από μεταλλάξεις στο γονίδιο τ.

2. Πρωτεΐνη Τ

2.1. Γονίδιο τ

Το 1988 απομονώθηκε το πρώτο cDNA για το γονίδιο τ από βιβλιοθήκη έκφρασης ποντικού (G. Lee, Cowan, & Kirschner, 1988) και εν συνεχεία ακολούθησε και η κλωνοποίησή του από άλλα ανώτερα είδη. Το ανθρώπινο γονίδιο τ έχει μέγεθος 100Kb, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στη γενετική θέση q21 και περιέχει 16 εξώνια (Andreadis et al., 1992); (Goedert et al., 1989b); (Neve et al., 1986). Το εξώνιο -1 αποτελεί μέρος του υποκινητή. Τα εξώνια -1 (στο 5΄ άκρο) και 14 (στο 3΄ άκρο) μεταγράφονται αλλά δεν μεταφράζονται. Τα εξώνια 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 και 13 αποτελούν το κύριο κορμό του mRNA (Goedert et al., 1989a); (Goedert et al., 1989b), ενώ τα εξώνια 2, 3 και 10 υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα (Andreadis et al., 1995); (Himmler et al., 1989) και δίνουν γένεση σε έξι διαφορετικά mRNAs που μεταφράζονται σε έξι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) **(Εικόνα 1)**. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν από την

απουσία ή την παρουσία ενός ή δύο ενθέσεων 29 αμινοξέων στο άμινο-τελικό άκρο (Ν-άκρο) που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 2 και το εξώνιο 3 σε συνδυασμό είτε με τρεις (R1, R3 και R4) είτε με τέσσερις (R1, R2, R3 και R4) επαναλήψεις στο καρβόξυ-τελικό άκρο (C-άκρο). Η επιπρόσθετη περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους κωδικοποιείται από το εξώνιο 10. Τα εξώνια 4Α και 8 είναι ειδικά για το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) (Goedert et al., 1992b). Στο ενήλικο ΚΝΣ εντοπίζονται και οι έξι ισομορφές της πρωτεΐνης Τ, ενώ στο εμβρυικό ΚΝΣ εντοπίζεται μόνο η μικρότερη ισομορφή μεγέθους 352 αμινοξέων (Andreadis et al., 1995); (Himmler et al., 1989).



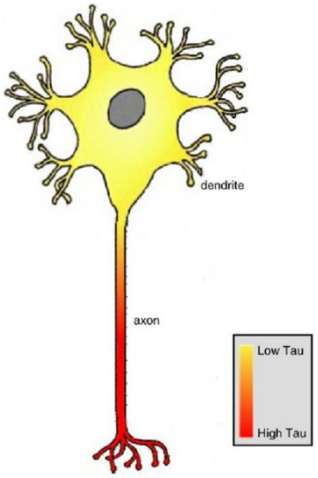
Εικόνα 1. Σχηματική Αναπαράσταση του ανθρώπινου γονιδίου τ, του πρώιμου μεταγράφου και των 6 ισομορφών της πρωτεΐνης στο ΚΝΣ. Το γονίδιο τ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στη θέση 17q21. Περιέχει 16 εξώνια με το εξώνιο -1 να αποτελεί μέρος του υποκινητή. Τα εξώνια -1 (στο 5΄ άκρο) και 14 (στο 3΄ άκρο) μεταγράφονται αλλά δεν μεταφράζονται. Τα εξώνια 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 και 13 αποτελούν το κύριο κορμό του mRNA, ενώ τα εξώνια 2, 3 και 10 υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα και δίνουν γένεση σε έξι διαφορετικά mRNA που μεταφράζονται σε έξι διαφορετικές ισομορφές στο ΚΝΣ. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν από την απουσία ή την παρουσία ενός ή δύο ενθέσεων 29 αμινοξέων στο Ν-άκρο που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 2 (πορτοκαλί πλαίσιο) και το εξώνιο 3 (πράσινο πλαίσιο) σε συνδυασμό είτε με τρεις (R1, R3 και R4) είτε με τέσσερις (R1, R2, R3 και R4) επαναλήψεις στο C-άκρο (μαύρα πλαίσια). Η επιπρόσθετη περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους κωδικοποιείται από το εξώνιο 10 (ροζ πλαίσιο). Η μικρότερη ισομορφή μεγέθους 352 αμινοξέων είναι η μόνη ισομορφή που εντοπίζεται στο εμβρυικό ΚΝΣ. (Luna-Muñoz et al., 2013)

2.2. Ισομορφές της πρωτεΐνης Τ

Στον άνθρωπο υπάρχουν έξι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ στο κεντρικό νευρικό σύστημα και μια στο περιφερικό νευρικό σύστημα **(Εικόνα 1)**. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν από την απουσία ή την παρουσία ενός ή δύο ενθέσεων 29 αμινοξέων στο Ν-άκρο (0Ν, 1Ν ή 2Ν) σε συνδυασμό με τρεις (3R) ή με τέσσερις (4R) επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αμινοξέων στο C-άκρο. Οι ισομορφές αυτές έχουν μέγεθος από 352 έως 441 αμινοξέα και 45 kDa έως 65kDa (Buée et al., 2000). Στο εμβρυικό ΚΝΣ εντοπίζεται μόνο η μικρότερη ισομορφή (0Ν3R), μεγέθους 352 αμινοξέων (Andreadis et al., 1995); (Himmler et al., 1989); (Goedert et al., 1989a); (Goedert et al., 1989b), ενώ στο ενήλικο ΚΝΣ εκφράζονται παρόμοια επίπεδα (αναλογία περίπου 1:1) των 3R και 4R ισομορφών (Goedert & Jakes, 1990). Οι 0Ν, 1Ν και 2Ν ισομορφές αποτελούν κατά αντιστοιχία το 37%, 54% και 9% της ολικής πρωτεΐνης Τ (Goedert & Jakes, 1990). Στο περιφερικό νευρικό σύστημα εντοπίζεται μια ακόμα ισομορφή, γνωστή ως 'μεγάλη' πρωτεΐνη Τ, η οποία έχει στο Ν-άκρο ένα επιπλέον μεγάλο εξώνιο (Goedert et al., 1992b); (Couchie et al., 1992). Ωστόσο, η έκφραση της πρωτεΐνης Τ δεν είναι συντηρημένη. Έτσι, σε άλλους οργανισμούς όπως στον εγκέφαλο ενήλικα ποντικού εντοπίζονται κυρίως οι 4R ισομορφές, ενώ στο κοτόπουλο οι 3R, 4R και 5R ισομορφές (Yoshida & Goedert, 2002).

2.3. Κυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών της πρωτεΐνης Τ.

Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη Τ εντοπίζεται κυρίως στους νευρώνες και συγκεκριμένα στους άξονες **(Εικόνα 2)** (Binder et al., 1985); (Kosik & Finch, 1987); (Migheli et al., 1988), ενώ σε πολύ μικρές ποσότητες εντοπίζεται και σε άλλα μη νευρικά κύτταρα (Y. Gu, Oyama, & Ihara, 1996), όπως για παράδειγμα σε γλοιακά κύτταρα (S. S. Chin & Goldman, 1996), στα ολιγοδενδροκύτταρα και στα αστροκύτταρα (Müller et al., 1997); (Papasozomenos & Binder, 1987). Η ενδο-νευρωνική πρωτεΐνη Τ μπορεί σε χαμηλά επίπεδα να εντοπιστεί και στα σωματοδενδριτικά διαμερίσματα (Tashiro et al., 1997), συμπεριλαμβανομένων της πλασματικής μεμβράνης, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια (X. C. Li et al., 2016).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Τ στους ώριμους νευρώνες. Η πρωτεΐνη Τ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα κυρίως στον άξονα των ώριμων νευρώνων (Scholz & Mandelkow, 2014).

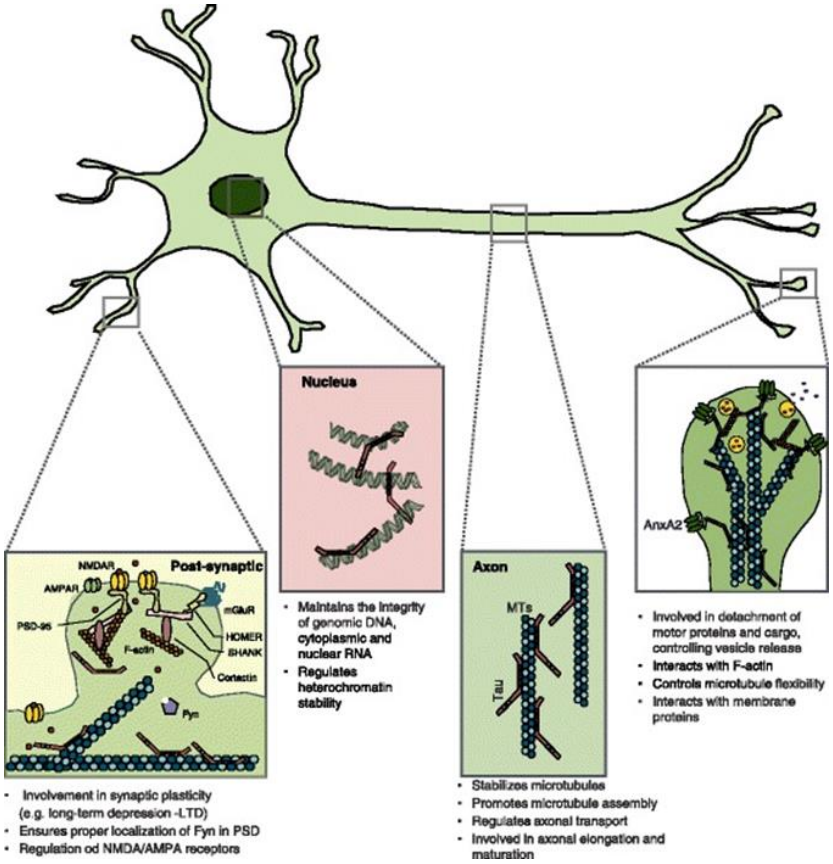
Επίσης, εντοπίζεται σε διάφορους περιφερικούς ιστούς, όπως στην καρδιά, στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στο πάγκρεας, σε μύες και σε ινοβλάστες (Y. Gu et al., 1996); (Vanier et al., 1998); (Kenner et al., 1994). Η πρωτεΐνη Τ που εκφράζεται σε μη-νευρωνικά κύτταρα έχει την ίδια δομή και λειτουργία όπως αυτή που εκφράζεται στον εγκέφαλο (Cross et al., 2000).

2.4. Φυσιολογικός Ρόλος της πρωτεΐνης Τ.

Ο κυτταρικός σκελετός αποτελείται από τρεις κύριες νηματοειδείς δομές, τους μικροσωληνίσκους, τα νευρονημάτια και τα μικρονημάτια ακτίνης (Doherty & McMahon, 2008). Οι μικροσωληνίσκοι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για τον σχηματισμό και την διατήρηση του νευράξονα και των δενδριτών. Κάθε μικροσωληνίσκος αποτελείται από τα πρωτονημάτια που με τη σειρά τους αποτελούνται από ζεύγη υπομονάδων τουμπουλίνης α και β (οι οποίες διατάσσονται γραμμικά). Σε αναπτυσσόμενους νευρώνες, οι μικροσωληνίσκοι διέρχονται από κύκλους πολυμερισμού-αποπολυμερισμού (με τη βοήθεια των διμερών τουμπουλίνης) μέχρις ότου δημιουργηθεί η κατάλληλη πολικότητα που θα οδηγήσει στην σωστή ανάπτυξη του νευράξονα. Οι μικροσωληνίσκοι των δενδριτών και των αξόνων είναι πολύ σταθεροί προάγοντας τη σωστή δομή και λειτουργία των ώριμων νευρώνων (Baas et al., 1991). Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε νευρωνικές διεργασίες όπως η πόλωση, η αξονική μεταφορά, η διατήρηση των νευρωνικών επεκτάσεων και στη συναπτική πλαστικότητα και ταξινόμηση των πρωτεϊνών (M. Morris, Maeda, Vossel, & Mucke, 2011).

Η πρωτεΐνη Τ ανακαλύφθηκε το 1975 (Weingarten, Lockwood, Hwo, & Kirschner, 1975) και το αρχικό της όνομα δόθηκε από τον Marc Kirschner ως ‘παράγοντας’ που σχετίζεται με την τουμπουλίνη προάγοντας τη συναρμολόγησή της σε μικροσωληνίσκους (Weingarten et al., 1975). Είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που προσδένονται με τους μικροσωληνίσκους (MAPs). Συμμετέχει στο πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (Witman et al., 1976) και σταθεροποιεί την δομή τους (Drechsel et al., 1992); (Bré & Karsenti, 1990). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαμέτρου των νευραξόνων (Harada et al., 1994) και στην αξονική μεταφορά (Dixit et al., 2008), στη νευρο-γένεση και δημιουργία της νευρωνικής πολικότητας κατά την ανάπτυξη (Caceres & Kosik, 1990). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη Τ πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασής της με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες διεργασίες. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τα ινίδια σπεκτρίνης (Carlier et al., 1984) και ακτίνης

(Henríquez et al., 1995), ενώ έχει βρεθεί ότι μπορεί να συνδέει τους μικροσωληνίσκους με άλλα οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Jung et al., 1993); (Brandt et al., 1995). Τέλος, έχει προταθεί ότι μπορεί να συνδέεται στο DNA ή το RNA, ωστόσο η άποψη αυτή δεν φαίνεται να επικρατεί ιδιαίτερα (Bryan et al., 1975); (Corces et al., 1980); (Corces et al., 1978) **(Εικόνα 3)**.

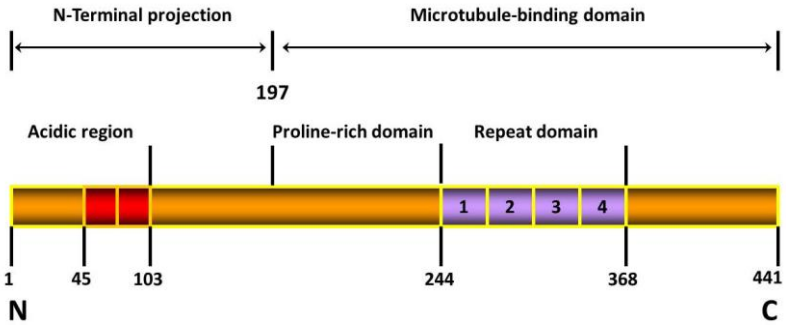


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων ρόλων της πρωτεΐνης Τ. Εικόνα από (Sotiropoulos et al., 2017).

2.5. Λειτουργικές Περιοχές της πρωτεΐνης Τ.

Η πρωτεΐνη Τ αποτελείται από δυο βασικές περιοχές, την περιοχή προβολής και την περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (MTB) **(Εικόνα 4)**. Η περιοχή προβολής υποδιαιρείται στην όξινη άμινο-τελική περιοχή και στην πλούσια σε προλίνες περιοχή. Η περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους υποδιαιρείται στη βασική περιοχή και στην όξινη καρβοξυ-τελική περιοχή. Η βασική περιοχή είναι αυτή που έρχεται σε επαφή με τους μικροσωληνίσκους (Himmler et al., 1989). Η αμινο-τελική περιοχή προβάλλει μακριά από την επιφάνεια των μικροσωληνίσκων και θεωρείται ότι αλληλεπιδρά με τη πλασματική μεμβράνη. Μια αλληλεπίδραση μεταξύ του εξωνίου 1 με τις αννεξίνες (Brandt et al., 1995); (Gauthier-Kemper et al.,

2011) βοηθάει στην κατανόηση του εντοπισμού της πρωτεΐνης Τ στους άξονες (Gauthier-Kemper et al., 2018). Επίσης, το εξώνιο 1 της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ περιέχει μια πρώιμη-ειδική αλληλουχία, η οποία έχει προταθεί ότι μεσολαβεί για τις αλληλεπιδράσεις με άλλες νευρωνικές πρωτεΐνες (Stefanoska et al., 2018). Τα PXXP μοτίβα στη πλούσια σε προλίνες περιοχή αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες της Src οικογένειας των κινασών που δεν είναι υποδοχείς και περιέχουν SH3 περιοχές, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες Lck, Fgr και Fyn (G. Lee et al., 1998).



Εικόνα 4. Λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης Τ. Η πρωτεΐνη Τ αποτελείται από δυο βασικές περιοχές, την περιοχή προβολής και την περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους. Η περιοχή προβολής υποδιαιρείται στην όξινη αμινο-τελική περιοχή και στην πλούσια σε προλίνες, ενώ η περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους υποδιαιρείται στη βασική περιοχή και στην όξινη καρβοξυ-τελική περιοχή. Εικόνα από (Luna-Muñoz et al., 2013).

Η περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους περιέχει τρεις ή τέσσερις (3R ή 4R) επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των 31 ή 32 αμινοξέων. Κάθε μία επανάληψη αποτελείται από μια συντηρημένη αλληλουχία 18 αμινοξέων και μια λιγότερο συντηρημένη αλληλουχία των 13 ή 14 αμινοξέων (Himmler et al., 1989); (Goedert et al., 1989b). Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες καθώς και κάποιες παρακείμενες αλληλουχίες μεσολαβούν για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Τ με τους μικροσωληνίσκους (Mukrasch et al., 2007). Οι αλληλουχίες αυτές περιλαμβάνουν τις K_{240}SRLQTAPV_{248}, V_{275}QINKKLDLS$_{285}$ και I_{297}KHV_{300}. Επίσης, αλληλουχίες όπως το επταπεπτίδιο K_{224}KVAVVR_{230}, το οποίο βρίσκεται στη πλούσια σε προλίνες περιοχή καθώς και το K_{370}IETHK_{375} φαίνεται να έχουν πολύ ισχυρή αλληλεπίδραση με τους μικροσωληνίσκους (Goode et al., 1997); (Mukrasch et al., 2007); (Sillen et al., 2007). Οι 3R ισομορφές, οι οποίες δεν περιέχουν την δεύτερη κατά σειρά επανάληψη καθώς και τις δυο αλληλουχίες V_{275}QINKKLDLS$_{285}$ και I_{297}KHV_{300}, οι οποίες κωδικοποιούνται από το εξώνιο 10, παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους σε σχέση με τις 4R ισομορφές (Lu & Kosik, 2001); (Panda et al., 2003). Μελέτες έχουν δείξει ότι κάθε επανάληψη της πρωτεΐνης Τ συνδέεται με την εξωτερική επιφάνεια των μικροσωληνίσκων και υιοθετούν μια εκτεταμένη δομή αλληλεπιδρώντας με την αλφα- και βήτα- τουμπουλίνη (Al-Bassam et al.,

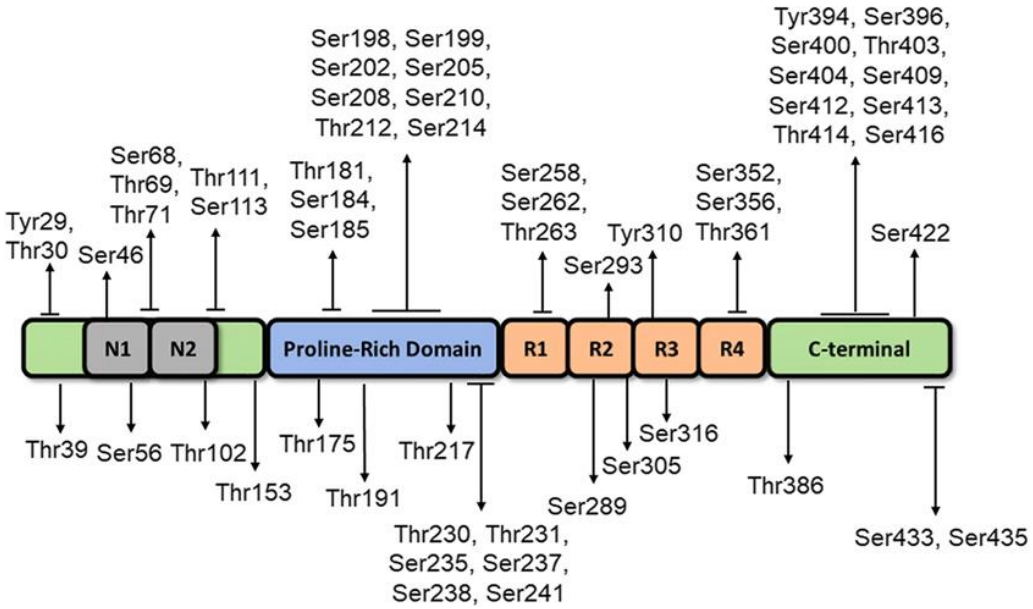
2002); (Kellogg et al., 2018). Οι μικροσωληνίσκοι έχουν σταθερές και ασταθείς περιοχές. Η πρωτεΐνη Τ βρίσκεται σε αφθονία στις ασταθείς περιοχές τους (Al-Bassam et al., 2002); (Kellogg et al., 2018) γεγονός που έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι ενδέχεται να μην σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους αλλά να τους επιτρέπει να βρίσκονται σε μακρές ασταθείς περιοχές (Black et al., 1996); (Qiang et al., 2018).

2.6. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Τ

Η πρωτεΐνη Τ, όπως και οι περισσότερες πρωτεΐνες υπόκειται σε μια σύνθετη σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Αυτές συμπεριλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση (G. Lee et al., 2004), τη γλυκοζυλίωση (Ledesma et al., 1994), την ακετυλίωση (Cohen et al., 2011), την οξείδωση (Landino, Skreslet, & Alston, 2004), τον ισομερισμό (Miyasaka et al., 2005), τη νίτρωση (Reyes et al., 2008), O-γλυκοζυλίωση (Arnold et al., 1996), την πολυαμίνωση (Wilhelmus et al., 2009), σουμοϋλίωση (Dorval & Fraser, 2006), την ουβικουϊτινίωση (Cripps et al., 2006) και τη πρωτεολυτική αποικοδόμηση (περικοπή) (Mondragón-Rodríguez et al., 2008). Η μη φυσιολογικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Τ φαίνεται να είναι η κύρια αιτία των παθολογικών μηχανισμών της πρωτεΐνης Τ, με βασικότερη τη μη φυσιολογική φωσφορυλίωσή της που φαίνεται να πυροδοτεί τη παθολογική συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ στις Τ-πρωτεϊνοπάθειες.

2.6.1. Φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ

Φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης είναι η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Αποτελεί την πιο κοινή μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης Τ. Μέχρις στιγμής έχουν περιγραφεί 85 θέσεις φωσφορυλίωσης στη μεγαλύτερη σε μήκος ισομορφή της πρωτεΐνης Τ, την 2N4R ισομορφή **(Εικόνα 5)**. Οι περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης βρίσκονται εκτός της περιοχής πρόσδεσης με τους μικροσωληνίσκους και συγκεκριμένα στην πλούσια περιοχή σε προλίνες του αμινο-τελικού άκρου και στην όξινη περιοχή του καρβοξυ-τελικού άκρου. Η κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ είναι απόρροια της ισορροπίας μεταξύ της ποσότητας και της δραστικότητας των πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών που είναι ειδικές για αυτές τις θέσεις (Sergeant et al., 2005).



Εικόνα 5. Σχηματική Αναπαράσταση των θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ. Οι πιο κοινές θέσεις φωσφορυλίωσης, όπως παρουσιάζονται στην μεγαλύτερη ισομορφής της πρωτεΐνης Τ, την 2N4R ισομορφή. Οι περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης βρίσκονται εκτός της περιοχής πρόσδεσης με τους μικροσωληνίσκους και συγκεκριμένα στην πλούσια σε προλίνες περιοχή του αμινο-τελικού άκρου και στην όξινη περιοχή του καρβοξυ-τελικού άκρου. Εικόνα από (Xia et al., 2021).

2.6.1.1. Πρωτεϊνικές κινάσες της πρωτεΐνης Τ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: πρωτεϊνικές κινάσες κατευθυνόμενες από την προλίνη (PDPK), πρωτεϊνικές κινάσες μη κατευθυνόμενες από την προλίνη (μη PDPK) και πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (TPK) (Martin et al., 2013); (Llorens-Martín et al., 2014); (Kimura et al., 2014); (Tomizawa et al., 2001); (Matenia & Mandelkow, 2009); (G. Lee et al., 2004); (Derkinderen et al., 2005).

2.6.1.1.1. Κινάση-3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3)

Η κινάση-3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3) ανήκει στην κατηγορία των PDPK κινασών και είναι μια κινάση ειδική για τις σερίνες/θρεονίνες, η δράση της οποίας ρυθμίζεται επίσης με φωσφορυλίωση. Η GSK-3 απενεργοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης της σερίνης 21 (ισόμορφη GSK-3α) ή της σερίνης 9 και 389 (ισόμορφη GSK-3β). Η ενεργοποίηση της εξαρτάται από την φωσφορυλίωσή της στην τυροσίνη 279 (GSK-3α) ή στην τυροσίνη 216 (GSK-3β) (Bhat et al., 2000); (Q. M. Wang et al., 1994); (Giese, 2009). Μέχρις στιγμής έχουν αναγνωριστεί 42 θέσεις στη πρωτεΐνη Τ, οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τις GSK-3. Οι 29 από αυτές παρουσιάζονται φωσφορυλιωμένες σε εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer (Hanger

et al., 2009); (Lovestone et al., 1994); (Reynolds et al., 2000). Ανάλυση εγκεφάλων σε ασθενείς με Alzheimer δείχνουν ότι τα επίπεδα των GSK-3 αυξάνονται στο νευροεκφυλισμό (Pei et al., 1997) και η δραστηριότητα των GSK-3 συσχετίζεται με τα νευροϊνιδικά πλέγματα (NFTs) (H. Yamaguchi et al., 1996); (Leroy et al., 2002). Ενώ σε εγκεφάλους από ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ στη θέση Ser^{396} από την GSK-3β (Muntané et al., 2008). Η σχέση μεταξύ της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ και των κινασών GSK-3 έχει δειχθεί επίσης και σε μελέτες σε ποντίκι που υπερεκφράζει την μεταλλαγμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη Τ (P301L, ON4R), μετάλλαξη η οποία συσχετίζεται με την μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό που συνδέεται με το χρωμόσωμα 17 (FTDP-17), όπου χορήγηση αναστολέων των GSK-3 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ (Noble et al., 2005). Ομοίως, μελέτες στη *D. melanogaster* έχουν δείξει ότι η χορήγηση αναστολέων των GSK-3β μειώνουν τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ και συγκεκριμένα της ισομορφής 0N3R (Mudher et al., 2004).

2.6.1.1.2. Εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 5 (CDK5)

Η εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 5 (CDK5) είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης (Dhavan & Tsai, 2001) και ανήκει στην κατηγορία των PDPK κινασών. Όπως και στην περίπτωση των GSK-3 κινασών, έτσι και η δραστικότητα των CDK5 κινασών ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση. Φωσφορυλίωση στη τυροσίνη 15 των CDK5 φαίνεται να τις ενεργοποιεί, ενώ η φωσφορυλίωση στη θρεονίνη 14 και στη σερίνη 159 τις αναστέλλει (M. S. Lee et al., 2000). Επιπλέον, η ενεργοποίηση της CDK5 απαιτεί τη δέσμευση της υπομονάδας p35 είτε της υπομονάδας p25 (M. S. Lee et al., 2000). Η υπομονάδα p25 έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής και φαίνεται να εμπλέκεται στην δραστηριότητα των CDK5 έναντι της πρωτεΐνης Τ (Noble et al., 2003); (Cruz et al., 2003). Η p25 φαίνεται να συσσωρεύεται σε εγκεφάλους ασθενών με AD, ενώ οι p25/ CDK5 φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Τ, μειώνοντας την ικανότητά της να συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους (Patrick et al., 1999). Επίσης, οι CDK5 κινάσες φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ μέσω της ανασταλτικής ρύθμισης από τις GSK-3 (T. Li et al., 2006); (Plattner et al., 2006). Τέλος, έχει δειχθεί ότι η επίδραση των CDK5 στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ εξαρτάται από την πρωτεΐνη Pin 1 (Liou et al., 2003); (Kimura et al., 2013).

2.6.1.1.3. Αμινοτελική κινάση C-Jun (JNK)

Η αμινοτελική κινάση C-Jun (JNK) ανήκει στην ομάδα των κινασών PDPK και ταυτόχρονα στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από

μιτογόνα (MAPKs). Η JNK έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Τ σε 12 θέσεις, οι οποίες εμφανίζονται μόνο στις παθολογικές καταστάσεις και όχι υπό φυσιολογικές συνθήκες. Με ανοσοϊστοχημική ανάλυση έχει βρεθεί ότι οι κινάσες JNK εντοπίζονται μαζί με τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ σε δείγματα από ασθενείς με AD, με νόσο του Pick (PiD), με προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση (PSP) και φλοιοβασικό εκφυλισμό (CBD) (Ferrer et al., 2001). Επίσης, σε εγκεφάλους ασθενών με AD έχει βρεθεί ότι η ενεργοποιημένη μορφή της JNK (p-JNK) εντοπίζεται μαζί με την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ (p-tau) (Mohit et al., 1995); (Zhu et al., 2001).

2.6.1.1.4. Κινάση της καζεΐνης 1 (CK1)

Η κινάση της καζεΐνης 1 (CK1) ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών, μη PDPK. Η CK1 έχει βρεθεί σε in vitro καλλιέργειες ότι μπορεί να φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη Τ στις θέσεις Ser^{202}/Thr^{205} και Ser^{396}/Ser^{404}, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τη συγγένεια της πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους (Singh et al., 1995); (G. Li, Yin, & Kuret, 2004). Επίσης, έχει βρεθεί με ανοσοϊστοχημική ανάλυση ότι η CK1δ συν-εντοπίζεται με τα NFTs σε AD, στη PSP, στο σύμπλεγμα άνοιας παρκινσονισμού του Guam (PDC) και με τα σωμάτια Pick στο PiD (Schwab et al., 2000). Επίσης, σε εγκεφάλους από ασθενείς με AD έχουν βρεθεί υψηλά ποσά του mRNA του CK1δ και συγκεκριμένα υπάρχει αύξηση κατά 24,4 του mRNA του CK1δ στον ιππόκαμπο και κατά 8 φορές υψηλότερα στην αμυγδαλή σε σύγκριση με φυσιολογικούς εγκεφάλους (Yasojima et al., 2000).

2.6.1.1.5. Κινάσες που ρυθμίζουν τη συγγένεια των μικροσωληνίσκων (MARKs)

Οι κινάσες που ρυθμίζουν τη συγγένεια των μικροσωληνίσκων (MARKs) ανήκουν στην οικογένεια των CAMK κινασών (πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το ασβέστιο/καλμοδουλίνη) και ανήκουν στις μη- PDPK κινάσες. Περιέχουν 4 καλά διατηρημένα μέλη (MARK1–4). Έχει βρεθεί ότι οι MARK κινάσες εντοπίζονται μαζί με τα NFTs και βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα σε εγκεφάλους ασθενών με AD (Timm et al., 2008); (J. Y. Chin et al., 2000). Οι MARKs κινάσες φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Τ στο μοτίβο KXGS των επαναλαμβανόμενων περιοχών της, με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της πρωτεΐνης Τ από τους μικροσωληνίσκους και την επακόλουθη αποσταθεροποίηση του κυτταροσκελετού και τη συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ (Gustke et al., 1992); (Augustinack et al., 2002); (Drewes et al., 1997). Επίσης, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από τις MARK κινάσες λαμβάνει χώρα στις θέσεις Ser^{262}, Ser^{293}, Ser^{324} και Ser^{356} (Augustinack et al., 2002); (Mocanu et al., 2008). Η φωσφορυλίωση της θέσης Ser^{262} της πρωτεΐνης Τ που πραγματοποιείται

από τις GSK3β κινάσες θεωρείται ότι γίνεται με τη μεσολάβηση των MARK2 κινασών, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ και αυτών των κινασών (Kosuga et al., 2005). Από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας MARK, φαίνεται ότι η MARK4 είναι η ισομορφή που εμπλέκεται περισσότερο με την παθολογική φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (G. J. Gu et al., 2013).

2.6.1.1.6. Εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP (cAMP) πρωτεϊνική κινάση (PKA)

Η εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP (cAMP) πρωτεϊνική κινάση (PKA) είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που ανήκει στην κατηγορία μη PDPK κινασών. Καταλύει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ σε in vitro και in vivo μελέτες (Sun et al., 2005); (Liu et al., 2007). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από τις PKA πυροδοτεί την επακόλουθη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από τις GSK-3β σε αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης που σχετίζονται με την παθολογία AD (Thr^{181}, Ser^{199}, Ser^{202}, Thr^{205}, Thr^{217}, Thr^{231}, Ser^{396} και Ser^{422}) και ταυτόχρονα αναστέλλει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ στις θέσεις Thr^{212} και Ser^{404} μέσω επακόλουθης φωσφορυλίωσης από την CDK5 κινάση στη θέση Ser^{396} (S. J. Liu et al., 2004).

2.6.1.1.7. Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMPK)

Η πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMPK) ανήκει στις μη-PDPK κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Οι AMPK κινάσες επηρεάζουν την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ σε πολλές θέσεις με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η δέσμευσή της στους μικροσωληνίσκους (Vingtdeux et al., 2011). In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι οι AMPK κινάσες φωσφορυλιώνουν απευθείας την πρωτεΐνη Τ στις θέσεις Thr^{231} και $Ser^{396/404}$. Η ενεργοποιημένη AMPK (p-AMPK) έχει βρεθεί ότι βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά σε εγκεφάλους διαφόρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών, όπως τα AD, PDC, PiD και FTDP-17 (Vingtdeux et al., 2011).

2.6.1.1.8. Διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενη από τη φωσφορυλίωση τυροσίνης κινάση 1A (Dyrk1A)

Σε εγκεφάλους ασθενών με AD, DS, και PiD έχει βρεθεί αυξημένη ανοσοδραστικότητα της μη-PDPK κινάσης Dyrk1A. Η Dyrk1A έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη Τ σε διάφορες θέσεις, συμπεριλαμβανομένων και των Thr^{181}, Ser^{199}, Ser^{202}, Thr^{205}, Thr^{212}, Thr^{217}, Thr^{231}, Ser^{396}, Ser^{400}, Ser^{404} και Ser^{422} (Ferrer et al., 2005). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από την Dyrk1A κινάση έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από την GSK-3

στις θέσεις Thr^{181}, Ser^{199}, Ser^{202}, Thr^{205} και Ser^{208} αλλά όχι από τις CDK5 και PKA (Liu et al., 2008); (Ryoo et al., 2007); (Wegiel et al., 2011). Η επαγόμενη από την Dyrk1A κινάση φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της διέγερσης συναρμολόγησης των μικροσωληνίσκων και προωθεί την αυτό-συναρμολόγησή τους σε νημάτια.

2.6.1.1.9. TPKI και TPKII κινάσες

Η πρωτεϊνική κινάση Ι (TPKI) ανήκει στην κατηγορία των μη- PDPK κινασών και μπορεί να φωσφορυλιώσει τη πρωτεΐνη Τ που απομονώνεται από έναν φυσιολογικό εγκέφαλο, ο οποίος είναι ήδη σε κάποιο βαθμό φωσφορυλιωμένος, ενώ δεν μπορεί να φωσφορυλιώσει μια πλήρως αποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ. Σε αντίθεση, η πρωτεϊνική κινάση ΙΙ (TPKII) μπορεί να φωσφορυλιώσει και μια πλήρως αποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ (Arioka et al., 1993). Οι πιο κοινές θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ από τις TPKII κινάσες είναι οι Ser^{202}, Thr^{205}, Ser^{235} και Ser^{404} ενώ για τις TPKI κινάσες είναι οι Ser^{199}, Thr^{231}, Ser^{396} και Ser^{413} (Imahori et al., 1998).

2.6.1.1.10. Src πρωτεϊνικές κινάσες

Η πρωτεΐνη Τ φωσφορυλιώνεται σε πέντε κατάλοιπα τυροσίνης, τα Tyr^{18}, Tyr^{29}, Tyr^{197}, Tyr^{310} και Tyr^{394} (Derkinderen et al., 2005); (Lebouvier et al., 2009); (Sato et al., 2006). Οι περισσότερες από αυτές τις τυροσίνες φωσφορυλιώνονται από μέλη της οικογένειας των Src πρωτεϊνικών κινασών, όπως οι Lck, Syk, Fyn και c-Abl (Derkinderen et al., 2005); (Reynolds et al., 2008). Η φωσφορυλίωση της θέσης Tyr^{18} πραγματοποιείται από την πρωτεϊνική κινάση Fyn και έχει προταθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αξονικής μεταφοράς (Cox et al., 2016); (Kanaan et al., 2012). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης των τυροσινών συσχετίζεται με την δημιουργία συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ (Hanger et al., 2009); (Vega et al., 2005).

2.6.1.2. Πρωτεϊνικές φωσφατάσες της πρωτεΐνης Τ

Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες που είναι υπεύθυνες για την αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ είναι οι PP2B, PP2A, PP1 και PP5 (Gong et al., 1994); (Liu et al., 2005).

2.6.1.2.1. Πρωτεϊνική φωσφατάση 2B (PP2B)

Η πρωτεϊνική φωσφατάση PP2B (καλσινευρίνη) είναι μια από τις κυριότερες φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης και η δραστικότητά της εξαρτάται από τη Ca^{2+}/καλμοδουλίνη. Μελέτες έχουν δείξει ότι η PP2B φωσφατάση αποφωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη Τ συγκεκριμένα τις θέσεις Ser^{199}, Thr^{217}, Ser^{262}, Ser^{396} και Ser^{422} ενώ η αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ στις θέσεις Thr^{181}, Ser^{202}, Thr^{205}, Thr^{212}, Ser^{214} και Ser^{404} δεν ήταν ανιχνεύσιμη. Η αποφωσφορυλίωση των Ser^{262} και Ser^{396} υποδηλώνει πιθανή εμπλοκή της φωσφατάσης αυτής στη παθολογία του AD (Rahman et al., 2006). Επίσης, ενδιαφέρον έχουν ορισμένες μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι η φωσφατάση PP2B μπορεί να καταλύσει την αποφωσφορυλίωση της Ser^{9} στη GSK-3β και κατά συνέπεια τη μετέπειτα φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (Kim et al., 2009). Συνεπώς, η φωσφατάση PP2B μπορεί να δράσει και με έμμεσο τρόπο έναντι της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ.

2.6.1.2.2. Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A)

Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2Α (PP2A) είναι μια από τις κύριες φωσφατάσες που εντοπίζονται στον εγκέφαλο και φαίνεται να εμπλέκεται στην αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ. Η PP2A φωσφατάση περιέχει μια καταλυτική υπομονάδα C, μια υπομονάδα Α και την ρυθμιστική υπομονάδα PR55/Bα ($PP2A_{T55\alpha}$). Η ρυθμιστική υπομονάδα PR55/Bα της PP2A φωσφατάσης φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (Landrieu et al., 2011). Η πρωτεϊνική φωσφατάση PP2A έχει βρεθεί ότι αποφωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη Τ στις θέσεις Ser^{202}/Thr^{205}, ως άμεση απόκριση στον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και στη θέση Thr^{231} μέσω μεσολάβησης της ισομεράσης Pin1 (Merrick, Demoise, & Lee, 1996). Σε μελέτες in vitro έχει δειχθεί ότι το PP2A/Bα συνδέεται με τις ισομορφές MAP2c (ισομορφή c της πρωτεΐνης 2 που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους). Η πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης, Fyn, συνδέεται με το πλούσιο σε προλίνες μοτίβο RTPPKSP, το οποίο υφίσταται τόσο στις MAP2 (πρωτεΐνη 2 που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους) όσο και στη πρωτεΐνη Τ και αναστέλλει την αλληλεπίδραση του PP2A/Bα με τη πρωτεΐνη Τ καθώς και με τις MAP2c (Sontag et al., 2012). Η δυσλειτουργία όλων των παραπάνω συμπλεγμάτων είναι πιθανό να συμβάλλει στην απορρύθμιση της πρωτεΐνης Τ και των μικροσωληνίσκων και στην επικείμενη σηματοδότηση.

2.6.1.2.3. Πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1)

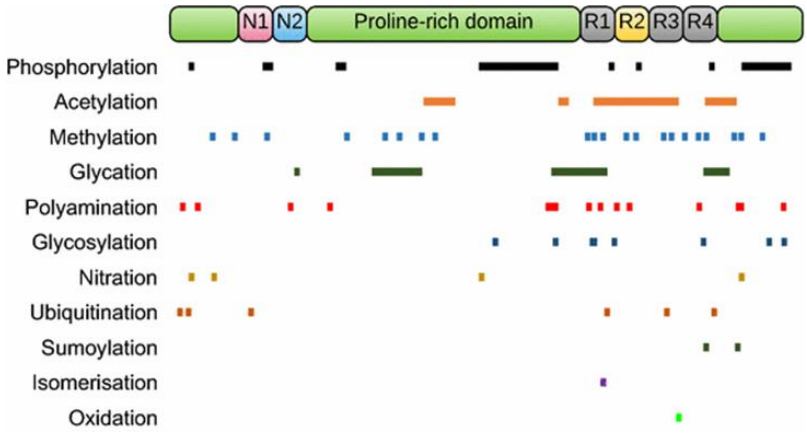
Η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες στους νευρώνες που εξαρτώνται από το ασβέστιο. Η PP1 φωσφατάση απαιτεί μεταλλικά ιόντα και η μέγιστη ενεργοποίησή της πετυχαίνεται παρουσία του Mn^{2+}. Η αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από την PP1 φωσφατάση συμβαίνει στις θέσεις Thr^{212}, Thr^{217}, Ser^{262}, Ser^{396} και Ser^{422} (Rahman et al., 2005). Ενώ, η αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ στις θέσεις Thr^{181}, Ser^{199}, Ser^{202}, Thr^{205}, Ser^{214} και Ser^{404} δεν είναι ανιχνεύσιμη. Επίσης, σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι η παθολογική πρωτεΐνη Τ αναστέλλει την αξονική μεταφορά μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από την PP1 φωσφατάση (LaPointe et al., 2009); (Patterson et al., 2011).

2.6.1.2.4. Πρωτεϊνική φωσφατάση 5 (PP5)

Η πρωτεϊνική φωσφατάση 5 (PP5) είναι μια φωσφατάση που υπάρχει σε διαφορετικούς ιστούς των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου. Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί πολύ λίγα υποστρώματα που δρα η PP5 φωσφατάση. Ωστόσο, σε μελέτες έχει βρεθεί ότι η PP5 φωσφατάση αποφωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη Τ σε 12 θέσεις που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις όπως το AD (Liu et al., 2005). Συχνότερα αποφωσφορυλιώνονται οι θέσεις Thr^{205}, Thr^{212} και Ser^{409} της πρωτεΐνης Τ, ενώ λιγότερο συχνά οι θέσεις Ser^{199}, Ser^{202}, Ser^{214}, Ser^{396} και Ser^{404}. Η αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ στη θέση Ser^{262} συμβαίνει υπερβολικά σπάνια. Επίσης, η PP5 φωσφατάση έχει δειχθεί ότι δρα σε πρωτεΐνες που δεσμεύουν το ασβέστιο υποδεικνύοντας έναν μηχανισμό αποφωσφορυλίωσης εξαρτώμενο από το ασβέστιο. Καθότι στις περισσότερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του AD, έχει βρεθεί ότι υπάρχει απορρύθμιση της μεταβίβασης του ασβεστίου, θεωρείται ότι η αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από τις PP5 φωσφατάσες πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει το ασβέστιο (F. Yamaguchi et al., 2012); (Fedrizzi & Carafoli, 2011).

2.6.2. Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Η κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ μπορεί να επηρεάζεται και από μια σειρά άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων **(Εικόνα 6)**. Η χρονική αλληλουχία γλυκοζυλίωσης, νίτρωσης, οξείδωσης, ακετυλίωσης, πολυαμίνωσης, σουμοϋλίωσης και ουβικουϊτινίωσης είναι ασαφής, αλλά αυτές οι τροποποιήσεις φαίνεται να συμβαίνουν πριν από την υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ και το σχηματισμό των νευροϊνιδικών πλεγμάτων NFTs (Necula & Kuret, 2004).



Εικόνα 6. Απεικόνιση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης Τ. Οι έγχρωμες μπάρες υποδεικνύουν τις κατά προσέγγιση θέσεις κάθε μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που λαμβάνει χώρα στη μεγαλύτερη ισομορφή της πρωτεΐνης Τ, την 2N4R ισομορφή. Εικόνα από (T. Guo, Noble, & Hanger, 2017).

Η πρωτεΐνη Τ έχει βρεθεί ότι μπορεί να είναι γλυκοζυλιωμένη σε in vitro μελέτες (Smet-Nocca et al., 2011), ενώ in vivo έχει δειχθεί ότι η O-γλυκοζυλίωση μειώνει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ στο φλοιό και στον ιππόκαμπο αρουραίων (Yuzwa et al., 2008), κάτι που όμως δεν αποδείχθηκε σε περαιτέρω βιοχημικές μελέτες σε ποντίκια P301L (Borghgraef et al., 2013). Σε ασθενείς με νόσο AD έχει αναφερθεί μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων φωσφορυλίωσης και O-γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, υποδηλώνοντας ότι η O-γλυκοζυλίωση ρυθμίζει αρνητικά τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (Liu et al., 2009). Η μειωμένη O-γλυκοζυλίωση που παρατηρείται σε εγκεφάλους ασθενών με AD μπορεί να δικαιολογήσει την αυξημένη φωσφορυλίωση και συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ (Liu et al., 2004). Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι το υπεύθυνο ένζυμο για την O-γλυκοζυλίωση, η τρανσφεράση O-GlcNAc, έχει επίσης μειωμένη δραστικότητα στους εγκεφάλους ασθενών με AD (A. C. Wang, Jensen, Rexach, Vinters, & Hsieh-Wilson, 2016). Ενώ σε μελέτες με ποντίκια στα οποία αποσιωπάτε η έκφραση της τρανσφεράσης O-GlcNAc, βρέθηκε ότι αναπτύσσουν νευροεκφυλισμό και υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (A. C. Wang et al., 2016).

Αντιθέτως, η N-γλυκοζυλίωση έχει βρεθεί αυξημένη σε εγκεφάλους ασθενών με AD και θεωρείται ότι εμπλέκεται στη διατήρηση της δομής των NFTs (J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, & Iqbal, 1996); (Ledesma, Medina, & Avila, 1996). Η N-γλυκοζυλίωση μπορεί να διευκολύνει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ, καταστέλλοντας την αποφωσφορυλίωσή της και πιθανότατα επηρεάζει τη διαμόρφωσή της (Liu et al., 2002). Ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στη N-γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης Τ είναι ασαφής, ωστόσο είναι πιθανόν ο κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Τ να οδηγεί σε μη φυσιολογική γλυκοζυλίωση και σε μετέπειτα υπερ-φωσφορυλίωση. Θεωρείται ότι το πρώτο βήμα στον καταρράκτη των γεγονότων που οδηγεί στη

τελική τροποποίηση της πρωτεΐνης Τ σε παθολογική αποτελεί η ρύθμιση της γλυκοζυλίωσης και η αυξημένη ενεργοποίηση των GSK3β κινασών, που με τη σειρά τους επάγουν την υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (M. Takahashi et al., 1999).

Επιπλέον, η γλυκοζυλίωση πυροδοτεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες ενισχύουν το οξειδωτικό στρες και το οποίο εν συνεχεία προάγει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (Su et al., 2010). Με το μηχανισμό αυτό, η οξείδωση στη Cys322 της πρωτεΐνης Τ οδηγεί στη δημιουργία των PHFs (Landino et al., 2004). Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες προάγει και τη νίτρωση της πρωτεΐνης Τ, υποδηλώνοντας ότι η γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης Τ μπορεί έμμεσα να προκαλέσει τόσο την οξείδωση όσο και τη νίτρωση της πρωτεΐνης Τ, οδηγώντας σε υπερ-φωσφορυλίωσή της και στην επικείμενη συσσωμάτωσή της (Y. J. Zhang et al., 2006). Μη φυσιολογική νίτρωση των Tyr^{18}, Tyr^{29} και Tyr^{394} της πρωτεΐνης Τ έχει ανιχνευθεί σε ασθενείς με AD και σε άλλες Τ-πρωτεϊνοπάθειες. Η νίτρωση αυτών των υπολειμμάτων θεωρείται ότι αλλάζει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ, μειώνοντας την ικανότητα της να δεσμεύεται στους μικροσωληνίσκους και ανάλογα με τη θέση νίτρωσης μπορεί είτε να προάγει είτε να αναστέλλει τη συσσωμάτωσή της (Reyes et al., 2012).

Η πολυαμίνωση με τη σειρά της έχει βρεθεί ότι μπορεί να προάγει το σχηματισμό των NFTs της πρωτεΐνης Τ (Singer et al., 2002) και μαζί με την γλυκοζυλίωση και τη νίτρωση της πρωτεΐνης Τ μπορεί να καταστήσει την ασυνήθιστα υπερ-φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ λιγότερο επιρρεπή σε βιοχημική αποικοδόμηση από το σύστημα ουβικουϊτίνης/πρωτεασώματος (Bancher et al., 1991); (Riederer et al., 2009). Στη συνέχεια, η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης Τ μπορεί να εξουδετερώσει την ουβικουϊτινίωση και να προάγει τη συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ. Με αυτό τον τρόπο η σουμοϋλίωση μπορεί να ελέγχει τα επίπεδα των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ (K. Takahashi et al., 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ουβικουϊτινίωση της πρωτεΐνης Τ, η οποία οδηγεί σε πρωτεασωμική αποικοδόμησή της, έχει βρεθεί αυξημένη στις Τ-πρωτεϊνοπάθειες. Πολλές από τις θέσεις ουβικουϊτινίωσης αποτελούν επίσης θέσεις ακετυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, υποδηλώνοντας ότι η εξαρτώμενη από την ουβικουϊτινίωση αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Τ, θα μπορούσε να επηρεάζεται άμεσα και από την ακετυλίωσή της (M. Morris et al., 2015).

Μια άλλη πολύ σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης Τ είναι η ακετυλίωση, η οποία συσχετίζεται τόσο με φυσιολογικές όσο και με τις παθολογικές λειτουργίες της πρωτεΐνης Τ (Y. Wang & Mandelkow, 2016). Η ακετυλίωση της πρωτεΐνης Τ μεσολαβείτε από την CBP πρωτεΐνη και η από-ακετυλίωση από το SIRT1 και το HDAC6 (Min et al., 2010); (Cook et al., 2014). Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι η πρωτεΐνη Τ, έχει μια εγγενή δραστηριότητα ακετυλοτρανσφεράσης, καταλύοντας την αυτό-ακετυλίωση που προκαλείται από τις Cys^{291} και Cys^{322}, οι οποίες βρίσκονται στη δεύτερη και τρίτη περιοχή δέσμευσης

των μικροσωληνίσκων αντίστοιχα (Cohen et al., 2013). Μελέτες έχουν δείξει ότι η αυτό-ακετυλίωση εξαρτάται από τις λυσίνες 274 και 340 (Luo et al., 2014). Η ακετυλίωση της πρωτεΐνης Τ στις λυσίνες 259, 290, 321 και 353 φαίνεται να λαμβάνει χώρα σε φυσιολογικούς εγκεφάλους και προστατεύει τη πρωτεΐνη Τ από την υπερ-φωσφορυλίωση και την επικείμενη συσσωμάτωσή της (Cook et al., 2014), ενώ μειωμένη ακετυλίωση στις λυσίνες αυτές έχει βρεθεί σε εγκεφάλους ασθενών με AD καθώς και σε μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερ-εκφράζουν την P301L μετάλλαξη, η οποία προκαλεί FTLD (Cook et al., 2014). Η ακετυλίωση της πρωτεΐνης Τ στις λυσίνες 174, 274 και 280 θεωρείται ότι συσχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις καθότι έχει ανιχνευθεί σε εγκεφάλους ασθενών με AD, Pick, FTLD και PSP (Irwin et al., 2013); (Min et al., 2015). Προς ενίσχυση των παραπάνω, μελέτες στη *D. melanogaster* έχουν δείξει ότι η μίμηση της ακετυλίωσης στη Lys280 επιδεινώνει τη νευροτοξικότητα που προκαλείται από την υπερ-έκφραση της πρωτεΐνης Τ (Gorsky, Burnouf, Dols, Mandelkow, & Partridge, 2016). Επιπλέον, σε ποντίκια που εκφράζουν τις ψευδο-ακετυλιωμένες λυσίνες 274 και 281 (K274/281Q) παρουσιάζουν ελλείμματα στη μνήμη και στο LTP (Tracy et al., 2016). Αυτά τα ευρήματα εγείρουν ερωτηματικά σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο προκαλείται παθολογική ακετυλίωση της πρωτεΐνης Τ και πως μια τέτοια μετα-μεταφραστική τροποποίηση επηρεάζει τη συναπτική λειτουργία και την ανάπτυξη παθολογίας.

2.7. Ο φυσιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ

Η φωσφορυλίωση αποτελεί ίσως και τον σημαντικότερο παράγοντα ρύθμισης της δράσης της πρωτεΐνης Τ. Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόσδεση της πρωτεΐνης Τ στους μικροσωληνίσκους και στην κυτταρική μεμβράνη καθώς και στον κυτταρικό εντοπισμό της. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ είναι αυξημένη κατά τη διάρκεια ορισμένων φυσιολογικών διεργασιών, όπως κατά την ανάπτυξη ή την υποθερμία. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, η εμβρυική πρωτεΐνη Τ είναι φωσφορυλιωμένη σε μεγάλο βαθμό και σε πολλαπλές θέσεις συμπεριλαμβανομένων των Thr^{181}, Ser^{199}, Ser^{202}, Thr^{205}, Thr^{231}, Ser^{396} και Ser^{404} (Brion et al., 1993); (Kenessey & Yen, 1993); (Yu et al., 2009). Μετά την αναπτυξιακή περίοδο, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ επιστρέφει σε σταθερά επίπεδα εν μέρει, διότι στους ώριμους εγκεφάλους υπάρχει υψηλότερη δραστικότητα των φωσφατασών (Yu et al., 2009). Επίσης, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ φαίνεται να επηρεάζει και την κατανομή της. Στην σωματοδενδριτική περιοχή του νευρώνα εντοπίζεται κυρίως η πρωτεΐνη Τ, η οποία είναι φωσφορυλιωμένη στην πλούσια σε προλίνες περιοχή. Όταν αποφωσφορυλιώνεται υπάρχει μια μετατόπιση στην ακραία αξονική περιοχή. Επίσης, η πρωτεΐνη Τ, η οποία είναι φωσφορυλιωμένη στο

καρβοξυ-τελικό της άκρο εντοπίζεται στην ακραία αξονική περιοχή (Dotti, Banker, & Binder, 1987).

Έχει βρεθεί ότι τα υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ μειώνουν την ικανότητα πρόσδεσής της στους μικροσωληνίσκους (Biernat et al., 1993); (Bramblett et al., 1993); (Lindwall & Cole, 1984). Η περιοχή πρόσδεσης με τους μικροσωληνίσκους είναι γενικά θετικά φορτισμένη και αλληλεπιδρά με τους αρνητικά φορτισμένους μικροσωληνίσκους. Η προσθήκη μιας αρνητικά φορτισμένης φωσφορικής ομάδας μέσω φωσφορυλίωσης στη πρωτεΐνη Τ οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους. Σε in vitro μελέτες έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλίωση των θέσεων Ser^{231} ή Ser^{262} μειώνει δραματικά την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης Τ στους μικροσωληνίσκους, ενώ σε in vivo μελέτες δε φαίνεται να είναι ικανή να την αναστείλει (Biernat et al., 1993); (Seubert et al., 1995); (Sengupta et al., 1998); (Fischer et al., 2009). Ωστόσο, η φωσφορυλίωση άλλων θέσεων της πρωτεΐνης Τ, όπως η θέση Ser^{208} φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο ότι η ρύθμιση της δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θέση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ (Xia et al., 2020).

Εκτός από τη δέσμευση στους μικροσωληνίσκους, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ φαίνεται να επηρεάζει και την συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων και την σταθερότητά τους. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ σε συγκεκριμένες θέσεις, όπως οι Thr^{231}, Ser^{262}, Ser^{396} και Ser^{404}, μειώνει την ικανότητα της πρωτεΐνης Τ να προάγει τη συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων (Kiris et al., 2011). Η μη σωστή ρύθμιση των μικροσωληνίσκων λόγω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ μπορεί να επηρεάσει και την αξονική μεταφορά. Για παράδειγμα η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ στη θέση Tyr^{18} επηρεάζει την αναστολή της κινητικότητας της κινεσίνης 1 και είναι γενικότερα ένας προστατευτικός μηχανισμός που προάγει τη φυσιολογική αξονική διακίνηση (Stern et al., 2017); (Kanaan et al., 2012). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ στη θέση Ser^{422} μπορεί να αναστείλει την αξονική μεταφορά Σε ανθρώπινους εγκεφάλους με AD έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλιωμένη Ser^{422} συνεντοπίζεται μαζί με τα ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ (Tiernan et al., 2016). Όλες αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν ότι η φυσιολογική ρύθμιση των μικροσωληνίσκων από την πρωτεΐνη Τ είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και μπορεί να διαμορφωθεί αμφίδρομα από τις διάφορες πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ.

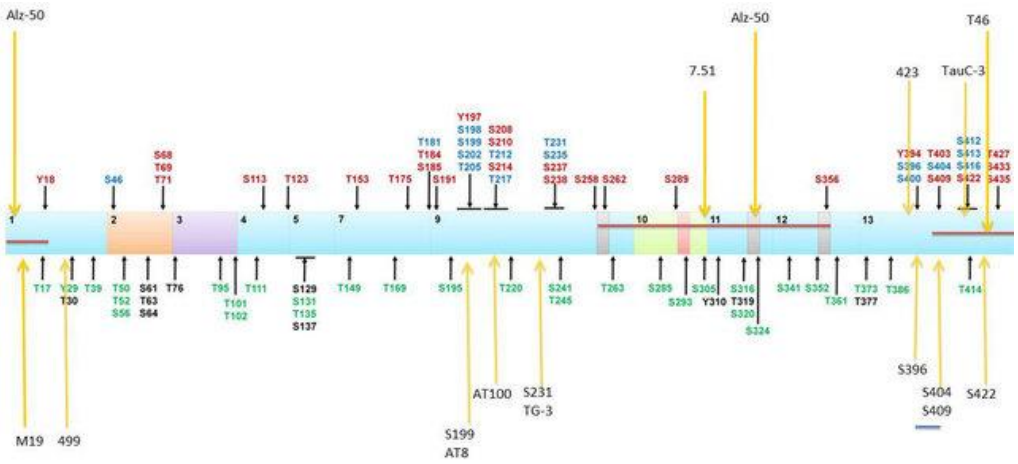
3. Παθολογία και τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ

3.1. Μηχανισμοί παθολογίας της πρωτεΐνης Τ

Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί πληθώρα μελετών για την ανάδειξη των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους η πρωτεΐνη Τ οδηγεί σε νευροεκφυλισμό. Για το σκοπό αυτό έχουν δημιουργηθεί διάφορα διαγονιδιακά μοντέλα, όπως το ποντίκι και η *Drosophila melanogaster*, στα οποία εκφράζονται διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ καθώς και διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές της.

3.1.1. Υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ

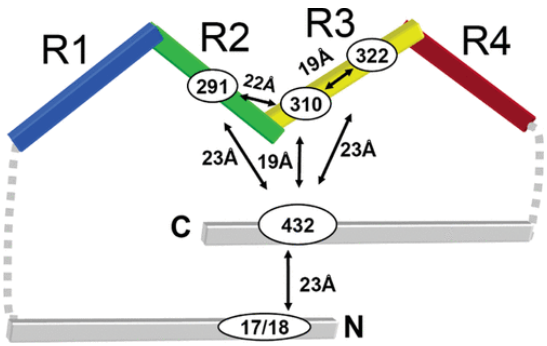
Η φωσφορυλίωση θεωρείται ότι είναι ένα από τα πρώιμα συμβάντα της Τ-μεσολαβούμενης παθογένεσης, πριν ακόμα την εσφαλμένη αναδίπλωσή της ή την δημιουργία των συσσωματωμάτων της (Noble et al., 2013). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ εκδηλώθηκε έπειτα από την ανακάλυψη ότι τα ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) που βρίσκονται σε ασθενείς με AD αποτελούνται από φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ (Grundke-Iqbal et al., 1986a); (Grundke-Iqbal et al., 1986b). Σε δείγματα εγκεφάλων από ασθενείς με AD έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη Τ είναι υπερ-φωσφορυλιωμένη σε σχέση με δείγματα φυσιολογικών εγκεφάλων και συγκεκριμένα είναι 3-4 φορές περισσότερο φωσφορυλιωμένη στα PHFs (Ksiezak-Reding, Liu, & Yen, 1992). Μέχρις στιγμής έχουν περιγραφεί 85 θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, από τις οποίες 45 θέσεις έχουν αναφερθεί ότι είναι φωσφορυλιωμένες σε δείγματα ασθενών με AD (Noble et al., 2013). **(Εικόνα 7).** Από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ που εμπλέκονται με την παθογένεση είναι οι Thr^{181}, Ser^{202}, Thr^{205}, Thr^{212}, Ser^{214}, Thr^{231}, Ser^{235}, Ser^{238}, Ser^{262}, Ser^{396}, Ser^{404} και Ser^{422}.



Εικόνα 7. Θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ. Απεικόνιση της μεγαλύτερης ισομορφής της πρωτεΐνης Τ, 2N4R, και των θέσεων φωσφορυλίωσης που εμφανίζονται σε φυσιολογικούς εγκεφάλους (πράσινο), σε εγκεφάλους ασθενών με AD (κόκκινο) και των θέσεων που εμφανίζονται τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε εγκεφάλους με AD (μπλε). Οι θέσεις που δεν έχουν ακόμα αποδειχθεί in vitro ή in vivo (μαύρο). Με βέλη υποδεικνύονται συγκεκριμένοι επίτοποι αντισωμάτων. Εικόνα από (Luna-Muñoz et al., 2013).

Η ισορροπία μεταξύ φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ είναι ιδιαίτερης σημασίας για την εξασφάλιση της σωστής πρόσδεσης της πρωτεΐνης Τ στους μικροσωληνίσκους και επιτυγχάνεται από ειδικές κινάσες και φωσφατάσες (όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.6.1). Η δυσλειτουργία αυτών των κινασών ή φωσφατασών θεωρείται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για την παθογένεση της πρωτεΐνης Τ. Μια τέτοια κινάση που έχει βρεθεί ότι είναι δυσλειτουργική στις Τ-πρωτεϊνοπάθειες είναι η GSK-3 κινάση. Η κινάση αυτή έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει τις 29 από τις 45 θέσεις φωσφορυλίωσης που εμπλέκονται στο AD (Noble et al., 2013). Βρίσκεται αυξημένη στο φλοιό των εγκεφάλων ασθενών με AD και συσχετίζεται με τα NFTs (H. Yamaguchi et al., 1996); (Leroy et al., 2002). Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε ασθενείς με AD, η δράση της φωσφατάσης PP2A είναι μειωμένη (Gong et al., 1993); (Gong et al., 1995); (Kins et al., 2001) με αποτέλεσμα να προάγεται η υπερ-φωσφορυλίωσή της πρωτεΐνης Τ καθώς και η δράση των κινασών CAMK II, PKA και MAP, προάγοντας ακόμα περισσότερο την υπερ-φωσφορυλίωσή της (Pei et al., 2003); (An et al., 2003). Επιπλέον, σε ορισμένες μελέτες που αφορούν τη νόσο AD έχει βρεθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα του αμυλοειδούς Αβ42 μπορεί να προάγουν την υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (Kurt et al., 2003); (Blanchard et al., 2003). Σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την πρωτεΐνη Τ μαζί με το αμυλοειδές Αβ42 ή ταυτόχρονα με το αμυλοειδές Αβ42 και τη προσενιλίνη παρατηρήθηκε ενίσχυση της υπερ-φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ καθώς και της δημιουργίας συσσωματωμάτων της (Götz et al., 2001); (Oddo et al., 2003); (Boutajangout et al., 2004).

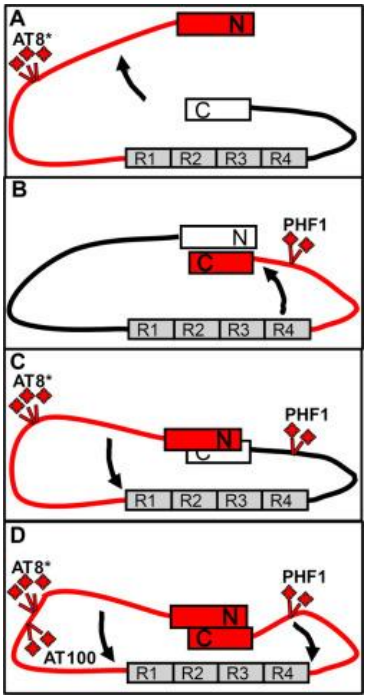
Η υπερ-φωσφορυλίωση θεωρείται επίσης ότι εμπλέκεται και στις αλλαγές που παρατηρούνται στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ και για την εσφαλμένη αναδίπλωσή της. Η πρωτεΐνη Τ κανονικά δεν έχει μια ιδιαίτερα διατεταγμένη δευτεροταγή δομή (Schweers, Schönbrunn-Hanebeck, Marx, & Mandelkow, 1994). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Τ σε διάλυμα έχει μια χαλαρή διαμόρφωση σε μορφή "συνδετήρα" ή διπλής φουρκέτας **(Εικόνα 8)**, όπου η πρωτεΐνη διπλώνει με τέτοιο τρόπο ώστε το C-άκρο να βρίσκεται δίπλα στη περιοχή δέσμευσης των μικροσωληνίσκων και το N-άκρο διπλώνεται πίσω προς το C-άκρο (Jeganathan et al., 2006).



Εικόνα 8. Διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ. Το C-άκρο της πρωτεΐνης Τ διπλώνει δίπλα στη περιοχή δέσμευσης των μικροσωληνίσκων και το N-άκρο διπλώνεται πίσω προς το C-άκρο. Εικόνα από (Jeganathan et al., 2006).

Με χρήση ειδικών διαμορφωτικών αντισωμάτων, όπως το Alz50 και το MC1, έχει αποδειχτεί ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ προκαλεί μια πιο σφιχτή αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Τα αντισώματα αυτά συνδέονται πιο εύκολα με τη πρωτεΐνη Τ που εντοπίζεται σε εγκεφάλους ασθενών με AD σε σύγκριση με αυτά των φυσιολογικών (Nukina, Kosik, & Selkoe, 1988); (Weaver et al., 2000), υποδηλώνοντας ότι η εσφαλμένη αναδίπλωση είναι χαρακτηριστικό της παθογένεσης της πρωτεΐνης Τ. Τα αντισώματα αυτά έχει δειχθεί ότι δεσμεύονται με μια ασυνεχή αλληλουχία της πρωτεΐνης Τ που περιλαμβάνεται στο N-άκρο και στην περιοχή δέσμευσης των μικροσωληνίσκων (Carmel, Mager, Binder, & Kuret, 1996). Επιπλέον, το αντίσωμα Alz50 είναι ενεργό έναντι της πρωτεΐνης Τ όταν είναι ταυτόχρονα φωσφορυλιωμένη στη θέση Ser^{396} (Mondragón-Rodríguez et al., 2008), υποδηλώνοντας με αυτό το τρόπο ότι η φωσφορυλίωση στη θέση Ser^{396} επίσης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στις αλλαγές που παρατηρούνται στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ **(Εικόνα 9)**. Επιπλέον, in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση και συγκεκριμένων άλλων θέσεων επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση των θέσεων (Ser^{202}/Thr^{205} και Ser^{396}/Ser^{404}) προκαλεί μια πιο σφιχτή αναδίπλωση της πρωτεΐνης Τ **(Εικόνα 9)** και την καθιστά προσβάσιμη στο MC1 αντίσωμα (Jeganathan et al., 2008), ενώ σε άλλες in vitro μελέτες έχει δειχθεί ότι θέσεις φωσφορυλίωσης της

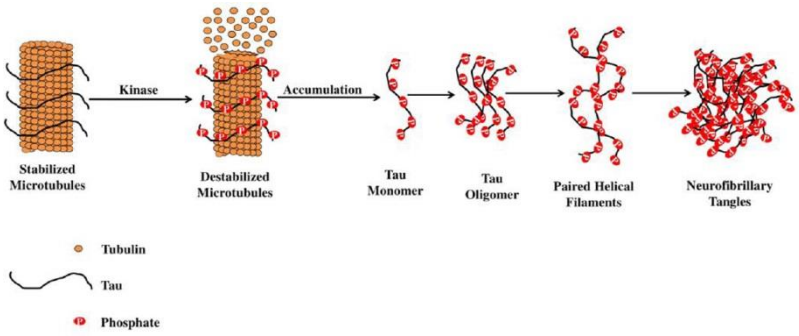
πρωτεΐνης Τ, όπως οι Thr^{175}, Ser^{202}, Thr^{205}, Thr^{212} και Ser^{422} προάγουν τη συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ και το σχηματισμό ινιδίων (Tiernan et al., 2016); (Gohar et al., 2009); (Rankin, Sun, & Gamblin, 2005); (Chang, Kim, Schafer, & Kuret, 2011). Η τριπλή φωσφορυλίωση στις θέσεις Ser^{202}/Thr^{205}/Ser^{208} έχει προταθεί ότι είναι ένας συνδυασμός που οδηγεί σε ταχεία συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ (Xia et al., 2020); (Despres et al., 2017). Συνεπώς, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόκληση αλλαγών στη διαμόρφωσή της.



Εικόνα 9. Αλλαγή συνολικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης Τ, έπειτα από φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση στις θέσεις AT8 (Ser^{202}/Thr^{205}), PHF-1 (Ser^{396}/Ser^{404}) επάγει μια πιο σφιχτή αναδίπλωση της πρωτεΐνης Τ που την καθιστά προσβάσιμη από τα ειδικά διαμορφωτικά αντισώματα Alz50 και MC1. Εικόνα από (Jeganathan et al., 2008).

3.1.2. Συσσωμάτωση πρωτεΐνης Τ.

Η πρωτεΐνη Τ μπορεί να υφίσταται σε πολλές διαφορετικές μορφές, κάποιες από τις οποίες θεωρείται ότι είναι τοξικές και μεσολαβούν στην παθογένεση που προκαλείται από την πρωτεΐνη Τ. Οι μορφές αυτές **(Εικόνα 10)** είναι τα μονομερή, διμερή, τριμερή, διαλυτά ολιγομερή, κοκκώδη αδιάλυτα ολιγομερή (GTOs), ινίδια, ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) και τα νευροϊνιδικά πλέγματα (NFTs) (Cowan & Mudher, 2013).



Εικόνα 10. Διαφορετικά είδη της πρωτεΐνης Τ. Τα μονομερή της πρωτεΐνης Τ φωσφορυλιώνονται από κινάσες σε συγκεκριμένες θέσεις, γεγονός που οδηγεί στην εσφαλμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης και στον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και στη συνέχεια δημιουργούνται τα συσσωματώματα των αδιάλυτων ολιγομερών. Στη συνέχεια, τα συσσωματώματα αυτά περιστρέφονται το ένα γύρω από το άλλο δημιουργώντας τα μεγαλύτερα είδη, που ονομάζονται ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) και τα νευροϊνιδικά πλέγματα (NFTs). Εικόνα από (Mamun et al., 2020)

Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι τα μεγαλύτερα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ, όπως τα PHFs και τα NFTs, προκύπτουν από την διαδοχική συσσωμάτωση μικρότερων ειδών της πρωτεΐνης Τ, όπως τα μονομερή και τα διαλυτά ολιγομερή. Θεωρείται ότι μόλις διαμορφωθεί η μερικώς αναδίπλωση του μονομερούς τότε προχωρά αυθόρμητα η διαδικασία δημιουργίας των διμερών, μια διαδικασία ενεργειακά ευνοϊκότερη (Chirita, Congdon, Yin, & Kuret, 2005). Για να δημιουργηθούν τα διμερή απαιτείται το εξαπεπτίδιο PHF6 στην τρίτη περιοχή πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων (Sahara et al., 2007); (von Bergen et al., 2000). Τα διμερή θεωρείται ότι είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο για τον σχηματισμό των μεγαλύτερων συσσωματωμάτων (Wille et al., 1992); (Schweers et al., 1995); (Kampers et al., 1996) και των μεγάλων αδιάλυτων ολιγομερών (Sahara et al., 2007); (Patterson et al., 2011). Ωστόσο, λίγα είναι τα στοιχεία για τον σχηματισμό των αδιάλυτων κοκκωδών ολιγομερών (GTOs). Θεωρείται ότι μπορεί να προκύπτουν είτε από τα μικρά διαλυτά ολιγομερή είτε απευθείας από τα μονομερή της πρωτεΐνης Τ (Maeda et al., 2007). Επίσης, σε μελέτες in vitro έχει δειχθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των GTOs προκαλεί το σχηματισμό ινιδίων, ενώ τα διαλυτά ολιγομερή όχι. Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι τα GTOs είναι πρόδρομοι των ζευγών ελικοειδών ινιδίων (PHFs) (Maeda et al., 2007). Επίσης, υπάρχει ένα ενδεχόμενο τα PHFs να μπορούν να δημιουργηθούν και από τον πολυμερισμό των μονομερών, ωστόσο δεν είναι γνωστό αν αυτό μπορεί να συμβεί απευθείας ή μόνο μέσω της δημιουργίας των ενδιάμεσων ολιγομερών. Ο μηχανισμός για τον σχηματισμό των PHFs απαιτεί δύο μοτίβα εξαπεπτιδίων στις περιοχές δέσμευσης των μικροσωληνίσκων, τα PHF6 [(306)VQIVYK(311)] και PHF6* [(275)VQIINK(281)]. Λόγω αυτών των δύο μοτίβων, η πρωτεΐνη Τ αλλάζει διαμόρφωση και από την δομή τυχαία σπείρα αποκτά δομή β-πτυχωτών φύλλων (von Bergen et al., 2000); (von

Bergen et al., 2005). Αξιοσημείωτο επίσης είναι το γεγονός ότι οι ισομορφές που δεν περιέχουν την κυστεΐνη ή μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Τ που δεν περιέχει καθόλου κυστεΐνες στις περιοχές πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων μπορούν να σχηματίζουν PHFs σε in vitro μελέτες αλλά με πολύ πιο αργό ρυθμό. Αυτό υποδεικνύει ότι τα διμερή δεν αποτελούν απαραιτήτως ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ μονομερών και PHFs (Barghorn & Mandelkow, 2002). Τέλος, θεωρείται ότι τα νευροϊνιδικά πλέγματα (NFTs) προκύπτουν από τη συσσώρευση ινιδίων PHFs και SFs (Bancher et al., 1989); (Rankin, Sun, & Gamblin, 2008).

3.1.2.1. Μονομερή πρωτεΐνης Τ

Τα μονομερή της πρωτεΐνης Τ είναι μια εξαιρετικά διαλυτή μορφή μεγέθους 55-74 kDa (ανάλογα με την ισομορφή και την κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ). Έχουν κυρίως μια δομή τυχαίας σπείρας (random coil), υπό φυσιολογικές συνθήκες (Schweers et al., 1994), ενώ έχουν επιπλέον περιγραφεί κάποιες μερικώς διπλωμένες μορφές μονομερών, διαφορετικές από τα φυσικά μονομερή της πρωτεΐνης Τ, οι οποίες έχουν μειωμένο επίπεδο τυχαίας περιέλιξης και αυξημένο επίπεδο β-πτυχωτών φύλλων (Chirita et al., 2005). Αυτά τα συμπαγή μονομερή εμφανίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, για τους οποίους απαιτείται η κυστεΐνη που εντοπίζεται στην δεύτερη περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (Schweers et al., 1995), η οποία είναι απούσα από τις 3R ισομορφές. Συνεπώς, αυτά τα συμπαγή μονομερή εντοπίζονται μόνο στις 4R ισομορφές.

3.1.2.2. Διμερή/Τριμερή πρωτεΐνης Τ

Τα διμερή της πρωτεΐνης Τ αποτελούνται από δυο μονομερή που τοποθετούνται σε αντιπαράλληλο προσανατολισμό και συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (ΕΜ) έχει παρατηρηθεί ότι μοιάζουν ως ράβδοι μήκους 22-25 nm και είναι παρόμοια με τα μονομερή (Wille et al., 1992). Τα διμερή μπορούν να σχηματιστούν σε όλες τις ισομορφές της πρωτεΐνης Τ και υφίστανται σε δύο διαφορετικές μορφές (Sahara et al., 2007). Η πρώτη μορφή διμερών εξαρτάται από την κυστεΐνη, ενώ η δεύτερη μορφή τους είναι ανεξάρτητη από την κυστεΐνη, όπου δημιουργείται μια διαμοριακή δισουλφιδική γέφυρα ανάμεσα στις περιοχές δέσμευσης των μικροσωληνίσκων. Και οι δύο μορφές έχουν ταυτοποιηθεί και σε διαγονιδιακά ποντίκια (Sahara et al., 2007). Μικρά διαλυτά διμερή ή τριμερή της πρωτεΐνης Τ μεγέθους 140 kDa έχουν απομονωθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια και σε εγκεφάλους ασθενών με AD (Sahara et al., 2007); (Berger et al., 2007); (Henkins et al., 2012).

3.1.2.3. Διαλυτά Ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ

Έχουν περιγραφεί in vitro και in vivo πολλά διαφορετικά μικρά διαλυτά ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ διαφόρων μοριακών μεγεθών. Ωστόσο, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί εάν αυτά τα διαφορετικά ολιγομερή που περιγράφονται στις μελέτες είναι το ίδιο είδος ή όχι. Τα διαφορικά ολιγομερή φαίνεται να συνίστανται από έξι έως οκτώ μόρια πρωτεΐνης Τ, μοριακού βάρους περίπου 300-500 kDa (Sahara et al., 2007).

3.1.2.4. Αδιάλυτα κοκκώδη ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ (GTOs).

Τα αδιάλυτα κοκκώδη ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ αποτελούνται κατά μέσο όρο από 40 πυκνά συσκευασμένα μονομερή της πρωτεΐνης Τ, μεγέθους 1800 kDa και διαμέτρου 20–50 nm (Maeda et al., 2007). Τα κοκκώδη ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ έχει βρεθεί ότι είναι αυξημένα σε εγκεφάλους ασθενών με AD που βρίσκονται στο στάδιο Braak I σε σύγκριση με αυτούς που βρίσκονται στο στάδιο Braak 0, υποδηλώνοντας ότι η συσσωμάτωση σε ολιγομερή προηγείται του σχηματισμού των PHFs. Τα GTOs έχουν δομή β-πτυχωτών φύλλων και πιθανόν να αποτελούνται από τα μερικώς διπλωμένα μονομερή της πρωτεΐνης Τ (Maeda et al., 2007)

3.1.2.5. Ινίδια πρωτεΐνης Τ

Η πρωτεΐνη Τ είναι ικανή να πολυμερίζεται σε ινίδια. Σε ασθενείς με AD, τα κυρίαρχα ινίδια που εντοπίζονται είναι τα ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) και τα ευθύγραμμα ινίδια (SFs). Ουσιαστικά ο πυρήνας των PHFs και SFs αποτελείται από οκτώ β-πτυχωτά φύλλα (β1-8) που διατρέχουν κατά μήκος του πρωτοινιδίου, υιοθετώντας μια δομή C. Κάθε C δομή αποτελείται από μια δομή β-έλικας, όπου τρία β-πτυχωτά φύλλα είναι διατεταγμένα με τριγωνικό τρόπο και δύο περιοχές με σταυροειδή δομή, όπου ζεύγη β-πτυχωτών φύλλων συσκευάζονται αντιπαράλληλα μεταξύ τους. Σε άλλες Τ-πρωτεϊνοπάθειες, όπως η FTDP-17, υπάρχει μεταβλητότητα στη μορφολογία των ινιδίων της πρωτεΐνης Τ ανάλογα με την ισομορφή που εμπλέκεται ή τις μεταλλάξεις της (Crowther & Goedert, 2000), ωστόσο έχουν δομή β-πτυχωτού φύλλου, η οποία σχηματίζεται μέσω των περιοχών πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (Berriman et al., 2003); (Novak, Kabat, & Wischik, 1993).

3.1.2.6. Νευροϊνιδικά πλέγματα (NFTs)

Τα νευροϊνιδικά πλέγματα αποτελούν τα κλασσικά πλέγματα που περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Alzheimer το 1907. Ταξινομούνται ως πλέγματα σταδίου 2 και είναι μεγάλες δέσμες ινών που συνίστανται από ζεύγη ελικοειδών ινιδίων και από ευθύγραμμα ινίδια (Bancher et al., 1989).

3.1.2.7. Μηχανισμοί συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης Τ

Η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ φαίνεται να διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη παθογένεση διαφόρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών, συμπεριλαμβανομένων της νόσου του Alzheimer, νόσο του Pick, της προϊούσας υπερπυρηνικής παράλυσης, της νόσου του Πάρκινσον, της Μετωποκροταφικής άνοιας και της φλοιοβασικής εκφύλισης (Ballatore, Lee, & Trojanowski, 2007); (Gendron & Petrucelli, 2009). Ο σχηματισμός των νευροϊνιδικών πλεγμάτων φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για την παθογένεση των Τ-πρωτεϊνοπαθειών, ωστόσο λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό σχηματισμού τους καθώς και για τον ρόλο των ενδιάμεσων διαλυτών ολιγομερών και των ζευγών ελικοειδών ινιδίων.

Η υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ συμβάλλει στο σχηματισμό των NFTs, ωστόσο η συσσώρευσή τους από μόνη της μπορεί να είναι ανεπαρκής για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου, καθότι μελέτες σε ασθενείς με AD δείχνουν ότι η απώλεια νευρώνων και τα γνωστικά ελλείμματα προηγούνται του σχηματισμού NFTs (Haroutunian et al., 2007). Επίσης, μελέτες σε ζωικά μοντέλα δείχνουν ότι τα ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ, τα οποία εμφανίζονται πριν το σχηματισμό των NFTs, συμβάλλουν στα ελλείμματα μάθησης και μνήμης και στο θάνατο νευρωνικών κυττάρων, ενώ τα NFTs δεν σχετίζονται με το νευρωνικό θάνατο (Lasagna-Reeves et al., 2011a); (Cowan, Quraishe, & Mudher, 2012); (Cook et al., 2015); (Kim et al., 2016). Παρά την πληθώρα των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη Τ προκαλεί τοξικότητα παραμένει άγνωστος. Οι περισσότερες μελέτες σε ζωικά μοντέλα δείχνουν ότι η διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη Τ δυσλειτουργία και τοξικότητα δεν απαιτεί συσσωμάτωση αλλά προκαλείται από τη διαλυτή φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ. Επιπλέον, σε ορισμένες μελέτες in vivo έχει δειχθεί ότι ορισμένα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ, ιδιαίτερα τα ολιγομερή, μπορεί ακόμα και να έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ (Cowan et al., 2015). Υπό το πρίσμα όλων αυτών καθίσταται ανάγκη να εντοπιστούν οι βασικές τοξικές μορφές της πρωτεΐνης Τ και να αναγνωριστεί ο ρόλους της κάθε μίας στη δυσλειτουργία και τον εκφυλισμό. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαν να αναπτυχθούν πιο αποτελεσματικές θεραπείες έναντι των νόσων.

Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ ειδικά στις θέσεις Thr^{231}, Ser^{396}, Ser^{422} και Ser^{404} φαίνεται να προάγει τη αυτό-συσσωμάτωση της πρωτεΐνης σε ινίδια (Abraha et al., 2000); (Haase et al., 2004); (Alonso Adel et al., 2004). Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες in vitro μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ δεν είναι απαραίτητη για την μετατροπή της σε PHFs (Kampers et al., 1996); (Goedert et al., 1996). Αντιθέτως, η φωσφορυλίωση των μοτίβων KXGS στη περιοχή πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων φαίνεται να αναστέλλει τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ (Schneider et al., 1999); (Khlistunova et al., 2006). Επιπλέον, άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ που αποτελούνται από ανασυνδυασμένη μη-φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ μπορούν να προάγουν περαιτέρω συσσωμάτωση στα κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι η φωσφορυλίωση δεν απαιτείται τουλάχιστον για την προώθηση της συσσωμάτωσης (Kfoury et al., 2012); (J. L. Guo & Lee, 2013).

Επιπλέον, πολλοί άλλοι παράγοντες έχουν αναγνωριστεί ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ, τουλάχιστον σε in vitro μελέτες. Για παράδειγμα, η ενζυματική διάσπαση των μονομερών της πρωτεΐνης Τ με περικοπή στην θέση Glu^{391} έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τη παθογένεση στην AD (Ugolini, Cattaneo, & Novak, 1997); (McMillan et al., 2011) καθώς και η πρωτεόλυση από πολλαπλές κασπάσες σε μια εξαιρετικά συντηρημένη θέση, την Asp^{421}, στο καρβόξυ-τελικό άκρο (Gamblin et al., 2003). Η κολοβωμένη πρωτεΐνη Τ από τις κασπάσες δεν περιέχει τα 20 τελευταία αμινοξέα του καρβόξυ-τελικού άκρου με αποτέλεσμα να δημιουργεί πιο γρήγορα και εκτενέστερα ινίδια σε in vitro μελέτες (Gamblin et al., 2003). Ακόμα η αφαίρεση του καρβόξυ-τελικού άκρου της πρωτεΐνης Τ σε in vitro μελέτες έχει δείξει ότι επάγει τον σχηματισμό ινιδίων της πρωτεΐνης Τ (Abraha et al., 2000); (Berry et al., 2003) . Η αφαίρεση λίγων (12) ή πολλών (121) αμινοξέων από το καρβόξυ-τελικό άκρο είχε ως αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά ο ρυθμός και η έκταση πολυμερισμού της πρωτεΐνης Τ, ενώ η διαγραφή επιπλέον 7 αμινοξέων (314)DLSKVTS(320) από την τρίτη επανάληψη της περιοχής πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας της πρωτεΐνης Τ να σχηματίζει ινίδια (Abraha et al., 2000). Αυτό υποδηλώνει ότι μόνο ένα μέρος της περιοχής πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (επαναλήψεις 1, 2 και τμήμα της 3) είναι κρίσιμο για τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης Τ. Τέλος, η απαμίνωση στην ασπαραγίνη ή την γλουταμίνη έχει δειχθεί ότι επίσης εμπλέκεται στο διμερισμό και τον τριμερισμό της πρωτεΐνης Τ και στο σχηματισμό PHFs in vivo (Watanabe, Takio, & Ihara, 1999). Επιπροσθέτως, διάφοροι πολύ-ανιονικοί παράγοντες όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) ηπαρίνη και νευροπαρίνη (Pérez, Valpuesta, Medina, Montejo de Garcini, & Avila, 1996); (Goedert et al., 1996), οι σουλφογλυκοζαμινογλυκάνες (sGAGs) κερατίνη και θειική χονδοϊτίνη (Arrasate et al., 1997), το RNA (Kampers et al., 1996), το πολυγλουταμινικό οξύ (Kampers et al., 1996); (Pérez et al., 1996), λιπαρά οξέα όπως

το αραχιδονικό οξύ (Wilson & Binder, 1997); (Gamblin et al., 2000) και το θειικό αλκύλιο (Chirita, Necula, & Kuret, 2003) φαίνεται να εμπλέκονται επίσης.

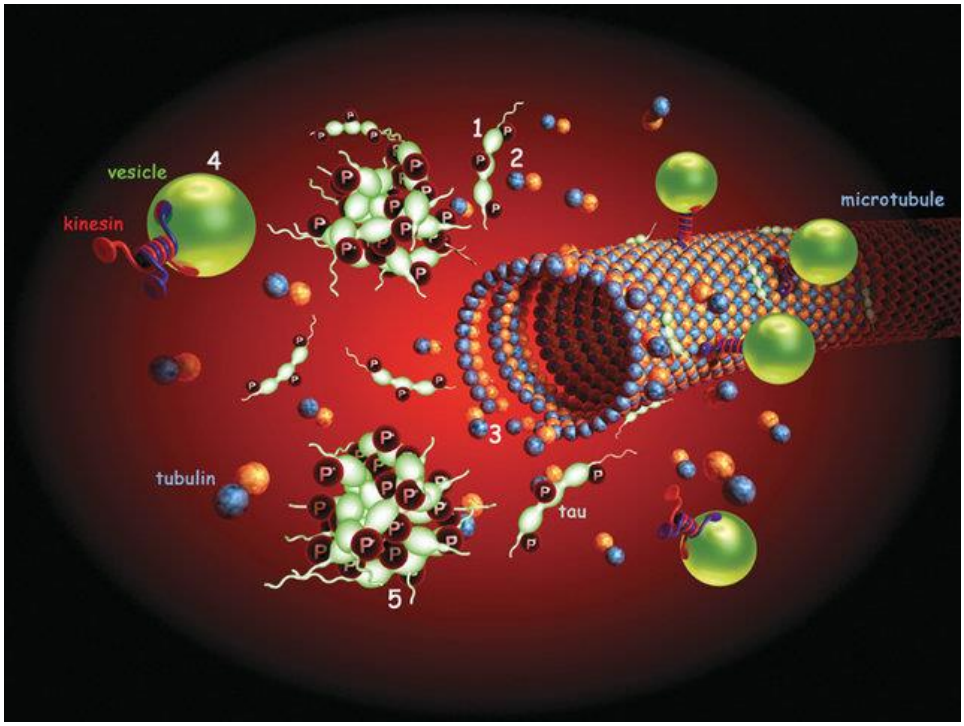
Παρά το γεγονός ότι υπάρχει μια πληθώρα δεδομένων που υποδεικνύει διάφορους παράγοντες οι οποίοι προάγουν τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά ερωτήματα σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό δημιουργίας τους και τον συσχετισμό τους με τις διάφορες ασθένειες.

3.2. Μηχανισμοί τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ

Ο μηχανισμός με τον οποίο η παθογόνος πρωτεΐνη Τ οδηγεί στο νευροεκφυλισμό είναι αρκετά ασαφής. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια με βάση πληθώρα μελετών έχουν αναπτυχθεί αρκετές θεωρίες. Μια θεωρία είναι ότι η πρωτεΐνη Τ προκαλεί δυσλειτουργία στη δομή και οργάνωση των μικροσωληνίσκων και κατά συνέπεια του κυτταροσκελετού των νευρώνων και απώλεια των συνάψεων με αποτέλεσμα τη διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και τον επικείμενο εκφυλισμό των νευρώνων. Αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα στη νόσο του Alzheimer, καθώς η συναπτική απώλεια θεωρείται ότι είναι ένα πρώιμο συμβάν στον νευροεκφυλισμό στην AD (Terry et al., 1991); (Masliah et al., 2001). Ωστόσο, η παθολογική δράση της πρωτεΐνης Τ θα μπορούσε να αιτιολογηθεί είτε από την άμεση τοξικότητα της ελεύθερης υπερ-φωσφορυλιωμένης μορφής είτε από την έμμεση τοξικότητα των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης που οδηγούν σε νευρωνικό θάνατο. Συλλογικά η πρωτεΐνη Τ έχει δειχθεί ότι υπερ-φωσφορυλιώνεται, αναδιπλώνεται εσφαλμένα και δημιουργεί συσσωματώματα. Αυτές οι αλλαγές συνάδουν στενά με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνης Τ.

3.2.1. Αποσταθεροποίηση μικροσωληνίσκων

Η φωσφορυλίωση θεωρείται ότι είναι το κλειδί για την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Στις διαφόρους νόσους, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ προκαλεί μειωμένη σύνδεση της πρωτεΐνης Τ με τους μικροσωληνίσκους **(Εικόνα 11),** οδηγώντας σε αποσυναρμολόγηση/αστάθεια των μικροσωληνίσκων και σε μειωμένη αξονική μεταφορά (Cowan et al., 2010); (Hempen & Brion, 1996). Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων, όπως οι θέσεις Ser^{214}, Ser^{262}, Ser^{293}, Thr^{231}, Ser^{235}, Ser^{324} και Ser^{356} έχει δειχτεί ότι εμπλέκονται ιδιαίτερα στη μειωμένη ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης Τ στους μικροσωληνίσκους (Sengupta et al., 1998); (Schneider et al., 1999); (Fischer et al., 2009).



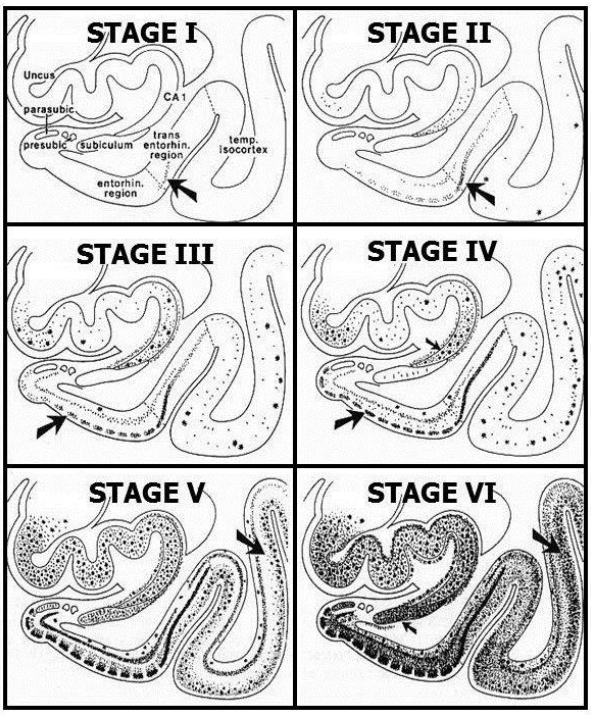
Εικόνα 11. Αποσταθεροποίηση μικροσωληνίσκων ως αποτέλεσμα υπερ-φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ. Τα ετεροδιμερή της α- και β- τουμπουλίνης συναρμολογούνται σε πρωτοϊνίδια, τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν τους μικροσωληνίσκους. Η πρωτεΐνη Τ όταν είναι φυσιολογικά φωσφορυλιωμένη αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους. Όταν η πρωτεΐνη Τ (1) είναι υπερ-φωσφορυλιωμένη (2) μειώνεται η ικανότητα δέσμευσης των μικροσωληνίσκων και έτσι η πρωτεΐνη Τ αποκολλάται από τους μικροσωληνίσκους (3). Ως αποτέλεσμα οι μικροσωληνίσκοι αρχίζουν να καταρρέουν (3) και συνεπώς, η αξονική μεταφορά κυστιδίων και άλλων οργανιδίων στη σύναψη διαταράσσεται, οδηγώντας σε μειωμένη συναπτική λειτουργία (4). Η υπερ-φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ αρχίζει να συσσωρεύεται και τελικά δημιουργούνται συσσωματώματα (5). Εικόνα από (Cowan et al., 2010).

Η αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων λόγω της φωσφορυλίωσης έχει δειχτεί σε πολλά διαφορετικά μοντέλα συμπεριλαμβανομένου και της *Drosophila melanogaster* (Cowan, Bossing, et al., 2010); (Mudher et al., 2004); (Quraishe, Cowan, & Mudher, 2013). Η μειωμένη αξονική μεταφορά λόγω αποσταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων πιθανόν να προκαλεί και την έναρξη του νευροεκφυλισμού. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν στην επανασταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Για παράδειγμα, η χρήση της πακλιταξέλης, μιας ένωσης που θεωρείται ότι σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους, όταν χορηγήθηκε σε ποντίκια που εκφράζουν την ανθρώπινη πρωτεΐνη Τ βρέθηκε ότι αναστρέφει την ελλειμματική αξονική μεταφορά (B. Zhang et al., 2005). Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η χορήγηση του πεπτιδίου NAPVSIPQ (NAP), όταν χορηγήθηκε σε μύγες που εκφράζουν την ανθρώπινη ισομορφή 0N3R της πρωτεΐνης Τ (Quraishe et al., 2013), καθώς σταθεροποίησε τους μικροσωληνίσκους και βελτίωσε την αξονική μεταφορά. Συνεπώς, οι μελέτες αυτές

δείχνουν ότι η αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων είναι καθοριστικός παράγοντας για την τοξικότητα που προκαλείται από την πρωτεΐνη Τ.

3.2.2. Διάδοση της πρωτεΐνης Τ

Ένας άλλος μηχανισμός τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ είναι η τάση της να διαδίδεται και να εξαπλώνεται στον εγκέφαλο, επηρεάζοντας διαφορετικές περιοχές του (Braak & Braak, 1991); (Braak & Braak, 1995). Περιλαμβάνει έξι διαφορετικά στάδια και ουσιαστικά αποδεικνύεται ότι τα NFTs συσσωρεύονται και διαδίδονται στον εγκέφαλο με ένα συγκεκριμένο μοτίβο **(Εικόνα 12)**. Στα στάδια I-II αρχίζουν να εμφανίζονται τα NFTs κυρίως στις ενδορινικές περιοχές και κινούνται προς το εγκεφαλικό στέλεχος. Στα στάδια III-IV, τα NFTs εξαπλώνονται στις μεταιχμιακές περιοχές του εγκεφάλου, τον φλοιό, τον υποθάλαμο, την CA1 περιοχή του ιπποκάμπου και στην αμυγδαλή. Στα στάδια V-VI, η εξάπλωση των NFTs έχει φτάσει στο νεοφλοιό και στις δομές του κροταφικού, βρεγματικού και μετωπιαίου λοβού. Στα στάδια I-II υπάγονται οι κλινικά σιωπηλοί ασθενείς, όπου τα συμπτώματα δεν έχουν αρχίσει να εμφανίζονται, ενώ στα στάδια III-IV αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα. Στα στάδια V-VI, τα συμπτώματα του AD αναπτύσσονται πλήρως. Αυτό υποδεικνύει ότι η εξάπλωση των NFTs συσχετίζεται στενά με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της νόσου, αποδεικνύοντας μια σαφή σύνδεση μεταξύ της διάδοσης της πρωτεΐνης Τ και της παθογένεσης του AD.



Εικόνα 12. Στάδια Braak της παθολογίας του AD. Στα στάδια I-II τα NFTs εντοπίζονται κυρίως στις ενδορινικές περιοχές και αντιπροσωπεύουν σιωπηλές περιόδους της νόσου, όπου τα συμπτώματα δεν έχουν αρχίσει να εμφανίζονται. Στα στάδια III-IV, τα NFTs εξαπλώνονται στις μεταιχμιακές περιοχές και στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου. Στα στάδια αυτά αρχίζουν να εκδηλώνονται τα πρώτα συμπτώματα στους ασθενείς. Στα στάδια V-VI, τα NFTs έχουν πλέον εξαπλωθεί σε όλες τις περιοχές του φλοιού και αντιπροσωπεύουν την πλήρως ανεπτυγμένη AD. Εικόνα από (Braak & Braak, 1991); (Luna-Muñoz et al., 2013).

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η διάδοση της πρωτεΐνης Τ από κύτταρο σε κύτταρο και προκαλεί την παθογένεση δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, διάφορες μελέτες δείχνουν ότι αυτό υφίσταται και πιθανόν να δρα σαν prion μηχανισμός, όπου η παθολογική πρωτεΐνη Τ μπορεί να εξαπλωθεί από νευρώνα σε νευρώνα (Lewis & Dickson, 2016); (Goedert, Eisenberg, & Crowther, 2017); (Ayers, Giasson, & Borchelt, 2018). Έχει βρεθεί ότι τόσο τα μη τροποποιημένα ινίδια της πρωτεΐνης Τ (Peeraer et al., 2015) όσο και τα φωσφορυλιωμένα ινίδια της πρωτεΐνης Τ (X. C. Li et al., 2016) μπορούν να προκαλέσουν την εξάπλωση της παθολογίας, όταν εγχέονται στον εγκέφαλο διαγονιδιακών ποντικών. Όταν πραγματοποιείται αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ από φωσφατάσες, τότε παρατηρείται λιγότερη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης και μειωμένη εξάπλωση στον εγκέφαλο, υποδηλώνοντας ότι η φωσφορυλίωση πιθανόν να είναι χαρακτηριστικό της διάδοσης της πρωτεΐνης. Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων, συμπεριλαμβανομένων των Ser^{262} και του συνδυασμού Thr^{231}/Ser^{235}, φαίνεται ότι ενισχύουν τη διάδοση των NFTs της πρωτεΐνης Τ, ενώ άλλες θέσεις όπως οι $Ser^{198}/Ser^{199}/Ser^{202}$ και $Ser^{400}/Thr^{403}/Ser^{404}$ συσχετίζονται με χαμηλότερη διάδοση.

Αυτό υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ μπορεί να ρυθμίσει ετερογενώς την ικανότητα διάδοσης των NFTs (Dujardin et al., 2020).

Επιπροσθέτως, αρκετές μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες έχουν δείξει ότι τα εξωκυτταρικά συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης και να πυροδοτήσουν την εσφαλμένη αναδίπλωση και την συσσώρευση της ενδογενούς πρωτεΐνης Τ (Frost, Jacks, & Diamond, 2009); (J. L. Guo & Lee, 2011); (Nonaka et al., 2010). Σε άλλη μελέτη, αποδείχτηκε ότι η έγχυση ινιδίων πρωτεΐνης Τ από ποντίκια με μεταλλαγμένη τη P301S στον ιππόκαμπο ποντικών που εκφράζουν μόνο την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Τ (υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ποντίκια αυτά δεν αναπτύσσουν ινίδια) προκαλεί την συσσώρευση τους όχι μόνο στο σημείο της έγχυσης αλλά και σε γειτονικά κύτταρα (Clavaguera et al., 2009). Παρομοίως, με χρήση του διαγονιδιακού ποντικού που υπερεκφράζει την ανθρώπινη μεταλλαγμένη P301L μόνο στον ενδορινικό φλοιό βρέθηκε ότι η σχετιζόμενη με την πρωτεΐνη Τ παθολογία διαβιβάζεται από τους νευρώνες που εκφράζουν το διαγονίδιο σε άλλους κοντινούς νευρώνες και στη συνέχεια στον ιππόκαμπο και στο φλοιό (de Calignon et al., 2012).

Όλες οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν ότι η παθολογική πρωτεΐνη Τ μπορεί να εξαπλωθεί από κύτταρο σε κύτταρο, καθώς και ότι έχει την ικανότητα να μετατρέπει τη φυσιολογική πρωτεΐνη Τ σε παθολογική, προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και συνεπώς δρα ως prion.

4. Τ-πρωτεϊνοπάθειες

Οι Τ-πρωτεϊνοπάθειες είναι μια ομάδα νευροεκφυλιστικών ασθενειών που προσβάλλουν τις γνωσιακές λειτουργίες και την μνήμη και χαρακτηρίζονται από υπερφωσφορυλιωμένη ή μη- φυσιολογικά φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ και από μεταλλαγές στο γονίδιο τ. Διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ έχουν εμπλακεί σε διαφορετικές ασθένειες **(Πίνακας 1)**. Για παράδειγμα σε ορισμένες ασθένειες, όπως η νόσος AD εμπλέκονται οι ισομορφές 3R και 4R, ενώ στη νόσο του Pick μόνο οι 3R ισομορφές. Η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (PSP) και η Φλοιοβασική Εκφύλιση (CBD) είναι παραδείγματα Τ-πρωτεϊνοπαθειών που εμπλέκονται μόνο οι 4R ισομορφές (Sergeant et al., 2005). Αυτό υποδηλώνει ότι οι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ έχουν και διαφορετικό ρόλο στην κάθε ασθένεια. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την κατανόηση των διαφορών στις ισομορφές 3R και 4R της πρωτεΐνης Τ και πως εμπλέκονται στη κάθε Τ-πρωτεϊνοπάθεια. Στις παρακάτω ενότητες περιγράφονται οι πιο κοινές αντιπροσωπευτικές Τ- πρωτεϊνοπάθειες.

Ασθένεια	Αγγλικός Όρος	Ισομορφή της πρωτεΐνης Τ που εμπλέκεται στην ασθένεια
Νόσος του Alzheimer	Alzheimer's disease (AD)	**3R & 4R ισομορφές**
Σύμπλεγμα πλάγιας μυατροφικής σκλήρυνσης και παρκινσονισμού του Guam	Amyotrophic lateral sclerosis/ parkinsonism- dementia complex of Guam (ALS)	
Χρόνια τραυματική εγκεφαλοπάθεια	Chronic traumatic encephalopathy	
Μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό σχετιζόμενη με το χρωμόσωμα 17	Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)	
Εγκεφαλική Γήρανση	Aging Hippocampal tauopathy in cerebral aging	
Σύνδρομο Down	Down's Syndrome	
Αμυλοειδική αγγειοπάθεια βρετανικού τύπου	Familial British dementia (British type amyloid angiopathy)	
Οικογενής άνοια δανικού τύπου	Familial Danish dementia	
Σύνδρομο Nodding	Nodding Syndrome	
'Πυγμαχική' άνοια/αυτισμός με συμπεριφορά αυτοτραυματισμού	Dementia pugilistica/autism with self injury bahavior	
Άνοια με παρουσία μόνο νευροϊνιδίων	Neurofibrillary tangle-only dementia (NFT-dementia)	
Νόσος των Niemann-Pick τύπου C	Niemann-Pick disease type C	
Παρκινσονισμός με άνοια της Γουαδελούπης	Parkinsonism with dementia of Guadeloupe	
Μετα-εγκεφαλιτιδικός παρκινσονισμός	Postencephalitic parkinsonism	
Προγεροντική άνοια με νευροϊνίδια και ασβεστοποίηση	Presenile dementia with tangles and calcifications	
Άνοια αργυλοφιλικών κόκκων	Argyrophilic grain disease (AGD)	**4R ισομορφές**
Φλοιοβασική Εκφύλιση	Corticobasal degeneration (CBD)	
Σφαιρική νευρογλοιακή Τ-πρωτεϊνοπάθεια	Globular glial tauopathy (GGT)	
Προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση	Progressive supranuclear palsy (PSP)	
Αστρογλοιοπάθεια σχετιζόμενη με την ηλικία	Age-related astrogliopathy	
Νόσος του Huntington	Huntington' disease	
Νόσος του Pick	Pick's Disease (PiD)	**3R ισομορφές**

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των πιο κοινών Τ-πρωτεϊνοπαθειών με βάση τις ισομορφές που εμπλέκονται σε κάθε ασθένεια.

4.1. Βιοχημική Ανάλυση των Τ-πρωτεϊνοπαθειών

Βιοχημική ανάλυση των Τ-πρωτεϊνοπαθειών με ηλεκτροφορετική ανάλυση και χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της ολικής και της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Τ έχει δείξει ότι τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ καθώς και η υπερφωσφορυλίωσή τους διαφέρει από ασθένεια σε ασθένεια.

Συγκεκριμένα, η παθολογική πρωτεΐνη Τ στη νόσο του AD δίνει ένα χαρακτηριστικό ηλεκτροφορετικό προφίλ, το οποίο προκύπτει από τη κατανομή των έξι διαφορετικών ισομορφών και συνίσταται από τρεις κύριες ζώνες (55, 64 και 69KDa) καθώς και μια επιπλέον αχνή ζώνη στα 74KDa (Goedert et al., 1992a); (Sergeant et al., 1997a). Η ζώνη των 74 KDa ανιχνεύεται ιδιαίτερα στους νεότερους και πιο σοβαρά προσβεβλημένους ασθενείς με AD και φαίνεται να αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη ισομορφή της πρωτεΐνης Τ, την 2N4R, ενώ η ζώνη των 55KDa αντιστοιχεί στην μικρότερη ισομορφή, την 0N3R. Η ζώνη των 64KDa είναι συνδυασμός των 1N3R και 0N4R ισομορφών, ενώ η ζώνη των 69KDa των 2N3R και 1N4R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ. Το συγκεκριμένο ηλεκτροφορετικό μοτίβο δίνεται και σε μια σειρά άλλων ασθενειών, όπως η νόσος των Niemann-Pick τύπου C, το FTDP-17, στο σύμπλεγμα πλάγιας μυατροφικής σκλήρυνσης και παρκινσονισμού του Guam και στο συνδρομο Down.

Στις ασθένειες που χαρακτηρίζονται από 3R παθολογική πρωτεΐνη Τ, όπως είναι η νόσος του Pick, δίνονται δυο ζώνες κατά την ηλεκτροφορετική ανάλυση, των 55KDa και των 64KDa, οι οποίες αντιστοιχούν στις 0N3R και 1N3R ισομορφές της πρωτεΐνης Τ αντίστοιχα. Μια πολύ αχνή ζώνη στα 69KDa ανιχνεύεται και αντιστοιχεί στην 2N3R ισομορφή (Sergeant et al., 1997b); (Delacourte et al., 1996).

Στις ασθένειες οι οποίες χαρακτηρίζονται από 4R παθολογική πρωτεΐνη Τ, όπως είναι οι ασθένειες φλοιοβασική εκφύλιση, προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση και η άνοια αργυλοφιλικών κόκκων, παρατηρούνται δύο ζώνες στα 64 και 69KDa, οι οποίες αντιστοιχούν στις 0N4R και 1N4R ισομορφές της πρωτεΐνης Τ αντίστοιχα και μια αχνή ζώνη στα 74KDa που αντιστοιχεί στην 2N4R (Sergeant et al., 1999); (Tolnay et al., 2002).

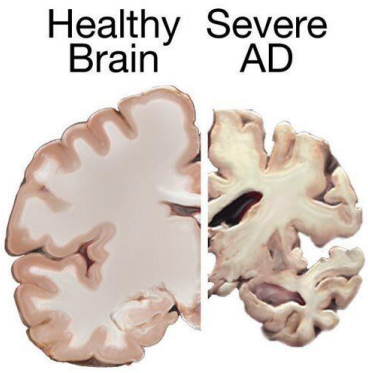
4.2. Η νόσος του Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1907 από τον Alois Alzheimer (επίσημη μετάφραση Alzheimer, Stelzmann, Schnitzlein, & Murtagh, 1995) και είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας στο κόσμο. Εκτιμάται ότι το 75% των ατόμων με άνοια δεν διαγιγνώσκεται, και το ποσοστό αυτό μπορεί να είναι υψηλότερο σε χώρες μικρού ή μεσαίου εισοδήματος, όπου η έλλειψη γνώσης για την άνοια εμποδίζει τη διάγνωση. Υπολογίζεται ότι πάνω από 55 εκατομμύρια

άνθρωποι έχουν άνοια παγκοσμίως και οι προβλέψεις αγγίζουν τα 78 εκατομμύρια έως το 2030 [World Alzheimer Report 2021, (Gauthier, Rosa-Neto, Morais, & Webster, 2021)].

Στο πρώιμο στάδιο της νόσου του Alzheimer (AD) αρχίζει να εκδηλώνεται απώλεια της πρόσφατης μνήμης, μειωμένη ικανότητα εκμάθησης, δυσκολία στη συγκράτηση νέας πληροφορίας και στον λόγο, δυσκολία οργάνωσης της σκέψης, αλλαγές στη διάθεση και στη προσωπικότητα (κατάθλιψη, απάθεια), ήπιες κινητικές διαταραχές (π.χ. τρόμος), αλλαγές στο κύκλο ύπνου/αφύπνισης καθώς και στο κιρκαδικό ρυθμό (Prinz et al., 1982); (Hatfield et al., 2004). Ωστόσο, τα συμπτώματα είναι πολύ αμυδρά και για το λόγο αυτό μπορεί να περάσουν πολλά έτη (ίσως και περισσότερα από 10) μέχρι να ανιχνευθεί η ασθένεια. Στο ενδιάμεσο στάδιο της νόσου υπάρχει σοβαρότερη διαταραχή μνήμης, πρόσφατης και παλαιότερης, απώλεια προσανατολισμού, αδυναμία ελέγχου κινήσεων και σοβαρές διαταραχές στη συμπεριφορά όπως κατάθλιψη, απομόνωση, απάθεια, ψευδαισθήσεις, παραληρητικές ιδέες, νευρικότητα και επιθετικότητα. Στο τελικό στάδιο (προχωρημένο στάδιο) υπάρχει πλήρης απώλεια μνήμης και εκτέλεσης των καθημερινών δραστηριοτήτων και αδυναμία λόγου (απραξία, αφασία, αγνωσία). Η μάζα και η κινητικότητα μυών επιδεινώνονται σε σημείο όπου ο ασθενής είναι μόνιμα στο κρεβάτι. Τελικά επέρχεται ο θάνατος, ο οποίος προκαλείται συνήθως από κάποιο άλλο παράγοντα, όπως λοιμώξεις, και όχι από την ίδια τη νόσο.

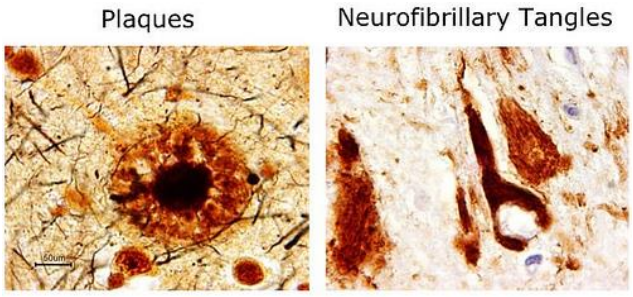
Η νόσος του Alzheimer θεωρείται μια πολυπαραγοντική νόσος καθότι διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη της νόσου και να τροποποιήσουν την ηλικία έναρξης και πορείας της νόσου. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι γενετικοί, κοινωνικοί (π.χ. επίπεδο μόρφωσης), ο τρόπος ζωής (π.χ. διατροφή, φυσική και πνευματική κατάσταση), το περιβάλλον, άλλες παθήσεις του ατόμου (π.χ. φλεγμονή) και η χορήγηση φαρμάκων για αυτές (π.χ. τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη). Οι πρώτες ενδείξεις για την κατανόηση της παθογένειας του AD βρίσκονται στις αλλαγές που έχουν βρεθεί στους εγκεφάλους ασθενών με AD, με κυριότερη την αυξημένη ατροφία που παρατηρείται **(Εικόνα 13)**.



Εικόνα 13. Υγιής εγκέφαλος σε σχέση με εγκέφαλο με σοβαρή νόσο Alzheimer. Αριστερά απεικονίζεται ενας υγιής εγκέφαλος και δεξιά ενας εγκέφαλος με νόσο του Alzheimer. Στον

εγκέφαλο με AD είναι εμφανής η ατροφία σοβαρού επιπέδου. Εικόνα από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institutes of Health, NIH).

Στη νόσο του Alzheimer επηρεάζονται συγκεκριμένες περιοχές (Braak & Braak, 1991); (Braak & Braak, 1995) ιδιαίτερα του νεοφλοιού, της ενδορινικής περιοχής, του ιπποκάμπου, της αμυγδαλής, του πρόσθιου θαλάμου και κάποιες περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους **(Εικόνα 12)**. Στο πρώιμο στάδιο της νόσου, η εκφύλιση εμφανίζεται κυρίως στις ενδορινικές περιοχές, ενώ στο ενδιάμεσο στάδιο εξαπλώνεται στις μεταιχμιακές περιοχές και κυρίως στις περιοχές CA1 και CA2 του ιπποκάμπου. Στο τελικό στάδιο της νόσου, η εκφύλιση φτάνει μέχρι το νεοφλοιό και στις δομές του μετωπιαίου λοβού. Δύο κύριες παθολογίες εντοπίζονται στον εγκέφαλο των ασθενών με AD **(Εικόνα 14)**, οι νευριτικές ή γεροντικές πλάκες, οι οποίες αποτελούνται από εξωκυττάριες εναποθέσεις β- αμυλοειδούς (Αβ) (Masters et al., 1985) και τα νευροϊνιδικά πλέγματα (NFTs) της πρωτεΐνης Τ (Grundke-Iqbal et al., 1986a).

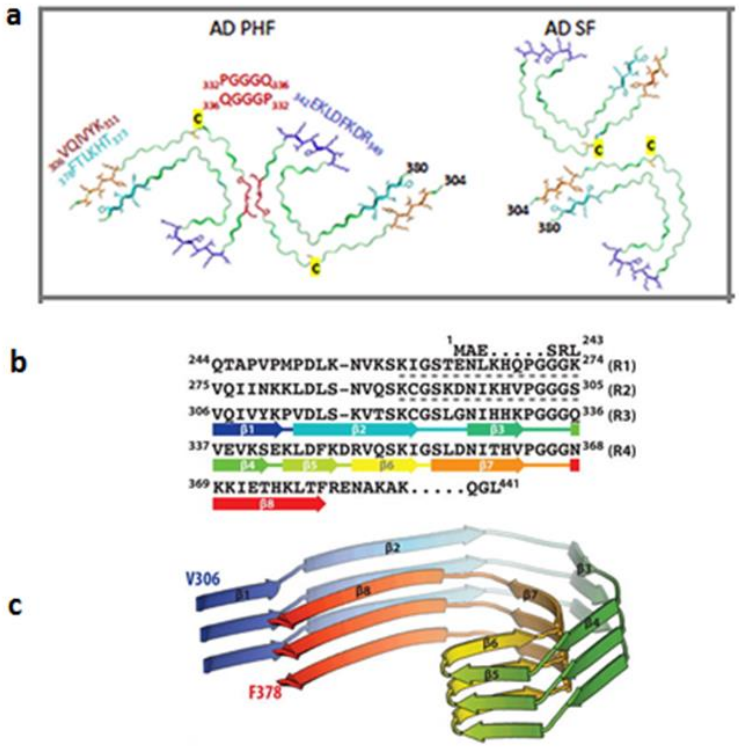


Εικόνα 14. Απεικόνιση πλακών αμυλοειδους βήτα (αριστερά) και νευροινιδικών πλεγμάτων της πρωτείνης Τ (δεξιά). Εικόνα από (LaFerla & Oddo, 2005).

Για πάρα πολλά χρόνια εθεωρείτο ότι η κύρια αιτία του AD ήταν οι εναποθέσεις των πλακών Αβ. Το Αβ απαντάται σε πεπτίδια των 40 (Αβ40) και των 42 (Αβ42) αμινοξέων, τα οποία προκύπτουν από συνεχείς πρωτεολύσεις της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) από τη β-σεκρετάση και τη γ-σεκρετάση (Haass et al., 1992); (Esler & Wolfe, 2001); (Hooper, 2005). Από αυτά, το Αβ42 έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη τάση να δημιουργεί συσσωματώματα (Jarrett, Berger, & Lansbury, 1993), ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες το Αβ40 είναι το επικρατέστερο πεπτίδιο (Kang et al., 1987). Μεταλλάξεις στο γονίδιο της APP (Goate et al., 1991); (Tanzi, 2012) ή σε γονίδια που είναι σημαντικά για την επεξεργασία της APP, όπως η πρεσενιλίνη 1 και 2 (Sherrington et al., 1995); (Scheuner et al., 1996) καθώς και αλληλόμορφα της πρωτεΐνης ApoE (Strittmatter et al., 1993) έχουν ταυτοποιηθεί ως γενετικοί παράγοντες κινδύνου για τη νόσο AD.

Στις γενετικές μορφές της νόσου φαίνεται ότι το αμυλοειδές διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Η αλυσίδα των γεγονότων του αμυλοειδούς ξεκινά από τα αυξημένα επίπεδα του Αβ, το οποίο εν συνεχεία σχηματίζει συσσωματώματα ολιγομερών. Αυτά προκαλούν δυσλειτουργίες σε μια σειρά κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένης της συναπτικής λειτουργίας και της αξονικής μεταφοράς. Μια σειρά από έρευνες δείχνουν ότι η πρωτεΐνη Τ εμπλέκεται σε αυτήν την αλληλουχία των γεγονότων του αμυλοειδούς, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αυτό συμβαίνει είναι ασαφής προς το παρόν. Ωστόσο, όσο αφορά τις γνωσιακές εκπτώσεις που παρατηρούνται στη νόσο AD φαίνεται ότι συσχετίζονται περισσότερο με την παθογένεση της πρωτεΐνης Τ.

Σε ασθενείς με AD, τα κυρίαρχα ινίδια της πρωτεΐνης Τ που εντοπίζονται είναι τα ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) και τα ευθύγραμμα ινίδια (SFs). Σε πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι ο πυρήνας των PHFs και SFs αποτελείται από τα υπολείμματα V306-F378, υποδεικνύοντας τη συμπερίληψη των επαναλήψεων R3 και R4 και επιπλέον 10 αμινοξέα από το καρβόξυ-τελικό άκρο (Fitzpatrick et al., 2017). Αυτό επιτρέπει την ενσωμάτωση και των έξι ισομορφών της πρωτεΐνης Τ. Τα PHFs και SFs σχηματίζονται από δύο πανομοιότυπα πρωτοϊνίδια που διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο συσκευάζονται. Τα πρωτοϊνίδια των PHFs ζευγαρώνουν βάση προς βάση, ενώ των SFs ζευγαρώνονται με διεπαφή πλάτη-βάση **(Εικόνα 15a)**.



Εικόνα 15. Διάταξη των πρωτοινιδίων προς σχηματισμό των PHFs και SFs στη νόσο του Alzheimer. α) Δομή των PHFs και SFs. b) Παράταξη αλληλουχίας των τεσσάρων επαναλαμβανόμενων περιοχών πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (R1-R4) με τις παρατηρούμενες οκτώ περιοχές β-φύλλων (β1-

β8). c) Απεικόνιση της δευτεροταγής δομής σε τρεις διαφορετικές διαβαθμίσεις. Εικόνα από (Oakley et al., 2020) και (Fitzpatrick et al., 2017).

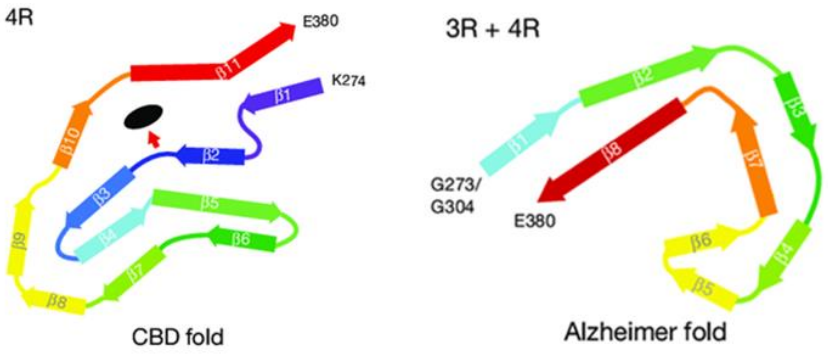
Κάθε πρωτοϊνίδιο περιέχει οκτώ β-φύλλα, πέντε από τα οποία δημιουργούν δυο ζεύγη αντιπαράλληλων β-πτυχωτών φύλλων και τα άλλα τρία σχηματίζουν μια β-έλικα. Τα β1 και β2 διατάσσονται έναντι των β8, τα β3 διατάσσονται έναντι των β7 και τα β4, β5 και β6 δημιουργούν την β-έλικα χαρακτηριστικού σχήματος C **(Εικόνα 15 και Εικόνα 16)**. Το άμινο-τελικό άκρο της δομής σχηματίζεται από το εξαπεπτίδιο ^{306}VQIVYK^{311} (PHF6), το οποίο είναι απαραίτητο για τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης Τ και την δημιουργία των ινιδίων (von Bergen et al., 2000). Το PHF6 σχηματίζει μια συμπληρωματική διεπαφή με τα υπολείμματα 374-378 του β8-φύλλου με υδρόφοβους δεσμούς. Το δεύτερο μοτίβο εξαπεπτιδίου που απαιτείται για το σχηματισμό των ινιδίων είναι το ^{275}VQIINK^{280} (PHF6*). Τα β2 και β8 σχηματίζουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο 'φερμουάρ'. Στη συνέχεια, σχηματίζεται μια στροφή σε σχεδόν ορθή γωνία μέσω αλληλεπίδρασης των G323 και G326 από τη μια πλευρά και του μοτίβου ^{364}PGGG^{367} στην άλλη πλευρά. Υδροφοβικοι δεσμοί μεταξύ L324, I326 και V363 αμέσως μετά την στροφή σταθεροποιούν την περιοχή και η διασύνδεση μεταξύ β3 και β7 εγκαθιδρύεται περαιτέρω με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των H328 και T361. Μετά το β3, τα υπολείμματα ^{332}PGGG^{335} υιοθετούν μια εκτεταμένη β-σπειροειδή διαμόρφωση. Τέλος, οι δύο πλευρές συναντώνται μέσω μιας δομής β-έλικας, η οποία σχηματίζεται από τρεις β-κλώνους (β4-6). Οι γωνίες β-τόξου δύο υπολειμμάτων (E342, K343) και τριών υπολειμμάτων (^{347}KDR^{349}) σχηματίζουν τη γεωμετρία β-έλικας, η οποία είναι κλειστή με μια περιστρεφόμενη διαμόρφωση γλυκίνης ~70° (G355).

4.3. Φλοιοβασική Εκφύλιση (CBD)

Η φλοιοβασική εκφύλιση (CBD) είναι μια σπάνια, προοδευτικά επιδεινούμενη νευροεκφυλιστική νόσος που συνήθως ξεκινά στις ηλικίες μεταξύ των 60 και 70 ετών. Συνήθως προσβάλλει τη μια πλευρά του σώματος εντονότερα από την άλλη και χαρακτηρίζεται από βραδύτητα στις κινήσεις, μυϊκές συσπάσεις, δυσκολία στην εκτέλεση των καθημερινών δραστηριοτήτων, διαταραχή του λόγου, του προσανατολισμού και της ικανότητας λήψης αποφάσεων, αλλαγές στην συμπεριφορά (απάθεια, παρορμητικότητα, ευερεθιστότητα) και μειωμένη γνωστική λειτουργία.

Η απώλεια νευρικών κυττάρων συμβαίνει σε συγκεκριμένες περιοχές, οδηγώντας σε ατροφία ή συρρίκνωση συγκεκριμένων σημείων του εγκεφάλου. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι πολλά από τα νευρικά κύτταρα που απομένουν είναι χρωματολυμένα, μια κατάσταση γνωστή ως αχρωμασία (Paulus & Selim, 1990). Προσβάλλει κυρίως τις περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου (κυρίως μετωπιαίο και

βρεγματικό λοβό) καθώς και τα βασικά γάγγλια, εξ ου και η ονομασία της νόσου. Αρχικώς, η παθολογία συναντάται στις υποφλοιώδεις περιοχές και μετέπειτα στο φλοιό για το λόγο αυτό ένα από τα πρώτα συμπτώματα αφορά κινητικές και γνωσιακές διαταραχές. Στα τελικά στάδια της νόσου παρατηρείται άνοια. Στις πάσχουσες εγκεφαλικές περιοχές έχουν εντοπιστεί ινίδια της πρωτεΐνης Τ και συγκεκριμένα των ισομορφών 4R. Για το λόγο αυτό, η φλοιοβασική εκφύλιση κατατάσσεται στις 4R Τ- πρωτεϊνοπάθειες, όπως επίσης και η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (PSP), η άνοια αργυλοφιλικών κόκκων (AGD) και η σφαιρική νευρογλοιακή Τ- πρωτεϊνοπάθεια (GGT) (Wakabayashi et al., 1994); (Arima et al., 1994); (Sergeant et al., 1999). Με ηλεκτρονική μικροσκοπική εξέταση, έχει βρεθεί ότι στο φλοιβασικό εκφυλισμό τα ινίδια της πρωτεΐνης Τ είναι περισσότερο στριμμένα και διαφέρουν από αυτά στην AD, όπου είναι τα κλασσικά ζευγαρωμένα ελικοειδή ινίδια. Στη νόσο CBD, τα ινίδια είναι μικρότερα σε μήκος από αυτά στο AD και παρουσιάζουν περιοδική συστροφή 169 έως 202 nm, δηλαδή διπλάσια του AD (Ksiezak-Reding et al., 1994). Ο πυρήνας των ινιδίων στη νόσο CBD περιλαμβάνει τα υπολείμματα K274-E380 της πρωτεΐνης Τ, τα οποία καλύπτουν το τελικό τμήμα της R1 επαναλαμβανόμενης περιοχής, ολόκληρες τις R2, R3 και R4 περιοχές και 12 αμινοξέα μετά την R4 περιοχή **(Εικόνα 16)**. Ουσιαστικά με αυτό τον τρόπο η πρωτεΐνη υιοθετεί μια πτυχή τεσσάρων στρωμάτων, που ονομάζεται πτυχή CBD (W. Zhang et al., 2020).



Εικόνα 16. Δομή ινιδίων της πρωτείνης Τ στη νόσο CBD και στη νοσο του AD. Η νόσος CBD αποτελεί μια 4R Τ- πρωτεϊνοπάθεια και τα ινίδια υιοθετούν μια πτυχή ουσιαστικά τεσσάρων στρωμάτων. Η νόσος του Alzheimer αποτελεί 3R+4R Τ- πρωτεϊνοπάθεια με χαρακτηριστική δομή ζευγαρωμένων ελικοειδών ινιδίων. Εικόνα από (W. Zhang et al., 2020).

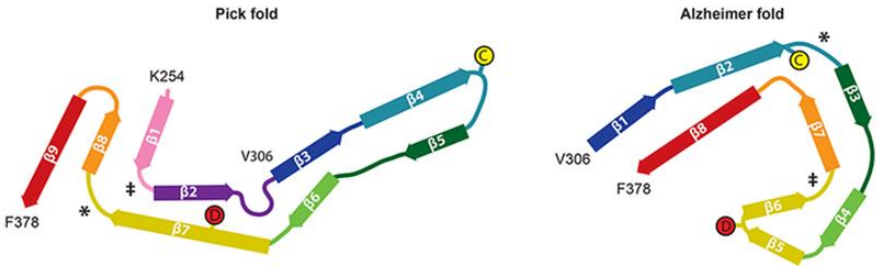
4.4. Προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (PSP)

Η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (PSP) είναι μια ασυνήθης νευρολογική διαταραχή μορφής άτυπου παρκινσονισμού, η οποία μπορεί να επηρεάσει την κίνηση, το βάδισμα, την ισορροπία, την ομιλία, την όραση, τις κινήσεις των ματιών, τη συμπεριφορά και τη γνωστική λειτουργία. Τα συμπτώματα εμφανίζονται

συνήθως μετά τα 60 έτη και παρουσιάζουν βραδέως επιδεινούμενη πορεία (Steele, Richardson, & Olszewski, 1964). Η ακριβής αιτία της νόσου PSP είναι άγνωστη, ωστόσο η προχωρημένη ηλικία και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες αποτελούν θεωρητικά αίτια (Golbe, Davis, Schoenberg, & Duvoisin, 1988); (Golbe et al., 1996); (Litvan et al., 2016). Η νευροπαθολογία της χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρώνων και γλοιακών κυττάρων και το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημά της είναι η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ απουσία εναποθέσεων β-αμυλοειδούς. Τα συσσωματώματά της συνίστανται σε 4R ισομορφές (Tomonaga, 1977); (Dickson, 1999). Η εκφύλιση ξεκινάει από τον φλοιό, επηρεάζοντας το εγκεφαλικό στέλεχος και την παρεγκεφαλίδα και έπειτα εξαπλώνεται στον ανώτερο εγκέφαλο, τον κροταφικό και μετωπιαίο φλοιό (Steele et al., 1964); (Hauw et al., 1990).

4.5. Νόσος του Pick

Η νόσος του Pick είναι μια σπάνια νευροεκφυλιστική ασθένεια που προκαλεί την προοδευτική άνοια. Εμφανίζεται σε ηλικίες κάτω των 60 ετών και τα αρχικά συμπτώματα της νόσου είναι η απραξία και αφασία και μετέπειτα αλλαγές στη συμπεριφορά, διαταραχή του λόγου και τέλος γνωσιακά προβλήματα. Η μετωποκροταφική άνοια οφείλεται στον εκφυλισμό των νευρώνων του μετωπιαίου και του κροταφικού λοβού. Επίσης, παρουσιάζεται απώλεια των γλοιακών κυττάρων και παρουσία διογκωμένων νευρώνων. Κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα αποτελεί η δημιουργία εγκλείστων, τα οποία ονομάζονται σωμάτια Pick που αποτελούνται από ευθύγραμμα αλλά και ελικοειδή ινίδια της πρωτεΐνης Τ σε τυχαία διάταξη (Delacourte et al., 1996). Αποτελούνται από τα αμινοξέα K254-F378 των 3R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ **(Εικόνα 17)**, τα οποία διπλώνονται διαφορετικά σε σύγκριση με τα ινίδια που συναντώνται στη νόσο AD (Falcon et al., 2018). Σχεδόν όλες οι πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων σε αυτή την περιοχή έχουν τον ίδιο προσανατολισμό με εξαίρεση τα αμινοξέα C322 και D348, τα οποία δημιουργούν αντίστροφες κατευθύνσεις. Η πλευρική αλυσίδα του C322 βρίσκεται στο εσωτερικό στα ινίδια που συναντώνται στη νόσο AD, ενώ προς την διαλυτή περιοχή στα ινίδια που συναντώνται στη νόσο του Pick και αντίστροφα η πλευρική αλυσίδα του D348, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη στροφή των ινιδίων σαν φουρκέτα **(Εικόνα 17)**. Τα ινίδια στη νόσο του Pick και στη νόσο του AD έχουν παρόμοια δευτεροταγή δομή, ωστόσο οι διαφορετικές διαμορφώσεις των στροφών που δημιουργούνται οδηγεί σε διακριτή διαμόρφωση των β-πτυχωτών φύλλων (Falcon et al., 2018).



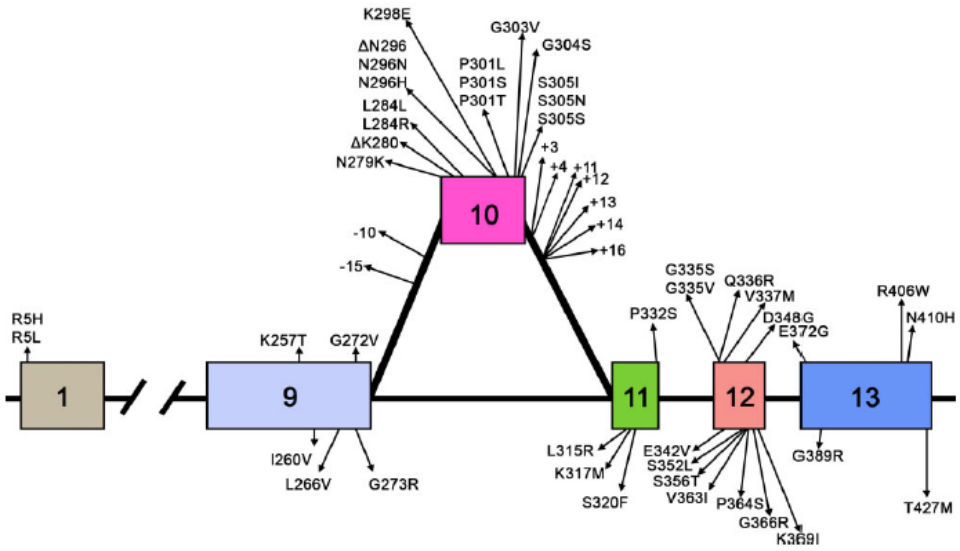
Εικόνα 17. Δομή ινιδίων της πρωτείνης Τ στη νόσο του Pick και στη νοσο του AD. Σχηματική αναπαράσταση των δευτεροταγών δομών των ινιδίων στη νόσο του Pick και τη νόσο του AD. Οι πλευρικές θέσεις των C322 και D348 παρουσιάζονται αντίστροφα μεταξύ των δύο αυτών νόσων. Εικόνα από (Falcon et al., 2018)

4.6. Μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό σχετιζόμενη με το χρωμόσωμα 17 (FTDP-17)

Μια σειρά από μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στο γενετικό τόπο 17q21.2 (Wilhelmsen, 1997) του γονιδίου τ βρέθηκε ότι σχετίζονται με την οικογενή μετωποκροταφική άνοια και για το λόγο αυτό καθιερώθηκε η ονομασία μετωποκροταφική άνοια με παρκινσονισμό σχετιζόμενη με το χρωμόσωμα 17 (FTDP-17) (Hutton et al., 1998); (Poorkaj et al., 1998); (Spillantini et al., 1998).

4.6.1. Μεταλλάξεις του γονιδίου τ που σχετίζονται με τη νόσο FTDP-17

Συνολικά έχουν εντοπιστεί εξήντα μεταλλάξεις που αφορούν το FTDP-17 **(Εικόνα 18)**, οι οποίες είναι συγκεντρωμένες στα εξώνια 9-13 (που κωδικοποιούν για τις επαναλαμβανόμενες περιοχές R1-R4) και στο εσώνιο 10. Ουσιαστικά κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες, αυτές που επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα του εξωνίου 10 και αυτές που επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης Τ στους μικροσωληνίσκους (Hasegawa, Smith, & Goedert, 1998); (Goedert & Jakes, 2005).



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων του γονιδίου τ. Συνολικά 60 μεταλλάξεις, οι οποίες είναι συγκεντρωμένες στα εξώνια 9-13 και στο εσώνιο 10 έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με τη νόσο FTDP-17. Εικόνα από (Ghetti et al., 2015).

Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα έχουν ως αποτέλεσμα να επηρεάζουν την αναλογία των ισομορφών 3R και 4R, με άμεση συνέπεια την αύξηση των επιπέδων των 4R ισομορφών και τη συσσωμάτωσή τους σε ινίδια (Hutton et al., 1998); (Spillantini et al., 1998); (Nacharaju et al., 1999). Μια μόνο μετάλλαξη έχει αναφερθεί ότι προκαλεί την αυξημένη έκφραση των 3R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ και τη μετέπειτα συσσωμάτωσή τους σε ινίδια, η μετάλλαξη ΔΚ280 (Tuerde et al., 2018). Ανάλογα με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο τ προκύπτουν ινίδια διαφορετικής μορφολογίας (Ghetti et al., 2015). Οι μεταλλάξεις V337M και R406W δίνουν γένεση σε ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) και σε ευθύγραμμα ινίδια (SFs). Ανάλυση εγκεφάλων ασθενών με μεταλλάξεις στα εξώνια 9-13 (μεταλλάξεις K257T, L266V, S305N, G272V, L315R, S320F, S320Y, P332S, Q336H, Q336R, K369I, E372G και G389R) δείχνουν ότι περιέχουν συσσωματώματα κυρίως των 3R ισομορφών με χαρακτηριστική μορφολογία σωματίων Pick. Άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα και έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή των ισομορφών 4R της πρωτεΐνης Τ είναι οι μεταλλάξεις N279K, L284L, L284R, N296, N296D, N296H, N296N, S305L, S205N και S305S καθώς και οι μεταλλάξεις P301L και P301S που βρίσκονται στο εξώνιο 10. Ενώ μεταλλάξεις που βρίσκονται εκτός του εξωνίου 10, όπως οι μεταλλάξεις I260V (εξώνιο 9), K317N (εξώνιο 11), E342V (εξώνιο 12) και N410H (εξώνιο 13) επίσης μπορούν να επηρεάσουν την αναλογία 3R και 4R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ.

Τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων στο γονίδιο τ μπορεί να ποικίλλουν. Γειτονικές μεταλλάξεις για παράδειγμα στο εξώνιο 12 (G335S, G335V, Q336H, Q336R και

V337M) έχουν δομικά διακριτά συσσωματώματα και έχουν διαφορετικά λειτουργικά αποτελέσματα. Η μετάλλαξη G335S χαρακτηρίζεται από αφθονία συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ σε ινίδια στα νευρικά κύτταρα απουσία σωματίων Pick (Spina et al., 2007), οι μεταλλάξεις Q336H και Q336R δίνουν γένεση σε σωμάτια Pick (Pickering-Brown et al., 2004); (Tacik et al., 2015), ενώ η μετάλλαξη V337M παράγει συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ παρόμοια με αυτά που συναντώνται στη νόσο AD (Poorkaj et al., 1998); (Spillantini, Crowther, & Goedert, 1996). Με χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Τ για τις μεταλλάξεις G335S, G335V (Neumann et al., 2005) ή για τη μετάλλαξη V337M έχει δειχθεί η μειωμένη ικανότητα σταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων. Σε αντίθεση οι μεταλλάξεις Q336H και Q336R φαίνεται να αυξάνουν την ικανότητα της πρωτεΐνης Τ για την προώθηση της συναρμολόγησης των μικροσωληνίσκων. Οι μεταλλάξεις G335V και V337M μειώνουν τη συγκρότηση σε ινίδια που προκαλείται από την ηπαρίνη, ενώ οι μεταλλάξεις Q336H και Q336R αυξάνουν την συναρμολόγηση με τις 3R ισομορφές και όχι με τις 4R.

4.6.2. Νευροπαθολογία και κλινική εικόνα των FTDP-17 ασθενειών

Η νόσος FTDP-17 επηρεάζει εξίσου τους άνδρες και τις γυναίκες και η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι τα 49 έτη. Το μέσο όρο προσδόκιμου ζωής είναι 8,5 χρόνια μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (Reed, Wszolek, & Hutton, 2001). Η κλινική εικόνα ασθενών με την ίδια μετάλλαξη στο γονίδιο τ μπορεί να ποικίλλει σημαντικά καθώς και μεταξύ ατόμων με διαφορετικές μεταλλάξεις. Πιθανόν, διάφοροι γενετικοί τροποποιητές ή περιβαλλοντικοί παράγοντες να αποτελούν τη βάση αυτής της διαφορικής φαινοτυπικής μεταβλητότητας (Wszolek et al., 2003); (Bugiani et al., 1999); (Forman, 2004). Τα κύρια γενικά κλινικά χαρακτηριστικά αφορούν αλλαγές στη συμπεριφορά, διαταραχή της προσωπικότητας, κινητικές δυσλειτουργίες (παρκινσονισμό) και γνωσιακά ελλείμματα.

Στους ασθενείς με FTDP-17 παρουσιάζεται οξεία απώλεια νευρώνων στους μετωπιαίους λοβούς και γλοιακών κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις στην φαιά και τη λευκή ουσία. Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία υπερ-φωσφορυλιωμένων ινιδίων πρωτεΐνης Τ (Goedert, Crowther, & Spillantini, 1998). Η μορφολογία των ινιδίων καθορίζεται από το είδος της μετάλλαξης, καθότι αυτές επηρεάζουν είτε την συρραφή του εξωνίου 10 με αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική αναλογία των 3R και 4R ισομορφών είτε τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Οι γνωστές μεταλλάξεις του γονιδίου τ που προκαλούν τη νόσο FTDP-17 δεν φαίνεται να επηρεάζουν άμεσα τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης, ωστόσο υπάρχουν κάποια στοιχεία που δείχνουν ότι μπορεί να οδηγήσουν έμμεσα στην αυξημένη φωσφορυλίωση και στον επακόλουθο σχηματισμό συσσωματωμάτων (Alonso Adel et al., 2004). Συνήθως, χαρακτηρίζονται είτε από ευθεία ινίδια είτε από ινίδια

ευρείας περιστροφής με μορφή κορδέλας ή ζευγαρωμένα ελικοειδή ινίδια (Spillantini et al., 1997).

4.7. Πολυμορφισμοί γονιδίου τ

Μέχρις στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί δύο διαφορετικοί απλότυποι (H1 και H2) στο γονίδιο τ, οι οποίοι αποτελούνται από 8 κοινούς πολυμορφισμούς που αφορούν σε μονά ζεύγη βάσεων. Ο απλότυπος H1 είναι ο πιο κοινός και φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τις νόσους PSP, CBD, νόσο του Parkinson (PD) και την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) αλλά όχι για την νόσο του Pick (Baker et al., 1999); (Conrad et al., 1997); (H. R. Morris et al., 2002); (Pastor et al., 2000); (C. C. Zhang et al., 2017). Η συσχέτιση του γονιδίου με PD και ALS προκαλεί ιδιαίτερη έκπληξη καθότι δεν χαρακτηρίζονται από συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ.

Άμεση συνέπεια αυτών των πολυμορφισμών φαίνεται να είναι η εμπλοκή τους στη συρραφή του εξωνίου 10, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή των 4R ισομορφών (Hutton, 2000). Ο απλότυπος H1 εκφράζει περισσότερο mRNA που περιέχει το εξώνιο 10 από τον απλότυπο H2, ειδικά στις υποφλοιώδεις περιοχές (Caffrey et al., 2006); (Kwok et al., 2004). Οι γνωστές μεταλλάξεις μέχρις στιγμής δεν φαίνεται να συσχετίζονται με τη νόσο του Alzheimer, αν και υπάρχουν κάποιες έρευνες που συσχετίζουν την A152T με τις νόσους AD, PSP, CBD και κάποιες άλλες από τις σπάνιες Τ- πρωτεϊνοπάθειες (Coppola et al., 2012); (Kara et al., 2012); (Kovacs et al., 2011); (Pastor et al., 2016), ωστόσο τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα.

5. Ο οργανισμός μοντέλο *Drosophila melanogaster*

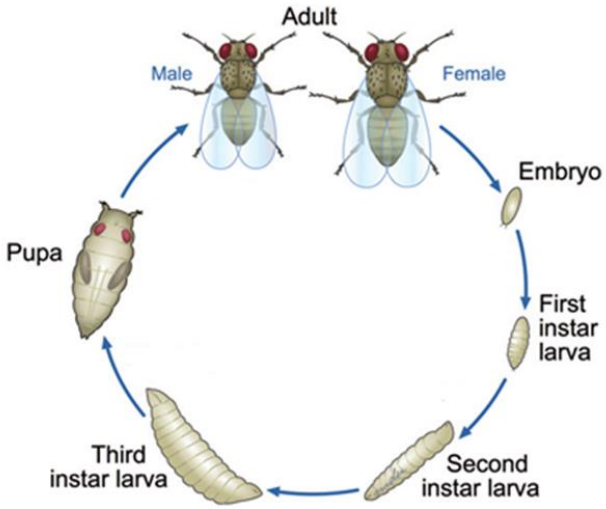
Η *Drosophila melanogaster* αποτελεί άριστο πειραματικό μοντέλο για την in vivo μελέτη μοριακών και κυτταρικών διεργασιών καθώς και για τη διερεύνηση μηχανισμών που διέπουν τη νευρωνική λειτουργία/ δυσλειτουργία, συμπεριλαμβανομένων και χαρακτηριστικών γνωσιακών διαταραχών, ανοιών και νευροεκφυλιστικών νόσων (Bilen & Bonini, 2005); (Marsh & Thompson, 2006). Κύρια χαρακτηριστικά του μοντέλου αυτού αποτελούν η εξαιρετική κλασική και μοριακή γενετική που μπορεί να εφαρμοστεί, το αποκωδικοποιημένο γένωμα και η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων. Σε σχέση με το ποντίκι έχει μικρό κόστος και μικρό κύκλο ζωής **(Εικόνα 19)**. Επιπλέον, ένα ακόμα χαρακτηριστικό της *D. melanogaster* είναι η υψηλή διατήρηση και ομολογία πρωτεϊνών που παρατηρείται με τα θηλαστικά.

Ο οργανισμός *D. melanogaster* χρησιμοποιείται ευρέως τις τελευταίες δεκαετίες ως μοντέλο για τη μελέτη διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Marsh & Thompson, 2006). Η οργάνωση της δομής των νευρώνων του εγκεφάλου της μύγας είναι παρόμοια με τα θηλαστικά εξυπηρετώντας όλες τις σημαντικές λειτουργίες, όπως την όσφρηση, την όραση, την κίνηση και φυσικά τη συμπεριφορική πλαστικότητα. Έχουν δημιουργηθεί εξαιρετικά γενετικά εργαλεία, όπου επιτρέπουν τη μελέτη της δυσλειτουργίας διαφόρων παθολογικών πρωτεϊνών με ιστοειδικό και χρονοειδικό τρόπο (Brand & Perrimon, 1993); (Brand & Dormand, 1995) καθώς και διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως η αποσιώπηση ενδογενών γονιδίων με χρήση RNAi (RNA interference) ή μέσω μετάλλαξής τους. Συνεπώς, οι διαδικασίες του νευροεκφυλισμού μπορούν να μελετηθούν τόσο στο περιφερικό νευρικό σύστημα όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η έκφραση πρωτεϊνών αγρίου τύπου ή πρωτεϊνών συνδεδεμένων με ανθρώπινες ασθένειες έχει βοηθήσει στην εξερεύνηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών της φυσιολογικής και παθολογικής λειτουργίας τους. Σε νόσους όπως το Huntington (Jackson et al., 1998), το Parkinson (Feany & Bender, 2000) ή σε αταξίες όπως η SCA1 (Chen et al., 2003), το μοντέλο της Drosophila έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο για την παθοβιολογία των νόσων αυτών. Επιπλέον, η χρήση της Drosophila για τη μελέτη συσσώρευσης των Αβ40 ή Αβ42 πεπτιδίων ή της πρωτεΐνης Τ έχει αναδείξει σημαντικές πτυχές της νόσου του Alzheimer (Iijima-Ando & Iijima, 2010); (Khurana, 2008) καθώς και για την ανάδειξη φαρμακευτικών προσεγγίσεων για τη βελτίωση της τοξικότητας και του εκφυλισμού (Newman, Sinadinos, Johnston, Sealey, & Mudher, 2011). Επιπλέον, η *D. melanogaster* ως μοντέλο έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό των μηχανισμών μάθησης και μνήμης (Heisenberg, 2003); (Pitman et al., 2009) με χρήση διαφόρων μεταλλαγμάτων που εμπλέκονται σε αυτές τις διεργασίες (Skoulakis & Grammenoudi, 2006). Η μελέτη των επιπτώσεων σε κινητικές αλλά και σε συμπεριφορικές λειτουργίες (π.χ. οσφρητική μάθηση και μνήμη) είναι σημαντική καθότι αυτές οι λειτουργίες αποτελούν χαρακτηριστικά συμπτώματα των νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

5.1. Κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster*

Η *D. melanogaster* έχει μικρό κύκλο ζωής, περίπου 9-10 ημέρες στους 25^{o}C, ωστόσο ποικίλλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία **(Εικόνα 19).** Τα μεταμερή στη *D. melanogaster*, όπως και στα περισσότερα έντομα, συντήκονται σχηματίζοντας τρία διακριτά τάγματα, το κεφάλι, το θώρακα και τη κοιλιά. Η *D. melanogaster* ανήκει στην κατηγορία των ολομετάβολων εντόμων, με κύριο χαρακτηριστικό τους το φαινόμενο της μεταμόρφωσης, το οποίο συμβαίνει μέσα στο περίβλημά τους. Ο κύκλος ζωής διακρίνεται σε τέσσερα στάδια. Απαιτείται περίπου μια ημέρα ώστε να ολοκληρωθεί η εμβρυική ανάπτυξη με την

εκκόλαψη της προνύμφης πρώτου σταδίου (first instar larva). Κατά την πρώτη έκδυση, η προνύμφη αποβάλλει το χιτινώδες περίβλημά της και ονομάζεται προνύμφη δευτέρου σταδίου (second instar larva). Μετά από ακόμη μία έκδυση του περιβλήματος έχουμε και τη μετατροπή της σε προνύμφη τρίτου σταδίου (third instar larva). Η προνύμφη τρίτου σταδίου ακινητοποιείται και εκκρίνει ένα σκληρό και ανθεκτικό χιτινώδες περίβλημα (puparium) και μετατρέπεται σε νύμφη (pupa). Μέχρι το στάδιο αυτό απαιτούνται περίπου 7 ημέρες από την στιγμή της γονιμοποίησης. Στη φάση της νύμφης συντελείται το φαινόμενο της μεταμόρφωσης μέσα στο χιτινώδες περίβλημα όπου και διαφοροποιούνται τα κύτταρα ώστε να προκύψουν οι ανάλογες δομές του ώριμου ενηλίκου.

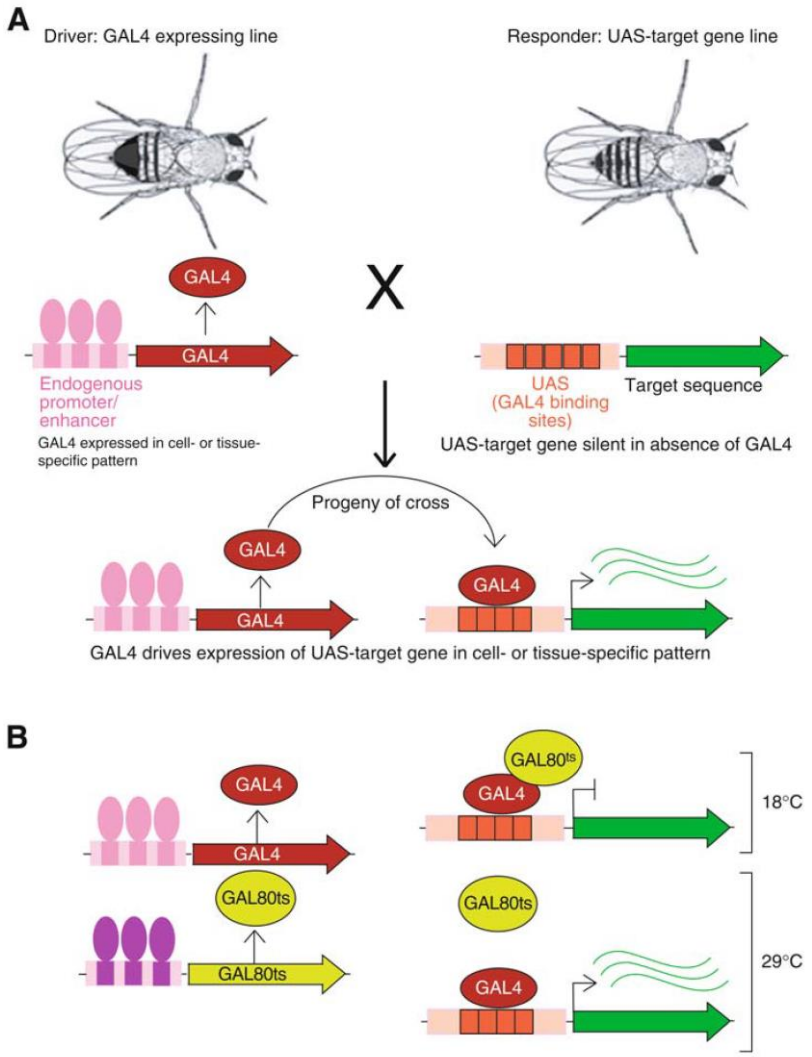


Εικόνα 19. Κύκλος ζωής της Drosophila melanogaster. Αλληλουχία των σταδίων ανάπτυξης της Drosophila melanogaster από το αυγό έως το ενήλικο άτομο.

Δυο βασικοί τύποι κυττάρων διακρίνονται κατά τη διάρκεια των σταδίων προνύμφης, τα διαφοροποιημένα κύτταρα και τα κύτταρα συγκρότησης του σώματος των ενήλικων ατόμων. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα είναι το σύνολο των κυττάρων που εξυπηρετούν τις φυσιολογικές λειτουργίες της προνύμφης και καταστρέφονται βαθμιαία κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης. Η δεύτερη κατηγορία κυττάρων αποτελεί συγκεκριμένες ομάδες κυττάρων, τα οποία παραμένουν αδιαφοροποίητα στη διάρκεια των τριών προνυμφικών σταδίων και από τα οποία θα προκύψουν μετέπειτα οι ιστοί των ενήλικων ατόμων και στη πλειοψηφία τους απαντώνται στους 19 συνολικά δίσκους των ενηλίκων.

5.2. Σύστημα έκφρασης διαγονιδίων GAL4/UAS

Ένα από τα σημαντικότερα επιτεύγματα στον τομέα των τεχνικών έκφρασης διαγονιδίων αποτέλεσε το δυαδικό σύστημα έκφρασης διαγονιδίων GAL4/UAS(Brand & Perrimon, 1993). Με τη μέθοδο αυτή καθίσταται εφικτός ο ακριβής χωρικός και χρονικός έλεγχος της έκφρασης οποιουδήποτε διαγονιδίου. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει τον μεταγραφικό παράγοντα του σακχαρομύκητα GAL4 και την αλληλουχία πρόσδεσης του, UAS, τα οποία δεν εκφράζονται στους ανώτερους οργανισμούς **(Εικόνα 20α)**. Για τη δημιουργία της διαγονιδιακής σειράς, ουσιαστικά χρησιμοποιείται ένας πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης στον οποίο ο ιστοειδικός υποκινητής του γονιδίου ενδιαφέροντος κατευθύνει την έκφραση του γονιδίου του GAL4 (σειρά- οδηγός, driver). Για την έκφραση του γονιδίου-μάρτυρα χρησιμοποιείται μια δεύτερη πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει την UAS αλληλουχία για την πρόσδεση του GAL4, τοποθετημένη μπροστά από το κατευθυνόμενο γονίδιο (σειρά απόκρισης, responder). Συνεπώς, η πρώτη σειρά είναι υπεύθυνη για την έκφραση του GAL4 μεταγραφικού παράγοντα μόνο στον ιστό του ενδιαφέροντος βάσει του ειδικού υποκινητή. Στη δεύτερη πλασμιδιακή σειρά κάθε κύτταρο φέρει την αλληλουχία UAS, ωστόσο δεν μπορεί να εκφραστεί το διαγονίδιο λόγω απουσίας του ενδογενούς GAL4 μεταγραφικού παράγοντα. Η διασταύρωση των δυο παραπάνω σειρών δίνει απογόνους που εκφράζουν το διαγονίδιο μόνο στους ιστούς που εκφράζουν το GAL4, όπως καθορίζεται από τον ιστοειδικό υποκινητή. Το μεγάλο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου συστήματος είναι ότι μπορεί να διασταυρωθεί η UAS σειρά απόκριση με πολλές σειρές-οδηγούς που επάγουν την έκφραση σε διαφορετικούς ιστούς, με αποτέλεσμα να μπορούν εύκολα να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα με χωρικό τρόπο. Πλέον υπάρχουν εκατοντάδες διαφορετικοί οδηγοί και UAS σειρές απόκρισης που είναι εύκολα διαθέσιμα.



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος έκφρασης GAL4/UAS και του συστήματος TARGET. Α) Συστημα GAL4/UAS: μια διαγονιδιακή σειρά-οδηγός φέρει το μεταγραφικό παράγοντα του σακχαρομύκητα GAL4 υπό τον έλεγχο ενός ιστοειδικού υποκινητή. Μια δεύτερη σειρά απόκρισης φέρει τη UAS αλληλουχία πρόσδεσης του GAL4, τοποθετημένη μπροστά από το διαγονίδιο ενδιαφέροντος. Η διασταύρωση των δυο παραπάνω σειρών δίνει απογόνους που εκφράζουν το διαγονίδιο κατά ιστοειδικό τρόπο. Β) Σύστημα TARGET: η σειρά οδηγός περιέχει τη θερμοευαίσθητη πρωτείνη GAL80^{ts}, η οποία σε χαμηλή θερμοκρασία (18^{o}C) δεσμεύει το GAL4 αποτρέποντας την έκφραση του διαγονιδίου. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (29^{o}C) το GAL80^{ts} απενεργοποιείται και συνεπώς το GAL4 μπορεί να δεσμευτεί και να επάγει την έκφραση του διαγονιδίου. Εικόνα από (Elliott & Brand, 2008)

5.3. Επαγόμενο σύστημα έκφρασης TARGET

Το μεγάλο μειονέκτημα του δυαδικού συστήματος έκφρασης διαγονιδίων GAL4/UAS είναι ο χρονικός έλεγχος έκφρασης του διαγονιδίου, καθότι ένα σύνηθες πρόβλημα της έκφρασης είναι η θνησιμότητα πριν από το αναπτυξιακό στάδιο που μας ενδιαφέρει και οι αναπτυξιακές ανωμαλίες που μπορεί να παρατηρούνται και

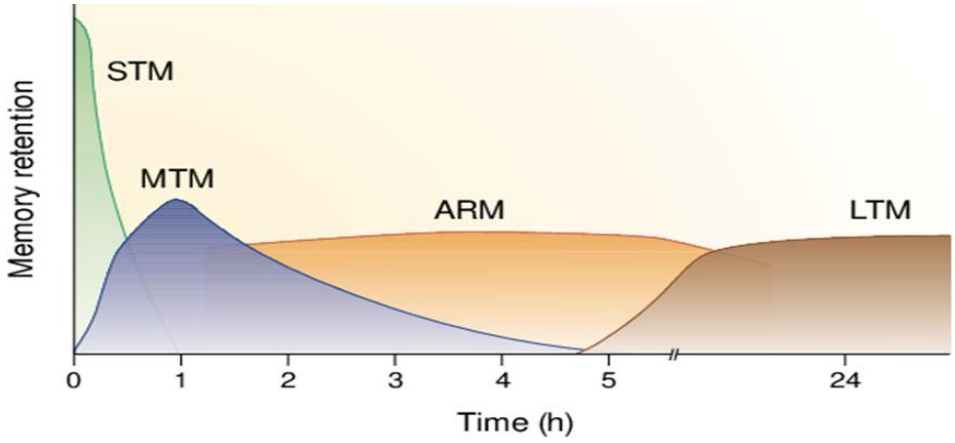
δημιουργούν πρόβλημα ιδιαίτερα στις συμπεριφορικές αναλύσεις. Προκειμένου να δοθεί λύση στο παραπάνω ζήτημα χρησιμοποιήθηκε μια θερμοευαίσθητη μεταλλαγή της πρωτεΐνης GAL80 ($GAL80^{ts}$), το γονίδιο της οποίας εκφράζεται σε όλους τους ιστούς υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της τουμπουλίνης. Στους 19^{o}C, η θερμοευαίσθητη $GAL80^{ts}$ εκφράζεται και προσδένεται στον GAL4 μεταγραφικό παράγοντα, καταστέλλοντας τη δραστηριότητά του και συνεπώς εμποδίζεται η έκφραση του UAS διαγονιδίου **(Εικόνα 20b)**. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 30^{o}C έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του $GAL80^{ts}$ και συνεπώς ο GAL4 μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να δεσμευτεί και να επάγει ελεύθερα την έκφραση του διαγονιδίου. Το σύστημα αυτό έχει ονομαστεί TARGET (Temporal And Regional Gene Expression Targeting).

5.4. Η μάθηση και μνήμη στη Drosophila melanogaster

5.4.1. Διάκριση φάσεων μνήμης στη *D. melanogaster*

Μάθηση είναι η διαδικασία μέσω της οποίας αποκτώνται οι γνώσεις για τον κόσμο και απαιτεί να λάβει χώρα ένας συνειρμός κατά τη διάρκεια της εμπειρίας που μαθαίνεται. Μνήμη είναι η ικανότητα του εγκεφάλου να επιτυγχάνει την κωδικοποίηση νέων πληροφοριών μέσα από τις διάφορες εμπειρίες, να διατηρεί/αποθηκεύει ήδη μαθημένες πληροφορίες με τέτοιο τρόπο ώστε να ενδυναμώνεται ή να καταστέλλεται με το χρόνο και να ανακαλεί προηγούμενες εμπειρίες.

Στη *D. melanogaster* έχουν αναγνωριστεί διαφορετικές φάσεις μνήμης **(Εικόνα 21)**. Η μάθηση, η οποία πολλές φορές αναφέρεται ως άμεση μνήμη (Immediate Memory) και διαρκεί μερικά λεπτά αποτελεί τη συντομότερη μέτρηση της απόδοσης μετά την εκπαίδευση. Η βραχυπρόθεσμη μνήμη (Short Term Memory, STM) έχει διάρκεια μικρότερη της μιας ώρας και είναι ανεξάρτητη της μεταγραφής και μετάφρασης νέων πρωτεϊνών. Επιπλέον, υπάρχουν τρία ακόμα είδη εμπεδωμένης μνήμης (consolidated memory). Η μεσοπρόθεσμη μνήμη (Middle Term Memory, MTM), η οποία διαρκεί μέχρι και τέσσερις ώρες μετά την εκπαίδευση, και απαιτεί νέα πρωτεϊνοσύνθεση από προϋπάρχοντα μηνύματα. Ακόμη υπάρχει η ανθεκτική στην αναισθησία μνήμη (Anesthesia Resistant Memory, ARM), η οποία διαρκεί έως 24 ώρες και είναι ανεξάρτητη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Και τέλος διακρίνεται η μακροπρόθεσμη μνήμη (Long Term Memory, LTM), η οποία διαρκεί από 24 ώρες έως εβδομάδες και απαιτεί de novo μεταγραφή και μετάφραση (Tully et al., 1994).



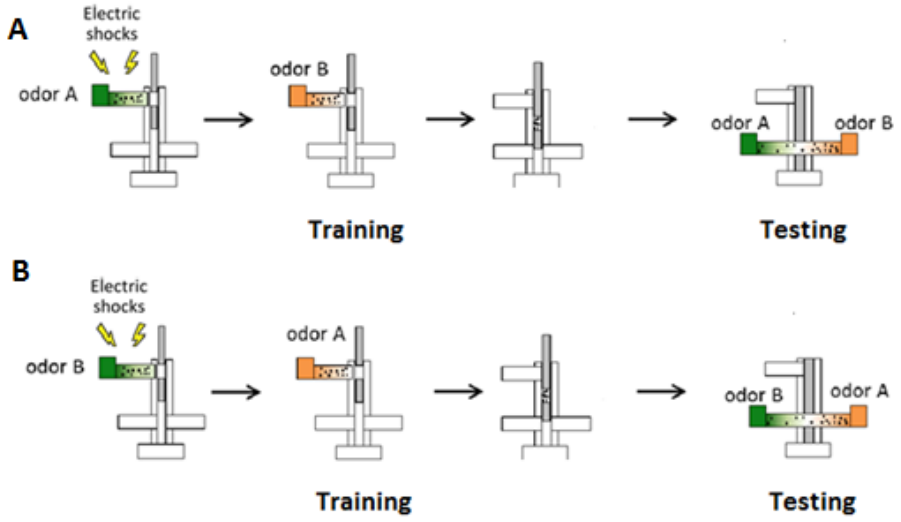
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών τύπων μνήμης στη D.melanogaster. Η βραχυπρόθεσμη μνήμη (STM) διαρκεί έως μια ώρα, η μεσοπρόθεσμη μνήμη (MTM) έχει διάρκεια έως 4 ώρες, η ανθεκτική στην αναισθησία μνήμη (ARM) με διάρκεια έως 24 ώρες ενώ η μακροπρόθεσμη μνήμη (LTM) μπορεί να διαρκέσει έως και εβδομάδες. Εικόνα από (Heisenberg, 2003).

Η μνήμη μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο μορφές, την έκδηλη και την άδηλη μνήμη. Έκδηλη μνήμη είναι η αποθήκευση πληροφοριών που αφορούν άτομα, θέσεις και πράγματα προσιτά στη συνείδηση, ενώ η άδηλη μνήμη είναι η αποθήκευση μη συνειδητά ανακαλούμενων στη μνήμη πληροφοριών και αφορούν συνήθως συνήθειες, κινητικές ή αντιληπτικές ικανότητες. Η έκδηλη μνήμη φαίνεται να χαρακτηρίζει τον άνθρωπο και κάποια ανώτερα ζώα, αλλά δεν είναι προφανής σε οργανισμούς μοντέλα τουλάχιστον ως σήμερα. Η άδηλη μνήμη διακρίνεται περαιτέρω στη συνειρμική και μη συνειρμική. Στη συνειρμική μάθηση έχουμε την συντελεστική εξαρτημένη μάθηση που περιλαμβάνει τη σύζευξη δυο ερεθισμάτων, ενώ στη μη συνειρμική μάθηση αρκεί η έκθεση του ατόμου μια φορά ή κατ' επανάληψη σε κάποιο ερέθισμα.

5.4.2. Δοκιμασία οσφρητικής μάθησης και μνήμης στη *D. melanogaster*

Η *D. melanogaster* αποτελεί άριστο μοντέλο για τη μελέτη της μάθησης και της μνήμης. Είναι ικανή να μάθει μια πληθώρα θετικών ή αρνητικών συσχετιζόμενων συνειρμικών ή μη συνειρμικών δοκιμασιών που χρησιμοποιούν οπτικά, οσφρητικά και απτικά ερεθίσματα. Αρχικά αναπτύχθηκε μια δοκιμασία αρνητικά συσχετισμένης ενεργά εξαρτημένης μάθησης (QHB paradigm), κατά την οποία οι μύγες μαθαίνουν να αποφεύγουν επιλεκτικά μια από τις δύο οσμές, η οποία συνοδεύεται με ηλεκτροσόκ (Quinn, Harris, & Benzer, 1974). Αργότερα όμως αναπτύχθηκε μια πιο εξελιγμένη δοκιμασία, αυτή της παβλοβιανής αρνητικής οσφρητικής μάθησης (Tully & Quinn, 1985) συνδυάζοντας απωθητικές οσμές ως

εξαρτημένο ερέθισμα (conditioned stimulus/CS) ταυτόχρονα με ηλεκτροσόκ, το οποίο αποτελεί το ανεξάρτητο ερέθισμα (unconditioned stimulus/US) **(Εικόνα 22)**. Ως ενίσχυση του ερεθίσματος χρησιμοποιείται η δεύτερη οσμή χωρίς τη παρουσία του ηλεκτροσόκ. Για τον καθορισμό της μνήμης πραγματοποιούνται πολλοί κύκλοι εκπαίδευσης εν συνεχεία (καθορισμός της ARM μνήμης) ή με μια περίοδο αδράνειας 15 λεπτών μεταξύ των κύκλων (καθορισμός της LTM μνήμης).



Εικόνα 22. Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της παβλοβιανής αρνητικής οσφρητικής μάθησης στη *D. melanogaster*. Για την εκπαίδευση (training), οι μύγες τοποθετούνται σε σωλήνα επενδεδυμένο με ηλεκτροφόρο πλέγμα και εκτίθενται στην πρώτη οσμή (odor A) σε συνδυασμό με επαναλαμβανόμενα ηλεκτρικά σοκ. Ακολούθως, οι μύγες εκτίθενται σε αέρα και στη συνέχεια στη δεύτερη οσμή (odor B) χωρίς ηλεκτρικά σοκ. Δυο ομάδες μυγών του ιδίου γονοτύπου εκπαιδεύονται ταυτόχρονα με τρόπο που η μία ομάδα να αποφεύγει την οσμή A **(A)** και η άλλη ομάδα να αποφεύγει την οσμή B **(B)**, ενώ η αντίθετη οσμή χρησιμοποιείται κάθε φορά ως οσμή ελέγχου. Τέλος, οι μύγες αφήνονται στη συσκευή Τ-λαβυρίνθου για να επιλέξουν μεταξύ των δύο οσμών χωρίς κανένα ηλεκτρικό σοκ (testing).

Η απόδοση των ζώων (μάθηση) υπολογίζεται με βάση τον δείκτη απόδοσης (Performance Index, PI), ο οποίος ισούται με το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν τη συνδεδεμένη με το ηλεκτρικό σοκ οσμή (CS+) μείον το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν την οσμή ελέγχου (CS-) διαιρούμενο προς τον συνολικό αριθμό των μυγών. Ο τελικός δείκτης απόδοσης υπολογίζεται ως το μέσο όρο των δυο ήμισυ λόγων για κάθε μια από τις ομάδες των ζώων που εκπαιδεύονται στα συμπληρωματικά ερεθίσματα και κυμαίνεται από 0 έως 100.

$$\text{Performance index (PI)} = \frac{(\#\ CS^- \text{ flies} - \#\ CS^+ \text{ flies})}{(\#\ \text{total flies})} \quad (\times 100)$$

5.5. Η *Drosophila melanogaster* ως μοντέλο για τη μελέτη των Τ-πρωτεϊνοπαθειών.

Η *D. melanogaster* έχει παράσχει ως μοντέλο σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεΐνη Τ προκαλεί τοξικότητα και εκφυλισμό στα νευρωνικά κύτταρα. Με στόχο τη δημιουργία ενός μοντέλου των Τ-πρωτεϊνοπαθειών κατάλληλο για γενετική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε αρχικώς το σύστημα UAS/GAL4 για επαγωγή της ιστοειδικής έκφρασης της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα (Wittmann et al., 2001). Οι μύγες αυτές ανέπτυξαν διάφορα χαρακτηριστικά των κοινών Τ-πρωτεϊνοπαθειών, όπως η αύξηση της θνησιμότητας. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν δημιουργηθεί πολλές διαφορετικές διαγονιδιακές μύγες που εκφράζουν είτε την ανθρώπινη πρωτεΐνη Τ αγρίου τύπου είτε μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Τ.

Με χρήση του συστήματος UAS/GAL4 έχουν μελετηθεί οι επιπτώσεις έκφρασης της πρωτεΐνης Τ σε συγκεκριμένους νευρωνικούς πληθυσμούς, όπως για παράδειγμα στους κινητικούς νευρώνες (Mudher et al., 2004) και στα μισχοειδή σωμάτια (Kosmidis et al., 2010). Η *D. melanogaster* έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη διαφόρων πτυχών της παθογένεσης της πρωτεΐνης Τ, όπως ο ρόλος της υπερ-φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ (Johnson & Stoothoff, 2004); (Papanikolopoulou et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015) και των συσσωματωμάτων που δημιουργεί (Gerson et al., 2016); (Cowan, Chee, et al., 2010); (Cowan et al., 2015), τα ελλείμματα στις συνάψεις (Chee et al., 2005) και στην αξονική μεταφορά (Mudher et al., 2004). Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών δοκιμασιών έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του αντίκτυπου που έχει η έκφραση της πρωτεΐνης Τ σε διαφορετικούς πληθυσμούς των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των συμπεριφορικών μηχανισμών (μάθηση και μνήμη) (Papanikolopoulou et al., 2010); (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015), του προσδόκιμου ζωής (Papanikolopoulou et al., 2010); (Folwell et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015), της κίνησης των προνυμφών (Mudher et al., 2004) και του οξειδωτικού στρες (Dias-Santagata et al., 2007).

Για παράδειγμα, η έκφραση των ισομορφών 0N4R ή 2N4R στη Drosophila προκαλεί ελαττωματική μάθηση και μνήμη, ενώ με την έκφραση της 0N3R ισομορφής παραμένει φυσιολογική (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η έκφραση της 0N3R ισομορφής ειδικά στους κινητικούς νευρώνες των προνυμφών διαταράσσει την αξονική μεταφορά, προκαλεί τη συσσώρευση των κυστιδίων μεταφοράς και οδηγεί σε μειωμένη κινητική λειτουργία των προνυμφών (Mudher et al., 2004). Σημαντικό εύρημα αποτελεί ότι η συσσώρευση των ινιδίων υπερ-φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Τ συσχετίζεται με την τοξικότητα που παρατηρείται στους ανθρώπους (Wittmann et al., 2001); (Steinhilb et al., 2007a); (Steinhilb et al., 2007b); (Feuillette, Miguel, Frébourg, Campion, &

Lecourtois, 2010). Πρόσφατα επίσης αναγνωρίστηκαν δύο θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, οι Ser^{238} και Thr^{245}, ως απαραίτητες για τη τοξικότητα της στα μισχοειδή σωμάτια (Mushroom Bodies, MBs) (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou et al., 2010) και για την πρόωρη θνησιμότητα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015), ενώ η φωσφορυλίωση της θέσης Ser^{262} της πρωτεΐνης Τ φαίνεται να είναι σημαντική για την νευρωνική δυσλειτουργία, όπως αυτή μετράται με τα μαθησιακά ελλείμματα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Επιπλέον, το μοντέλο της Drosophila έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του νευροεκφυλισμού τόσο στο μάτι (Shulman & Feany, 2003) όσο και σε ολόκληρο των εγκέφαλο (Wittmann et al., 2001) με αποτέλεσμα να έχουν εντοπιστεί διάφοροι ενισχυτές ή κατασταλτικοί παράγοντες της τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ (Shulman & Feany, 2003). Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι οι διάφορες μελέτες στη μύγα έχουν δείξει ότι υπάρχουν σαφείς διαφορές στη τοξικότητα και δυσλειτουργία που προκαλεί η κάθε ισομορφή της πρωτεΐνης Τ καθώς και οι φωσφορυλιώσεις τους, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την ετερογένεια των κλινικών και γνωσιακών προφίλ που έχουν οι ανθρώπινες Τ-πρωτεϊνοπάθειες (Sahara et al., 2008).

Επιπροσθέτως, η χρήση μεταλλαγμένων γονιδίων τ στη Drosophila έχει αναδείξει το ρόλο τους στην νευροεκφυλιστική νόσο FTDP-17 και δίνει πιθανές εξηγήσεις για την ενισχυμένη τοξικότητά τους. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η μετάλλαξη R406W της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ έχει σημαντικά πιο αυξημένη θνησιμότητα και είναι ιδιαίτερα πιο ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες σε σχέση με την αγρίου τύπου 0N4R ισομορφή (Wittmann et al., 2001); (Dias-Santagata et al., 2007). Σε αντίθεση, οι δομικές αλλαγές στα μισχοειδή σωμάτια που παρατηρήθηκαν ήταν μειωμένες έως μηδαμινές για τις μεταλλάξεις R406W και V377M σε σχέση με την αγρίου τύπου 0N4R ισομορφή (Kosmidis et al., 2010). Επιπλέον, η έκφραση συγκεκριμένων μεταλλάξεων που σχετίζονται με τη FTDP-17 νόσο αποδίδει σοβαρότερους φαινοτύπους στη τοξικότητα στον αμφιβληστροειδή και διαφορετικής μορφολογίας (Grammenoudi et al., 2008); (Shulman & Feany, 2003) σε σχέση με την αγρίου τύπου 0N4R ισομορφή. Επομένως, οι επιπτώσεις της κάθε μετάλλαξης που σχετίζεται με το FTDP-17 σε σχέση με την αγρίου τύπου 0N4R ισομορφή, φαίνεται να είναι ειδικές για την ισομορφή και για τον τύπο κυττάρων στον οποίο εκφράζονται, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα κλινικά δεδομένα (V. M. Lee et al., 2001). Ο νευρωνικός τύπος όπου εκφράζεται η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Τ ή τα μεταλλάγματα είναι ουσιαστικής σημασίας καθώς αποκαλύπτονται ιστοειδικές διαφορές στα πρότυπα φωσφορυλίωσης (Grammenoudi et al., 2008), κάτι το οποίο θα μπορούσε να δώσει μια εξήγηση για τη διαφορετική ευαισθησία των νευρωνικών πληθυσμών στις διάφορες Τ- πρωτεϊνοπάθειες.

Όλα τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη Drosophila καταδεικνύουν ότι υπάρχουν σαφείς διαφορές ανάμεσα στις νευροεκφυλιστικές νόσους ακόμη και αν οι υποκείμενοι παθολογικοί μηχανισμοί είναι παραπλήσιοι. Συλλογικά όλες οι

μελέτες καταδεικνύουν την πλούσια ιστορία της χρήσης της Drosophila ως μοντέλο για τη μελέτη των Τ-πρωτεϊνοπαθειών, παρέχοντας μια πληθώρα διαφορετικών μοντέλων και αναλύσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη παρούσα μελέτη.

6. Βιβλιογραφία

Al-Bassam, J., Ozer, R. S., Safer, D., Halpain, S., & Milligan, R. A. (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol, 157*(7), 1187-1196. doi:10.1083/jcb.200201048

Alonso Adel, C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem, 279*(33), 34873-34881. doi:10.1074/jbc.M405131200

Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat, 8*(6), 429-431. doi:10.1002/ca.980080612

Andreadis, A., Broderick, J. A., & Kosik, K. S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res, 23*(17), 3585-3593. doi:10.1093/nar/23.17.3585

Andreadis, A., Brown, W. M., & Kosik, K. S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry, 31*(43), 10626-10633. doi:10.1021/bi00158a027

Arima, K., Uesugi, H., Fujita, I., Sakurai, Y., Oyanagi, S., Andoh, S., . . . Inose, T. (1994). Corticonigral degeneration with neuronal achromasia presenting with primary progressive aphasia: ultrastructural and immunocytochemical studies. *J Neurol Sci, 127*(2), 186-197. doi:10.1016/0022-510x(94)90072-8

Arioka, M., Tsukamoto, M., Ishiguro, K., Kato, R., Sato, K., Imahori, K., & Uchida, T. (1993). Tau protein kinase II is involved in the regulation of the normal phosphorylation state of tau protein. *J Neurochem, 60*(2), 461-468. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03173.x

Arnold, C. S., Johnson, G. V., Cole, R. N., Dong, D. L., Lee, M., & Hart, G. W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem, 271*(46), 28741-28744. doi:10.1074/jbc.271.46.28741

Arrasate, M., Pérez, M., Valpuesta, J. M., & Avila, J. (1997). Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol, 151*(4), 1115-1122.

Augustinack, J. C., Sanders, J. L., Tsai, L. H., & Hyman, B. T. (2002). Colocalization and fluorescence resonance energy transfer between cdk5 and AT8 suggests a close association in pre-neurofibrillary tangles and neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol, 61*(6), 557-564. doi:10.1093/jnen/61.6.557

Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M., & Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol, 103*(1), 26-35. doi:10.1007/s004010100423

Ayers, J. I., Giasson, B. I., & Borchelt, D. R. (2018). Prion-like Spreading in Tauopathies. *Biol Psychiatry, 83*(4), 337-346. doi:10.1016/j.biopsych.2017.04.003

Baas, P. W., Slaughter, T., Brown, A., & Black, M. M. (1991). Microtubule dynamics in axons and dendrites. *J Neurosci Res, 30*(1), 134-153. doi:10.1002/jnr.490300115

Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., . . . Hutton, M. (1999). Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet, 8*(4), 711-715. doi:10.1093/hmg/8.4.711

Ballatore, C., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci, 8*(9), 663-672. doi:10.1038/nrn2194

Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., . . . Wisniewski, H. M. (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res, 477*(1-2), 90-99. doi:10.1016/0006-8993(89)91396-6

Bancher, C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Fried, V. A., Smith, H. T., & Wisniewski, H. M. (1991). Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res, 539*(1), 11-18. doi:10.1016/0006-8993(91)90681-k

Barghorn, S., & Mandelkow, E. (2002). Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry, 41*(50), 14885-14896. doi:10.1021/bi026469j

Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., . . . Janus, C. (2007). Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci, 27*(14), 3650-3662. doi:10.1523/jneurosci.0587-07.2007

Berriman, J., Serpell, L. C., Oberg, K. A., Fink, A. L., Goedert, M., & Crowther, R. A. (2003). Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A, 100*(15), 9034-9038. doi:10.1073/pnas.1530287100

Berry, R. W., Abraha, A., Lagalwar, S., LaPointe, N., Gamblin, T. C., Cryns, V. L., & Binder, L. I. (2003). Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry, 42*(27), 8325-8331. doi:10.1021/bi027348m

Bhat, R. V., Shanley, J., Correll, M. P., Fieles, W. E., Keith, R. A., Scott, C. W., & Lee, C. M. (2000). Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A, 97*(20), 11074-11079. doi:10.1073/pnas.190297597

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron, 11*(1), 153-163. doi:10.1016/0896-6273(93)90279-z

Bilen, J., & Bonini, N. M. (2005). Drosophila as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet, 39*, 153-171. doi:10.1146/annurev.genet.39.110304.095804

Binder, L. I., Frankfurter, A., & Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol, 101*(4), 1371-1378. doi:10.1083/jcb.101.4.1371

Black, M. M., Slaughter, T., Moshiach, S., Obrocka, M., & Fischer, I. (1996). Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci, 16*(11), 3601-3619. doi:10.1523/jneurosci.16-11-03601.1996

Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., . . . Pradier, L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol, 184*(1), 247-263. doi:10.1016/s0014-4886(03)00252-8

Borghgraef, P., Menuet, C., Theunis, C., Louis, J. V., Devijver, H., Maurin, H., . . . Van Leuven, F. (2013). Increasing brain protein O-GlcNAc-ylation mitigates breathing defects and mortality of Tau.P301L mice. *PLoS One, 8*(12), e84442. doi:10.1371/journal.pone.0084442

Boutajangout, A., Authelet, M., Blanchard, V., Touchet, N., Tremp, G., Pradier, L., & Brion, J. P. (2004). Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis, 15*(1), 47-60. doi:10.1016/j.nbd.2003.09.007

Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol, 82*(4), 239-259. doi:10.1007/bf00308809

Braak, H., & Braak, E. (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging, 16*(3), 271-278; discussion 278-284. doi:10.1016/0197-4580(95)00021-6

Bramblett, G. T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron, 10*(6), 1089-1099. doi:10.1016/0896-6273(93)90057-x

Brand, A. H., & Dormand, E. L. (1995). The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the Drosophila nervous system. *Curr Opin Neurobiol, 5*(5), 572-578. doi:10.1016/0959-4388(95)80061-1

Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development, 118*(2), 401-415.

Brandt, R., Léger, J., & Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol, 131*(5), 1327-1340. doi:10.1083/jcb.131.5.1327

Bré, M. H., & Karsenti, E. (1990). Effects of brain microtubule-associated proteins on microtubule dynamics and the nucleating activity of centrosomes. *Cell Motil Cytoskeleton, 15*(2), 88-98. doi:10.1002/cm.970150205

Brion, J. P., Smith, C., Couck, A. M., Gallo, J. M., & Anderton, B. H. (1993). Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner

similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem, 61*(6), 2071-2080. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb07444.x

Bryan, J. B., Nagle, B. W., & Doenges, K. H. (1975). Inhibition of tubulin assembly by RNA and other polyanions: evidence for a required protein. *Proc Natl Acad Sci U S A, 72*(9), 3570-3574. doi:10.1073/pnas.72.9.3570

Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev, 33*(1), 95-130. doi:10.1016/s0165-0173(00)00019-9

Bugiani, O., Murrell, J. R., Giaccone, G., Hasegawa, M., Ghigo, G., Tabaton, M., . . . Ghetti, B. (1999). Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol, 58*(6), 667-677. doi:10.1097/00005072-199906000-00011

Caceres, A., & Kosik, K. S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature, 343*(6257), 461-463. doi:10.1038/343461a0

Caffrey, T. M., Joachim, C., Paracchini, S., Esiri, M. M., & Wade-Martins, R. (2006). Haplotype-specific expression of exon 10 at the human MAPT locus. *Hum Mol Genet, 15*(24), 3529-3537. doi:10.1093/hmg/ddl429

Carlier, M. F., Simon, C., Cassoly, R., & Pradel, L. A. (1984). Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie, 66*(4), 305-311. doi:10.1016/0300-9084(84)90007-5

Carmel, G., Mager, E. M., Binder, L. I., & Kuret, J. (1996). The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem, 271*(51), 32789-32795. doi:10.1074/jbc.271.51.32789

Chang, E., Kim, S., Schafer, K. N., & Kuret, J. (2011). Pseudophosphorylation of tau protein directly modulates its aggregation kinetics. *Biochim Biophys Acta, 1814*(2), 388-395. doi:10.1016/j.bbapap.2010.10.005

Chee, F. C., Mudher, A., Cuttle, M. F., Newman, T. A., MacKay, D., Lovestone, S., & Shepherd, D. (2005). Over-expression of tau results in defective synaptic transmission in Drosophila neuromuscular junctions. *Neurobiol Dis, 20*(3), 918-928. doi:10.1016/j.nbd.2005.05.029

Chen, H. K., Fernandez-Funez, P., Acevedo, S. F., Lam, Y. C., Kaytor, M. D., Fernandez, M. H., . . . Zoghbi, H. Y. (2003). Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell, 113*(4), 457-468. doi:10.1016/s0092-8674(03)00349-0

Chin, J. Y., Knowles, R. B., Schneider, A., Drewes, G., Mandelkow, E. M., & Hyman, B. T. (2000). Microtubule-affinity regulating kinase (MARK) is tightly associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain: a fluorescence resonance energy transfer study. *J Neuropathol Exp Neurol, 59*(11), 966-971. doi:10.1093/jnen/59.11.966

Chin, S. S., & Goldman, J. E. (1996). Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol, 55*(5), 499-508. doi:10.1097/00005072-199605000-00001

Chirita, C. N., Congdon, E. E., Yin, H., & Kuret, J. (2005). Triggers of full-length tau aggregation: a role for partially folded intermediates. *Biochemistry, 44*(15), 5862-5872. doi:10.1021/bi0500123

Chirita, C. N., Necula, M., & Kuret, J. (2003). Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J Biol Chem, 278*(28), 25644-25650. doi:10.1074/jbc.M301663200

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., . . . Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol, 11*(7), 909-913. doi:10.1038/ncb1901

Cohen, T. J., Friedmann, D., Hwang, A. W., Marmorstein, R., & Lee, V. M. (2013). The microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity. *Nat Struct Mol Biol, 20*(6), 756-762. doi:10.1038/nsmb.2555

Cohen, T. J., Guo, J. L., Hurtado, D. E., Kwong, L. K., Mills, I. P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun, 2*, 252. doi:10.1038/ncomms1255

Conrad, C., Andreadis, A., Trojanowski, J. Q., Dickson, D. W., Kang, D., Chen, X., . . . Saitoh, T. (1997). Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol, 41*(2), 277-281. doi:10.1002/ana.410410222

Cook, C., Carlomagno, Y., Gendron, T. F., Dunmore, J., Scheffel, K., Stetler, C., . . . Petrucelli, L. (2014). Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance. *Hum Mol Genet, 23*(1), 104-116. doi:10.1093/hmg/ddt402

Cook, C., Kang, S. S., Carlomagno, Y., Lin, W. L., Yue, M., Kurti, A., . . . Fryer, J. D. (2015). Tau deposition drives neuropathological, inflammatory and behavioral abnormalities independently of neuronal loss in a novel mouse model. *Hum Mol Genet, 24*(21), 6198-6212. doi:10.1093/hmg/ddv336

Coppola, G., Chinnathambi, S., Lee, J. J., Dombroski, B. A., Baker, M. C., Soto-Ortolaza, A. I., . . . Geschwind, D. H. (2012). Evidence for a role of the rare p.A152T variant in MAPT in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer's diseases. *Hum Mol Genet, 21*(15), 3500-3512. doi:10.1093/hmg/dds161

Corces, V. G., Manso, R., De La Torre, J., Avila, J., Nasr, A., & Wiche, G. (1980). Effects of DNA on microtubule assembly. *Eur J Biochem, 105*(1), 7-16. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb04468.x

Corces, V. G., Salas, J., Salas, M. L., & Avila, J. (1978). Binding of microtubule proteins to DNA: specificity of the interaction. *Eur J Biochem, 86*(2), 473-479. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12330.x

Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L., & Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A, 89*(10), 4378-4381. doi:10.1073/pnas.89.10.4378

Cowan, C. M., Bossing, T., Page, A., Shepherd, D., & Mudher, A. (2010). Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo. *Acta Neuropathol, 120*(5), 593-604. doi:10.1007/s00401-010-0716-8

Cowan, C. M., Chee, F., Shepherd, D., & Mudher, A. (2010). Disruption of neuronal function by soluble hyperphosphorylated tau in a Drosophila model of tauopathy. *Biochem Soc Trans, 38*(2), 564-570. doi:10.1042/bst0380564

Cowan, C. M., & Mudher, A. (2013). Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol, 4*, 114. doi:10.3389/fneur.2013.00114

Cowan, C. M., Quraishe, S., Hands, S., Sealey, M., Mahajan, S., Allan, D. W., & Mudher, A. (2015). Rescue from tau-induced neuronal dysfunction produces insoluble tau oligomers. *Sci Rep, 5*, 17191. doi:10.1038/srep17191

Cowan, C. M., Quraishe, S., & Mudher, A. (2012). What is the pathological significance of tau oligomers? *Biochem Soc Trans, 40*(4), 693-697. doi:10.1042/bst20120135

Cox, K., Combs, B., Abdelmesih, B., Morfini, G., Brady, S. T., & Kanaan, N. M. (2016). Analysis of isoform-specific tau aggregates suggests a common toxic mechanism involving similar pathological conformations and axonal transport inhibition. *Neurobiol Aging, 47*, 113-126. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.015

Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P., & Yang, A. J. (2006). Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem, 281*(16), 10825-10838. doi:10.1074/jbc.M512786200

Cross, D. C., Muñoz, J. P., Hernández, P., & Maccioni, R. B. (2000). Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem, 78*(2), 305-317.

Crowther, R. A., & Goedert, M. (2000). Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J Struct Biol, 130*(2-3), 271-279. doi:10.1006/jsbi.2000.4270

Cruz, J. C., Tseng, H. C., Goldman, J. A., Shih, H., & Tsai, L. H. (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron, 40*(3), 471-483. doi:10.1016/s0896-6273(03)00627-5

de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., . . . Hyman, B. T. (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron, 73*(4), 685-697. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.033

Delacourte, A., Robitaille, Y., Sergeant, N., Buée, L., Hof, P. R., Wattez, A., . . . Gauvreau, D. (1996). Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol, 55*(2), 159-168. doi:10.1097/00005072-199602000-00004

Derkinderen, P., Scales, T. M., Hanger, D. P., Leung, K. Y., Byers, H. L., Ward, M. A., . . . Anderton, B. H. (2005). Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci, 25*(28), 6584-6593. doi:10.1523/jneurosci.1487-05.2005

Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F. X., Huvent, I., Chambraud, B., . . . Smet-Nocca, C. (2017). Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 114*(34), 9080-9085. doi:10.1073/pnas.1708448114

Dhavan, R., & Tsai, L. H. (2001). A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol, 2*(10), 749-759. doi:10.1038/35096019

Dias-Santagata, D., Fulga, T.A., Duttaroy, A., Feany, M.B., 2007. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila. *J. Clin. Invest. 117*:236–245. http://dx.doi.org/10.1172/JCI28769.

Dickson, D. W. (1999). Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol, 246 Suppl 2*, Ii6-15. doi:10.1007/bf03161076

Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science, 319*(5866), 1086-1089. doi:10.1126/science.1152993

Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2008). Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu Rev Biophys, 37*, 65-95. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125912

Dorval, V., & Fraser, P. E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J Biol Chem, 281*(15), 9919-9924. doi:10.1074/jbc.M510127200

Dotti, C. G., Banker, G. A., & Binder, L. I. (1987). The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience, 23*(1), 121-130. doi:10.1016/0306-4522(87)90276-4

Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H., & Kirschner, M. W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell, 3*(10), 1141-1154. doi:10.1091/mbc.3.10.1141

Drewes, G., Ebneth, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell, 89*(2), 297-308. doi:10.1016/s0092-8674(00)80208-1

Dujardin, S., Commins, C., Lathuiliere, A., Beerepoot, P., Fernandes, A. R., Kamath, T. V., . . . Hyman, B. T. (2020). Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nat Med, 26*(8), 1256-1263. doi:10.1038/s41591-020-0938-9

Elliott, D. A., & Brand, A. H. (2008). The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol, 420*, 79-95. doi:10.1007/978-1-59745-583-1_5

Esler, W. P., & Wolfe, M. S. (2001). A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science, 293*(5534), 1449-1454. doi:10.1126/science.1064638

Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Vidal, R., . . . Goedert, M. (2018). Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature, 561*(7721), 137-140. doi:10.1038/s41586-018-0454-y

Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature, 404*(6776), 394-398. doi:10.1038/35006074

Fedrizzi, L., & Carafoli, E. (2011). Ca2+ dysfunction in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Biofactors, 37*(3), 189-196. doi:10.1002/biof.157

Ferrer, I., Barrachina, M., Puig, B., Martínez de Lagrán, M., Martí, E., Avila, J., & Dierssen, M. (2005). Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down

syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol Dis, 20*(2), 392-400. doi:10.1016/j.nbd.2005.03.020

Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., & Puig, B. (2001). Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *J Neural Transm (Vienna), 108*(12), 1397-1415. doi:10.1007/s007020100016

Feuillette, S., Miguel, L., Frébourg, T., Campion, D., & Lecourtois, M. (2010). Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J Neurochem, 113*(4), 895-903. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06663.x

Fischer, D., Mukrasch, M. D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., . . . Zweckstetter, M. (2009). Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry, 48*(42), 10047-10055. doi:10.1021/bi901090m

Fitzpatrick, A. W. P., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., . . . Scheres, S. H. W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature, 547*(7662), 185-190. doi:10.1038/nature23002

Folwell, J., Cowan, C. M., Ubhi, K. K., Shiabh, H., Newman, T. A., Shepherd, D., & Mudher, A. (2010). Abeta exacerbates the neuronal dysfunction caused by human tau expression in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol, 223*(2), 401-409. doi:10.1016/j.expneurol.2009.09.014

Forman, M. S. (2004). Genotype-phenotype correlations in FTDP-17: does form follow function? *Exp Neurol, 187*(2), 229-234. doi:10.1016/j.expneurol.2004.01.031

Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem, 284*(19), 12845-12852. doi:10.1074/jbc.M808759200

Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., . . . Cryns, V. L. (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A, 100*(17), 10032-10037. doi:10.1073/pnas.1630428100

Gamblin, T. C., King, M. E., Kuret, J., Berry, R. W., & Binder, L. I. (2000). Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry, 39*(46), 14203-14210. doi:10.1021/bi001876l

Gauthier-Kemper, A., Suárez Alonso, M., Sündermann, F., Niewidok, B., Fernandez, M. P., Bakota, L., . . . Brandt, R. (2018). Annexins A2 and A6 interact with the extreme N terminus of tau and thereby contribute to tau's axonal localization. *J Biol Chem, 293*(21), 8065-8076. doi:10.1074/jbc.RA117.000490

Gauthier-Kemper, A., Weissmann, C., Golovyashkina, N., Sebö-Lemke, Z., Drewes, G., Gerke, V., . . . Brandt, R. (2011). The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J Cell Biol, 192*(4), 647-661. doi:10.1083/jcb.201007161

Gauthier, S., Rosa-Neto, P., Morais, J. A., & Webster, C. (2021). World Alzheimer Report 2021, Journey through the diagnosis of dementia. *Alzheimer's Disease International*.

Gendron, T. F., & Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener, 4*, 13. doi:10.1186/1750-1326-4-13

Gerson, J. E., Mudher, A., & Kayed, R. (2016). Potential mechanisms and implications for the formation of tau oligomeric strains. *Crit Rev Biochem Mol Biol, 51*(6), 482-496. doi:10.1080/10409238.2016.1226251

Ghetti, B., Oblak, A. L., Boeve, B. F., Johnson, K. A., Dickerson, B. C., & Goedert, M. (2015). Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol, 41*(1), 24-46. doi:10.1111/nan.12213

Giese, K. P. (2009). GSK-3: a key player in neurodegeneration and memory. *IUBMB Life, 61*(5), 516-521. doi:10.1002/iub.187

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., . . . et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature, 349*(6311), 704-706. doi:10.1038/349704a0

Goedert, M., Crowther, R. A., & Spillantini, M. G. (1998). Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron, 21*(5), 955-958. doi:10.1016/s0896-6273(00)80615-7

Goedert, M., Eisenberg, D. S., & Crowther, R. A. (2017). Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci, 40*, 189-210. doi:10.1146/annurev-neuro-072116-031153

Goedert, M., & Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo j, 9*(13), 4225-4230.

Goedert, M., & Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta, 1739*(2-3), 240-250. doi:10.1016/j.bbadis.2004.08.007

Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J., & Crowther, R. A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature, 383*(6600), 550-553. doi:10.1038/383550a0

Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., & Crowther, R. A. (1992a). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron, 8*(1), 159-168. doi:10.1016/0896-6273(92)90117-v

Goedert, M., Spillantini, M. G., & Crowther, R. A. (1992b). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A, 89*(5), 1983-1987. doi:10.1073/pnas.89.5.1983

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron, 3*(4), 519-526. doi:10.1016/0896-6273(89)90210-9

Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., & Crowther, R. A. (1989b). 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. *Embo j, 8*(2), 393-399.

Gohar, M., Yang, W., Strong, W., Volkening, K., Leystra-Lantz, C., & Strong, M. J. (2009). Tau phosphorylation at threonine-175 leads to fibril formation and enhanced cell death: implications for amyotrophic lateral sclerosis with cognitive impairment. *J Neurochem, 108*(3), 634-643. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05791.x

Golbe, L. I., Davis, P. H., Schoenberg, B. S., & Duvoisin, R. C. (1988). Prevalence and natural history of progressive supranuclear palsy. *Neurology, 38*(7), 1031-1034. doi:10.1212/wnl.38.7.1031

Golbe, L. I., Rubin, R. S., Cody, R. P., Belsh, J. M., Duvoisin, R. C., Grosmann, C., . . . Zimmerman, T. R., Jr. (1996). Follow-up study of risk factors in progressive supranuclear palsy. *Neurology, 47*(1), 148-154. doi:10.1212/wnl.47.1.148

Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1994). Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience, 61*(4), 765-772. doi:10.1016/0306-4522(94)90400-6

Gong, C. X., Shaikh, S., Wang, J. Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem, 65*(2), 732-738. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.65020732.x

Gong, C. X., Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem, 61*(3), 921-927. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03603.x

Goode, B. L., Denis, P. E., Panda, D., Radeke, M. J., Miller, H. P., Wilson, L., & Feinstein, S. C. (1997). Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell, 8*(2), 353-365. doi:10.1091/mbc.8.2.353

Gorsky, M. K., Burnouf, S., Dols, J., Mandelkow, E., & Partridge, L. (2016). Acetylation mimic of lysine 280 exacerbates human Tau neurotoxicity in vivo. *Sci Rep, 6*, 22685. doi:10.1038/srep22685

Götz, J., Tolnay, M., Barmettler, R., Ferrari, A., Bürki, K., Goedert, M., . . . Nitsch, R. M. (2001). Human tau transgenic mice. Towards an animal model for neuro- and glialfibrillary lesion formation. *Adv Exp Med Biol, 487*, 71-83.

Grammenoudi, S., Anezaki, M., Kosmidis, S., & Skoulakis, E. M. (2008). Modelling cell and isoform type specificity of tauopathies in Drosophila. *SEB Exp Biol Ser, 60*, 39-56.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., & Wisniewski, H. M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem, 261*(13), 6084-6089.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A, 83*(13), 4913-4917. doi:10.1073/pnas.83.13.4913

Gu, G. J., Lund, H., Wu, D., Blokzijl, A., Classon, C., von Euler, G., . . . Kamali-Moghaddam, M. (2013). Role of individual MARK isoforms in phosphorylation of tau at Ser^{262} in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med, 15*(3), 458-469. doi:10.1007/s12017-013-8232-3

Gu, Y., Oyama, F., & Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem, 67*(3), 1235-1244. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x

Guo, J. L., & Lee, V. M. (2011). Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J Biol Chem, 286*(17), 15317-15331. doi:10.1074/jbc.M110.209296

Guo, J. L., & Lee, V. M. (2013). Neurofibrillary tangle-like tau pathology induced by synthetic tau fibrils in primary neurons over-expressing mutant tau. *FEBS Lett, 587*(6), 717-723. doi:10.1016/j.febslet.2013.01.051

Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol, 133*(5), 665-704. doi:10.1007/s00401-017-1707-9

Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Meyer, H. E., Goedert, M., & Mandelkow, E. (1992). The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett, 307*(2), 199-205. doi:10.1016/0014-5793(92)80767-b

Haase, C., Stieler, J. T., Arendt, T., & Holzer, M. (2004). Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem, 88*(6), 1509-1520. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02287.x

Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., . . . et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature, 359*(6393), 322-325. doi:10.1038/359322a0

Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med, 15*(3), 112-119. doi:10.1016/j.molmed.2009.01.003

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., . . . Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature, 369*(6480), 488-491. doi:10.1038/369488a0

Haroutunian, V., Davies, P., Vianna, C., Buxbaum, J. D., & Purohit, D. P. (2007). Tau protein abnormalities associated with the progression of alzheimer disease type dementia. *Neurobiol Aging, 28*(1), 1-7. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.001

Hasegawa, M., Smith, M. J., & Goedert, M. (1998). Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett, 437*(3), 207-210. doi:10.1016/s0014-5793(98)01217-4

Hatfield, C. F., Herbert, J., van Someren, E. J., Hodges, J. R., & Hastings, M. H. (2004). Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia. *Brain, 127*(Pt 5), 1061-1074. doi:10.1093/brain/awh129

Hauw, J. J., Verny, M., Delaère, P., Cervera, P., He, Y., & Duyckaerts, C. (1990). Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic

differences with Alzheimer's disease and aging. *Neurosci Lett, 119*(2), 182-186. doi:10.1016/0304-3940(90)90829-x

Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci, 4*(4), 266-275. doi:10.1038/nrn1074

Hempen, B., & Brion, J. P. (1996). Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol, 55*(9), 964-972. doi:10.1097/00005072-199609000-00003

Henkins, K. M., Sokolow, S., Miller, C. A., Vinters, H. V., Poon, W. W., Cornwell, L. B., . . . Gylys, K. H. (2012). Extensive p-tau pathology and SDS-stable p-tau oligomers in Alzheimer's cortical synapses. *Brain Pathol, 22*(6), 826-833. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00598.x

Henríquez, J. P., Cross, D., Vial, C., & Maccioni, R. B. (1995). Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct, 13*(4), 239-250. doi:10.1002/cbf.290130404

Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. W., & Martin, D. W., Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol, 9*(4), 1381-1388. doi:10.1128/mcb.9.4.1381-1388.1989

Hooper, N. M. (2005). Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem Soc Trans, 33*(Pt 2), 335-338. doi:10.1042/bst0330335

Hutton, M. (2000). Molecular genetics of chromosome 17 tauopathies. *Ann N Y Acad Sci, 920*, 63-73. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06906.x

Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., . . . Heutink, P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature, 393*(6686), 702-705. doi:10.1038/31508

Iijima-Ando, K., & Iijima, K. (2010). Transgenic Drosophila models of Alzheimer's disease and tauopathies. *Brain Struct Funct, 214*(2-3), 245-262. doi:10.1007/s00429-009-0234-4

Imahori, K., Hoshi, M., Ishiguro, K., Sato, K., Takahashi, M., Shiurba, R., . . . Uchida, T. (1998). Possible role of tau protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging, 19*(1 Suppl), S93-98. doi:10.1016/s0197-4580(98)00025-6

Irwin, D. J., Cohen, T. J., Grossman, M., Arnold, S. E., McCarty-Wood, E., Van Deerlin, V. M., . . . Trojanowski, J. Q. (2013). Acetylated tau neuropathology in sporadic and hereditary tauopathies. *Am J Pathol, 183*(2), 344-351. doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.025

Jackson, G. R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P. W., . . . Zipursky, S. L. (1998). Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons. *Neuron, 21*(3), 633-642. doi:10.1016/s0896-6273(00)80573-5

Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T., Jr. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the

pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry, 32*(18), 4693-4697. doi:10.1021/bi00069a001

Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem, 283*(46), 32066-32076. doi:10.1074/jbc.M805300200

Jeganathan, S., von Bergen, M., Brutlach, H., Steinhoff, H. J., & Mandelkow, E. (2006). Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry, 45*(7), 2283-2293. doi:10.1021/bi0521543

Johnson, G. V., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci, 117*(Pt 24), 5721-5729. doi:10.1242/jcs.01558

Jung, D., Filliol, D., Miehe, M., & Rendon, A. (1993). Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP2 or TAU. *Cell Motil Cytoskeleton, 24*(4), 245-255. doi:10.1002/cm.970240405

Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett, 399*(3), 344-349. doi:10.1016/s0014-5793(96)01386-5

Kanaan, N. M., Morfini, G., Pigino, G., LaPointe, N. E., Andreadis, A., Song, Y., . . . Brady, S. T. (2012). Phosphorylation in the amino terminus of tau prevents inhibition of anterograde axonal transport. *Neurobiol Aging, 33*(4), 826.e815-830. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.006

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., . . . Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature, 325*(6106), 733-736. doi:10.1038/325733a0

Kara, E., Ling, H., Pittman, A. M., Shaw, K., de Silva, R., Simone, R., . . . Revesz, T. (2012). The MAPT p.A152T variant is a risk factor associated with tauopathies with atypical clinical and neuropathological features. *Neurobiol Aging, 33*(9), 2231.e2237-2231.e2214. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.04.006

Kellogg, E. H., Hejab, N. M. A., Poepsel, S., Downing, K. H., DiMaio, F., & Nogales, E. (2018). Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science, 360*(6394), 1242-1246. doi:10.1126/science.aat1780

Kenessey, A., & Yen, S. H. (1993). The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res, 629*(1), 40-46. doi:10.1016/0006-8993(93)90478-6

Kenner, L., el-Shabrawi, Y., Hutter, H., Forstner, M., Zatloukal, K., Hoefler, G., . . . Denk, H. (1994). Expression of three- and four-repeat tau isoforms in mouse liver. *Hepatology, 20*(4 Pt 1), 1086-1089. doi:10.1002/hep.1840200442

Kfoury, N., Holmes, B. B., Jiang, H., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. (2012). Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem, 287*(23), 19440-19451. doi:10.1074/jbc.M112.346072

Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., . . . Mandelkow, E. M. (2006). Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem, 281*(2), 1205-1214. doi:10.1074/jbc.M507753200

Khurana, V. (2008). Modeling Tauopathy in the fruit fly Drosophila melanogaster. *J Alzheimers Dis, 15*(4), 541-553. doi:10.3233/jad-2008-15403

Kim, Y., Choi, H., Lee, W., Park, H., Kam, T. I., Hong, S. H., . . . Jung, Y. K. (2016). Caspase-cleaved tau exhibits rapid memory impairment associated with tau oligomers in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis, 87*, 19-28. doi:10.1016/j.nbd.2015.12.006

Kim, Y., Lee, Y. I., Seo, M., Kim, S. Y., Lee, J. E., Youn, H. D., . . . Juhnn, Y. S. (2009). Calcineurin dephosphorylates glycogen synthase kinase-3 beta at serine-9 in neuroblast-derived cells. *J Neurochem, 111*(2), 344-354. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06318.x

Kimura, T., Ishiguro, K., & Hisanaga, S. (2014). Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front Mol Neurosci, 7*, 65. doi:10.3389/fnmol.2014.00065

Kimura, T., Tsutsumi, K., Taoka, M., Saito, T., Masuda-Suzukake, M., Ishiguro, K., . . . Hisanaga, S. I. (2013). Isomerase Pin1 stimulates dephosphorylation of tau protein at cyclin-dependent kinase (Cdk5)-dependent Alzheimer phosphorylation sites. *J Biol Chem, 288*(11), 7968-7977. doi:10.1074/jbc.M112.433326

Kins, S., Crameri, A., Evans, D. R., Hemmings, B. A., Nitsch, R. M., & Gotz, J. (2001). Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem, 276*(41), 38193-38200. doi:10.1074/jbc.M102621200

Kiris, E., Ventimiglia, D., Sargin, M. E., Gaylord, M. R., Altinok, A., Rose, K., . . . Feinstein, S. C. (2011). Combinatorial Tau pseudophosphorylation: markedly different regulatory effects on microtubule assembly and dynamic instability than the sum of the individual parts. *J Biol Chem, 286*(16), 14257-14270. doi:10.1074/jbc.M111.219311

Kosik, K. S., & Finch, E. A. (1987). MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci, 7*(10), 3142-3153. doi:10.1523/jneurosci.07-10-03142.1987

Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2010). Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in Drosophila. *J Neurosci, 30*(2), 464-477. doi:10.1523/jneurosci.1490-09.2010

Kosuga, S., Tashiro, E., Kajioka, T., Ueki, M., Shimizu, Y., & Imoto, M. (2005). GSK-3beta directly phosphorylates and activates MARK2/PAR-1. *J Biol Chem, 280*(52), 42715-42722. doi:10.1074/jbc.M507941200

Kovacs, G. G., Wöhrer, A., Ströbel, T., Botond, G., Attems, J., & Budka, H. (2011). Unclassifiable tauopathy associated with an A152T variation in MAPT exon 7. *Clin Neuropathol, 30*(1), 3-10. doi:10.5414/npp30003

Ksiezak-Reding, H., Liu, W. K., & Yen, S. H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res, 597*(2), 209-219. doi:10.1016/0006-8993(92)91476-u

Ksiezak-Reding, H., Morgan, K., Mattiace, L. A., Davies, P., Liu, W. K., Yen, S. H., . . . Dickson, D. W. (1994). Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am J Pathol, 145*(6), 1496-1508.

Kurt, M. A., Davies, D. C., Kidd, M., Duff, K., & Howlett, D. R. (2003). Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiol Dis, 14*(1), 89-97. doi:10.1016/s0969-9961(03)00084-6

Kwok, J. B., Teber, E. T., Loy, C., Hallupp, M., Nicholson, G., Mellick, G. D., . . . Schofield, P. R. (2004). Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol, 55*(3), 329-334. doi:10.1002/ana.10826

LaFerla, F. M., & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med, 11*(4), 170-176. doi:10.1016/j.molmed.2005.02.009

Landino, L. M., Skreslet, T. E., & Alston, J. A. (2004). Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite: modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system. *J Biol Chem, 279*(33), 35101-35105. doi:10.1074/jbc.M405471200

Landrieu, I., Smet-Nocca, C., Amniai, L., Louis, J. V., Wieruszeski, J. M., Goris, J., . . . Lippens, G. (2011). Molecular implication of PP2A and Pin1 in the Alzheimer's disease specific hyperphosphorylation of Tau. *PLoS One, 6*(6), e21521. doi:10.1371/journal.pone.0021521

LaPointe, N. E., Morfini, G., Pigino, G., Gaisina, I. N., Kozikowski, A. P., Binder, L. I., & Brady, S. T. (2009). The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J Neurosci Res, 87*(2), 440-451. doi:10.1002/jnr.21850

Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Guerrero-Muoz, M. J., Jackson, G. R., & Kayed, R. (2010). Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry, 49*(47), 10039-10041. doi:10.1021/bi1016233

Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Clos, A. L., Jackson, G. R., & Kayed, R. (2011a). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener, 6*, 39. doi:10.1186/1750-1326-6-39

Lebouvier, T., Scales, T. M., Williamson, R., Noble, W., Duyckaerts, C., Hanger, D. P., . . . Derkinderen, P. (2009). The microtubule-associated protein tau is also phosphorylated on tyrosine. *J Alzheimers Dis, 18*(1), 1-9. doi:10.3233/jad-2009-1116

Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaço, C., & Avila, J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem, 269*(34), 21614-21619.

Ledesma, M. D., Medina, M., & Avila, J. (1996). The in vitro formation of recombinant tau polymers: effect of phosphorylation and glycation. *Mol Chem Neuropathol, 27*(3), 249-258. doi:10.1007/bf02815107

Lee, G., Cowan, N., & Kirschner, M. (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science, 239*(4837), 285-288. doi:10.1126/science.3122323

Lee, G., Newman, S. T., Gard, D. L., Band, H., & Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci, 111 (Pt 21)*, 3167-3177.

Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., . . . Ksiezak-Reding, H. (2004). Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci, 24*(9), 2304-2312. doi:10.1523/jneurosci.4162-03.2004

Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., & Tsai, L. H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature, 405*(6784), 360-364. doi:10.1038/35012636

Lee, V. M., Goedert, M., & Trojanowski, J. Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci, 24*, 1121-1159. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1121

Leroy, K., Boutajangout, A., Authelet, M., Woodgett, J. R., Anderton, B. H., & Brion, J. P. (2002). The active form of glycogen synthase kinase-3beta is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol, 103*(2), 91-99. doi:10.1007/s004010100435

Lewis, J., & Dickson, D. W. (2016). Propagation of tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol, 131*(1), 27-48. doi:10.1007/s00401-015-1507-z

Li, G., Yin, H., & Kuret, J. (2004). Casein kinase 1 delta phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules. *J Biol Chem, 279*(16), 15938-15945. doi:10.1074/jbc.M314116200

Li, T., Hawkes, C., Qureshi, H. Y., Kar, S., & Paudel, H. K. (2006). Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry, 45*(10), 3134-3145. doi:10.1021/bi051635j

Li, X. C., Hu, Y., Wang, Z. H., Luo, Y., Zhang, Y., Liu, X. P., . . . Wang, J. Z. (2016). Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins. *Sci Rep, 6*, 24756. doi:10.1038/srep24756

Lindwall, G., & Cole, R. D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem, 259*(8), 5301-5305.

Liou, Y. C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X. Z., Yu, Z. X., Huang, H. K., . . . Lu, K. P. (2003). Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature, 424*(6948), 556-561. doi:10.1038/nature01832

Litvan, I., Lees, P. S., Cunningham, C. R., Rai, S. N., Cambon, A. C., Standaert, D. G., . . . Shprecher, D. R. (2016). Environmental and occupational risk factors for progressive supranuclear palsy: Case-control study. *Mov Disord, 31*(5), 644-652. doi:10.1002/mds.26512

Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci, 22*(8), 1942-1950. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x

Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G. W., & Gong, C. X. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(29), 10804-10809. doi:10.1073/pnas.0400348101

Liu, F., Li, B., Tung, E. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. X. (2007). Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci, 26*(12), 3429-3436. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x

Liu, F., Liang, Z., Wegiel, J., Hwang, Y. W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., . . . Gong, C. X. (2008). Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Faseb j, 22*(9), 3224-3233. doi:10.1096/fj.07-104539

Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., . . . Gong, C. X. (2009). Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain, 132*(Pt 7), 1820-1832. doi:10.1093/brain/awp099

Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., & Gong, C. X. (2002). Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience, 115*(3), 829-837. doi:10.1016/s0306-4522(02)00510-9

Liu, S. J., Zhang, J. Y., Li, H. L., Fang, Z. Y., Wang, Q., Deng, H. M., . . . Wang, J. Z. (2004). Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem, 279*(48), 50078-50088. doi:10.1074/jbc.M406109200

Llorens-Martín, M., Jurado, J., Hernández, F., & Avila, J. (2014). GSK-3β, a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci, 7*, 46. doi:10.3389/fnmol.2014.00046

Lovestone, S., Reynolds, C. H., Latimer, D., Davis, D. R., Anderton, B. H., Gallo, J. M., . . . et al. (1994). Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol, 4*(12), 1077-1086. doi:10.1016/s0960-9822(00)00246-3

Lu, M., & Kosik, K. S. (2001). Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell, 12*(1), 171-184. doi:10.1091/mbc.12.1.171

Luna-Muñoz, J., R, C., M, C., Flores-Rodriguez, P., Avila, J., R, S., . . . Floran, B. (2013). Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease.

Luo, Y., Ma, B., Nussinov, R., & Wei, G. (2014). Structural Insight into Tau Protein's Paradox of Intrinsically Disordered Behavior, Self-Acetylation Activity, and Aggregation. *J Phys Chem Lett, 5*(17), 3026-3031. doi:10.1021/jz501457f

Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D., & Richter-Landsberg, C. (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res, 288*(2), 239-249. doi:10.1007/s004410050809

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., . . . Takashima, A. (2007). Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry, 46*(12), 3856-3861. doi:10.1021/bi061359o

Makrides, V., Shen, T. E., Bhatia, R., Smith, B. L., Thimm, J., Lal, R., & Feinstein, S. C. (2003). Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. *J Biol Chem, 278*(35), 33298-33304. doi:10.1074/jbc.M305207200

Mamun, A. A., Uddin, M. S., Mathew, B., & Ashraf, G. M. (2020). Toxic tau: structural origins of tau aggregation in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res, 15*(8), 1417-1420. doi:10.4103/1673-5374.274329

Marsh, J. L., & Thompson, L. M. (2006). Drosophila in the study of neurodegenerative disease. *Neuron, 52*(1), 169-178. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.025

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev, 12*(1), 289-309. doi:10.1016/j.arr.2012.06.003

Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L. A., McKeel, D. W., Jr., & Morris, J. C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology, 56*(1), 127-129. doi:10.1212/wnl.56.1.127

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., & Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A, 82*(12), 4245-4249. doi:10.1073/pnas.82.12.4245

Matenia, D., & Mandelkow, E. M. (2009). The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci, 34*(7), 332-342. doi:10.1016/j.tibs.2009.03.008

McMillan, P. J., Kraemer, B. C., Robinson, L., Leverenz, J. B., Raskind, M., & Schellenberg, G. (2011). Truncation of tau at E391 promotes early pathologic changes in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol, 70*(11), 1006-1019. doi:10.1097/NEN.0b013e31823557fb

Merrick, S. E., Demoise, D. C., & Lee, V. M. (1996). Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser202/Thr205 in response to microtubule depolymerization in cultured human neurons involves protein phosphatase 2A. *J Biol Chem, 271*(10), 5589-5594. doi:10.1074/jbc.271.10.5589

Migheli, A., Butler, M., Brown, K., & Shelanski, M. L. (1988). Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J Neurosci, 8*(6), 1846-1851. doi:10.1523/jneurosci.08-06-01846.1988

Min, S. W., Chen, X., Tracy, T. E., Li, Y., Zhou, Y., Wang, C., . . . Gan, L. (2015). Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nat Med, 21*(10), 1154-1162. doi:10.1038/nm.3951

Min, S. W., Cho, S. H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W. W., . . . Gan, L. (2010). Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron, 67*(6), 953-966. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.044

Miyasaka, T., Watanabe, A., Saito, Y., Murayama, S., Mann, D. M., Yamazaki, M., . . . Ihara, Y. (2005). Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads. *J Neuropathol Exp Neurol, 64*(8), 665-674. doi:10.1097/01.jnen.0000173890.79058.1d

Mocanu, M. M., Nissen, A., Eckermann, K., Khlistunova, I., Biernat, J., Drexler, D., . . . Mandelkow, E. M. (2008). The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy. *J Neurosci, 28*(3), 737-748. doi:10.1523/jneurosci.2824-07.2008

Mohit, A. A., Martin, J. H., & Miller, C. A. (1995). p493F12 kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron, 14*(1), 67-78. doi:10.1016/0896-6273(95)90241-4

Mondragón-Rodríguez, S., Basurto-Islas, G., Santa-Maria, I., Mena, R., Binder, L. I., Avila, J., . . . García-Sierra, F. (2008). Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol, 89*(2), 81-90. doi:10.1111/j.1365-2613.2007.00568.x

Morris, H. R., Baker, M., Yasojima, K., Houlden, H., Khan, M. N., Wood, N. W., . . . Hutton, M. (2002). Analysis of tau haplotypes in Pick's disease. *Neurology, 59*(3), 443-445. doi:10.1212/wnl.59.3.443

Morris, M., Knudsen, G. M., Maeda, S., Trinidad, J. C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A. L., & Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci, 18*(8), 1183-1189. doi:10.1038/nn.4067

Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., & Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron, 70*(3), 410-426. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.009

Mudher, A., Shepherd, D., Newman, T. A., Mildren, P., Jukes, J. P., Squire, A., . . . Lovestone, S. (2004). GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in Drosophila. *Mol Psychiatry, 9*(5), 522-530. doi:10.1038/sj.mp.4001483

Mukrasch, M. D., von Bergen, M., Biernat, J., Fischer, D., Griesinger, C., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2007). The "jaws" of the tau-microtubule interaction. *J Biol Chem, 282*(16), 12230-12239. doi:10.1074/jbc.M607159200

Muntané, G., Dalfó, E., Martinez, A., & Ferrer, I. (2008). Phosphorylation of tau and alpha-synuclein in synaptic-enriched fractions of the frontal cortex in Alzheimer's disease, and in Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies. *Neuroscience, 152*(4), 913-923. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.030

Nacharaju, P., Lewis, J., Easson, C., Yen, S., Hackett, J., Hutton, M., & Yen, S. H. (1999). Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett, 447*(2-3), 195-199. doi:10.1016/s0014-5793(99)00294-x

Necula, M., & Kuret, J. (2004). Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro. *J Biol Chem, 279*(48), 49694-49703. doi:10.1074/jbc.M405527200

Neumann, M., Diekmann, S., Bertsch, U., Vanmassenhove, B., Bogerts, B., & Kretzschmar, H. A. (2005). Novel G335V mutation in the tau gene associated with early onset familial frontotemporal dementia. *Neurogenetics, 6*(2), 91-95. doi:10.1007/s10048-005-0210-y

Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., & Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res, 387*(3), 271-280. doi:10.1016/0169-328x(86)90033-1

Newman, T., Sinadinos, C., Johnston, A., Sealey, M., & Mudher, A. (2011). Using Drosophila models of neurodegenerative diseases for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov, 6*(2), 129-140. doi:10.1517/17460441.2011.549124

Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C., & Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol, 4*, 83. doi:10.3389/fneur.2013.00083

Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., . . . Duff, K. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron, 38*(4), 555-565. doi:10.1016/s0896-6273(03)00259-9

Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., . . . Duff, K. (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(19), 6990-6995. doi:10.1073/pnas.0500466102

Nonaka, T., Watanabe, S. T., Iwatsubo, T., & Hasegawa, M. (2010). Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem, 285*(45), 34885-34898. doi:10.1074/jbc.M110.148460

Novak, M., Kabat, J., & Wischik, C. M. (1993). Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *Embo j, 12*(1), 365-370.

Nukina, N., Kosik, K. S., & Selkoe, D. J. (1988). The monoclonal antibody, Alz 50, recognizes tau proteins in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett, 87*(3), 240-246. doi:10.1016/0304-3940(88)90455-7

Oakley, S. S., Maina, M. B., Marshall, K. E., Al-Hilaly, Y. K., Harrington, C. R., Wischik, C. M., & Serpell, L. C. (2020). Tau Filament Self-Assembly and Structure: Tau as a Therapeutic Target. *Front Neurol, 11*, 590754. doi:10.3389/fneur.2020.590754

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., . . . LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron, 39*(3), 409-421. doi:10.1016/s0896-6273(03)00434-3

Panda, D., Samuel, J. C., Massie, M., Feinstein, S. C., & Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A, 100*(16), 9548-9553. doi:10.1073/pnas.1633508100

Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S., & Skoulakis, E. M. (2010). Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. *Biochem Soc Trans, 38*(4), 981-987. doi:10.1042/bst0380981

Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2015). Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in Drosophila. *Hum Mol Genet, 24*(7), 2065-2077. doi:10.1093/hmg/ddu726

Papasozomenos, S. C., & Binder, L. I. (1987). Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton, 8*(3), 210-226. doi:10.1002/cm.970080303

Pastor, P., Ezquerra, M., Muñoz, E., Martí, M. J., Blesa, R., Tolosa, E., & Oliva, R. (2000). Significant association between the tau gene A0/A0 genotype and Parkinson's disease. *Ann Neurol, 47*(2), 242-245.

Pastor, P., Moreno, F., Clarimón, J., Ruiz, A., Combarros, O., Calero, M., . . . Sánchez-Juan, P. (2016). MAPT H1 Haplotype is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease Risk in APOEε4 Noncarriers: Results from the Dementia Genetics Spanish Consortium. *J Alzheimers Dis, 49*(2), 343-352. doi:10.3233/jad-150555

Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., & Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature, 402*(6762), 615-622. doi:10.1038/45159

Patterson, K. R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N. M., Vana, L., . . . Binder, L. I. (2011). Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J Biol Chem, 286*(26), 23063-23076. doi:10.1074/jbc.M111.237974

Paulus, W., & Selim, M. (1990). Corticonigral degeneration with neuronal achromasia and basal neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol, 81*(1), 89-94. doi:10.1007/bf00662643

Peeraer, E., Bottelbergs, A., Van Kolen, K., Stancu, I. C., Vasconcelos, B., Mahieu, M., . . . Moechars, D. (2015). Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiol Dis, 73*, 83-95. doi:10.1016/j.nbd.2014.08.032

Pei, J. J., Gong, C. X., An, W. L., Winblad, B., Cowburn, R. F., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2003). Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol, 163*(3), 845-858. doi:10.1016/s0002-9440(10)63445-1

Pei, J. J., Tanaka, T., Tung, Y. C., Braak, E., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (1997). Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol, 56*(1), 70-78. doi:10.1097/00005072-199701000-00007

Pérez, M., Valpuesta, J. M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., & Avila, J. (1996). Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem, 67*(3), 1183-1190. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67031183.x

Pickering-Brown, S. M., Baker, M., Nonaka, T., Ikeda, K., Sharma, S., Mackenzie, J., . . . Mann, D. M. (2004). Frontotemporal dementia with Pick-type histology associated with Q336R mutation in the tau gene. *Brain, 127*(Pt 6), 1415-1426. doi:10.1093/brain/awh147

Pitman, J. L., DasGupta, S., Krashes, M. J., Leung, B., Perrat, P. N., & Waddell, S. (2009). There are many ways to train a fly. *Fly (Austin), 3*(1), 3-9. doi:10.4161/fly.3.1.7726

Plattner, F., Angelo, M., & Giese, K. P. (2006). The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem, 281*(35), 25457-25465. doi:10.1074/jbc.M603469200

Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., . . . Schellenberg, G. D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol, 43*(6), 815-825. doi:10.1002/ana.410430617

Prinz, P. N., Peskind, E. R., Vitaliano, P. P., Raskind, M. A., Eisdorfer, C., Zemcuznikov, N., & Gerber, C. J. (1982). Changes in the sleep and waking EEGs of nondemented and demented elderly subjects. *J Am Geriatr Soc, 30*(2), 86-93. doi:10.1111/j.1532-5415.1982.tb01279.x

Qiang, L., Sun, X., Austin, T. O., Muralidharan, H., Jean, D. C., Liu, M., . . . Baas, P. W. (2018). Tau Does Not Stabilize Axonal Microtubules but Rather Enables Them to Have Long Labile Domains. *Curr Biol, 28*(13), 2181-2189.e2184. doi:10.1016/j.cub.2018.05.045

Quinn, W. G., Harris, W. A., & Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A, 71*(3), 708-712. doi:10.1073/pnas.71.3.708

Quraishe, S., Cowan, C. M., & Mudher, A. (2013). NAP (davunetide) rescues neuronal dysfunction in a Drosophila model of tauopathy. *Mol Psychiatry, 18*(7), 834-842. doi:10.1038/mp.2013.32

Rahman, A., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Phosphothreonine-212 of Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau is a preferred substrate of protein phosphatase-1. *Neurochem Res, 30*(2), 277-287. doi:10.1007/s11064-005-2483-9

Rahman, A., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2006). PP2B isolated from human brain preferentially dephosphorylates Ser-262 and Ser-396 of the Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated tau. *J Neural Transm (Vienna), 113*(2), 219-230. doi:10.1007/s00702-005-0313-5

Rankin, C. A., Sun, Q., & Gamblin, T. C. (2005). Pseudo-phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 affects tau filament formation. *Brain Res Mol Brain Res, 138*(1), 84-93. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.04.012

Rankin, C. A., Sun, Q., & Gamblin, T. C. (2008). Pre-assembled tau filaments phosphorylated by GSK-3b form large tangle-like structures. *Neurobiol Dis, 31*(3), 368-377. doi:10.1016/j.nbd.2008.05.011

Reed, L. A., Wszolek, Z. K., & Hutton, M. (2001). Phenotypic correlations in FTDP-17. *Neurobiol Aging, 22*(1), 89-107. doi:10.1016/s0197-4580(00)00202-5

Reyes, J. F., Geula, C., Vana, L., & Binder, L. I. (2012). Selective tau tyrosine nitration in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol, 123*(1), 119-132. doi:10.1007/s00401-011-0898-8

Reyes, J. F., Reynolds, M. R., Horowitz, P. M., Fu, Y., Guillozet-Bongaarts, A. L., Berry, R., & Binder, L. I. (2008). A possible link between astrocyte activation and tau nitration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis, 31*(2), 198-208. doi:10.1016/j.nbd.2008.04.005

Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R., & Anderton, B. H. (2000). Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem, 74*(4), 1587-1595. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0741587.x

Reynolds, C. H., Garwood, C. J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., . . . Anderton, B. H. (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of

phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem, 283*(26), 18177-18186. doi:10.1074/jbc.M709715200

Riederer, I. M., Schiffrin, M., Kövari, E., Bouras, C., & Riederer, B. M. (2009). Ubiquitination and cysteine nitrosylation during aging and Alzheimer's disease. *Brain Res Bull, 80*(4-5), 233-241. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.04.018

Ryoo, S. R., Jeong, H. K., Radnaabazar, C., Yoo, J. J., Cho, H. J., Lee, H. W., . . . Song, W. J. (2007). DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J Biol Chem, 282*(48), 34850-34857. doi:10.1074/jbc.M707358200

Sahara, N., Maeda, S., Murayama, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Yen, S. H., & Takashima, A. (2007). Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci, 25*(10), 3020-3029. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05555.x

Sahara, N., Maeda, S., & Takashima, A. (2008). Tau oligomerization: a role for tau aggregation intermediates linked to neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res, 5*(6), 591-598. doi:10.2174/156720508786898442

Sato, S., Cerny, R. L., Buescher, J. L., & Ikezu, T. (2006). Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation. *J Neurochem, 98*(5), 1573-1584. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04059.x

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., . . . Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med, 2*(8), 864-870. doi:10.1038/nm0896-864

Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry, 38*(12), 3549-3558. doi:10.1021/bi981874p

Scholz, T., & Mandelkow, E. (2014). Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci, 71*(16), 3139-3150. doi:10.1007/s00018-014-1610-7

Schwab, C., DeMaggio, A. J., Ghoshal, N., Binder, L. I., Kuret, J., & McGeer, P. L. (2000). Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging, 21*(4), 503-510. doi:10.1016/s0197-4580(00)00110-x

Schweers, O., Mandelkow, E. M., Biernat, J., & Mandelkow, E. (1995). Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A, 92*(18), 8463-8467. doi:10.1073/pnas.92.18.8463

Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., & Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem, 269*(39), 24290-24297.

Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1998). Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys, 357*(2), 299-309. doi:10.1006/abbi.1998.0813

Sergeant, N., David, J. P., Goedert, M., Jakes, R., Vermersch, P., Buée, L., . . . Delacourte, A. (1997a). Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J Neurochem, 69*(2), 834-844. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69020834.x

Sergeant, N., David, J. P., Lefranc, D., Vermersch, P., Wattez, A., & Delacourte, A. (1997b). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett, 412*(3), 578-582. doi:10.1016/s0014-5793(97)00859-4

Sergeant, N., Delacourte, A., & Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta, 1739*(2-3), 179-197. doi:10.1016/j.bbadis.2004.06.020

Sergeant, N., Wattez, A., & Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms. *J Neurochem, 72*(3), 1243-1249. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0721243.x

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., . . . St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature, 375*(6534), 754-760. doi:10.1038/375754a0

Shulman, J. M., & Feany, M. B. (2003). Genetic modifiers of tauopathy in Drosophila. *Genetics, 165*(3), 1233-1242. doi:10.1093/genetics/165.3.1233

Sillen, A., Barbier, P., Landrieu, I., Lefebvre, S., Wieruszeski, J. M., Leroy, A., . . . Lippens, G. (2007). NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry, 46*(11), 3055-3064. doi:10.1021/bi061920i

Singer, S. M., Zainelli, G. M., Norlund, M. A., Lee, J. M., & Muma, N. A. (2002). Transglutaminase bonds in neurofibrillary tangles and paired helical filament tau early in Alzheimer's disease. *Neurochem Int, 40*(1), 17-30. doi:10.1016/s0197-0186(01)00061-4

Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1995). Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J Neurochem, 64*(3), 1420-1423. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64031420.x

Skoulakis, E. M., & Grammenoudi, S. (2006). Dunces and da Vincis: the genetics of learning and memory in Drosophila. *Cell Mol Life Sci, 63*(9), 975-988. doi:10.1007/s00018-006-6023-9

Smet-Nocca, C., Broncel, M., Wieruszeski, J. M., Tokarski, C., Hanoulle, X., Leroy, A., . . . Hackenberger, C. P. (2011). Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation. *Mol Biosyst, 7*(5), 1420-1429. doi:10.1039/c0mb00337a

Sontag, J. M., Nunbhakdi-Craig, V., White, C. L., 3rd, Halpain, S., & Sontag, E. (2012). The protein phosphatase PP2A/Bα binds to the microtubule-associated proteins Tau and MAP2 at a motif also recognized by the kinase Fyn: implications for tauopathies. *J Biol Chem, 287*(18), 14984-14993. doi:10.1074/jbc.M111.338681

Sotiropoulos, I., Galas, M. C., Silva, J. M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M. B., . . . Buee, L. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun, 5*(1), 91. doi:10.1186/s40478-017-0489-6

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., & Goedert, M. (1996). Comparison of the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease and familial presenile dementia with tangles. *Acta Neuropathol, 92*(1), 42-48. doi:10.1007/s004010050487

Spillantini, M. G., Goedert, M., Crowther, R. A., Murrell, J. R., Farlow, M. R., & Ghetti, B. (1997). Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A, 94*(8), 4113-4118. doi:10.1073/pnas.94.8.4113

Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A., & Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95*(13), 7737-7741. doi:10.1073/pnas.95.13.7737

Spina, S., Murrell, J. R., Yoshida, H., Ghetti, B., Bermingham, N., Sweeney, B., . . . Keohane, C. (2007). The novel Tau mutation G335S: clinical, neuropathological and molecular characterization. *Acta Neuropathol, 113*(4), 461-470. doi:10.1007/s00401-006-0182-5

Steele, J. C., Richardson, J. C., & Olszewski, J. (1964). PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY. A HETEROGENEOUS DEGENERATION INVOLVING THE BRAIN STEM, BASAL GANGLIA AND CEREBELLUM WITH VERTICAL GAZE AND PSEUDOBULBAR PALSY, NUCHAL DYSTONIA AND DEMENTIA. *Arch Neurol, 10*, 333-359. doi:10.1001/archneur.1964.00460160003001

Stefanoska, K., Volkerling, A., Bertz, J., Poljak, A., Ke, Y. D., Ittner, L. M., & Ittner, A. (2018). An N-terminal motif unique to primate tau enables differential protein-protein interactions. *J Biol Chem, 293*(10), 3710-3719. doi:10.1074/jbc.RA118.001784

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L., & Feany, M. B. (2007a). Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol Biol Cell, 18*(12), 5060-5068. doi:10.1091/mbc.e07-04-0327

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Mulkearns, E. E., Shulman, J. M., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Feany, M. B. (2007b). S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in Drosophila. *J Neurosci Res, 85*(6), 1271-1278. doi:10.1002/jnr.21232

Stern, J. L., Lessard, D. V., Hoeprich, G. J., Morfini, G. A., & Berger, C. L. (2017). Phosphoregulation of Tau modulates inhibition of kinesin-1 motility. *Mol Biol Cell, 28*(8), 1079-1087. doi:10.1091/mbc.E16-10-0728

Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., & Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A, 90*(5), 1977-1981. doi:10.1073/pnas.90.5.1977

Su, B., Wang, X., Lee, H. G., Tabaton, M., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2010). Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett, 468*(3), 267-271. doi:10.1016/j.neulet.2009.11.010

Sun, L., Wang, X., Liu, S., Wang, Q., Wang, J., Bennecib, M., . . . Iqbal, K. (2005). Bilateral injection of isoproterenol into hippocampus induces Alzheimer-like

hyperphosphorylation of tau and spatial memory deficit in rat. *FEBS Lett, 579*(1), 251-258. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.083

Tacik, P., DeTure, M., Hinkle, K. M., Lin, W. L., Sanchez-Contreras, M., Carlomagno, Y., . . . Dickson, D. W. (2015). A Novel Tau Mutation in Exon 12, p.Q336H, Causes Hereditary Pick Disease. *J Neuropathol Exp Neurol, 74*(11), 1042-1052. doi:10.1097/nen.0000000000000248

Takahashi, K., Ishida, M., Komano, H., & Takahashi, H. (2008). SUMO-1 immunoreactivity co-localizes with phospho-Tau in APP transgenic mice but not in mutant Tau transgenic mice. *Neurosci Lett, 441*(1), 90-93. doi:10.1016/j.neulet.2008.06.012

Takahashi, M., Tsujioka, Y., Yamada, T., Tsuboi, Y., Okada, H., Yamamoto, T., & Liposits, Z. (1999). Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol, 97*(6), 635-641. doi:10.1007/s004010051040

Tanzi, R. E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med, 2*(10). doi:10.1101/cshperspect.a006296

Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., & Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport, 8*(12), 2797-2801. doi:10.1097/00001756-199708180-00029

Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., . . . Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol, 30*(4), 572-580. doi:10.1002/ana.410300410

Tiernan, C. T., Combs, B., Cox, K., Morfini, G., Brady, S. T., Counts, S. E., & Kanaan, N. M. (2016). Pseudophosphorylation of tau at S422 enhances SDS-stable dimer formation and impairs both anterograde and retrograde fast axonal transport. *Exp Neurol, 283*(Pt A), 318-329. doi:10.1016/j.expneurol.2016.06.030

Timm, T., Marx, A., Panneerselvam, S., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2008). Structure and regulation of MARK, a kinase involved in abnormal phosphorylation of Tau protein. *BMC Neurosci, 9 Suppl 2*(Suppl 2), S9. doi:10.1186/1471-2202-9-s2-s9

Tolnay, M., Sergeant, N., Ghestem, A., Chalbot, S., De Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., . . . Delacourte, A. (2002). Argyrophilic grain disease and Alzheimer's disease are distinguished by their different distribution of tau protein isoforms. *Acta Neuropathol, 104*(4), 425-434. doi:10.1007/s00401-002-0591-z

Tomizawa, K., Omori, A., Ohtake, A., Sato, K., & Takahashi, M. (2001). Tau-tubulin kinase phosphorylates tau at Ser-208 and Ser-210, sites found in paired helical filament-tau. *FEBS Lett, 492*(3), 221-227. doi:10.1016/s0014-5793(01)02256-6

Tomonaga, M. (1977). Ultrastructure of neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol, 37*(2), 177-181. doi:10.1007/bf00692065

Tracy, T. E., Sohn, P. D., Minami, S. S., Wang, C., Min, S. W., Li, Y., . . . Gan, L. (2016). Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss. *Neuron, 90*(2), 245-260. doi:10.1016/j.neuron.2016.03.005

Tuerde, D., Kimura, T., Miyasaka, T., Furusawa, K., Shimozawa, A., Hasegawa, M., . . . Hisanaga, S. I. (2018). Isoform-independent and -dependent phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mouse brain during postnatal development. *J Biol Chem, 293*(5), 1781-1793. doi:10.1074/jbc.M117.798918

Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., & Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila. *Cell, 79*(1), 35-47. doi:10.1016/0092-8674(94)90398-0

Tully, T., & Quinn, W. G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster. *J Comp Physiol A, 157*(2), 263-277. doi:10.1007/bf01350033

Ugolini, G., Cattaneo, A., & Novak, M. (1997). Co-localization of truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's disease neurones. *Neuroreport, 8*(17), 3709-3712. doi:10.1097/00001756-199712010-00010

Vanier, M. T., Neuville, P., Michalik, L., & Launay, J. F. (1998). Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci, 111 (Pt 10)*, 1419-1432.

Vega, I. E., Cui, L., Propst, J. A., Hutton, M. L., Lee, G., & Yen, S. H. (2005). Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Brain Res Mol Brain Res, 138*(2), 135-144. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.04.015

Vingtdeux, V., Davies, P., Dickson, D. W., & Marambaud, P. (2011). AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol, 121*(3), 337-349. doi:10.1007/s00401-010-0759-x

von Bergen, M., Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2005). Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta, 1739*(2-3), 158-166. doi:10.1016/j.bbadis.2004.09.010

von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A, 97*(10), 5129-5134. doi:10.1073/pnas.97.10.5129

Wakabayashi, K., Oyanagi, K., Makifuchi, T., Ikuta, F., Homma, A., Homma, Y., . . . Tokiguchi, S. (1994). Corticobasal degeneration: etiopathological significance of the cytoskeletal alterations. *Acta Neuropathol, 87*(6), 545-553. doi:10.1007/bf00293314

Wang, A. C., Jensen, E. H., Rexach, J. E., Vinters, H. V., & Hsieh-Wilson, L. C. (2016). Loss of O-GlcNAc glycosylation in forebrain excitatory neurons induces neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A, 113*(52), 15120-15125. doi:10.1073/pnas.1606899113

Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med, 2*(8), 871-875. doi:10.1038/nm0896-871

Wang, Q. M., Fiol, C. J., DePaoli-Roach, A. A., & Roach, P. J. (1994). Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem, 269*(20), 14566-14574.

Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci, 17*(1), 5-21. doi:10.1038/nrn.2015.1

Watanabe, A., Takio, K., & Ihara, Y. (1999). Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *J Biol Chem, 274*(11), 7368-7378. doi:10.1074/jbc.274.11.7368

Weaver, C. L., Espinoza, M., Kress, Y., & Davies, P. (2000). Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging, 21*(5), 719-727. doi:10.1016/s0197-4580(00)00157-3

Wegiel, J., Kaczmarski, W., Barua, M., Kuchna, I., Nowicki, K., Wang, K. C., . . . Gong, C. X. (2011). Link between DYRK1A overexpression and several-fold enhancement of neurofibrillary degeneration with 3-repeat tau protein in Down syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol, 70*(1), 36-50. doi:10.1097/NEN.0b013e318202bfa1

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A, 72*(5), 1858-1862. doi:10.1073/pnas.72.5.1858

Wilhelmsen, K. C. (1997). Disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex (DDPAC) is a non-Alzheimer's frontotemporal dementia. *J Neural Transm Suppl, 49*, 269-275. doi:10.1007/978-3-7091-6844-8_26

Wilhelmus, M. M., Grunberg, S. C., Bol, J. G., van Dam, A. M., Hoozemans, J. J., Rozemuller, A. J., & Drukarch, B. (2009). Transglutaminases and transglutaminase-catalyzed cross-links colocalize with the pathological lesions in Alzheimer's disease brain. *Brain Pathol, 19*(4), 612-622. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00197.x

Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1992). Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol, 118*(3), 573-584. doi:10.1083/jcb.118.3.573

Wilson, D. M., & Binder, L. I. (1997). Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol, 150*(6), 2181-2195.

Witman, G. B., Cleveland, D. W., Weingarten, M. D., & Kirschner, M. W. (1976). Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A, 73*(11), 4070-4074. doi:10.1073/pnas.73.11.4070

Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., & Feany, M. B. (2001). Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science, 293*(5530), 711-714. doi:10.1126/science.1062382

Wszolek, Z. K., Tsuboi, Y., Farrer, M., Uitti, R. J., & Hutton, M. L. (2003). Hereditary tauopathies and parkinsonism. *Adv Neurol, 91*, 153-163.

Xia, Y., Prokop, S., & Giasson, B. I. (2021). "Don't Phos Over Tau": recent developments in clinical biomarkers and therapies targeting tau phosphorylation in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Mol Neurodegener, 16*(1), 37. doi:10.1186/s13024-021-00460-5

Xia, Y., Prokop, S., Gorion, K. M., Kim, J. D., Sorrentino, Z. A., Bell, B. M., . . . Giasson, B. I. (2020). Tau Ser208 phosphorylation promotes aggregation and reveals neuropathologic diversity in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol Commun, 8*(1), 88. doi:10.1186/s40478-020-00967-w

Yamaguchi, F., Umeda, Y., Shimamoto, S., Tsuchiya, M., Tokumitsu, H., Tokuda, M., & Kobayashi, R. (2012). S100 proteins modulate protein phosphatase 5 function: a link between CA2+ signal transduction and protein dephosphorylation. *J Biol Chem, 287*(17), 13787-13798. doi:10.1074/jbc.M111.329771

Yamaguchi, H., Ishiguro, K., Uchida, T., Takashima, A., Lemere, C. A., & Imahori, K. (1996). Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol, 92*(3), 232-241. doi:10.1007/s004010050513

Yasojima, K., Kuret, J., DeMaggio, A. J., McGeer, E., & McGeer, P. L. (2000). Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res, 865*(1), 116-120. doi:10.1016/s0006-8993(00)02200-9

Yoshida, H., & Goedert, M. (2002). Molecular cloning and functional characterization of chicken brain tau: isoforms with up to five tandem repeats. *Biochemistry, 41*(51), 15203-15211. doi:10.1021/bi026464m

Yu, Y., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, F., Liu, Y., . . . Gong, C. X. (2009). Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J Neurochem, 108*(6), 1480-1494. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05882.x

Yuzwa, S. A., Macauley, M. S., Heinonen, J. E., Shan, X., Dennis, R. J., He, Y., . . . Vocadlo, D. J. (2008). A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol, 4*(8), 483-490. doi:10.1038/nchembio.96

Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., . . . Trojanowski, J. Q. (2005). Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(1), 227-231. doi:10.1073/pnas.0406361102

Zhang, C. C., Zhu, J. X., Wan, Y., Tan, L., Wang, H. F., Yu, J. T., & Tan, L. (2017). Meta-analysis of the association between variants in MAPT and neurodegenerative diseases. *Oncotarget, 8*(27), 44994-45007. doi:10.18632/oncotarget.16690

Zhang, W., Tarutani, A., Newell, K. L., Murzin, A. G., Matsubara, T., Falcon, B., . . . Scheres, S. H. W. (2020). Novel tau filament fold in corticobasal degeneration. *Nature, 580*(7802), 283-287. doi:10.1038/s41586-020-2043-0

Zhang, Y. J., Xu, Y. F., Liu, Y. H., Yin, J., Li, H. L., Wang, Q., & Wang, J. Z. (2006). Peroxynitrite induces Alzheimer-like tau modifications and accumulation in rat brain and its underlying mechanisms. *Faseb j, 20*(9), 1431-1442. doi:10.1096/fj.05-5223com

Zhu, X., Raina, A. K., Rottkamp, C. A., Aliev, G., Perry, G., Boux, H., & Smith, M. A. (2001). Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem, 76*(2), 435-441. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00046.x

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις των θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ που διέπουν την τοξικότητα της και την ελλιπή μάθηση στο μοντέλο της *Drosophila melanogaster*

1.1. Περίληψη

Η υπερ-φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ είναι το κύριο συστατικό των νευροϊνιδιακών πλεγμάτων, που χαρακτηρίζει τους εκφυλισμένους νευρώνες στη νόσο του Alzheimer και σε άλλες Τ πρωτεϊνοπάθειες. Η έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) της *D.melanogaster* οδηγεί σε αυξημένη τοξικότητα, πρόωρη θνησιμότητα και σε ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν νέα διαγονιδιακά στελέχη για να χαρακτηριστούν συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, οι οποίες καθορίζουν την τοξικότητά της. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά στελέχη, τα Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262}, στα οποία είτε έχει αντικατασταθεί η Ser/Thr με την φωσφο-ανθεκτική αλανίνη (Ala), μπλοκάροντας με αυτό τον τρόπο την φωσφορυλίωση σε αυτή τη θέση, είτε με το φωσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ(Glu) οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε ψευδο-φωσφορυλίωση. Με τα στελέχη αυτά, επαληθεύτηκε η υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση της Ser^{262} είναι απαραίτητη για την εμφάνιση των μαθησιακών ελλειμμάτων και δρα ως «διευκολυντής θυροφύλακας» για την φωσφορυλίωση της Ser^{238}, η οποία συνδέεται με την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η αποκάλυψη του ρόλου της φωσφορυλίωσης Thr^{245}, η οποία δρα ως «κατασταλτικός θυροφύλακας», εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση πολλών θέσεων, συμπεριλαμβανομένης και της φωσφορυλίωσης της Ser^{262} και κατά συνέπεια και της Ser^{238}. Συνεπώς, με τη παρούσα εργασία διευκρινίζουμε μοναδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφοεπιτόπων, οι οποίοι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμεσολαβούμενη νευρωνική δυσλειτουργία και τοξικότητα και πιθανόν σε αυτές να οφείλονται και οι διαμορφωτικές αλλαγές που υφίσταται η πρωτεΐνη Τ λόγω φωσφορυλίωσης.

1.2. Εισαγωγή

Η πρωτεΐνη Τ είναι μια πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη, η οποία σχετίζεται με τους νευρωνικούς μικροσωληνίσκους (Sotiropoulos et al., 2017) και είναι σημαντική για την ρύθμιση της αξονικής μεταφοράς και του μήκους των ασταθών τομέων των αξονικών μικροσωληνίσκων (Qiang et al., 2018). Στον ενήλικα ανθρώπινο εγκέφαλο υπάρχουν 6 διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ, οι οποίες προκύπτουν από ένα γονίδιο μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν από

την απουσία ή την παρουσία ενός ή δύο ενθέσεων στο αμινο-τελικό άκρο (0N, 1N, 2N), σε συνδυασμό με τη προσθήκη του εξωνίου 10 ή τον αποκλεισμό του από το mRNA (Andreadis et al., 1992). Αυτό οδηγεί σε ισομορφές με 3 (ισομορφές 3R) ή 4 (ισομορφές 4R) επαναλήψεις στο καρβοξυ-τελικό άκρο, οι οποίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις με τους μικροσωληνίσκους (Buée et al., 2000). Ένα κυρίαρχο χαρακτηριστικό και των 6 ισομορφών της πρωτεΐνης Τ που υπάρχουν στον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι το αυξημένο φορτίο φωσφορυλίωσης, το οποίο οφείλεται στις αντίρροπες δράσεις αρκετών κινασών και φωσφατασών (Johnson & Stoothoff, 2004). Πολλές κινάσες έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλιώνουν τη πρωτεΐνη Τ in vitro και σε κύτταρα, αλλά αν στοχεύουν επίσης τη πρωτεΐνη Τ in vivo και υπό ποιες συνθήκες παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστο (Hosoi et al., 1995); (Hong et al., 1997); (Zheng-Fischhöfer et al., 1998); (Gong et al., 2005).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ μπορεί να ξεκινήσει από μια συγκεκριμένη θέση πριν την εμφάνιση επιπρόσθετων φωσφορυλιώσεων (Hanger et al., 2009). Με το φαινόμενο «θυροφύλακας» φωσφορυλιώσεων θεωρείται ότι μπορεί είτε να επιτραπούν είτε να ανασταλούν διαμορφώσεις στις τοπικές τριτογενείς δομές της πρωτεΐνης (Uversky, 2015), οι οποίες μπορεί στη συνέχεια να επιτρέψουν ή να αποτρέψουν τη φωσφορυλίωση άλλων συχνά μακρινών θέσεων (Jeganathan et al., 2008); (Sibille et al., 2012); (Schwalbe et al., 2015). Ως εκ τούτου, συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης μπορεί να ρυθμίζουν δομικά την πρωτεΐνη Τ και τον κυτταρικό εντοπισμό της κάθε ισομορφής (Sotiropoulos et al., 2017) και συνεπώς να ρυθμίζουν τις λειτουργικές ιδιότητές της (Xia, Li, & Götz, 2015).

Η πρωτεΐνη Τ, ανεξαρτήτως αν είναι μεταλλαγμένη ή αγρίου τύπου, σε παθολογικές καταστάσεις παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης σε θέσεις που είναι κατειλημμένες φυσιολογικά αλλά και σε θέσεις, οι οποίες καταλαμβάνονται μόνο σε παθολογικές καταστάσεις και αναφέρονται ως φωσφοεπίτοποι "συσχετιζόμενοι με ασθένεια" (Morris et al., 2015); (Arendt et al., 2016). Αν και οι μηχανισμοί που πυροδοτούν την υπερ-φωσφορυλίωση είναι άγνωστοι προς το παρόν, το αποτέλεσμα είναι η νευρωνική εναπόθεση της υπερ-φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Τ (Martin, Latypova, & Terro, 2011). Εάν οι φωσφορυλιώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δομική διαμόρφωση και στις λειτουργικές ιδιότητες των διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης Τ, τότε η υπερ-φωσφορυλίωση είναι πολύ πιθανόν να αντικατοπτρίζει και τις σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στις ιδιότητες της πρωτεΐνης Τ και συσχετίζονται με την παθολογία της (Regan et al., 2017). Στην πραγματικότητα, η βιβλιογραφία οδηγεί στην ευρέως διαδεδομένη αντίληψη ότι η υπερ-φωσφορυλίωση είναι καθοριστική για την νευρωνική παθολογία (Stoothoff & Johnson, 2005) και παρέχει αποδείξεις, ότι η διαλυτή υπερ-φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ συμβάλλει στη νευρωνική δυσλειτουργία, πριν τη

δημιουργία των συσσωματωμάτων της (Fath et al., 2002); (Santacruz et al., 2005); (Brandt et al., 2009); (Decker et al., 2015).

Για την αναγνώριση της μη- φυσιολογικά φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Τ, σε νευρώνες ασθενών και για συγκεκριμένες θέσεις (φωσφοεπίτοποι), έχουν αναπτυχθεί ειδικά αντισώματα και χρησιμοποιούνται ως ειδικοί διαγνωστικοί δείκτες των Τ πρωτεϊνοπαθειών (Sergeant et al., 2005). Ωστόσο, ο μηχανισμός των διαδοχικών γεγονότων φωσφορυλίωσης που εμφανίζονται στη πρωτεΐνη Τ, καθώς και ποιες θέσεις είναι απαραίτητες για τη συντήρηση και την εξέλιξη της παθολογίας είναι ακόμη ασαφής. Η ταυτοποίηση των θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, που είτε ενεργοποιούν, είτε είναι απαραίτητες για την παθογένεση είναι ζωτικής σημασίας, ώστε να κατανοηθεί η νευρωνική δυσλειτουργία και τοξικότητας που μεσολαβείτε από την πρωτεΐνη Τ.

Η χρήση της *D. melanogaster,* ως μοντέλο των Τ-πρωτεϊνοπαθειών, συμβάλλει σημαντικά στη κατανόηση του συσχετισμού της τοξικότητας που παρατηρείται στους ανθρώπους με τη συσσώρευση των υπερ-φωσφορυλιωμένων προ –ινιδίων της πρωτεΐνης Τ (Wittmann et al., 2001); (Steinhilb, Dias-Santagata, Fulga, Felch, & Feany, 2007a); (Steinhilb et al., 2007b); (Feuillette et al., 2010). Πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν δυο θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, η Ser^{238} και η Thr^{245}, ως απαραίτητες για τη τοξικότητα της στα μισχοειδή σωμάτια (Mushroom Bodies, MBs) (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou et al., 2010) και για την πρόωρη θνησιμότητα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Τα μισχοειδή σωμάτια (MB) αποτελούν το κέντρο μάθησης και μνήμης στη Drosophila (Davis, 2005). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση της Ser^{238} και της Thr^{245}, αντικαθιστώντας με αλανίνες (μετάλλαξη STA), δίνει ζώα με δομικά φυσιολογικά αλλά ιδιαίτερα δυσλειτουργικά MBs, καθώς επίσης και μύγες οι οποίες παρουσιάζουν προβλήματα στη συνειρμική μάθηση (Kosmidis et al., 2010). Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση στη Ser^{238} διακατέχει σημαντικό ρόλο στη νευροτοξικότητα της πρωτεΐνης Τ in vivo. Ωστόσο, η νευρωνική δυσλειτουργία, όπως μετράται με τα μαθησιακά ελλείμματα, φαίνεται να οφείλεται στη φωσφορυλίωση της Ser^{262} (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015).

Όλες οι παραπάνω μελέτες βασίστηκαν στη χρήση του διπλού διαγονιδίου STA και με χρήση διαγονιδίων που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις πάνω στο γονιδίωμα, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεταβλητότητα, ως προς τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ. Η διαφορετική ποσότητα έκφρασης της πρωτεΐνης ανάμεσα στα διαφορετικά μεταλλάγματα, δεν αφήνει περιθώρια για ακριβή ποσοτική μέτρηση της τοξικότητας και της δυσλειτουργίας που εξαρτάται από την πρωτεΐνη Τ στο ΚΝΣ. Ως εκ τούτου, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνήσουμε το ρόλο του καθενός από τους δυο αυτούς φωσφοτόπους ανεξαρτήτως (Ser^{238} και Thr^{245}), καθώς και μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ τους, με χρήση διαγονιδίων που εκφράζουν

την πρωτεΐνη σε ισόποσα επίπεδα. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήσαμε νέα διαγονίδια, τα οποία εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση στις θέσεις αυτές (αντικατάσταση των Ser/Thr με την φωσφο-ανθεκτική αλανίνη, Ala) ή που οδηγούνται σε ψευδο-φωσφορυλίωση (αντικατάσταση με το φωσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ, Glu). Επίσης, στόχος μας ήταν η διερεύνηση του ρόλου της Ser^{262} ως «θυροφύλακα» για την εμφάνιση επικείμενων φωσφορυλιώσεων, οι οποίες σχετίζονται με τη νόσο, καθώς και αν η φωσφορυλίωσή της ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της Ser^{238} ή της Thr^{245} ή αντιστρόφως.

1.3. Υλικά και μέθοδοι

1.3.1. Καλλιέργεια και στελέχη *Drosophila melanogaster*

Οι διασταυρώσεις της Drosophila πραγματοποιήθηκαν μαζικά σε τροφή που περιέχει αλεύρι σίτου, ζάχαρη, αλεύρι σόγιας και $CaCl_2$. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25^{o}C με υγρασία 50-70% και σε 12 ώρες κύκλο φωτός/σκοταδιού, εκτός των περιπτώσεων που υποδεικνύεται κάτι διαφορετικό. Οι επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι το $Elav^{c155}$-Gal4 και το Ras2-Gal4, οι οποίοι έχουν περιγραφεί εκτενώς στο παρελθόν (Gouzi et al., 2011). Ο επαγωγέας Elav-Gal4, ο οποίος βρίσκεται στο δεύτερο χρωμόσωμα ελήφθη από το Bloomington Drosophila Stock center (#8765). Ο διπλός επαγωγέας $Elav^{c155}$-Gal4; Ras2-Gal4 (στο εξής θα αναφέρεται ως επαγωγέας Elav; Ras2) και ο $Elav^{c155}$-Gal4; Elav/CyO (στο εξής επαγωγέας Elav; Elav), κατασκευάστηκαν με κατάλληλες διασταυρώσεις. Οι διαγονιδιακές μύγες για την ανθρώπινη ισομορφή 0N4R της πρωτεΐνης Τ, οι οποίες έχουν κατασκευαστεί σε τυχαία εισαγόμενη θέση του διαγονιδίου ($hTau^{0N4R}$, στο εξής θα αναφέρονται ως 0N4R μύγες), ελήφθησαν από την M. Feany (Ιατρική Σχολή του Χάρβαρντ, Βοστώνη, Ηνωμένες Πολιτείες).

Για τη δημιουργία των διαγονιδιακών μυγών που περιέχουν τις μονές μεταλλάξεις, χρησιμοποιήθηκε το cDNA της ανθρώπινης ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ (κατασκευασμένο από τον Δρ. Martin Chow, Πανεπιστήμιο του Κεντάκι) και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pUAS.attB (Bischof et al., 2007) με χρήση των περιοριστικών ενζύμων Bgl II/XbaI. Οι μεταλλάξεις δημιουργήθηκαν με αντικατάσταση των καταλοίπων Ser και Thr σε Ala ή Glu με χρήση του QuickChange XL κιτ (Agilent) ιδανικό για τη διενέργεια μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης από την θέση και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα συμπληρωματικά μεταλλαξιογόνα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων (5 'έως 3') παρουσιάζονται παρακάτω. Οι σιωπηλές θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιούνται για διαλογή θετικών κλώνων παρουσιάζονται υπογραμμισμένα με πλάγια γραφή, ενώ η αντικατάσταση των αμινοξέων με έντονα γράμματα

S238A (Pvu II): 5’ CCACCCAAGTCGCCGT*CA**GCTG***CCAAGAGCCGCCTGCAGACAGC

GGTGGGTTCAGCGGCAG*T**CGA**C*GGTTCTCGGCGGACGTCTGTCG 5’

S238E (Xba I): 5’ CCAAGTCGCCGTCT**GAG**GCCAAG*TCTAGA*CTGCAGACAGCCCC

GGTTCAGCGGCAGA**CTC**CGGTTC*AGATCT*GACGTCTGTCGGGG 5’

T245A (Sal I): 5’ CTTCCGCCAAGA*GTCGAC*TGCAG**GCA**GCCCCCGTGCCCATG

GAAGGCGGTTCT*CAGCTG*ACGTC**CGT**CGGGGGCACGGGTAC 5’

T245E (Sal I): 5’ CGTCTTCCGCCAAGA*GTCGAC*TGCAG**GAG**GCCCCCGTGCCCATG

GCAGAAGGCGGTTCT*CAGCTG*ACGTC**CTC**CGGGGGCACGGGTAC 5’

S262A (Bgl II): 5’ GCC*AGATCT*GAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGC**GCC**ACTGAG

CGG*TCTAGA*CTTCTTACAGTTCAGGTTCTAGCCG**CGG**TGACTC 5’

S262E (Bgl II): 5’ GCC*AGATCT*GAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGC**GAG**ACTGAG

CGG*TCTAGA*CTTCTTACAGTTCAGGTTCTAGCCG**CTC**TGACTC 5’

STA (Pvu II): 5’ CCAAGTCGCCGT*CA**GCTG***CCAAGAGCCGCCTGCAG**GCA**GCCCCCG

GGTTCAGCGGCA*GT**CGA**C*GGTTCTCGGCGGACGTC**CGT**CGGGGGC 5’

Η σωστή αλληλουχία των μεταλλαγμάτων επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της αλληλούχισης (sequencing, VBC-biotech). Οι διαγονιδιακές μύγες δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του phiC31 από την BestGene Inc. (Chino Hills, CA, Ηνωμένες Πολιτείες). Τα DNA εγχύθηκαν στη θέση 53B2 του γονιδιώματος και συγκεκριμένα στο δεύτερο χρωμόσωμα (BDSC #9736).

Για την διενέργεια των πειραμάτων που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες διασταυρώσεις, χρησιμοποιώντας παρθένες μύγες από τον επαγωγέα-οδηγό και αρσενικά από τις μύγες που έχουν τα διαγονίδια τ. Οι πειραματικοί απόγονοι επιλέχθησαν κατά περίπτωση, όπως περιγράφονται παρακάτω:

Θηλυκά Elav **X** w^{1118} (μύγες πειραματικού ελέγχου): Επιλογή όλων των απογόνων.

Θηλυκά Elav **X** αρσενικά 0N4R ή $0N4R^{II}$: Επιλογή όλων των απογόνων.

Θηλυκά Elav;Elav/CyO **X** αρσενικά 0N4R ή $0N4R^{II}$: Επιλογή μόνο των αρσενικών και θηλυκών απογόνων που δεν περιέχουν CyO.

Θηλυκά Elav;Ras2 X αρσενικά 0N4R ή $0N4R^{II}$: Επιλογή όλων των απογόνων.

Θηλυκά Elav;Ras2 X αρσενικά 0N4R^{S238A} ή 0N4R^{S238E} ή 0N4R^{T245A} ή 0N4R^{T245E} ή 0N4R^{S262A} ή 0N4R^{S262E} ή 0N4R^{STA}: Επιλογή όλων των απογόνων.

Θηλυκά Elav;Ras2 X αρσενικά w^{1118} (μύγες πειραματικού ελέγχου): Επιλογή όλων των απογόνων.

1.3.2. Ιστολογία

Η ανοσοϊστολογική ανάλυση ενήλικων κεφαλών Drosophila πραγματοποιήθηκε με τομές παραφίνης, όπως προηγουμένως έχει περιγραφεί (Kosmidis et al., 2010) με χρήση του anti-Leo πρωτογενούς αντισώματος. Εν συντομία, τα κεφάλια των μυγών μονιμοποιούνται σε διάλυμα Carnoy's (60% αιθανόλη, 30% χλωροφόρμιο και 10% οξικό οξύ) για 4 ώρες ακολουθούμενο από 4 πλύσεις με αιθανόλη και στη συνέχεια επεξεργάζονται με μεθυλοβενζοικό για 12 ώρες. Τέλος, ενσωματώνονται σταδιακά σε παραφίνη και με τη βοήθεια μικροτόμου συλλέγονται τομές 5 μm. Αφού αποπαραφινοποιηθούν σε ξυλένιο, στη συνέχεια ενυδατώνονται με τη χρήση σειράς διαλυμάτων αιθανόλης συγκέντρωσης από 100% έως 30% και έπειτα από χρήση του πρωτογενούς αντισώματος anti-Leo σε συγκέντρωση 1:4000, ακολουθεί ανάλυση των αποτελεσμάτων.

1.3.3. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western και αντισώματα:

Τα επίπεδα έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης Τ καθώς και τα επίπεδα των φωσφορυλιώσεών της, προσδιορίστηκαν με χρήση κεφαλών από 2-5 ενήλικες μύγες, τα οποία ομογενοποιούνται σε διάλυμα 1x Laemmli (50 mM Tris pH 6.8, 5% 2- μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS, 10% γλυκερόλη, και 0.01% μπλε της βρωμοφαινόλης). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στον πίνακα 1-1.

Αντίσωμα	Εταιρεία	Θέσεις που αναγνωρίζει	Συγκέντρωση
Μονοκλωνικό αντίσωμα T46	Invitrogen	Ολική πρωτεΐνη Τ ανεξαρτήτου φωσφορυλίωσης	1:3.000
Μονοκλωνικό αντίσωμα AT8	Pierce Endogen	Φωσφορυλιωμένες θέσεις Ser^{202}/Thr^{205}	1:1.000
Μονοκλωνικό αντίσωμα AT100	Pierce Endogen	Φωσφορυλιωμένες θέσεις Thr^{212}/Ser^{214}	1:1.000
Πολυκλωνικό αντίσωμα pS396	Source Bioscience	Φωσφορυλίωση της Ser^{396}	1:3.000
Πολυκλωνικό αντίσωμα pS262	Source Bioscience	Φωσφορυλίωση της Ser^{262}	1:1.000

Πίνακας 1- 1. Αντισώματα έναντι της ολικής πρωτεΐνης Τ και συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης. Στον πίνακα αναγράφονται τα αντισώματα, ο προμηθευτής του κάθε αντισώματος και η συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιήθηκαν.

Επίσης, καθότι υπάρχει έλλειψη στο εμπόριο του αντισώματος έναντι της φωσφορυλίωσης Ser^{238}, κρίναμε απαραίτητη τη δημιουργία του αντισώματος αυτού, για την διενέργεια των πειραμάτων που απαιτούνται στη παρούσα έρευνα. Το πολυκλωνικό αυτό αντίσωμα δημιουργήθηκε σε κουνέλι (Pocono Rabbit Farm and Laboratory) στοχεύοντας έναντι του πεπτιδίου TPPKSPSpSAKSRLQTAPVPMP. Πριν τη χρήση του, το αντίσωμα καθαρίστηκε περαιτέρω με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας.

Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και την εξάλειψη σφαλμάτων κατά τη φόρτωση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές αντίσωμα συνταξίνη (mAb 8C3, Developmental Studies Hybridoma Studies), σε συγκέντρωση 1: 3.000. Τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1: 5.000.

1.3.4. Προσδιορισμός προσδόκιμου ζωής σε ενήλικα ζώα Drosophila

Για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής χρησιμοποιήθηκαν οι ενήλικοι απόγονοι από τις διασταυρώσεις του επαγωγέα $Elav^{c155}$-Gal4; Ras2 με το εκάστοτε διαγονίδιο τ. Σαν μύγες πειραματικού ελέγχου, επιλέχθησαν οι απόγονοι από την διασταύρωση του επαγωγέα $Elav^{c155}$-Gal4; Ras2 με τις w^{1118} μύγες (ετεροζυγώτες). Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 18^{o}C και στη συνέχεια 17 ομάδες των 20 ενήλικων αρσενικών μυγών (340 μύγες ανά γενότυπο) μεταφέρθηκαν στους 30^{o}C. Κάθε 3 ημέρες, οι μύγες μεταφέρονται σε καινούργια φιαλίδια με νέα τροφή, και καταγράφεται ο αριθμός των μυγών που πεθαίνουν. Για την εξαγωγή του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκαν δυο ανεξάρτητα πειράματα.

1.3.5. Οξειδωτικό στρες

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του κάθε διαγονιδίου στο οξειδωτικό στρες χρησιμοποιήθηκε χορήγηση του paraquat, όπως προηγουμένως έχει περιγραφεί (Dias-Santagata et al., 2007). Εν συντομία, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες μύγες, οι οποίες προέκυψαν έπειτα από τις κατάλληλες διασταυρώσεις του επαγωγέα $Elav^{c155}$-Gal4; Ras2 με αρσενικά, είτε από τα διαγονίδια τ είτε από τις μύγες πειραματικού ελέγχου (w^{1118}). Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25^{o}C. Οι ενήλικοι απόγονοι από κάθε διασταύρωση διαχωρίστηκαν σε δεκαπέντε ομάδες των 20 μυγών (ηλικίας 1-2 ημερών), ώστε συνολικά 300 μύγες να υπάρχουν ανά γενότυπο. Στις μύγες αυτές, χορηγήθηκε μεθυλοβιογόνο 30 mM (methyl viologen, Acros Organics) μαζί με την τροφή και καταμετρήθηκε ο αριθμός των επιζώντων μυγών έπειτα από 24 ώρες. Για την εξαγωγή του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκαν δυο ανεξάρτητα πειράματα.

1.3.6. Συμπεριφορική ανάλυση

Όλα τα συμπεριφορικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό χαμηλό ερυθρό φωτισμό, στους 24-25^{o}C και σε υγρασία 70-75%. Οι μύγες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ενήλικες μύγες 2-5 ημερών και συλλέχθησαν μέσω αναισθησίας υπό CO_2, μια μέρα πριν την διεξαγωγή του πειράματος. Αφού χωρίστηκαν σε ομάδες των 50-70 μυγών, μεταφέρονται στους 30^{o}C για 12 έως 16 ώρες. Για την μέτρηση της ικανότητας μάθησης χρησιμοποιήθηκε το παράδειγμα της παβλοβιανής αρνητικής οσφρητικής μάθησης συνδυάζοντας απωθητικές οσμές ως εξαρτημένο ερέθισμα (CS+ και CS-) με το ηλεκτρικό σοκ ως μη εξαρτημένο ερέθισμα (US). Οι απωθητικές οσμές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η βενζαλδεΰδη (BNZ) και η 3-οκτανόλη (OCT) αραιωμένες σε λάδι (5% v/v για τη βενζαλδεΰδη και 50% v/v για την οκτανόλη). Μια ώρα πριν τη διεξαγωγή του πειράματος, οι μύγες μεταφέρονται σε καθαρά φιαλίδια με φρέσκια τροφή. Για την εκπαίδευση, οι μύγες τοποθετούνται σε σωλήνα επενδεδυμένο με ηλεκτροφόρο πλέγμα και εκτίθενται σε αέρα (500 mL/min). Στη συνέχεια, οι μύγες εκτίθενται στη πρώτη οσμή για 30 δευτερόλεπτα σε συνδυασμό με επαναλαμβανόμενα σοκ των 90 V (6 σοκ διάρκειας 1,25 δευτερολέπτων ανά χρονικά διαστήματα των 4,5 δευτερολέπτων). Ακολούθως, οι μύγες εκτίθενται αρχικώς σε αέρα για 30 δευτερόλεπτα υπό ροή 500 mL/min και στη συνέχεια στη δεύτερη οσμή για 30 δευτερόλεπτα χωρίς όμως τα ηλεκτρικά σοκ και τέλος σε αέρα για άλλα 30 δευτερόλεπτα. Δυο ομάδες μυγών του ιδίου γενοτύπου εκπαιδεύονται ταυτόχρονα, με τρόπο που η μια ομάδα να αποφεύγει τη βενζαλδεΰδη και η άλλη ομάδα να αποφεύγει την οκτανόλη, ενώ η αντίθετη οσμή χρησιμοποιείται κάθε φορά ως οσμή ελέγχου. Στη συνέχεια, οι μύγες μεταφέρονται σε μια συσκευή Τ-λαβυρίνθου και αφήνονται να επιλέξουν μεταξύ των δύο οσμών (χωρίς ηλεκτρικό σοκ) για 90 δευτερόλεπτα.

Η απόδοση των ζώων (μάθηση) υπολογίζεται με βάση τον δείκτη απόδοσης (Performance Index, PI), ο οποίος ισούται με το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν τη συνδεδεμένη με το ηλεκτρικό σοκ οσμή (CS+) μείον το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν την οσμή ελέγχου (CS-) διαιρούμενο προς τον συνολικό αριθμό των μυγών. Ο τελικός δείκτης απόδοσης υπολογίζεται ως το μέσο όρο των δυο ήμισυ λόγων για κάθε μια από τις ομάδες των ζώων που εκπαιδεύονται στα συμπληρωματικά ερεθίσματα και κυμαίνεται από 0 έως 100. Επειδή όλα τα διαγονίδια που χρησιμοποιήθηκαν έχουν εισαχθεί στον ίδιο γενετικό τόπο, σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ως μύγες πειραματικού ελέγχου μόνο οι ετερόζυγες μύγες πειραματικού ελέγχου.

1.3.7. Στατιστική Ανάλυση

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και αυτά που έχουν διαφορές στη συνέχεια συγκρίνονται με τη δοκιμασία Dunnett΄s. Ομοίως, οι δείκτες απόδοσης της μάθησης υπολογίστηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω με ANOVA και εν συνεχεία αυτά με θετική ANOVA αναλύθηκαν περαιτέρω με πολλαπλές συγκρίσεις ή με τη δοκιμασία Dunnett’s.

Τα δεδομένα από τα πειράματα επιβίωσης (προσδιορισμός προσδόκιμου ζωής) μελετήθηκαν για την κάθε μέρα με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές υπολογίστηκε το μέσο όρο και το τυπικό σφάλμα για κάθε γενότυπο και συγκρίθηκε με τις μύγες πειραματικού ελέγχου με χρήση της μεθόδου Steel. Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα στα πειράματα επιβίωσης με το οξειδωτικό στρες με χρήση του paraquat συγκρίθηκαν με αυτά του πειραματικού ελέγχου ή με αυτά μεταξύ διαφορετικών γενοτύπων με χρήση της μεθόδου Dunnett’s ή πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις, έπειτα από ένα αρχικό θετικό αποτέλεσμα με τη μέθοδο ANOVA.

1.4. Αποτελέσματα

1.4.1. Τα μαθησιακά ελλείμματα είναι ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ στη Drosophila

Σε προηγούμενες μελέτες είχε χρησιμοποιηθεί το τυχαία εισαγόμενο $hTau^{STA}$, το οποίο είχε δημιουργηθεί στην 2N4R ισομορφή της Τ πρωτεΐνης (Kosmidis et al., 2010). Για να γενικευτούν οι επιδράσεις αυτής της διπλής μετάλλαξης και να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που έχουν ήδη δημοσιευθεί (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015) κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία ενός ανεξάρτητου διπλού μεταλλάγματος STA στην ισομορφή 0N4R της Τ πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, σε όλα τα τυχαία εισαγόμενα διαγονίδια που είχαν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες είχε παρατηρηθεί μεταβλητότητα των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Τ. Συνεπώς, κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία νέων διαγονιδίων, στα οποία η έκφραση της πρωτεΐνης είναι ίδια ή παρόμοια, ώστε να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση αυτών στη νευρωνική λειτουργία και νευροτοξικότητα. Η δημιουργία όλων των νέων διαγονιδίων, για την ισομορφή 0N4R, το STA και για τα μονά φωσφο-μεταλλάγματα πραγματοποιήθηκε μέσω του

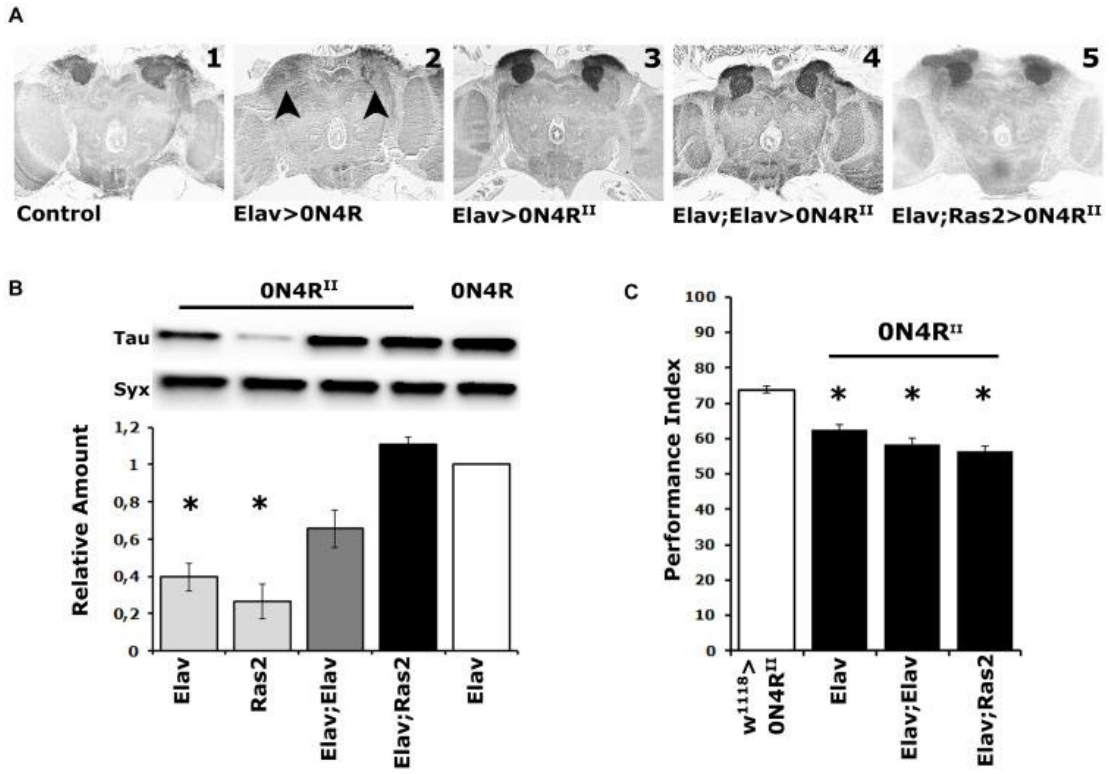
phiC3 (Bischof et al., 2007), με όλα τα τρανσποσόνια να έχουν εισαχθεί στην ίδια θέση του δεύτερου χρωμοσώματος (55B2). Όλα αυτά τα νέα διαγονίδια παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης **(Συμπληρωματική Εικόνα 1-** 1**)**, με αποτέλεσμα να μπορεί να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη. Οι όποιες φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των διαγονιδίων δεν θα μπορούσαν να οφείλονται στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης, παρά μόνο στις διαφορικές επιδράσεις της λειτουργίας αυτών.

Στη παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι το συγκεκριμένο διαγονίδιο που κατασκευάστηκε για την ισομορφή 0N4R και έχει εισαχθεί σε συγκεκριμένη θέση του δεύτερου χρωμοσώματος (0N4R^{II}), έχει φυσιολογικά μισχοειδή σωμάτια (MB) **(Εικόνα 1-** 1**A2 έναντι Εικόνα 1-** 1**A3)** όταν εκφράζεται υπό έναν παν-νευρωνικό επαγωγέα, σε αντίθεση με το τυχαία εισαγόμενο διαγονίδιο που είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί (Kosmidis et al., 2010). Υποθέτουμε ότι η ένθεση σε θέσεις attp ή στη συγκεκριμένη θέση στο δεύτερο χρωμόσωμα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση του 0N4R^{II}, με αποτέλεσμα να μένουν άθικτα τα μισχοειδή σωμάτια. Για την αντιμετώπιση αυτού και επειδή όλα τα διαγονίδια που κατασκευάστηκαν έχουν εισαχθεί στην ίδια χρωμοσωμική θέση, επιδιώξαμε να αυξήσουμε την έκφραση, ώστε τα επίπεδα να προσομοιάζουν αυτά της τυχαίας ένθεσης 0N4R. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν δύο νέοι επαγωγείς που συνίσταται είτε από δυο παν-νευρωνικούς επαγωγείς Elav, ένας στο X χρωμόσωμα και ένας στο δεύτερο χρωμόσωμα (Elav;Elav), είτε από δυο παν-νευρωνικούς επαγωγείς, ένας Elav επαγωγέας στο X χρωμόσωμα και ένας επαγωγέας Ras2 στο δεύτερο χρωμόσωμα (Elav; Ras2) (Gouzi et al., 2011).

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του 0N4R^{II} υπό τους επαγωγείς Elav ή Ras2 έδωσε σημαντικές διαφορές σε σχέση με την τυχαία ένθεση 0N4R. Οι διαφορές αυτές εκμηδενίζονται, όταν επάγεται η έκφραση του 0N4R^{II} υπό τους διπλούς επαγωγείς Elav;Elav ή Elav; Ras2 **(Εικόνα 1-** 1**B και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 1**),** με τα επίπεδα έκφρασης του 0N4R^{II} υπό τον επαγωγέα Elav; Ras2 να προσομοιάζουν περισσότερο τα επίπεδα έκφρασης του τυχαίο εισαγόμενου 0N4R. Για το λόγο αυτό σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο συγκεκριμένος επαγωγέας. Ωστόσο, ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης του 0N4R^{II} ήταν παρόμοια με τα επίπεδα του τυχαία εισαγόμενου 0N4R, τα μισχοειδή σωμάτια σε αυτό το στέλεχος παρέμειναν άθικτα **(Εικόνα 1-** 1**A5)**, όπως επίσης και υπό την έκφραση του διπλού επαγωγέα Elav;Elav **(Εικόνα 1-** 1**A4)**. Ποσοτικοποίηση των δενδριτικών περιοχών (κάλυκες), έπειτα από χρώση με το αντίσωμα anti-Leo, σε στελέχη πειραματικού ελέγχου (0.1376 mm^2) σε σύγκριση με αυτή των στελεχών που εκφράζουν την 0N4R^{II} υπό τον επαγωγέα Elav; Ras2 (0.1268 mm^2) δεν έδειξε σημαντικές διαφορές (Student's t-test, p = 0.1716, n = 6). Αυτό υποδεικνύει ότι η δομή των μισχοειδών σωματίων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης T κατά την ανάπτυξή τους (Kosmidis et al., 2010).

Πιθανόν, τα επίπεδα έκφρασης του 0N4R^{II} υπό τον επαγωγέα Elav; Ras2 να είναι χαμηλότερα του απαιτούμενου ορίου για την εκδήλωση δομικών ελλειμμάτων στα μισχοειδή σωμάτια. Εναλλακτικά, οι άθικτες δομές των μισχοειδών σωματίων στα στελέχη που εκφράζουν την 0N4R^{II} μπορούν να δικαιολογηθούν λόγω της καθυστερημένης συσσώρευσης της πρωτεΐνης στους νευροβλάστες (πιθανόν όταν η ενσωμάτωση γίνεται στις attP θέσεις να πραγματοποιείται η επαγωγή της έκφρασης αργότερα κατά την ανάπτυξη) που θα οδηγήσουν στο σχηματισμό των μισχοειδών σωματίων (Kosmidis et al., 2010).

Επιπροσθέτως, η επαγωγή της έκφρασης του διαγονιδίου 0N4R^{II} από τους επαγωγείς Elav, Elav;Elav ή Elav;Ras2 απέδωσε παρόμοια ελλείμματα στη συνειρμική μάθηση **(Εικόνα 1-** 1**C και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 1**)**. Η απόδοση στην μάθηση υπό τον επαγωγέα Elav;Ras2 ήταν οριακά διαφορετική από αυτή του Elav ($p = 0.002$), ωστόσο δεν διέφερε όταν επάγεται η έκφραση του 0N4R^{II} υπό τον επαγωγέα Elav;Elav **(Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 1**)**. Εφόσον, η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Τ είχε παρόμοια μαθησιακά ελλείμματα για όλους τους παν-νευρωνικούς επαγωγείς που ελέχθησαν, αποδεικνύεται ότι τα μαθησιακά ελλείμματα που παρατηρούμε είναι ανεξάρτητα των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Τ και δεν είναι αποτέλεσμα αλλοίωσης των δομών των μισχοειδών σωματίων. Ως εκ τούτου, σε όλες τις πειραματικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο επαγωγέας Elav;Ras2, καθότι είναι ο επαγωγέας που προκαλεί παρόμοια επίπεδα έκφρασης της 0N4R^{II} με το τυχαία εισαγόμενο 0N4R που είχε χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015), γεγονός που διευκολύνει τις συγκρίσεις μεταξύ τους.



Εικόνα 1- 1. Η έκφραση της πρωτεΐνης Τ στο ΚΝΣ της μύγας δεν προκαλεί δομικά ελλείμματα στα μισχοειδή σωμάτια (MB), ενώ επιφέρει μαθησιακά ελλείμματα ανεξαρτήτων των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης. Α) Μονιμοποιημένες σε διάλυμα Carnoy's μετωπιαίες τομές παραφίνης που έχουν υποβληθεί σε χρώση με το αντίσωμα anti-Leo στο επίπεδο των δενδριτών των μισχοειδών σωματίων για τις μύγες πειραματικού ελέγχου (Elav/+) και για τις μύγες που εκφράζουν τα διαφορετικά διαγονίδια 0N4R με χρήση διαφορετικών επαγωγέων. Τα βέλη δείχνουν την έλλειψη καλύκων στις μύγες που εκφράζουν το τυχαία εισαγόμενο 0N4R διαγονίδιο. **Β)** Ποσοτικοποίηση δειγμάτων από κεφαλές μυγών που εκφράζουν παν-νευρωνικά με χρήση διαφορετικών επαγωγέων τα δυο διαγονίδια 0N4R (0N4R^{II} και το τυχαία εισαγόμενο 0N4R). Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές για τα δείγματα που εκφράζουν την πρωτεΐνη Τ έναντι των δειγμάτων ελέγχου, που στη προκείμενη περίπτωση είναι οι μύγες που εκφράζουν το τυχαία εισαγόμενο διαγονίδιο 0N4R. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 1**. C)** Απόδοση στη μάθηση των μυγών που εκφράζουν, με χρήση διαφορετικών επαγωγέων, τα υποδεικνυόμενα 0N4R διαγονίδια (μαύρες μπάρες) σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου (λευκή μπάρα). Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές από τις μύγες ελέγχου. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 1**.**

1.4.2. Διαφορικός ρόλος των Ser^{238} και Thr^{245} στη τοξικότητα της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ

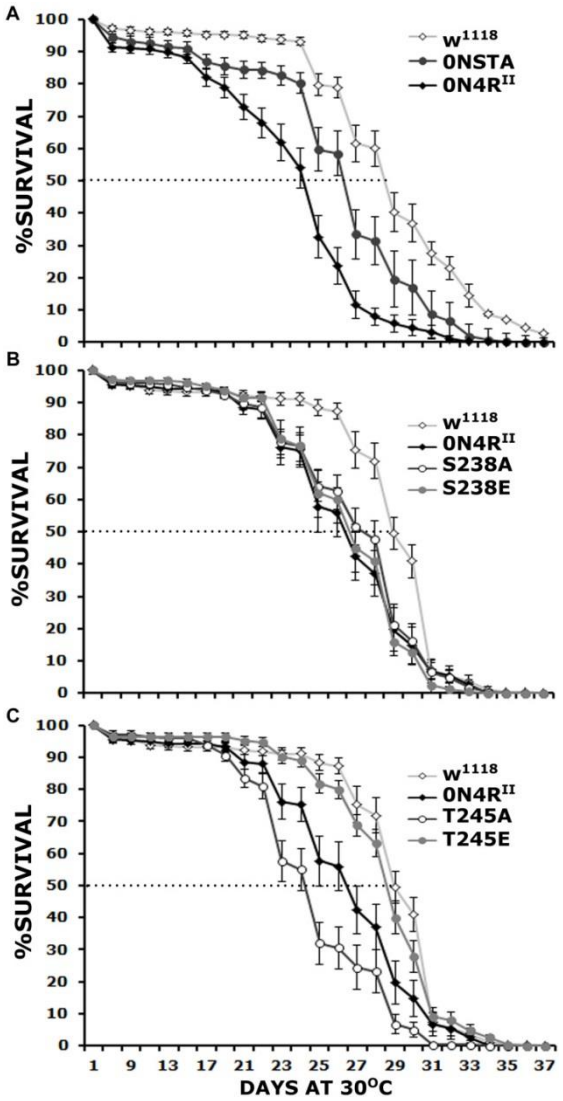
Αρχικός στόχος ήταν να καθοριστεί αν η Ser^{238} και η Thr^{245}, από τα οποία συνίσταται το διπλό διαγονίδιο STA (0N4R^{STA}, STA στο γενετικό υπόβαθρο της 0N4R ισομορφής), καταστέλλουν την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ. Αυτό αρχικώς πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της εξαρτώμενης από την ηλικία θνησιμότητας,

όπως ακριβώς είχε πραγματοποιηθεί και στο STA διαγονίδιο, το οποίο βρισκόταν στο γενετικό υπόβαθρο της 2N4R ισομορφής, $2N4R^{STA}$ (Kosmidis et al., 2010). Για το σκοπό αυτό, κατάλληλες διασταυρώσεις του επαγωγέα με το εκάστοτε διαγονίδιο ή με τις w^{1118} μύγες (ζώα πειραματικού ελέγχου) πραγματοποιήθηκαν στους 18^{o}C, ώστε να παραμείνει η έκφραση της πρωτεΐνης στο ελάχιστο. Στη συνέχεια, οι ενήλικες μύγες αφού διαχωρίστηκαν σε ομάδες των 20 ζώων, μεταφέρθηκαν στους 30^{o}C και διατηρήθηκαν σε αυτή τη θερμοκρασία, έως ότου αποβιώσουν όλες οι μύγες. Οι επιζήσαντες μύγες καταμετρούνται κάθε δυο ημέρες. Οι μύγες που εκφράζουν την $0N4R^{II}$ παρουσίασαν πρόωρη θνησιμότητα σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου **(Εικόνα 1- 2Α και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 Α),** παρόμοιο αποτέλεσμα με αυτό του τυχαία εισαγόμενου 0N4R (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Σε αντίθεση, η έκφραση του διαγονιδίου $0N4R^{STA}$ δεν παρουσίασε διαφορά στο προφίλ επιβίωσης σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου **(Εικόνα 1- 2Α και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 Α)**. Συγκεκριμένα, την 29^{η} ημέρα ο πληθυσμός που έχει επιβιώσει στις μύγες $0N4R^{II}$ είναι σημαντικά διαφορετικός από αυτόν των στελεχών πειραματικού ελέγχου, ο οποίος είναι μειωμένος κατά 50% **(Εικόνα 1- 2Α)**, ενώ οι μύγες που εκφράζουν το $0N4R^{STA}$ δεν διαφέρουν καθόλου **(Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 Α)**. Συνεπώς, τα νέα διαγονίδια που έχουν εισαχθεί στο δεύτερο χρωμόσωμα επαληθεύουν πλήρως τα αποτελέσματα επιβίωσης που είχαν και τα τυχαία εισαγόμενα διαγονίδια (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Επίσης, το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα διαγονίδια εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα **(Συμπληρωματική Εικόνα 1-** 1**)** επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η τοξικότητα που προκαλείται είναι ανεξάρτητη των επιπέδων έκφρασης της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ. Επιπλέον, επαληθεύεται και ο ισχυρισμός ότι η Ser^{238} ή η Thr^{245} ή και οι δύο μαζί απαιτούνται για την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ, όπως αυτή εκδηλώνεται με την πρόωρη θνησιμότητα.

Στη συνέχεια, για να διευκρινιστεί αν και οι δύο και/ή ποια από τις δυο φωσφορυλιώσεις (Ser^{238} και Thr^{245}) που είναι μεταλλαγμένες στο διαγονίδιο STA μεσολαβούν για την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ, κρίθηκε απαραίτητη η ανάλυση των επιδράσεων του κάθε μεμονωμένου μεταλλάγματος Ser^{238} ή Thr^{245}. Στα μεταλλάγματα αυτά, είτε έχει αντικατασταθεί η Ser/Thr με την φωσφο-ανθεκτική αλανίνη (Ala), μπλοκάροντας με αυτό τον τρόπο την φωσφορυλίωσή της, είτε με το φωσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ (Glu), οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε ψευδο-φωσφορυλίωση. Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι η φωσφορυλίωση της Ser^{238} λαμβάνει χώρα ακριβώς πριν το σημείο που το 50% του πληθυσμού των μυγών που εκφράζουν τη 0N4R αποβιώνει (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015) και έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η συγκεκριμένη θέση αποτελεί δείκτης τοξικότητας. Παραδόξως, στη παρούσα έρευνα μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση της Ser^{238} δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στη τοξικότητα της πρωτεΐνης $0N4R^{S238A}$ **(Εικόνα 1- 2Β)**, η οποία παρέμεινε σημαντικά διαφορετική από αυτή των μυγών πειραματικού

ελέγχου από την 23η ημέρα έως την 30η ημέρα **(Εικόνα 1- 2B και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 B)**. Επίσης, το ψευδο-φωσφορυλιωμένο 0N4R^{S238E} παρέμεινε και αυτό εξίσου τοξικό όσο το 0N4R^{II} **(Εικόνα 1- 2B και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 B)**. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση στη Ser^{238} μπορεί να είναι απαραίτητη αλλά δεν επαρκεί από μόνη της για να επάγει τη τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ.

Σημαντική επίσης είναι η παρατήρηση ότι η 0N4R^{T245A} πρωτεΐνη, όπου η φωσφορυλίωση της Thr^{245} μπλοκάρεται από την αντικατάσταση σε αλανίνη, παρουσιάζει αυξημένη θνησιμότητα από την 23η ημέρα έως την 30η **(Εικόνα 1- 2C και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 C)**, δηλαδή νωρίτερα σε σύγκριση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N4R^{II} και παρουσιάζουν 50% θνησιμότητα την 24η ημέρα και σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου που φτάνουν την 29η ημέρα **(Εικόνα 1- 2C)**. Αυτό υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη θέση φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη για την καταστολή της τοξικότητας που οδηγεί σε πρώιμη θνησιμότητα. Επιπροσθέτως, το ψευδο-φωσφορυλιωμένο 0N4R^{T245E} βελτιώνει την τοξικότητα και συμπεριφέρεται με τον ίδιο τρόπο όπως και οι μύγες πειραματικού ελέγχου **(Εικόνα 1- 2C και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 C)**. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η φωσφορυλίωση στη Thr^{245} δρα προστατευτικά ή αποτρεπτικά έναντι της τοξικότητας, ενώ η εξάλειψή της είναι απαραίτητη για την επαγωγή της τοξικότητας.

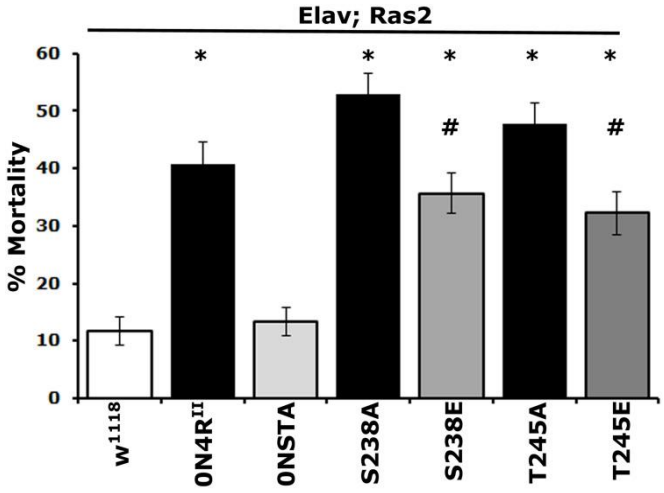


Εικόνα 1- 2. Διαφορική επίδραση των Ser^{238} και Thr^{245} στη πρόωρη θνησιμότητα. Καμπύλες επιβίωσης των ζώων που εκφράζουν στο ΚΝΣ τα διαγονίδια 0N4R^{II}, 0NSTA **(A)**, S238A, S238E **(B)**, T245A, και T245E **(C)** σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες Elav/+; Ras/ + (μύγες πειραματικού ελέγχου, w^{1118}). Ο μέσος όρος ± SEM υπολογίστηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα και από συνολικά 340 ζώα ανά γενότυπο. Την 29^{η} ημέρα υπολογίστηκε ότι η μείωση του πληθυσμού στις μύγες πειραματικού ελέγχου ήταν 50%. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στους **συμπληρωματικούς πίνακες 1-2A, B, C.**

Μια διαφορετική μέτρηση της τοξικότητας, έπειτα από την συσσώρευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ, αποτελεί η αντίσταση στο paraquat για την καταμέτρηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες. Πρόκειται για μια οξειδοαναγωγική ετεροκυκλική ένωση διπυριδίνης, η οποία έχει βρεθεί ότι στους ιστούς παράγει ανιόντα υπεροξειδίου και συνεπώς προάγει το ήδη υπάρχον οξειδωτικό στρες (Rzezniczak et al., 2011). Κατά συνέπεια, οι μύγες που υπόκεινται υπό αυξημένο οξειδωτικό στρες λόγω της συσσώρευσης της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ, αναμένεται να είναι πιο ευαίσθητες έπειτα από το στρες που επάγεται από το paraquat (Dias-Santagata et

al., 2007). Στη πραγματικότητα, έπειτα από έκθεση για 24 ώρες σε 30 mM paraquat (εισαγόμενο με την τροφή), οι μύγες πειραματικού ελέγχου παρουσιάζουν θνησιμότητα 10%, ενώ οι μύγες που εκφράζουν την 0N4R^{II} παρουσιάζουν θνησιμότητα 40%. Σε αντίθεση, στις μύγες που εκφράζουν το διαγονίδιο STA καταστέλλεται η θνησιμότητα, η οποία προσομοιάζει τα επίπεδα των μυγών πειραματικού ελέγχου **(Εικόνα 1- 3 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 2**)**, υποδηλώνοντας ότι η Ser^{238} ή/και η Thr^{245} διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη τοξικότητα στο οξειδωτικό στρες.

Επίσης, όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Ser^{238}, έπειτα από την αντικατάσταση σε αλανίνη (0N4R^{S238A}) καθώς και η ψευδο-φωσφορυλιωμένη 0N4R^{S238E} προκαλούν τα ίδια επίπεδα θνησιμότητας όπως το 0N4R^{II} **(Εικόνα 1- 3 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 2**)**. Ωστόσο, η τοξικότητα της 0N4R^{S238E} είναι σημαντικά μικρότερη αυτής της 0N4R^{S238A} **(Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 2**)**. Επιπροσθέτως, οι μύγες στις οποίες μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Thr^{245}, έπειτα από την αντικατάσταση σε αλανίνη, 0N4R^{T245A}, παρουσιάζουν αυξημένη τοξικότητα σε σύγκριση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N4R^{II} **(Εικόνα 1- 3 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 2**)**. Η ψευδο-φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης θέσης (0N4R^{T245E}) προκαλεί μείωση της τοξικότητας, ωστόσο δεν εξαλείφεται η τοξικότητα η οποία παραμένει σημαντικά υψηλότερη αυτής της 0N4R^{STA} **(Εικόνα 1- 3 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 2**)**. Το γεγονός ότι οι μύγες που εκφράζουν το διπλό διαγονίδιο 0N4R^{STA} παρουσιάζουν τοξικότητα σε χαμηλά επίπεδα, παρόμοια με τις μύγες πειραματικού ελέγχου, σε αντίθεση με τα μονά διαγονίδια, υποδηλώνει ότι και οι δύο θέσεις ταυτόχρονα θα πρέπει πιθανότατα να μπλοκάρονται από τη φωσφορυλίωση, ώστε να εξαλείφεται ή να καταστέλλεται η τοξικότητα στο οξειδωτικό στρες, η οποία προκαλείται από την έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ.



Εικόνα 1- 3. Διαφορική επίδραση των Ser^{238} και Thr^{245} στο οξειδωτικό στρες. Ζώα ηλικίας δυο ημερών αφήνονται σε 30mM paraquat και καταγράφεται η θνησιμότητα έπειτα από 24 ώρες. Ο μέσος όρος ± SEM υπολογίστηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα και από συνολικά 300 ζώα ανά γενότυπο. Οι γενότυποι όλων των ζώων υποδεικνύονται κάτω από τις μπάρες. Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές των διαγονιδίων που είναι στατιστικά σημαντικές από τις μύγες πειραματικού ελέγχου, ενώ το '#' τις διαφορές μεταξύ των συγγενών διαγονιδίων. Η χορήγηση paraquat για 24 ώρες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της θνησιμότητας σε όλα τα διαγονίδια σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου, εκτός του διαγονιδίου 0NSTA. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 1- 2**.

Η θνησιμότητα που παρατηρείται από το οξειδωτικό στρες για τις μύγες Ser^{238} και Thr^{245} είναι διαφορετική από αυτήν που παρατηρείται από την πρώιμη θνησιμότητα που εξετάστηκε προηγουμένως, υποδηλώνοντας ότι οι δυο αυτές μετρήσεις της τοξικότητας αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς παθολογικούς μηχανισμούς.

1.4.3. Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης των θέσεων Ser^{238} και Thr^{245}.

Για να διερευνηθεί η προτεινόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ των θέσεων φωσφορυλίωσης Ser^{238} και Thr^{245} καθώς και των συνεπειών τους σε άλλες απομακρυσμένες θέσεις φωσφορυλίωσης, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε ο επίτοπος AT8, αντίσωμα ειδικό για τις φωσφορυλιώσεις Ser^{202} και Thr^{205}, το αντίσωμα AT100, το οποίο είναι ειδικό για τις φωσφορυλιώσεις Thr^{212} και Ser^{214}, καθώς και τα pSer^{262} και pSer^{396} αντισώματα. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ, όλων των νέων διαγονιδίων που δημιουργήθηκαν, είναι παρόμοια με αυτά του 0N4R^{II} **(Εικόνα 1- 4A–C)**. Επιπροσθέτως, στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε και το νέο αντίσωμα pSer^{238} που κατασκευάστηκε. Η ειδικότητα του συγκεκριμένου αντισώματος εξετάστηκε

πρώτα σε μύγες που εκφράζουν το 0N4R^{STA} **(Συμπληρωματική Εικόνα 1-** 2**)**. Στις μύγες αυτές, καθότι είναι μπλοκαρισμένη η φωσφορυλίωση της Ser^{238}, δεν θα έπρεπε να παίρνουμε καμία ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση. Ωστόσο, σε όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων από τις μύγες 0N4R^{STA}, ανιχνεύθηκε μια ζώνη σε υψηλότερο μοριακό βάρος, η οποία θεωρήθηκε ως μη ειδική **(Συμπληρωματική Εικόνα 1-** 2**)**.

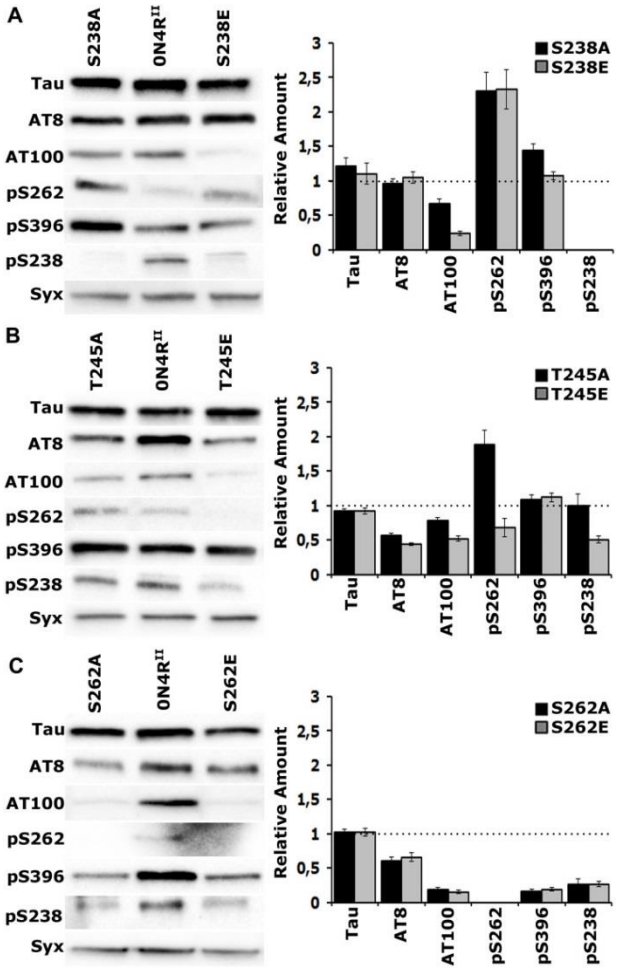
Με την ανάλυση με χρήση όλων των παραπάνω διαφορετικών αντισωμάτων, βρέθηκε ότι όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Ser^{238}, έπειτα από την αντικατάστασή της σε αλανίνη ή με ψευδο-φωσφορυλίωσή της, προκαλείται μείωση της φωσφορυλίωσης του επιτόπου AT100 και αύξηση της φωσφορυλίωσης της Ser^{262} σε σχέση με τη 0N4R^{II} **(Εικόνα 1-** 4**A και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 3**)**. Αυτό υποδηλώνει ότι η κατάληψη της Ser^{262} είναι ανεξάρτητη από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της Ser^{238}. Η φωσφορυλίωση της απομακρυσμένης Ser^{396} είναι αυξημένη στις μύγες στις οποίες έχει μπλοκαριστεί η φωσφορυλίωση της Ser^{238}, ενώ μένει ανεπηρέαστη στη ψευδο-φωσφορυλιωμένη Ser^{238} **(Εικόνα 1-** 4**A και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 3**)**. Όπως ήταν αναμενόμενο το pSer^{238} αντίσωμα δεν αναγνωρίζει ούτε το 0N4R^{S238A} ούτε το 0N4R^{S238E} **(Εικόνα 1-** 4**A).**

Σημαντικό εύρημα αποτελεί επίσης, ότι παρά το γεγονός ότι στις μύγες 0N4R^{T245A} τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του Ser^{238} παραμένουν τα ίδια με της 0N4R^{II}, στην ψευδο-φωσφορυλιωμένη 0N4R^{T245E} μειώνονται σημαντικά **(Εικόνα 1-** 4**B και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 3**)**. Αυτό συμφωνεί με την υπόθεση ότι η κατάληψη της Thr^{245} καταστέλλει την φωσφορυλίωση της Ser^{238}. Καθότι το αντίσωμα pThr^{245} δεν είναι διαθέσιμο, δεν μπορεί να εξεταστεί αν ισχύει και το ανάποδο δηλαδή αν η κατάληψη της Ser^{238} καταστέλλει την φωσφορυλίωση της Thr^{245}. Όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Thr^{245}, έπειτα από την αντικατάστασή της σε αλανίνη προκαλείται αύξηση της Ser^{262} σε σχέση με τις 0N4R^{II} μύγες, ενώ η ψευδο-φωσφορυλίωσή της έχει ως αποτέλεσμα τα επίπεδα του Ser^{262} να είναι περίπου τα ίδια με των 0N4R^{II} **(Εικόνα 1-** 4**B και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 3**)**. Αυτό είναι σύμφωνο με την ιδέα ότι η απώλεια ή η καταστολή της φωσφορυλίωσης Thr^{245} οδηγεί σε κατάληψη των θέσεων Ser^{238} και Ser^{262} και τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι η κατάληψη της θέσης Thr^{245} καταστέλλει τη φωσφορυλίωση και των δύο θέσεων, Ser^{238} και Ser^{262}. Επομένως, η Thr^{245} δρα ως «θυροφύλακας» για τις επακόλουθες φωσφορυλιώσεις των θέσεων Ser^{238} και Ser^{262}, οι οποίες συσχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015).

Ο προτεινόμενος ρόλος της Thr^{245} ως κρίσιμος «θυροφύλακας», αντί για τη θέση Ser^{238}, αντικατοπτρίζεται επίσης στις συνέπειες που έχει ο αποκλεισμός της ή η ψευδό-φωσφορυλίωσή της σε απομακρυσμένους φωσφο-επιτόπους. Η φωσφορυλίωση των θέσεων που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα AT8 και AT100 είναι επίσης μειωμένη και στα δυο Thr^{245} μεταλλάγματα **(Εικόνα 1-** 4**B και**

Συμπληρωματικός Πίνακας 1- 3**)**, ενώ η Ser^{396} παραμένει ανεπηρέαστη. Σε αντίθεση, στα Ser^{238} μεταλλάγματα παρατηρείται μείωση του επιτόπου AT100, ενώ η φωσφορυλίωση της Ser^{396} είναι σημαντικά αυξημένη, όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Ser^{238} **(Εικόνα 1- 4A και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 3**)**. Αυτό υποδεικνύει ότι η κατάληψη της θέσης Thr^{245} είναι απαραίτητη για την επικείμενη φωσφορυλίωση των AT8 και AT100 επιτόπων, ενώ η φωσφορυλίωση της Ser^{238} καταστέλλει την κατάληψη της Ser^{396}, μια ακόμα ένδειξη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων θέσεων φωσφορυλίωσης.

Ο ουσιώδης ρόλος της Ser^{262} ως «θυροφύλακας» (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015), (Nishimura, Yang, & Lu, 2004) παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1- 4C**, όπου όλες οι φωσφορυλιώσεις είναι σημαντικά μειωμένες και στα δυο μεταλλάγματα $0N4R^{S262A}$ και $0N4R^{S262E}$. Παρότι ο αποκλεισμός της φωσφορυλίωσης της Ser^{262} ($0N4R^{S262A}$) ενισχύει τη άποψη ότι η κατάληψη της συγκεκριμένης θέσης είναι απαραίτητη για την επικείμενη φωσφορυλίωση της Ser^{238}, το αντίθετο αναμένεται για το ψευδό-φωσφορυλιωμένο Ser^{262} ($0N4R^{S262E}$). Το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση της Ser^{238} είναι μειωμένη στο $0N4R^{S262E}$, ενισχύει την άποψη ότι το Glu δεν είναι ένα αποτελεσματικό υποκατάστατο της φωσφορυλίωσης του Ser^{262} και πιθανόν να έχει και κάποια αρνητική επίδραση.



Εικόνα 1- 4. Αλληλεπίδραση φωσφορυλιώσεων μεταξύ των Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262}. Αντιπροσωπευτικά δείγματα ανάλυσης με Western από ομογενοποιημένες κεφαλές μυγών που εκφράζουν την 0N4R^{II} παν-νευρωνικά, σε σύγκριση με τα δείγματα των μεταλλαγμάτων Ala και Glu με συγκεκριμένα αντισώματα, όπως απεικονίζονται αριστερά. Το πρώτο αντίσωμα ανιχνεύει τα ολικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ, ενώ όλα τα υπόλοιπα είναι ειδικά για συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης. Η συνταξίνη (Syx) χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση και επακόλουθη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων που εκφράζουν την 0N4R^{II}, η οποία τίθεται στο 1, όπως απεικονίζεται με τη διακεκομμένη γραμμή. Οι μπάρες υποδεικνύουν τα μέσα ±SEM σχετικά επίπεδα των φωσφορυλιωμένων μεταλλαγμάτων σε συγκεκριμένες θέσεις σε σχέση με τα επίπεδα αυτών των θέσεων στη 0N4R^{II}. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 3**. (A-C)** Ποσοτικοποίηση δειγμάτων που εκφράζουν παν-νευρωνικά την 0N4R^{II} σε σύγκριση με δείγματα των διαγονιδίων S238A και S238E **(A)**, T245A και T245E διαγονιδίων **(B)** και των διαγονιδίων S262A και S262E **(C)**, με χρήση διαφορετικών αντισωμάτων όπως αυτά υποδεικνύονται αριστερά.

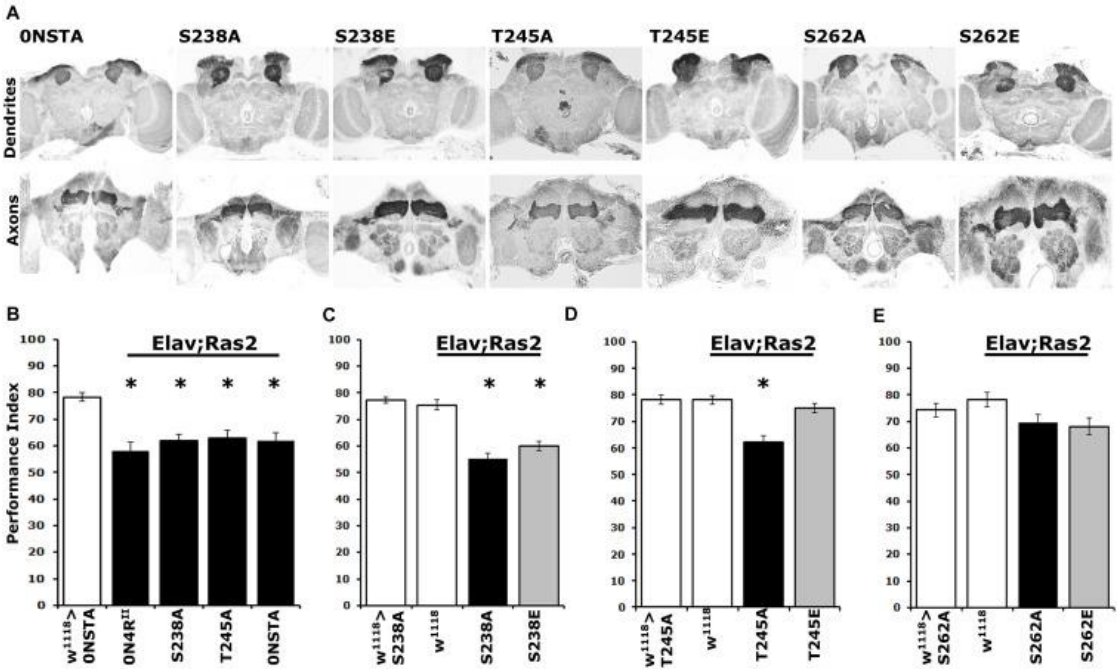
1.4.4. Διαφορικός ρόλος των Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262} στα μαθησιακά ελλείμματα, τα οποία εξαρτώνται από την έκφραση της πρωτεΐνης Τ.

Εκτός από το ρόλο του Ser^{262} ως «θυροφύλακα», έχει προταθεί ότι η συγκεκριμένη θέση φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη για τα μαθησιακά ελλείμματα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Η τυχαία ένθεση 0N4R-Ser^{262}, που είχε χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες, είχε βρεθεί ότι έχει πολύ χαμηλότερα

επίπεδα έκφρασης σε σχέση με το τυχαία εισαγόμενο 0N4R (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Αυτό θέτει το ενδεχόμενο ότι η έλλειψη των μαθησιακών ελλειμμάτων, έπειτα από τον αποκλεισμό της φωσφορυλίωσης της συγκεκριμένης θέσης με αλανίνη, μπορεί να ήταν αποτέλεσμα των χαμηλότερων επιπέδων. Συνεπώς, προς επιβεβαίωση του παραπάνω αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκε το νέο διαγονίδιο S262A, το οποίο εκφράζεται στα ίδια επίπεδα με το $0N4R^{II}$ **(Συμπληρωματική Εικόνα 1-** 1**)**.

Όπως ήταν αναμενόμενο και σε αυτά τα νέα διαγονίδια, όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Ser^{262} ($0N4R^{S262A}$) δεν παρατηρούνται μαθησιακά ελλείμματα **(Εικόνα 1-** 5**E και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 4**)**, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Επίσης, καθότι το συγκεκριμένο διαγονίδιο εκφράζεται στα ίδια επίπεδα με αυτά που εκφράζεται η $0N4R^{II}$ **(Συμπληρωματική Εικόνα 1-** 1 **και Εικόνα 1-** 4**C)**, επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η έλλειψη μαθησιακών ελλειμμάτων στις $0N4R^{S262A}$ δεν είναι αποτέλεσμα μειωμένων επιπέδων έκφρασης και συνεπώς η φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης θέσης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μάθηση.

Η έκφραση του $0N4R^{STA}$ διαγονιδίου σε όλους τους νευρώνες δεν προκαλεί ελαττώματα στα μισχοειδή σωμάτια **(Εικόνα 1-** 5**A)**, σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιεύσεις (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Επιπλέον, όπως και για το $2N4R^{STA}$ (Kosmidis et al., 2010), η έκφραση του $0N4R^{STA}$ προκαλεί σημαντικά ελλείμματα στη συνειρμική μάθηση **(Εικόνα 1-** 5**B και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 4**)**, παρόμοια με αυτά του $0N4R^{II}$ **(Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 4**)**. Συνεπώς το $0N4R^{STA}$, αν και έχει εντελώς άθικτα μισχοειδή σωμάτια, παρουσιάζει δυσλειτουργία στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης, σημαντικό εύρημα είναι το γεγονός ότι η έκφραση των μονά μεταλλαγμένων $0N4R^{S238A}$ και $0N4R^{T245A}$ έχει ως αποτέλεσμα εξίσου σημαντικά μαθησιακά ελλείμματα. Δεδομένου ότι στα συγκεκριμένα διαγονίδια η Ser^{262} είναι υπερ-φωσφορυλιωμένη, τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τα μαθησιακά ελλείμματα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015).



Εικόνα 1- 5. Διαφορικά ελλείμματα στη μάθηση παρατηρούνται για τα μεταλλάγματα Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262}. Α) Μονιμοποιημένες σε διάλυμα Carnoy's μετωπιαίες τομές παραφίνης που έχουν υποβληθεί σε χρώση με anti-Leo αντίσωμα στο επίπεδο των δενδριτών (Calyx) και των αξόνων των μισχοειδών σωματίων για τις μύγες που εκφράζουν τα διαφορετικά διαγονίδια της πρωτεΐνης Τ. **(Β–Ε)** Απόδοση στη μάθηση των ζώων που εκφράζουν τα διαφορετικά διαγονίδια της πρωτεΐνης Τ (μαύρες και γκρι μπάρες) σε σχέση με τα ζώα πειραματικού ελέγχου (λευκές μπάρες). Οι γενότυποι όλων των ζώων αναγράφονται κάτω από τις μπάρες. Ο μέσος ± SEM υποδεικνύεται σε κάθε μπάρα. Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές των διαγονιδίων που είναι στατιστικά σημαντικές από τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 1- 4.**

Στη συνέχεια, εξετάστηκε ο ρόλος των ψευδο-φωσφορυλιωμένων διαγονιδίων 0N4R^{S238E} και 0N4R^{T245E}. Η έκφραση του 0N4R^{S238E} παρουσιάζει τα ίδια μαθησιακά ελλείμματα, όπως και το 0N4R^{S238A} **(Εικόνα 1-** 5**C και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 4**)**. Κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία και με το γεγονός ότι η θέση Ser^{262} στο συγκεκριμένο διαγονίδιο είναι υπερ-φωσφορυλιωμένη **(Εικόνα 1- 4A)** και σε πλήρη συμφωνία με την αναποτελεσματικότητα της Glu υποκατάστασης ως φώσφο-μιμητικό στη θέση αυτή. Σε αντίθεση με τα μαθησιακά ελλείμματα που παρουσιάζει το 0N4R^{T245A}, η έκφραση του 0N4R^{T245E} δεν επηρεάζει τη μάθηση **(Εικόνα 1-** 5**D και Συμπληρωματικός Πίνακας 1-** 4**)**. Γεγονός το οποίο έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Ser^{262} (μειωμένα επίπεδα, **Εικόνα 1- 4B**) και υποστηρίζοντας την άποψη ότι η φωσφορυλίωση της Thr^{245} δρα ως κατασταλτικός παράγοντας για την τοξικότητα και δυσλειτουργία που μεσολαβείτε από την ανθρώπινη πρωτεΐνη Τ.

1.5. Συζήτηση

Παρότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ, το τελευταίο διάστημα δεν παρουσιάζει το ενδιαφέρον που είχε τα προηγούμενα χρόνια, ωστόσο παραμένει ένας ισχυρός βιοδείκτης των παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με την υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ (Blennow & Zetterberg, 2018). Για το λόγο αυτό, η κατανόηση του προτύπου και του τρόπου ρύθμισης της φωσφορυλίωσης της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ είναι σημαντική, για την παρακολούθηση και εξέλιξη των παθολογιών αυτών και εξίσου σημαντική για την κατανόηση των δομικών αλλαγών που φαίνεται να προκαλούν στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας και στο συγκεκριμένο μοντέλο της Drosophila περιγράφουν μια ακολουθία στις φωσφορυλιώσεις που δρουν ως «θυροφύλακες» και επηρεάζουν τόσο την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ, όσο και τη νευρωνική δυσλειτουργία αυτής, γεγονός που μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για τις διάφορες ασθένειες (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015).

Η υπόθεση που τέθηκε σε προηγούμενες μελέτες (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015), ότι η Ser^{262} είναι απαραίτητη για την κατάληψη της θέσης Ser^{238}, επαληθεύτηκε πειραματικώς και στη συγκεκριμένη έρευνα **(Εικόνα 1- 4)**. Επίσης, η δημιουργία των μονών διαγονιδίων Ser^{238} και Thr^{245} ανέδειξε ένα νέο σημαντικό σημείο ρύθμισης, κάτι το οποίο δεν μπορούσε να δειχθεί στις προηγούμενες μελέτες με τη χρήση του διπλά μεταλλαγμένου διαγονιδίου STA που είχε αναλυθεί. Συγκεντρωτικά, η τοξικότητα **(Εικόνα 1- 2, Εικόνα 1- 3)** και τα αποτελέσματα στη μάθηση **(Εικόνα 1- 5)** υπό το πλαίσιο του προφίλ φωσφορυλίωσης **(Εικόνα 1- 4)**, υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση της Thr^{245} εξασθενεί ή αποκλείει την κατάληψη της Ser^{262}, η οποία με τη σειρά της είναι απαραίτητη για την φωσφορυλίωση της Ser^{238}, οδηγώντας σε τοξικότητα. Επομένως, η φωσφορυλίωση της Ser^{262} προηγείται και λειτουργεί ως «θυροφύλακας» για την κατάληψη της Ser^{238}, η οποία με τη σειρά της προάγει τη πρόωρη θνησιμότητα που εξαρτάται από την ανθρώπινη πρωτεΐνη Τ ή οδηγεί στη μειωμένη αντίσταση στο οξειδωτικό στρες.

Μέχρι τώρα δεν γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό ή το έναυσμα για την αποφωσφορυλίωση της Thr^{245}, όπως επίσης και την ταχύτητα και το μηχανισμό της επακόλουθης κατάληψης της Ser^{262}, αν και πιθανότατα να μεσολαβείτε από διάφορες αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Πιθανώς η διαδικασία να είναι αρκετά αργή, αν λάβουμε υπ' όψιν ότι τα μαθησιακά ελλείμματα προκύπτουν αρκετά αργότερα από την έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ (Papanikolopoulou et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Δεδομένου ότι η φωσφορυλίωση της Ser^{262} προηγείται χρονικά αυτή της Ser^{238}, πιθανόν σε αυτό να οφείλεται και η καθυστέρηση φωσφορυλίωσης της τελευταίας (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Αυτό δείχνει μια εξαρτώμενη από την ηλικία εκδήλωση της τοξικότητας, κοινό χαρακτηριστικό των εκφυλιστικών Τ-πρωτεϊνοπαθειών. Αυτό

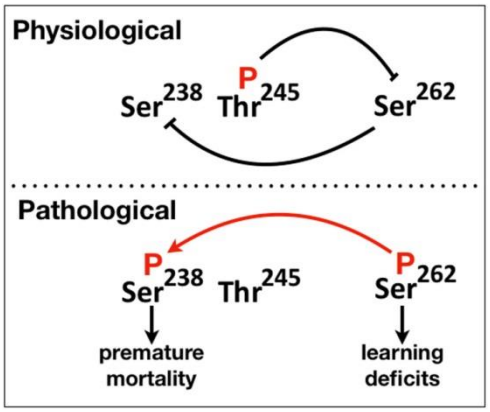
υποδεικνύει ότι ο έλεγχος της φωσφορυλίωσης της Ser^{238} μπορεί να είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης της εξέλιξης της νόσου.

Περιοχές όπως η υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων και η αμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι λειτουργικά εξειδικευμένες (Trushina et al., 2019). Αξιοσημείωτο είναι ότι με τη παρούσα έρευνα προτείνονται αλληλεπιδράσεις εξαρτώμενες από την διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ, με τα 24 αμινοξέα που διαχωρίζουν τη Ser^{238} από τη Ser^{262} να έχουν καθοριστικό ρόλο στη τοξικότητα και δυσλειτουργία που μεσολαβείτε από την πρωτεΐνη Τ. Ως εκ τούτου, προτείνουμε ότι η συγκεκριμένη περιοχή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη τοξικότητα και νευρωνική δυσλειτουργία. Αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζεται και στο προφίλ φωσφορυλιώσεων σε δείγματα από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) από ασθενείς με Alzheimer, όπου εμφανίζονται υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης των Ser^{238} και Ser^{262} (Russell et al., 2017). Επιπλέον, μια άλλη έρευνα έδειξε ότι οι φωσφορυλιωμένες Ser^{238} και Ser^{262} σχετίζονται άμεσα με την παθολογία σε ασθενείς με Alzheimer (Martin et al., 2013). Προτείνουμε ότι αυτές οι 'περιοχές τοξικότητας' συμβάλλουν στη διαμόρφωση της δομής της πρωτεΐνης Τ, καθώς η φωσφορυλίωση των Ser^{238}, Thr^{245}, και Ser^{262} επηρεάζει και τη φωσφορυλίωση επιπρόσθετων θέσεων, όπως των Ser^{202}/Thr^{205} (AT8), Thr^{212}/Ser^{214} (AT100) αλλά και της απομακρυσμένης Ser^{396}, η οποία βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο **(Εικόνα 1- 4)**, η οποία επίσης βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένη σε δείγματα CSF από ασθενείς με Alzheimer (Russell et al., 2017). Επειδή όλες οι θέσεις φωσφορυλίωσης που εξετάζονται στη παρούσα έρευνα βρίσκονται σε σταθερές περιοχές, θεωρούμε ότι αυτοί οι μηχανισμοί ρύθμισης που προτείνουμε είναι κοινοί για όλες τις ισομορφές της πρωτεΐνης Τ.

Επιπροσθέτως, η φωσφορυλίωση της Thr^{245} φαίνεται να είναι ανασταλτική όχι μόνο για τη Ser^{262} και κατά συνέπεια για τη Ser^{238}, αλλά επίσης και για τις Ser^{202}/Thr^{205} και Thr^{212}/Ser^{214} **(Εικόνα 1- 4B)**. Πιθανότατα η συγκεκριμένη θέση να αντιπροσωπεύει έναν ευρύτερο ανασταλτικό παράγοντα της τοξικότητας και της νευρωνικής δυσλειτουργίας **(Εικόνα 1- 6)**. Ως εκ τούτου, η φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης θέσης φαίνεται να λειτουργεί ως «θυροφύλακας» εναντίον επιπρόσθετων φωσφορυλιώσεων που σχετίζονται με τις παθολογικές καταστάσεις. Σε συμφωνία με αυτήν την άποψη, η φωσφορυλίωση της Thr^{245} εμφανίζεται αποκλειστικά σε φυσιολογικά δείγματα από τον ανθρώπινο εγκέφαλο (Martin et al., 2013). Η μόνη άλλη φωσφορυλίωση που έχει αναφερθεί ότι μειώνει την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ είναι αυτή στη θέση Thr^{205} (Ittner et al., 2016). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το ρόλο της Ser^{262}, η οποία φαίνεται να ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωση επιπρόσθετων θέσεων, συμπεριλαμβανομένης και της τοξικής Ser^{238} **(Εικόνα 1- 4C)** και πιθανότατα και περισσοτέρων θέσεων από αυτές που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία. Για το λόγο αυτό γίνονται πολλές προσπάθειες δημιουργίας του

αντισώματος p-Thr^{245}, το οποίο μαζί με αυτά των pSer^{238} και pSer^{262} μπορεί να είναι πολύτιμοι βιοδείκτες για την εξέλιξη των Τ-πρωτεϊνοπαθειών.

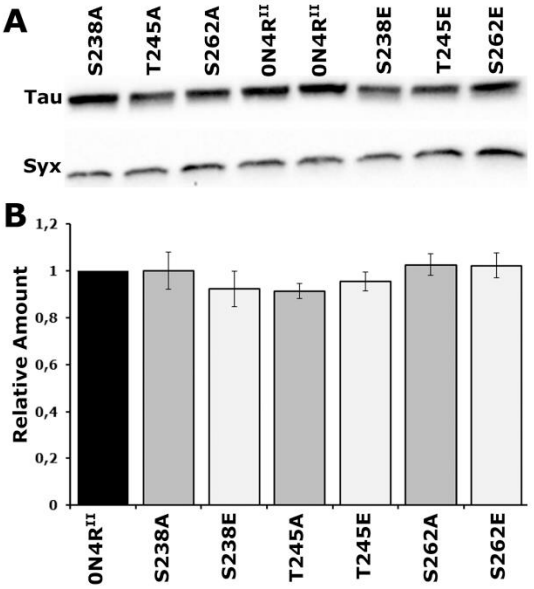
Συγκεντρωτικά, φαίνεται να υπάρχουν δυο ειδών «θυροφύλακες» φωσφορυλιώσεων, αυτοί οι οποίοι καταστέλλουν τη φωσφορυλίωση επιπρόσθετων θέσεων, όπως η Thr^{245} και άλλοι οι οποίοι την ενεργοποιούν, όπως η Ser^{262}. Αυτό αναπαρίσταται στην **Εικόνα 1-** 6, όπου προτείνουμε ότι η φωσφορυλίωση της Thr^{245} δρα ως «κατασταλτικός θυροφύλακας», εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση του «διευκολυντή θυροφύλακα» Ser^{262} και κατά συνέπεια και της Ser^{238} (Nishimura et al., 2004); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015).



Εικόνα 1- 6 Σχηματική απεικόνιση της προτεινόμενης αλληλεπίδρασης του «κατασταλτικού θυροφύλακα» Thr^{245} και του «διευκολυντή θυροφύλακα» Ser^{262}. Το κόκκινο βέλος αντιπροσωπεύει τους «διευκολυντές θυροφύλακες». Η κατεύθυνση του βέλους δείχνει ότι η φωσφορυλίωση της Ser^{238} πραγματοποιείται μετά την φωσφορυλίωση της Ser^{262}. Οι αμβλείς γραμμές αντιπροσωπεύουν τους «κατασταλτικούς θυροφύλακες»

Αν και υπάρχουν προφανείς φαρμακευτικοί στόχοι, παραμένει μια πρόκληση ο εντοπισμός και η παρέμβαση σε φωσφατάσες και κινάσες που στοχεύουν συγκεκριμένους φωσφο-επιτόπους, εν μέρει λόγω συμμετοχής τους και σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου (Martin et al., 2013). Όσο αφορά τη Thr^{245}, της οποίας η φωσφορυλίωση φαίνεται να δρα ως «κατασταλτικός θυροφύλακας» για τις επικείμενες φωσφορυλιώσεις που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις, αποτελεί θεραπευτική πρόκληση να μπορεί να διατηρηθεί κατειλημμένη η συγκεκριμένη θέση. Επιπροσθέτως, η δημιουργία αντισώματος p-Thr^{245} για την έγκαιρη ανίχνευση της από-φωσφορυλιωμένης κατάστασής της μπορεί να είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης πρόγνωσης των Τ-πρωτεϊνοπαθειών.

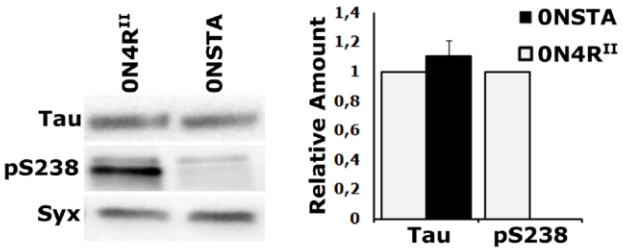
1.6. Συμπληρωματικά δεδομένα



C

Genotype	Mean ± SEM	p
ANOVA $F_{(6,139)}$ = 0.7679, p=0.5969		
Elav;Ras2>0N4R^{II}	1	
Elav;Ras2>S238A	0.999 ± 0.078	1
Elav;Ras2>S238E	0.922 ± 0.075	0.925
Elav;Ras2>T245A	0.914 ± 0.032	0.807
Elav;Ras2>T245E	0.956 ± 0.040	0.993
Elav;Ras2>S262A	1.026 ± 0.046	0.999
Elav;Ras2>S262E	1.023 ± 0.052	0.999

Συμπληρωματική Εικόνα 1- 1. Ισόποση έκφραση των διαφορετικών μεταλλαγμάτων Ala και Glu που έχουν εισαχθεί στη θέση 55B2 με την πρωτεΐνη ελέγχου 0N4R. Α) Αντιπροσωπευτικά δείγματα ανάλυσης με Western από ομογενοποιημένες κεφαλές μυγών που εκφράζουν την 0N4R^{II} παν-νευρωνικά σε σύγκριση με τα δείγματα των μεταλλαγμάτων Ala και Glu, με χρήση του αντισώματος T46 έναντι της ολικής πρωτεΐνης Τ. **Β)** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Τ. Η συνταξίνη (Syx) χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση και επακόλουθη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων που εκφράζουν την 0N4R^{II}, η οποία τίθεται στο 1. Οι μπάρες υποδεικνύουν τα μέσα ± SEM σχετικά επίπεδα των μεταλλαγμάτων Ala και Glu σε σχέση με τα επίπεδα της 0N4R^{II}. **C)** Στατιστική ανάλυση της ποσοτικοποίησης με τη μέθοδο ANOVA.



Συμπληρωματική Εικόνα 1- 2. Το 0N4R^{STA} εκφράζεται στα ίδια επίπεδα με το 0N4R^{II} και δεν έχει τον επίτοπο pSer^{238}. Αντιπροσωπευτικά δείγματα ανάλυσης με Western από ομογενοποιημένες

κεφαλές μυγών που εκφράζουν την 0N4R^{II} παν-νευρωνικά σε σύγκριση με αυτά του 0N4R^{STA}, με χρήση του αντισώματος T46 έναντι της ολικής πρωτεΐνης T και του αντισώματος pS238. Η συνταξίνη (Syx) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και την περαιτέρω ποσοτικοποίηση (όπως απεικονίζεται δεξιά) των ολικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης T και της φωσφορυλιωμένης Ser^{238}. Για κάθε ποσοτικό προσδιορισμό τα επίπεδα του 0N4R^{II} ορίστηκαν ως 1. Οι μπάρες υποδεικνύουν τα μέσα ±SEM σχετικά επίπεδα του 0N4R^{STA} σε σχέση με τα επίπεδα της 0N4R^{II}. Περαιτέρω στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμασία Dunnetts's, όπου δεν υποδεικνύεται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στα ολικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης T (p=0,4945), ενώ η διαφορά των επιπέδων φωσφορυλίωσης της Ser^{238} είναι σημαντικά αυξημένη (p<0,0001).

Εικόνα 1-1 B	**Γενότυπος**	**Μέσος Όρος ± SEM**
	Elav>0N4R^{II}	0,396 ± 0,073
	Ras2>0N4R^{II}	0,264 ± 0,091
	Elav;Elav>0N4R^{II}	0,656 ± 0,100
	Elav;Ras2>0N4R^{II}	1,108 ± 0,039
	ANOVA: $F_{(4,15)}$= 15.331, p= 2.8703 x 10^{-4}	
		Dunnetts' p
	Elav>0N4R	
	Elav>0N4R^{II}	**3.5 x 10^{-3}**
	Ras2>0N4R^{II}	**8.4 x 10^{-4}**
	Elav;Elav>0N4R^{II}	**0,081**
	Elav;Ras2>0N4R^{II}	**0,826**

Εικόνα 1-1 C	**Γενότυπος**	**Μέσος Όρος ± SEM**
	w^{1118}>0N4R^{II}	73.745 ± 0.954
	Elav>0N4R^{II}	62.497 ± 1.349
	Elav;Elav>0N4R^{II}	58.454 ± 1.511
	Elav;Ras2>0N4R^{II}	56.301 ± 1.643
	ANOVA: $F_{(3,47)}$= 31.273, p= 5.530 x 10^{-11}	

0N4R^{II} >	**w^{1118}**		**Elav**		**Elav;Elav**		**Elav;Ras2**	
	t-Ratio	p	t-Ratio	p	t-Ratio	p	t-Ratio	p
w^{1118}			32.78	**8.5x10^{-7}**	60.60	**8.2x10^{-10}**	78.86	**2.2x10^{-11}**
Elav	32.78	**8.5x10^{-7}**			4.23	**0.045**	9.95	**0.002**
Elav;Elav	60.60	**8.2x10^{-10}**	4.23	**0.045**			1.20	**0.279**
Elav;Ras2	78.86	**2.2x10^{-11}**	9.95	**0.002**	1.20	**0.279**		

Συμπληρωματικός Πίνακας 1- 1. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-1. Εικόνα 1-1 B: Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης T σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου (του τυχαία εισαγόμενου διαγονιδίου 0N4R) ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση. **Εικόνα 1-1 C:** Απεικόνιση των μέσων όρων και των SEM της απόδοσης μάθησης των υποδεικνυόμενων γενοτύπων (n > 9). Έπειτα από πραγματοποίηση ANOVA, οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας τις υποδεικνυόμενες πολλαπλές επί μέρους συγκρίσεις.

Εικόνα 1-2A					
Wilcoxon/Kruskal-Wallis			**Σύγκριση μέσων όρων (Steel με μύγες πειραματικού ελέγχου)**		
DAY	**χ^2, (DF,count)**	**p > χ^2**	**Genotype**	**z**	**p**
1	0.000 (2,17)	1.000	Elav;Ras2>0NSTA		
			Elav;Ras2>0N4R^{II}		
9	4.851 (2,17)	0.0884	Elav;Ras2>0NSTA		
			Elav;Ras2>0N4R^{II}		
13	6.736 (2,17)	0.0344	Elav;Ras2>0NSTA	0.2991	0.9368
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-2.4960	0.0237
17	12.029 (2,17)	0.0024	Elav;Ras2>0NSTA	-0.4854	0.8434
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.5005	0.0009*
21	18.748 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-0.1071	0.9916
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.0369	0.0001*
23	23.222 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-0.4987	0.8357
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.5185	<0.0001*
25	23.710 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-1.1512	0.4072
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.5403	<0.0001*
27	26.808 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-1.3162	0.3156
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.6813	<0.0001*
29	21.792 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-0.9507	0.5346
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.6309	<0.0001*
31	8.003 (2,17)	0.0183	Elav;Ras2>0NSTA	1.7182	0.1518
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-1.2432	0.3545
33	9.000 (2,17)	0.0111	Elav;Ras2>0NSTA	1.4759	0.2404
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-1.7498	0.1424
35	15.806 (2,17)	0.0004	Elav;Ras2>0NSTA	2.8776	0.0077
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	0.0000	<0.0001*
37	10.836 (2,17)	0.0044	Elav;Ras2>0NSTA	2.3487	0.0353
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	0.0000	<0.0001*

Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 Α. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-2Α. Τα δεδομένα από τα πειράματα επιβίωσης (προσδιορισμός προσδόκιμου ζωής) μελετήθηκαν, για την κάθε μέρα που υποδεικνύεται, με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές (χ^2) υπολογίστηκε περαιτέρω η σημαντικότητα του αποτελέσματος με τη μέθοδο Steel, σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές των διαφόρων διαγονιδίων από τις μύγες πειραματικού ελέγχου εμφανίζονται με γκρι χρώμα και με '*'.

ΕΙΚΟΝΑ 1-2Β					
Wilcoxon/Kruskal-Wallis			**Σύγκριση Μέσων όρων (Steel με μύγες πειραματικού ελέγχου)**		
DAY	**χ^2, (DF,count)**	**p > χ^2**	**Γενότυπος**	**z**	**p**
1	0.000 (3,17)	1.000	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
9	0.803 (3,17)	0.8474	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
13	4.485 (3,17)	0.2136	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
17	0.735 (3,17)	0.8649	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
21	2.184 (3,17)	0.5351	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
23	12.612 (3,17)	0.0056	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-2.5828	0.0269
			Elav;Ras2>S238A	-3.3387	0.0024*
			Elav;Ras2>S238E	-2.2527	0.0643
25	17.394 (3,17)	0.0006	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3442	0.0024*
			Elav;Ras2>S238A	-3.5856	0.0010*
			Elav;Ras2>S238E	-3.0621	0.0063
27	13.619 (3,17)	0.0035	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.1389	0.0049*
			Elav;Ras2>S238A	-2.5576	0.0289
			Elav;Ras2>S238E	-2.9983	0.0053*
29	19.763 (3,17)	0.0002	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3843	0.0021*
			Elav;Ras2>S238A	-3.2606	0.0032*
			Elav;Ras2>S238E	-3.9454	0.0002*
30	19.554 (3,17)	0.0002	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.4931	0.0014*
			Elav;Ras2>S238A	-3.2680	0.0031*
			Elav;Ras2>S238E	-3.7314	0.0006*
31	6.010 (3,17)	0.0111	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
33	1.526 (3,17)	0.6763	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
35	2.778 (3,17)	0.4272	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		

Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 Β. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-2Β. Τα δεδομένα από τα πειράματα επιβίωσης (προσδιορισμός διάρκειας ζωής) μελετήθηκαν για την κάθε μέρα που υποδεικνύεται με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές (χ^2) υπολογίστηκε περαιτέρω η σημαντικότητα του αποτελέσματος με τη μέθοδο Steel, σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές των διαφόρων διαγονιδίων από τις μύγες πειραματικού ελέγχου εμφανίζονται με γκρι χρώμα και με '*'.

Εικονα 1-2C					
Wilcoxon/Kruskal-Wallis			**Σύγκριση Μέσων όρων (Steel με μύγες πειραματικού ελέγχου)**		
DAY	**χ^2, (DF,count)**	**p > χ^2**	**Γενότυπος**	**z**	**p**
1	0.000 (3,17)	1.000	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
9	1.975 (3,17)	0.5777	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
13	5.537 (3,17)	0.1364	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
17	4.936 (3,17)	0.1766	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
21	13.256 (3,17)	0.0041	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-0.8529	0.7300
			Elav;Ras2>T245A	-2.2792	0.0600
			Elav;Ras2>T245E	1.6196	0.2496
23	26.712 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-2.5828	0.0269
			Elav;Ras2>T245A	-4.2948	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-0.3894	0.9628
25	32.021 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3443	0.0024*
			Elav;Ras2>T245A	-4.6484	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.6225	0.2483
27	26.331 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.1388	0.0049*
			Elav;Ras2>T245A	-4.0639	0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.5834	0.2665
29	31.289 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3841	0.0021*
			Elav;Ras2>T245A	-4.7469	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.2106	0.4820
30	31.637 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.4931	0.0014*
			Elav;Ras2>T245A	-4.7034	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.9241	0.1365
31	16.445 (3,17)	0.0009	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-1.4835	0.3170
			Elav;Ras2>T245A	-2.8833	0.0111
			Elav;Ras2>T245E	1.0863	0.5671
33	6.322 (3,17)	0.0970	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
35	1.975 (3,17)	0.5776	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		

Συμπληρωματικός Πίνακας 1-2 C. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-2C. Τα δεδομένα από τα πειράματα επιβίωσης (προσδιορισμός προσδόκιμου ζωής) μελετήθηκαν για την κάθε μέρα που υποδεικνύεται με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές (χ^2) υπολογίστηκε περαιτέρω η σημαντικότητα του αποτελέσματος με τη μέθοδο Steel, σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές των διαφόρων διαγονιδίων από τις μύγες πειραματικού ελέγχου εμφανίζονται με γκρι χρώμα και με '*'.

ANOVA: $F_{(6,104)}=19.7546$, $p=5.3261 \times 10^{-15}$		
Διαγονίδια τ έναντι w^{1118}		
Γενότυπος	**t-Ratio**	**p**
$0N4R^{II}$	33.6099	8.2167×10^{-8}
0NSTA	0.1562	0.6934
S238A	67.8144	7.9778×10^{-13}
S238E	23.1285	5.4824×10^{-6}
T245A	49.6900	2.5435×10^{-10}
T245E	17.7771	5.5375×10^{-5}
Glu έναντι Ala μεταλλαγμάτων		
Γενότυπος	**t-Ratio**	**p**
S238A vs S238E	11.7356	8.9715×10^{-4}
T245A vs T245E	8.0248	5.60149×10^{-3}
Μεταλλάγματα έναντι $0N4R^{II}$		
Γενότυπος	**t-Ratio**	**p**
0NSTA	29.1829	4.6172×10^{-7}
S238A	5.9416	0.0165
S238E	0.9765	0.3254
T245A	1.5667	0.2136
T245E	2.4999	0.1170
Μεταλλάγματα έναντι 0NSTA		
Γενότυπος	**t-Ratio**	**p**
S238A	61.4604	5.5674×10^{-12}
S238E	19.4828	2.6125×10^{-5}
T245A	44.2736	1.6464×10^{-9}
T245E	14.6001	2.3336×10^{-4}

Συμπληρωματικός Πίνακας 1- 2. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-3. Η μέση θνησιμότητα, έπειτα από 24 ώρες έκθεσης σε paraquat, των υποδεικνυόμενων γενοτύπων συγκρίθηκε με εκείνη των ζώων πειραματικού ελέγχου ή με μεταξύ τους σύγκριση με ANOVA και στη συνέχεια με πολλαπλές συγκρίσεις.

	Αντίσωμα	ANOVA	Dunnett's test έναντι 0N4R^{II} (P Value)	
Εικόνα 1-4A	AT8	$F_{(2,77)}$=0.4568, p=0.6350	S238A	S238E
	AT100	$F_{(2,57)}$=58.0959, p=2.7491 x 10^{-14}	S238A	S238E
			2.3578 x 10^{-4}	1.4981 x10^{-8}
	pS262	$F_{(2,39)}$=10.8692, p=1.9349 x 10^{-4}	S238A	S238E
			4.9992 x10^{-4}	4.8214 x10^{-4}
	pS396	$F_{(2,85)}$= 9.0999, p=2.6715 x 10^{-4}	S238A	S238E
			1.6780 x 10^{-3}	0.7914
	pS238		S238A	S238E
Εικόνα 1-4B	AT8	$F_{(2,62)}$=128.1423, p=2.1988 x10-22	T245A	T245E
			1.7794 x 10^{-8}	1.7794 x 10^{-8}
	AT100	$F_{(2,76)}$=51.8107, p=8.5164 x10^{-15}	T245A	T245E
			5.3832 x 10^{-5}	1.3669 x10^{-8}
	pS262	$F_{(2,54)}$=15.4009, p=5.5852 x 10^{-6}	T245A	T245E
			2.6969 x 10^{-3}	0.3519
	pS396	$F_{(2,62)}$=0.6312, p=0.5354	T245A	T245E
	pS238	$F_{(2,25)}$=6.0830, p=7.2933 x10^{-3}	T245A	T245E
			0.9999	0.0138
Εικόνα 1-4C	AT8	$F_{(2,68)}$=8.9678, p=3.587 x10^{-4}	S262A	S262E
			2.0874 x 10^{-4}	1.3759 x 10^{-3}
	AT100	$F_{(2,57)}$=282.5058, p=1.1721 x10^{-29}	S262A	S262E
			1.4967 x10^{-8}	1.4967 x10^{-8}
	pS262		S262A	S262E
	pS396	$F_{(2,64)}$=280.1379, p= 8.9264 x 10-32	S262A	S262E
			1.8071 x10^{-8}	1.8071 x 10^{-8}
	pS238	$F_{(2,20)}$=68.8786, p= 1.96561 x10^{-9}	S262A	S262E
			4.8748 x 10^{-9}	4.8230 x 10^{-9}

Συμπληρωματικός Πίνακας 1- 3. Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-4. Πραγματοποίηση δοκιμασίας ANOVA και στη συνέχεια δοκιμασίας Dunnett's των μεταλλαγμάτων Ser^{238} και Thr^{245} σε σύγκριση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N4R^{II} για όλους τους φωσφο-επιτόπους που εξετάστηκαν. Όταν οι ηλεκτροφορετικές ζώνες ήταν μηδενικές ή σχεδόν μηδενικές δεν πραγματοποιήθηκε ANOVA.

Γενότυπος	Μέσος Όρος ± SEM	t-Ratio	p
Εικόνα 1-5B.	ANOVA $F_{(4,52)}$ = 7.3803, p<0.0001		
w^{1118}>0NSTA	78.322 ±1.593		
Elav;Ras2>0N4R^{II}	58.149 ± 3.314	24.81	$8.5x10^{-6}$
Elav;Ras2>S238A	61.783 ± 2.509	15.92	$2.2x10^{-4}$
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076	14.58	$3.8x10^{-4}$
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	16.60	$1.7x10^{-4}$
Elav;Ras2>0N4R^{II}	58.149 ± 3.314		
Elav;Ras2>S238A	61.783 ± 2.509	0.80	0.373
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076	1.41	0.239
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	0.86	0.357
Elav;Ras2>S238A	61.783 ± 2.509		
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076	0.07	0.792
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	0.00	0.992
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076		
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	0.06	0.794
Εικόνα 1-5C.	ANOVA $F_{(3,39)}$ = 38.5284, p<0.0001		
w^{1118}>S238A	77.327 ± 1.141		
Elav;Ras2>w^{1118}	75.407 ± 1.949	0.56	0.456
Elav;Ras2>S238A	55.275 ± 2.028	65.63	$1.2x10^{-9}$
Elav;Ras2>S238E	60.028 ± 1.665	40.13	$2.5x10^{-7}$
Elav;Ras2>w^{1118}	75.407 ± 1.949		
Elav;Ras2>S238A	55.275 ± 2.028	74.6	$2.7x10^{-10}$
Elav;Ras2>S238E	60.028 ± 1.665	48.0	$4.1x10^{-8}$
Elav;Ras2>S238A	55.275 ± 2.028		
Elav;Ras2>S238E	60.028 ± 1.665	3.83	0.058
Εικόνα 1-5D.	ANOVA $F_{(3,43)}$ = 15.3415, p<0.0001		
w^{1118}>T245A	78.126 ± 1.762		
Elav;Ras2>w^{1118}	78.049 ± 1.564	0.00	0.978
Elav;Ras2>T245A	62.098 ± 2.545	31.74	$1.5x10^{-6}$
Elav;Ras2>T245E	74.956 ± 1.734	1.14	0.29
Elav;Ras2>w^{1118}	78.049 ± 1.564		
Elav;Ras2>T245A	62.098 ± 2.545	33.72	$8.8x10^{-7}$
Elav;Ras2>T245E	74.956 ± 1.734	1.26	0.267
Elav;Ras2>T245A	62.098 ± 2.545		
Elav;Ras2>T245E	74.956 ± 1.734	21.7	$3.5x10^{-5}$
Εικόνα 1-5E.	ANOVA $F_{(3,33)}$ = 2.7719, p=0.0586		
w^{1118}>S262A	74.279 ± 2.556		
Elav;Ras2>w^{1118}	78.280 ± 2.655	0.99	0.326
Elav;Ras2>S262A	69.640 ± 2.863	4.63	0.039
Elav;Ras2>S262E	68.073 ± 3.149	6.87	0.013
Elav;Ras2>w^{1118}	78.280 ± 2.655		
Elav;Ras2>S262A	69.640 ± 2.863	1.26	0.270
Elav;Ras2>S262E	68.073 ± 3.149	2.39	0.132
Elav;Ras2>S262A	69.640 ± 2.863		
Elav;Ras2>S262E	68.073 ± 3.149	0.15	0.698

Συμπληρωματικός Πίνακας 1- 4 Στατιστική ανάλυση εικόνας 1-5. Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στην μάθηση υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Μετά την σημαντική ANOVA, πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων του κάθε γενοτύπου με τρόπο που αναπαρίσταται στον πίνακα πραγματοποιήθηκαν.

1.7. Βιβλιογραφία

Andreadis, A., Brown, W. M., & Kosik, K. S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry, 31*(43), 10626-10633. doi:10.1021/bi00158a027

Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res Bull, 126*(Pt 3), 238-292. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.08.018

Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., & Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(9), 3312-3317. doi:10.1073/pnas.0611511104

Blennow, K., & Zetterberg, H. (2018). Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med, 284*(6), 643-663. doi:10.1111/joim.12816

Brandt, R., Gergou, A., Wacker, I., Fath, T., & Hutter, H. (2009). A Caenorhabditis elegans model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau. *Neurobiol Aging, 30*(1), 22-33. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.011

Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev, 33*(1), 95-130. doi:10.1016/s0165-0173(00)00019-9

Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in Drosophila: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci, 28*, 275-302. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651

Decker, J. M., Krüger, L., Sydow, A., Zhao, S., Frotscher, M., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2015). Pro-aggregant Tau impairs mossy fiber plasticity due to structural changes and Ca(++) dysregulation. *Acta Neuropathol Commun, 3*, 23. doi:10.1186/s40478-015-0193-3

Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Duttaroy, A., & Feany, M. B. (2007). Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila. *J Clin Invest, 117*(1), 236-245. doi:10.1172/jci28769

Fath, T., Eidenmüller, J., & Brandt, R. (2002). Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci, 22*(22), 9733-9741. doi:10.1523/jneurosci.22-22-09733.2002

Feuillette, S., Miguel, L., Frébourg, T., Campion, D., & Lecourtois, M. (2010). Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J Neurochem, 113*(4), 895-903. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06663.x

Gong, C. X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna), 112*(6), 813-838. doi:10.1007/s00702-004-0221-0

Gouzi, J. Y., Moressis, A., Walker, J. A., Apostolopoulou, A. A., Palmer, R. H., Bernards, A., & Skoulakis, E. M. (2011). The receptor tyrosine kinase Alk controls neurofibromin functions in Drosophila growth and learning. *PLoS Genet, 7*(9), e1002281. doi:10.1371/journal.pgen.1002281

Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med, 15*(3), 112-119. doi:10.1016/j.molmed.2009.01.003

Hong, M., Chen, D. C., Klein, P. S., & Lee, V. M. (1997). Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem, 272*(40), 25326-25332. doi:10.1074/jbc.272.40.25326

Hosoi, T., Uchiyama, M., Okumura, E., Saito, T., Ishiguro, K., Uchida, T., . . . Hisanaga, S. (1995). Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J Biochem, 117*(4), 741-749. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124771

Ittner, A., Chua, S. W., Bertz, J., Volkerling, A., van der Hoven, J., Gladbach, A., . . . Ittner, L. M. (2016). Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-β toxicity in Alzheimer's mice. *Science, 354*(6314), 904-908. doi:10.1126/science.aah6205

Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem, 283*(46), 32066-32076. doi:10.1074/jbc.M805300200

Johnson, G. V., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci, 117*(Pt 24), 5721-5729. doi:10.1242/jcs.01558

Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2010). Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in Drosophila. *J Neurosci, 30*(2), 464-477. doi:10.1523/jneurosci.1490-09.2010

Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int, 58*(4), 458-471. doi:10.1016/j.neuint.2010.12.023

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev, 12*(1), 289-309. doi:10.1016/j.arr.2012.06.003

Morris, M., Knudsen, G. M., Maeda, S., Trinidad, J. C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A. L., & Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci, 18*(8), 1183-1189. doi:10.1038/nn.4067

Nishimura, I., Yang, Y., & Lu, B. (2004). PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in Drosophila. *Cell, 116*(5), 671-682. doi:10.1016/s0092-8674(04)00170-9

Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S., & Skoulakis, E. M. (2010). Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. *Biochem Soc Trans, 38*(4), 981-987. doi:10.1042/bst0380981

Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2015). Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in Drosophila. *Hum Mol Genet, 24*(7), 2065-2077. doi:10.1093/hmg/ddu726

Qiang, L., Sun, X., Austin, T. O., Muralidharan, H., Jean, D. C., Liu, M., . . . Baas, P. W. (2018). Tau Does Not Stabilize Axonal Microtubules but Rather Enables Them to Have Long Labile Domains. *Curr Biol, 28*(13), 2181-2189.e2184. doi:10.1016/j.cub.2018.05.045

Regan, P., Whitcomb, D. J., & Cho, K. (2017). Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau. *Neuroscientist, 23*(2), 137-151. doi:10.1177/1073858416633439

Russell, C. L., Mitra, V., Hansson, K., Blennow, K., Gobom, J., Zetterberg, H., . . . Pike, I. (2017). Comprehensive Quantitative Profiling of Tau and Phosphorylated Tau Peptides in Cerebrospinal Fluid by Mass Spectrometry Provides New Biomarker Candidates. *J Alzheimers Dis, 55*(1), 303-313. doi:10.3233/jad-160633

Rzezniczak, T. Z., Douglas, L. A., Watterson, J. H., & Merritt, T. J. (2011). Paraquat administration in Drosophila for use in metabolic studies of oxidative stress. *Anal Biochem, 419*(2), 345-347. doi:10.1016/j.ab.2011.08.023

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., . . . Ashe, K. H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science, 309*(5733), 476-481. doi:10.1126/science.1113694

Schwalbe, M., Kadavath, H., Biernat, J., Ozenne, V., Blackledge, M., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2015). Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231. *Structure, 23*(8), 1448-1458. doi:10.1016/j.str.2015.06.002

Sergeant, N., Delacourte, A., & Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta, 1739*(2-3), 179-197. doi:10.1016/j.bbadis.2004.06.020

Sibille, N., Huvent, I., Fauquant, C., Verdegem, D., Amniai, L., Leroy, A., . . . Landrieu, I. (2012). Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the

impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins, 80*(2), 454-462. doi:10.1002/prot.23210

Sotiropoulos, I., Galas, M. C., Silva, J. M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M. B., . . . Buee, L. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun, 5*(1), 91. doi:10.1186/s40478-017-0489-6

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L., & Feany, M. B. (2007a). Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol Biol Cell, 18*(12), 5060-5068. doi:10.1091/mbc.e07-04-0327

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Mulkearns, E. E., Shulman, J. M., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Feany, M. B. (2007b). S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in Drosophila. *J Neurosci Res, 85*(6), 1271-1278. doi:10.1002/jnr.21232

Stoothoff, W. H., & Johnson, G. V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta, 1739*(2-3), 280-297. doi:10.1016/j.bbadis.2004.06.017

Trushina, N. I., Bakota, L., Mulkidjanian, A. Y., & Brandt, R. (2019). The Evolution of Tau Phosphorylation and Interactions. *Front Aging Neurosci, 11*, 256. doi:10.3389/fnagi.2019.00256

Uversky, V. N. (2015). Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci, 7*, 18. doi:10.3389/fnagi.2015.00018

Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., & Feany, M. B. (2001). Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science, 293*(5530), 711-714. doi:10.1126/science.1062382

Xia, D., Li, C., & Götz, J. (2015). Pseudophosphorylation of Tau at distinct epitopes or the presence of the P301L mutation targets the microtubule-associated protein Tau to dendritic spines. *Biochim Biophys Acta, 1852*(5), 913-924. doi:10.1016/j.bbadis.2014.12.017

Zheng-Fischhöfer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Illenberger, S., Godemann, R., & Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem, 252*(3), 542-552. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2520542.x

SCIENTIFIC PUBLICATION

Functional Interactions of Tau Phosphorylation Sites That Mediate Toxicity and Deficient Learning in Drosophila melanogaster

Front Mol Neurosci. 2020; 13: 569520.
Published online 2020 Oct 21. doi: 10.3389/fnmol.2020.569520

frontiers in Molecular Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 21 October 2020
doi: 10.3389/fnmol.2020.569520

Functional Interactions of Tau Phosphorylation Sites That Mediate Toxicity and Deficient Learning in *Drosophila melanogaster*

*Iason Keramidis[1†‡], Ergina Vourkou[1,2†], Katerina Papanikolopoulou[1] and Efthimios M. C. Skoulakis[1]**

[1] Biomedical Sciences Research Centre "Alexander Fleming", Institute for Fundamental Biomedical Research, Vari, Greece, [2] 1st Department of Neurology, Memory and Movement Disorders Clinic, Eginition Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

OPEN ACCESS

Edited by:
Isabel Lastres-Becker, Autonomous University of Madrid, Spain

Reviewed by:
Karim Belarbi, Université de Lille, France
Marie-Christine Galas, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France

***Correspondence:**
Efthimios M. C. Skoulakis
skoulakis@fleming.gr

† These authors have contributed equally to this work

‡ **Present address:**
Iason Keramidis, CERVO Brain Research Center, Quebec City, QC, Canada

Received: 04 June 2020
Accepted: 15 September 2020
Published: 21 October 2020

Citation:
Keramidis I, Vourkou E, Papanikolopoulou K and Skoulakis EMC (2020) Functional Interactions of Tau Phosphorylation Sites That Mediate Toxicity and Deficient Learning in Drosophila melanogaster. Front. Mol. Neurosci. 13:569520. doi: 10.3389/fnmol.2020.569520

Hyperphosphorylated Tau protein is the main component of the neurofibrillary tangles, characterizing degenerating neurons in Alzheimer's disease and other Tauopathies. Expression of human Tau protein in Drosophila CNS results in increased toxicity, premature mortality and learning and memory deficits. Herein we use novel transgenic lines to investigate the contribution of specific phosphorylation sites previously implicated in Tau toxicity. These three different sites, Ser^{238}, Thr^{245}, and Ser^{262} were tested either by blocking their phosphorylation, by Ser/Thr to Ala substitution, or pseudophosphorylation, by changing Ser/Thr to Glu. We validate the hypothesis that phosphorylation at Ser^{262} is necessary for Tau-dependent learning deficits and a "facilitatory gatekeeper" to Ser^{238} occupation, which is linked to Tau toxicity. Importantly we reveal that phosphorylation at Thr^{245} acts as a "suppressive gatekeeper", preventing phosphorylation of many sites including Ser^{262} and consequently of Ser^{238}. Therefore, we elucidate novel interactions among phosphosites central to Tau mediated neuronal dysfunction and toxicity, likely driven by phosphorylation-dependent conformational plasticity.

Keywords: Tau, Tau phosphorylation, toxicity, neuronal dysfunction, learning deficits, gatekeeper phosphorylation, Drosophila

INTRODUCTION

Tau is a multifunctional neuronal microtubule-associated protein (Sotiropoulos et al., 2017) important for regulation of axonal transport and the length of the labile domains of axonal microtubules (Qiang et al., 2018). A single gene gives rise to 6 protein isoforms in the adult human brain via alternative splicing that results in isoforms that contain 1, 2 or none sequence blocks at their amino-terminus (0N, 1N, 2N), as well as inclusion of exon 10, or its exclusion from the mRNA (Andreadis et al., 1992). This leads to isoforms with 3 (3R isoforms), or 4 (4R isoforms) caboxy-terminal repeats, which mediate interactions with the microtubular cytoskeleton (Buee et al., 2000). A predominant characteristic of all 6 Tau isoforms present in the human brain is their highly elevated steady state phosphorylation load mediated by the opposing actions of several kinases and phosphatases (Johnson and Stoothoff, 2004). Tau has 84 putative phosphorylation sites

and it is reported more extensively phosphorylated during development than in mature neurons (Brion et al., 1993; Yu et al., 2009). Multiple kinases have been shown to phosphorylate Tau *in vitro* and in cells, but whether they also target Tau *in vivo* and under what circumstances remains largely elusive (Hosoi et al., 1995; Hong et al., 1997; Zheng-Fischhofer et al., 1998; Gong et al., 2005).

Interestingly, studies indicate that Tau phosphorylation might be primed by occupation of a particular site before the occurrence of additional phosphorylations (Hanger et al., 2009). Tau contains multiple "intrinsically disordered regions" (IDRs), which interfere with structural stability of the protein (Uversky, 2015). Then, this "gatekeeper" phosphorylation effect suggests that it may enable or inhibit local tertiary structures that expose or occlude other, often distant, phosphorylation sites (Jeganathan et al., 2008; Sibille et al., 2012; Schwalbe et al., 2015). Hence, the effect of specific phosphorylations may be to regulate this "structural plasticity" of Tau, contribute to the subcellular localization of Tau isoforms (Sotiropoulos et al., 2017) and modulate their functional properties (Xia et al., 2015).

Irrespective of whether it is mutated, or wild-type, pathological Tau presents increased phosphorylation at sites occupied physiologically, but also on sites occupied only when pathology is present and are referred to as "disease-associated" epitopes (Morris et al., 2015; Arendt et al., 2016). Although the mechanisms that trigger hyper-phosphorylation are unclear at present, the result is neuronal deposition of hyper-phosphorylated Tau (Martin et al., 2011). If indeed phosphorylations modulate the structure and functional properties of Tau isoforms, then this hyper-phosphorylation is likely to underlie significant changes in the properties of the protein that underlie its pathobiology (Regan et al., 2017). In fact, extensive literature has led to the widely held notion that aberrant Tau phosphorylation is central to neuronal pathology (Stoothoff and Johnson, 2005) and provided evidence that soluble hyper-phosphorylated Tau contributes to neuronal dysfunction before its aggregation (Fath et al., 2002; Santacruz et al., 2005; Brandt et al., 2009; Decker et al., 2015).

Antibodies that recognize non-physiologically phosphorylated Tau at specific sites (phosphoepitopes) in patient neurons but not in age-matched healthy individuals have been developed and used as specific diagnostic markers of Tauopathies (Sergeant et al., 2005). However, the mechanistic understanding of the sequential phosphorylation events that occur on Tau and which sites are essential for maintenance and evolution of pathology are still unclear. Identification of phosphorylation sites on Tau that either trigger or are essential for pathogenesis are pivotal to our understanding of Tau-dependent neuronal malfunction and toxicity.

Drosophila models of Tauopathies contribute significantly to the concept that accumulation of prefibrillar hyper-phosphorylated forms of Tau correlate with human Tau-mediated toxicity in flies (Wittmann et al., 2001; Steinhilb et al., 2007a,b; Feuillette et al., 2010). Recently, we have identified two novel phosphorylation sites on Tau, Ser^{238} and Thr^{245}, as essential for its toxic effects on mushroom body (MB) integrity (Kosmidis et al., 2010; Papanikolopoulou et al., 2010) and premature lethality (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). The MBs are neuronal assemblies that constitute major insect brain centers for learning and memory (Davis, 2005). Significantly, blocking Ser^{238} and Thr^{245} phosphorylation by substituting them with alanines (STA mutant), yielded animals with structurally normal but profoundly dysfunctional MBs, as flies accumulating the mutant protein exhibited impaired associative learning (Kosmidis et al., 2010). Moreover, our results strongly suggested that Ser^{238} occupation is a critical mediator of Tau neurotoxicity *in vivo*. However, neuronal dysfunction measured as olfactory learning deficits appeared to rely on phosphorylation at Ser^{262}, whose enhanced occupation appeared to account for the learning deficits of animals expressing the STA mutant Tau (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015).

Our previous analyses were performed on the double mutant STA and with Tau transgenes in different genomic locations with consequent variable transgenic protein expression, which attenuated accurate quantitative measures of toxicity and dysfunction and their dependence on relative hTau levels in the CNS. Therefore, we aimed to investigate the contribution of each of these two sites independently and investigate the potential interplay between them with respect to neuronal toxicity and dysfunction with quantifiably equally expressed transgenes. Hence, we generated new single mutants that block or mimic phosphorylation at these sites. We also focus on the role of Ser^{262} as a "gatekeeper" of disease-associated phospho-epitope appearance and whether as previously suggested (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), its occupation is regulated by phosphorylation of Ser^{238} or Thr^{245} or *vice versa*.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila Culture and Strains

Drosophila crosses were set up *en masse* in standard wheat-flour-sugar food supplemented with soy flour and $CaCl_2$ and cultured at 25°C and 50–70% humidity in a 12 h light/dark cycle unless noted otherwise. The $Elav^{c155}$-Gal4 and Ras2-Gal4 have been described before (Gouzi et al., 2011). The Elav-Gal4 line on the second chromosome was obtained from Bloomington Drosophila Stock center (#8765). The dual Gal 4 driver strains $Elav^{c155}$-Gal4;Ras2-Gal4 (henceforth Elav;Ras2) and $Elav^{c155}$-Gal4;Elav/CyO (henceforth Elav;Elav), were constructed by standard crosses. The $hTau^{0N4R}$ (0N4R) transgenic flies were a gift from M. Feany (Harvard Medical School, Boston, MA, United States).

To generate the transgenics carrying point mutations, the $hTau^{0N4R}$ cDNA (kind gift from Dr. Martin Chow, University of Kentucky), was subcloned into the pUAS.attB vector (Bischof et al., 2007) as a *Bgl*II/*Xba*I fragment. The mutants were generated by replacing the indicated Ser and Thr residues with Ala or Glu using the QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. The complementary mutagenic oligonucleotides pairs (5' to 3') for each mutant are shown below. The silent restriction sites

introduced for effective screening of positive clones appear underlined in italics whereas the amino acid substitution is shown in bold.

S238A (*Pvu*II): 5' CCACCCAAGTCGCCGT*CAGCTG*CCAAGAGCCGCCTGCAGACAGC.
GGTGGGTTCAGCGGCAG*TCGAC*GGTTCTCGGCG
GACGTCTGTCG 5'.

S238E (*Xba*I): 5' CCAAGTCGCCGTCT**GA**GGCCAAG *TCTAGA*CTGCAGACAGCCCC.
GGTTCAGCGGCAGACTCCGGTTC*AGATCT*GACGTCTG
TCGGGG 5'.

T245A (*Sal*I): 5' CTTCCGCCAAGA*GTCGAC*TGCAGGCAG
CCCCCGTGCCCATG.
GAAGGCGGTTCT*CAGCTG*ACGTCCGTCGGGG
GCACGGGTAC 5'

T245E (*Sal*I): 5' CGTCTTCCGCCAAGA*GTCGAC*TGCAG
GAGGCCCCCGTGCCCATG.
GCAGAAGGCGGTTCT*CAGCTG*ACGTCCTCCGGGGG
CACGGGTAC 5'.

S262A (*Bgl*II): 5' GCC*AGATCT*GAAGAATGTCAAGTCCAA
GATCGGCGCCACTGAG.
CGG*TCTAGA*CTTCTTACAGTTCAGGTTCTAGCCGCGG
TGACTC 5'.

S262E (*Bgl*II): 5' GCC*AGATCT*GAAGAATGTCAA
GTCCAAGATCGGC**GA**GACTGAG.
CGG*TCTAGA*CTTCTTACAGTTCAGGTTCT
AGCCGC**T**CTGACTC 5'.

STA (*Pvu*II): 5' CCAAGTCGCCGT*CAGCTG*CCAAGAGCC
GCCTGCAGGCAGCCCCCG.
GGTTCAGCGGCA*GTCGAC*
GGTTCTCGGCGGACGTCCGTCGGGGGC 5'.

The sequence of the mutants was confirmed by sequencing (VBC-biotech). Transgenic flies were generated by phiC31-mediated transgenesis by BestGene Inc. (Chino Hills, CA, United States). DNAs were injected into genomic landing site 53B2 on the second chromosome (BDSC #9736).

To obtain flies for experiments detailed herein, virgins from the driver strains were crossed to males bearing the hTau transgenes and experimental genotypes were selected from the progeny as appropriate and as detailed below:

Female Elav X 0N4R or $0N4R^{II}$ or w^{1118} (for controls).

Female Elav;Elav/CyO X 0N4R or $0N4R^{II}$: Select male and female non-CyO progeny.

Female Elav;Ras2 × 0N4R or $0N4R^{II}$: Select male and female non-CyO progeny.

Female Elav;Ras2 × $0N4R^{S238A}$ or $0N4R^{S238E}$ or $0N4R^{T245A}$ or $0N4R^{T245E}$ or $0N4R^{S262A}$ or $0N4R^{S262E}$ or $0N4R^{STA}$: Select male and female progeny.

Female Elav;Ras2 X w^{1118}: Select male and female progeny for controls.

Histology

Immunohistochemistry on paraffin sections of Drosophila adult heads were performed on paraffin sections as previously described (Kosmidis et al., 2010) using the anti-Leo primary antibody at 1:4000.

Western Blot and Antibodies

Total Tau levels and occupation of particular phosphosites were determined in 2–5 adult female head homogenates in 1x Laemmli buffer (50 mM Tris pH 6.8, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.01% bromophenol blue). The monoclonal antibodies T46 (recognizing hTau irrespective of phosphorylation- Invitrogen, 1:3,000), AT8 (recognizing phosphorylated Ser^{202}/Thr^{205}-Pierce Endogen, 1:1,000), AT100 (recognizing phosphorylated Thr^{212}/Ser^{214}-Pierce Endogen 1:1,000) and the polyclonal antibodies pS396 (Source Bioscience, 1:3,000) and pS262 (Source Bioscience, 1:1,000) were used. We generated a novel polyclonal antibody against phospho-Ser^{238} of hTau, raised in rabbits (Pocono Rabbit Farm and Laboratory) against peptide TPPKSPS**p**SAKSRLQTAPVPMP and affinity purified before use. In order to normalize sample loading, anti-Syntaxin (mAb 8C3, Developmental Studies Hybridoma Studies) was used at 1:3,000. Secondary antibodies were applied at 1:5,000.

Lifespan Determination

Flies accumulating $hTau^{0N4R}$ variants under $Elav^{c155}$-Gal4;Ras2-Gal4 were raised at 18°C and subsequently 17 groups of 20 (340 flies per genotype in two biological replicates), 1–2 day-old males per genotype were maintained at 30°C transferring to fresh vials every 3 days until they expired (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015).

Drug Feeding

Flies accumulating $hTau^{0N4R}$ variants under $Elav^{c155}$-Gal4; Ras2-Gal4 were raised at 25°C together with control heterozygotes. Paraquat feeding was performed as previously described (Dias-Santagata et al., 2007). Briefly fifteen groups of 20, (two biological replicates of 300 flies total) 1–2 day-old males per genotype were fed 30 mM of methyl viologen (Acros Organics) in standard food for 24 h or as indicated and the number of surviving flies per vial were counted.

Behavioral Assessment

Behavioral assays were performed under dim red light at 24–25°C and 70-75% humidity. All flies were 2–5 days old, collected under CO_2 anesthesia one day prior to the experiment and kept in food vials in groups of 50–70 flies each at 30°C. Pavlovian olfactory aversive conditioning was performed using aversive odors as conditioned stimuli (CS+ and CS−) with the electric shock unconditioned stimulus (US). The odors used were benzaldehyde (BNZ) and 3-octanol (OCT) diluted in oil (5% v/v for BNZ and 50% v/v for OCT). One hour before training flies were transferred to fresh food vials. For training, a group of 50–70 flies were transferred into a tube lined with electrifiable grid and presented with air (500 mL/min). Flies were first exposed to an odor for 30 s paired with 90 V shock (consisting of six 1.25 s pulses with 4.5 s inter-pulse intervals, so 6 US/CS pairings were delivered within 30 s of odor presentation) and then 30 s of air. Subsequently, flies were exposed to the second odor for 30 s without shock and then 30 s of air. Two groups of animals of the same genotype were trained simultaneously such as, one to avoid BNZ and the other to avoid OCT, while the complimentary odorant was used as

control odor. The animals were transferred to a T-maze apparatus immediately and flies were tested simultaneously for preferential avoidance of the conditioned odorant allowed to choose between the two odors for 90 s. A performance index (PI) was calculated as the fraction of flies that avoided the CS+ minus the fraction that avoided the CS− odors divided by the total number of flies in the experiment. A final PI is the average of the scores from the two groups of flies trained to complementary conditioning stimuli and ranges from 0 to 100. Because all new transgenes are inserted in the same site we used one of the cognates as heterozygous controls.

Statistical Analyses

Quantification of all Western blots was performed by densitometry and the ratio of Tau relative to that of Syntaxin (Syx) was calculated. The ratio of the control genotype was set to 1 and all experimental ratios were reported as relative to that. The means and SEMs were compared following an initial, significant differences- indicating ANOVA (positive ANOVA), using Dunnett's tests relative to the designated control. Similarly, learning performance indices were calculated for each genotype as indicated above and following positive ANOVA, means and SEMs were compared to that of controls using Dunnett's tests.

Survival data were examined for differences at each assessment day using Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests. If significant differences were uncovered then the means and SEMs from each genotype for that day were compared relative to controls using the Steel with control tests. Means and SEMs of survival upon oxidative stress toxicity were compared to that that of controls or the variants as designated using Dunnett's or planned multiple comparisons tests following an initial positive ANOVA. All statistical details are presented in **Supplementary Tables 1–5**.

RESULTS

Learning Deficits Are Independent of hTau Levels in Adult Drosophila

Because the randomly inserted $hTau^{STA}$ was generated in the 2N4R isoform (Kosmidis et al., 2010), to generalize the effects of that double mutation and validate the derived conclusions (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015) independently, we generated the STA double mutation in the 0N4R isoform. In addition, comparison of the effects of transgenics on neuronal function and neurotoxicity is expected to be facilitated if the protein levels were similar or the same, rather than the variable levels attained by randomly inserted transgenes. Therefore, we generated new 0N4R, STA and single phosphomutant strains via phiC31-mediated transgenesis (Bischof et al., 2007), with all transposons inserted in the same landing site on the second chromosome (55B2), expected to yield similar expression levels to facilitate cross variant comparisons. Importantly, all new transgenes used herein presented similar levels of expression (**Supplementary Figure 1**), ascertaining that potential phenotypic differences among the transgenic proteins would not be due to differences in expression, but rather reflect differential functional effects.

Interestingly, unlike for the randomly inserted $hTau^{0N4R}$ (henceforth 0N4R) (Wittmann et al., 2001), pan-neuronal expression of the same transgene integrated in the second chromosome landing site ($0N4R^{II}$) did not result in MB ablation (**Figure 1A2** vs. **Figure 1A3**), as previously reported (Kosmidis et al., 2010). We hypothesized that integration within the attp sites, or at the specific location on the second chromosome must have attenuated $0N4R^{II}$ expression resulting in intact MBs. To address this and because all phosphosite variants we generated were integrated in the same chromosomal site, we sought to increase expression of these transgenes to match that of 0N4R. To that end we combined two copies of the pan-neuronal Elav driver, the typical one on the X chromosome with an independent insertion on the second (Elav;Elav), or the pan-neuronal Elav driver on the X with the ubiquitous adult CNS driver Ras2 (Gouzi et al., 2011) as detailed in Materials and Methods.

Quantification of $0N4R^{II}$ levels relative to those of the original 0N4R revealed significant differences under Elav, Ras2, but not the double driver Elav;Elav, or Elav;Ras2 (**Figure 1B** and **Supplementary Table 1**). Importantly, $0N4R^{II}$ accumulation under Elav;Ras2 was the closest to the levels of 0N4R under Elav (**Figure 1B** and **Supplementary Table 1**) as reported before (Kosmidis et al., 2010). Therefore, the Elav;Ras2 composite driver was used for all subsequent experiments. Interestingly, however, despite the similar levels of expression the MBs remained structurally intact in animals expressing $0N4R^{II}$ under Elav;Ras2 (**Figure 1A5**), as they also did under Elav;Elav (**Figure 1A4**). In fact quantification of the dendritic areas (calyces) stained by the anti-Leo antibody in controls (0.1376 mm^2) compared to those in animals expressing $0N4R^{II}$ under Elav;Ras2 (0.1268 mm^2) did not yield significant differences (Student's *t*-test, $p = 0.1716$, $n = 6$). This indicates that the structural deficits of the MBs are highly sensitive to the amount of hTau present during their development (Kosmidis et al., 2010) and levels under Elav;Ras2 are likely just under the threshold requisite to precipitate defects. Alternatively, the presence of the attp sites flanking the new transgenes may insulate them from non-specific effects of neighboring chromatin on their levels, or temporal expression pattern. This likely leads to bypassing the sensitive period during early embryogenesis when hTau elevation results in aberrant MBs (Kosmidis et al., 2010).

Importantly, expression of the $0N4R^{II}$ transgene under the single Elav, the Elav;Elav or the Elav;Ras2 drivers yielded similar deficits in associative learning (**Figure 1C** and **Supplementary Table 1**). Although the lowest performance index was consistently attained under Elav;Ras2, it was marginally ($p = 0.002$) different than that under Elav and not different from the performance of animals expressing $0N4R^{II}$ under Elav;Elav (**Supplementary Table 1**). Since $0N4R^{II}$ expression under all pan-neuronal drivers tested yielded similar learning deficits, these results demonstrate that the magnitude of learning impairment is not proportional to the levels of hTau and is not consequent of altered MB integrity. Therefore, we used Elav;Ras2 to drive $0N4R^{II}$ for subsequent analyses because it induces expression levels similar to previously used and reported conditions (Kosmidis et al., 2010; Papanikolopoulou et al., 2010;

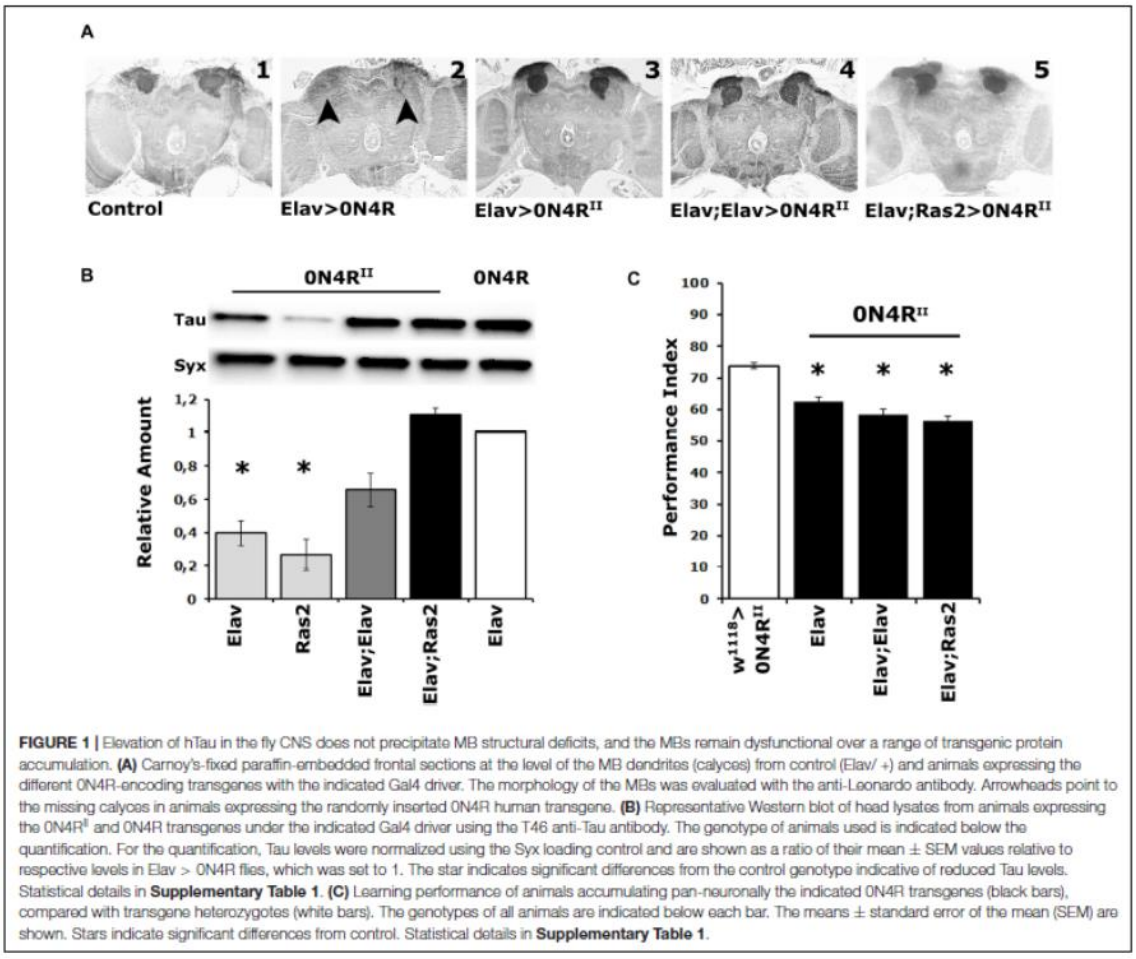


FIGURE 1 | Elevation of hTau in the fly CNS does not precipitate MB structural deficits, and the MBs remain dysfunctional over a range of transgenic protein accumulation. **(A)** Carnoy's-fixed paraffin-embedded frontal sections at the level of the MB dendrites (calyces) from control (Elav/ +) and animals expressing the different 0N4R-encoding transgenes with the indicated Gal4 driver. The morphology of the MBs was evaluated with the anti-Leonardo antibody. Arrowheads point to the missing calyces in animals expressing the randomly inserted 0N4R human transgene. **(B)** Representative Western blot of head lysates from animals expressing the $0N4R^{II}$ and 0N4R transgenes under the indicated Gal4 driver using the T46 anti-Tau antibody. The genotype of animals used is indicated below the quantification. For the quantification, Tau levels were normalized using the Syx loading control and are shown as a ratio of their mean ± SEM values relative to respective levels in Elav > 0N4R flies, which was set to 1. The star indicates significant differences from the control genotype indicative of reduced Tau levels. Statistical details in **Supplementary Table 1**. **(C)** Learning performance of animals accumulating pan-neuronally the indicated 0N4R transgenes (black bars), compared with transgene heterozygotes (white bars). The genotypes of all animals are indicated below each bar. The means ± standard error of the mean (SEM) are shown. Stars indicate significant differences from control. Statistical details in **Supplementary Table 1**.

Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), which would facilitate comparisons and extrapolations.

Differential Contributions of Ser^{238} and Thr^{245} to hTau-Dependent Toxicity

Initially we determined whether the Ser^{238} and Thr^{245} to Ala double mutation (STA), on the 0N4R isoform suppresses hTau toxicity measured as elevated age-dependent mortality as did when on the 2N4R isoform (Kosmidis et al., 2010). To that end, we raised animals at 18C to keep transgene expression minimal and then transferred and maintained the adults to 30C to maximize transgene expression and scored for survivors every 2 days. Importantly, expression of $0N4R^{II}$ resulted in premature lethality relative to controls (**Figure 2A** and **Supplementary Table 2**), similar to the randomly inserted transgene (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). In contrast, expression of $0N4R^{STA}$ did not yield significantly different survival profile from that of controls (**Figure 2A** and **Supplementary Table 2**). Significantly, on the 29th day when the population of control animals is reduced by 50% (50% attrition-dotted line on **Figure 2A**), the population of surviving $0N4R^{II}$ animals was significantly different from controls while that of $0N4R^{STA}$-expressing flies was not (**Supplementary Table 2**). Therefore, the new transgenes on chromosome II fully recapitulate and verify the survival results obtained with the randomly inserted transgenic strains (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). Because the new transgenes are expressed at the same level (**Supplementary Figure 1**), these results confirm that toxicity is independent of hTau protein levels and the assertion that Ser^{238} or Thr^{245}, or both are required for hTau dependent toxicity manifested as premature mortality.

To determine whether both, or which of the two phosphorylation sites mutated in the STA transgene mediate hTau toxicity, we examined the effects of single substitutions

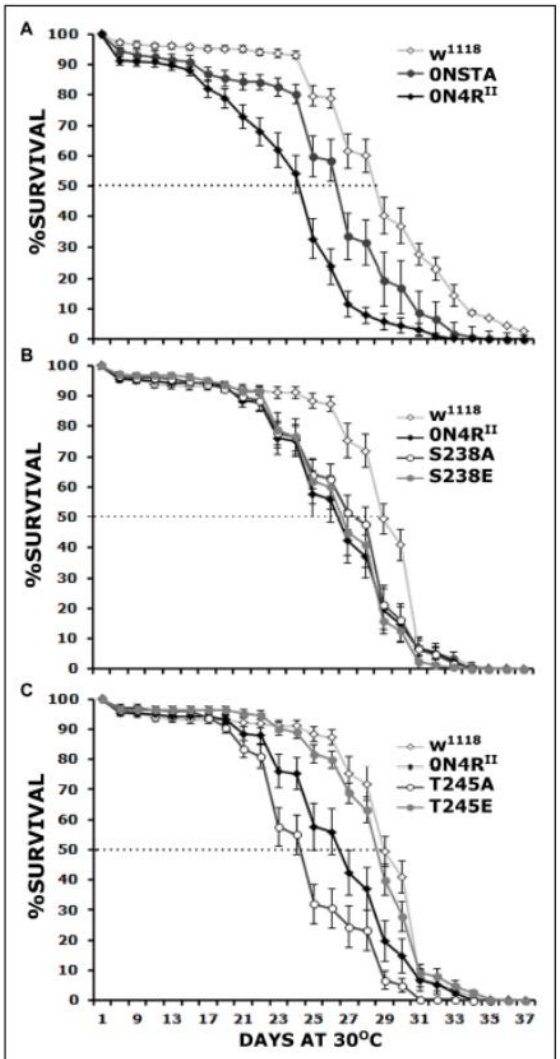


FIGURE 2 | Differential effects of mutants on Ser^{238} and Thr^{245} on premature lethality. Survival curves for animals expressing 0N4R^{II}, 0NSTA **(A)**, S238A, S238E **(B)**, T245A, and T245E variants **(C)** expressed in the CNS in comparison with Elav/+; Ras/ + control heterozygotes (w^{1118}). The data represent the mean ± SEM from two independent experiments with a total of 340 flies assessed per genotype. After 29 days, the population of Elav/+; Ras/ + control heterozygotes (w1118) was reduced by 50% (50% attrition). Statistical details in **Supplementary Table 2**.

of Ser^{238} and Thr^{245} either to the phosphorylation-blocking Ala, or the potential phosphomimic Glu. Ser^{238} has been reported phosphorylated immediately before the 50% attrition point on 0N4R (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), leading to the hypothesis that its occupation predicts toxicity. Surprisingly, however, blocking phosphorylation at Ser^{238} did not ameliorate the toxicity of the 0N4R^{S238A} protein (**Figure 2B**), which remained significantly different from that of control flies from days 23 until 30, including day 29 when the control population reached the 50% attrition day (**Figure 2B** and **Supplementary Table 2**). The pseudophosphorylated 0N4R^{S238E} also remained as toxic as the parental 0N4R^{II} (**Figure 2B** and **Supplementary Table 2**). The results suggest that phosphorylation at Ser^{238} may be necessary, but it is not sufficient to induce of hTau toxicity underlying early mortality, unlike our prior hypothesis (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015).

Significantly, the 0N4R^{T245A} protein where Thr^{245} phosphorylation was blocked by the Ala substitution presented consistently elevated mortality from days 23 to 30 (**Figure 2C** and **Supplementary Table 2**), earlier than in animals expressing 0N4R^{II} and presenting a 50% attrition on day 24 instead of day 29 in controls (**Figure 2C**). This suggests that occupation of this site is essential to suppress toxicity leading to early mortality. Surprisingly and in accord with this hypothesis, the phosphomimic 0N4R^{T245E} mutation ameliorated toxicity behaving much like controls throughout the curve including the 50% attrition day (**Figure 2C** and **Supplementary Table 2**). These results strongly suggest that phosphorylation at Thr^{245} is protective or averts toxicity, whereas lack of occupation at that site is necessary for hTau toxicity linked to early mortality.

A different measure of toxicity that underlies the level of oxidative stress upon pathological hTau accumulation is resistance to paraquat. This is a redox-active bipyridine heterocyclic compound, which in tissues produces superoxide anions and therefore exacerbates already extant oxidative stress (Rzezniczak et al., 2011). Consequently, flies experiencing increased oxidative stress due to pathological hTau accumulation are expected to be more sensitive to added paraquat-mediated stress (Dias-Santagata et al., 2007). In fact, after 24 h of exposure to 30 mM paraquat-laced food, control flies presented a baseline 10% mortality, while 40% of 0N4R^{II} animals expired in the same time frame. In contrast, the Ser^{238} and Thr^{245} to Ala double mutation 0N4R^{STA}-expressing animals suppressed mortality to basal levels similar to that of controls (**Figure 3** and **Supplementary Table 3**), suggesting a role for both Ser^{238} and/or Thr^{245} in hTau-mediated oxidative stress toxicity.

As for mortality, the 0N4R^{S238A} protein with blocked phosphorylation at Ser^{238} and the pseudophosphorylated 0N4R^{S238E} were as toxic as 0N4R^{II} (**Figure 3** and **Supplementary Table 3**). However, toxicity of 0N4R^{S238E} was significantly milder than that of 0N4R^{S238A} (**Supplementary Table 3**). Blocking Thr^{245} phosphorylation presented elevated hTau toxicity compared to 0N4R^{II}-expressing animals (**Figure 3** and **Supplementary Table 3**). Interestingly 0N4R^{T245A} was ameliorated to 0N4R^{II} levels by pseudophophorylation at that site, but it was not eliminated to 0N4R^{STA} basal levels (**Figure 3** and **Supplementary Table 3**). Because expression of the double phosphoblock mutant 0N4R^{STA} presented only baseline toxicity unlike the single site mutants (**Supplementary Table 3**), these results suggest that both sites likely need to be occluded from phosphorylation to eliminate or suppress hTau-mediated oxidative stress toxicity. The dependence of

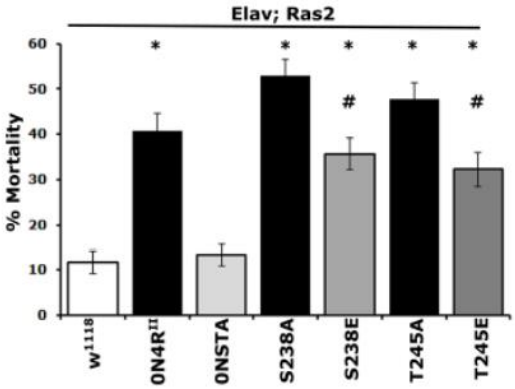


FIGURE 3 | Differential effects of mutants on Ser^{238} and Thr^{245} on oxidative stress. One to 2-day-old flies were exposed to 30 mM paraquat, and mortality was scored after 24 h. The data represent the mean ± SEM from two independent experiments with a total of 300 flies assessed per genotype. The genotypes of all animals are indicated below each bar. Stars indicate significant difference from controls and # significant difference from the cognate mutant. Compared with the control driver heterozygote flies (Elav/+; Ras/+) administration of paraquat for 24 h resulted in significant lethality for all Tau variants except for 0NSTA expressing flies. Statistical details in **Supplementary Table 3**.

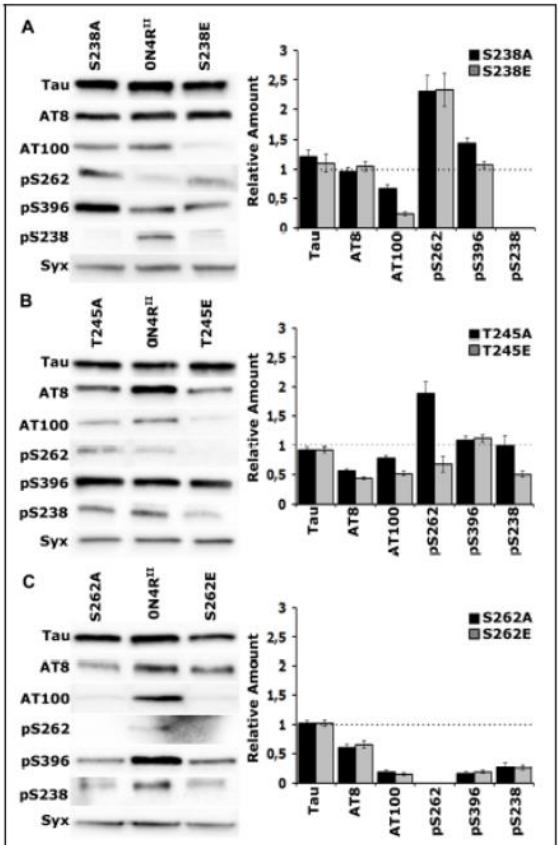


FIGURE 4 | Gatekeeper phosphorylation interactions among Ser^{238}, Thr^{245}, and Ser^{262}. Representative Western blots from head lysates of flies accumulating 0N4R^{II} pan-neuronally compared with similar lysates from site-specific Ala and Glu mutants probed with the antibodies indicated on the left. The level of syntaxin (Syx) in the lysates was used as loading control for quantifications. The first antibody measures total Tau in the lysates, whereas all others target particular phosphorylated residues. Quantification of at least three independent biological replicates of at least six technical replicates are shown on the right. The syntaxin-normalized level of 0N4R^{II} for each quantification was fixed to 1 and represented by the horizontal dotted line. The bars represent the mean ± SEM relative levels of mutants phosphorylated at the given sites, over that of the 0N4R^{II} control. Bars and their respective error bars that are not in contact with the dotted line are significantly different from control. Statistical details in **Supplementary Table 4**. **(A–C)** Representative Western blots from head lysates of flies accumulating 0N4R^{II} pan-neuronally compared with similar lysates from S238A and S238E mutants **(A)**, T245A and T245E mutants **(B)** and S262A and S262E mutants **(C)** probed with the antibodies indicated on the left. Dunnett's tests followed initial ANOVA to indicate significant differences from control for all phosphosites.

oxidative stress-dependent lethality on occupation of Ser^{238} and Thr^{245} is distinctly different from that for premature mortality, suggesting that the two measures of toxicity may in fact reflect distinct pathological mechanisms.

Multiple Phosphorylations Depend on the State of Thr^{245} and Ser^{238} Occupation

To investigate the proposed interaction between occupation of Ser^{238} and Thr^{245} and its consequences on distant sites, we used phospho-specific antibodies against sites associated with pathology. We selected the AT8 epitope formed by phosphorylation of Ser^{202} and Thr^{205} and AT100 signifying occupation of Thr^{212} and Ser^{214} in the Proline Rich Region of hTau, amino-terminal to Ser^{238} and Thr^{245}. In addition, we assayed phosphorylation at Ser^{396} near the carboxy-terminus of the protein. As demonstrated again on **Figures 4A–C**, the expression levels of the new transgenes are the same and equivalent with that of 0N4R^{II}. In addition, we verified the specificity of the new anti-pSer^{238} antibody against 0N4R^{STA} (**Supplementary Figure 2**). A residual band of higher molecular mass was detectable in all lysates including 0N4R^{STA} (**Supplementary Figure 2**) and is considered non-specific.

Blocking phosphorylation, or pseudophosphorylation of Ser^{238} reduced AT100 phosphorylation (**Figure 4A** and **Supplementary Table 4**) and elevated occupation of Ser^{262} (**Figure 4A** and **Supplementary Table 4**) relative to that on 0N4R^{II}. This suggests that Ser^{262} occupation is independent of the state of Ser^{238} phosphorylation. Phosphorylation of the distant Ser^{396} was elevated upon blockade of Ser^{238} occupation, but remained unaffected by pseudophosphorylation of that site (**Figure 4A** and **Supplementary Table 4**). As expected, the anti-pSer^{238} antibody

also did not recognize the $0N4R^{S238A}$, or the $0N4R^{S238E}$ proteins (**Figure 4A**).

Importantly, although Ser^{238} occupation appeared unaffected in the $0N4R^{T245A}$ protein, it was significantly reduced in the pseudo-phosphorylated $0N4R^{T245E}$ (**Figure 4B** and **Supplementary Table 4**). This is consistent with the notion that occupation of Thr^{245} suppresses Ser^{238} phosphorylation. Given that Glu substitution provides a single charge at the site vs. the two charges carried by the phosphate group, the suppression may in fact be higher in the normal wild type hTau. Because an anti- $pThr^{245}$ antibody is not currently available, we cannot currently directly test whether the reciprocal that is, Ser^{238} occupation suppressing Thr^{245} phosphorylation may be true as well. Conversely, blockade of Thr^{245} occupation enhanced Ser^{262} relative to that on $0N4R^{II}$, while pseudophosphorylation left it at control levels if not marginally lower (**Figure 4B** and **Supplementary Table 4**). This is consistent with the notion that loss or suppression of Thr^{245} phosphorylation leads to Ser^{238} and Ser^{262} occupation. Inasmuch as the phosphomimic substitution may not fully reflect the consequence of *bona fide* phosphorylation at the site, the data support the notion Thr^{245} occupation suppresses both Ser^{238} and Ser^{262} phosphorylation. Therefore, in effect it acts as a "gatekeeper" for the consequent pathological manifestations of Ser^{238} and Ser^{262} occupation (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015).

The proposed role of Thr^{245} as the critical "gatekeeper" instead of the Ser^{238}, the two residues concurrently changed in the STA mutants is also reflected in the consequences of blocking, or pseudophosphorylating it on distant phosphosites. Phosphorylation at the proximal phospho epitopes recognized by the AT8 and AT100 antibodies are significantly depressed in both Thr^{245} mutants (**Figure 4B** and **Supplementary Table 4**), but Ser^{396} occupation remains unaffected. In contrast, only AT100 occupation is suppressed in Ser^{238} mutants, while Ser^{396} phosphorylation appears significantly elevated when Ser^{238} phosphorylation is blocked (**Figure 4A** and **Supplementary Table 4**). This suggests that Thr^{245} occupation is required for phosphorylation at the AT8 and AT100 epitopes, while Ser^{238} phosphorylation suppresses occupation of Ser^{396}, another manifestation of potentially conformation-mediated interactions among distant phosphosites.

The essential role of Ser^{262} as a broad-acting "gatekeeper" of pathology (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015) in accord to independently-derived similar proposal (Nishimura et al., 2004) is demonstrated in **Figure 4C** where all phosphorylations in question are drastically suppressed on the $0N4R^{S262A}$ and $0N4R^{S262E}$ proteins. This includes $pSer^{238}$, which drastically reduced, albeit not completely eliminated (**Figure 4C** and **Supplementary Table 4**). Although the effect of blocking Ser^{262} phosphorylation ($0N4R^{S262A}$), supports the notion that its occupation is required for subsequent Ser^{238} phosphorylation, the opposite might be expected for the phospho-mimic $0N4R^{S262E}$. The fact that Ser^{238} is under-phosphorylated on the $0N4R^{S262E}$ protein argues that the single charge- bearing Glu is not an efficient substitute for phosphorylated Ser^{262} in mediating conformational changes promoting phosphorylation at proximal and distant sites (**Figure 4C**). Rather it appears that it may in fact have a negative effect by occluding *bona fide* phosphorylation at that site.

Differential Contribution of Ser^{238} and Thr^{245} to hTau-Mediated Learning Deficits

In addition to its "gatekeeper" effects, phosphorylation at Ser^{262} was proposed to be necessary for and predict learning deficits (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). The Ser^{262} variants were in fact generated for a second reason in addition to facilitating comparison and validation of the effects of the Ser^{238} and Thr^{245} variants. Because the expression level of the previously used randomly inserted Ser^{262A} variant was low (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), it raised the possibility that the lack of learning deficits upon expression of that transgene may have been consequent of its low expression.

Pan-neuronal expression of the new $0N4R^{STA}$ variant did not precipitate structural defects in the MBs (**Figure 5A**), in agreement with prior reports (Kosmidis et al., 2010; Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). Moreover, as for the $2N4R^{STA}$ (Kosmidis et al., 2010), expression of $0N4R^{STA}$ yielded significant deficits in associative learning (**Figure 5B** and **Supplementary Table 5**), equivalent to those presented by $0N4R^{II}$ (**Supplementary Table 5**), demonstrating that although grossly intact structurally, the CNS of animals expressing this hTau variant is dysfunctional. Importantly, expression of the single variants $0N4R^{S238A}$ and $0N4R^{T245A}$ resulted in a similar decrease in learning. Given that Ser^{262} is hyper-phosphorylated in these variants (**Figures 4A,B**), the data support the proposal that elevated occupation at this site is in fact requisite for the learning deficits (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015).

Further toward this notion, we assayed associative learning in animals expressing the phosphomimic variants $0N4R^{S238E}$ and $0N4R^{T245E}$ alongside the respective Ala substituted proteins at these sites. Interestingly, expression of $0N4R^{S238E}$ precipitated a learning deficit equivalent to that of the phospho-blocked variant $0N4R^{S238A}$ (**Figure 5C** and **Supplementary Table 5**), as predicted by the hyper-phosphorylation of this protein at Ser^{262} (**Figure 4A**) and in agreement with the inefficiency of Glu substitution as a phospho-mimic at that site. In contrast, unlike the deficit presented by animals expressing $0N4R^{T245A}$, expression of the pseudo-phosphorylated variant $0N4R^{T245E}$ did not affect learning (**Figure 5D** and **Supplementary Table 5**). This agrees with the phosphorylation state of Ser^{262} on this variant protein and in support of the proposed role of Thr^{245} phosphorylation as suppressive of hTau-mediated toxicity and dysfunction. This in turn suggests that phosphorylation at this epitope may be constitutive on non-pathogenic hTau.

As expected, expression of the phosphoblocked $0N4R^{S262A}$ protein did not affect learning (**Figure 5E** and **Supplementary Table 5**), confirming published results (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). Moreover, since $0N4R^{S262A}$ is expressed at the same level as controls (**Supplementary Figure 1** and **Figure 4C**), this result verifies that lack of deficient learning was not consequent of lower expression of the randomly inserted transgene (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015).

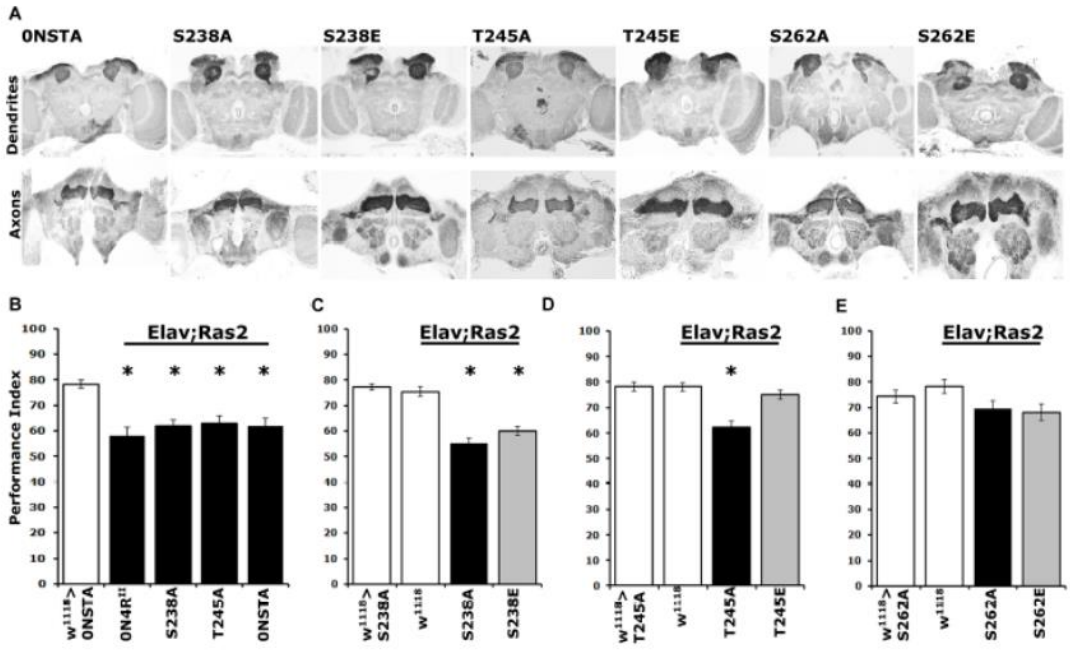


FIGURE 5 | Differential learning defects of mutants on Ser^{238} and Thr^{245} and Ser^{262}. **(A)** Carnoy's-fixed paraffin-embedded frontal sections stained with anti-Leonardo at the level of MB dendrites in the posterior of the head and of MB axons of the γ-subtype-lobe from animals expressing the indicated Tau variants. **(B–E)** Learning performance of animals accumulating pan-neuronally the indicated Tau variants (black bars) compared with driver or transgene heterozygotes (white bar). The genotypes of all animals are indicated below each bar. The means ± standard error of the mean (SEM) are shown. Stars indicate significant differences from control. Statistical details in **Supplementary Table 5**.

Again, lack of the expected learning deficit upon expression of the pseudo-phosphorylated 0N4R^{S262E} is a likely consequence of the inefficient Glu-mediated mimic of phosphorylation at that site (**Figure 5E**).

DISCUSSION

Although hTau phosphorylation and its regulation has received waning attention lately, hyper-phosphorylation at disease linked phosphoepitopes remain strong pathology-linked biomarkers (Blennow and Zetterberg, 2018). Therefore, understanding the patterns and regulation of hTau phosphorylation is essential to monitor pathologies and their progression, but just as importantly, to understand its contribution to the IDR-mediated structural plasticity of this protein. The results herein describe a sequence of apparent "gatekeeper" phosphorylations, which affect both hTau toxicity and neuronal dysfunction in Drosophila that could also serve as disease biomarkers in patients (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015).

A hypothesis put forward before (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), suggested that Ser^{262} is required for Ser^{238} occupation, which was verified experimentally herein (**Figure 4**). Importantly, generation of the single mutants on Ser^{238} and Thr^{245} revealed an important new regulatory point not evident with the STA double mutant analyzed before. Collectively, the toxicity (**Figures 2, 3**) and learning (**Figure 5**) data in the context of the phospho-profile analyses (**Figure 4**), strongly indicate that Thr^{245} phosphorylation attenuates or blocks Ser^{262} occupation, which in turn is required for Ser^{238} phosphorylation leading to toxicity. Therefore, Ser^{262} phosphorylation precedes and acts as a "gatekeeper" to Ser^{238} occupation, which promotes hTau-dependent premature mortality or decreased resistance to oxidative stress, two very likely distinct manifestations of hTau toxicity.

Currently we do not know the mechanism or trigger of Thr^{245} dephosphorylation, as well as the speed and mechanism of the consequent Ser^{262} occupation, although it is likely mediated by conformational changes. As the resultant learning deficits require time after hTau expression to be manifested (Papanikolopoulou et al., 2010; Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), the process is likely relatively slow. Since Ser^{262} occupation precedes that of Ser^{238}, this may account for the reported significant delay in phosphorylation of the latter (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), a potential link to the age dependent manifestation of degenerative Tauopathies in humans as well. This is turn suggests that monitoring Ser^{238} occupation may be a useful biomarker of disease progression.

Domains such as the highly conserved microtubule binding repeats and the amino terminal region of the protein appear functionally specialized (Trushina et al., 2019). Notably, the work described herein suggests IDR/conformation-dependent interactions with the 24 aminoacids that separate Ser^{238} just amino-terminal to the first microtubule binding repeat to Ser^{262} within it, with significant roles in hTau-mediated toxicity and dysfunction. Therefore, we propose that this region defines a new potential hTau domain of importance to toxicity and neuronal dysfunction. This may be reflected in phospho-profiles of Tau fragments in Cerebrospinal fluid (CSF) samples from Alzheimer's disease (AD) patients that show significant enrichment in Ser^{238} and Ser^{262} occupation (Russell et al., 2017). Moreover, an independent study indicated that phosphorylated Ser^{238} and Ser^{262} appear specifically associated with pathological Tau in AD patients (Martin et al., 2013). We propose that this "toxicity domain" contributes to Tau structural plasticity, as the occupation state of Ser^{238}, Thr^{245}, and Ser^{262} affects the phosphorylation state of additional proximal sites such as Ser^{202}/Thr^{205} (AT8), Thr^{212}/Ser^{214} (AT100), but also the distant Ser^{396} at the far carboxy-terminus of the protein (**Figure 4**), which when phosphorylated is also enriched in the CSF from AD patients (Russell et al., 2017). As all the sites under consideration are in invariant hTau regions, the regulatory mechanisms we propose are pertinent to all isoforms.

Importantly, Thr^{245} phosphorylation appears to be inhibitory not only to Ser^{262} and consequently to Ser^{238} occupation, but also on Ser^{202}/Thr^{205} and Thr^{212}/Ser^{214} (**Figure 4B**) and perhaps it represents a broader suppressor of toxicity and neuronal dysfunction (**Figure 6**). Hence, occupation of this site appears to act as a "gatekeeper" against additional phosphorylations linked to pathologies. In agreement with this notion, phosphorylated Thr^{245} appears exclusively in physiological human brain lysates (Martin et al., 2013). To our knowledge, the only other phosphorylation reported to decrease Tau/Aβ-induced toxicity is on Thr^{205} (Ittner et al., 2016). This contrasts with the apparent role of Ser^{262} phosphorylation as an enabler of phosphorylation at many additional sites, probably a lot more than we have tested herein (**Figure 4C**), including the essential for toxicity Ser^{238}. To that end ongoing efforts aim at generating an anti p-Thr^{245} antibody, which along with either p$Ser^{238}$and pSer^{262} may be useful biomarkers in monitoring progression of Tauopathies.

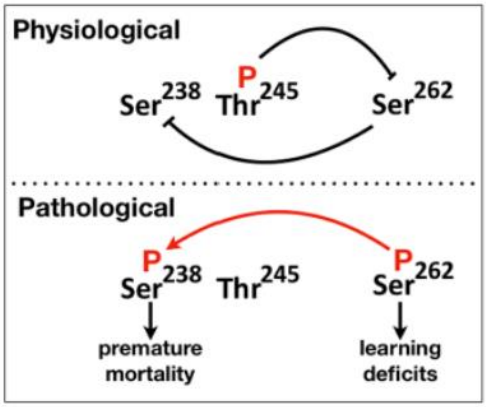


FIGURE 6 | A schematic of the proposed phosphorylation-mediated interaction between "suppressive" and "facilitatory gatekeeper" phosphosite interactions proximal to and within the first microtubule binding repeat of hTau. Blunt lines represent "suppressive" while the red arrow "facilitatory" interactions. The direction of the arrow indicates that Ser^{238} is phosphorylated after occupation of Ser^{262}.

Collectively therefore, there appear to be two types of "gatekeeper" phosphosites, those that when occupied suppress additional phosphorylations such as pThr^{245} and others like pSer^{262} that enable them. This is reflected in the schematic on **Figure 6**, where we propose that abrogation or attenuation of Thr^{245} phosphorylation removes the effect of the toxicity and dysfunction "suppressing gatekeeper," enabling occupation of the "facilitatory gatekeeper" phospho-Ser^{262} (Nishimura et al., 2004; Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). In agreement with others (Trushina et al., 2019), we posit that these changes in hTau toxicity are manifestations of the IDR-mediated structural plasticity of the protein with local or broad conformational changes favored by the presence or absence of particular phosphorylations leading to physiological or pathogenic states.

One notable result from the work herein is that the single charge contributed by Glu replacing the relevant Serines and Threonines does not mimic the double charge of the phosphate group in the case of Ser^{238} (**Figures 2B, 3, 4A, 5C**) and Ser^{262} (**Figures 4C, 5E**). This indicates that the proposed local structural plasticity is at least in part mediated and possibly stabilized by weak charge based interactions, a proposed characteristic of intrinsically disordered proteins (Trushina et al., 2019). Interestingly, our data suggests that with respect to these sites, Glu substitution may in fact mimic blocking phosphorylation at these sites (**Figures 2B, 3, 4A,C, 5C,E**), possibly by occlusion and this approach should be used with caution.

Although they are obvious pharmaceutical targets, it remains a challenge to identify and interfere with the phosphatases and kinases that target specific phosphoepitopes in part because of overlapping consensus sequences and participation in many other physiological cellular processes (Martin et al., 2013). For Thr^{245}, whose phosphorylation appears to function as "suppressive gatekeeper" to subsequent pathology-linked phosphorylations, the therapeutic challenge is to maintain its occupation. In addition, development of an anti-phospho Thr^{245} antibody for early detection of its dephosphorylated state may be a good disease prognostic biomarker.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IK and EV performed research and prepared the manuscript. EV wrote the manuscript initial draft. KP performed research and guidance. ES directed the research and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported in part by the funds from the "Strategic Development of the Biomedical Research Institute "Alexander Fleming" (MIS 5002562) implemented under the "Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sector," funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund) and Infrafrontier GR (co-funded by Greece and the European Union, ERDF and NSRF 2014-2020).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the help of Maro Loizou for expert technical support and of Best Gene (CA, United States) for generating the transgenics.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.569520/full#supplementary-material

REFERENCES

Andreadis, A., Brown, W. M., and Kosik,K. S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31,10626–10633. doi: 10.1021/bi00158a027

Arendt, T., Stieler, J. T., and Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* 126(Pt 3), 238–292. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.018

Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific φC31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3312–3317. doi: 10.1073/pnas.0611511104

Blennow, K., and Zetterberg, H. (2018). Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J. Intern. Med.* 284, 643–663. doi: doi.org/10.1111/joim.12816

Brandt, R., Gergou, A., Wacker, I., Fath, T., and Hutter, H. (2009). A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau. *Neurobiol. Aging* 30, 22–33. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.011

Brion, J. P., Smith, C., Couck, A. M., Gallo, J. M., and Anderton, B. H. (1993). Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 61, 2071–2080. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb07444.x

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95–130. doi: 10.1016/S0165-0173(00)00019-9

Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 275–302. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651

Decker, J. M., Kruger, L., Sydow, A., Zhao, S., Frotscher, M., Mandelkow, E., et al. (2015). Pro-aggregant Tau impairs mossy fiber plasticity due to structural changes and Ca(++) dysregulation. *Acta Neuropathol. Commun.* 3:23. doi: 10.1186/s40478-015-0193-3

Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Duttaroy, A., and Feany, M. B. (2007). Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *J. Clin. Invest.* 117, 236–245. doi: 10.1172/JCI28769

Fath, T., Eidenmuller, J., and Brandt, R. (2002). Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 9733–9741. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-22-09733.2002

Feuillette, S., Miguel, L., Frebourg, T., Campion, D., and Lecourtois, M. (2010). *Drosophila* models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J. Neurochem.* 113, 895–903. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06663.x

Gong, C. X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 112, 813–838. doi: 10.1007/s00702-004-0221-0

Gouzi, J. Y., Moressis, A., Walker, J. A., Apostolopoulou, A. A., Palmer, R. H., Bernards, A., et al. (2011). The receptor tyrosine kinase Alk controls neurofibromin functions in *Drosophila* growth and learning. *PLoS Genet.* 7:e1002281. doi: 10.1371/journal.pgen.1002281

Hanger, D. P., Anderton, B. H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* 15, 112–119. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.003

Hong, M., Chen, D. C., Klein, P. S., and Lee, V. M. (1997). Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* 272, 25326–25332. doi: 10.1074/jbc.272.40.25326

Hosoi, T., Uchiyama, M., Okumura, E., Saito, T., Ishiguro, K., Uchida, T., et al. (1995). Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J. Biochem.* 117, 741–749. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124771

Ittner, A., Chua, S., Bertz, J., Volkerling, A., van der Hoven, J., Gladbach, A., et al. (2016). Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-β toxicity in Alzheimer's mice. *Science* 354, 904–908. doi: 10.1126/science.aah6205

Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J. Biol. Chem.* 283, 32066–32076. doi: 10.1074/jbc.M805300200

Johnson, G. V., and Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. Cell Sci.* 117(Pt 24), 5721–5729. doi: 10.1242/jcs.01558

Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K., and Skoulakis, E. M. C. (2010). Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30, 464–477. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1490-09.2010

Martin, L., Latypova, X., and Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 58, 458–471. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.023

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C., Magnaudeix, A., Perrin, M., Yardin, C., et al. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 12, 289–309. doi: 10.1016/j.arr.2012.06.003

Morris, M., Knudsen, G. M., Maeda, S., Trinidad, J. C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A. L., et al. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 18, 1183–1189. doi: 10.1038/nn.4067

Nishimura, I., Yang, Y., and Lu, B. (2004). PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* 116, 671–682. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00170-9

Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S., and Skoulakis, E. M. (2010). Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 981–987. doi: 10.1042/BST0380981

Papanikolopoulou, K., and Skoulakis, E. M. (2015). Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2065–2077. doi: 10.1093/hmg/ddu726

Qiang, L., Sun, X., Austin, T. O., Muralidharan, H., Jean, D. C., Liu, M., et al. (2018). Tau does not stabilize axonal microtubules but rather enables them to have long labile domains. *Curr. Biol.* 28, 2181–2189.e2184. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.045

Regan, P., Whitcomb, D. J., and Cho, K. (2017). Physiological and pathophysiological implications of synaptic Tau. *Neuroscientist* 23, 137–151. doi: 10.1177/1073858416633439

Russell, C., Mitra, V., Hansson, K., Blennow, K., Gobom, J., Zetterberg, H., et al. (2017). Comprehensive quantitative profiling of tau and phosphorylated tau peptides in cerebrospinal fluid by mass spectrometry provides new biomarker candidates. *J. Alzheimers. Dis.* 55, 303–313. doi: 10.3233/JAD-160633

Rzezniczak, T., Douglas, L. A., Watterson, J. H., and Merritt, T. J. S. (2011). Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. *Anal. Biochem.* 419, 345–347. doi: 10.1016/j.ab.2011.08.023

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481. doi: 10.1126/science.1113694

Schwalbe, M., Kadavath, H., Biernat, J., Ozenne, V., Blackledge, M., Mandelkow, E., et al. (2015). Structural impact of Tau phosphorylation at threonine 231. *Structure* 23, 1448–1458. doi: 10.1016/j.str.2015.06.002

Sergeant, N., Delacourte, A., and Buee, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 179–197. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.020

Sibille, N., Huvent, I., Fauquant, C., Verdegem, D., Amniai, L., Leroy, A., et al. (2012). Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins* 80, 454–462. doi: 10.1002/prot.23210

Sotiropoulos, I., Galas, M. C., Silva, J. M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M. B., et al. (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:91. doi: 10.1186/s40478-017-0489-6

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L., and Feany, M. B. (2007a). Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol. Biol. Cell* 18, 5060–5068. doi: 10.1091/mbc.e07-04-0327

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Mulkearns, E. E., Shulman, J. M., Biernat, J., Mandelkow, E. M., et al. (2007b). S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J. Neurosci. Res.* 85, 1271–1278. doi: 10.1002/jnr.21232

Stoothoff, W. H., and Johnson, G. V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 280–297. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.017

Trushina, N., Bakota, L., Mulkidjanian, A., and Brandt, R. (2019). The evolution of Tau phosphorylation and interactions. *Front. Aging Neurosci.* 11:256. doi: 10.3389/fnagi.2015.00256

Uversky, V. N. (2015). Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Front. Aging Neurosci.* 7:18. doi: 10.3389/fnagi.2015.00018

Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., et al. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293, 711–714. doi: 10.1126/science.1062382

Xia, D., Li, C., and Gotz, J. (2015). Pseudophosphorylation of Tau at distinct epitopes or the presence of the P301L mutation targets the microtubule-associated protein Tau to dendritic spines. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 913–924. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.12.017

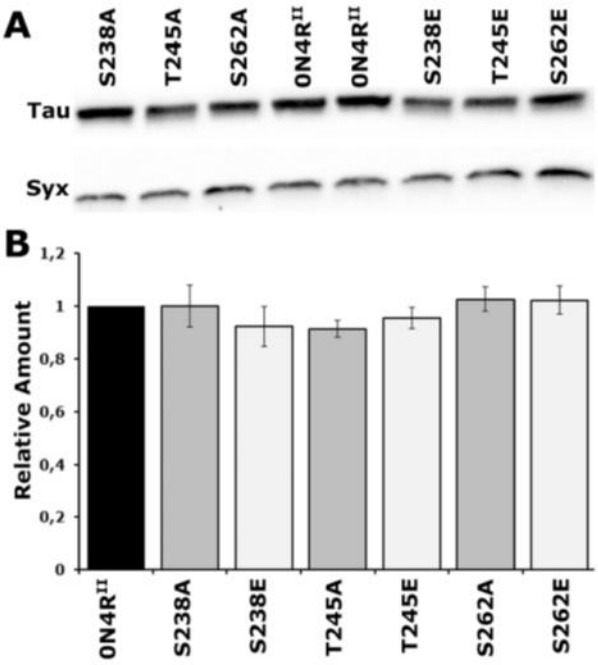
Yu, Y., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, F., Liu, Y., et al. (2009). Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J. Neurochem.* 108, 1480–1494. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05882.x

Zheng-Fischhofer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Illenberger, S., Godemann, R., and Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur. J. Biochem.* 252, 542–552. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520542.x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Keramidis, Vourkou, Papanikolopoulou and Skoulakis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

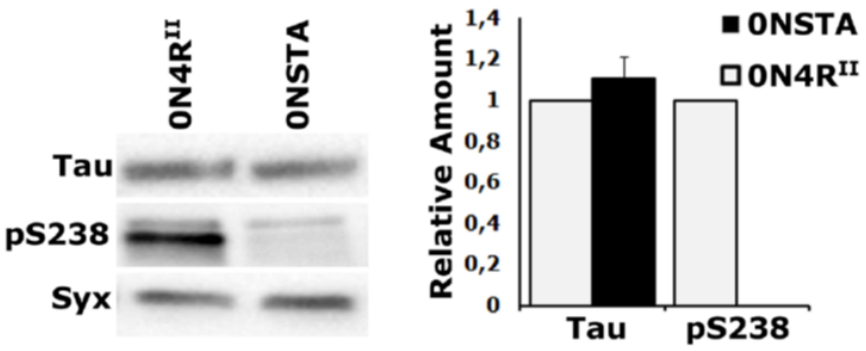
Supplementary Material



C

Genotype	Mean ± SEM	p
ANOVA $F_{(6,139)}$ = 0.7679, p=0.5969		
Elav;Ras2>0N4R^{II}	1	
Elav;Ras2>S238A	0.999 ± 0.078	1
Elav;Ras2>S238E	0.922 ± 0.075	0.925
Elav;Ras2>T245A	0.914 ± 0.032	0.807
Elav;Ras2>T245E	0.956 ± 0.040	0.993
Elav;Ras2>S262A	1.026 ± 0.046	0.999
Elav;Ras2>S262E	1.023 ± 0.052	0.999

Supplemental Figure 1. Mutant and control transgenes inserted at 55B2 are expressed equivalently.
A) Representative Western blot demonstrating the levels of 0N4R^{II} and single Tau mutant accumulation under Elav;Ras probed with the T46 anti-Tau antibody.
B) For the quantifications below, levels of the protein were normalized using the Syntaxin (Syx) loading control and shown as a ratio of their means ±S.E.M. relative to their respective levels in fly heads expressing 0N4R^{II}, which is set to 1. Statistical details presented in C.



Supplemental Figure 2. 0N4R^{STA} is expressed at the same level as 0N4R^{II} and lacks the pSer^{238} epitope.

Representative Western blots from head lysates of flies accumulating 0N4R^{II} and 0NSTA probed with the antibodies indicated on the left. The level of syntaxin (Syx) in the lysates was used as control for quantifications. Quantification of at least three independent blots and extracts are shown on the right. The syntaxin-normalized level of 0N4R^{II} for each quantification was fixed to 1. The bars represent the mean ± SEM relative levels of 0NSTA over that of the 0N4R^{II} control. Dunnett's tests indicated significant difference from control for the phosphosite S238 ($p<0.0001$) and no difference in accumulation of Tau ($p=0.4945$).

Supplemental Table 1.

	Genotype	Mean ± SEM	
Fig 1B	Elav>0N4R^{II}	0,396 ± 0,073	
	Ras2>0N4R^{II}	0,264 ± 0,091	
	Elav;Elav>0N4R^{II}	0,656 ± 0,100	
	Elav;Ras2>0N4R^{II}	1,108 ± 0,039	
	ANOVA: $F_{(4,15)}$= 15.331, p= 2.8703 x 10^{-4}		
		Dunnetts' p	
	Elav>0N4R		
	Elav>0N4R^{II}	**3.5 x 10^{-3}**	
	Ras2>0N4R^{II}	**8.4 x 10^{-4}**	
	Elav;Elav>0N4R^{II}	**0,081**	
	Elav;Ras2>0N4R^{II}	**0,826**	

	Genotype	Mean ± SEM
Fig 1C	w^{1118}>0N4R^{II}	73.745 ± 0.954
	Elav>0N4R^{II}	62.497 ± 1.349
	Elav;Elav>0N4R^{II}	58.454 ± 1.511
	Elav;Ras2>0N4R^{II}	56.301 ± 1.643
	ANOVA: $F_{(3,47)}$= 31.273, p= 5.530 x 10^{-11}	

0N4R^{II} >	**w^{1118}**		**Elav**		**Elav;Elav**		**Elav;Ras2**	
	t-Ratio	p	t-Ratio	p	t-Ratio	p	t-Ratio	p
w^{1118}			32.78	**8.5x10^{-7}**	60.60	**8.2x10^{-10}**	78.86	**2.2x10^{-11}**
Elav	32.78	**8.5x10^{-7}**			4.23	**0.045**	9.95	**0.002**
Elav;Elav	60.60	**8.2x10^{-10}**	4.23	**0.045**			1.20	**0.279**
Elav;Ras2	78.86	**2.2x10^{-11}**	9.95	**0.002**	1.20	**0.279**		

Supplemental Table 1. Statistical details from Fig 1B and C.

Fig 1B. The means and SEMs are shown of the densitometrically determined ratio of hTau normalized for loading by Syntaxin for the indicated genotypes from 5 independent experiments. Following the indicated significant ANOVA the means we compared using Dunnett's tests with the means of the accumulation of the randomly inserted 0N4R encoding transgene.

Fig 1C. The means and SEMs for learning performance of the indicated genotypes are shown ($n \geq 9$). Following the indicated significant ANOVA the means we compared using the indicated planned multiple comparisons.

Supplemental Table 2

FIGURE 2A					
Wilcoxon/Kruskal-Wallis			**Means comparison (Steel with control)**		
DAY	**χ^2, (DF,count)**	**p > χ^2**	**Genotype**	**z**	**p**
1	0.000 (2,17)	1.000	Elav;Ras2>0NSTA		
			Elav;Ras2>0N4R^{II}		
9	4.851 (2,17)	0.0884	Elav;Ras2>0NSTA		
			Elav;Ras2>0N4R^{II}		
13	6.736 (2,17)	0.0344	Elav;Ras2>0NSTA	0.2991	0.9368
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-2.4960	0.0237
17	12.029 (2,17)	0.0024	Elav;Ras2>0NSTA	-0.4854	0.8434
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.5005	0.0009*
21	18.748 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-0.1071	0.9916
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.0369	0.0001*
23	23.222 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-0.4987	0.8357
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.5185	<0.0001*
25	23.710 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-1.1512	0.4072
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.5403	<0.0001*
27	26.808 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-1.3162	0.3156
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.6813	<0.0001*
29	21.792 (2,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0NSTA	-0.9507	0.5346
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-4.6309	<0.0001*
31	8.003 (2,17)	0.0183	Elav;Ras2>0NSTA	1.7182	0.1518
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-1.2432	0.3545
33	9.000 (2,17)	0.0111	Elav;Ras2>0NSTA	1.4759	0.2404
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	-1.7498	0.1424
35	15.806 (2,17)	0.0004	Elav;Ras2>0NSTA	2.8776	0.0077
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	0.0000	<0.0001*
37	10.836 (2,17)	0.0044	Elav;Ras2>0NSTA	2.3487	0.0353
			Elav;Ras2>0N4R^{II}	0.0000	<0.0001*

FIGURE 2B					
Wilcoxon/Kruskal-Wallis			Means comparison (Steel with control)		
DAY	χ^2, (DF,count)	$p > \chi^2$	Genotype	z	p
1	0.000 (3,17)	1.000	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
9	0.803 (3,17)	0.8474	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
13	4.485 (3,17)	0.2136	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
17	0.735 (3,17)	0.8649	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
21	2.184 (3,17)	0.5351	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
23	12.612 (3,17)	0.0056	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-2.5828	0.0269
			Elav;Ras2>S238A	-3.3387	0.0024*
			Elav;Ras2>S238E	-2.2527	0.0643
25	17.394 (3,17)	0.0006	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3442	0.0024*
			Elav;Ras2>S238A	-3.5856	0.0010*
			Elav;Ras2>S238E	-3.0621	0.0063
27	13.619 (3,17)	0.0035	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.1389	0.0049*
			Elav;Ras2>S238A	-2.5576	0.0289
			Elav;Ras2>S238E	-2.9983	0.0053*
29	19.763 (3,17)	0.0002	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3843	0.0021*
			Elav;Ras2>S238A	-3.2606	0.0032*
			Elav;Ras2>S238E	-3.9454	0.0002*
30	19.554 (3,17)	0.0002	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.4931	0.0014*
			Elav;Ras2>S238A	-3.2680	0.0031*
			Elav;Ras2>S238E	-3.7314	0.0006*
31	6.010 (3,17)	0.0111	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
33	1.526 (3,17)	0.6763	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		
35	2.778 (3,17)	0.4272	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>S238A		
			Elav;Ras2>S238E		

FIGURE 2C					
Wilcoxon/Kruskal-Wallis			**Means comparison (Steel with control)**		
DAY	**χ^2, (DF,count)**	**p > χ^2**	**Genotype**	**z**	**p**
1	0.000 (3,17)	1.000	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
9	1.975 (3,17)	0.5777	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
13	5.537 (3,17)	0.1364	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
17	4.936 (3,17)	0.1766	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
21	13.256 (3,17)	0.0041	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-0.8529	0.7300
			Elav;Ras2>T245A	-2.2792	0.0600
			Elav;Ras2>T245E	1.6196	0.2496
23	26.712 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-2.5828	0.0269
			Elav;Ras2>T245A	-4.2948	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-0.3894	0.9628
25	32.021 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3443	0.0024*
			Elav;Ras2>T245A	-4.6484	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.6225	0.2483
27	26.331 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.1388	0.0049*
			Elav;Ras2>T245A	-4.0639	0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.5834	0.2665
29	31.289 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.3841	0.0021*
			Elav;Ras2>T245A	-4.7469	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.2106	0.4820
30	31.637 (3,17)	<0.0001	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-3.4931	0.0014*
			Elav;Ras2>T245A	-4.7034	<0.0001*
			Elav;Ras2>T245E	-1.9241	0.1365
31	16.445 (3,17)	0.0009	Elav;Ras2>0N4R^{II}	-1.4835	0.3170
			Elav;Ras2>T245A	-2.8833	0.0111
			Elav;Ras2>T245E	1.0863	0.5671
33	6.322 (3,17)	0.0970	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		
35	1.975 (3,17)	0.5776	Elav;Ras2>0N4R^{II}		
			Elav;Ras2>T245A		
			Elav;Ras2>T245E		

Supplemental Table 2. Statistical details from Fig 2.

Survival results from 17 independent determinations were compared with Wilcoxon/Kruskal-Wallis tests for the indicated days. When the χ^2 was significant, significant differences from the survival of Elav;Ras2>w^{1118} controls were investigated using Steel with control tests whose z ratio and p values are shown. Significant differences from controls are highlighter in light gray and emphasized by asterisks.

Supplemental Table 3.

ANOVA: $F_{(6,104)}=19.7546$, $p=5.3261 \times 10^{-15}$		
Tau variants vs w^{1118}		
Genotype	**t-Ratio**	**p**
0N4R^{II}	33.6099	8.2167×10^{-8}
0NSTA	0.1562	0.6934
S238A	67.8144	7.9778×10^{-13}
S238E	23.1285	5.4824×10^{-6}
T245A	49.6900	2.5435×10^{-10}
T245E	17.7771	5.5375×10^{-5}
Glu vs Ala mutants		
Genotype	**t-Ratio**	**p**
S238A vs S238E	11.7356	8.9715×10^{-4}
T245A vs T245E	8.0248	5.60149×10^{-3}
Tau variants vs 0N4R^{II}		
Genotype	**t-Ratio**	**p**
0NSTA	29.1829	4.6172×10^{-7}
S238A	5.9416	0.0165
S238E	0.9765	0.3254
T245A	1.5667	0.2136
T245E	2.4999	0.1170
Tau variants vs 0NSTA		
Genotype	**t-Ratio**	**p**
S238A	61.4604	5.5674×10^{-12}
S238E	19.4828	2.6125×10^{-5}
T245A	44.2736	1.6464×10^{-9}
T245E	14.6001	2.3336×10^{-4}

Supplemental Table 3. Statistical details from Fig 3

Mean mortalities after 24 hrs of exposure to 30mM methyl viologen of the indicated genotypes were compared with that of Elav;Ras2>w^{1118} control animals (n=15) following the indicated highly significant ANOVA with planned multiple comparisons as indicated.

SUPPLEMENTAL TABLE 4

	Antibody	ANOVA	Dunnett's p	
Fig 4A	AT8	$F_{(2,77)}$=0.4568, p=0.6350	S238A	S238E
	AT100	$F_{(2,57)}$=58.0959, p=2.7491 x 10^{-14}	S238A	S238E
			2.3578 x 10^{-4}	1.4981 x10^{-8}
	pS262	$F_{(2,39)}$=10.8692, p=1.9349 x 10^{-4}	S238A	S238E
			4.9992 x10^{-4}	4.8214 x10^{-4}
	pS396	$F_{(2,85)}$= 9.0999, p=2.6715 x 10^{-4}	S238A	S238E
			1.6780 x 10^{-3}	0.7914
	pS238		S238A	S238E
Fig 4B	AT8	$F_{(2,62)}$=128.1423, p=2.1988 x10^{-22}	T245A	T245E
			1.7794 x 10^{-6}	1.7794 x 10^{-6}
	AT100	$F_{(2,76)}$=51.8107, p=8.5164 x10^{-15}	T245A	T245E
			5.3832 x 10^{-5}	1.3669 x10^{-8}
	pS262	$F_{(2,54)}$=15.4009, p=5.5852 x 10^{-6}	T245A	T245E
			2.6969 x 10^{-3}	0.3519
	pS396	$F_{(2,62)}$=0.6312, p=0.5354	T245A	T245E
	pS238	$F_{(2,25)}$=6.0830, p=7.2933 x10^{-3}	T245A	T245E
			0.9999	0.0138
Fig 4C	AT8	$F_{(2,68)}$=8.9678, p=3.587 x10^{-4}	S262A	S262E
			2.0874 x 10^{-4}	1.3759 x 10^{-3}
	AT100	$F_{(2,57)}$=282.5058, p=1.1721 x10^{-29}	S262A	S262E
			1.4967 x10^{-8}	1.4967 x10^{-8}
	pS262		S262A	S262E
	pS396	$F_{(2,64)}$=280.1379, p= 8.9264 x 10^{-32}	S262A	S262E
			1.8071 x10^{-8}	1.8071 x 10^{-8}
	pS238	$F_{(2,20)}$=68.8786, p= 1.96561 x10^{-9}	S262A	S262E
			4.8748 x 10^{-9}	4.8230 x 10^{-9}

Supplemental Table 4. Statistical details from Fig 4

ANOVAs and Dunnett's tests p's for the ratios of densitometrically determined level of each of the designated phosphoepitopes and total hTau normalized for loading with Syntaxin for the indicated Ser^{238} and Thr^{245} mutants relative to the ratio in $0N4R^{II}$. When experimental bands were zero or near zero ANOVA was not performed. When ANOVA was not significant further comparisons were not performed.

Supplemental Table 5.

Genotype	Mean ± SEM	t-Ratio	p
Figure 5B.	**ANOVA $F_{(4,52)}$ = 7.3803, p<0.0001**		
w^{1118}>0NSTA	78.322 ±1.593		
Elav;Ras2>0N4R^{II}	58.149 ± 3.314	24.81	$8.5x10^{-6}$
Elav;Ras2>S238A	61.783 ± 2.509	15.92	$2.2x10^{-4}$
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076	14.58	$3.8x10^{-4}$
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	16.60	$1.7x10^{-4}$
Elav;Ras2>0N4R^{II}	58.149 ± 3.314		
Elav;Ras2>S238A	61.783 ± 2.509	0.80	0.373
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076	1.41	0.239
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	0.86	0.357
Elav;Ras2>S238A	61.783 ± 2.509		
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076	0.07	0.792
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	0.00	0.992
Elav;Ras2>T245A	62.857 ± 3.076		
Elav;Ras2>0NSTA	61.820 ± 3.130	0.06	0.794
Figure 5C.	**ANOVA $F_{(3,39)}$ = 38.5284, p<0.0001**		
w^{1118}>S238A	77.327 ± 1.141		
Elav;Ras2>w^{1118}	75.407 ± 1.949	0.56	0.456
Elav;Ras2>S238A	55.275 ± 2.028	65.63	$1.2x10^{-9}$
Elav;Ras2>S238E	60.028 ± 1.665	40.13	$2.5x10^{-7}$
Elav;Ras2>w^{1118}	75.407 ± 1.949		
Elav;Ras2>S238A	55.275 ± 2.028	74.6	$2.7x10^{-10}$
Elav;Ras2>S238E	60.028 ± 1.665	48.0	$4.1x10^{-8}$
Elav;Ras2>S238A	55.275 ± 2.028		
Elav;Ras2>S238E	60.028 ± 1.665	3.83	0.058
Figure 5D.	**ANOVA $F_{(3,43)}$ = 15.3415, p<0.0001**		
w^{1118}>T245A	78.126 ± 1.762		
Elav;Ras2>w^{1118}	78.049 ± 1.564	0.00	0.978
Elav;Ras2>T245A	62.098 ± 2.545	31.74	$1.5x10^{-6}$
Elav;Ras2>T245E	74.956 ± 1.734	1.14	0.29
Elav;Ras2>w^{1118}	78.049 ± 1.564		
Elav;Ras2>T245A	62.098 ± 2.545	33.72	$8.8x10^{-7}$
Elav;Ras2>T245E	74.956 ± 1.734	1.26	0.267
Elav;Ras2>T245A	62.098 ± 2.545		
Elav;Ras2>T245E	74.956 ± 1.734	21.7	$3.5x10^{-5}$

Supplemental Table 5.

Figure 5E.	ANOVA $F_{(3,33)} = 2.7719$, $p=0.0586$		
w^{1118}>S262A	74.279 ± 2.556		
Elav;Ras2>w^{1118}	78.280 ± 2.655	0.99	0.326
Elav;Ras2>S262A	69.640 ± 2.863	4.63	0.039
Elav;Ras2>S262E	68.073 ± 3.149	6.87	0.013
Elav;Ras2>w^{1118}	78.280 ± 2.655		
Elav;Ras2>S262A	69.640 ± 2.863	1.26	0.270
Elav;Ras2>S262E	68.073 ± 3.149	2.39	0.132
Elav;Ras2>S262A	69.640 ± 2.863		
Elav;Ras2>S262E	68.073 ± 3.149	0.15	0.698

Supplemental Table5. Statistical details from Fig 5

The means and SEMs for learning performance of the indicated genotypes are shown for $n \geq 9$. Following the indicated significant ANOVA the means we compared using the indicated planned multiple comparisons.

2. Διαφορικοί μηχανισμοί τοξικότητας των ανθρωπίνων ισομορφών της πρωτεΐνης Τ με τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις στο μοντέλο Τ-πρωτεϊνοπαθειών *Drosophila melanogaster*

2.1. Περίληψη

Η πρωτεΐνη Τ υπάρχει σε 6 ισομορφές στον ενήλικο ανθρώπινο εγκέφαλο, οι οποίες προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα ενός μεταγράφου mRNA και διαφέρουν ως προς την απουσία ή την παρουσία μιας ή δύο αμινο-τελικών επαναλήψεων και τριών ή τεσσάρων περιοχών πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους. Τυπικά και οι έξι ισομορφές έχουν θεωρηθεί ως λειτουργικά παρόμοιες. Ωστόσο, η διαφορική εμπλοκή τους σε συγκεκριμένες Τ πρωτεϊνοπάθειες εγείρει την πιθανότητα να υπάρχουν διαφορές στη φυσιολογική λειτουργία και στην παθογένεση, οι οποίες είναι ειδικές για ορισμένες ισομορφές. Για να το διερευνήσουμε αυτό, συγκρίναμε τους φαινοτύπους που προκύπτουν από την έκφραση των ισομορφών 0N3R και 0N4R στη Drosophila. Η έκφραση της ισομορφής 3R προκαλεί πιο ισχυρά ελαττώματα στην αξονική μεταφορά και στη κινητικότητα και καταλήγουν να έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τα ζώα που εκφράζουν την ισομορφή 4R. Αντίθετα, η έκφραση της ισομορφής 4R οδηγεί σε μεγαλύτερο νευροεκφυλισμό καθώς και σε ελλιπή μάθηση και μνήμη. Επιπλέον, υπάρχουν διακριτές διαφορές στο μοτίβο φωσφορυλίωσης των δύο ισομορφών καθώς και στην ικανότητά τους να προκαλούν οξειδωτικό στρες. Αυτές οι διαφορές δεν οφείλονται σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δύο ισομορφών και υποδηλώνουν φυσιολογικές διαφορές στη βιολογία των ισομορφών και στο παθολογικό δυναμικό τους. Συνεπώς, μπορεί να εξηγηθούν οι διαφορετικού μηχανισμοί τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ, ανάλογα με την ισομορφή, και η διαφορική ευαισθησία συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου σε διαφορετικές Τ- πρωτεϊνοπάθειες.

2.2. Εισαγωγή

Το ανθρώπινο γονίδιο τ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στη γενετική θέση q21.1. Από το εναλλακτικό μάτισμα ενός μεταγράφου mRNA προκύπτουν έξι ισομορφές της πρωτεΐνης Τ στον ενήλικο ανθρώπινο εγκέφαλο (Andreadis, 2005), που κυμαίνονται σε μέγεθος από 352 έως 441 αμινοξέα. Το εναλλακτικό μάτισμα των εξωνίων 2, 3 και 10 οδηγεί στην απουσία ή παρουσία 1 ή 2 αμινο-τελικών επαναλήψεων και 3 ή 4 περιοχών πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους στη καρβοξυ-τελική περιοχή (Goedert et al., 1989). Συνήθως αναφέρονται ως ισομορφές 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R και 2N4R. Επιπλέον, οι ισομορφές της πρωτεΐνης Τ υφίστανται μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένων των

φωσφορυλιώσεων Ser/Thr και Tyr, της ακετυλίωσης και της σουμουλίωσης. Μερικές από αυτές τις τροποποιήσεις συμβαίνουν φυσιολογικά και ρυθμίζονται κατά την ανάπτυξη και τη γήρανση, ενώ άλλες σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις και εμπλέκονται στη τοξικότητα που επάγεται από την πρωτεΐνη Τ (Medina et al., 2016); (Huefner et al., 2013).

Γενικότερη αντίληψη αποτελεί ότι η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος κατά την ανάπτυξη, είναι ένας μηχανισμός για τη ριζική μεταβολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης Τ. Αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζεται και με την έκφραση των ισομορφών 3R νωρίς στην ανάπτυξη του ανθρώπινου εγκεφάλου, όπου απαιτείται πιο πλαστικός κυτταροσκελετός και στη συνέχεια στην έκφραση των ισομορφών 4R μετά την ανάπτυξη του νευρίτη, όταν έχει ήδη δηλαδή δημιουργηθεί ένα πιο σταθερό δίκτυο (Andreadis, 2005). Μια κύρια διάκριση των ισομορφών της πρωτεΐνης Τ περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση τους σε λειτουργικές περιοχές, όπως οι περιοχές των επαναλήψεων πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους. Αυτό πιθανότατα υποδεικνύει και τις διαφορές στη φυσιολογία των ισομορφών και στο παθολογικό δυναμικό τους, καθώς φαινομενικά αλληλεπιδρούν με διαφορετικές ή μερικώς ίδιες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη, με κυτταροπλασματικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Στην πραγματικότητα, οι διαφορές στις ιδιότητες δέσμευσης των μικροσωληνίσκων για κάθε ισομορφή είναι γνωστές (Goode et al., 2000). Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν πλέον δείξει επιπρόσθετες διαφορές μεταξύ των ισομορφών της πρωτεΐνης Τ, όπως η τάση τους να συσσωματώνονται (Adams et al., 2010), η ικανότητα συσσωμάτωσης σε διαφορετικές μορφές ανάλογα με την ισομορφή της πρωτεΐνης Τ (Dinkel et al., 2011), την ενδο-νευρωνική ανακατανομή τους κατά τον σχηματισμό των νευροϊνιδικών πλεγμάτων (Hara et al., 2013); (Liu and Gotz, 2013), τις αλληλεπιδράσεις με διαφορετικούς πρωτεΐνες-συνοδούς (Bhaskar et al., 2005); (Liu et al., 2016), το δυναμικό φωσφορυλίωσης και η επίδραση όλων των παραπάνω διαφορών στις βιοχημικές τους ιδιότητες (Combs et al., 2011).

Η αναλογία των ισομορφών 3R προς 4R στον ενήλικο ανθρώπινο εγκέφαλο είναι περίπου 1. Η αναλογία αυτή διαταράσσεται σε ορισμένες οικογενείς Τ-πρωτεϊνοπάθειες λόγω μεταλλάξεων κατά το μάτισμα, οι οποίες οδηγούν σε αύξηση των ισομορφών 4R της πρωτεΐνης Τ (Andreadis, 2005). Ακόμη και στη νόσο του Alzheimer (AD) υπάρχουν ενδείξεις μειωμένης αναλογίας 3R/4R στους νευρώνες που φέρουν νευροϊνιδικά πλέγματα (Niblock and Gallo, 2012); (Park et al., 2016). Το γεγονός ότι η διατάραξη της αναλογίας των ισομορφών σχετίζεται με τις ασθένειες, υποδεικνύει τη σημασία διατήρησης μιας ισορροπίας των ισομορφών 3R:4R στους υγιείς νευρώνες. Επιπλέον, ένα χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί τις Τ-πρωτεϊνοπάθειες, είναι ότι δεν απαντάται σε αυτές ο σχηματισμός των συσσωματωμάτων από τις ίδιες ισομορφές της πρωτεΐνης Τ. Για παράδειγμα, στη νόσο του Alzheimer (AD), όλες οι ισομορφές της πρωτεΐνης Τ σχηματίζουν ινίδια,

ενώ σε άλλες αποτελούνται κυρίως από είτε 3R, π.χ. νόσος του Pick, είτε από 4R ισομορφές, π.χ. στην προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση, στον φλοιοβασικό εκφυλισμό, και στην άνοια αργυλοφιλικών κόκκων (Rabano et al., 2013); (Spillantini and Goedert, 2013).

Στη συγκεκριμένη έρευνα γίνεται χρήση του καλά μελετημένου μοντέλου Τ-πρωτεϊνοπαθειών της *D. melanogaster* και γίνεται αξιολόγηση των φαινοτύπων που προκύπτουν για την κάθε ισομορφή της πρωτεΐνης Τ (0N3R και 0N4R). Με την έρευνα αυτή, δίνονται σαφείς αποδείξεις ότι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ μπορεί να έχουν και σημαντικά διαφορετικές επιδράσεις σε πανομοιότυπες αναλύσεις. Αυτό μπορεί να ρίξει φως στον διαφορετικό ρόλο της κάθε ισομορφής στη παθολογία των Τ- πρωτεϊνοπαθειών, ιδιαίτερα στις ασθένειες στις οποίες μόνο μια από αυτές τις ισομορφές κυριαρχεί.

2.3. Υλικά και μέθοδοι

2.3.1. Καλλιέργεια και στελέχη Drosophila

Οι διασταυρώσεις της Drosophila πραγματοποιήθηκαν μαζικά σε συνήθη τροφή που περιέχει αλεύρι σίτου, ζάχαρη, αλεύρι σόγιας και $CaCl_2$. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 18^{o}C ή στους 25^{o}C, ανάλογα με την περίπτωση, και όπως υποδεικνύεται στο κείμενο, σε υγρασία 50-70% και σε 12 ώρες κύκλο φωτός/σκοταδιού. Οι επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο D42-GAL4 (επαγωγέας ειδικός για τους νευρώνες κίνησης), οι Elav^{C155}-GAL4 και Elav^{C155}-GAL4/TubGAL80^{ts} (επαγωγείς έκφρασης σε όλο το νευρωνικό σύστημα), ο panR7-GAL4 (επαγωγέας ειδικός για τους αισθητήριους νευρώνες) και ο GMR-GAL4 (ειδικός επαγωγέας για τους φωτοϋποδοχείς). Για την 0N4R ισομορφή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαγονίδια, τα hTau^{0N4R} και hTau^{0N4R*}, προερχόμενα από την M. Feany (Ιατρική Σχολή του Χάρβαρντ, Βοστώνη, Ηνωμένες Πολιτείες). Και τα δύο αυτά διαγονίδια παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης **(Εικόνα 2-** 2**)**. Όλες οι άλλες διαγονιδιακές μύγες και οι επαγωγείς προέρχονται από το Bloomington Stock Centre.

2.3.2. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Για την αξιολόγηση των ολικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Τ και των επιπέδων φωσφορυλίωσης και διαλυτότητας της πρωτεΐνης Τ, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western. Για την ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 10 προνύμφες 3^{ου} σταδίου ή κεφάλια από ενήλικες μύγες ηλικίας 1-3 ημερών και ομογενοποιήθηκαν σε 20μl ρυθμιστικού διαλύματος

1X Laemmli (50 mM Tris pH 6.8, 5% 2- μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS, 10% γλυκερόλη, και 0.01% μπλε της βρωμοφαινόλης). Αφέθηκαν να βράσουν στους 95^{o}C για 5 λεπτά και εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 14000 RPM σε θερμοκρασία δωματίου. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και την εξάλειψη σφαλμάτων κατά τη φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές αντίσωμα συνταξίνη (mAb 8C3, Developmental Hybridoma Bank) σε συγκέντρωση 1: 3.000. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: έναντι της ολικής πρωτεΐνης T (Dako, σε συγκέντρωση 1:15.000 ή T46 σε συγκέντρωση 1:3000), έναντι ειδικών θέσεων φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης T, Ser^{396}/Ser^{404} (PHF-1) (δώρο από τον Peter Davies, USA, σε συγκέντρωση 1:500), Ser^{396} (pS396, Source Biosciences, σε συγκέντρωση 1:2000), Ser^{202}/Thr^{205} (AT8) (Thermo Scientific, σε συγκέντρωση 1:1000), Thr^{212}/Ser^{214} (AT100) (Pierce Endogen, σε συγκέντρωση 1:1000), Ser^{262} (pS262, Invitrogen, σε συγκέντρωση 1:1000), έναντι της από-φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης στις θέσεις Ser^{199}/Ser^{202}/Thr^{205} (Tau-1) (Millipore, 1:2000), και τέλος το αντίσωμα MC1 (ευγενική χορηγεία από τον Peter Davies, USA), σε συγκέντρωση 1:200). Τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1:5000 και το σήμα ανιχνεύθηκε με χημειοφωταύγεια (ECL plus).

2.3.3. Δοκιμασία συνειρμικής μάθησης και μνήμης σε ενήλικες μύγες

Για να πραγματοποιηθούν τα πειράματα μάθησης και μνήμης, αρσενικές μύγες UAS-hTau^{0N3R} ή UAS-hTau^{0N4R} διασταυρώθηκαν με θηλυκά Elav^{c155}GAL4;TubGAL80^{ts} ή με w^{1118} (μύγες πειραματικού ελέγχου). Ταυτόχρονα μια τρίτη διασταύρωση πραγματοποιήθηκε με θηλυκά από τον επαγωγέα Elav^{c155}GAL4;TubGAL80^{ts} και αρσενικά από τις w^{1118} μύγες (μύγες πειραματικού ελέγχου). Όλες οι διασταυρώσεις τοποθετήθηκαν στους 18^{o}C. Οι ενήλικοι απόγονοι συλλέχθησαν σε νέα μπουκάλια και διατηρήθηκαν στους 30^{o}C για 12 ημέρες, ώστε να επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης T. Κάθε 3 ημέρες, οι μύγες μεταφέρονται σε νέα μπουκάλια με καινούργια τροφή. Την 11^{η} ημέρα, οι μύγες χωρίζονται σε ομάδες των 50-70 ζώων σε φιαλίδια με τροφή και επανατοποθετούνται στους 30^{o}C για όλη τη νύχτα. Μία ώρα περίπου πριν τη πειραματική διαδικασία, οι μύγες μεταφέρονται σε νέα φιαλίδια με καινούργια τροφή.

Όλα τα συμπεριφορικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό χαμηλό ερυθρό φωτισμό, στους 24-25° C και σε υγρασία 65-75%. Όλοι οι γενότυποι που εμπλέκονται σε ένα πείραμα ελέγχονται ταυτόχρονα την ίδια ημέρα. Για την μέτρηση της ικανότητας μάθησης χρησιμοποιήθηκε το παράδειγμα της παβλοβιανής αρνητικής οσφρητικής μάθησης συνδυάζοντας τις απωθητικές οσμές βενζαλδεΰδη (BNZ) και 3-οκτανόλη (OCT) αραιωμένες σε λάδι (6% v/v για BNZ και 50% v/v για OCT) ως εξαρτημένα ερεθίσματα (CS+ και CS-), με το ηλεκτρικό σοκ ως μη εξαρτημένο ερέθισμα (US). Για την εκπαίδευση, μια ομάδα 50-70 μυγών

εκτίθεται αρχικώς στη πρώτη οσμή για 40 δευτερόλεπτα σε συνδυασμό με επαναλαμβανόμενα σοκ των 90 V (συνολικά 8 ηλεκτρικά σοκ των 1,25 δευτερολέπτων με διάστημα παύσης 4,5 δευτερολέπτων). Ακολούθως οι μύγες εκτίθενται για 30 δευτερόλεπτα σε αέρα και στη συνέχεια στη δεύτερη οσμή για 40 δευτερόλεπτα χωρίς όμως τα ηλεκτρικά σοκ και τέλος σε αέρα για άλλα 30 δευτερόλεπτα. Κάθε πειραματική δοκιμή περιλαμβάνει δύο ομάδες μυγών του ιδίου γενοτύπου οι οποίες εκπαιδεύονται ταυτόχρονα με τρόπο που η μια ομάδα να αποφεύγει τη βενζαλδεΰδη και η άλλη ομάδα να αποφεύγει την οκτανόλη, ενώ η αντίθετη οσμή χρησιμοποιείται κάθε φορά ως οσμή ελέγχου. Τέλος μετά την εκπαίδευση, και οι δύο ομάδες μυγών αφήνονται να επιλέξουν μεταξύ των δύο οσμών (χωρίς ηλεκτρικό σοκ) για 90 δευτερόλεπτα.

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων ελέγχου της εξαρτώμενης από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμης, οι μύγες υποβάλλονται σε 12 ηλεκτρικά σοκ US/CS ανά κύκλο και σε συνολικά πέντε τέτοιους επαναλαμβανόμενους κύκλους εκπαίδευσης με διάστημα παύσης 15 λεπτών μεταξύ τους. Στη συνέχεια, οι μύγες μεταφέρονται σε φιαλίδια με τροφή και αφήνονται στους 18^{o}C για 24 ώρες. Τέλος, οι μύγες μεταφέρονται σε μια συσκευή Τ-λαβυρίνθου και αφήνονται να επιλέξουν μεταξύ των δύο οσμών (χωρίς ηλεκτρικό σοκ) για 90 δευτερόλεπτα.

Ο δείκτης απόδοσης (Performance Index, PI) υπολογίστηκε ως το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν τη συνδεδεμένη με το ηλεκτρικό σοκ οσμή, CS+, μείον το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν την οσμή ελέγχου, CS-, διαιρούμενο προς το συνολικό αριθμό των μυγών. Ο τελικός δείκτης απόδοσης (PI) υπολογίζεται ως το μέσο όρο των δυο ήμισυ λόγων για κάθε μια από τις ομάδες των ζώων που εκπαιδεύονται στα συμπληρωματικά ερεθίσματα (είτε με βενζαλδεΰδη είτε με 3-οκτανόλη) και κυμαίνεται από 0 έως 100.

2.4. Αποτελέσματα

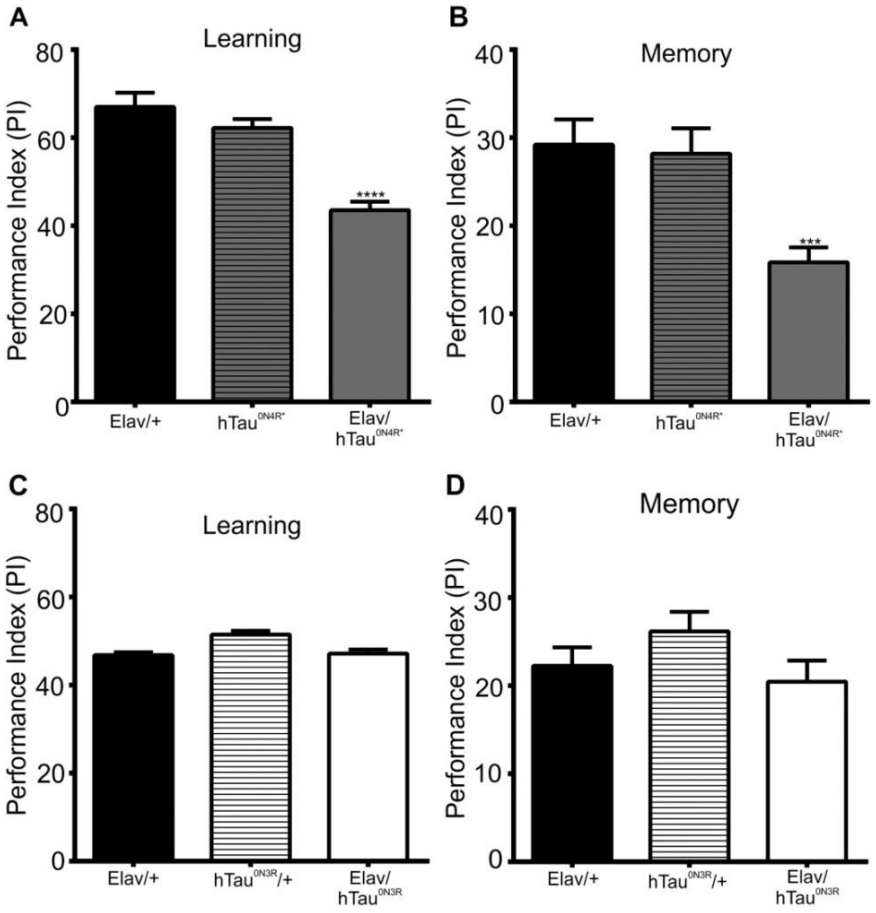
2.4.1. Οι ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ προκαλούν διαφορετικούς φαινοτύπους

Για τη διερεύνηση του ρόλου των 0N3R και 0N4R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ ελέχθησαν οι φαινότυποι για την κινητικότητα των προνυμφών και την ικανότητα αναρρίχησης ενήλικων μυγών με τη δοκιμασία του αρνητικού γεωτροπισμού, αξιολογήθηκε το προσδόκιμο ζωής και ο βαθμός νευροεκφυλισμού των αισθητήριων νευρώνων και η επίδραση στη συμπεριφορική ικανότητα της κάθε ισομορφής.

Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η έκφραση της ισομορφής 0N3R στους κινητικούς νευρώνες προκαλεί κινητικές ανωμαλίες **(Παράρτημα Α-Εικόνα 1Α-C)**, οι οποίες

προκύπτουν από τη μειωμένη αξονική μεταφορά **(Παράρτημα Α-Εικόνα 1D)**, ενώ σε αντίθεση, η έκφραση της ισομορφής 0N4R δεν προκαλεί σημαντικές κινητικές αλλοιώσεις ή βλάβες στην αξονική μεταφορά **(Παράρτημα Α-Εικόνα 1A-D)**. Όσο αφορά το προσδόκιμο ζωής των ενήλικων μυγών βρέθηκε ότι η έκφραση της 0N3R ισομορφής προκαλεί πρόωρη θνησιμότητα στις ενήλικες μύγες σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου και νωρίτερα από τις μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή **(Παράρτημα Α-Εικόνα 2Α)**. Επιπροσθέτως, στη δοκιμασία αρνητικού γεωτροπισμού (Mudher et al., 2004) βρέθηκε ότι οι ενήλικες μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή αρχίζουν να έχουν μειωμένη ικανότητα αναρρίχησης από την πρώτη εβδομάδα και δραματική μείωση κατά τις εβδομάδες 5 και 6, όπου οι περισσότερες μύγες είναι πλέον ακίνητες **(Παράρτημα Α-Εικόνα 2Β)**. Σε αντίθεση, οι μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα αναρρίχησης μια εβδομάδα αργότερα και ακόμα και την 5^{η} εβδομάδα πολλές μύγες παραμένουν κινητικά ενεργές **(Παράρτημα Α-Εικόνα 2Β)**. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ένα άλλο ανεξάρτητο διαγονίδιο που εκφράζει την 0N4R ισομορφή **(Παράρτημα Β, Συμπληρωματική Εικόνα 2- 1)**. Όσο αφορά τον νευροεκφυλισμό των αισθητήριων νευρώνων παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της 0N4R ισομορφής παρουσιάζει ισχυρότερο εκφυλισμό των νευρώνων σε σχέση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή **(Παράρτημα Α-Εικόνα 3)**. Συγκεκριμένα, την 40^{η} ημέρα οι αισθητήριοι νευρώνες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή είχαν πλήρως εκφυλιστεί με λίγους άξονες να απομένουν **(Παράρτημα Α-Εικόνα 3J,M)**, ενώ με χρήση αντισώματος έναντι μιας μεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης (Hirai-Fujita et al., 2008) επιβεβαιώθηκε ότι στην 0N4R ισομορφή παρατηρείται ισχυρότερη απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης **(Παράρτημα Β, Συμπληρωματική Εικόνα 2- 2)** σε σχέση με την 0N3R ισομορφή.

Για τη διερεύνηση επιπλέον διαφορών που εξαρτώνται από την ισομορφή της πρωτεΐνης Τ που εκφράζεται, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της κάθε ισομορφής ξεχωριστά στη μάθηση και μνήμη. Είναι γνωστό από προηγούμενη μελέτη ότι η έκφραση σε όλους τους νευρώνες της 0N4R ισομορφής προκαλεί μαθησιακά ελλείμματα (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). Για το λόγο αυτό στη παρούσα έρευνα εξετάστηκε ο ρόλος της ισομορφής 0N3R στη μάθηση και μνήμη έπειτα από 24 ώρες (Μακροπρόθεσμη μνήμη- LTM). Οι ενήλικες μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή παρουσιάζουν ελλειμματική μάθηση **(Εικόνα 2-** 1**Α)** σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015); (Kosmidis et al., 2010) καθώς και στην μακροπρόθεσμη μνήμη **(Εικόνα 2-** 1**Β)**, ενώ η έκφραση της 0N3R ισομορφής παρουσιάζει φυσιολογική ικανότητα μάθησης και μνήμης, όπως οι μύγες πειραματικού ελέγχου **(Εικόνα 2-** 1**C,D)**.

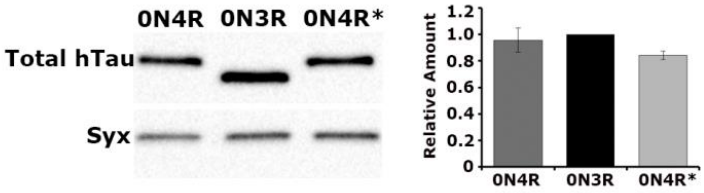


Εικόνα 2- 1. Έκφραση της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη, ενώ η έκφραση της ανθρώπινης 0N3R ισομορφής όχι. Η έκφραση και των δύο ισομορφών επάγεται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts}. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται στους 18^{o}C και οι ενήλικες μύγες τοποθετούνται στους 30^{o}C για 12 ημέρες, πριν τη πραγματοποίηση της δοκιμασίας. Η έκφραση της hTau^{0N4R} προκαλεί σοβαρά ελλείμματα στη μάθηση ($p<0.001$, Dunnett's test, $n>12$ ανά γενότυπο) **(A)** και στη μνήμη ($p<0.001$, Dunnett's test, $n>16$) **(B)**, ενώ η έκφραση της hTau^{0N3R} δεν επηρεάζει ούτε τη μάθηση ($p=0.4585$, Dunnett's test, $n>12$)**(C)**, ούτε τη μνήμη ($p=0.142$, Dunnett's test, $n>14$ **(D)**.

Συγκεντρωτικά αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι υπάρχει μια διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ισομορφών 0N3R και 0N4R, όσο αφορά τη νευροτοξικότητα, η οποία μπορεί να είναι πολύ ισχυρή σε ορισμένους φαινοτύπους που εξετάστηκαν έως ανύπαρκτη. Αυτό με τη σειρά του υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ στη Drosophila δεν είναι απλώς η συνέπεια μιας μη ειδικής τοξικότητας ή δυσλειτουργίας που μπορεί απλά να οφείλεται στην υπερ-έκφραση μιας εξωγενούς πρωτεΐνης. Πιθανόν η κάθε ισομορφή να αλληλεπιδρά διαφορετικά με τους ίδιους ή με διαφορετικούς ενδο-νευρώνες, όπως προτείνεται και με την ειδικότητα και το εύρος των φαινοτύπων που περιγράφηκαν παραπάνω.

2.4.2. Οι ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ επάγουν διαφορετικούς μηχανισμούς τοξικότητας.

Οι φαινοτυπικές διαφορές που παρατηρούνται παραπάνω, ανάμεσα στις δυο ισομορφές, θα μπορούσαν να οφείλονται στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, κάτι που όμως δεν ισχύει, καθότι οι δυο ισομορφές που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα **(Εικόνα 2-** 2**)**.

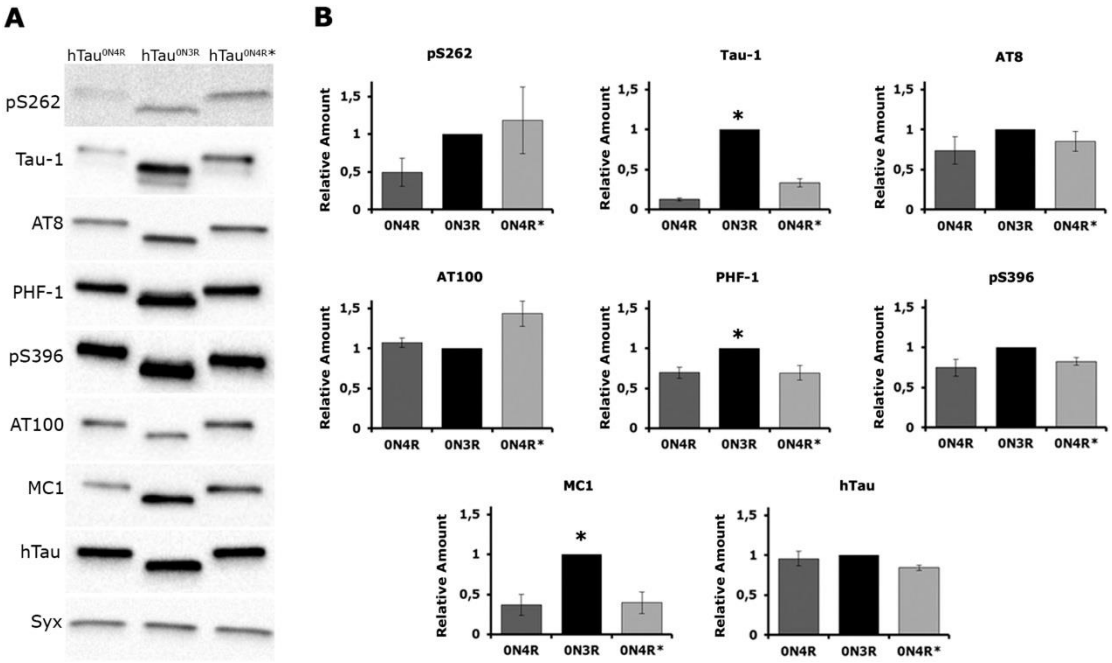


Εικόνα 2- 2 Παρόμοια επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ σε τρία ανεξάρτητα διαγονίδια. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ ελέχθησαν σε κεφαλές ενήλικων μυγών ηλικίας 1-3 ημερών. Η επαγωγή έκφρασης της $hTau^{0N3R}$ και της $hTau^{0N4R}$ πραγματοποιήθηκε υπό τον επαγωγέα ElavGal4. Για την 0N4R ισομορφή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά διαγονίδια, τα οποία σημαίνονται ως 0N4R και 0N4R*. Τα επίπεδα έκφρασης είναι παρόμοια και για τα τρία διαγονίδια.

Για να αποσαφηνιστεί εάν οι δύο ισομορφές δρουν διαφορετικά σε κυτταρικό/μοριακό επίπεδο, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα διαλυτότητας και συσσωμάτωσης, η κατάσταση φωσφορυλίωσης και το δυναμικό του οξειδωτικού στρες καθώς γνωρίζουμε ότι όλα αυτά εμπλέκονται στο μηχανισμό τοξικότητας που μεσολαβείτε από την πρωτεΐνη Τ (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015).

Όπως είναι ήδη γνωστό τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ οδηγούν στη συσσωμάτωσή της (Cowan et al., 2015). Για το λόγο αυτό στη παρούσα έρευνα ελέχθησαν τα επίπεδα συσσωμάτωσης ανάλογα με την ηλικία και για τις δύο ισομορφές, οι οποίες και παρουσίασαν παρόμοιο μοτίβο συσσωμάτωσης **(Παράρτημα Α-Εικόνα 4)**. Στη συνέχεια, μελέτη των επιπέδων φωσφορυλίωσης σε προνύμφες ανέδειξε κάποιες σημαντικές διαφορές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης ανάλογα με την κάθε ισομορφή που εκφράζεται **(Παράρτημα Α-Εικόνα 5)**. Ενώ με χρήση των ίδιων αντισωμάτων σε ενήλικες μύγες **(Εικόνα 2-** 3**)** βρέθηκε ότι υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης μεταξύ των δυο ισομορφών καθώς επίσης και διαφορές που δεν είχαν εντοπιστεί στη μελέτη των προνυμφών **(Παράρτημα Α-Εικόνα 5)**. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι όχι μόνο έχουμε διαφορές που οφείλονται στην έκφραση διαφορετικής ισομορφής αλλά και διαφορές που προκύπτουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης της μύγας και οφείλονται και αυτές στη διαφορετική έκφραση της κάθε ισομορφής. Οι διαφορές αυτές επιβεβαιώθηκαν και με τη χρήση ενός δεύτερου διαγονιδίου 0N4R ($hTau^{0N4R}$

και hTau^{0N4R*}) **(Εικόνα 2-** 3**)**. Στο στάδιο της προνύμφης, η 0N3R είναι περισσότερο φωσφορυλιωμένη στον AT8 επίτοπο και λιγότερο στο TAU-1 σε σχέση με την 0N4R **(Παράρτημα Α-Εικόνα 5)**, ενώ στις ενήλικες 0N3R μύγες παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα του TAU-1 σε σχέση με τις 0N4R μύγες **(Εικόνα 2-** 3**)**. Επίσης, τα υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης που παρατηρούνται στις 0N3R προνύμφες για τον AT100 επίτοπο **(Παράρτημα Α-Εικόνα 5)** δεν εμφανίζονται και στις ενήλικες μύγες **(Εικόνα 2-** 3**)**. Επιπροσθέτως, η 0N3R ισομορφή στις ενήλικες μύγες είναι περισσότερο φωσφορυλιωμένη στις θέσεις Ser$^{396/404}$ (PHF-1) από την 0N4R ισομορφή **(Εικόνα 2-** 3**)**, κάτι που δεν παρατηρείται στις προνύμφες. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί, επίσης, ότι η 0N3R ισομορφή είναι περισσότερο ανοσοδραστική με το αντίσωμα MC1 σε σχέση με την 0N4R ισομορφή, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην αναδίπλωσή τους και προφανώς και στις επικείμενες παθολογικές καταστάσεις, που συσχετίζονται με την δομή, μεταξύ των δύο ισομορφών.



Εικόνα 2- 3. Σύγκριση επιπέδων φωσφορυλίωσης ανάμεσα στις δύο ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ σε συγκεκριμένες θέσεις. Η έκφραση της πρωτεΐνης Τ επάγεται με χρήση του παν-νευρωνικού επαγωγέα ElavGal4. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης ελέγχονται σε κεφαλές από ενήλικες μύγες, ηλικίας 1-3 ημερών, για να συγκριθούν η 0N3R ισομορφή με δύο διαφορετικά διαγονίδια της 0N4R ισομορφής (hTau^{0N4R} και hTau^{0N4R*}). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση των επιπέδων φωσφορυλίωσης παρουσιάζονται στο **(Α)**, με τρία ανεξάρτητα πειράματα να έχουν πραγματοποιηθεί για την επακόλουθη ποσοτικοποίησή τους **(Β)**. Όπου: hTau^{0N3R} = {ElavGal4 / +; w / +; UAShtau^{0N3R} / +}. hTau^{0N4R} = {ElavGal4 /+; w / +; UAShTau^{0N4R} / +} και hTau^{0N4R*} = { ElavGal4 / +; w / +; UAShTau^{0N4R*} / +}.

Συνοπτικά, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι δύο ισομορφές είναι διαφορετικά φωσφορυλιωμένες σε ορισμένες θέσεις αλλά όχι σε όλες και διαφέρουν ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο. Συνεπώς, υπάρχει η ένδειξη ότι τα διαφορετικά επίπεδα

φωσφορυλίωσης ανάμεσα στις δύο ισομορφές μπορεί να προκαλούν και τους διαφορετικούς φαινοτύπους που παρατηρήθηκαν, ωστόσο είναι κάτι που θα πρέπει να διερευνηθεί διεξοδικά στο μέλλον. Επιπλέον, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι οι δυο ισομορφές αλληλεπιδρούν με διαφορετικές κινάσες και φωσφατάσες.

Εκτός από την φωσφορυλίωση και την συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ, το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν άλλο μηχανισμό τοξικότητας που μεσολαβείτε από την πρωτεΐνη Τ (Dias-Santagata et al., 2007); (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015). Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια εξετάστηκε το δυναμικό του οξειδωτικού στρες σε μύγες που εκφράζουν παν-νευρωνικά τις δυο ισομορφές ανεξάρτητα. Οι μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή παρουσίασαν διπλάσια επίπεδα οξείδωσης σε σχέση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή **(Παράρτημα Α-Εικόνα 6)**, υποδηλώνοντας ξεκάθαρα ότι και πάλι υπάρχει διαφορά ανάλογα με την ισομορφή που εξετάζεται.

2.5. Συζήτηση

Με τη παρούσα έρευνα αναφέρουμε φαινοτύπους που είναι ειδικοί για κάθε ισομορφή στο στάδιο των προνυμφών και σε ενήλικες μύγες Drosophila. Παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάσουν τους φαινοτύπους, με την παρούσα έρευνα αποδείχτηκε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στις δυο ισομορφές δεν οφείλονται στα επίπεδα έκφρασης. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με άλλες έρευνες, οι οποίες επίσης παρουσιάζουν διαφορές στο φυσιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης Τ και οφείλονται στην διαφορετική έκφραση της κάθε ισομορφής, συμπεριλαμβανομένων του υπο-κυτταρικού εντοπισμού της κάθε ισομορφής, της λειτουργίας τους και των βιοχημικών διεργασιών που συσχετίζονται με τις ασθένειες (Liu and Gotz, 2013); (Liu et al., 2016).

Εδώ και πολλά χρόνια, έχουν αναφερθεί διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές ισομορφές, που αφορούν κυρίως τη πιο γνωστή κυτταρική λειτουργία της πρωτεΐνης Τ, τη πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους. Θεωρείται ότι οφείλονται στο γεγονός ότι οι 4R ισομορφές έχουν μια επιπλέον περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους, που επιτρέπει την 3-φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τους μικροσωληνίσκους (Goode et al., 2000). Επίσης, η καρβοξυ-τελική περιοχή ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο την πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους και φαίνεται να επηρεάζει την πρόσδεση των 3R ισομορφών σε μεγαλύτερο βαθμό, σε σύγκριση με τις 4R ισομορφές (Goode et al., 2000). Εκτός από την πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους, μια σειρά από άλλες διαφορές που εξαρτώνται από την ισομορφή έχουν αναγνωριστεί σε μια πληθώρα άλλων φυσιολογικών ρόλων που σχετίζονται με την πρωτεΐνη Τ. Αυτές περιλαμβάνουν διάφορες πρωτεΐνες που

αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Τ, με την 2N4R ισομορφή να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον νευροεκφυλισμό (Liu et al., 2016), ενώ κινάσες όπως η Fyn φαίνεται να δεσμεύουν κατά προτίμηση τις 3R ισομορφές (Bhaskar et al., 2005). Διαφορές στον υπο-κυτταρικό εντοπισμό έχουν επίσης αποκαλυφθεί, όπου οι 0N ισομορφές εμφανίζονται κατά προτίμηση στο σώμα και τους άξονες, οι 1N ισομορφές στους δενδρίτες και τον πυρήνα και οι 2N ισομορφές στο κυτταρικό σώμα και τους άξονες (Liu and Gotz, 2013). Τέτοια ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με τη γενικότερη άποψη ότι η πρωτεΐνη Τ συμπεριφέρεται κυρίως ως αξονική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων, και μαζί με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας ενισχύουν την άποψη ότι η πρωτεΐνη Τ είναι μια πρωτεΐνη με πολλαπλές λειτουργίες που πιθανόν να διαφοροποιούνται από την έκφραση διαφορετικών ισομορφών.

Σε συμφωνία με την ιδέα αυτή έρχονται τα δεδομένα που παρέχονται από άλλες έρευνες, οι οποίες δείχνουν ότι συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις είναι ειδικές ως προς την ισομορφή, συμπεριλαμβανομένης και της τάσης για δημιουργία συσσωματωμάτων (Adams et al., 2010), της μορφολογίας των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται (Adams et al., 2010) και της διαμόρφωσής τους (Dinkel et al., 2011). Δεδομένου ότι η υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ μπορεί να προάγει το σχηματισμό συσσωματωμάτων, πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην εξερεύνηση του ρόλου της ψευδο-φωσφορυλίωσης στη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ in vitro και έχουν ταυτοποιηθεί ενδιαφέρουσες διαφορές ειδικές για κάθε ισομορφή (Combs et al., 2011). Παρόλο που στη παρούσα έρευνα έχουμε αναδείξει διαφορές ειδικές με την ισομορφή και διαφορές που εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο, αυτές δεν φαίνεται να οδηγούν σε διαφορές στη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ, τουλάχιστον με βάση την ανάλυση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν εδώ. Σε επίπεδο υπο-κυτταρικού εντοπισμού έχουν επίσης αναφερθεί διαφορές ανάλογες με την ισομορφή καθώς και πως οι αλλαγές αυτές συμβαίνουν κατά την διάρκεια εξέλιξης της παθολογίας των νευροϊνιδικών πλεγμάτων (Hara et al., 2013). Συλλογικά, όλες αυτές οι μελέτες φαίνεται ότι αρχίζουν να αποσαφηνίζουν γιατί διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ σχετίζονται με διαφορετικές Τ- πρωτεϊνοπάθειες και για την κυτταρική/μοριακή βάση της προδιάθεσης διαφορετικών περιοχών του εγκεφάλου σε αυτές.

Όλες οι παραπάνω μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν βιοχημικές διαφορές ανάλογα με την ισομορφή στη παθολογία της πρωτεΐνης Τ, ωστόσο σχεδόν καμία από αυτές δεν έχει συγκρίνει άμεσα και δεν έχει αντιπαραβάλλει τις ισομορφές στο ίδιο μοντέλο. Με τη μελέτη αυτή δείξαμε ότι ορισμένοι φαινότυποι που εξαρτώνται από την έκφραση της πρωτεΐνης Τ, όπως η διαταραχή της αξονικής μεταφοράς και της κινητικότητας των ενηλίκων, είναι ισχυρότεροι για τις 3R ισομορφές **(Παράρτημα Α-Εικόνα 1),** ενώ για άλλους φαινοτύπους, όπως η μάθηση και η

μνήμη **(Εικόνα 2-** 1**)** και η εκφύλιση των φωτουποδοχέων **(Παράρτημα Α-Εικόνα 3)** είναι πιο τοξική η ισομορφή 4R. Επίσης, σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχτεί ότι οι ισομορφές $hTau^{0N4R}$ και $hTau^{2N4R}$ εξαλείφουν τα μισχοειδή σωμάτια, ενώ δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο για την $hTau^{0N3R}$ (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015); (Grammenoudi et al., 2008); (Papanikolopoulou et al., 2010). Επιπλέον, η έκφραση της $hTau^{0N3R}$ συσχετίζεται με την δυσλειτουργία, χωρίς όμως να επιφέρει νευρωνικό θάνατο (Mudher et al., 2004); (Cowan et al., 2010). Επιπροσθέτως, σε άλλες μελέτες αναφέρεται ότι συμβαίνει εκφύλιση των φωτο-υποδοχέων ή άλλων περιοχών του εγκεφάλου, ωστόσο σε όλες αυτές τις περιπτώσεις εκφράζονται μόνο οι 4R ισομορφές (Dourlen et al., 2016); (Chanu and Sarkar, 2016). Απ' όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει κάποια έρευνα, πέρα από την παρούσα, στην οποία να συγκρίνεται άμεσα το δυναμικό οξείδωσης των ισομορφών 3R και 4R, όπου η 4R ισομορφή προκαλεί ισχυρότερο οξειδωτικό στρες από τις 3R ισομορφές **(Παράρτημα Α-Εικόνα 6)**. Το οξειδωτικό στρες έχει αναφερθεί ότι υπάρχει στις Τ-πρωτεϊνοπάθειες που εμπλέκουν είτε μόνο είτε και τις δυο 3R και 4R ισομορφές (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015). Εκτός από τις λίγες έρευνες στη Drosophila, που συστηματικά συγκρίνουν τη παθολογία των 3R και 4R ισομορφών, ορισμένες έρευνες στα ποντίκια έχουν δείξει ότι η ισορροπία μεταξύ των 4R ισομορφών φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με την παθολογία της πρωτεΐνης Τ καθώς και με τα συμπεριφορικά ελλείμματα (Schoch et al., 2016).

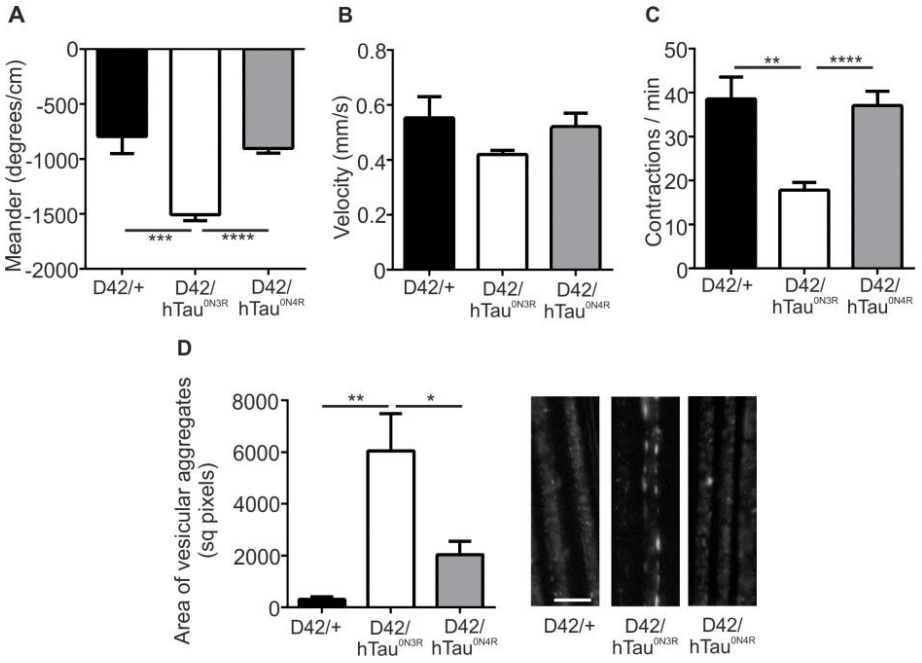
Προς το παρόν, ο μοριακός μηχανισμός για αυτές τις διαφορές που υφίστανται στις διαφορετικές ισομορφές είναι ασαφής. Τα επίπεδα έκφρασης και οι διαφορές στη σταθερότητα της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι ορισμένοι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτό, καθότι η τοξικότητα που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη Τ φαίνεται να σχετίζεται με το φορτίο της πρωτεΐνης Τ ενδο-κυτταρικά (Ubhi et al., 2007). Αυτή η άποψη ενισχύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, τα οποία αναδύουν διαφορές μεταξύ των ισομορφών $hTau^{0N3R}$ και $hTau^{0N4R}$, αν και εκφράζονται στα ίδια επίπεδα **(Εικόνα 2-** 2**)**. Διαφορές στους φωσφορυλιωμένους επιτόπους μπορεί επίσης να είναι ένας καθοριστικός παράγοντας καθότι τέτοιες διαφορές έχουν συσχετιστεί με τη διαφορική τοξικότητα (Brelstaff et al., 2015), ή τη μειωμένη πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους (Biernat et al., 1993), υποστηρίζοντας τη νευρωνική δυσλειτουργία που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη Τ.

2.6. Συμπέρασμα

Οι έξι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ πολλές φορές θεωρούνται ως η ίδια πρωτεΐνη και πράγματι πολλά από τα φυσιολογικά αλλά και παθολογικά χαρακτηριστικά τους είναι παρόμοια. Ωστόσο, υπάρχουν σαφείς διαφορές στη λειτουργία των ισομορφών, οι οποίες προκύπτουν από τις μεταβλητές Ν-τελικές περιοχές και από τις 3 ή 4 περιοχές πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους. Αυτό

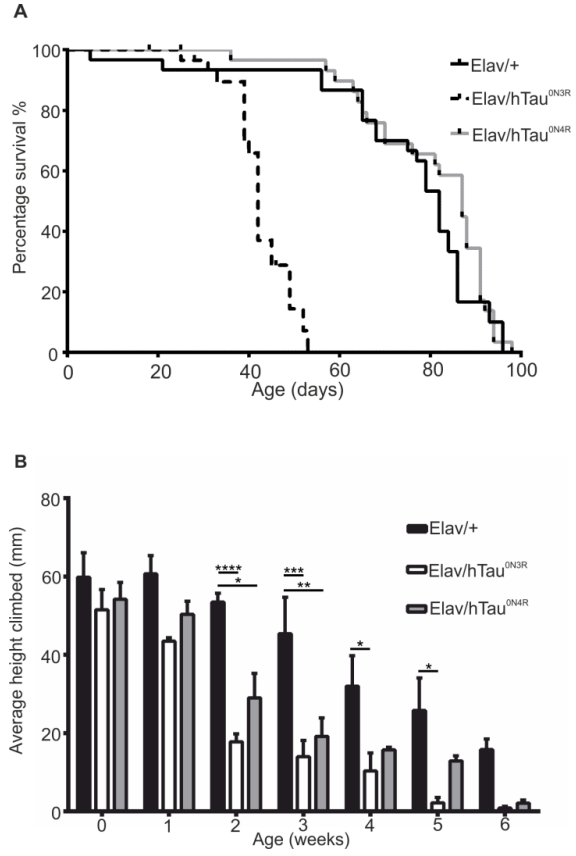
εκδηλώνεται με διαφοροποιήσεις κατά τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση και εν συνεχεία στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία τους. Επίσης, όπως αποδείχτηκε στη παρούσα έρευνα διαφέρουν και ως προς το παθολογικό δυναμικό τους. Συνεπώς, αυτές οι διαφορές που εξαρτώνται από την ισομορφή, πρέπει να λαμβάνονται υπ όψιν κατά την ερμηνεία των διαφόρων αποτελεσμάτων στα μοντέλα των Τ-πρωτεϊνοπαθειών. Μελλοντικά θα πρέπει να διερευνηθεί πως οι διαφορετικές ισομορφές συμβάλλουν στη διαφορική ευαισθησία ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου και στο μηχανισμό της τοξικότητας που μεσολαβείτε από την πρωτεΐνη Τ στις διαφορετικές Τ- πρωτεϊνοπάθειες.

2.7. Παράρτημα Α

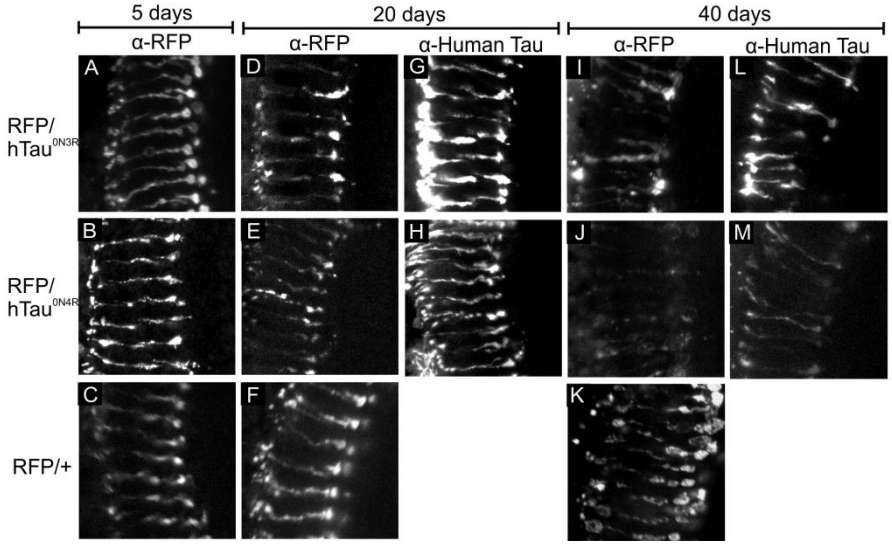


Παράρτημα Α-Εικόνα 1. Έκφραση της hTau^{0N3R} και όχι της hTau^{0N4R} προκαλεί κινητικές αλλοιώσεις και βλάβη στην αξονική μεταφορά. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται στις μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή όσο αφορά τους ελιγμούς μετρούμενους ως η γωνία που αποκλίνει από την ευθεία ανά εκατοστό που διανύθηκε **(A)** καθώς και μειωμένη συχνότητα συσπάσεων των μυών του σώματος **(C).** Αντίθετα οι μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή δεν παρουσιάζουν καμιά αλλοίωση σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Παρόμοια τάση παρατηρείται και στη ταχύτητα κίνησης, χωρίς ωστόσο να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά **(B).** Στους κινητικούς νευρώνες των προνυμφών βρέθηκαν κυστικά συσσωματώματα στις προνύμφες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή και όχι στις προνύμφες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή **(D).** Μπάρα κλίμακας = 10 μm. Στατιστική ανάλυση: Α) WT έναντι hTau^{0N3R} p = 0.0009; hTau^{0N3R} έναντι hTau^{0N4R} p = 0.0001; WT έναντι hTau^{0N4R} p = 0.4801. Β) WT έναντι hTau^{0N3R} p = 0.1508 (ns); hTau^{0N3R} έναντι hTau^{0N4R} p = 0.0928 (ns); WT έναντι hTau^{0N4R} p = 0.7304 (ns). C) WT έναντι hTau^{0N3R} p = 0.0013; hTau^{0N3R} έναντι hTau^{0N4R} p = 0.0001;WT έναντι hTau^{0N4R} p = 0.803 (ns) (μη ζευγαρωμένη δοκιμασία 2 ουρών; n = 9–10 ανά δοκιμή). D) WT έναντι hTau0N3R p = 0.0041; hTau^{0N3R} έναντι hTau^{0N4R} p = 0.0306; WT έναντι

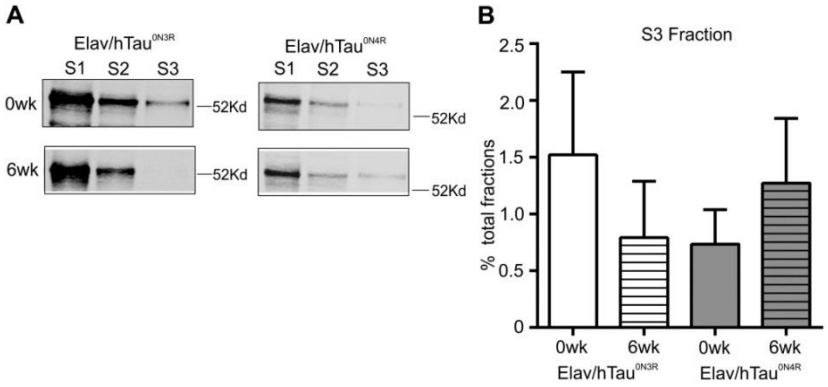
hTau0N4R p = 0.0116 (μη ζευγαρωμένη δοκιμασία 2 ουρών ή μιας κατεύθυνσης Anova και στη συνέχεια δοκιμασία Bonferroni πολλαπλών συγκρίσεων, n = 5). Όπου: hTau^{0N3R} = {w / +; D42-GAL4 / +; UAShtau^{0N3R} / +}. hTau^{0N4R}= {w / +; D42-GAL4 / +; UAShTau^{0N4R} / +}. WT= {w / +; D42-GAL4 / +; + /+} σε OreR γενετικό υπόβαθρο (μύγες πειραματικού ελέγχου). (τα δεδομένα παρήχθησαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Amritpal Mudher)



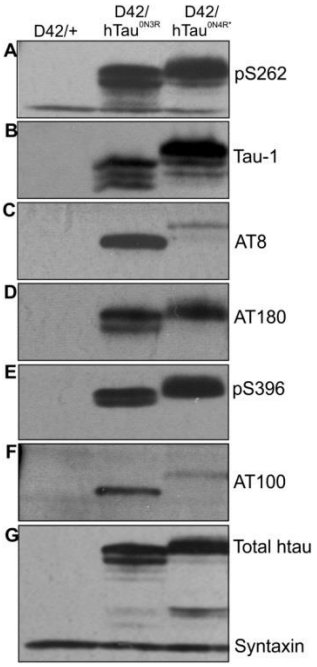
Παράρτημα Α-Εικόνα 2. Διαφορετική τοξικότητα ανάλογα με την ισομορφή που εκφράζεται σε ενήλικες μύγες *Drosophila melanogaster*. Α) Καμπύλη επιβίωσης αρσενικών μυγών (n = 30) που εκφράζουν την 0N3R και την 0N4R ισομορφή υπό τον παν-νευρωνικό επαγωγέα Elav-GAL4 και μυγών πειραματικού ελέγχου (WT, Elav/+). Οι μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερο προσδόκιμο ζωής σε σχέση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή ή τις μύγες πειραματικού ελέγχου (Log-rank, Mantel-Cox δοκιμασία p = 0.0001). **Β)** Μέτρηση της ικανότητας αναρρίχησης μέχρι την 6^{η} εβδομάδα των μυγών (n = 30) που εκφράζουν την 0N3R και την 0N4R ισομορφή καθώς και των μυγών πειραματικού ελέγχου, WT. (διπλής κατεύθυνσης ANOVA; p = 0.0002). Όπου: hTau^{0N3R} = { Elav-GAL4 /+; w /+; UAShtau^{0N3R}/+}. hTau^{0N4R} = { Elav-GAL4/+; w/+; UAShTau^{0N4R}/+}. WT = { Elav-GAL4/+; w/+; +/+} σε OreR γενετικό υπόβαθρο. (Τα δεδομένα παρήχθησαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Amritpal Mudher)



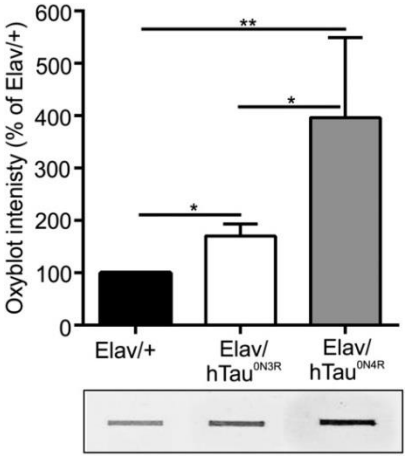
Παράρτημα Α-Εικόνα 3. Η έκφραση της 0N4R ισομορφής προκαλεί ισχυρότερη τοξικότητα στους αισθητήριους υποδοχείς (R7 νευρώνες) σε σχέση με την 0N3R ισομορφή. Οι R7 αισθητήριοι νευρώνες στο οπτικό σύστημα της Drosophila εκφράζουν τον δείκτη φθοριμού (myr-RFP) μαζί με την 0N3R ισομορφή (άνω σειρά) είτε μαζί με την 0N4R ισομορφή (ενδιάμεση σειρά) ή μόνο του (RFP, κάτω σειρά). Οι εγκέφαλοι ενήλικων μυγών εξετάστηκαν στις 5 ημέρες (πρώτη στήλη), στις 20 ημέρες (δεύτερη και τρίτη στήλη) και στις 40 ημέρες (τέταρτη και πέμπτη στήλη). Μπάρα κλίμακας 10 μm. **(A–C)** Στους εγκεφάλους 5 ημερών δεν επηρεάζονται οι αισθητήριοι νευρώνες για καμία από τις δύο ισομορφές. **(D–F)** Η έκφραση των $hTau^{0N3R}$ **(D)** και $hTau^{0N4R}$ **(E)** για 20 ημέρες οδηγεί σε μειωμένο RFP σήμα σε σχέση με τους εγκεφάλους των μυγών πειραματικού ελέγχου **(F)**, ωστόσο οι άξονες παραμένουν άθικτοι **(G,H)**. Η έκφραση της $hTau^{0N3R}$ έχει μια τάση να δημιουργεί συσσωματώματα στις συνάψεις. **(I–K)** Στις 40 ημερών μύγες υπάρχει και για τις δύο ισομορφές σημαντική μείωση του RFP σήματος και συγκεκριμένα η έκφραση της $hTau^{0N4R}$ οδηγεί σε παντελή έλλειψη σήματος σε μια πιο ευρεία περιοχή σε σχέση με τις $hTau^{0N3R}$. **(L, M)** ο σχηματισμός συσσωματωμάτων κατά μήκος των αξόνων και στις συνάψεις είναι μεγαλύτερος για την $hTau^{0N3R}$ **(L)** σε σχέση με την $hTau^{0N4R}$ **(M)**. Όπου: $hTau^{0N3R}$ = {w / +; panR7-GAL4 / +; $UAShtau^{0N3R}$ / +}. $hTau^{0N4R}$ = {w / +; panR7-GAL4; $UAShTau^{0N4R}$ / +}. WT = {w / +; panR7-GAL4; + / +} σε OreR γενετικό υπόβαθρο. (Τα δεδομένα παρήχθησαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Amritpal Mudher)



Παράρτημα Α-Εικόνα 4. Οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης Τ δεν έχουν καμία διαφορά στο σχηματισμό των αδιάλυτων ολιγομερών. Α) Αντιπροσωπευτική απεικόνιση του διαλυτού (S1 κλάσμα), του SDS-διαλυτού (S2 κλάσμα) και του αδιάλυτου στο SDS (S3) κλάσματος που προέρχονται από κεφάλια ενήλικων μυγών που εκφράζουν τις hTau^{0N3R} και hTau^{0N4R} (παν-νευρωνική έκφραση μέσω του Elav-GAL4) σε νεαρές και μύγες 6 εβδομάδων. **Β)** Ποσοτικοποίηση S3 κλάσματος σε σχέση με το άθροισμα όλων των κλασμάτων δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των μυγών hTau^{0N3R} και hTau^{0N4R} (n=4). Όπου: hTau^{0N3R} = { Elav-GAL4 / +; w / +; UAShtau^{0N3R} / +}. hTau^{0N4R} = { Elav-GAL4; w / +; UAShTau^{0N4R} / +}. (Τα δεδομένα παρήχθησαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Amritpal Mudher).

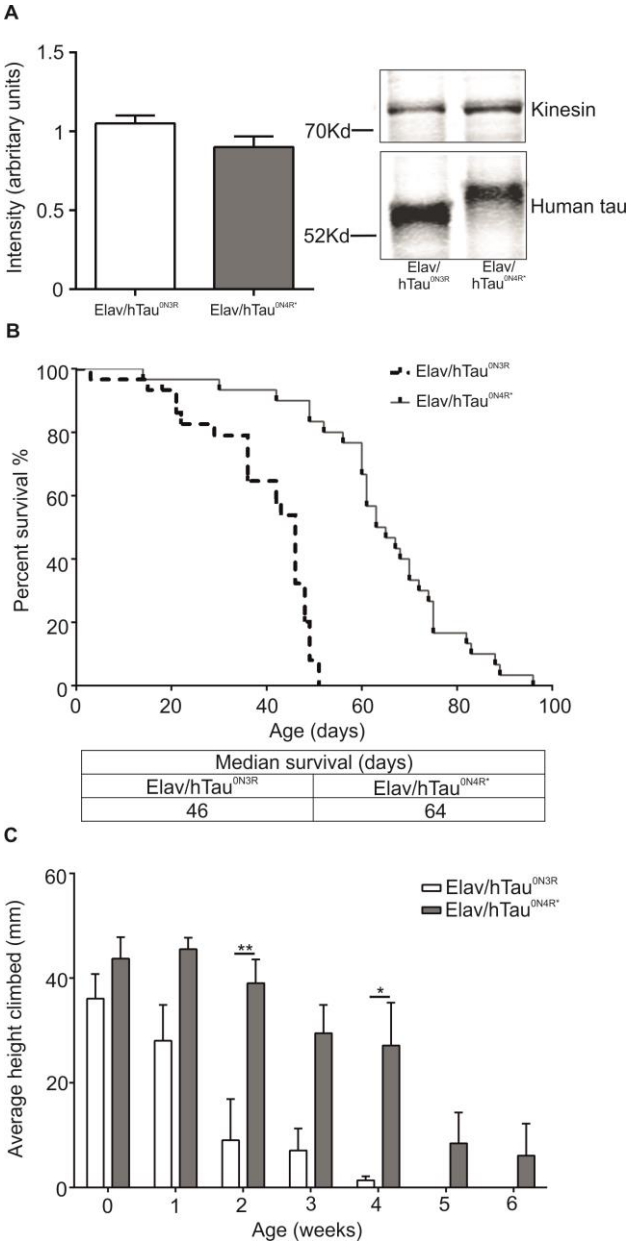


Παράρτημα Α-Εικόνα 5. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης σε προνύμφες που εκφράζουν τις hTau^{0N3R} και hTau^{0N4R}. Η έκφραση και των δύο ισομορφών επάγεται με χρήση του επαγωγέα D42-GAL4 και εξετάζονται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης σε προνύμφες τρίτου σταδίου. Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των φωσφορυλιώσεων με χρήση διαφορετικών αντισωμάτων. Και οι δύο ισομορφές παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα φωσφορυλίωσης για τις θέσεις pS262 **(Α)**, AT180 **(D)** και pS396 **(Ε)**. Ωστόσο, η hTau0N4R* παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα φωσφορυλίωσης για τις θέσεις AT8/Tau-1 **(Β και C)** και AT100 **(F)**. Η έκφραση και των δύο ισομορφών βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα **(G)**. Όπου: hTau^{0N3R} = {w / +; D42-GAL4 / +; UAShTau^{0N3R} / +}. hTau^{0N4R*} = {w / +; D42-GAL4 / +; UAShTau^{0N4R*} / +}.



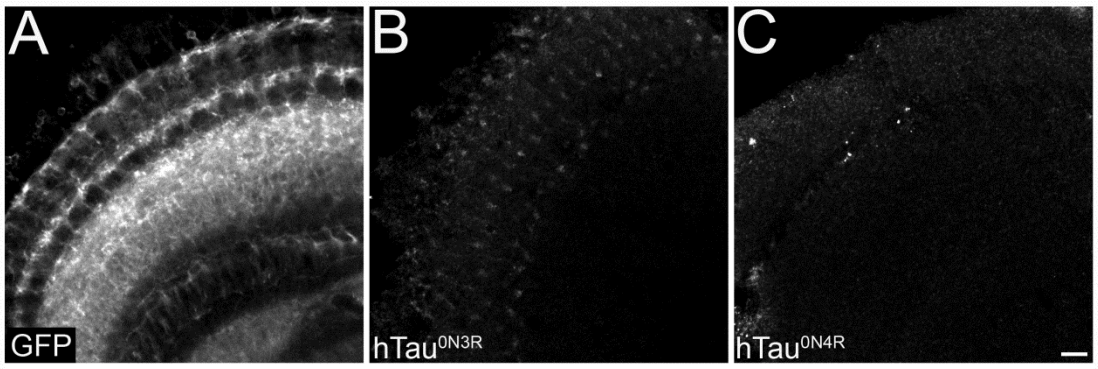
Παράρτημα Α-Εικόνα 6. Οξειδωτικό στρες σε μύγες που εκφράζουν τις hTau^{0N3R} και hTau^{0N4R} ισομορφές. Παν- νευρωνική έκφραση των δύο ισομορφών με χρήση του επαγωγέα Elav-GAL4 προκαλεί οξειδωτικό στρες σε μύγες ηλικίας μιας ημέρας. Τα επίπεδα οξείδωσης που παρατηρούνται στις μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή είναι υψηλότερα από αυτά των μυγών που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή. Στο γράφημα απεικονίζεται ο μέσος όρος από 9 ανεξάρτητα πειράματα. Στατιστική ανάλυση με t-δοκιμασία: μύγες πειραματικού ελέγχου (Elav/+) έναντι hTau^{0N3R}, p = 0.0145; hTau^{0N3R} έναντι hTau^{0N4R}, p = 0.04; μύγες πειραματικού ελέγχου (Elav/+) έναντι hTau^{0N4R}, p = 0.008. Όπου: hTau^{0N3R} = { Elav-GAL4 / +; w / +; UAShtau^{0N3R} / +}. hTau^{0N4R} = { Elav-GAL4 / +; w / +; UAShTau^{0N4R} / +}. WT = { Elav-GAL4 / +; w / +; +/ +} σε OreR γενετικό υπόβαθρο. (Τα δεδομένα παρήχθησαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Amritpal Mudher)

2.8. Παράρτημα Β-Συμπληρωματικές εικόνες



Median survival (days)	
Elav/hTau^{0N3R}	Elav/hTau^{0N4R*}
46	64

Συμπληρωματική Εικόνα 2- 1. Μύγες που εκφράζουν την ισομορφή 0N3R έχουν μικρότερο προσδόκιμο ζωής και μειωμένη ικανότητα αναρρίχησης σε σχέση με ένα ανεξάρτητο διαγονίδιο για την 0N4R ισομορφή. Α) Παρόμοια επίπεδα έκφρασης παρουσιάζουν οι ισομορφές hTau^{0N3R} και hTau^{0N4R*}, όπως παρουσιάζεται με την ανοσοαποτύπωση κατά Western. **Β)** Το προσδόκιμο ζωής των hTau^{0N3R} μυγών είναι σημαντικά μειωμένο σε σχέση με αυτό των μυγών hTau^{0N4R*} (Mantel-Cox; p = 0.0001, n = 30). Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στους 23°C, ενώ σε υψηλότερη θερμοκρασία παρατηρούνται ισχυρότεροι φαινότυπο για την 0N4R ισομορφή, όπως έχει ήδη δημοσιευθεί (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). C) Σύγκριση ικανότητας αναρρίχησης για το χρονικό διάστημα των 6 εβδομάδων, έδειξε ότι hTau^{0N3R} μύγες παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη ικανότητα αναρρίχησης σε σύγκριση με τις hTau^{0N4R*} μύγες. (δοκιμασία ANOVA δυο κατευθύνσεων; p = 0.0001, n = 30). (Τα δεδομένα παρήχθησαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Amritpal Mudher)



Συμπληρωματική Εικόνα 2- 2. Έκφραση της πρωτεΐνης Τ προκαλεί βλάβη στην ακεραιότητα της μεμβράνης. Σε εγκεφάλους από μύγες ηλικίας 6 εβδομάδων, η μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη (chaoptin, 24B10 antiserum) σημαίνει τους φωτο-υποδοχείς του οπτικού συστήματος της Drosophila. Η γλυκοπρωτεΐνη ανιχνεύεται οριακά στους άξονες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή **(B)** και είναι εντελώς απούσα στις μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή **(C)**. Μπάρα κλίμακας = 10 μm. (Τα δεδομένα παρήχθησαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Amritpal Mudher)

2.9. Βιβλιογραφία

Adams, S.J., DeTure, M.A.,McBride,M., Dickson, D.W., Petrucelli, L., 2010. Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. PLoS One 5, e10810. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010810.

Alavi Naini, S.M., Soussi-Yanicostas, N., 2015. Tau hyperphosphorylation and oxidative stress, a critical vicious circle in neurodegenerative tauopathies? Oxidative Med. Cell. Longev.:151979 http://dx.doi.org/10.1155/2015/151979.

Andreadis, A., 2005. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. Biochim. Biophys. Acta 1739:91–103. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.010.

Bhaskar, K., Yen, S.H., Lee, G., 2005. Disease-relatedmodifications in tau affect the interaction between fyn and tau. J. Biol. Chem. 280:35119–35125. http://dx.doi.org/10.1074/ jbc.M505895200.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. Neuron 11, 153–163.

Brelstaff, J., et al., 2015. The fluorescent pentameric oligothiophene pFTAA identifies filamentous tau in live neurons cultured from adult P301S tau mice. Front. Neurosci. 9: 184. http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00184.

Chanu, S.I., Sarkar, S., 2016. Targeted downregulation of dMyc suppresses pathogenesis of human neuronal tauopathies in Drosophila by limiting heterochromatin relaxation and tau hyperphosphorylation. Mol. Neurobiol. http://dx.doi.org/10.1007/s12035- 016-9858-6.

Combs, B., Voss, K., Gamblin, T.C., 2011. Pseudohyperphosphorylation has differential effects on polymerization and function of tau isoforms. Biochemistry 50:9446–9456. http://dx.doi.org/10.1021/bi2010569.

Cowan, C.M., Bossing, T., Page, A., Shepherd, D., Mudher, A., 2010. Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo. Acta Neuropathol. 120:593–604. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-010-0716-8.

Cowan, C.M., et al., 2015. Rescue from tau-induced neuronal dysfunction produces insoluble tau oligomers. Sci. Report. 5:17191. http://dx.doi.org/10.1038/srep17191.

Dias-Santagata, D., Fulga, T.A., Duttaroy, A., Feany, M.B., 2007. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila. J. Clin. Invest. 117:236–245. http:// dx.doi.org/10.1172/JCI28769.

Dinkel, P.D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., Margittai, M., 2011. Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. Biochemistry 50:4330–4336. http://dx.doi.org/10.1021/bi2004685.

Dourlen, P., et al., 2016. Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of tau pathology. Mol. Psychiatry http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.59.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3, 519–526.

Goode, B.L., Chau,M., Denis, P.E., Feinstein, S.C., 2000. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenetative disease. J. Biol. Chem. 275:38182–38189. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007489200.

Grammenoudi, S., Anezaki, M., Kosmidis, S., Skoulakis, E.M., 2008. Modelling cell and isoform type specificity of tauopathies in Drosophila. SEB Exp. Biol. Ser. 60, 39–56.

Hara, M., Hirokawa, K., Kamei, S., Uchihara, T., 2013. Isoform transition from four-repeat to three-repeat tau underlies dendrosomatic and regional progression of neurofibrillary pathology. Acta Neuropathol. 125:565–579. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1097-6.

Hirai-Fujita, Y., Yamamoto-Hino, M., Kanie, O., Goto, S., 2008. N-Glycosylation of the Drosophila neural protein Chaoptin is essential for its stability, cell surface transport and adhesive activity. FEBS Lett. 582:2572–2576. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.028.

Huefner, A., Kuan, W.L., Barker, R.A., Mahajan, S., 2013. Intracellular SERS nanoprobes for distinction of different neuronal cell types. Nano Lett. 13:2463–2470. http://dx.doi. org/10.1021/nl400448n.

Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K., Skoulakis, E.M., 2010. Differential effects of tau on the integrity and function of neurons essential for learning in Drosophila. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 30:464–477. http://dx.doi.org/10.1523/ JNEUROSCI.1490-09.2010.

Liu, C., Gotz, J., 2013. Profilingmurine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization,

with the 1N isoform being enriched in the nucleus. PLoS One 8, e84849. http://dx.doi.org/10. 1371/journal.pone.0084849.

Liu, C., Song, X., Nisbet, R., Gotz, J., 2016. Co-immunoprecipitation with tau isoform-specific antibodies reveals distinct protein interactions and highlights a putative role for 2N tau in disease. J. Biol. Chem. 291:8173–8188. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115. 641902.

Medina, M., Hernandez, F., Avila, J., 2016. New features about tau function and dysfunction. Biomolecules 6. http://dx.doi.org/10.3390/biom6020021.

Mudher, A., et al., 2004. GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in Drosophila. Mol. Psychiatry 9:522–530. http://dx.doi.org/ 10.1038/sj.mp.4001483.

Niblock, M., Gallo, J.M., 2012. Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. Biochem. Soc. Trans. 40:677–680. http://dx.doi.org/10.1042/BST20120091.

Papanikolopoulou, K., Skoulakis, E.M., 2015. Temporally distinct phosphorylations differentiate tau-dependent learning deficits and premature mortality in Drosophila. Hum. Mol. Genet. 24:2065–2077. http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu726.

Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Skoulakis, E.M., 2010. Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. Biochem. Soc. Trans. 38:981–987. http://dx.doi.org/10.1042/BST0380981.

Park, S.A., Ahn, S.I., Gallo, J.M., 2016. Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. BMB Rep.

Quraishe, S., Cowan, C.M.,Mudher, A., 2013. NAP (davunetide) rescues neuronal dysfunction in a Drosophila model of tauopathy. Mol. Psychiatry 18:834–842. http://dx.doi. org/10.1038/mp.2013.32.

Rabano, A., Cuadros, R., Calero, M., Hernandez, F., Avila, J., 2013. Specific profile of tau isoforms in argyrophylic grain disease. Exp. Neurosci. 7:51–59. http://dx.doi.org/10. 4137/JEN.S12202.

Schoch, K.M., et al., 2016. Increased 4R-tau induces pathological changes in a human-tau mouse model. Neuron 90:941–947. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.042.

Sinadinos, C., Cowan, C.M., Wyttenbach, A., Mudher, A., 2012. Increased throughput assays of locomotor dysfunction in Drosophila larvae. J. Neurosci. Methods 203: 325–334. http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.08.037.

Smith, C.J., Anderton, B.H., Davis, D.R., Gallo, J.M., 1995. Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. FEBS Lett. 375, 243–248.

Spillantini, M.G., Goedert,M., 2013. Tau pathology and neurodegeneration. Lancet Neurol. 12:609–622. http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5.

Ubhi, K.K., Shaibah, H., Newman, T.A., Shepherd, D.,Mudher, A., 2007. A comparison of the neuronal dysfunction caused by Drosophila tau and human tau in a Drosophila model of tauopathies. Invertebr. Neurosci. 7:165–171. http://dx.doi.org/10.1007/s10158- 007-0052-4.

Wittmann, C.W., et al., 2001. Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. Science 293:711–714. http://dx.doi.org/10.1126/science.1062382.

Wu, T.H., et al., 2013. Loss of vesicular dopamine release precedes tauopathy in degenerative dopaminergic neurons in a Drosophila model expressing human tau. Acta Neuropathol. 125:711–725. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1105-x.

SCIENTIFIC PUBLICATION

Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy

Neurobiology of Disease

Volume 105, September 2017, Pages 74-83

https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.003

Neurobiology of Disease 105 (2017) 74–83

Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy

Megan A. Sealey [a], Ergina Vourkou [c], Catherine M. Cowan [a], Torsten Bossing [b], Shmma Quraishe [a], Sofia Grammenoudi [c], Efthimios M.C. Skoulakis [c], Amritpal Mudher [a,*]

[a] Centre for Biological Sciences, University of Southampton, Southampton SO17 1BJ, UK
[b] School of Biomedical and Healthcare Sciences, Plymouth University, PL6 8BU, UK
[c] Division of Neuroscience, Biomedical Sciences Research Centre "Alexander Fleming", Vari 16672, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 December 2016
Revised 12 April 2017
Accepted 10 May 2017
Available online 11 May 2017

Keywords:
3R tau
4R tau
Alzheimer's disease
Drosophila
Isoforms
Tauopathy

ABSTRACT

Tau exists as six closely related protein isoforms in the adult human brain. These are generated from alternative splicing of a single mRNA transcript and they differ in the absence or presence of two N-terminal and three or four microtubule binding domains. Typically all six isoforms have been considered functionally similar. However, their differential involvement in particular tauopathies raises the possibility that there may be isoform-specific differences in physiological function and pathological role. To explore this, we have compared the phenotypes induced by the 0N3R and 0N4R isoforms in *Drosophila*. Expression of the 3R isoform causes more profound axonal transport defects and locomotor impairments, culminating in a shorter lifespan than the 4R isoform. In contrast, the 4R isoform leads to greater neurodegeneration and impairments in learning and memory. Furthermore, the phosphorylation patterns of the two isoforms are distinct, as is their ability to induce oxidative stress. These differences are not consequent to different expression levels and are suggestive of bona fide physiological differences in isoform biology and pathological potential. They may therefore explain isoform-specific mechanisms of tau-toxicity and the differential susceptibility of brain regions to different tauopathies.

Crown Copyright © 2017 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

Transcripts from the single microtubule associated protein tau (MAPT)-encoding gene on human chromosome 17q21.1 are spliced into six isoforms in the adult brain (Andreadis, 2005). These tau isoforms, ranging in size from 352 to 441 amino acids, arise because of alternative splicing of exons 2, 3 and 10 leading to the absence or presence of 1 or 2 N-terminal domains and 3 or 4C-terminal microtubule binding repeats (Goedert et al., 1989). They are commonly referred to as 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R and 2N4R tau. Furthermore, tau isoforms undergo a variety of post-translational modifications including Ser/Thr and Tyr phosphorylation, acetylation and SUMOylation. Some of these modifications occur physiologically and are regulated during development and aging; others occur in pathological conditions and are implicated in tau-mediated toxicity (reviewed in (Medina et al., 2016; Huefner et al., 2013)).

It has been argued that regulation of alternative splicing during development is a mechanism for radically altering the function of tau protein. This may be reflected in expression of 3R isoforms early in human brain development during axon path finding when a more dynamic cytoskeleton is required and then transitioning to expression of 4R isoforms post neurite elaboration, when a more stable network has been established (Andreadis, 2005). Accordingly, a main distinction of tau isoforms involves differentiation of the microtubule-binding repeats. This likely underlies differences in isoform physiology and pathological potential as they ostensibly interact with distinct or partially overlapping membrane-associated, cytosolic and cytoskeletal proteins. In fact, differences in microtubule binding properties were well-known (Goode et al., 2000), but several studies have now demonstrated additional isoform-specific differences including: the propensity of tau to aggregate (Adams et al., 2010), differential templated seeding capabilities (Dinkel et al., 2011), intra-neuronal re-localisation during tangle formation (Hara et al., 2013; Liu and Gotz, 2013), interactions with distinct cellular binding partners (Bhaskar et al., 2005; Liu et al., 2016), phosphorylation potential and the impact of these differences on their biochemical properties (Combs et al., 2011).

The ratio of 3R to 4R isoforms in the adult human brain is approximately 1. The equimolar isoform ratio is disrupted in some familial tauopathies due to splicing mutations, which lead to elevation of the 4R tau isoforms (Andreadis, 2005). Even in Alzheimer's Disease (AD) there is evidence of impaired 3R/4R ratio in tangle bearing neurons (Niblock and Gallo, 2012; Park et al., 2016). The fact that disrupting

* Corresponding author.
E-mail address: A.Mudher@soton.ac.uk (A. Mudher).
Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.003
0969-9961/Crown Copyright © 2017 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

the isoform ratio is associated with disease, demonstrates the importance of maintaining the 3R:4R isoform balance in healthy neurons. Additionally, not all isoforms are present in tau aggregates that characterise particular tauopathies, including sporadic forms. In AD for example, all tau isoforms form filaments, whereas in others they are comprised predominately of either 3R (e.g. Pick's disease), or 4R isoforms (e.g. Progressive Supranuclear Palsy, Corticobasal Degeneration, Argyrophilic Grain Disease) (Rabano et al., 2013; Spillantini and Goedert, 2013).

When divergent phenotypes are reported in animal models of tauopathy, the particular isoform expressed is not typically considered as a reason for the discrepancy. Here we highlight this by systematically assessing isoform-specific phenotypes in *Drosophila* and demonstrate that distinct tau isoforms can have significantly different effects in identical assays. This may shed light on the role of isoform-specific differences in the divergent pathogenic profiles of tauopathies where one of these isoforms predominates.

2. Materials and methods

2.1. Flies

Female *Drosophila melanogaster* expressing either the motor neuron-specific driver D42-GAL4, pan-neuronal driver Elav^{C155}-GAL4 and Elav^{C155}-GAL4/TubGAL80^{ts} (Bloomington Stock Centre), sensory neuron driver panR7-GAL4 or retinal photoreceptor driver GMR-GAL4 were crossed with male flies transgenic for UAS-human 0N3R tau (UAS-hTau^{0N3R}), or UAS-human 0N4R tau (two 4R transgenic lines were used and they are referred to as hTau^{0N4R} and hTau^{0N4R*}; they are distinct transgene insertions presenting similar expression levels – see Suppl. Fig. 1), or with wild-type Oregon-R male flies (WT). All transgenic lines and drivers were obtained from the Bloomington Stock centre (USA), except the UAS-htau^{0N4R} and UAS-htau^{0N4R*} lines, which were originally generated by Prof. Mel Feany (Brigham and Women's Hospital, Boston, USA).

2.2. Larval locomotion analysis

As previously described (Sinadinos et al., 2012), wandering third instar larvae were allowed to crawl freely in a 10 cm × 10 cm plate, filled to a depth of approximately 4 mm with dark blue agarose (1% agarose, 0.1% alcian blue), within a bioassay room kept at 21 °C, 30–40% humidity, and controlled lighting conditions. After a 6-minute acclimatisation period, larvae were placed at the centre of the plate, and were filmed for 2 min using an Ikegami digital video camera and 5 mm camera lens (Tracksys, UK). 4 such plates were filmed simultaneously. Ethovision movement analysis software (Noldus Information Technology) was then used to measure the following parameters of locomotion: velocity (mm/s); meander, measured as the angle deviated from the straight path per cm travelled (degrees/cm); and angular velocity (degrees/s). Further, the frequency of contractions of the body-wall muscles (contractions/min) was measured semi-manually from these video recordings, with the experimenter blinded to condition. GraphPad Prism was used to calculate standard error of the mean, unpaired 2-tailed students *t*-test, and/or 1-way ANOVA on the resulting data, as appropriate.

2.3. Adult climbing assay

This assay was performed on cohorts of 15 adult flies, which had been allowed to mate for 1–2 days after eclosion and then separated

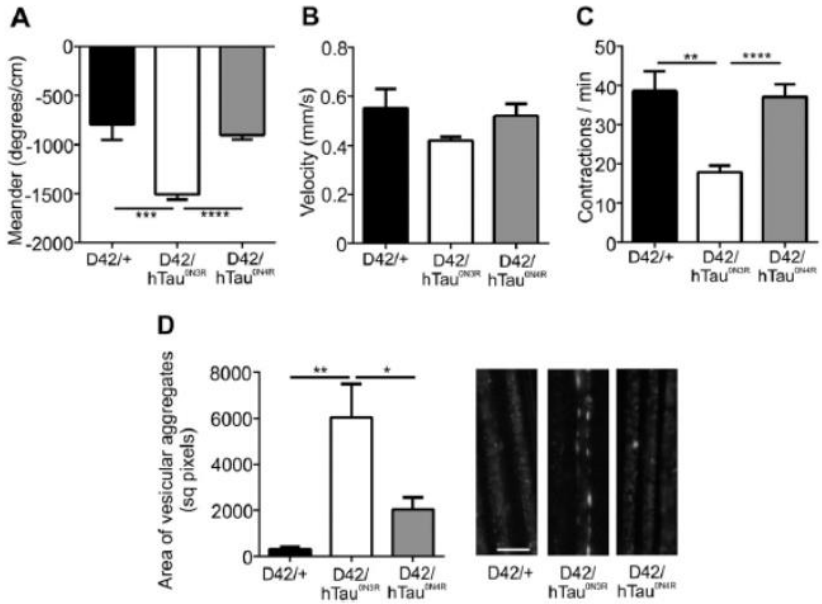


Fig. 1. *Drosophila* expressing hTau^{0N3R} but not hTau^{0N4R} in motor neurons display a motor phenotype, and impaired fast axonal transport. Locomotor performance in a free-crawling test is significantly impaired in hTau^{0N3R} -expressing larvae compared to controls in terms of meander (A), and frequency of body-wall contractions (C). In contrast locomotion of hTau^{0N4R}-expressing larvae is not different from driver controls. A similar trend is seen for velocity of movement (B) but the differences between genotypes are not significant. (D) In larval motor neurons, vesicular aggregates (indicative of axonal transport defect) were found in hTau^{0N3R}-expressing larvae but not in controls or hTau^{0N4R}-expressing larvae. Very few aggregates were found in hTau^{0N4R}-expressing larvae compared to hTau^{0N3R}-expressing larvae. Scale bar = 10 μm. For meander: WT vs hTau^{0N3R} $p = 0.0009$; hTau^{0N3R} vs hTau^{0N4R} $p = 0.0001$; WT vs hTau^{0N4R} $p = 0.4801$. For velocity: WT vs hTau^{0N3R} $p = 0.1508$ (ns); hTau^{0N3R} vs hTau^{0N4R} $p = 0.0928$ (ns); WT vs hTau^{0N4R} $p = 0.7304$ (ns). For body wall contractions: WT vs hTau^{0N3R} $p = 0.0013$; hTau^{0N3R} vs hTau^{0N4R} $p = 0.0001$; WT vs hTau^{0N4R} $p = 0.803$ (ns) (Unpaired two-tailed *t*-tests; $n = 9$–10 per assay). For axonal transport: WT vs hTau^{0N3R} $p = 0.0041$; hTau^{0N3R} vs hTau^{0N4R} $p = 0.0306$; WT vs hTau^{0N4R} $p = 0.0116$ (Unpaired two-tailed *t*-tests or one-way Anova Bonferroni's multiple comparisons test $n = 5$). hTau^{0N3R} = {w / +; D42-GAL4 / +; UAShtau0N3R / +}. hTau^{0N4R} = {w / +; D42-GAL4 / +; UAShTau0N4R / + – parental line hTau^{0N4R}}. WT = {w / +; D42-GAL4 / +; + / +} on an OreR background.

by sex and housed in their testing cohorts. Each week, 6–9 h into the 12-hour light cycle of the flies, they were anaesthetised very briefly (<5 s) with CO_2 and placed in a measuring cylinder in an assay room with controlled lighting conditions, temperature (23 °C) and humidity (30–40%). They were given 15 min to recover from anaesthesia and to acclimatise to the assay room. The measuring cylinder was tapped 3 times upon a mouse pad to send the flies to the bottom, a video recording was carried out and paused 10s later when the analysis was conducted. Flies rested for 2 min, and the procedure was repeated 2 more times. Flies were then placed onto fresh food until the following week.

2.4. Survival assay

Three cohorts of 10 male flies of each genotype were separated 0–3 days post-eclosion and then transferred to new food twice a week and scored for deaths three times a week. Flies were housed in a room with controlled lighting conditions, temperature (23 °C) and humidity (30–40%). A Kaplan-Meier survival curve was plotted and a Log-rank (Mantel-Cox) test was performed on the data using GraphPad Prism software.

2.5. Adult learning and memory assay

To obtain animals for learning and memory assays UAS-hTau^{0N3R} and UAS-hTau^{0N4R} males were crossed *en masse* with Elav^{c155}GAL4; +;TubGAL80^{ts} at 18 °C. Upon eclosion they were collected in fresh bottles and tau expression was induced by placing the adult flies at 30 °C for 12 days with bottle changes every 3 days. On the 11th day the flies were separated in groups of 50–70 animals in vials and placed back at 30 °C overnight. All animals were placed in fresh food vials 1–2 h before conditioning. Conditioning assays were performed under dim red light at 24 °C–25 °C and 65%–75% humidity. All experiments were carried out in a balanced manner, where all genotypes involved in an experiment were tested per day. Classical learning refers to Pavlovian olfactory aversive conditioning and was performed using the aversive odors benzaldehyde (BNZ) and 3-octanol (OCT) diluted in oil (6% *v*/v for BNZ and 50% *v*/v for OCT) as conditioned stimuli (CS+ and CS−) with the electric shock unconditioned stimulus (US). For training, a group of 50–70 flies was first exposed to the CS+ odor for 40 s paired with 90 V shock (consisting of twelve 1.25 s pulses with 4.5 s inter-pulse intervals, therefore 8 US/CS pairings were delivered within 40 s of odor presentation) and then 30 s of air. Subsequently, flies were exposed to the CS− for 40 s without shock and then 30 s of air. Each experimental trial included two reciprocal groups, with the CS+ and CS− odors switched. Three minutes after conditioning, both groups of flies were tested simultaneously for preferential avoidance of the conditioned odorant.

For 24-hour memory experiments, flies were submitted to 12 US/CS pairings per round and five such rounds of training with a 15-minute inter-round interval. The flies were stored at 18 °C for 24 h and then transferred to a T-maze apparatus and allowed to choose between the two odors for 90 s. A performance index (PI) was calculated as the fraction of flies that avoided the CS+ minus the fraction that avoided the CS− odors divided by the total number of flies in the experiment. A final PI is the average of the scores from the two groups of flies trained with either benzaldehyde or 3-octanol as CS+ and ranges from 0 to 100.

2.6. Tau solubility assay to enrich for oligomeric tau species

This assay enriches for insoluble oligomeric tau species as described (Cowan et al., 2015). A total of 10 fly heads were homogenized in 40 μl of TBS/sucrose buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 175 mM NaCl, 1 M sucrose, 5 mM EDTA and protease inhibitor cocktail). The samples were then spun for 2 min at 1000 g and the pellet discarded. The supernatant was spun at 186,000 g for 2 h at 4 °C. The resulting supernatant was "S1" – the aqueous soluble fraction. The pellet was re-suspended at room temperature in 5% SDS/TBS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 175 mM NaCl, 5% SDS) and spun at 186,000 g for 2 h at 25 °C. The resulting supernatant was "S2" – the SDS-soluble, aqueous-insoluble fraction. The pellet was resuspended at room temperature in 5% SDS/TBS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 175 mM NaCl, 5% SDS and protease inhibitor cocktail) and spun at 186,000 g for 2 h at 25 °C as a wash spin; following which the supernatant was discarded. This pellet was then re-suspended in 8 M urea, 8% SDS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 175 mM NaCl, 8% SDS, 8 M urea and protease inhibitor cocktail) and agitated for 12–18 h at room temperature ("S3"). All samples were diluted in 2× Laemmli buffer and boiled for 5 min. "S1" and "S2" were loaded equally (equivalent volumes) whereas double the amount of "S3" was loaded compared to "S1" and "S2". The S3 fraction was then quantified as a proportion of the sum total of all three fractions.

2.7. Protein oxidation assay (OxyBlot)

For each condition, 5 heads of 1 day-old flies were homogenized in 30 μl OxyBlot buffer (150 mM NaCl, 50 mM MES, 1% triton-X 100, 1% SDS, 2% β-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail). Homogenates were centrifuged for 5 min at 5000g, and the pellets discarded. 10 μl homogenate was used for a carbonyl derivatisation reaction with the OxyBlot kit (Millipore), according to the manufacturer's instructions. Briefly, we added 10 μl 12% SDS, 20 μl DNPH (or negative control

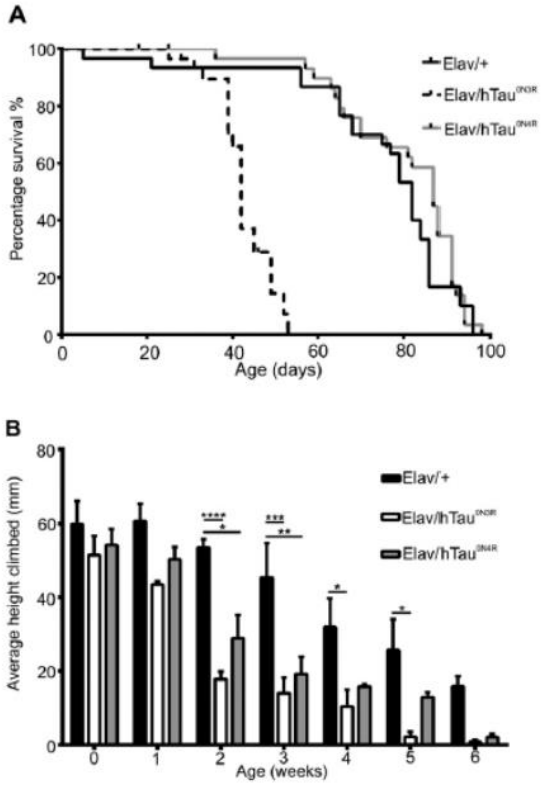


Fig. 2. Differential Tau isoform toxicity in adult *Drosophila*. (A) Survival curves for Elav-GAL4 driven hTau^{0N3R}, hTau^{0N4R} and WT male flies ($n = 30$). HTau^{0N3R} flies have significantly shorter lifespan compared with both htau^{0N4R} and WT flies (Log-rank, Mantel-Cox test $p = 0.0001$). B) Comparison of the climbing ability with age over 6 weeks for hTau^{0N3R}, hTau^{0N4R} and WT flies ($n = 30$). (2-way ANOVA; $p = 0.0002$). Error bars are plotted as ±S.E.M. hTau^{0N3R} = {w / +; Elav-GAL4 / +; UAShtau0N3R / +}. hTau^{0N4R} = {w / +; Elav-GAL4 / +; UAShTau^{0N4R} / + — parental line hTau^{0N4R}}. WT = {w / +; Elav-GAL4 / +; + / +} on an OreR background.

provided) and incubated 15 min at room temperature; then added 14 μl of neutralizing solution. 10 μl of this final labelled product was applied to nitrocellulose membrane (Amersham) using a slot blot apparatus (BioRad). Membranes were probed with anti-DNP antibody (Millipore, 1:150), and signal was detected using fluorescently conjugated anti-rabbit secondary antibody (LICOR) and a LiCor scanner with Odyssey software. Resulting band densities were measured using Image J software.

2.8. Western blotting

Western blotting was performed to assess total tau levels, phosphorylation and solubility state of tau. For Western blot analysis of larval samples, 10 3rd instar larvae or heads of 1-3d adult flies were pooled and homogenized in 200 μl 1× Laemmli buffer, boiled at 95 °C for 5 min and centrifuged for 5 min at 14000 RPM, at RT. Proteins were separated by SDS-PAGE according to standard methods, and transferred to PVDF membrane by semi-dry transfer Anti-Syntaxin (Developmental Hybridoma Bank) at 1:3000 was used as loading control. Primary antibodies were used as follows: anti-human tau (Dako, 1:15,000 or T46, 1:3000). The phosphorylation-specific anti-tau antibodies Ser396/Ser404 (PHF-1) (a gift from Peter Davies, USA, 1:500), Ser396 (Source Biosciences, 1:2000), Ser202/Thr205 (AT8) (Thermo Scientific, 1:1000), Thr212/Ser214 (AT100) (Pierce Endogen, 1:1000), dephosphorylated at Ser199/Ser202/Thr205 (Tau-1) (Millipore, 1:2000), pS262 (Invitrogen, 1:1000). MC1 (a gift from Peter Davies, USA), was used at 1:200. Secondary antibodies were at 1:5000 and the signal detected by chemiluminescence (ECL plus).

2.9. Axonal transport studies

Wandering third instar (L3) larvae (day 5) were anaesthetised by placing larvae in a chamber containing cotton wool soaked in diethylether vapour for 15 min. Larvae were immobilised on glass slides in 1% agarose ventral face up and mounted under coverslips. Peripheral nerves were analysed between the 2nd and 4th denticle bands. For total area acquisition, vGFP accumulates were imaged at ×63 on an Axioplan2 Epifluorescence Microscope (Zeiss) and thresholded in Metamorph software (Molecular Devices, CA, USA). $n = 5$ for each genotype.

2.10. Immuno-histochemistry

Anaesthetized Flies were decapitated and the brains dissected in PBS. Brains were fixed for 20 min with 4% formaldehyde in PBS with 0.4% Triton-X100, 10 mM EGTA and 50 mM $MgCl_2$ added. Brains were washed five times and incubated for 1 h with 10% Newborn Calfserum in PBS-T (PBS with 0.4% Triton-X100). Primary antibodies (anti-RFP, mouse, 1:100, abcam; anti-Tau, 1:2000, DAKO; anti-chaoptin, 1:50, DSHB, Iowa) were incubated at 4 °C. Washing consisted of five repetitions of 3 rinses and 20 min incubation with PBS-T. Secondary antibodies coupled to Alexa 488 or 568 (1:500 in PBS-T) were incubated overnight at 4 °C. After the final wash brains were embedded in Vectashield/70% Glycerol (3:1). For every genotype five brains were recorded using a Zeiss 710 confocal microscope using. Controls were imaged first and experimental brains were imaged with the same settings. Images were assembled using Photoshop.

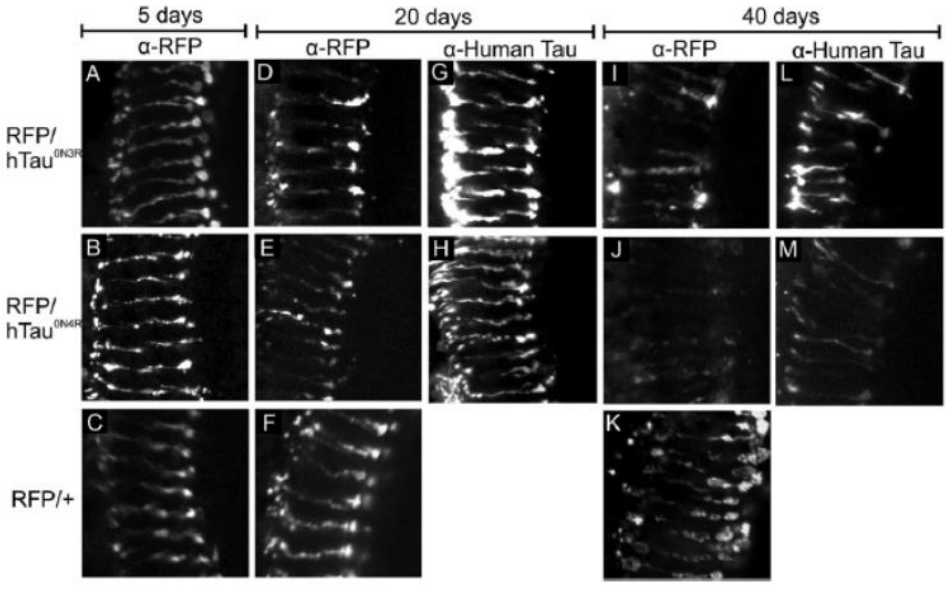


Fig. 3. The expression of 4 repeat human Tau disrupts R7 sensory neurons more severely than 3 repeat human Tau. R7 sensory neurons in the *Drosophila* visual system express the membrane marker myristolated-red fluorescent protein (myr-RFP) together with $hTau^{0N3R}$ (upper row), $hTau^{0N4R}$ (middle row) or on its own (RFP, bottom row). Adult brains were dissected 5 days (first column), 20 days (second and third column) or 40 days (fourth and fifth column) after eclosion. Brains were stained with antibodies against RFP or human tau (indicated at the top of each column). Images show axons in the medulla. Scale Bar = 10 μm. (A–C) In 5 day-old brains, RFP expression in R7 axons is not affected by the expression of either tau isoform. (D–F) In 20 day-old brains expression of $hTau^{0N3R}$ (D) and $hTau^{0N4R}$ (E) results in a weaker membrane RFP signal than in controls (F) but axons are still intact. (G, H) Expression of $hTau^{0N3R}$ (G) is stronger than $hTau^{0N4R}$ (H) and $hTau^{0N3R}$ shows a tendency to form aggregates at synapses. (I–K) In 40 day-old brains expressing either isoform (I, J) membrane RFP is severely reduced (compare I, J with K). In particular, $hTau^{0N4R}$ expression results in loss of RFP expression in broad areas in the medulla. (L, M) $hTau^{0N3R}$ (L) aggregates along the axons and at synapses and is still expressed stronger than $hTau^{0N4R}$ (M). $hTau^{0N3R}$ = {w / +; panR7-GAL4 / +; UAShtau^{0N3R} / +}. $hTau^{0N4R}$ = {w / +; panR7-GAL4; UAShTau^{0N4R} / + − parental line $hTau^{0N4R}$}. WT = {w / +; panR7-GAL4; + / +} on an OreR background.

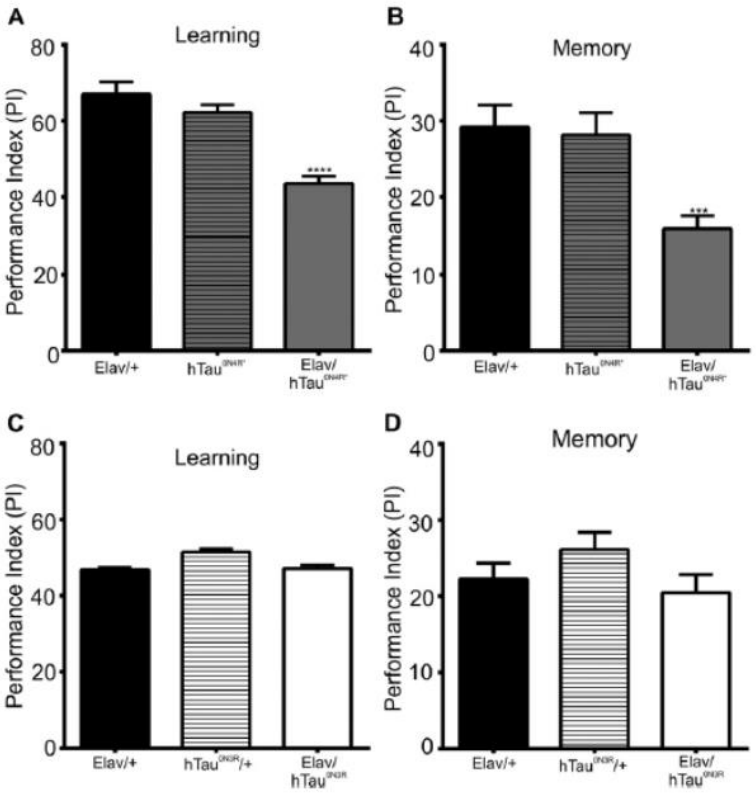


Fig. 4. The expression of 4 repeat human Tau impairs learning and memory but expression of 3R tau does not. Learning and associative memory was probed in transgenic lines in which adult specific expression of $hTau^{0N3R}$, $hTau^{0N4R}$ was driven by Elav-GAL4 / TubGAL80^{ts}. The transgenes were induced progeny of these crosses raised at 18 °C by transferring to 30 °C for 12 days prior to testing. Expression of $hTau^{0N4R}$ caused severe impairment in learning ($p < 0.001$, Dunnett's test, $n > 12$ per genotype) (A), and memory ($p < 0.001$, Dunnett's test, $n > 16$)(B), but expression of $hTau^{0N3R}$ did not affect either learning ($p = 0.4585$, Dunnett's test, $n > 12$)(C), or LTM ($p = 0.142$, Dunnett's test, $n > 14$ (D). $hTau^{0N3R}$ = {w / +; Elav-GAL4 / TubGAL80^{ts} / +; UAShtau^{0N3R} / +}. $hTau^{0N4R}$ = {w / +; GAL4 / TubGAL80^{ts} / +; UAShTau^{0N4R*} / + — parental line $hTau^{0N4R*}$).

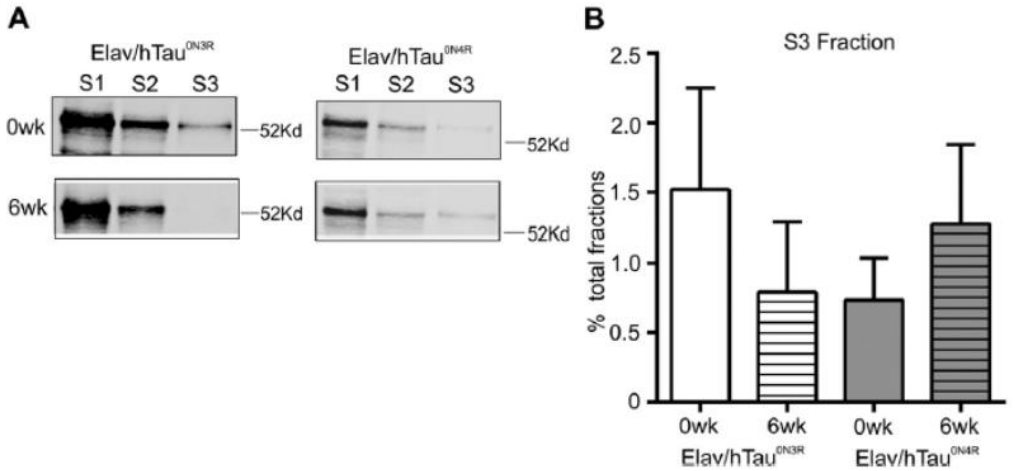


Fig. 5. No differences between 3R and 4R transgenics in the amount of insoluble tau oligomers formed with age. (A) Representative Western blots of soluble (S1), SDS-soluble (S2) and SDS-insoluble (S3) fractions generated from adult heads following Elav-GAL4 driven $hTau^{0N3R}$ and $hTau^{0N4R}$ expression in newly eclosed young (0 weeks) and old (6 weeks) flies. Some insoluble tau oligomeric species are detected in both young and old flies. B) However quantification of S3 fraction relative to sum total of all fractions shows there is no significant difference in the amount of insoluble tau between $hTau^{0N3R}$ and $hTau^{0N4R}$ expressing flies or with age in either line ($n = 4$). Unpaired, two-tailed t-tests used to test for significance. Error bars are plotted ± S.E.M. $hTau^{0N3R}$ = {w / +; Elav-GAL4 / +; UAShTau^{0N3R} / +}. $hTau^{0N4R}$ = {w / +; Elav-GAL4 / +; UAShTau^{0N4R} / + — parental line $hTau^{0N4R}$}. WT = {w / +; Elav-GAL4 / +; + / +} on an OreR background.

3. Results

3.1. Human 3-repeat tau and human 4-repeat tau expression present different phenotypes

To test whether the 0N3R and 0N4R isoforms yield identical, similar or distinct effects on larval mobility (Sinadinos et al., 2012), the UAS-hTau^{0N3R} and UAS hTau^{0N4R} transgenes were expressed in motor neurons under D42-GAL4. Using a semi-automated method to track larval locomotion (Sinadinos et al., 2012), we confirmed our previous observations that expression of hTau^{0N3R} in larval motor neurons manifests in locomotor defects. Significant impairments were evident in two larval locomotor parameters: meander and contractions (Fig. 1A–C), which arise from impaired axonal transport (Fig. 1D). In contrast, expression of hTau^{0N4R} did not result in significant locomotor deficits, or cause axonal transport impairments as profound as those induced by hTau^{0N3R} (Fig. 1A–D).

Isoform-specific phenotypes were also revealed in adult animals upon transgene expression with Elav-GAL4. Premature lethality was apparent in hTau^{0N3R}-expressing adult flies earlier than hTau^{0N4R}-expressing animals (Fig. 2A). In addition, isoform-specific differential effects were revealed on a negative geotaxis locomotor assay (Mudher et al., 2004) in adult flies expressing pan-neuronally the two tau isoforms. The climbing ability of flies expressing hTau^{0N3R} starts to decline at 1 week and diminishes rapidly as animals progress to week 5 and 6, when the majority of the flies are virtually immobile (Fig. 2B). By comparison, the climbing ability of flies expressing hTau^{0N4R} begins to deteriorate significantly one week later (week 2) and even at week 5, many of the flies remain mobile (Fig. 2B). Similar results were observed with an independent UAS-0N4R transgene insertion (Suppl. Fig. 2), supporting the idea that this difference between the tau isoforms is of biological significance and not because of differential expression levels due to transgene insertion. Therefore, expression of 0N3R tau appears to precipitate more severe effects than 0N4R expression in the same neurons.

Collectively the results indicate differential effects of the two tau isoforms on survival and larval and adult locomotion. Therefore, we wondered whether such differential isoform-specific effects may be revealed in additional neuronal subpopulations.

We selected a subset of eye sensory neurons to assay the effects of these isoforms since the fly retina has been used extensively to study tau-dependent neurodegeneration. Each tau isoform was co-expressed with membrane-tagged RFP (myristolated-RFP) in R7 sensory receptor neurons (pan-R7-GAL4). Degeneration was not apparent at 5 days post-eclosion evidenced by anti-RFP staining of axons following expression of either isoform (Fig. 3A–C). By day 20 however, degeneration was apparent in the sensory neurons expressing either of the isoforms, but with those expressing hTau^{0N4R} (Fig. 3E, H) presenting more extensive aberrations than those expressing hTau^{0N3R} (Fig. 3D, G). By 40 days post-eclosion, the sensory neurons expressing htau^{0N4R} had largely degenerated with only few axons remaining (Fig. 3J, M). In contrast, more axons remained in animals expressing hTau^{0N3R} at this time time-point (Fig. 3I, L). This data indicates that when expressed in the adult visual sensory neurons, hTau^{0N4R} exhibits a stronger neurodegenerative phenotype than hTau^{0N3R}. Interestingly, in 40 day-old hTau^{0N4R} brains myr-RFP expression is nearly absent (Fig. 3J), but accumulation of tau along the axons persists (Fig. 3M), indicating loss of membrane integrity leaving 'ghost' axonal scaffolds behind. We confirmed the loss of membrane integrity by expressing the tau isoforms in all photoreceptors (under GMR-GAL4) and using antibodies against the membrane glycoprotein Chaoptin (Hirai-Fujita et al., 2008). In 40 day-old hTau^{0N4R} expressing optic lobes, Chaoptin is completely absent, whereas although severely reduced in hTau^{0N3R} expressing neurons, it is still detectable (Suppl. Fig. 3). Therefore, the results from both myr-RFP and Chaoptin membrane markers confirm that although tau expression disrupts membrane integrity, the severity is isoform-specific with hTau^{0N4R} precipitating a stronger neurodegenerative phenotype than hTau^{0N3R}.

To further explore whether such isoform-dependent differences persisted in other adult assays, we undertook conditional pan neuronal expression of both isoforms in the adult CNS because hTau^{0N4R} expression has been reported to yield learning deficits in this assay (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). Hence we investigated whether adult specific expression of 0N3R might also precipitate such deficits in learning and 24 h memory (long term memory-LTM). Surprisingly, while 0N4R expression impaired associative learning (Fig. 4A) in agreement with prior results (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015; Kosmidis et al., 2010) and LTM was similarly significantly impaired (Fig. 4B), expression of hTau^{0N3R} did not affect either of these processes (Fig. 4C, D).

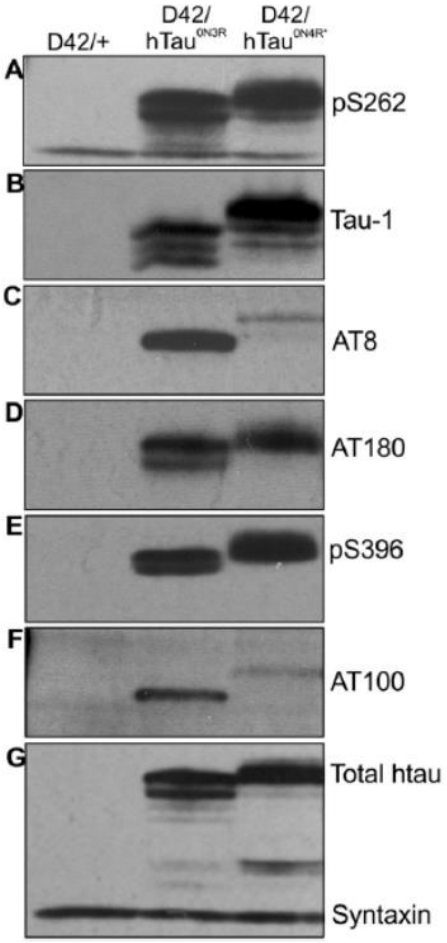


Fig. 6. Qualitative assessment of phosphorylation state in hTau^{0N3R} and hTau^{0N4R} larvae. Tau expression was driven using the D42-GAL4 motor neuron specific driver. Tau phosphorylation was assessed in wandering third instar larvae. Representative blots are shown for at least two independent experiments. Both isoforms of tau were phosphorylated to similar extents at the pS262 site (A), AT180 site (D) and pS396 site (E). However hTau^{0N4R*} was less phosphorylated at the AT8/Tau-1 site (B and C) and AT100 site (F). Expression of both isoforms of tau is comparable (G). hTau^{0N3R} = {w / +; D42-GAL4 / +; UAShTau^{0N3R} / +}. hTau^{0N4R} = {w / +; D42-GAL4 / +; UAShTau^{0N4R*} / + — parental line hTau^{0N4R*}}. WT = {w / +; D42-GAL4 / +; + / +} on an OreR background.

Collectively then, our data demonstrate that distinct larval and adult neuronal populations are differentially sensitive to the neuro-toxic effects of 0N3R and 0N4R tau isoforms, precipitating phenotypic strength differences, or lack of discernable phenotypes. This in turn strongly suggests that the effects of tau expression in *Drosophila* are not merely a consequence of non-specific toxicity or dysfunction due to overexpression of an exogenous protein. Rather it is likely that human tau isoforms interact differentially with the same or different intra-neuronal clients as suggested by the specificity and range of phenotypes described above.

3.2. Isoforms engage different mechanisms of toxicity

Differences in phenotypic strength can be precipitated by expression level differences. However this is unlikely to be key for the differences we report since the expression of the two tau isoforms is comparable in the transgenic lines we have employed (Suppl. Fig. 1). To investigate whether the two tau isoforms act differently at the cellular/molecular level, we assessed their accumulation, solubility, phosphorylation status and oxidative stress potential because these are other properties implicated in mechanisms of tau toxicity (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015).

We have previously reported that increased tau levels lead to aggregation (Cowan et al., 2015) and accordingly we have found elevated accumulation of tau with increasing age in both 0N3R and 0N4R adults (data not shown). We therefore explored whether the age-dependent accumulation of tau led to its aggregation. Using a commonly used biochemical insolubility assay that enriches for insoluble oligomeric tau species (Cowan et al., 2015), we found little evidence of significant levels of insoluble tau oligomers in the brains of adult flies expressing 0N3R or 0N4R pan-neuronally, even in older flies (Fig. 5A). Though insoluble oligomeric tau species were not abundant, substantial isoform-specific aggregate profiles were not revealed upon fractionation of brain extracts expressing 0N3R or 0N4R (Fig. 5B). We did not investigate whether larger insoluble tau aggregates, such as tau filaments are found in these transgenics, because they have been described in some (Wu et al., 2013), but not all *Drosophila* tauopathy models (Wittmann et al., 2001).

Of the six isoforms, 0N3R is most highly phosphorylated (Smith et al., 1995), but whether the other tau isoforms undergo differential post-translational modifications has been unclear. Therefore we sought to determine whether the two isoforms were phosphorylated differentially in larval motor neurons implicated in the isoform-specific locomotor behaviours and in adult brains to potentially mirror the isoform-specific learning, memory and longevity differences. Hence, we expressed 0N3R or 0N4R specifically in larval motor neurons or adult brains and then probed the occupation status of a set of phosphorylation sites implicated in tauopathies.

Though phosphorylation at many sites was similar in larval motor neurons, there were some interesting isoform-specific differences. Phosphorylation at Ser 262 (Fig. 6A), Thr 231 (AT180 - Fig. 6D), and Ser 396 (Fig. 6E) did not appear significantly different between isoforms in larvae. However, the signal with the AT100 antibody appeared elevated in hTau^{0N3R}-expressing larvae (Fig. 6F). Phosphorylation at the AT8 site was also elevated in hTau^{0N3R}-expressing larvae, while in hTau^{0N4R}-expressing animals AT8 phosphorylation was suppressed as revealed by the Tau-1 antibody which is reactive to non-phosphorylated epitopes at the AT8 site (Fig. 6 B and C).

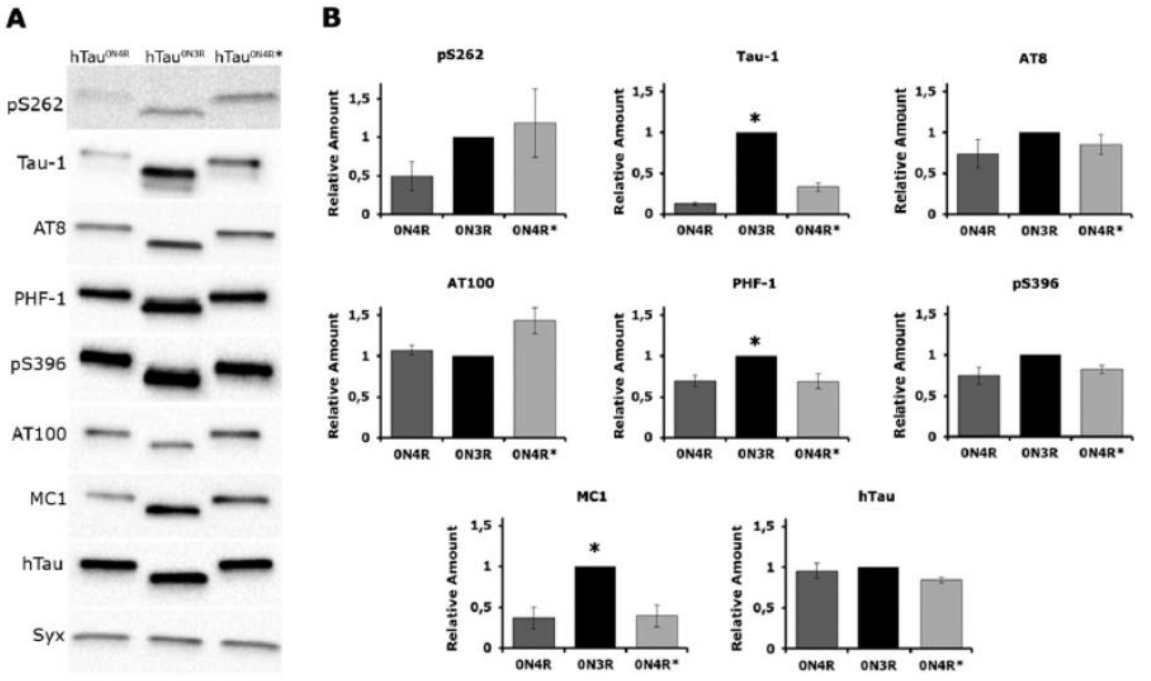


Fig. 7. Quantitative assessment of the phosphorylation state of hTau^{0N3R} and hTau^{0N4R} in adult brains. Tau expression was driven using the ELAV-GAL4 pan-neuronal driver. Tau phosphorylation was assessed in 1–3 day adult brains to compare 0N3R tau with two independent p-element insertion lines expressing 0N4R tau (referred to as hTau^{0N4R} and hTau^{0N4R*}). Representative blots are shown for at least three independent experiments (A) and their quantification is shown in (B). Both isoforms of tau were phosphorylated to similar extents at most sites except for the Tau-1 and PHF-1 sites which showed greater immunoreactivity in 0N3R tau brains. MC1 immunoreactivity, indicative of misfolded tau, was greater in 0N3R tau. Expression of total tau levels was comparable between all three lines. hTau^{0N3R} = {w/+; ELAV-GAL4/+; UAShtau0N3R/+}. hTau^{0N4R} = {w/+; ELAV-GAL4/+; UAShTau^{0N4R}/+ — parental line hTau^{0N4R}} and hTau^{0N4R*} = {w/+; ELAV-GAL4/+; UAShTau^{0N4R*}/+ — parental line hTau^{0N4R*}}. WT = {w/+; ELAV-GAL4/+; +/+} on an OreR background.

As with the larval motor neurons, the 0N3R and 0N4R isoforms were similarly phosphorylated at most epitopes in adult brain, but there were some interesting differences suggesting that developmental stage influences tau phosphorylation in an isoform-specific manner. These differences were genuine because they were evident even when the independent 0N4R p-element insertion line hTau^{0N4R*} was used (Fig. 7). In larval motor neurons, 0N3R tau is more phosphorylated than 0N4R tau at the AT8 site (as evidenced by increased AT8 and decreased Tau-1 immunoreactivity in 0N3R motor neurons) whereas in adult brain, 0N4R tau is more phosphorylated than 0N3R tau at these sites (as indicated by greater Tau-1 immunoreactivity in 0N3R brains) (Figs. 6 and 7). Similarly the greater phosphorylation of 0N3R tau at the AT100 site in larval motor neurons is not evident in adult brain (Figs 6 and 7). Instead, 0N3R tau is more phosphorylated at the Ser 396/404 (detected by PHF-1 with an increased trend seen with an antibody that only picks up phosphorylation at Ser 396) than 0N4R tau in adult brains but not in larval motor neurons (Figs 6 and 7). Significantly, the 0N3R isoform is much more immunoreactive with the MC1 antibody than the 0N4R proteins, suggesting differences in folding or pathology-related structure between the two isoforms.

In summary the data implies that 0N3R and 0N4R isoforms are differentially phosphorylated at some but not all sites in different developmental stages. Whether these site-specific phosphorylation differences underpin the differential phenotypes precipitated by the two isoforms is yet to be determined, but is consistent with the data. Moreover, because the phosphorylation profiles of these tau isoforms on tauopathy associated sites are not identical, the data support the notion of isoform-specific interactions with kinases and phosphatases.

Aside from phosphorylation and aggregation, oxidative stress is another mechanism by which tau mediates toxicity (Dias-Santagata et al., 2007; Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015). We therefore examined oxidative stress using a commercial assay to detect oxidised proteins in brain homogenates from flies expressing either tau isoform pan-neuronally. Though there was clear evidence of oxidative stress in brains from both transgenic lines, surprisingly, oxidation detected in hTau^{0N4R}-expressing flies was twice as much as of that detected in hTau^{0N3R}-expressing animals (Fig. 8). This again demonstrates a clear isoform-specific difference, which may underpin some of the isoform-specific differences in toxicity and neuronal dysfunction described here by us and by others in various tauopathy models.

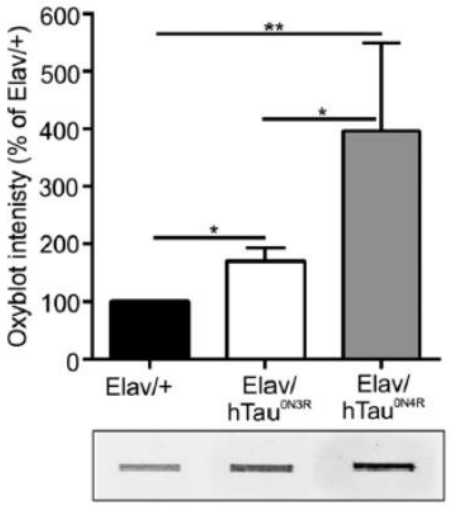


Fig. 8. Comparison of the protein oxidation induced by expression of hTau^{0N4R} versus hTau^{0N3R}-expressing *Drosophila*. Elav-GAL4 driven pan-neural expression of either hTau^{0N4R} or hTau^{0N3R} induces oxidative stress in 1d old adult flies as measured by a commercial Oxyblot assay. However levels of protein oxidation are significantly greater in hTau^{0N4R} versus hTau^{0N3R} flies. Graph represents the average of 9 experiments. Results from unpaired *t*-tests: wild-type vs hTau^{0N3R} $p = 0.0145$; hTau^{0N3R} vs hTau^{0N4R} $p = 0.04$; wild-type vs hTau^{0N4R} ($p = 0.008$). hTau^{0N3R} = {w / +; Elav-GAL4 / +; UAShTau^{0N3R} / +}. hTau^{0N4R} = {w / +; Elav-GAL4 / +; UAShTau^{0N4R} / + — parental line hTau^{0N4R}}. WT = {w / +; Elav-GAL4 / +; + / +} on an OreR background.

4. Discussion

We report here isoform-specific phenotypes in both larval and adult *Drosophila* expressing either hTau^{0N3R} or hTau^{0N4R} transgenes. Although expression level differences may contribute to the phenotypic consequences, isoform-specific differences independent of this were uncovered in this study. These results are in agreement with independent studies, which have also demonstrated isoform-specific differences in physiological tau biology, including sub-cellular localisation and function, and disease-relevant biochemical properties (Liu and Gotz, 2013; Liu et al., 2016).

Differences in the best-described cellular function of tau, microtubule binding, have long been known, and believed to arise because the 4R isoforms possess an extra microtubule-binding domain enabling three-fold greater microtubule affinity (Goode et al., 2000). However, the flanking carboxy-terminal region also differentially regulates microtubule-binding, and curiously appears to influence binding of 3R isoforms to a greater extent than 4R isoforms (Goode et al., 2000). In addition to microtubule-binding, isoform specific differences have been identified in several other physiological roles attributed to tau. This includes interacting partners, with 2N4R isoforms exhibiting stronger affinity to proteins implicated in neurodegeneration (Liu et al., 2016) and interactions with kinases such as Fyn, which binds preferentially to 3R tau (Bhaskar et al., 2005). Differences in sub-cellular localisation have also been uncovered, wherein 0N isoforms appear preferentially in the soma and axons, 1N isoforms in the dendrites and nucleus and 2N isoforms in cell bodies and axons (Liu and Gotz, 2013). Such results challenge the widely-held view that tau behaves preferentially as an axonal protein engaged mostly in microtubule stabilisation, and jointly with the data herein, promote the idea that tau is a protein of multiple functions which are likely sub-served differentially by distinct isoforms.

Further support for this notion is provided by isoform-specific differences in pathological behaviour including propensity to aggregate (Adams et al., 2010), morphology of aggregates formed (Adams et al., 2010) and templated seeding (Dinkel et al., 2011). Templated seeding of filaments in particular, exhibits striking isoform-specific barriers. While seeds containing 3R isoforms alone or 3R and 4R isoforms together can recruit both 3R and 4R monomers into growing filaments, seeds comprising just of 4R isoforms can only recruit 4R monomers (Dinkel et al., 2011). Since hyper-phosphorylation of tau is believed to promote its aggregation, some studies have explored the impact of pseudo-phosphorylation on aggregation in vitro and identified interesting isoform-specific differences (Combs et al., 2011). Although we have revealed isoform-specific, developmental stage-dependent phosphorylation differences, these do not appear to lead to aggregation differences, at least within the resolution afforded by our techniques, but clearly appear consistent with the distinct phenotypic consequences we detailed. Differences have also been reported in the sub-cellular localisation of the different tau isoforms and how this changes during the evolution of tangle pathology (Hara et al., 2013). Collectively these studies begin to elucidate why different tau isoforms are preferentially affected in different tauopathies and the cellular/molecular basis for predilection of different brain regions therein.

The studies discussed above show clear isoform-specific differences in the biochemical and pathological properties of tau; however not many studies have directly compared and contrasted isoform-specific

phenotypic differences in the same model. Adding to this, we show here that for some tau-mediated phenotypes, like axonal transport disruption and adult locomotion, the 3R tau isoform is more detrimental whereas in other tau-mediated phenotypes, such as learning and memory and photo-receptor degeneration, it is the 4R tau which is more toxic. In line with this, we have previously shown that expression of either $hTau^{0N4R}$ or $hTau^{2N4R}$ but not $hTau^{0N3R}$ eliminates *Drosophila* mushroom bodies (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015; Grammenoudi et al., 2008; Papanikolopoulou et al., 2010), and that expression of $hTau^{0N3R}$ is associated with dysfunction in the absence of neuronal death (Mudher et al., 2004; Cowan et al., 2010). Likewise, many other *Drosophila* models of tauopathy report degeneration, mainly of photoreceptors or other brain regions, but most studies invariably express 4R isoforms (Dourlen et al., 2016; Chanu and Sarkar, 2016). Moreover, to our knowledge, no other studies have directly compared the oxidative potential of 3R and 4R isoforms. We provide evidence that the 0N4R isoform is more potent at inducing oxidative stress than 0N3R. Oxidative stress has been reported in tauopathies implicating either or both 3R and 4R isoforms (reviewed in (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015)). Whether, as our data suggests, it plays a more profound role in diseases involving 4R remains to be determined. In fact, of the few studies that have systematically compared 3R and 4R mediated phenotypes in the same model, work in mice suggests that tipping the balance towards 4R isoforms was associated with greater pathology and behavioural defects (Schoch et al., 2016).

The molecular mechanism(s) underpinning the divergent phenotypes of tau isoforms are unclear at present. Expression level and stability differences are likely contributing factors because tau-toxicity is generally believed to correlate with intraneuronal tau load (Ubhi et al., 2007). This notion is significantly supplemented and enhanced by our own results uncovering phenotypic differences between $hTau^{0N3R}$ and $hTau^{0N4R}$, which persisted even in the face of comparable expression levels. Differences in the epitopes phosphorylated may be another contributing factor since such differences have been associated with differential toxicity (Brelstaff et al., 2015), or reduced microtubule binding (Biernat et al., 1993) which underpins tau-mediated neuronal dysfunction (Cowan et al., 2010; Quraishe et al., 2013).

5. Conclusion

The six tau isoforms are often regarded as the same protein. Indeed many of their normal biological and pathological characteristics are very similar. However, there are distinct differences in isoform functional properties arising from the variable N-terminal domains and 3 or 4 microtubule-binding domains. This manifests in variations in their post-translational regulation and in turn their normal cellular functions. Adding to this, we report here that they are distinctly different in their pathological potential as well. Such isoform-specific differences need to be taken into account when interpreting data from experimental models of tauopathy since they will invariably differ from model to model. It should also inform tau-centric therapeutic approaches. It remains to be investigated how the tau isoforms contribute to differential susceptibility of brain region and mechanism of tau-toxicity in different tauopathies.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.003.

Acknowledgements

We would like to thank and acknowledge the Wessex Medical Trust and Gerald Kerkut Trust. This research has also been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: THALIS –UOA - "Study mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease".

References

Adams, S.J., DeTure, M.A., McBride, M., Dickson, D.W., Petrucelli, L., 2010. Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. PLoS One 5, e10810. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010810.

Alavi Naini, S.M., Soussi-Yanicostas, N., 2015. Tau hyperphosphorylation and oxidative stress, a critical vicious circle in neurodegenerative tauopathies? Oxidative Med. Cell. Longev.: 151979 http://dx.doi.org/10.1155/2015/151979.

Andreadis, A., 2005. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. Biochim. Biophys. Acta 1739:91–103. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.010.

Bhaskar, K., Yen, S.H., Lee, G., 2005. Disease-related modifications in tau affect the interaction between fyn and tau. J. Biol. Chem. 280: 35119–35125. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M505895200.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. Neuron 11, 153–163.

Brelstaff, J., et al., 2015. The fluorescent pentameric oligothiophene pFTAA identifies filamentous tau in live neurons cultured from adult P301S tau mice. Front. Neurosci. 9: 184. http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00184.

Chanu, S.I., Sarkar, S., 2016. Targeted downregulation of dMyc suppresses pathogenesis of human neuronal tauopathies in *Drosophila* by limiting heterochromatin relaxation and tau hyperphosphorylation. Mol. Neurobiol. http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9858-6.

Combs, B., Voss, K., Gamblin, T.C., 2011. Pseudohyperphosphorylation has differential effects on polymerization and function of tau isoforms. Biochemistry 50:9446–9456. http://dx.doi.org/10.1021/bi2010569.

Cowan, C.M., Bossing, T., Page, A., Shepherd, D., Mudher, A., 2010. Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo. Acta Neuropathol. 120:593–604. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-010-0716-8.

Cowan, C.M., et al., 2015. Rescue from tau-induced neuronal dysfunction produces insoluble tau oligomers. Sci. Report. 5:17191. http://dx.doi.org/10.1038/srep17191.

Dias-Santagata, D., Fulga, T.A., Duttaroy, A., Feany, M.B., 2007. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. J. Clin. Invest. 117:236–245. http://dx.doi.org/10.1172/JCI28769.

Dinkel, P.D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., Margittai, M., 2011. Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. Biochemistry 50:4330–4336. http://dx.doi.org/10.1021/bi2004685.

Dourlen, P., et al., 2016. Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of tau pathology. Mol. Psychiatry http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.59.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3, 519–526.

Goode, B.L., Chau, M., Denis, P.E., Feinstein, S.C., 2000. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenetative disease. J. Biol. Chem. 275:38182–38189. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007489200.

Grammenoudi, S., Anezaki, M., Kosmidis, S., Skoulakis, E.M., 2008. Modelling cell and isoform type specificity of tauopathies in *Drosophila*. SEB Exp. Biol. Ser. 60, 39–56.

Hara, M., Hirokawa, K., Kamei, S., Uchihara, T., 2013. Isoform transition from four-repeat to three-repeat tau underlies dendrosomatic and regional progression of neurofibrillary pathology. Acta Neuropathol. 125:565–579. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1097-6.

Hirai-Fujita, Y., Yamamoto-Hino, M., Kanie, O., Goto, S., 2008. N-Glycosylation of the *Drosophila* neural protein Chaoptin is essential for its stability, cell surface transport and adhesive activity. FEBS Lett. 582:2572–2576. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.028.

Huefner, A., Kuan, W.L., Barker, R.A., Mahajan, S., 2013. Intracellular SERS nanoprobes for distinction of different neuronal cell types. Nano Lett. 13:2463–2470. http://dx.doi.org/10.1021/nl400448n.

Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K., Skoulakis, E.M., 2010. Differential effects of tau on the integrity and function of neurons essential for learning in *Drosophila*. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 30:464–477. http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1490-09.2010.

Liu, C., Gotz, J., 2013. Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. PLoS One 8, e84849. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084849.

Liu, C., Song, X., Nisbet, R., Gotz, J., 2016. Co-immunoprecipitation with tau isoform-specific antibodies reveals distinct protein interactions and highlights a putative role for 2N tau in disease. J. Biol. Chem. 291:8173–8188. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.641902.

Medina, M., Hernandez, F., Avila, J., 2016. New features about tau function and dysfunction. Biomolecules 6. http://dx.doi.org/10.3390/biom6020021.

Mudher, A., et al., 2004. GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. Mol. Psychiatry 9:522–530. http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001483.

Niblock, M., Gallo, J.M., 2012. Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. Biochem. Soc. Trans. 40:677–680. http://dx.doi.org/10.1042/BST20120091.

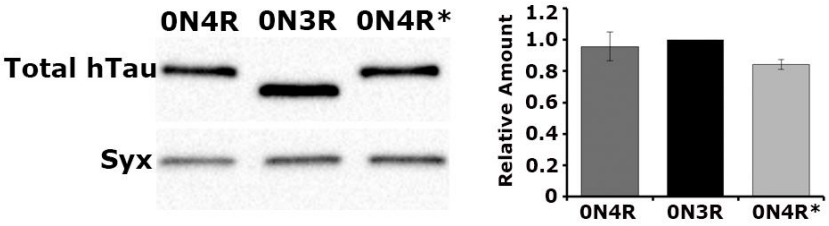
Papanikolopoulou, K., Skoulakis, E.M., 2015. Temporally distinct phosphorylations differentiate tau-dependent learning deficits and premature mortality in *Drosophila*. Hum. Mol. Genet. 24:2065–2077. http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu726.

Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Skoulakis, E.M., 2010. Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. Biochem. Soc. Trans. 38:981–987. http://dx.doi.org/10.1042/BST0380981.

Park, S.A., Ahn, S.I., Gallo, J.M., 2016. Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. BMB Rep.
Quraishe, S., Cowan, C.M., Mudher, A., 2013. NAP (davunetide) rescues neuronal dysfunction in a *Drosophila* model of tauopathy. Mol. Psychiatry 18:834–842. http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.32.
Rabano, A., Cuadros, R., Calero, M., Hernandez, F., Avila, J., 2013. Specific profile of tau isoforms in argyrophylic grain disease. Exp. Neurosci. 7:51–59. http://dx.doi.org/10.4137/JEN.S12202.
Schoch, K.M., et al., 2016. Increased 4R-tau induces pathological changes in a human-tau mouse model. Neuron 90:941–947. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.042.
Sinadinos, C., Cowan, C.M., Wyttenbach, A., Mudher, A., 2012. Increased throughput assays of locomotor dysfunction in *Drosophila* larvae. J. Neurosci. Methods 203:325–334. http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.08.037.
Smith, C.J., Anderton, B.H., Davis, D.R., Gallo, J.M., 1995. Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. FEBS Lett. 375, 243–248.
Spillantini, M.G., Goedert, M., 2013. Tau pathology and neurodegeneration. Lancet Neurol. 12:609–622. http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5.
Ubhi, K.K., Shaibah, H., Newman, T.A., Shepherd, D., Mudher, A., 2007. A comparison of the neuronal dysfunction caused by *Drosophila* tau and human tau in a *Drosophila* model of tauopathies. Invertebr. Neurosci. 7:165–171. http://dx.doi.org/10.1007/s10158-007-0052-4.
Wittmann, C.W., et al., 2001. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. Science 293:711–714. http://dx.doi.org/10.1126/science.1062382.
Wu, T.H., et al., 2013. Loss of vesicular dopamine release precedes tauopathy in degenerative dopaminergic neurons in a *Drosophila* model expressing human tau. Acta Neuropathol. 125:711–725. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1105-x.

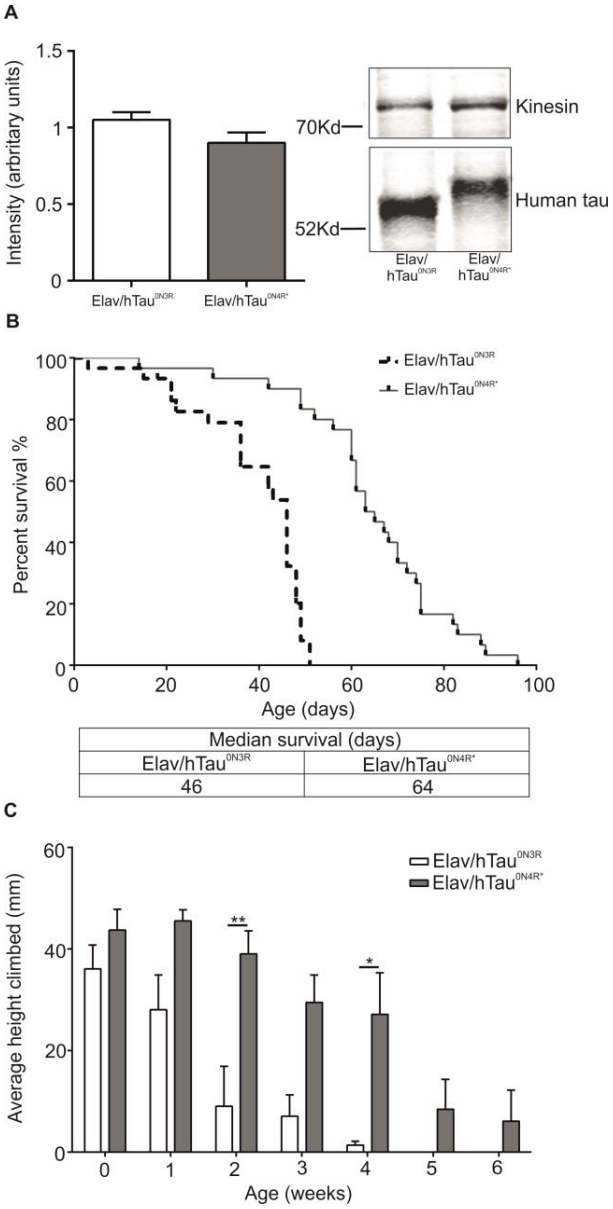
Supplementary data

Supplementary Figure 1



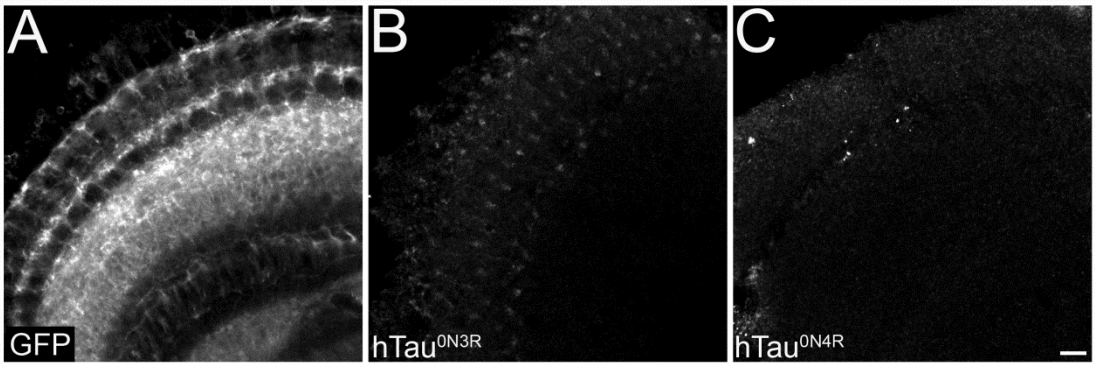
Suppl. Fig. 1. Tau expression is similar in three independent transgenic lines.
Tau expression was probed in 1–3 day-old adult fly heads in which ELAV was used to drive pan-neuronal expression of hTau^{0N3R} and hTau^{0N4R} (from two independent p-element insertion lines that we have called hTau^{0N4R} and hTau^{0N4R*}) to distinguish them. Total tau levels are comparable in the three lines. The hTau^{0N4R} line was used in most studies described in this manuscript with only some experiments conducted with the hTau^{0N4R*} line. The parental line used is always stated in the legend for all figures.

Supplementary Figure 2



Suppl. Fig. 2. hTau^{0N3R} mediates a stronger lifespan reduction and locomotor phenotype even when compared to an independent hTau^{0N4R} p-element insertion line. (A) Equal human tau expression demonstrated by Western blots from adult fly heads taken from Elav-GAL4 driven hTau^{0N3R} and hTau^{0N4R*} expressing flies. (B) The lifespan of hTau^{0N3R} flies is significantly shorter than that of hTau^{0N4R*} expressing flies (Mantel-Cox; $p = 0.0001$, $n = 30$). This data is generated when the flies were reared at 23 °C; at higher temperatures, stronger phenotypes are evident, as previously published for UAS-hTau^{0N4R*} (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). (C) Comparison of climbing ability over 6 weeks of hTau^{0N3R} and hTau^{0N4R} expressing flies shows that hTau^{0N3R} expressing flies exhibit significantly increased deficits in climbing over age compared with hTau^{0N4R*} expressing flies (2-way ANOVA; $p = 0.0001$, $n = 30$). Error bars are plotted as ± S.E.M.

Supplementary Figure 3



Suppl. Fig. 3. Tau expression destroys membrane integrity.
(A) In 6 weeks old brains the membrane glycoprotein chaoptin (24B10 antiserum) labels photoreceptors in the *Drosophila* visual system. (B, C) Chaoptin can barely be detected in $hTau^{0N3R}$ expressing axons (B) and is lost from $hTau^{0N4R}$ expressing sensory axons (C). Note that gain is 1.8 times higher in B, C than A. Scale Bar = 10 µm.

3. Τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ δρουν επιτρεπτικά έναντι των διεργασιών που αποτελούν τη βάση για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSD-M, στη *Drosophila Melanogaster.*

Υπό υποβολή σε έγκριτο επιστημονικό περιοδικό

3.1. Περίληψη

Ένα από τα πιο κοινά χαρακτηριστικά των περισσοτέρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν εμπλέκουν μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Τ, όπως η νόσος του Alzheimer, είναι τα χρονο-εξαρτώμενα ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη, γεγονός που εμφανίζεται ξεκάθαρα και στο δικό μας μοντέλο Τ-πρωτεϊνοπαθειών της *D. melanogaster*. Ωστόσο, δεν είναι σαφές μέχρι τώρα εάν αυτά τα ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη είναι απόρροια μη αναστρέψιμων δυσλειτουργιών ή εκφυλισμένων νευρώνων. Για το σκοπό αυτό, εγκαθιδρύσαμε ένα πρωτόκολλο με το οποίο καταστέλλεται η έκφραση της ανθρώπινης ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή της ελλειμματικής μάθησης. Αυτό πιθανόν υποδεικνύει ότι τα γνωστικά ελλείμματα προκύπτουν ναι μεν από δυσλειτουργικούς νευρώνες αλλά άθικτους και ίσως να είναι επίσης φαρμακολογικά αναστρέψιμα και σε ασθενείς, τουλάχιστον πριν τα μεταγενέστερα εκφυλιστικά στάδια της νόσου. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι η αναστροφή της ελλειμματικής μνήμης συνδυάζεται και με ταυτόχρονη αύξηση των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ. Τα μη διαλυτά συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ έχουν συνδεθεί άρρηκτα με τις νευροεκφυλιστικές Τ- πρωτεϊνοπάθειες, ωστόσο είναι ακόμα ασαφές ποια είδη επακριβώς συμβάλλουν στη τοξικότητα, καθότι έχει δειχθεί ότι μπορεί να επέλθει εκφύλιση των νευρώνων και χωρίς την δημιουργία των NFTs. Τα δεδομένα στη παρούσα έρευνα υποστηρίζουν σθεναρά την άποψη ότι τα μη διαλυτά συσσωματώματα είναι προστατευτικά σε νευρωνικές διεργασίες (ή έστω τις επιτρέπουν), οι οποίες αποτελούν τη βάση για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSD-M. Αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων των 0N4R και 0N3R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ με το μπλε του μεθυλενίου, είχε ως συνέπεια την πρόκληση ελλειμματικής μνήμης, γεγονός που υποδεικνύει ότι φάρμακα που προωθούν τη συσσωμάτωση μπορεί να είναι καταλληλότερα για την θεραπεία των γνωστικών ελλειμμάτων σε ασθενείς με AD, παρά τα φάρμακα τα οποία δρουν ανασταλτικά έναντι της συσσωμάτωσης, όπως το MetBlu.

3.2. Εισαγωγή

Το ανθρώπινο γονίδιο τ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στη γενετική θέση q21.1. Από το εναλλακτικό μάτισμα ενός μεταγράφου mRNA προκύπτουν έξι ισομορφές της πρωτεΐνης Τ στον ενήλικο ανθρώπινο εγκέφαλο (Andreadis, 2005), που κυμαίνονται σε μέγεθος από 352 έως 441 αμινοξέα. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν από την απουσία ή την παρουσία ενός ή δύο ενθέσεων στο αμινο-τελικό άκρο (0N, 1N, 2N), σε συνδυασμό με τη προσθήκη του εξωνίου 10 ή τον αποκλεισμό του από το mRNA (Andreadis et al., 1992). Αυτό οδηγεί σε ισομορφές με 3 (ισομορφές 3R) ή 4 (ισομορφές 4R) επαναλήψεις στο καρβοξυ-τελικό άκρο (Goedert et al., 1989), οι οποίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις με τους μικροσωληνίσκους (Buée et al., 2000). Οι διάφορες ισομορφές εκτός από την διαφοροποίησή τους σε λειτουργικές περιοχές, όπως οι περιοχές πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων (Goode et al., 2000), παρουσιάζουν διαφορές και στη φυσιολογία τους καθώς και στο παθολογικό δυναμικό τους. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαφορετικές ισομορφές παρουσιάζουν διακριτές διαφορές ως προς την τάση τους να συσσωματώνονται (Adams et al., 2010), τα είδη των συσσωματωμάτων που δημιουργούν (Dinkel et al., 2011), ως προς την επανο-τοποθέτησή τους κατά τον σχηματισμό των NFTs (Hara et al., 2013); (Liu & Götz, 2013), το δυναμικό φωσφορυλίωσής τους και τοξικότητας τους (Sealey et al., 2017).

Η αναλογία των ισομορφών 3R προς 4R στον ενήλικο ανθρώπινο εγκέφαλο είναι περίπου 1. Διατάραξη αυτής της αναλογίας των ισομορφών σχετίζεται με τις ασθένειες, υποδεικνύοντας τη σημασία διατήρησης μιας ισορροπίας των ισομορφών 3R:4R στους υγιείς νευρώνες. Επιπλέον, ένα χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί τις Τ- πρωτεϊνοπάθειες, είναι ότι δεν απαντάται σε αυτές ο σχηματισμός των συσσωματωμάτων από τις ίδιες ισομορφές της πρωτεΐνης Τ. Για παράδειγμα, στη νόσο του Alzheimer (AD), όλες οι ισομορφές της πρωτεΐνης Τ σχηματίζουν ινίδια, ενώ σε άλλες αποτελούνται κυρίως από είτε 3R, π.χ. νόσος του Pick, είτε από 4R ισομορφές, π.χ. στην προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση, στον φλοιοβασικό εκφυλισμό, και στην άνοια αργυλοφιλικών κόκκων (Rábano et al., 2013); (Spillantini & Goedert, 2013).

Τα μη διαλυτά συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ έχουν συνδεθεί άρρηκτα με τις νευροεκφυλιστικές Τ-πρωτεϊνοπάθειες (Delacourte & Buée, 2000); (Geschwind, 2003); (Trojanowski & Lee, 2005). Ο σχηματισμός των νευροϊνιδικών πλεγμάτων φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για την παθολογία των Τ-πρωτεϊνοπαθειών, ωστόσο λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό σχηματισμού τους καθώς και για τον ρόλο των ενδιάμεσων διαλυτών ολιγομερών και των ζευγών ελικοειδών ινιδίων. Η υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ συμβάλλει στο σχηματισμό των NFTs, ωστόσο η συσσώρευσή τους από μόνη της μπορεί να είναι ανεπαρκής για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου, καθότι μελέτες σε ασθενείς με

AD δείχνουν ότι η απώλεια νευρώνων και τα γνωστικά ελλείμματα προηγούνται του σχηματισμού NFTs (Haroutunian et al., 2007). Σε διάφορα ζωικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένης και της *D. melanogaster*, έχει δειχτεί ότι τα ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ, τα οποία εμφανίζονται πριν το σχηματισμό των NFTs, συμβάλλουν στο θάνατο των νευρωνικών κυττάρων, ενώ τα NFTs δεν σχετίζονται με αυτόν (Cowan et al., 2012); (Lasagna-Reeves et al., 2011a); (Kim et al., 2016); (Cook et al., 2015). Επιπλέον, σε ορισμένες έρευνες έχει δειχτεί ότι μπορεί να επέλθει εκφύλιση των νευρώνων και χωρίς τη δημιουργία NFTs (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2011); (Wang et al., 2015); (Wittmann et al., 2001); (Mudher et al., 2004). Επιπροσθέτως, οι πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη Τ δυσλειτουργία και τοξικότητα δεν απαιτούν συσσωμάτωση αλλά προκαλούνται από τη διαλυτή φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ, ενώ σε ορισμένες μελέτες in vivo έχει δειχθεί ότι ορισμένα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ, ιδιαίτερα τα ολιγομερή, μπορεί ακόμα και να έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ (Cowan et al., 2015).

Η χρήση της *D. melanogaster* ως μοντέλο των Τ-πρωτεϊνοπαθειών έχει συμβάλλει σημαντικά στη κατανόηση του συσχετισμού της τοξικότητας που παρατηρείται στους ανθρώπους με τη συσσώρευση των υπερ-φωσφορυλιωμένων προ –ινιδίων της πρωτεΐνης Τ (Wittmann et al., 2001); (Steinhilb et al., 2007a); (Steinhilb et al., 2007b); (Feuillette et al., 2010). Πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν δυο θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, η Ser^{238} και η Thr^{245}, ως απαραίτητες για τη τοξικότητά της στα μισχοειδή σωμάτια (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou et al., 2010) και για την πρόωρη θνησιμότητα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η ισομορφή 0N4R της πρωτεΐνης Τ και όχι η ισομορφή 0N3R προκαλεί ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη (Sealey et al., 2017). Ενώ, καθοριστικός είναι ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στη θέση Ser^{262} για τα μαθησιακά ελλείμματα, αφού πρόσφατα αποδείχτηκε ότι αντικατάστασή της με αλανίνη δίνει φυσιολογική απόδοση των ζώων στη μάθηση (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015).

Ωστόσο, ένα από τα βασικά ερωτήματα που προκύπτουν από όλες τις παραπάνω έρευνες είναι αν τα ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη είναι απόρροια μη αναστρέψιμων δυσλειτουργιών ή εκφυλισμένων νευρώνων. Προηγούμενες έρευνες σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών με ρυθμιζόμενη έκφραση των μεταλλάξεων P301L και ΔK280 στο γενετικό υπόβαθρο της 0N4R ισομορφής, έδειξαν ότι η καταστολή έκφρασης της πρωτεΐνης Τ βελτιώνει τη μνήμη, χωρίς όμως να μειώνει και τα μεγάλα συσσωματώματα (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al., 2011); (Van der Jeugd et al., 2012). Ωστόσο, όλες οι παραπάνω έρευνες έχουν χρησιμοποιήσει μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Τ και υπάρχει έλλειψη δεδομένων για την πρωτεΐνη Τ αγρίου τύπου. Συνεπώς, ένας από τους πρωταρχικούς στόχους της παρούσας έρευνας είναι να διερευνήσουμε αν τα ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη μπορούν να αναστραφούν και στο πειραματικό μοντέλο των Τ-

πρωτεϊνοπαθειών της *D. melanogaster,* με χρήση διαφόρων ισομορφών της πρωτεΐνης Τ αγρίου τύπου. Η υπόθεση που έχει τεθεί είναι ότι τα γνωστικά ελλείμματα που προκύπτουν λόγω έκφρασης της πρωτεΐνης Τ προκύπτουν ναι μεν από δυσλειτουργικούς νευρώνες αλλά προφανώς άθικτους και ίσως αυτό να υποδεικνύει ότι τα ελλείμματα αυτά μπορεί να είναι επίσης φαρμακολογικά αναστρέψιμα και σε ασθενείς, τουλάχιστον πριν τα τελικά στάδια της νόσου (Braak & Braak, 1996); (Lee et al., 2001).

Επιπλέον, ένα ακόμα βασικό ερώτημα που τίθεται στη παρούσα έρευνα, είναι ο ρόλος των συσσωματωμάτων σε νευρωνικές διεργασίες, οι οποίες αποτελούν τη βάση για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSD-M, στη Drosophila. Προς αποσαφήνιση του παραπάνω ερωτήματος έγινε χρήση του αναστολέα σχηματισμού συσσωματωμάτων, του μπλε του μεθυλενίου (MetBlu). Το MetBlu έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες, συμπεριλαμβανομένου και του πειραματικού μοντέλου ποντικού της μετωποκροταφικής άνοιας, και έχει δειχτεί ότι η χορήγησή του αποτρέπει ή επαναφέρει τις γνωστικές λειτουργίες (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al., 2011); (Van der Jeugd et al., 2012). Ωστόσο, όταν το MetBlu δοκιμάστηκε σε ασθενείς με AD και πέρασε στις δοκιμές φάσης III, δεν απέδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα (Gauthier et al., 2016). Πιθανότατα ο λόγος αποτυχίας του συγκεκριμένου φαρμάκου ήταν ότι αναστέλλει συγκεκριμένες μορφές συσσωματωμάτων και όχι για παράδειγμα το σχηματισμό των GTOs (Soeda et al., 2015). Σε διάφορες μελέτες έχει δειχτεί ότι και τα GTOs, μπορεί να διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στις διεργασίες τοξικότητας (Cowan & Mudher, 2013), ενώ ακόμα και τα διαλυτά ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ είναι υπεύθυνα για την εξέλιξη της νόσου (Shin et al., 2020).

Συλλογικά η παρούσα έρευνα μαζί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών έχει ως στόχο να αποσαφηνίσει αν οι γνωστικές δυσλειτουργίες των Τ-πρωτεϊνοπαθειών είναι απόρροια δυσλειτουργικών και εκφυλισμένων ή άθικτων νευρώνων, καθώς και του ρόλου που διαδραματίζουν τα συσσωματώματα στις διεργασίες που απαιτούνται για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη. Πιθανόν φάρμακα που στοχεύουν τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ, και συγκεκριμένα την επάγουν, να είναι καταλληλότερα για την θεραπεία των γνωστικών δυσλειτουργιών στον άνθρωπο.

3.3. Υλικά και μέθοδοι

3.3.1. Καλλιέργεια και στελέχη *Drosophila melanogaster*

Οι διασταυρώσεις της Drosophila πραγματοποιήθηκαν μαζικά σε συνήθη τροφή που περιέχει αλεύρι σίτου, ζάχαρη, αλεύρι σόγιας και $CaCl_2$. Οι Καλλιέργειες

πραγματοποιήθηκαν στους 18^{o}C με υγρασία 50-70% σε 12 ώρες κύκλο φωτός/σκοταδιού, εκτός των περιπτώσεων που υποδεικνύεται κάτι διαφορετικό. Οι επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι για την παν-νευρωνική έκφραση ο Elav^{c155}-Gal4; TubGal80^{ts} και για την έκφραση σε όλα τα μισχοειδή σωμάτια, ο LeoMB-Gal4; TubGal80^{ts}.

Για τη δημιουργία των διαγονιδιακών μυγών της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής που έχει εισαχθεί σε συγκεκριμένη θέση (0N4R^{a1} και 0N4R^{a2}) χρησιμοποιήθηκε ο βακτηριακός πλασμιδιακός φορέας pGEX-5x που εκφράζει την ισομορφή 0N4R της πρωτεΐνης Τ, ο οποίος ελήφθη από τον Δρ. Martin Chow (Πανεπιστήμιο του Κεντάκι). Το cDNA κλωνοποιήθηκε στον φορέα pUAS.attB (Bischof et al., 2007) με χρήση των περιοριστικών ενζύμων Bgl II/XbaI. Η σωστή αλληλουχία των μεταλλαγμάτων επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της αλληλούχισης (sequencing, VBC-biotech). Οι διαγονιδιακές μύγες δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του phiC31 από την BestGene Inc. (Chino Hills, CA, Ηνωμένες Πολιτείες). Τα DNAs εισήχθησαν στη θέση 53B2 και ZH-86Fb του γονιδιώματος και συγκεκριμένα στο δεύτερο χρωμόσωμα και τρίτο χρωμόσωμα αντίστοιχα (BDSC #9736 και BDSC#24749). Το διπλό διαγονιδιακό στέλεχος για την 0N4R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ (0N4R^{2a}) κατασκευάστηκε με κατάλληλες διασταυρώσεις των δύο παραπάνω διαγονιδίων (0N4R^{a1} και 0N4R^{a2}) και συνεπώς περιέχει το 0N4R^{a1} διαγονίδιο στο δεύτερο χρωμόσωμα και το 0N4R^{a2} στο τρίτο χρωμόσωμα. Οι διαγονιδιακές μύγες για την ανθρώπινη ισομορφή 0N4R της πρωτεΐνης Τ που έχουν κατασκευαστεί σε τυχαία εισαγόμενη θέση (hTau^{0N4R}, 0N4R) ελήφθησαν από την M. Feany (Ιατρική Σχολή του Χάρβαρντ, Βοστώνη, Ηνωμένες Πολιτείες).

Για την διενέργεια των πειραμάτων που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες διασταυρώσεις και οι πειραματικοί απόγονοι επιλέχθησαν κατά περίπτωση, όπως περιγράφονται παρακάτω:

Μύγες πειραματικού ελέγχου. Επιλογή όλων των απογόνων:

Θηλυκά { Elav^{c155}-Gal4; TubGal80^{ts} ; ή ; LeoMB-Gal4; TubGal80^{ts} } **X** **Αρσενικά** w^{1118}

Μύγες πειραματικού ελέγχου. Επιλογή όλων των απογόνων:

Θηλυκά w^{1118} **X** **Αρσενικά** 0N4R ή 0N4R^{a1} ή 0N4R^{a2} ή 0N4R^{2a}

Πειραματικές Μύγες. Επιλογή όλων των απογόνων:

Θηλυκά { Elav^{c155}-Gal4; TubGal80^{ts} ή LeoMB-Gal4; TubGal80^{ts} } **X** **Αρσενικά** 0N4R ή 0N4R^{a1} ή 0N4R^{a2} ή 0N4R^{2a}

3.3.2. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Για την αξιολόγηση των συνολικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Τ πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western. Για την ανάλυση των δειγμάτων, συνολικά 4-5 κεφάλια από ενήλικες μύγες ηλικίας ανάλογα με την περίπτωση και όπως υποδεικνύεται παρακάτω, ομογενοποιήθηκαν σε 20μl ρυθμιστικού διαλύματος 1X Laemmli (50 mM Tris pH 6.8, 5% 2- μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS, 10% γλυκερόλη και 0.01% μπλε της βρωμοφαινόλης), και αφέθηκαν να βράσουν στους 95^{o}C για 5 λεπτά και εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 14000 RPM σε θερμοκρασία δωματίου. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και την εξάλειψη σφαλμάτων κατά τη φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές αντίσωμα συνταξίνη (mAb 8C3, Developmental Hybridoma Bank) σε συγκέντρωση 1: 5.000. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε έναντι της ολικής πρωτεΐνης Τ είναι το Τ46 (Invitrogen) σε συγκέντρωση 1:3000. Τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1:5000 και το σήμα ανιχνεύθηκε με χημειοφωταύγεια (ECL plus).

3.3.3. Δοκιμασία διαλυτότητας της πρωτεΐνης Τ για εμπλουτισμό των ολιγομερών

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των αδιάλυτων ολιγομερών της πρωτεΐνης Τ, όπως προηγουμένως έχει περιγραφεί (Cowan et al., 2015). Συνολικά 30 κεφάλια από τις πειραματικές μύγες ελέγχου ομογενοποιούνται σε 120 μl ρυθμιστικού διαλύματος TBS/σουκρόζης (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 175 mM NaCl, 1 M σουκρόζη, 5 mM EDTA και μίγμα αναστολέων πρωτεάσης). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά στα 1000 g και το ίζημα απορρίπτεται. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 186.000 g για 2 ώρες και στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει αναφέρεται ως δείγμα "S1" - υδατοδιαλυτό κλάσμα. Το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 5% SDS/TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 175 mM NaCl, 5% SDS) και φυγοκεντρείται στα 186.000 g για 2 ώρες στους 25°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει αναφέρεται ως δείγμα "S2" - διαλυτό σε SDS, μη υδατοδιαλυτό κλάσμα. Τέλος, μια πλύση του ιζήματος πραγματοποιείται με επαναδιάλυσή του σε ρυθμιστικό διάλυμα 5% SDS/TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 175

mM NaCl, 5% SDS και μίγμα αναστολέων πρωτεάσης) και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 186.000 g για 2 ώρες στους 25°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας 8 M, 8% SDS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 175 mM NaCl, 8% SDS, 8 M ουρία και μίγμα αναστολέων πρωτεάσης) και αφήνεται υπό ανάδευση για 12-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (δείγμα "S3"). Όλα τα δείγματα αραιώνονται σε 2X ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli και αφήνονται να βράσουν για 5 λεπτά. Το "S1" και το "S2" φορτώνονται σε ισοδύναμους όγκους), ενώ η διπλάσια ποσότητα του "S3" φορτώνεται σε σύγκριση με το "S1" και το "S2".

3.3.4. Εξαγωγή του RNA και RT-PCR

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Prifti et al., 2021). Το ολικό RNA εξήχθη από τις κεφαλές μυγών χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής από ολικό RNA που έχει υποστεί επεξεργασία με DNase I διεξήχθη χρησιμοποιώντας την αντίστροφη τρανκριπτάση SuperScript® II (Invitrogen). Δείγματα 1 μl cDNA από κάθε αντίδραση RT υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε PCR χρησιμοποιώντας την Go Taq® Flexi DNA πολυμεράση (Promega, Madison, WI, USA). Οι ημι-ποσοτικές αναλύσεις PCR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες συνθήκες: αρχικά μετουσίωση στους 95°C για 10 λεπτά και ακολούθως 28 κύκλοι, όπου ο κάθε κύκλος συνίσταται σε ένα βήμα αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 1 λεπτό και στη συνέχεια υβριδοποίηση των εκκινητών στους 62°C για 40 δευτερόλεπτα και έπειτα επιμήκυνση του εκκινητή στους 72°C για 1 λεπτό. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το ριβοσωμικό γονίδιο rp49. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Tau-F: 5’-CCCGCACCCCGTCCCTTCC-3’

Tau-R: 5’-GATCTCCGCCCCGTGGTCTGTCTT-3’

rp49-F: 5’-GATCGTGAAGAAGCGCAC-3’ και

rp49-R: 5’-CTTCTTGAATCCGGTGGG-3’.

3.3.5. Προσδιορισμός προσδόκιμου ζωής σε ενήλικα ζώα Drosophila

Για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής χρησιμοποιήθηκαν οι αρσενικοί ενήλικοι απόγονοι από τις διασταυρώσεις του επαγωγέα $Elav^{c155}$-Gal4; $TubGal8O^{ts}$ με το εκάστοτε διαγονίδιο τ ή με τις μύγες πειραματικού ελέγχου (w^{1118}). Οι

διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 18^{o}C και στη συνέχεια 15 ομάδες των 20 ενήλικων αρσενικών μυγών (300 μύγες ανά γενότυπο) μεταφέρθηκαν στους 30^{o}C. Κάθε 3 μέρες οι μύγες μεταφέρονται σε καινούργια φιαλίδια με νέα τροφή και καταγράφεται ο αριθμός των μυγών που πεθαίνουν. Για τον προσδιορισμό του προσδόκιμου ζωής υπό χορήγηση MetBlu, τα φιαλίδια περιείχαν την αντίστοιχη συγκέντρωση MetBlu ανά περίπτωση μέσα στη τροφή. Για την εξαγωγή του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκαν δυο ανεξάρτητα πειράματα.

3.3.6. Χρήση φαρμάκου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του MetBlu, είτε στο προσδόκιμο ζωής είτε στα συμπεριφορικά πειράματα, χορηγήθηκε μπλε του μεθυλενίου (Sigma-Aldrich), στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται ανά περίπτωση. Το μπλε του μεθυλενίου χορηγήθηκε μαζί με την τροφή. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ανά περίπτωση ήταν 10, 50, 100, 250, 500, 1000μM.

3.3.7. Δοκιμασία συνειρμικής μάθησης και μνήμης σε ενήλικες μύγες

Για να πραγματοποιηθούν τα πειράματα μάθησης και μνήμης, αρσενικές μύγες που έχουν τα διαγονίδια της 0N4R ή της 0N3R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ διασταυρώθηκαν με θηλυκά Elav^{c155}GAL4;TubGAL80^{ts} ή με LeoMBGal4;TubGal80^{ts} και τοποθετήθηκαν στους 18^{o}C. Οι ενήλικες μύγες από τις παραπάνω διασταυρώσεις, συλλέχθηκαν σε νέα μπουκάλια και τοποθετήθηκαν στους 30^{o}C για 12 ημέρες, ώστε να επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης Τ. Κάθε 3 ημέρες, οι μύγες μεταφέρονται σε νέα μπουκάλια με καινούργια τροφή. Την 11^{η} ημέρα, οι μύγες χωρίζονται σε ομάδες των 50-70 ζώων σε φιαλίδια με τροφή και επανατοποθετούνται στους 30^{o}C για όλη τη νύχτα. 1-2 ώρες πριν τη πειραματική διαδικασία, οι μύγες μεταφέρονται σε νέα φιαλίδια με καινούργια τροφή.

Για να πραγματοποιηθούν τα πειράματα αναστροφής της ελλειμματικής μνήμης, αφού ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία, στη συνέχεια οι μύγες μεταφέρθηκαν στους 18^{o}C για 10 ημέρες. Κάθε δύο ημέρες οι μύγες μεταφέρονται σε νέα τροφή. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε το MetBlu για τα συμπεριφορικά πειράματα, χορηγήθηκε μαζί με την τροφή στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται ανά περίπτωση. Οι συνθήκες διατήρησης των μυγών στο MetBlu ήταν οι ίδιες με τις συνθήκες χωρίς χορήγηση φαρμάκου.

Όλα τα συμπεριφορικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό χαμηλό ερυθρό φωτισμό, στους 24-25°C και σε υγρασία 65-75%. Όλοι οι γονότυποι που εμπλέκονται σε ένα πείραμα ελέγχονταν ανά ημέρα. Για την μέτρηση της

ικανότητας μάθησης (immediate) χρησιμοποιήθηκε το παράδειγμα της παβλοβιανής αρνητικής οσφρητικής μάθησης συνδυάζοντας τις απωθητικές οσμές βενζαλδεΰδη (BNZ) και 3-οκτανόλη (OCT) αραιωμένες σε λάδι (6% v/v για BNZ και 50% v/v για OCT) ως εξαρτημένα ερεθίσματα (CS+ και CS-) με το ηλεκτρικό σοκ ως μη εξαρτημένο ερέθισμα (US). Για την εκπαίδευση, μια ομάδα 50-70 μυγών εκτίθεται αρχικώς στη πρώτη οσμή για 40 δευτερόλεπτα σε συνδυασμό με επαναλαμβανόμενα σοκ των 90 V (συνολικά 8 ηλεκτρικά σοκ των 1,25 δευτερολέπτων με διάστημα παύσης 4,5 δευτερολέπτων). Ακολούθως οι μύγες εκτίθενται για 30 δευτερόλεπτα σε αέρα και στη συνέχεια στη δεύτερη οσμή για 40 δευτερόλεπτα χωρίς όμως τα ηλεκτρικά σοκ και τέλος σε αέρα για άλλα 30 δευτερόλεπτα. Κάθε πειραματική δοκιμή περιλαμβάνει δύο ομάδες μυγών του ιδίου γενοτύπου, οι οποίες εκπαιδεύονται ταυτόχρονα με τρόπο που η μια ομάδα να αποφεύγει τη βενζαλδεΰδη και η άλλη ομάδα να αποφεύγει την οκτανόλη, ενώ η αντίθετη οσμή χρησιμοποιείται κάθε φορά ως οσμή ελέγχου. Τέλος μετά την εκπαίδευση, και οι δύο ομάδες μυγών αφήνονται να επιλέξουν μεταξύ των δύο οσμών (χωρίς ηλεκτρικό σοκ) για 90 δευτερόλεπτα.

Για τον προσδιορισμό ελέγχου της απόδοσης των μυγών, έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση (immediate 5X), οι μύγες υποβάλλονται στην ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι γίνεται χρήση 12 ηλεκτρικών σοκ US/CS σε 60 δευτερόλεπτα και η διαδικασία επαναλαμβάνεται συνολικά πέντε φορές με μεσοδιάστημα παύσης 15 λεπτών. Τέλος, οι μύγες αμέσως μετά την εκπαίδευση αφήνονται να επιλέξουν μεταξύ των δύο οσμών (χωρίς ηλεκτρικό σοκ) για 90 δευτερόλεπτα.

Για τα πειράματα ελέγχου της εξαρτώμενης από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμης (PSD-M, 24hr spaced), οι μύγες υποβάλλονται σε 12 ηλεκτρικά σοκ US/CS ανά κύκλο και σε συνολικά πέντε τέτοιους επαναλαμβανόμενους κύκλους εκπαίδευσης με διάστημα παύσης 15 λεπτών μεταξύ τους. Ενώ για τα πειράματα ελέγχου της ανεξάρτητης από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμης (PSI-M, 24hr massed), οι μύγες υποβάλλονται σε 12 ηλεκτρικά σοκ US/CS ανά κύκλο και σε συνολικά πέντε τέτοιους επαναλαμβανόμενους κύκλους εκπαίδευσης, χωρίς όμως το διάστημα παύσης 15 λεπτών μεταξύ των κύκλων. Στις περιπτώσεις ελέγχου της PSD-M και PSI-M μνήμης, οι μύγες μετά την εκπαίδευση, μεταφέρονται σε φιαλίδια με τροφή και αφήνονται στους 18^{o}C για 24 ώρες. Τέλος, οι μύγες μεταφέρονται σε μια συσκευή T-λαβυρίνθου και αφήνονται να επιλέξουν μεταξύ των δύο οσμών (χωρίς ηλεκτρικό σοκ) για 90 δευτερόλεπτα.

Ο δείκτης απόδοσης (Performance Index, PI) υπολογίστηκε ως το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν τη συνδεδεμένη με το ηλεκτρικό σοκ οσμή, CS+, μείον το κλάσμα των μυγών που αποφεύγουν την οσμή ελέγχου, CS-, διαιρούμενο προς το συνολικό αριθμό των μυγών. Ο τελικός δείκτης απόδοσης (PI) υπολογίζεται ως το μέσο όρο

των δυο ήμισυ λόγων για κάθε μια από τις ομάδες των ζώων που εκπαιδεύονται στα συμπληρωματικά ερεθίσματα (είτε με βενζαλδεΰδη είτε με 3-οκτανόλη) και κυμαίνεται από 0 έως 100.

3.3.8. Στατιστική Ανάλυση

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και αυτά που έχουν διαφορές στη συνέχεια συγκρίνονται με τη δοκιμασία Dunnett's.

Τα δεδομένα από τα συμπεριφορικά πειράματα αναλύθηκαν παραμετρικά με το στατιστικό πρόγραμμα JMP 7.1 (SAS Institute Inc.) και υπολογίστηκε η σημαντικότητα του αποτελέσματος με ANOVA. Μετά την αρχική θετική ANOVA, πραγματοποιήθηκαν προγραμματισμένες πολλαπλές συγκρίσεις, χρησιμοποιώντας p-τιμή=0,05. Σε ορισμένες περιπτώσεις μετά τη θετική ANOVA ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση με τη δοκιμασία Dunnett΄s.

Τα δεδομένα από τα πειράματα προσδιορισμού του προσδόκιμου ζωής αναλύθηκαν για την κάθε ημέρα με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος JMP 7.1 (SAS Institute Inc.) με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές υπολογίστηκε το μέσο όρο και το τυπικό σφάλμα για κάθε γενότυπο και συγκρίθηκε με τις μύγες πειραματικού ελέγχου με χρήση της μεθόδου Steel.

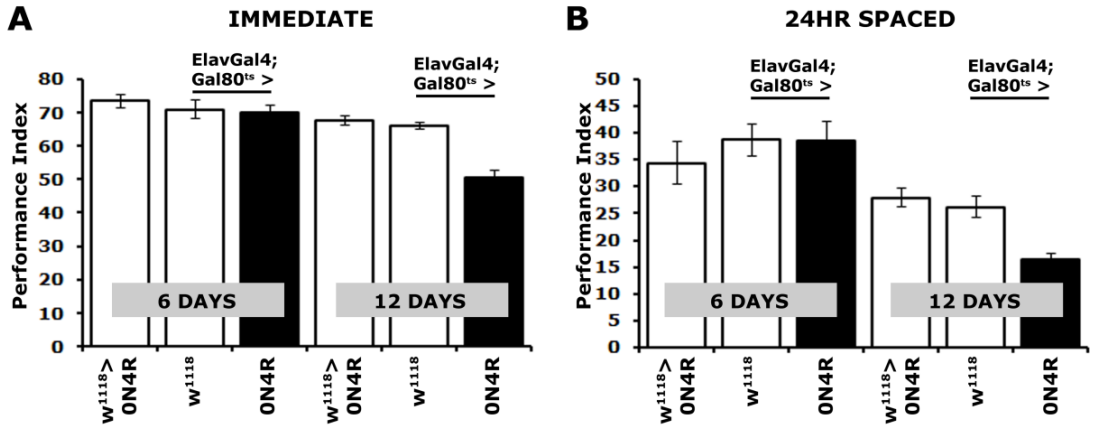
Λεπτομερή στατιστικά στοιχεία όλων των πειραμάτων αναφέρονται είτε στο κείμενο είτε στους συμπληρωματικούς πίνακες.

3.4. Αποτελέσματα

3.4.1. Έκφραση της ανθρώπινης ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ στο ΚΝΣ ενηλίκων μυγών προκαλεί ελλείμματα στη συνειρμική μάθηση και στην εξαρτώμενη από τη πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη.

Η ελλιπής συνειρμική μάθηση έχει βρεθεί ότι εμφανίζεται μετά από 12 ημέρες παν-νευρωνικής έκφρασης της ανθρώπινης ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ ($hTau^{0N4R}$) στις ενήλικες μύγες (Papanikolopoulou et al., 2015); (Sealey et al., 2017). Μετά από 6 ημέρες έκφρασης της ανθρώπινης ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ ($hTau^{0N4R}$), η

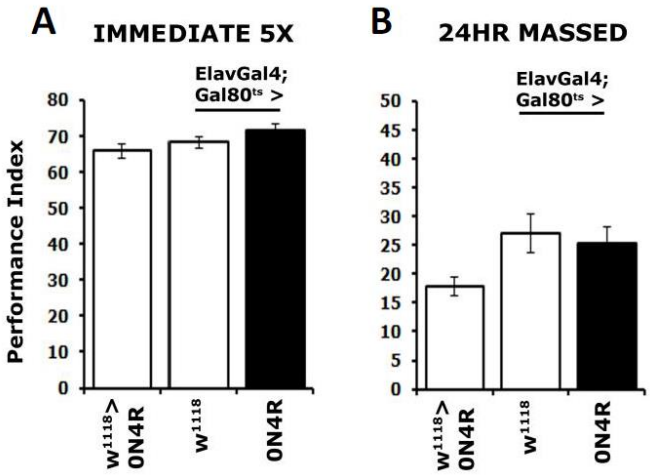
μάθηση είναι φυσιολογική, ενώ παρουσιάζει ισχυρά μαθησιακά ελλείμματα την 12η ημέρα **(Εικόνα 3- 1A)**, επαληθεύοντας έτσι και στο μοντέλο Τ-πρωτεϊνοπαθειών της Drosophila, τη χρονικά εξαρτώμενη εκδήλωση της νευρωνικής δυσλειτουργίας, όπως εμφανίζεται και στους ανθρώπους. Για να προσδιοριστεί εάν εκτός από την ελλιπή μάθηση, η έκφραση της ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ οδηγεί και σε παρόμοια ελλείμματα στη μνήμη με διακριτό τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο, αξιολογήθηκε η απόδοση των μυγών 24 ώρες μετά την εκπαίδευση με 5 επαναλαμβανόμενους κύκλους εκπαίδευσης, με 12 ηλεκτρικά σοκ CS/US ανά κύκλο, και με 15 λεπτά μεσοδιάστημα παύσης μεταξύ των κύκλων (Spaced Training). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της εξαρτώμενης από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμης (PSD-M) (Tully et al., 1994). Η PSD-M εμφανίστηκε φυσιολογική μετά από 6 ημέρες, ενώ παρουσιάστηκε ισχυρό έλλειμμα μετά από 12 ημέρες έκφρασης της hTau^{0N4R} **(Εικόνα 3- 1B)**.



Εικόνα 3- 1. Έκφραση της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί ελλείμματα στη μάθηση και στην εξαρτώμενη από τη πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο. Η έκφραση της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts}. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται στους 18^{o}C και οι ενήλικες μύγες τοποθετούνται στους 30^{o}C για 6 ή 12 ημέρες πριν τη πραγματοποίηση της δοκιμασίας. **(A)** Η έκφραση της hTau^{0N4R} προκαλεί σοβαρά ελλείμματα στη μάθηση (IMMEDIATE), έπειτα από επαγωγή της έκφρασης για 12 ημέρες ($p<0.001$, Dunnett's test, $n>12$ ανά γενότυπο), ενώ καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρουσιάζεται έπειτα από επαγωγή της έκφρασης για 6 ημέρες. **(B)** Η έκφραση της hTau^{0N4R} προκαλεί σοβαρά ελλείμματα στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη (24HR SPACED), έπειτα από επαγωγή της έκφρασης για 12 ημέρες ($p<0.001$, Dunnett's test, $n>14$ ανά γενότυπο), ενώ καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρουσιάζεται έπειτα από επαγωγή της έκφρασης για 6 ημέρες.

Τα αποτελέσματα αυτά θέτουν το ερώτημα εάν η συσσώρευση της hTau^{0N4R} έπειτα από 12 ημέρες, επισπεύδει μια γενικότερη νευρωνική δυσλειτουργία ή νευροτοξικότητα, που αντικατοπτρίζεται με τα ισχυρά ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη, ή χειροτερεύει συγκεκριμένες διαδικασίες πλαστικότητας και συμπεριφορικές διεργασίες. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε η άμεση απόδοση (μάθηση) μετά από 5

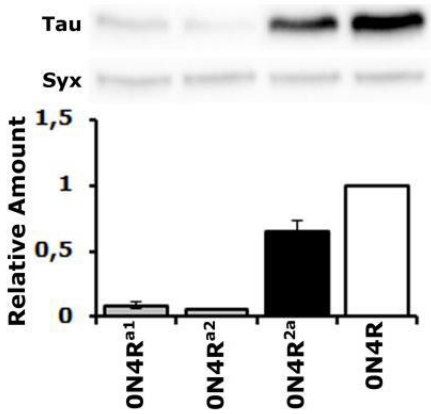
κύκλους εκτεταμένης εκπαίδευσης με 12 ηλεκτρικά σοκ CS/US ανά κύκλο και με 15 λεπτά μεσοδιάστημα παύσης μεταξύ των κύκλων (Gouzi et al., 2018). Η άμεση απόδοση των ζώων, έπειτα από την εκτεταμένη εκπαίδευση (Immediate 5X) ήταν φυσιολογική, δηλαδή τα ζώα που συσσωρεύουν hTau^{0N4R} για 12 ημέρες παρουσιάζουν ίδια απόδοση με τα ζώα πειραματικού ελέγχου **(Εικόνα 3- 2A)**. Επιπλέον, η ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη (PSI-M), που παράγεται έπειτα από 5 επαναλαμβανόμενους κύκλους εκπαίδευσης χωρίς όμως να μεσολαβεί το μεσοδιαστήματα των 15 λεπτών (Tully et al., 1994), δεν επηρεάζεται από την έκφραση της hTau^{0N4R} **(Εικόνα 3- 2B)**. Επομένως, αν και η συσσώρευση της hTau^{0N4R} στο ενήλικο ΚΝΣ της Drosophila προκαλεί μαθησιακά ελλείμματα έπειτα από 12 ημέρες επαγωγής της έκφρασης, αυτό το έλλειμμα μπορεί να αναστραφεί έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση των ζώων, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο ότι είναι αποτέλεσμα μειωμένης νευρωνικής αποτελεσματικότητας. Επιπλέον, από τις δυο μορφές μνήμης (PSD-M και PSI-M), μόνο η εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη (PSD-M) παρουσιάζει ελλείμματα, έπειτα από την επαγωγή έκφρασης της hTau^{0N4R} για 12 ημέρες, υποδηλώνοντας ότι η συσσώρευση της hTau^{0N4R} επηρεάζει τη μετάφραση, όπως πρόσφατα έχει αναφερθεί (Papanikolopoulou et al., 2019) και αφήνει αμετάβλητη την PSI-M.



Εικόνα 3- 2. Έκφραση της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ παρουσιάζει φυσιολογική μάθηση έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση και φυσιολογική PSI-M. Η έκφραση της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts}. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται στους 18^{o}C και οι ενήλικες μύγες τοποθετούνται στους 30^{o}C για 12 ημέρες πριν τη πραγματοποίηση της δοκιμασίας. Η έκφραση της hTau^{0N4R} παρουσιάζει φυσιολογική μάθηση έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση των ζώων (Immediate 5X) **(A)** και φυσιολογική μνήμη ανεξάρτητη της πρωτεϊνικής σύνθεσης (PSI-M, 24HR Massed) **(B).** Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 1**.

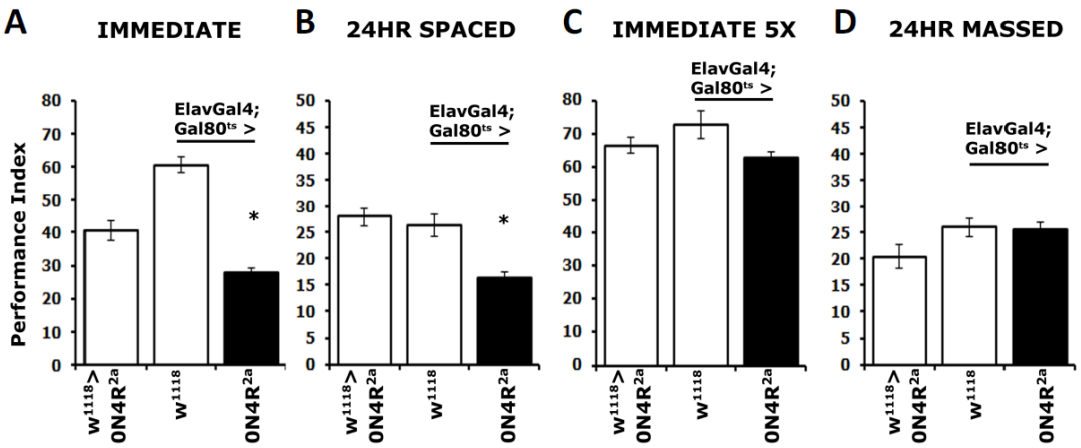
Για την επαλήθευση όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων, δημιουργήθηκαν δύο ανεξάρτητα διαγονίδια που κωδικοποιούν για τη hTau^{0N4R}, τα 0N4R^{a1} και 0N4R^{a2}, σε

δύο διαφορετικές χρωμοσωμικές θέσεις (attp9A και attp86F). Ωστόσο, η έκφραση της πρωτεΐνης Τ, η οποία παρατηρήθηκε στα συγκεκριμένα διαγονίδια ήταν πολύ χαμηλή, με αποτέλεσμα να κριθεί απαραίτητη η δημιουργία με κατάλληλες διασταυρώσεις ενός νέου 0N4R (0N4R^{2a}) που συνίσταται από αυτά τα δύο (0N4R^{a1} και 0N4R^{a2}). Τα επίπεδα έκφρασης του νέου 0N4R^{2a} προσεγγίζουν τα επίπεδα έκφρασης του αρχικού διαγονιδίου 0N4R που χρησιμοποιήθηκε παραπάνω **(Εικόνα 3- 3)**, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η μεταξύ τους σύγκριση.



Εικόνα 3- 3. Επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης Τ σε διαφορετικά διαγονίδια 0N4R. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων από κεφαλές μυγών που εκφράζουν παν-νευρωνικά διαφορετικά διαγονίδια την 0N4R ισομορφής για 12 ημέρες. Η έκφραση όλων των διαγονιδίων πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts}. Τα διαγονίδια 0N4R^{a1} και 0N4R^{a2} παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με τα διαγονίδια 0N4R και 0N4R^{2a}. Παραπλήσια επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ παρουσιάζουν τα διαγονίδια 0N4R και 0N4R^{2a}. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 1**.

Σε συμφωνία με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, η παν-νευρωνική έκφραση του νέου διαγονιδίου 0N4R^{2a} σε ενήλικες μύγες για 12 ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα την ελλιπή μάθηση, έπειτα από μόνο ένα κύκλο 8 ηλεκτρικών σοκ CS/US **(Εικόνα 3- 4A)**, η οποία εξαλείφεται έπειτα από παρατεταμένη μάθηση με 5 επαναλαμβανόμενους κύκλους των 12 ηλεκτρικών σοκ CS/US ανά κύκλο **(Εικόνα 3- 4B)**. Επίσης, τα ζώα αυτά παρουσίασαν, όπως και το προηγούμενο 0N4R διαγονίδιο που εξετάστηκε, ελλιπή PSD-M **(Εικόνα 3- 4C)**, και φυσιολογική PSI-M **(Εικόνα 3- 4D)**.



Εικόνα 3- 4. Έκφραση του διαγονιδίου 0N4R^{2a} της πρωτεΐνης Τ προκαλεί ελλείμματα στη μάθηση και στην PSD-M. Η έκφραση του διαγονιδίου 0N4R^{2a} της πρωτεΐνης Τ πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts}. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται στους 18^{o}C και οι ενήλικες μύγες τοποθετούνται στους 30^{o}C για 12 ημέρες πριν τη πραγματοποίηση της δοκιμασίας. Η έκφραση της ανθρώπινης 0N4R^{2a} προκαλεί σοβαρά ελλείμματα στη μάθηση (Immediate) **(A)** και στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M (24hr Spaced) **(B)** , ενώ καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου έπειτα από παρατεταμένους κύκλους μάθησης (Immediate 5X) **(C)** ή στην ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSI-M (24hr massed) **(D)**. Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές από τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 2**.

Επομένως, η συσσώρευση της hTau^{0N4R} σε όλους τους νευρώνες των ενήλικων μυγών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση, αλλά όχι την παντελή κατάργηση της συνειρμικής μάθησης καθώς και την μείωση ειδικά της PSD-M μνήμης. Η ελλειμματική μάθηση υπό συνθήκες μειωμένης εκπαίδευσης καθώς και η ελλειμματική μνήμη που επέρχεται ειδικά στην PSD-M και όχι στην PSI-M υποδηλώνουν ότι τα ελλείμματα αυτά δεν είναι αποτέλεσμα μιας γενικότερης τοξικότητας και νευρωνικής απώλειας της παν-νευρωνικής συσσώρευσης της hTau^{0N4R}, αλλά της εξασθένησης ορισμένων συγκεκριμένων ενδο-νευρωνικών διεργασιών, όπως η μετάφραση μεταξύ άλλων.

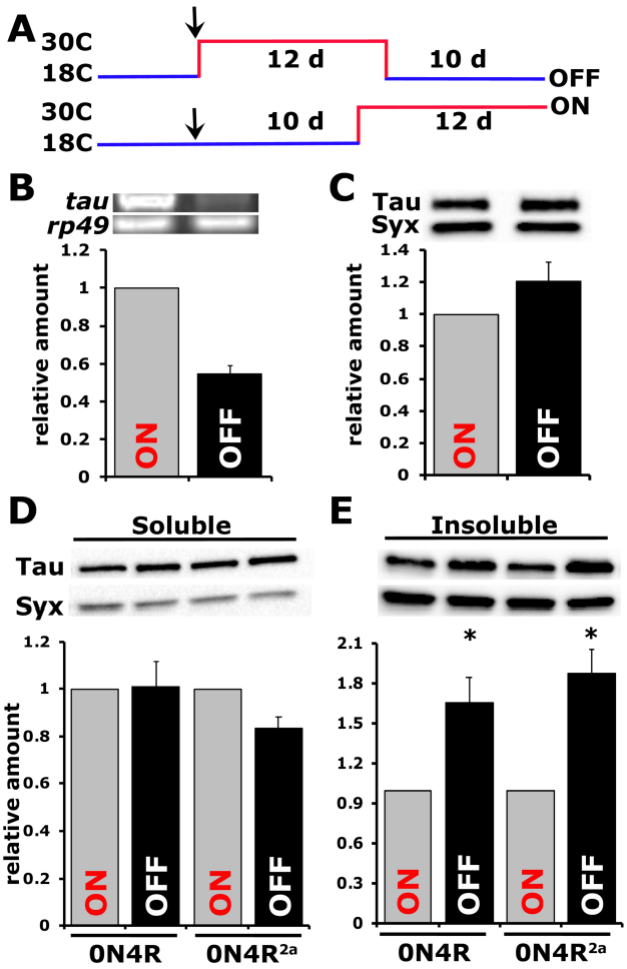
3.4.2. Η συσσώρευση αδιάλυτων συσσωματωμάτων πρωτεΐνης Τ συσχετίζεται με την αντιστροφή του ελλείμματος στην εξαρτωμένη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M.

Επειδή τα αποτελέσματα συσσώρευσης της hTau^{0N4R} είναι ειδικά για την εξαρτωμένη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M, και καθώς τα μαθησιακά ελλείμματα φαίνεται να αντιστρέφονται έπειτα από την εκτεταμένη εκπαίδευση

των μυγών, υποθέτουμε ότι το ΚΝΣ είναι απίθανο να φέρει μόνιμη και εκτεταμένη νευροεκφυλιστική βλάβη. Συνεπώς, η καταστολή έκφρασης του διαγονιδίου 0N4R και η επικείμενη μείωση της πρωτεΐνης $hTau^{0N4R}$ στο ΚΝΣ της μύγας πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα την αντιστροφή αυτών των ελλειμμάτων μνήμης, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες σε μοντέλα σπονδυλωτών που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη $hTau^{0N4R}$, η οποία σχετίζεται με την μετωποκροταφική άνοια (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al., 2011); (Van der Jeugd et al., 2012). Για το σκοπό αυτό, αφού επαχθεί παν-νευρωνικά η έκφραση της $hTau^{0N4R}$ για 12 ημέρες στους 30^{o}C, όπως και προηγουμένως (Papanikolopoulou et al., 2015); (Sealey et al., 2017) και όπως φαίνεται στις Εικόνα 3- 1 και Εικόνα 3- **4**, στη συνέχεια ακολουθεί διάστημα 10 ημερών, όπου οι μύγες τοποθετούνται στους 18^{o}C. Η χαμηλή θερμοκρασία, όπως είναι γνωστό, δεν ευνοεί την επαγωγή έκφρασης των διαγονιδίων. Ταυτόχρονα μια δεύτερη ομάδα μυγών του ιδίου γενοτύπου, αφού τοποθετηθεί για 10 ημέρες στους 18^{o}C, στη συνέχεια μεταφέρεται για 12 ημέρες στους 30^{o}C για να επαχθεί η έκφραση του διαγονιδίου **(Εικόνα 3- 5A)**. Επομένως, σε αυτές τις δυο ομάδες του ιδίου γενοτύπου και παρόμοιας ηλικίας, η έκφραση της $hTau^{0N4R}$ είτε καταστέλλεται για 10 ημέρες στους 18^{o}C, έπειτα από τις 12 ημέρες έκφρασης στους 30^{o}C (OFF), είτε επάγεται η έκφραση συνεχόμενα για 12 ημέρες στους 30^{o}C (ON). Τα επίπεδα έκφρασης των διαγονιδίων σε αυτές τις συνθήκες ελέχθησαν την 22^{η} ημέρα με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από PCR. Στις μύγες που βρίσκονται υπό καταστολή έκφρασης (OFF) βρέθηκε τουλάχιστον 50% μείωση στα μετάγραφα $htau^{0N4R}$ σε σχέση με τις μύγες στις οποίες ευνοείται η έκφραση (ON) **(Εικόνα 3- 5B).** Αντίθετα, ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών παρέμειναν και στις δύο συνθήκες σχεδόν πανομοιότυπα **(Εικόνα 3- 5C)**, υποδεικνύοντας ότι η $hTau^{0N4R}$ είναι μάλλον σταθερή στο ΚΝΣ της μύγας.

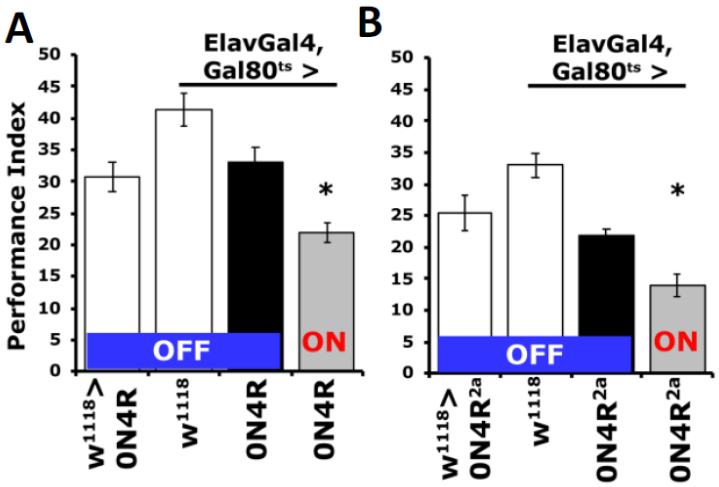
Παρατεταμένη συσσώρευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ στη μύγα (Cowan et al., 2015); (Papanikolopoulou et al., 2015), ή στο CNS σπονδυλωτών (Santacruz et al., 2005); (Wang et al., 2015) έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ως εκ τούτου, επόμενος στόχος ήταν η διερεύνηση αν αυτά τα φαινομενικά σταθερά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ που παρατηρήθηκαν, παρά τα μειωμένα επίπεδα μεταγράφων, οφείλονται στη συσσώρευση συσσωματωμάτων. Σε ομογενοποιημένες κεφαλές από μύγες για τα διαγονίδια 0N4R και $0N4R^{2a}$ που είναι μεταγραφικά ενεργά για 12 ημέρες (ON) ή ανενεργά για 10 ημέρες (OFF), πραγματοποιήθηκε κλασματοποίηση και ποσοτικοποίηση των διαλυτών και αδιάλυτων κλασμάτων της πρωτεΐνης Τ. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι τα επίπεδα της διαλυτής πρωτεΐνης $hTau^{0N4R}$ παρέμειναν σχεδόν τα ίδια, αν όχι κάπως μειωμένα, ανεξαρτήτου αν τα διαγονίδια 0N4R και $0N4R^{2a}$ είναι ON ή OFF **(Εικόνα 3- 5D)**. Ωστόσο, τα επίπεδα της αδιάλυτης $hTau^{0N4R}$ ήταν σημαντικά αυξημένα **(Εικόνα 3- 5E)**, όταν τα διαγονίδια είναι μεταγραφικά ανενεργά (OFF). Συνεπώς, τα συσσωματώματα συσσωρεύονται στο ΚΝΣ της μύγας, φαινομενικά από τη

προϋπάρχουσα διαλυτή hTau^{0N4R} και πιθανότατα να ευθύνονται για τα σταθερά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης που παρατηρούνται, ακόμη και μετά από 10 ημέρες, χωρίς όμως νέα μεταγραφή των διαγονιδίων **(Εικόνα 3- 5B)**.



Εικόνα 3- 5. Αυξημένος σχηματισμός συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ, έπειτα από καταστολή έκφρασής της. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού καταστολής έκφρασης της πρωτεΐνης Τ **(Α)**. Αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από PCR και ενδεικτική αναπαράσταση σε πηκτή αγαρόζης. Οι μύγες που βρίσκονται υπό καταστολή έκφρασης (OFF) της πρωτεΐνης Τ παρουσιάζουν τουλάχιστον 50% μείωση των μεταγράφων σε σύγκριση με τις μύγες στις οποίες ευνοείται η έκφραση (0N). Το rp49 χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός έλεγχος της RT-PCR και για την κανονικοποίηση και επακόλουθη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων **(Β)**. Ενώ, τα επίπεδα έκφρασης σε επίπεδο πρωτεΐνης παραμένουν τα ίδια ανεξαρτήτως συνθηκών ON ή OFF, όπως φαίνεται από την ποσοτικοποίηση δειγμάτων που έχουν αναλυθεί με Western και ενδεικτικά αναπαρίστανται **(C)**. Κλασμάτωση ομογενοποιημένων δειγμάτων από κεφαλές μυγών που εκφράζουν ή βρίσκονται υπό καταστολή έκφρασης των διαγονιδίων 0N4R και 0N4R^{2a} σε διαλυτή **(D)** και σε αδιάλυτη μορφή **(Ε)**. Τα επίπεδα διαλυτής πρωτεΐνης Τ παραμένουν σταθερά σε όλες τις συνθήκες και για τα δυο διαγονίδια που αναλύθηκαν, ενώ τα επίπεδα συσσωματωμάτων είναι αυξημένα στη συνθήκη καταστολής έκφρασης (OFF) σε σχέση με αυτά της συνθήκης ON. Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές ανάμεσα στους ίδιους γενοτύπους, αλλά στις διαφορετικές συνθήκες έκφρασης ON ή OFF. Η έκφραση της πρωτεΐνης Τ πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts} σε όλες τις περιπτώσεις. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 3**.

Στη συνέχεια, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αποσιώπηση της μεταγραφής των διαγονιδίων 0N4R και $0N4R^{2a}$ (OFF) έχει ως αποτέλεσμα την αντιστροφή των ελλειμμάτων στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M, σε σύγκριση με τα ζώα που είναι μεταγραφικά ενεργά (ON) και έχουν ελλείμματα **(Εικόνα 3- 6 A,B)**. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την ιδέα ότι η νευρωνική δυσλειτουργία που παρατηρείται δεν είναι συνέπεια μη αναστρέψιμων βλαβών ή εκφυλισμένων νευρώνων του ΚΝΣ της Drosophila, αλλά μάλλον μια αναστρέψιμη κατάσταση όσο αφορά τουλάχιστον των διεργασιών που είναι απαραίτητες για την PSD-M.



Εικόνα 3- 6. Μεταγραφική καταστολή του διαγονιδίου της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD-M. Η καταστολή της μεταγραφής της $hTau^{0N4R}$ πραγματοποιείται με το μηχανισμό που απεικονίζεται στην εικόνα 5A και προκαλεί αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD-M και για το 0N4R διαγονίδιο **(A)** και για το $0N4R^{2a}$ διαγονίδιο **(B),** σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου (λευκές μπάρες) καθώς και σε σχέση με τις μύγες που είναι μεταγραφικά ενεργές (ON, γκρι μπάρα). Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 4**.

Λαμβάνοντας υπόψιν, ότι η μεταγραφική καταστολή των διαγονιδίων αυξάνει τα επίπεδα της αδιάλυτης μορφής της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ, προφανώς τέτοια συσσωματώματα μπορεί στη πραγματικότητα όχι μόνο να μην επισπεύδουν τη νευρωνική δυσλειτουργία αλλά μπορεί και να την καταστέλλουν ή να την αποτρέπουν. Εναλλακτικά, η νευρωνική δυσλειτουργία που εκδηλώνεται ως ελλιπή μνήμη μπορεί να προκαλείται από τη μετάφραση νέας διαλυτής $hTau^{0N4R}$ και αναμένεται να εξασθενείτε σημαντικά κατά τη μεταγραφική καταστολή **(Εικόνα 3-5B)**.

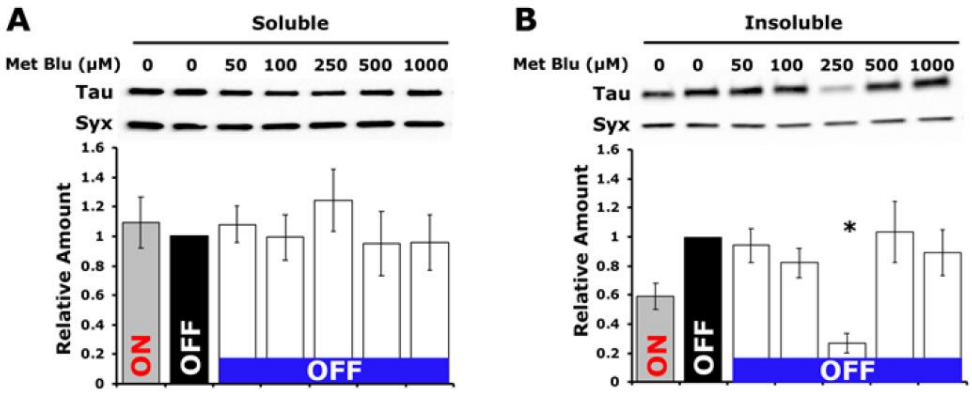
3.4.3. Αναστολή σχηματισμού των αδιάλυτων hTau^{0N4R} συσσωματωμάτων οδηγεί σε ελλείμματα στην PSD-M.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα γεννάται το ερώτημα αν είναι η συσσώρευση συσσωματωμάτων hTau^{0N4R} είναι υπεύθυνη για την αναστροφή της ελλειμματικής μνήμης PSD-M, ή είναι η έλλειψη νέας διαλυτής πρωτεΐνης κατά τη μεταγραφική αποσιώπηση του διαγονιδίου. Για να διαλευκανθούν αυτές οι δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις, κρίθηκε απαραίτητο στη συνέχεια να μελετηθεί τι συμβαίνει αν αποτραπεί ο σχηματισμός αδιάλυτων συσσωματωμάτων hTau ή αν προκληθεί η διάλυσή τους υπό συνθήκες μεταγραφικής αποσιώπησης του διαγονιδίου. Για το σκοπό αυτό, ζώα που εκφράζουν την ισομορφή 0N4R της πρωτεΐνης Τ για 12 ημέρες στους 30°C μεταφέρονται στους 18^{o}C για 10 ημέρες (συνθήκες καταστολής της μεταγραφής) παρουσία μιας σειράς διαφορετικών συγκεντρώσεων ενός παραγώγου της φαινοθειαζίνης, το μπλε του μεθυλενίου (MetBlu). Το φάρμακο αυτό είναι γνωστό ότι προσδένεται στις επαναλαμβανόμενες περιοχές της πρωτεΐνης Τ και αναστέλλει τις αλληλεπιδράσεις hTau-hTau, οι οποίες και είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό των ζευγών ελικοειδών ινιδίων (PHF) και των συσσωματωμάτων (Wischik et al., 1996) και έχει δειχθεί στη πράξη πειραματικά ότι αναστέλλει το σχηματισμό συσσωματωμάτων (Hosokawa. et al., 2012). Καθότι τα διαγονίδια 0N4R και 0N4R^{2a} απέδωσαν πανομοιότυπα αποτελέσματα σε όλα τα παραπάνω πειράματα που περιγράφηκαν, σε όλα τα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε μόνο το αρχικό 0N4R διαγονίδιο τυχαίας ένθεσης (Wittmann et al., 2001).

Αρχικώς, σε μύγες πειραματικού ελέγχου (ετεροζυγώτες του ElavGal4;TubGal80^{ts}) χορηγήθηκε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών συγκεντρώσεων του MetBlu στους 30^{o}C, ώστε να προσδιοριστεί η τοξικότητά του σε σχέση με την πρόωρη θνησιμότητα, πρωτόκολλο που τυπικά χρησιμοποιείται για την ανάλυση του προσδόκιμου επιβίωσης των μυγών που εκφράζουν την hTau^{0N4R} (Keramidis et al., 2020); (Papanikolopoulou et al., 2015). Η χορήγηση του MetBlu μέσω της τροφής, δεν επηρεάζει σημαντικά το βαθμό επιβίωσης των μυγών όταν χορηγείται σε συγκεντρώσεις 10-250μM, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλεί πρόωρη θνησιμότητα και συγκεκριμένα στη συγκέντρωση 500 μM το 50% των μυγών αποβιώνει νωρίτερα κατά 16 ημέρες και στη συγκέντρωση 1mM κατά 22 ημέρες **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1Α και Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 5)**. Επιπλέον, η χορήγηση MetBlu σε συγκεντρώσεις 10-100 μM δεν αλλάζει το χρόνο της 50% επιβίωσης σε μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N4R} σε σχέση με τις μύγες που δεν έλαβαν MetBlu, ωστόσο το μειώνουν κατά 5 ημέρες σε σχέση με αυτό των ζώων πειραματικού ελέγχου. Σε συγκεντρώσεις 250 μM και 500 μM MetBlu, το ποσοστό 50% της επιβίωσης ελαττώνεται κατά 15 ημέρες, ενώ σε συγκέντρωση 1 mM κατά 17 ημέρες **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1Β και Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 6)**. Συνεπώς, σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες (Gillman et al., 2011), το

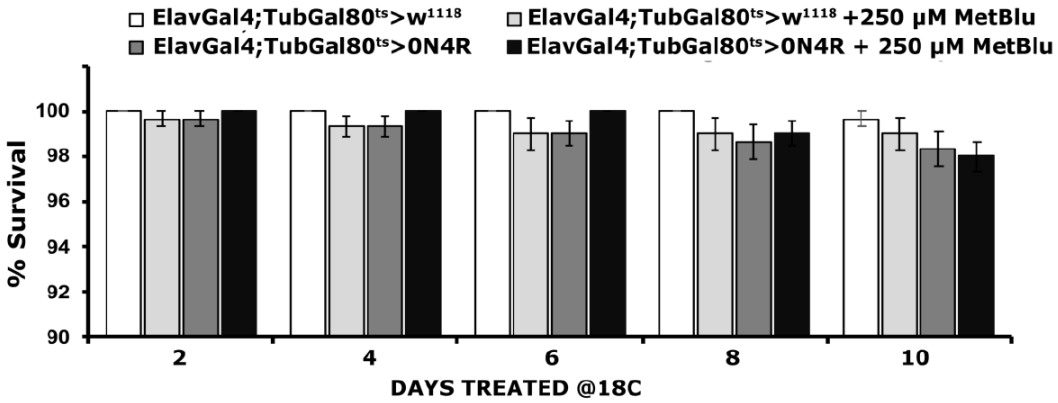
MetBlu παρουσιάζει τοξικότητα εξαρτωμένη από την συγκέντρωση, άνω των 250 μM στους 30°C, γεγονός που είναι εντονότερο στις μύγες που εκφράζουν την 0N4R **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1 Α και Β)**.

Για να προσδιοριστεί η επίδραση του MetBlu στο σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau^{0N4R}, τα ζώα μεταφέρθηκαν σε τροφή που περιέχει MetBlu σε διαφορετικές συγκεντρώσεις από 50 έως 1000 μM στους 18°C για 10 ημέρες ώστε να επέλθει η μεταγραφική καταστολή του διαγονιδίου. Ομογενοποιημένες κεφαλές από τα ζώα υπέστησαν κλασματοποίηση για το διαχωρισμό των διαλυτών από των αδιάλυτων μορφών hTau^{0N4R} και τα διαφορετικά κλάσματα προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε σχέση με τα αντίστοιχα κλάσματα από ζώα που καλλιεργήθηκαν στις ίδιες συνθήκες αλλά χωρίς προσθήκη φαρμάκου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα της διαλυτής hTau^{0N4R} δεν επηρεάζονται σχεδόν καθόλου από καμία συγκέντρωση του MetBlu (μικρή αύξηση παρουσιάζεται στα 250 μM χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα ζώα που δεν τους είχε χορηγηθεί MetBlu) **(Εικόνα 3- 7Α)**, ενώ τα επίπεδα των αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau^{0N4R} είναι σημαντικά μειωμένα μόνο στη συγκέντρωση 250 μM **(Εικόνα 3- 7Β)**. Ο ακριβής λόγος για αυτή την ειδική αναστολή δημιουργίας συσσωματωμάτων στη συγκεκριμένη συγκέντρωση είναι ασαφής, ωστόσο υπήρξε ορατή σε έναν μεγάλο αριθμό τεχνικών και βιολογικών επαναλήψεων.



Εικόνα 3- 7. Ποσοτικοποίηση διαλυτών και αδιάλυτων μορφών hTau^{0N4R}, έπειτα από χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων MetBlu. Κλασμάτωση ομογενοποιημένων κεφαλών από μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N4R} για 12 ημέρες στους 30°C και εν συνεχεία καθίστανται μεταγραφικά ανενεργές για 10 ημέρες στους 18°C υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις MetBlu. **Α)** Στο κλάσμα της διαλυτής hTau δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για καμία συγκέντρωση MetBlu, ενώ παρατηρείται μια μικρή τάση για αύξηση της πρωτεΐνης στη συγκέντρωση 250μM. **Β)** Στο κλάσμα των αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau παρατηρείται δραματική μείωση σε συγκέντρωση 250μM, η οποία αναπαρίσταται με το '*'. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 7**.

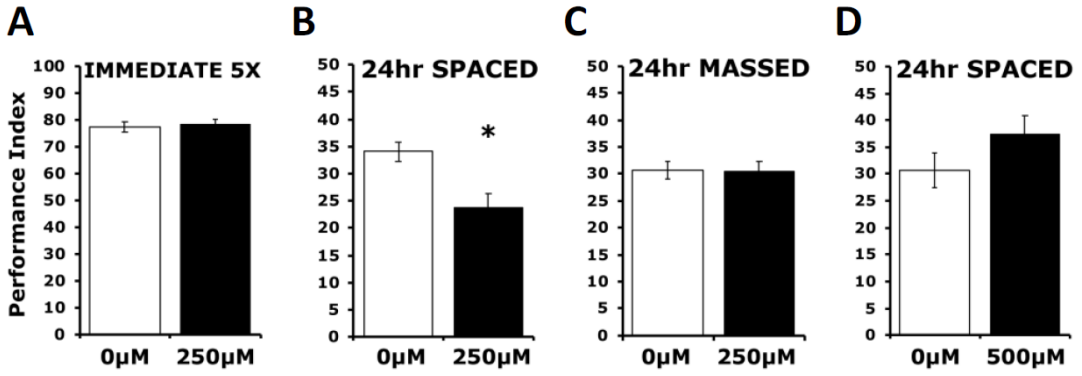
Επιπλέον, η χορήγηση MetBlu σε συγκέντρωση 250 μM για 10 ημέρες και στους 18^{o}C δεν προκάλεσε αύξηση στη θνησιμότητα των ζώων που εκφράζουν την hTau^{0N4R} **(Εικόνα 3- 8)** σε σχέση με τις μύγες στις οποίες δεν χορηγήθηκε φάρμακο, καθώς ούτε και σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου (ποσοστό επιβίωσης πάνω από 98% για όλες τις μύγες) σε αντίθεση με την αυξημένη θνησιμότητα που παρατηρήθηκε στους 30^{o}C **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1B)**. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Schirmer et al., 2011), που έχει δείξει ότι η τοξικότητα του MetBlu πιθανώς να εξαρτάται από τον μεταβολισμό. Για την ποικιλόθερμη Drosophila αναμένεται υψηλότερος μεταβολισμός στους 30^{o}C σε σχέση με τους 18^{o}C και αυτό πιθανόν να αντανακλάται στην έλλειψη τοξικότητας του φαρμάκου στη χαμηλότερη θερμοκρασία σε αυτές τις πρώτες 10 ημέρες.



Εικόνα 3- 8. Καμία μεταβολή στο ποσοστό επιβίωσης, έπειτα από χορήγηση MetBlu σε μύγες hTau^{0N4R} στους 18^{o}C. Η χορήγηση του φαρμάκου σε συγκέντρωση 250μM μαζί με την τροφή για 10 ημέρες στους 18^{o}C δεν προκαλεί καμία αλλαγή του ποσοστού επιβίωσης, ούτε των ζώων πειραματικού ελέγχου (ElavGal4;TubGal80ts>w^{1118}), ούτε των ζώων που εκφράζουν την hTau^{0N4R}. Όλα τα ζώα ανεξαρτήτου γονοτύπου ή χορήγησης ή μη του MetBlu παρουσιάζουν ποσοστό επιβίωσης πάνω από 98%.

Επίσης, σημαντικό είναι ότι χορήγηση MetBlu για 10 ημέρες σε συγκέντρωση 250 μM ή 500 μM δεν προκαλεί καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόδοση των ζώων πειραματικού ελέγχου στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M **(Συμπληρωματική Εικόνα 3- 2 A και B)**. Επομένως, υπό αυτές τις συνθήκες, το φάρμακο δεν φαίνεται να προκαλεί δυσλειτουργία στους νευρώνες ή στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη PSD-M. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην απόδοση των ζώων που εκφράζουν την hTau^{0N4R} και λαμβάνουν το MetBlu για 10 ημέρες σε συγκέντρωση 250 μM, έπειτα από 5 κύκλους εκτεταμένης εκπαίδευσης (5X), σε σχέση με τα ίδια ζώα που δεν λαμβάνουν το φάρμακο **(Εικόνα 3- 9A)**. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάζουν τα ζώα που εκφράζουν την hTau^{0N4R} και λαμβάνουν το MetBlu σε σχέση με τα ίδια ζώα που δεν λαμβάνουν το φάρμακο στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-

M, **(Εικόνα 3- 9B)** και όχι στην ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSI-M, **(Εικόνα 3- 9C)**. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η μείωση των αδιάλυτων συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ επηρεάζει τις διαδικασίες που εμπλέκονται ή απαιτούνται για να μια φυσιολογική PSD μνήμη. Επιπλέον, η χορήγηση μεγαλύτερης συγκέντρωσης MetBlu, 500 μM, συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται μείωση των αδιάλυτων συσσωματωμάτων **(Εικόνα 3- 7B),** δεν επιφέρει καμιά διαφορά στην απόδοση των ζώων στην PSD-M σε σχέση με τα ζώα που δεν λαμβάνουν το φάρμακο, υποστηρίζοντας τα δεδομένα ότι το MetBlu δεν προκαλεί γενικότερη νευρωνική δυσλειτουργία **(Εικόνα 3- 9D)**.



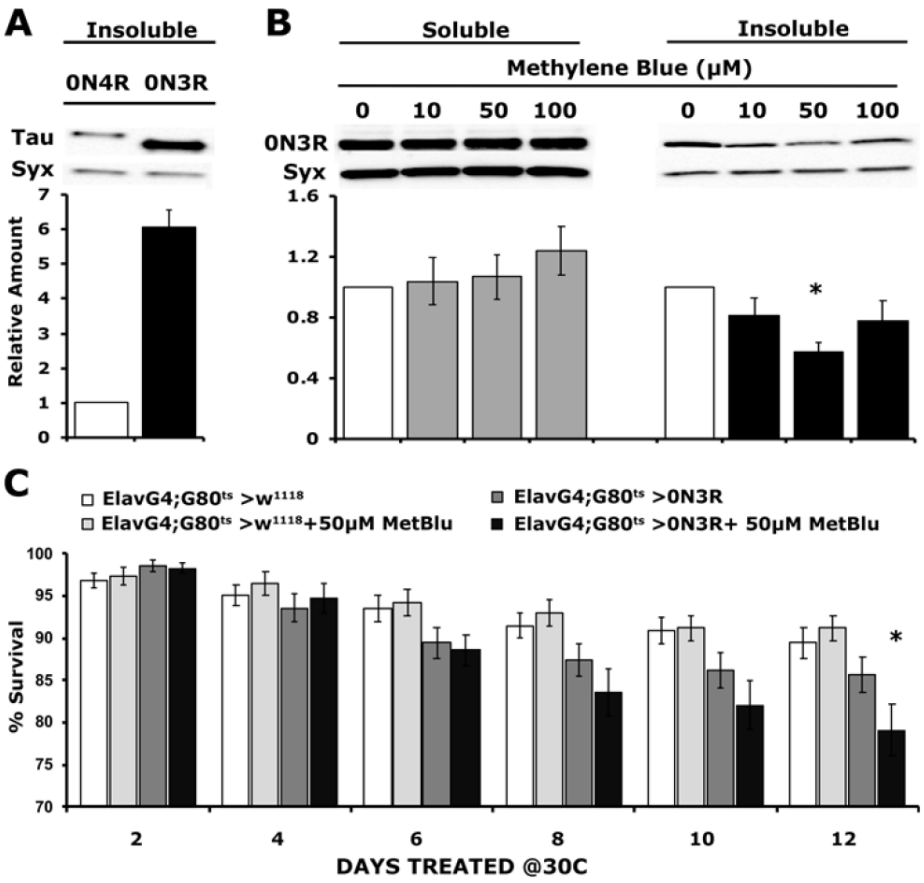
Εικόνα 3- 9. Χορήγηση συγκεκριμένης συγκέντρωσης MetBlu, σε ζώα που βρίσκονται υπό μεταγραφική καταστολή του διαγονιδίου της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ προκαλεί μείωση των αδιάλυτων συσσωματωμάτων και αυξημένα ελλείμματα στην PSD-M. Η καταστολή της μεταγραφής της hTau^{0N4R} πραγματοποιείται με το μηχανισμό που απεικονίζεται στην εικόνα 5A και προκαλεί αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD-M (Εικόνα 6A). Η χορήγηση MetBlu, συγκέντρωσης 250 μM, κατά την μεταγραφική καταστολή δεν προκαλεί μείωση της απόδοσης των ζώων αυτών, έπειτα από 5 κύκλους εκτεταμένης εκπαίδευσης **(A)**, ενώ έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σοβαρών ελλειμμάτων στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M, σε σύγκριση με τα ζώα ιδίου γονοτύπου που δεν έχουν λάβει φάρμακο **(B)** και καμία διαφορά στην ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη PSI-M **(C)**. Η χορήγηση MetBlu σε συγκέντρωση 500μM παρουσιάζει φυσιολογική PSD-M **(D)**. Η έκφραση της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts} σε όλες τις περιπτώσεις. Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές ανάμεσα στις μύγες ιδίου γονοτύπου με ή χωρίς τη χορήγηση φαρμάκου. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 8**.

Συνεπώς, η σχετική αύξηση των συσσωματωμάτων που παρατηρείται κατά την μεταγραφική καταστολή της hTau^{0N4R} πιθανότατα να είναι υπεύθυνη και για την προκύπτουσα αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD-M που παρατηρήθηκε νωρίτερα **(Εικόνα 3- 6 A και B)**. Συλλογικά, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν έντονα ότι ενώ τα συσσωματώματα της hTau^{0N4R} είναι προστατευτικά όσο αφορά των διαδικασιών/μηχανισμών που εμπλέκονται στην PSD-M, τα διαλυτά μόρια της πρωτεΐνης είναι επιβλαβή.

3.4.4. Οι μύγες που εκφράζουν hTau^{0N3R} παρουσιάζουν φυσιολογική PSD-M και αυξημένο ποσό αδιάλυτων συσσωματωμάτων.

Σε αντίθεση με τις μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N4R}, οι μύγες που εκφράζουν την ισομορφή hTau^{0N3R} παρουσιάζουν φυσιολογική συνειρμική μάθηση και φυσιολογική εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M, ακόμη και μετά από επαγωγή της έκφρασης για 12 ημέρες στους 30^{o}C (Sealey et al., 2017). Ποσοτικοποίηση των κλασμάτων που προέρχονται από ομογενοποιημένες κεφαλές ζώων που εκφράζουν την hTau^{0N3R} απέδωσε 6 φορές υψηλότερα ποσά των αδιάλυτων συσσωματωμάτων σε σχέση με τα ζώα που εκφράζουν την hTau^{0N4R} **(Εικόνα 3- 10A),** έπειτα από επαγωγή της έκφρασης για 12 ημέρες στους 30^{o}C. Με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, η διαφορά στην απόδοση των ζώων ανάμεσα στις δυο διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης Τ, οδηγεί στο εύλογο ερώτημα αν η έλλειψη ελλειμμάτων στη μάθηση και στη PSD-M για την hTau^{0N3R} είναι απόρροια της αυξημένης συγκέντρωσης των αδιάλυτων συσσωματωμάτων που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη ισομορφή. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η μείωση σχηματισμού αδιάλυτων συσσωματωμάτων στα ζώα που εκφράζουν την hTau^{0N3R} με χρήση του MetBlu.

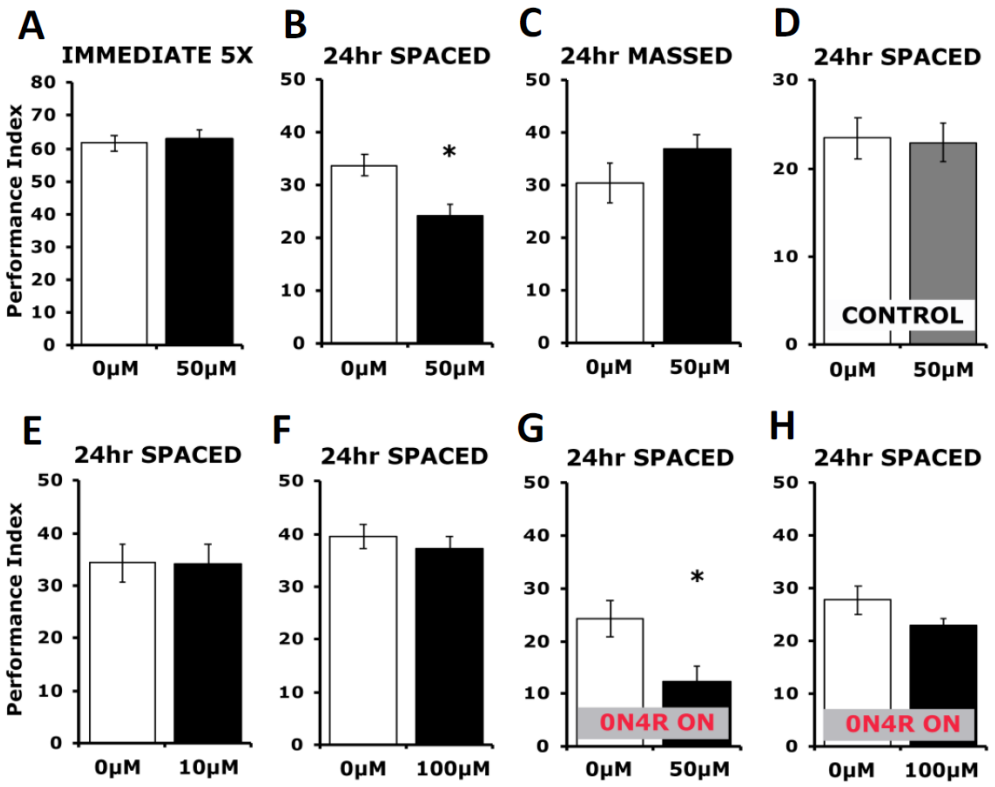
Όπως έχει ήδη αναφερθεί (Sealey et al., 2017), τα ζώα που εκφράζουν την hTau^{0N3R} παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένο βαθμό επιβίωσης και η κατά 50% θνησιμότητα εμφανίζεται 7 ημέρες νωρίτερα από τις μύγες πειραματικού ελέγχου **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1C).** Χορήγηση MetBlu σε αυτές τις μύγες (στους 30^{o}C) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οδήγησε σε ακόμα μεγαλύτερη πρόωρη θνησιμότητα, με το 50% του ποσοστού θνησιμότητας να εμφανίζεται κατά 8 ημέρες νωρίτερα σε συγκεντρώσεις MetBlu άνω των 250 μM **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1C και Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 9)**. Η χορήγηση για 12 ημέρες στους 30^{o}C μικρότερων συγκεντρώσεων MetBlu, οι οποίες δεν είναι τόσο τοξικές με βάση την θνησιμότητα, δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα της διαλυτής hTau^{0N3R} **(Εικόνα 3- 10B)**, ενώ τα επίπεδα των αδιάλυτων συσσωματωμάτων βρέθηκαν αρκετά μειωμένα, ιδιαιτέρως στη συγκέντρωση 50 μM MetBlu **(Εικόνα 3- 10B)**. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο βαθμός επιβίωσης των μυγών που εκφράζουν την hTau^{0N3R} υπό ταυτόχρονη χορήγηση 50 μM MetBlu ήταν αρκετά μειωμένος σε σχέση με τις μύγες ελέγχου, ωστόσο μόνο τη 12^{η} ημέρα, και όχι νωρίτερα, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε σχέση με τις μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} και δε λαμβάνουν το φάρμακο **(Εικόνα 3- 10C)**.



Εικόνα 3- 10. Χορήγηση του MetBlu σε μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} για 12 ημέρες στους 30^{o}C προκαλεί μείωση του ποσοστού των συσσωματωμάτων της. A) κλασμάτωση ομογενοποιήματος από κεφαλές μυγών που εκφράζουν είτε την hTau^{0N4R} είτε την hTau^{0N3R} για 12 ημέρες στους 30^{o}C και ποσοτικοποίηση των συσσωματωμάτων. Οι μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} παρουσιάζουν 6 φορές μεγαλύτερη ποσότητα συσσωματωμάτων σε σχέση με τις μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N4R}. **B)** Κλασμάτωση ομογενοποιήματος από κεφαλές μυγών που εκφράζουν την hTau^{0N3R} για 12 ημέρες στους 30^{o}C με ταυτόχρονη χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων MetBlu (10, 50 και 100μM). Αριστερά απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση του κλάσματος της διαλυτής μορφής και δεξιά του κλάσματος των αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau^{0N3R} υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις MetBlu. **C)** Απεικόνιση του ποσοστού επιβίωσης των μυγών πειραματικού ελέγχου (ElavG4;G80^{ts}>w^{1118}) και των μυγών που εκφράζουν την hTau^{0N3R} χωρίς και με χορήγηση MetBlu 50μM. Στις μύγες πειραματικού ελέγχου δεν υπάρχει καμία επίδραση του φαρμάκου, ενώ στις μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} παρατηρείται αύξηση της τοξικότητας μόνο την 12^{η} ημέρα χορήγησης φαρμάκου. Η έκφραση της 0N3R και 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης T πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4 / TubGAL80^{ts} σε όλες τις περιπτώσεις. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 10**.

Εάν ο αυξημένος αριθμός των αδιάλυτων συσσωματωμάτων είναι όντως υπεύθυνος για την έλλειψη έκπτωσης στην PSD-M για τις μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} για 12 ημέρες, τότε η χορήγηση του MetBlu και η επακόλουθη μείωση των συσσωματωμάτων που παρατηρείται σε αυτές τις μύγες **(Εικόνα 3- 10B)** αναμένεται να προκαλέσει ελλείμματα στη μνήμη αυτή. Για το λόγο αυτό, σε μύγες που

εκφράζουν την hTau^{0N3R} στους 30^{o}C χορηγήθηκε για 12 ημέρες MetBlu 50μM. Στη συγκέντρωση αυτή βρέθηκε ότι δεν επηρεάζεται η απόδοση των ζώων έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση σε σύγκριση με τα ζώα ιδίου γονοτύπου στα οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο **(Εικόνα 3- 11A)**. Ωστόσο, η PSD-M μειώθηκε σημαντικά έπειτα από τη χορήγηση της συγκεκριμένης συγκέντρωσης MetBlu **(Εικόνα 3- 11B)**, σε αντίθεση με τη PSI-M που παρέμεινε αμετάβλητη **(Εικόνα 3- 11C)**. Η ειδικότητα της δράσης του φαρμάκου για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M, υποδηλώνει ότι τα ελλείμματα που παρατηρούνται είναι απίθανο να είναι αποτέλεσμα μη ειδικής τοξικότητας του φαρμάκου. Για την επαλήθευση αυτής της υπόθεσης, χορηγήθηκε φάρμακο ιδίας συγκέντρωσης (MetBlu 50 μM) σε μύγες πειραματικού ελέγχου για 12 ημέρες στους 30^{o}C, δηλαδή στις ίδιες συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν και τα παραπάνω πειράματα και σε συνθήκες που δεν επηρεάζεται η επιβίωσή τους **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1 A)** και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζεται η PSD-M σε σύγκριση με τα ζώα στα οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο **(Εικόνα 3- 11D)**, υποδεικνύοντας ότι τα ελλείμματα που προκύπτουν έπειτα από χορήγηση του φαρμάκου στις μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} δεν είναι αποτέλεσμα τοξικότητας του φαρμάκου. Επιπλέον, σε συγκεντρώσεις του MetBlu (10μM και 100μM) που δεν μειώνονται σημαντικά τα αδιάλυτα συσσωματώματα **(Εικόνα 3- 10B)** της hTau^{0N3R} δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην απόδοση των ζώων στη PSD-M **(Εικόνα 3- 11 E και F)**. Συνεπώς, τα ελλείμματα στη PSD-M για τις μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} εμφανίζονται μόνο έπειτα από χορήγηση MetBlu σε συνθήκες που ελαττώνεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, επιβεβαιώνοντας ανεξάρτητα ότι η συσσώρευση συσσωματωμάτων hTau δεν είναι ανασταλτική και μπορεί στη πραγματικότητα να είναι και προστατευτική έναντι των διεργασιών/μηχανισμών που διέπουν τη εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη.



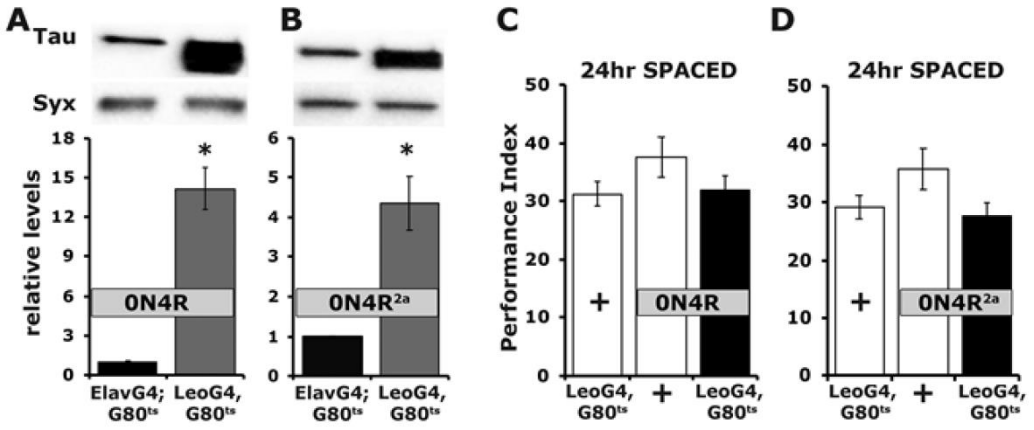
Εικόνα 3- 11. Χορήγηση συγκεκριμένης συγκέντρωσης MetBlu, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau^{0N3R}, προκαλεί ελλείμματα ειδικά ως προς την απόδοση των ζώων στην PSD-M. Η έκφραση των 0N3R και ON4R ισομορφών της πρωτεΐνης T πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts}. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται στους 18^{o}C και οι ενήλικες μύγες τοποθετούνται στους 30^{o}C για 12 ημέρες με ή χωρίς τη χορήγηση MetBlu. Χορήγηση 50μM MetBlu σε μύγες που εκφράζουν την hTau^{0N3R} για 12 ημέρες δεν επηρεάζει την απόδοση των ζώων έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση **(A)**. Ωστόσο, προκαλεί σημαντικά ελλείμματα στην PSD-M σε σύγκριση με τα ζώα ιδίου γονοτύπου στα οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο **(B)** σε αντίθεση με την PSI-M που παραμένει αμετάβλητη **(C)**. Χορήγηση ιδίας συγκέντρωσης MetBlu και στις ίδιες συνθήκες στις μύγες πειραματικού ελέγχου δεν προκαλεί καμία αλλαγή στην απόδοση των ζώων στην PSD-M **(D)**. Επίσης, χορήγηση διαφορετικής συγκέντρωσης MetBlu, 10μM **(E)** ή 100μM **(F)**, η οποία δεν μειώνει σημαντικά τον σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων, δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην απόδοση των ζώων που εκφράζουν την hTau^{0N3R} στην PSD-M **(E,F)**. Χορήγηση MetBlu σε συγκέντρωση που μειώνει το σχηματισμό συσσωματωμάτων στην 0N4R ισομορφή επιδεινώνει τα ήδη υπάρχοντα ελλείμματα στην PSD-M **(G)**, ενώ δεν υπάρχει διαφορά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου, 100μM, όπου δεν μεταβάλλεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων **(H)**. Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές στις μύγες ιδίου γονοτύπου με ή χωρίς τη χορήγηση φαρμάκου. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 11**.

Αντίστοιχα, η ελλειμματική μνήμη που παρουσιάζεται στα ζώα που εκφράζουν την hTau^{0N4R} για 12 ημέρες στους 30^{o}C **(Εικόνα 3- 1B)** επιδεινώνεται ακόμα περισσότερο έπειτα από χορήγηση MetBlu συγκέντρωσης 50μM **(Εικόνα 3- 11G),** ενώ δεν επηρεάζεται έπειτα από χορήγηση MetBlu συγκέντρωσης 100μM **(Εικόνα 3- 11H)**,

συγκεντρώσεις οι οποίες δεν επηρεάζουν το βαθμό επιβίωσής τους **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1 Β)** και μόνο η πρώτη από αυτές επηρεάζει τη συσσώρευση συσσωματωμάτων. Συμπερασματικά, η αναστολή σχηματισμού των αδιάλυτων συσσωματωμάτων για δυο διαφορετικές ισομορφές της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ (0N4R και 0N3R) έχει ως αποτέλεσμα ελλείμματα ειδικά ως προς την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M.

3.4.5. Ο σχηματισμός αδιάλυτων συσσωματωμάτων στα μισχοειδή σωμάτια προκαλεί φυσιολογική PSD-M, ενώ η ελάττωση τους έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελλειμματικής μνήμης.

Οι νευρώνες των μισχοειδών σωματίων (MBs) εμπλέκονται στη δημιουργία της εξαρτώμενης από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμης (PSD-M), (Cognigni et al., 2018); (Davis et al., 2005), ενώ η έκφραση της hTau σε αυτά έχει αναφερθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελλειμμάτων στη μάθηση και βραχυπρόθεσμη μνήμη, αφήνοντας όμως τους νευρώνες αυτούς δομικά φυσιολογικούς (Mershin et al., 2004). Ωστόσο, δεν έχει εξεταστεί μέχρι τώρα αν η έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ εντός των νευρώνων των μισχοειδών σωματίων ειδικά σε ενήλικα ζώα οδηγεί σε ελλειμματική μνήμη. Για να προσδιοριστεί εάν η PSD-M μεταβάλλεται, όταν εκφράζεται η $hTau^{0N4R}$ εντός των νευρώνων αυτών χρησιμοποιήθηκε ένας ισχυρός επαγωγέας ειδικός για τα μισχοειδή σωμάτια, ο $LeoGal4;TubG80^{ts}$ (Messaritou et al., 2009). Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 18^{o}C και η έκφραση της 0N4R ισομορφής της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ διεξήχθη έπειτα από μεταφορά των ενηλίκων μυγών στους 30^{o}C για 12 ημέρες. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ υπό τον επαγωγέα $LeoGal4;TubG80^{ts}$ παρατηρήθηκε ότι είναι πολύ αυξημένα σε σύγκριση με αυτά που προκύπτουν υπό τον παν-νευρωνικό επαγωγέα $ElavGal4;TubG80^{ts}$ **(Εικόνα 3- 12Α)** και αυτό επαληθεύτηκε και με ένα δεύτερο διαγονίδιο, το $0N4R^{2a}$ **(Εικόνα 3- 12Β)**. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η έκφραση υπό τον επαγωγέα LeoGal4 γίνεται σε μικρό αριθμό νευρώνων (Messaritou et al., 2009) σε σύγκριση με τον παν-νευρωνικό επαγωγέα ElavGal4 (Robinow et al., 1988), υποδεικνύεται ότι μια πολύ μεγάλη περίσσεια της hTau συσσωρεύεται σε αυτούς τους ~4500 MB νευρώνες (Aso et al., 2009) σε αυτές τις 12 ημέρες επαγωγής έκφρασης του διαγονιδίου. Ωστόσο έκπληξη αποτελεί το γεγονός ότι παρά την πολύ μεγάλη συσσώρευση της hTau σε αυτούς τους νευρώνες, δεν επηρεάζεται η PSD-M ούτε στα ζώα που εκφράζουν το διαγονίδιο 0N4R **(Εικόνα 3- 12C)** ούτε σε αυτά που εκφράζουν το διαγονίδιο $0N4R^{2a}$ **(Εικόνα 3- 12D)**. Συγκεντρωτικά αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα επίπεδα έκφρασης της hTau από μόνα τους δεν είναι επαρκή για τη νευρωνική δυσλειτουργία.

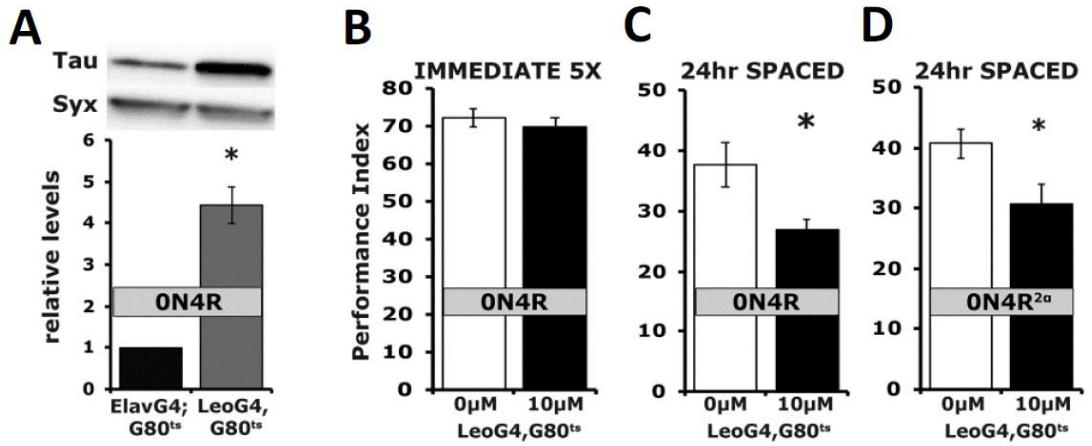


Εικόνα 3- 12. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ στα μισχοειδή σωμάτια δεν είναι επαρκή για τη δημιουργία ελλειμμάτων στην PSD-M. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων από κεφαλές μυγών που εκφράζουν παν-νευρωνικά (Elav-GAL4 /TubGAL80^{ts}) ή σε όλα τα μισχοειδή σωμάτια (Leo-GAL4;TubGAL80^{ts}) για 12 ημέρες στους 30^{o}C είτε το διαγονίδιο 0N4R **(A)** είτε το διαγονίδιο 0N4R^{2α} **(B)**. Η έκφραση υπό τον επαγωγέα-ειδικό για τα μισχοειδή σωμάτια επιφέρει σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης που επάγονται υπό τον παν-νευρωνικό επαγωγέα και η στατιστικά σημαντική αυτή διαφορά αναπαρίσταται με '*' **(A,B)**. Η έκφραση των διαγονιδίων 0N4R **(C)** και 0N4R^{2α} **(D)** υπό τον ειδικό για τα μισχοειδή σωμάτια επαγωγέα Leo-GAL4;TubGAL80^{ts} για 12 ημέρες στους 30^{o}C δεν επιφέρει ελλείμματα στην PSD-M **(C,D)** σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 12**.

Επιπλέον, έπειτα από κλασμάτωση των προϊόντων λύσης από ομογενοποιημένες κεφαλές ζώων που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ, υπό τον επαγωγέα LeoGal4, βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα των αδιάλυτων μορφών της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με εκείνα που προκύπτουν έπειτα από επαγωγή έκφρασης υπό τον επαγωγέα ElavGal4 **(Εικόνα 3- 13A)** και πιθανόν σε αυτά να οφείλεται η έλλειψη της εξαρτώμενης από την πρωτεΐνη Τ δυσλειτουργίας στα μισχοειδή σωμάτια. Δεδομένης της εξαρτώμενης από την θερμοκρασία τοξικότητας του MetBlu και του περιορισμένου αριθμού των νευρώνων που στοχεύονται με τη χρήση του επαγωγέα LeoGal4, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση 10 μM MetBlu για την αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων την πρωτεΐνης Τ, μιας συγκέντρωσης η οποία δεν έχει σημαντικές επιπτώσεις στην επιβίωση των μυγών πειραματικού ελέγχου **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1A)** ή των μυγών που εκφράζουν παν-νευρωνικά τη hTau^{0N4R} **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1B)**.

Η χορήγηση του MetBlu συγκέντρωσης 10 μM στις μύγες, πραγματοποιήθηκε επί 12 ημέρες στους 30^{o}C και δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην απόδοση των ζώων έπειτα από παρατεταμένη εκπαίδευση **(Εικόνα 3- 13B)**, υποδεικνύοντας την έλλειψη της γενικότερης τοξικότητας του φαρμάκου και τη φυσιολογική λειτουργία του ΚΝΣ, όπως και προηγουμένως. Αντίθετα, η εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M, παρουσίασε σημαντικά ελλείμματα στις μύγες που εκφράζουν το

διαγονίδιο 0N4R **(Εικόνα 3- 13C)** είτε το διαγονίδιο 0N4R^{2a} **(Εικόνα 3- 13D)** σε σχέση με τα ζώα ιδίου γονοτύπου που δεν έλαβαν φάρμακο.



Εικόνα 3- 13. Χορήγηση συγκεκριμένης συγκέντρωσης MetBlu, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων της hTau^{0N4R}, προκαλεί ελλείμματα στην PSD-M. Η έκφραση των διαγονιδίων 0N4R και ON4R^{2a} πραγματοποιείται υπό τον επαγωγέα Leo-GAL4;TubGAL80^{ts} ή τον επαγωγέα Elav-GAL4;TubGAL80^{ts}. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται στους 18^{o}C και οι ενήλικες μύγες τοποθετούνται στους 30^{o}C για 12 ημέρες με ή χωρίς τη χορήγηση MetBlu. **A)** Κλασμάτωση των προϊόντων λύσης από ομογενοποιημένες κεφαλές ζώων που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ υπό τους επαγωγείς Elav-GAL4;TubGAL80^{ts} και Leo-GAL4;TubGAL80^{ts}. Η επαγωγή έκφρασης στα μισχοειδή σωμάτια έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερα επίπεδα των αδιάλυτων συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ σε σύγκριση με εκείνα που προκύπτουν από την επαγωγή έκφρασης με τον παν-νευρωνικό επαγωγέα. **B-D)** Χορήγηση 10μM MetBlu σε μύγες που εκφράζουν τα διαγονίδια 0N4R και ON4R^{2a} για 12 ημέρες στους 30^{o}C δεν επηρεάζει την απόδοση των ζώων έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση **(B)**, ενώ προκαλεί σημαντικά ελλείμματα στην PSD-M **(C,D)** σε σύγκριση με τα ζώα ιδίου γονοτύπου στα οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο. Το '*' υποδεικνύει τις διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές στις μύγες ιδίου γονοτύπου με ή χωρίς τη χορήγηση φαρμάκου. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 13**.

Συμπερασματικά, η συσσώρευση των αδιάλυτων συσσωματωμάτων hTau στα μισχοειδή σωμάτια δεν επιφέρει νευρωνική δυσλειτουργία, η οποία εκδηλώνεται ως ελλείμματα PSD-M, σε αντίθεση με τη διαλυτή hTau και πιθανόν και τα GTO που φαινομενικά επιφέρουν.

3.5. Συζήτηση

3.5.1. Αντιστροφή ελλειμμάτων στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη σε ενήλικα ζώα που εκφράζουν τη πρωτεΐνη Τ.

Τα ελλείμματα στην μνήμη που είναι χρόνο-εξαρτώμενα και πιθανότατα αντικατοπτρίζουν την εξέλιξη της νόσου, είναι χαρακτηριστικό των περισσότερων

σποραδικών Τ-πρωτεϊνοπαθειών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν εμπλέκουν μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Τ, όπως το AD (Delacourte et al., 2005); (Lee et al., 2001). Τα ελλείμματα στη συνειρμική μάθηση και στη μνήμη PSD με τρόπο χρόνο-εξαρτώμενο εμφανίζονται ξεκάθαρα και στο συγκεκριμένο μοντέλο της Drosophila με την επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης Τ σε ενήλικα άτομα [Εικόνα 3-1 και (Sealey et al., 2017)]. Ωστόσο, δεν είναι σαφές μέχρι τώρα εάν αυτά τα ελλείμματα στη μνήμη είναι απόρροια μη αναστρέψιμων δυσλειτουργιών ή εκφυλισμένων νευρώνων. Προηγούμενες έρευνες σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών με ρυθμιζόμενη έκφραση των μεταλλάξεων P301L και ΔK280 στο γενετικό υπόβαθρο της 0N4R ισομορφής, οι οποίες σχετίζονται με τη FTDP νόσο, έδειξαν ότι η καταστολή έκφρασης της hTau βελτιώνει τη μνήμη, χωρίς όμως να μειώνει και τα μεγάλα συσσωματώματα (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al.,2011); (Van der Jeugd et al., 2012).

Η παρούσα έρευνα, από όσο γνωρίζουμε, είναι η πρώτη που παρουσιάζει αναστροφή της ελλειμματικής μνήμης έπειτα από καταστολή της έκφρασης της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ αγρίου τύπου. Μαζί με τα δεδομένα από τις έρευνες στο ποντίκι, τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα ελλείμματα στη μνήμη δεν είναι απόρροια μη αναστρέψιμων κατεστραμμένων νευρώνων από την έκφραση αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης Τ. Πιθανόν, τα γνωστικά ελλείμματα να προκύπτουν από δυσλειτουργικούς αλλά άθικτους νευρώνες και ίσως να είναι επίσης φαρμακολογικά αναστρέψιμα και σε ασθενείς, τουλάχιστον πριν τα μεταγενέστερα εκφυλιστικά στάδια της νόσου (Braak et al., 1996); (Lee et al., 2001); (Papanikolopoulou et al., 2020).

Επιπλέον, με τη παρούσα έρευνα αποδεικνύουμε ότι η περίσσεια των ισομορφών 0N3R και 0N4R στο ΚΝΣ δημιουργεί ελλείμματα ειδικά για την PSD-M **(Εικόνα 3-4 A-D, Εικόνα 3-9 A-D, Εικόνα 3-11 A-C).** Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι η περίσσεια της πρωτεΐνης Τ δεν οδηγεί σε γενική δυσλειτουργία του ΚΝΣ της μύγας αλλά προφανώς επιδρά σε συγκεκριμένες διεργασίες συμπεριλαμβανομένων και των μηχανισμών που είναι απαραίτητοι για το σχηματισμό της εξαρτώμενης από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμης. Σε πρόσφατη μελέτη με χρήση ζώων Drosophila στα οποία έχει εξαλειφθεί η ενδογενής πρωτεΐνη Τ, βρέθηκε ότι έχουν αυξημένη μετάφραση και ενισχυμένη PSD-M ενώ η υπερέκφραση της παρουσιάζει προβλήματα και στις δύο διαδικασίες, με αποτέλεσμα να παρέχει σαφής αποδείξεις για το ρόλο της πρωτεΐνης Τ στην αρνητική ρύθμιση της μετάφρασης (Papanikolopoulou et al., 2019). Σε αντίθεση, στη συγκεκριμένη έρευνα βρέθηκε ότι η ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSI-M, μένει ανεπηρέαστη, παρέχοντας επιπλέον στήριξη της ιδέας ότι η περίσσεια της διαλυτής πρωτεΐνης Τ δεν είναι αυτή καθαυτή τοξική στο ΚΝΣ της μύγας. Επιπλέον, έχει αναφερθεί σε άλλη έρευνα ότι η PSI-M εξαρτάται τουλάχιστον εν μέρει από τη σταθερότητα της νηματώδους F-ακτίνης (Kotoula et al., 2017) και σε συνάρτηση με το γεγονός ότι σε

άλλες έρευνες έχει αναφερθεί ότι η περίσσεια hTau στο ΚΝΣ της μύγας σταθεροποιεί την F-ακτίνη (Fulga et al., 2007), μπορούμε να κατανοήσουμε το λόγο για τον οποίο η PSI-M παραμένει άθικτη υπό αυτές τις συνθήκες.

3.5.2. Η αυξημένη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ στο ΚΝΣ ενηλίκων μυγών συσχετίζεται με την καταστολή των ελλειμμάτων PSD-M.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από το μοντέλο ποντικού για την μετωποκροταφική άνοια, στη Drosophila βρέθηκε ότι τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ παραμένουν για τουλάχιστον 10 ημέρες μετά την αποσιώπηση της έκφρασής της και προφανώς αποτελούν και το κύριο κλάσμα της ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ **(Εικόνα 3- 5 C και D)**. Επιπροσθέτως, στην ισομορφή 0N3R της πρωτεΐνης Τ, τα συσσωματώματα αποτελούν το κύριο κλάσμα στη μύγα ακόμα και όταν το διαγονίδιο είναι πλήρως μεταγραφικά ενεργό για 12 ημέρες **(Εικόνα 3-10A)**. Η αυξημένη τάση της ισομορφής 0N3R της πρωτεΐνης Τ για συσσωμάτωση μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη φωσφορυλίωσή της έναντι της αντίστοιχης φωσφορυλίωσης της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ στο ΚΝΣ της Drosophila (Sealey et al., 2017). Ένα άλλο ενδεχόμενο για την αυξημένη συσσωμάτωση που παρατηρείται στην ισομορφή 0N3R μπορεί να είναι το γεγονός ότι η συγκεκριμένη ισομορφή έχει μειωμένη συγγένεια για τους μικροσωληνίσκους σε σχέση με την 0N4R ισομορφή με αποτέλεσμα να καθίσταται ένα μεγάλο ποσοστό αυτής της ισομορφής αδέσμευτο και πιο επιρρεπή στη συσσωμάτωση (Goode et al.,2000). Ενδιαφέρον επίσης έχει το γεγονός ότι όταν η έκφραση της ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ περιορίζεται μόνο στους ~4500 νευρώνες των μισχοειδών σωματίων (MB), με χρήση του πολύ ισχυρού επαγωγέα LeoGal4, παρατηρείται αύξηση των συσσωματωμάτων ακόμα και χωρίς την αποσιώπηση του διαγονιδίου σε σχέση με τα επίπεδα που παρατηρήθηκαν με χρήση του παν-νευρωνικού επαγωγέα ElavGal4 (~$1x10^5$ νευρώνες) σε παρόμοιες συνθήκες **(Εικόνα 3- 12 A και B)**. Αυτό υποδεικνύει ότι η συσσωμάτωση ευνοείται με τη συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ εντός συγκεκριμένων νευρώνων, όπως έχει προταθεί και από άλλες μελέτες in vitro (Montejo de Garcini et al., 1986); (von Bergen et al., 2000). Επιπλέον, αυτό δικαιολογεί την επιλογή μας να συνδυάσουμε τα δύο νέα διαγονίδια 0N4R έτσι ώστε η έκφραση hTau του προκύπτοντος $0N4R^{2a}$ να προσεγγίζει εκείνη του αρχικού τυχαίως εισαχθέντος διαγονιδίου 0N4R (Wittmann et al., 2001) **(Εικόνα 3- 3)**.

Τα μη διαλυτά συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ έχουν συνδεθεί άρρηκτα με τις νευροεκφυλιστικές Τ- πρωτεϊνοπάθειες (Delacourte et al., 2000); (Geschwind et al., 2003); (Trojanowski et al., 2005) και τα μεγαλύτερα συσσωματώματα, όπως τα NFT θεωρείται ότι συμβάλλουν στη τοξικότητα αλλά σε μεταγενέστερο στάδιο. Ωστόσο, πολλά είναι τα στοιχεία πλέον που υποδεικνύουν ότι τα διαλυτά ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ και πιθανώς και τα μικρά μη διαλυτά συσσωματώματα όπως τα GTOs

(Cowan et al., 2013), διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη δυσλειτουργία και τοξικότητα, ενώ άμεσες ενδείξεις για το ρόλο των μεγάλων μη διαλυτών συσσωματωμάτων σε αυτές τις διαδικασίες παραμένουν ελάχιστες (Arendt et al., 2016); (Cowan et al., 2013); (Wang et al., 2015). Στην πραγματικότητα έχει δειχθεί ότι μπορεί να επέρχεται εκφύλιση των νευρώνων και χωρίς τη δημιουργία NFTs (Papanikolopoulou et al., 2011); (Wang et al., 2015); (Wittmann et al., 2001).

Τα δεδομένα στη παρούσα έρευνα υποστηρίζουν σθεναρά την άποψη ότι τα μη διαλυτά συσσωματώματα είναι προστατευτικά σε νευρωνικές διεργασίες (ή έστω τις επιτρέπουν), οι οποίες αποτελούν τη βάση για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSD-M. Αυτό έρχεται σε συμφωνία, εν μέρει, με άλλες ερευνητικές μελέτες που δείχνουν ότι στο μοντέλο μετωποκροταφικής άνοιας του ποντικού, τα συσσωματώματα παραμένουν, ενώ η γνωστική λειτουργία βελτιώνεται (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al., 2011); (Van der Jeugd et al., 2012).

Στη παρούσα έρευνα αποδείξαμε ότι η αποσιώπηση της διαγονιδιακής έκφρασης σε ζώα που εκφράζουν την ισομορφή 0N4R της πρωτεΐνης Τ έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD-M μνήμη και συσχετίζεται άμεσα με την αύξηση των μη διαλυτών συσσωματωμάτων **(Εικόνα 3- 5 Ε και Εικόνα 3- 6)**. Αντίθετα, η ελλειμματική μνήμη διατηρείται έπειτα από την αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων με χορήγηση του MetBlu και ταυτόχρονη διαγονιδιακή αποσιώπηση **(Εικόνα 3- 9Β)**. Ενώ, σε συγκεντρώσεις του MetBlu που δεν επηρεάζεται ο σχηματισμός των συσσωματωμάτων της ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ δεν επηρεάζεται η PSD-M **(Εικόνα 3- 9 D)**. Επιπλέον, η χορήγηση MetBlu σε συγκέντρωση που αναστέλλεται ο σχηματισμός των συσσωματωμάτων και σε συνθήκες χωρίς διαγονιδιακή αποσιώπηση (έκφραση 12 ημέρες στους 30^{o}C: συνθήκες στις οποίες η 0N4R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ δημιουργεί ελλείμματα στη PSD-M) έχει ως αποτέλεσμα την επαύξηση του ελλείμματος στη PSD-M **(Εικόνα 3- 11 G).** Επιπροσθέτως, η έκφραση της ισομορφής 0N4R της πρωτεΐνης Τ εντός των μισχοειδών σωματίων απέδωσε φυσιολογική PSD-M, πιθανότατα λόγω της υπερβολικής συσσωμάτωσής της **(Εικόνα 3- 12 A-D)**, ενώ σημαντικά ελλείμματα παρουσιάστηκαν έπειτα από χορήγηση του MetBlu σε συγκέντρωση η οποία αναστέλλει το σχηματισμό των συσσωματωμάτων **(Εικόνα 3- 13C και D)**.

Επιπλέον αποδείξεις έναντι του ρόλου των συσσωματωμάτων, ειδικά για την PSD-M, απέδωσε η χρήση μιας δεύτερης ισομορφής της πρωτεΐνης Τ, η 0N3R ισομορφή. Η έκφραση της 0N3R ισομορφής για 12 ημέρες στους 30^{o}C, αποδίδει φυσιολογική μάθηση και μνήμη στα ζώα αυτά (Sealey et al., 2017), ενώ σε σύγκριση με την 0N4R ισομορφή παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα συσσωματωμάτων **(Εικόνα 3- 10Α)**. Η χορήγηση του MetBlu στις μύγες αυτές που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελλειμμάτων στην PSD-M **(Εικόνα 3- 11 Β)** ακριβώς όπως και στη περίπτωση της έκφρασης της 0N4R ισομορφής στα μισχοειδή σωμάτια

(Εικόνα 3- 13 C). Κοινό χαρακτηριστικό και στις δύο αυτές περιπτώσεις ήταν η σχετική αφθονία των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ **(Εικόνα 3- 10 Α και Εικόνα 3- 13 Α)**.

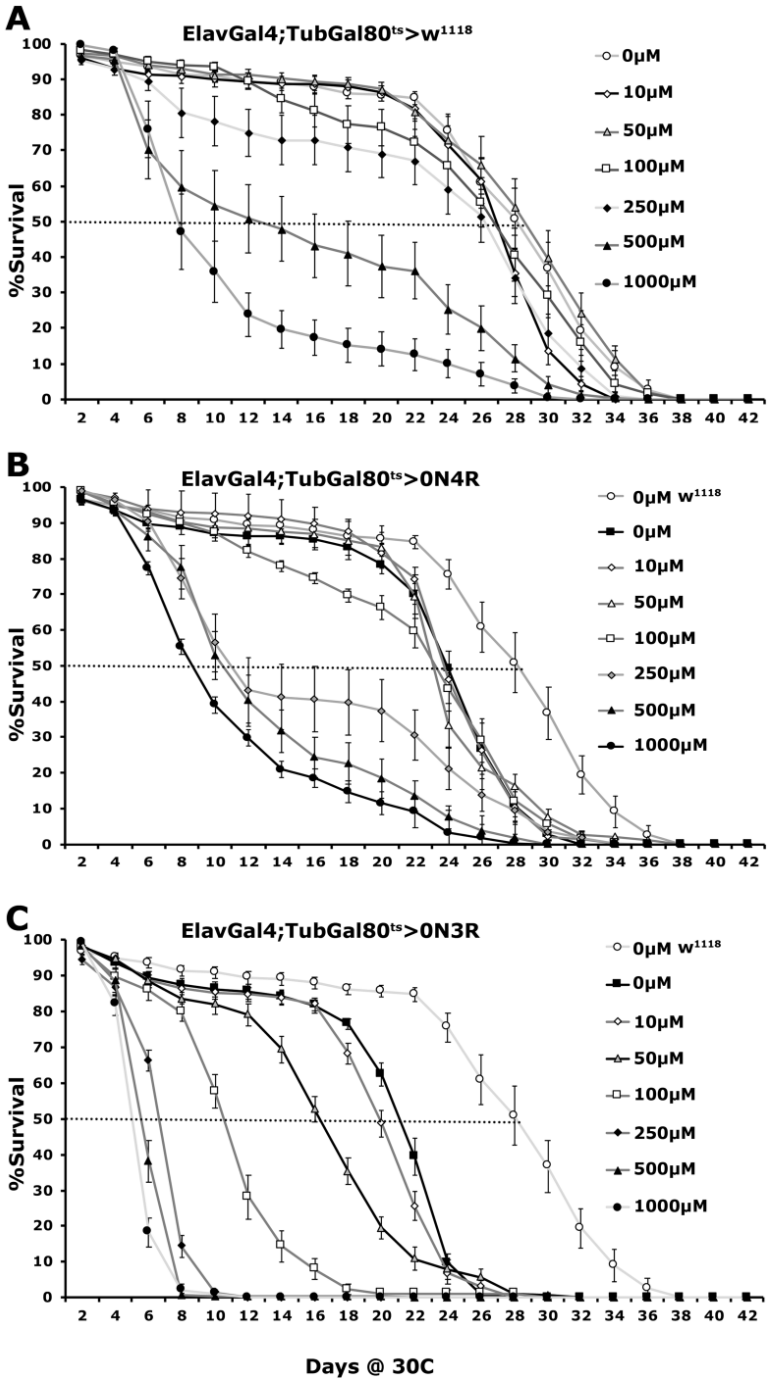
Συμπερασματικά, τα μη διαλυτά συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ δεν εμποδίζουν τις νευρωνικές διεργασίες που απαιτούνται για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη PSD-M στη *D. melanogaster* και μπορεί ακόμα και να δρουν προστατευτικά έναντι των κυτταρικών αποκρίσεων που επέρχονται λόγω της αυξημένης φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, όπως προτείνεται και σε άλλες μελέτες (Wang et al., 2015). Αντίθετα, τα μικρά διαλυτά ολιγομερή ή τα μονομερή, διμερή και τριμερή της πρωτεΐνης Τ μπορεί να δρουν παρεμποδιστικά στις διεργασίες που απαιτούνται για την PSD-M. Επιπλέον, η αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων των 0N4R και 0N3R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ, σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις του MetBlu και υπό συνθήκες μέγιστης έκφρασης των διαγονιδίων (30^{o}C) μείωσε δραματικά τη διάρκεια ζωής των μυγών **(Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1)**. Συνεπώς, η αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων ή η προκύπτουσα περίσσεια των διαλυτών ολιγομερών ή ο συνδυασμός και των δύο, έχει ως αποτέλεσμα την τοξικότητα στο ΚΝΣ, όπως αυτή φαίνεται με την πρόωρη θνησιμότητα.

Σε διάφορες μελέτες στο μοντέλο μετωποκροταφικής άνοιας του ποντικού έχει δειχτεί ότι η θεραπεία ή η πρόληψη με MetBlu αποτρέπει ή επαναφέρει τις γνωστικές λειτουργίες (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al., 2011); (Van der Jeugd et al., 2012), αλλά οι επιδράσεις του φαρμάκου δεν έχουν πλήρως αξιολογηθεί. Ωστόσο, το MetBlu όταν δοκιμάστηκε σε ασθενείς ως θεραπεία για την αναστολή της συσσωμάτωσης στο AD και πέρασε στις δοκιμές φάσης III, δεν απέδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα (Gauthier et al., 2016) πιθανότατα επειδή δεν αναστέλλει το σχηματισμό των GTOs (Soeda et al., 2015), τα οποία συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα. Μέχρις στιγμής δεν γνωρίζουμε τη διαμόρφωση των συσσωματωμάτων και των ολιγομερών που σχηματίζονται στο ΚΝΣ της μύγας, υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία. Ως εκ τούτου δεν γνωρίζουμε εάν τα GTOs περιλαμβάνονται ή όχι στα συσσωματώματα που απομένουν έπειτα την επεξεργασία με MetBlu και αν είναι αυτά ή τα διαλυτά ολιγομερή που προκαλούν τα ελλείμματα στην PSD-M μνήμη. Ωστόσο, πρόσφατα αποτελέσματα από το μοντέλο ποντικού FTDP υποδεικνύουν ότι τα διαλυτά ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ που φέρει τη μετάλλαξη P301L, είναι υπεύθυνα για την εξέλιξη της νόσου (Shin et al., 2020).

Συλλογικά τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας μαζί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών υποδεικνύουν ότι φάρμακα που προωθούν τη συσσωμάτωση (Dominguez-Meijide et al., 2020) μπορεί να είναι καταλληλότερα για την θεραπεία

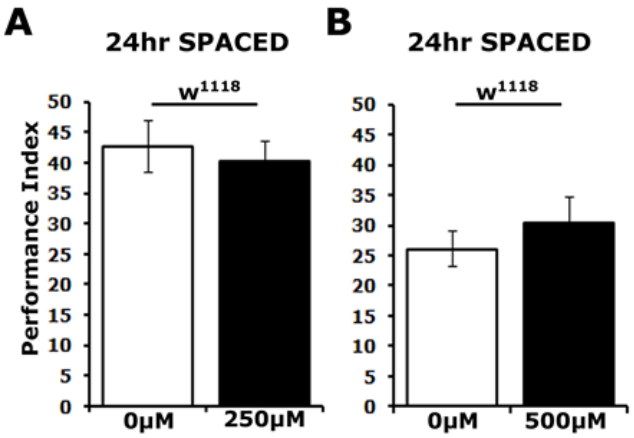
των γνωστικών ελλειμμάτων σε ασθενείς με AD παρά τα φάρμακα τα οποία δρουν ανασταλτικά της συσσωμάτωσης, όπως το MetBlu.

3.6. Συμπληρωματικά Δεδομένα



Συμπληρωματική Εικόνα 3 - 1. Διαφορική επίδραση στην θνησιμότητα των διαφορετικών συγκεντρώσεων του MetBlu για τις μύγες πειραματικού ελέγχου και για τις μύγες που εκφράζουν τις ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης Τ. Καμπύλες επιβίωσης έπειτα από χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων MetBlu (0, 10, 50, 100, 250, 500 και 1000μM) σε μύγες πειραματικού ελέγχου **(A)** και στις μύγες που εκφράζουν την ισομορφή 0N4R **(B)** ή την ισομορφή 0N3R **(C)** της πρωτεΐνης Τ. **A)** Η χορήγηση του MetBlu μέσω της τροφής στις μύγες πειραματικού ελέγχου (ετεροζυγώτες ElavGal4;TubGal80^{ts}>w^{1118}), δεν επηρεάζει σημαντικά το βαθμό επιβίωσης των μυγών σε συγκεντρώσεις 10-250μM, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλεί πρόωρη θνησιμότητα

και συγκεκριμένα στη συγκέντρωση 500 μM το 50% των μυγών αποβιώνει νωρίτερα κατά 16 ημέρες και στη συγκέντρωση 1 mM κατά 22 ημέρες. **B)** Η χορήγηση MetBlu σε συγκεντρώσεις 10-100 μM δεν αλλάζει το σημείο, όπου έχουμε το 50% επιβίωσης στις μύγες που εκφράζουν την $hTau^{0N4R}$ σε σχέση με τις μύγες που δεν έλαβαν MetBlu, ωστόσο το μειώνουν κατά 5 ημέρες σε σχέση με αυτό των ζώων πειραματικού ελέγχου. Σε συγκεντρώσεις 250 μM και 500 μM MetBlu, το ποσοστό επιβίωσης 50% ελαττώνεται κατά 15 ημέρες, ενώ σε συγκέντρωση 1 mM κατά 17 ημέρες. C) Τα ζώα που εκφράζουν την $hTau^{0N3R}$ παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένο βαθμό επιβίωσης και η κατά 50% θνησιμότητα εμφανίζεται 7 ημέρες νωρίτερα από τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Το 50% του ποσοστού θνησιμότητας εμφανίζεται κατά 8 ημέρες νωρίτερα σε συγκεντρώσεις MetBlu άνω των 250 μM. Στατιστικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται στους **Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 5, 3- 6 και 3- 9**.



Συμπληρωματική Εικόνα 3- 2. Η χορήγηση MetBlu σε μύγες πειραματικού ελέγχου δεν προκαλεί αλλαγές στην απόδοση της PSD-M. Η χορήγηση MetBlu σε μύγες πειραματικού ελέγχου, w^{1118}, για 10 ημέρες στους 18^{o}C και σε συγκέντρωση 250 μM (A) ή 500 μM (B) δεν προκαλεί καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (A: p=0.6584, Dunnett's test, n>12 ανά συνθήκη, B: p=0.4115, Dunnett's test, n>12 ανά συνθήκη) στην απόδοση στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη, PSD-M (24hr Spaced).

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	t-Ratio	p
Εικόνα 3-2 Α.	**ANOVA $F_{(2,40)}$ =3.136, p=0.0549**		
w^{1118}>0N4R	65.774 ± 1.955		
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	68.305 ± 1.583	1.053	0.3112
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	71.697 ± 1.567	6.179	**0.0174**
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	68.305 ± 1.583		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	71.697 ± 1.567	2.026	0.1628
Εικόνα 3-2 Β.	**ANOVA $F_{(2,47)}$ =3.202, p=0.0501**		
w^{1118}>0N4R	17.937 ± 1.609		
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	27.051 ± 3.348	5.574	0.0226
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	25.300 ± 2.854	3.874	0.0552
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	27.051 ± 3.348		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	25.300 ± 2.854	0.2116	0.6477
Εικόνα 3-3.	**ANOVA $F_{(3,18)}$ =135.648, p=4.3164e-11**		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	1		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{a1}	0.08779 ± 0.0199	272.781	**4.9499e-11**
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{a2}	0.05450 ± 0.0059	293.052	**2.9662e-11**
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	0.64758 ± 0.0804	36.188	**2.36462e-5**

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 1. Στατιστική ανάλυση εικόνων 3-2 και 3-3.

3-2 Α-Β: Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στη μάθηση έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση των ζώων (Immediate 5X) **(Α)** και στην ανεξάρτητη της πρωτεϊνικής σύνθεσης μνήμη (PSI-M, 24HR Massed) **(Β)** υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Μετά την σημαντική ANOVA, πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων του κάθε γενοτύπου με τρόπο που αναπαρίσταται στον πίνακα πραγματοποιήθηκαν.

3-3: Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου (του τυχαία εισαγόμενου διαγονιδίου 0N4R) ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση. Με έντονο μαύρο αναπαρίστανται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	t-Ratio	p
Εικόνα 3-4 B.	**ANOVA $F_{(2,42)}$ =13.829,**		**p=2.7206e-5**
w^{1118}>0N4R^{2a}	27.926 ± 1.731		
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	26.202 ± 2.079	0.5018	0.4828
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	16.326 ± 1.246	23.4966	**1.92352e-5**
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	26.202 ± 2.079		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	16.326 ± 1.246	17.0308	**0.0001**
Εικόνα 3-4 C.	**ANOVA $F_{(2,27)}$ =3.119,**		**p=0.062**
w^{1118}>0N4R^{2a}	66.526 ± 2.471		
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	72.845 ± 4.099	2.5096	0.1257
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	62.930 ± 1.753	0.9146	0.3480
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	72.845 ± 4.099		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	62.930 ± 1.753	6.1794	0.0199
Εικόνα 3-4 D.	**ANOVA $F_{(2,34)}$ =2.963,**		**p=0.0659**
w^{1118}>0N4R^{2a}	20.437 ± 2.228		
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	25.966 ± 1.669	5.021	0.0321
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	25.598 ± 1.250	4.3752	0.0445
ElavGal4;Gal80^{ts}> w^{1118}	25.966 ± 1.669		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	25.598 ± 1.250	0.0272	0.8701

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 2. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-4. Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στη μάθηση και στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Μετά την σημαντική ANOVA, πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων του κάθε γενοτύπου με τρόπο που αναπαρίσταται στον πίνακα πραγματοποιήθηκαν. Με έντονο μαύρο αναπαρίστανται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	Dunnetts' p
Εικόνα 3-5 B.	**ANOVA $F_{(1,13)}$ = 99.548, p=3.67003e-7**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **ON**	1	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF**	0.5436 ± 0.0457	**1.10368e-8**
Εικόνα 3-5 C.	**ANOVA $F_{(1,12)}$ =1.012, p=0.3327**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **ON**	1	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF**	1.205 ± 0.114	0.332
Εικόνα 3-5 D.	**0N4R: ANOVA $F_{(1,11)}$ =0.145, p=0.711** **0N4R^{2a}: ANOVA $F_{(1,13)}$ = 4.262, p= 0.061**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **ON**	1	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF**	1.009 ± 0.107	0.7114
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a} **ON**	1	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a} **OFF**	0.836 ± 0.046	0.0612
Εικόνα 3-5 E.	**0N4R: ANOVA $F_{(1,11)}$ = 9.191. p= 0.0126** **0N4R^{2a}: ANOVA $F_{(1,9)}$ = 11.556, p= 0.0094**	
ElavGal4;Gal80ts >0N4R **ON**	1	
ElavGal4;Gal80ts >0N4R **OFF**	1.656 ± 0.197	**0.0126**
ElavGal4;Gal80ts >0N4R^{2a} **ON**	1	
ElavGal4;Gal80ts >0N4R^{2a} **OFF**	1.879 ± 0.183	**0.0094**

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 3. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-5.

B: Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων της RT-PCR υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας των mRNA επιπέδων της πρωτεΐνης T σε σχέση με τη σχετική ποσότητα των mRNAs του rp49. Ο λόγος του δείγματος ελέγχου (0N4R ON) ορίστηκε ως 1 και ο λόγος της σχετικής ποσότητας του 0N4R OFF αναφέρεται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett΄s. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση.

C-E: Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης T σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου (0N4R ON και 0N4R2a ON) ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση. Με έντονο μαύρο χρώμα αναπαρίστανται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Γενότυπος	Μέσο όρο ± SEM	t-Ratio	p
Εικόνα 3-6 Α.	**ANOVA $F_{(3,39)}$ = 12.466, p= 9.64504e-6**		
w^{1118}>0N4R **OFF**	30.701 ± 2.261		
ElavGal4;$Gal80^{ts}$> w^{1118} **OFF**	41.380 ± 2.698	11.240	0.0019
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R **OFF**	32.962 ± 2.346	0.504	0.4825
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R **ON**	22.034 ± 1.548	7.405	**0.0099**
ElavGal4;$Gal80^{ts}$> w^{1118} **OFF**	41.380 ± 2.698		
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R **OFF**	32.962 ± 2.346	6.985	0.0120
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R **ON**	22.034 ± 1.548	36.891	**5.5383e-7**
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R **OFF**	32.962 ± 2.346		
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R **ON**	22.034 ± 1.548	11.770	**0.0015**
Εικόνα 3-6 Β.	**ANOVA $F_{(3,43)}$ =17.761, p=1.53441e-7**		
w^{1118}>0N4R^{2a} **OFF**	25.398 ± 2.722		
ElavGal4;$Gal80^{ts}$> w^{1118} **OFF**	33.028 ± 1.944	7.395	0.009
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R^{2a} **OFF**	21.768 ± 0.991	2.061	0.159
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R^{2a} **ON**	13.839 ± 1.765	19.541	**7.06971e-5**
ElavGal4;$Gal80^{ts}$> w^{1118} **OFF**	33.028 ± 1.944		
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R^{2a} **OFF**	21.768 ± 0.991	18.625	9.80285e-5
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R^{2a} **ON**	13.839 ± 1.765	50.777	**1.09544e-8**
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R^{2a} **OFF**	21.768 ± 0.991		
ElavGal4;$Gal80^{ts}$ >0N4R^{2a} **ON**	13.839 ± 1.765	10.892	**0.002**

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 4. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-6. Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Μετά την σημαντική ANOVA, πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων του κάθε γενοτύπου με τρόπο που αναπαρίσταται στον πίνακα πραγματοποιήθηκαν. Με έντονο μαύρο χρώμα αναπαρίστανται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Wilkoxon/Kruscal-Wallis			Means comparison (Steel with control)		
DAY	χ^2, (DF, count)	p>χ^2	Genotype (μM MetBlu)	z	p
2	17.015 (6,17)	**0.0092**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**		
			Elav;G80^{ts}> + **500**	0.4029	0.9975
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	2.9594	0.0161
6	8.044 (6,17)	0.2349	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**		
			Elav;G80^{ts}> + **500**		
			Elav;G80^{ts}> + **1000**		
10	44.54 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**		
			Elav;G80^{ts}> + **500**	-2.9765	0.0153
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	-4.9758	**<0.0001**
14	60.578 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**	-2,6753	0.0372
			Elav;G80^{ts}> + **500**	-3.8591	**0.0007**
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	-4.9943	**<0.0001**
18	63.859 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**	-2.4139	0.075
			Elav;G80^{ts}> + **500**	-4.2418	**0.0001**
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	-5.0056	**<0.0001**
22	58,397 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**	-1.8873	0.2439
			Elav;G80^{ts}> + **500**	-4.3894	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	-4.9321	**<0.0001**
26	43.698 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**	-1.0555	0.7870
			Elav;G80^{ts}> + **500**	-3.4394	**0.0032**
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	-4.4177	**<0.0001**
30	39.271 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**	-2.1832	0.3149
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**	-2.1833	0.1287
			Elav;G80^{ts}> + **500**	-36036	**0.0018**
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	-4.1500	**0.0002**
34	26.7302 (6,17)	**0.0002**	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**	-2.6180	0.0436
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**	-2.0723	0.1642
			Elav;G80^{ts}> + **500**	-2.1460	0.1398
			Elav;G80^{ts}> + **1000**	-2.6181	0.0436
38	0.0000 (6,17)	1.0000	Elav;G80^{ts}> + **0**		
			Elav;G80^{ts}> + **10**		
			Elav;G80^{ts}> + **50**		
			Elav;G80^{ts}> + **100**		
			Elav;G80^{ts}> + **250**		
			Elav;G80^{ts}> + **500**		
			Elav;G80^{ts}> + **1000**		

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 5. Στατιστική ανάλυση συμπληρωματικής εικόνας 3-1A. Τα δεδομένα από τα πειράματα επιβίωσης (προσδιορισμός διάρκειας ζωής) μελετήθηκαν για την κάθε μέρα που υποδεικνύεται με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές (χ2) υπολογίστηκε περαιτέρω η σημαντικότητα του αποτελέσματος με τη μέθοδο Steel, σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις μύγες πειραματικού ελέγχου εμφανίζονται με έντονο μαύρο χρώμα.

Wilkoxon/Kruscal-Wallis			Means comparison (Steel with control)		
DAY	χ^2, (DF, count)	p>χ^2	Genotype (μM MetBlu)	z	p
2	13.5961 (6,17)	0.0834	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**		
6	18.4831 (6,17)	**0.0051**	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**	-2.1034	0.1536
10	65.901 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**	-3.0928	0.0106
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**	-3.8612	**0.0006**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**	-4.8594	**<0.0001**
14	76.510 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**	-1.7623	0.3028
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**	-3.7252	**0.0011**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**	-4.9123	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**	-4.8496	**<0.0001**
18	73.901 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**	-1.5947	0.4017
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**	-3.4581	**0.0030**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**	-4.8533	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**	-4.9939	**<0.0001**
22	70.196 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**	-0.7294	0.9497
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**	-3.6844	**0.0013**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**	-4.8786	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**	-4.9903	**<0.0001**
26	30.019 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**	-1.5003	0.4648
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**	-2.9561	**0.0163**
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**	-3.6461	**0.0015**
30	15.404 (6,17)	0.0173	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**	-0.9155	0.8626
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**	-2.2021	0.1204
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**	-2.2018	0.1204
34	5.1170 (6,17)	0.5289	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**		
38	0.0000 (6,17)	1.0000	Elav;G80^{ts}> 0N4R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**		
			Elav;G80^{ts}> 0N4R **1000**		

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 6. Στατιστική ανάλυση συμπληρωματικής εικόνας 3-1B. Τα δεδομένα από τα πειράματα επιβίωσης (προσδιορισμός διάρκειας ζωής) μελετήθηκαν για την κάθε μέρα που υποδεικνύεται με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές (χ^2) υπολογίστηκε περαιτέρω η σημαντικότητα του αποτελέσματος με τη

μέθοδο Steel, σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις μύγες πειραματικού ελέγχου εμφανίζονται με έντονο μαύρο χρώμα.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	t-Ratio	p
Εικόνα 3-7 Α.	**ANOVA $F_{(6,40)}$ = 0.323, p= 0.9204**		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF**	1		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **ON**	1.091 ± 0.172	0.128	0.7223
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 50μM Met Blu**	1.080 ± 0.121	0.0998	0.7539
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 100μM Met Blu**	0.99345 ± 0.153	0.00065	0.9796
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 250μM Met Blu**	1.245 ± 0.211	0.927	0.3425
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 500μM Met Blu**	0.952 ± 0.219	0.035	0.8521
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 1000μM Met Blu**	0.959 ± 0.186	0.023	0.8794
Εικόνα 3-7 Β.	**ANOVA $F_{(6,44)}$ =4.142, p=0.0027**		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF**	1		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **ON**	0.591 ± 0.090	5.1285	0.0293
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 50μM Met Blu**	0.942 ± 0.118	0.0839	0.7736
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 100μM Met Blu**	0.822 ± 0.103	0.7924	0.3789
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 250μM Met Blu**	0.269 ± 0.069	13.3013	**0.0008**
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 500μM Met Blu**	1.034 ± 0.208	0.029	0.864
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R **OFF 1000μM Met Blu**	0.892 ± 0.158	0.289	0.593

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 7. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-7. Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου (0N4R OFF) ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση. Με έντονο μαύρο χρώμα αναπαρίστανται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	Dunnetts' p
Εικόνα 3-9 A.	**ANOVA $F_{(1,15)}$ =0.138, p=0.7154**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	77.210 ± 1.779	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 250μM MetBlu	78.161 ± 1.834	0.7154
Εικόνα 3-9 B.	**ANOVA $F_{(1,27)}$ =10.435, p=0.0033**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	34.005 ± 1.815	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 250μM MetBlu	23.804 ± 2.479	**0.0033**
Εικόνα 3-9 C.	**ANOVA $F_{(1,29)}$ =0.0016, p=0.9681**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	30.585 ± 1.619	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 250μM MetBlu	30.487 ± 1.817	0.9681
Εικόνα 3-9 D.	**ANOVA $F_{(1,14)}$ =2.056, p=0.1752**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	30.584 ± 3.218	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 500μM MetBlu	37.413 ± 3.521	0.1752

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 8. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-9. Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στη μάθηση έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση **(A)**, στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη **(B και D)** και στην ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη PSI-M **(C)** υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Μετά την σημαντική ANOVA, πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων του κάθε γενοτύπου με τρόπο που αναπαρίσταται στον πίνακα πραγματοποιήθηκαν. Με έντονο μαύρο χρώμα αναπαρίστανται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Wilkoxon/Kruscal-Wallis			Means comparison (Steel with control)		
DAY	χ^2, (DF, count)	p>χ^2	Genotype (µM MetBlu)	z	p
2	14,6455 (6,17)	0.0232	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**	-0.6696	0.9657
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**	-2.5453	0.0530
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**		
6	83,7625 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**	-0.7908	0.9280
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**	-4.5530	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**	-4.6673	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**	-4.9777	**<0.0001**
10	99.929 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**	-0.8090	0.9208
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**	-3.9799	**0.0004**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**	-5.1601	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**	-5.2584	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**	-5.2050	**<0.0001**
14	104.714 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**	0.2637	0.9998
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**	-3.1629	**0.0084**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**	-4.9986	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**	-5.3209	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**	-5.2584	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**	-5.3209	**<0.0001**
18	108.364 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**	-2.3846	0.0799
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**	-4.9932	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**	-5.1725	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**	-5.3345	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**	-5.2715	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**	-5.3345	**<0.0001**
22	90.179 (6,17)	**<0.0001**	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**	-1.9251	0.2222
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**	-3.7813	**0.0009**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**	-4.9195	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**	-5.0693	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**	-5.0693	**<0.0001**
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**	-5.0609	**<0.0001**
26	21.133 (6,17)	**0.0017**	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**	-1.3926	0.5432
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**	-1.3926	0.5432
30	6.000 (6,17)	0.4232	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**		
34	0.000 (6,17)	1.0000	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**		
38	0.000 (6,17)	1.0000	Elav;G80^{ts}> 0N3R **0**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **10**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **50**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **100**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **250**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **500**		
			Elav;G80^{ts}> 0N3R **1000**		

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 9. Στατιστική ανάλυση συμπληρωματικής εικόνας 3-1C. Τα δεδομένα από τα πειράματα επιβίωσης (προσδιορισμός διάρκειας ζωής) μελετήθηκαν για την κάθε μέρα που υποδεικνύεται με τη μέθοδο Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Για αυτά που παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές (χ^2) υπολογίστηκε περαιτέρω η σημαντικότητα του αποτελέσματος με τη μέθοδο Steel, σε σύγκριση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις μύγες πειραματικού ελέγχου εμφανίζονται με έντονο μαύρο χρώμα.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	Dunnetts' p
Εικόνα 3-10 Α.	**ANOVA $F_{(1,9)}$ = 51.036, p=9.76687e-5**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	1	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	6.049 ± 0.516	7.66145e-5

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	t-Ratio	p
Εικόνα 3-10 Β.	**Soluble: ANOVA $F_{(3,15)}$ =0.495, p=0.6927** **Insoluble: ANOVA $F_{(1,27)}$ =3.013, p= 0.0397**		
Soluble			
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	1		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R **10μM Met Blu**	1.042 ± 0.154	0.0377	0.8492
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R **50μM Met Blu**	1.071 ± 0.146	0.107	0.7495
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R **100μM Met Blu**	1.246 ± 0.159	1.280	0.2799
Insoluble			
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	1		
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R **10μM Met Blu**	0.816 ± 0.115	1.704	0.1984
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R **50μM Met Blu**	0.578 ± 0.058	8.970	0.0044
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R **100μM Met Blu**	0.782 ± 0.133	2.484	0.1219

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 10. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-10. Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	Dunnetts' p
Εικόνα 3-11 A.	**ANOVA $F_{(1,23)}$ = 0.107, p= 0.7470**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	61.532 ± 2.4079	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R + 50μM MetBlu	62.742 ± 2.815	0.7470
Εικόνα 3-11 B.	**ANOVA $F_{(1,28)}$ = 9.407, p= 0.0049**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	33.772 ± 2.1357	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R + 50μM MetBlu	24.232 ± 2.2006	0.0049
Εικόνα 3-11 C.	**ANOVA $F_{(1,20)}$ = 4.120, p= 0.0566**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	30.408 ± 3.872	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R + 50μM MetBlu	36.975 ± 2.589	0.0566
Εικόνα 3-11 D.	**ANOVA $F_{(1,59)}$ = 0.028, p= 0.8666**	
W^{1118}	23.464 ± 2.337	1
W1118 + 50μM MetBlu	22.925 ± 2.174	0.8666
Εικόνα 3-11 E.	**ANOVA $F_{(1,39)}$ = 0.0018, p= 0.9661**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	34.286 ± 3.519	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R + 50μM MetBlu	34.066 ± 3.762	0.9661
Εικόνα 3-11 F	**ANOVA $F_{(1,38)}$ = 0.546, p= 0.4646**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R	39.670 ± 2.295	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N3R + 100μM MetBlu	37.321 ± 2.202	0.4646
Εικόνα 3-11 G.	**ANOVA $F_{(1,23)}$ = 7.211, p= 0.0135**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	24.318 ± 3.448	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 50μM MetBlu	12.492 ± 2.739	0.0135
Εικόνα 3-11 H.	**ANOVA $F_{(1,22)}$ = 2.576, p= 0.1234**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	27.778 ± 2.615	1
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 100μM MetBlu	22.875 ± 1.420	0.1234

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 11. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-11. Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στη μάθηση έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση **(A)**, στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη **(B και D-H)** και στην ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη PSI-M **(C)** υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	Dunnetts' p
Εικόνα 3-12 Α.	**ANOVA $F_{(1,11)}$ = 37.416, p= 0.0001**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	1	1
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R	14.199 ± 1.586	0.0001
Εικόνα 3-12 Β.	**ANOVA $F_{(1,11)}$ = 34.926, p= 0.0001**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	1	1
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	4.341 ± 0.671	0.0001

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	t-Ratio	p
Εικόνα 3-12 C.	**ANOVA $F_{(2,39)}$ =1.527, p=0.2306**		
LeoGal4;Gal80^{ts} >W^{1118}	37.573 ± 3.367		
W^{1118} > 0N4R	31.291 ± 2.029	2.308	0.1372
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R	31.915 ± 2.564	2.201	0.1463
W^{1118} > 0N4R	31.291 ± 2.029		
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R	31.915 ± 2.564	0.0234	0.8792
Εικόνα 3-12 D.	**ANOVA $F_{(2,39)}$ =2.706, p=0.0799**		
LeoGal4;Gal80^{ts} >W^{1118}	35.773 ± 3.475		
W^{1118} > 0N4R^{2a}	29.079 ± 2.046	3.2223	0.0808
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	27.518 ± 2.306	4.9009	0.0331
W^{1118} > 0N4R^{2a}	29.079 ± 2.046		
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	27.518 ± 2.306	0.1899	0.6655

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 12. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-12.

Α και Β: Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης Τ σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση.

C και D: Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Μετά την σημαντική ANOVA, πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων του κάθε γενοτύπου με τρόπο που αναπαρίσταται στον πίνακα πραγματοποιήθηκαν.

Γενότυπος	Μέσος όρος ± SEM	Dunnetts' p
Εικόνα 3-13 A.	**ANOVA $F_{(1,11)}$ =49.499, p=0.0000356**	
ElavGal4;Gal80^{ts} >0N4R	1	1
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R	4.445 ± 0.447	0.00003097
Εικόνα 3-13 B.	**ANOVA $F_{(1,23)}$ =0.517, p=0.4797**	
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R	72.327 ± 2.333	1
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 10μM MetBlu	69.959 ± 2.324	0.4797
Εικόνα 3-13 C.	**ANOVA $F_{(1,23)}$ =6.768, p=0.0163**	
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R	37.588 ± 3.709	1
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R + 10μM MetBlu	26.842 ± 1.816	0.0163
Εικόνα 3-13 D.	**ANOVA $F_{(1,23)}$ =6.192, p=0.0209**	
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a}	40.723 ± 2.455	1
LeoGal4;Gal80^{ts} >0N4R^{2a} + 10μM MetBlu	30.747 ± 3.169	0.0209

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 - 13. Στατιστική ανάλυση εικόνας 3-13.

A: Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε πυκνομετρία και υπολογίστηκε ο λόγος της σχετικής ποσότητας της πρωτεΐνης T σε σχέση με τη σχετική ποσότητα της συνταξίνης (Syx). Ο λόγος των δειγμάτων ελέγχου ορίστηκε ως 1 και όλοι οι λόγοι σχετικής ποσότητας αναφέρονται σε σχέση με αυτό. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's. Τρία ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση.

B-D: Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα της απόδοσης στη μάθηση έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση **(B)** και στην εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική σύνθεση μνήμη **(C και D)** υποδεικνύονται στον πίνακα για όλους τους γενοτύπους. Ο μέσος όρος και οι τιμές τυπικού σφάλματος (SEM) συγκρίνονται αρχικώς με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με τη δοκιμασία Dunnett's.

3.7. Βιβλιογραφία

Adams, S. J., DeTure, M. A., McBride, M., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2010). Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. *PLoS One, 5*(5), e10810. doi:10.1371/journal.pone.0010810

Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta, 1739*(2-3), 91-103. doi:10.1016/j.bbadis.2004.08.010

Andreadis, A., Brown, W. M., & Kosik, K. S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry, 31*(43), 10626-10633. doi:10.1021/bi00158a027

Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res Bull, 126*(Pt 3), 238-292. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.08.018

Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I., & Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult Drosophila characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet, 23*(1-2), 156-172. doi:10.1080/01677060802471718

Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., & Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(9), 3312-3317. doi:10.1073/pnas.0611511104

Braak, H., & Braak, E. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl, 165*, 3-12. doi:10.1111/j.1600-0404.1996.tb05866.x

Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev, 33*(1), 95-130. doi:10.1016/s0165-0173(00)00019-9

Cognigni, P., Felsenberg, J., & Waddell, S. (2018). Do the right thing: neural network mechanisms of memory formation, expression and update in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol, 49*, 51-58. doi:10.1016/j.conb.2017.12.002

Cook, C., Kang, S. S., Carlomagno, Y., Lin, W. L., Yue, M., Kurti, A., . . . Fryer, J. D. (2015). Tau deposition drives neuropathological, inflammatory and behavioral abnormalities independently of neuronal loss in a novel mouse model. *Hum Mol Genet, 24*(21), 6198-6212. doi:10.1093/hmg/ddv336

Cowan, C. M., & Mudher, A. (2013). Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol, 4*, 114. doi:10.3389/fneur.2013.00114

Cowan, C. M., Quraishe, S., Hands, S., Sealey, M., Mahajan, S., Allan, D. W., & Mudher, A. (2015). Rescue from tau-induced neuronal dysfunction produces insoluble tau oligomers. *Sci Rep, 5*, 17191. doi:10.1038/srep17191

Cowan, C. M., Quraishe, S., & Mudher, A. (2012). What is the pathological significance of tau oligomers? *Biochem Soc Trans, 40*(4), 693-697. doi:10.1042/bst20120135

Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in Drosophila: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci, 28*, 275-302. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651

Delacourte, A. (2005). Tauopathies: recent insights into old diseases. *Folia Neuropathol, 43*(4), 244-257.

Delacourte, A., & Buée, L. (2000). Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol, 13*(4), 371-376. doi:10.1097/00019052-200008000-00002

Dinkel, P. D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., & Margittai, M. (2011). Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. *Biochemistry, 50*(20), 4330-4336. doi:10.1021/bi2004685

Dominguez-Meijide, A., Vasili, E., & Outeiro, T. F. (2020). Pharmacological Modulators of Tau Aggregation and Spreading. *Brain Sci, 10*(11). doi:10.3390/brainsci10110858

Feuillette, S., Miguel, L., Frébourg, T., Campion, D., & Lecourtois, M. (2010). Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J Neurochem, 113*(4), 895-903. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06663.x

Fulga, T. A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M. L., Spires, T. L., Hyman, B. T., & Feany, M. B. (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol, 9*(2), 139-148. doi:10.1038/ncb1528

Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., Hardlund, J. H., . . . Wischik, C. M. (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet, 388*(10062), 2873-2884. doi:10.1016/s0140-6736(16)31275-2

Geschwind, D. H. (2003). Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg? *Neuron, 40*(3), 457-460. doi:10.1016/s0896-6273(03)00681-0

Gillman, P. K. (2011). CNS toxicity involving methylene blue: the exemplar for understanding and predicting drug interactions that precipitate serotonin toxicity. *J Psychopharmacol, 25*(3), 429-436. doi:10.1177/0269881109359098

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron, 3*(4), 519-526. doi:10.1016/0896-6273(89)90210-9

Goode, B. L., Chau, M., Denis, P. E., & Feinstein, S. C. (2000). Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenetative disease. *J Biol Chem, 275*(49), 38182-38189. doi:10.1074/jbc.M007489200

Gouzi, J. Y., Bouraimi, M., Roussou, I. G., Moressis, A., & Skoulakis, E. M. C. (2018). The Drosophila Receptor Tyrosine Kinase Alk Constrains Long-Term Memory Formation. *J Neurosci, 38*(35), 7701-7712. doi:10.1523/jneurosci.0784-18.2018

Hara, M., Hirokawa, K., Kamei, S., & Uchihara, T. (2013). Isoform transition from four-repeat to three-repeat tau underlies dendrosomatic and regional progression of neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol, 125*(4), 565-579. doi:10.1007/s00401-013-1097-6

Haroutunian, V., Davies, P., Vianna, C., Buxbaum, J. D., & Purohit, D. P. (2007). Tau protein abnormalities associated with the progression of alzheimer disease type dementia. *Neurobiol Aging, 28*(1), 1-7. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.001

Hosokawa, M., Arai, T., Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Yamashita, M., Akiyama, H., & Hasegawa, M. (2012). Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One, 7*(12), e52389. doi:10.1371/journal.pone.0052389

Keramidis, I., Vourkou, E., Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. C. (2020). Functional Interactions of Tau Phosphorylation Sites That Mediate Toxicity and Deficient Learning in Drosophila melanogaster. *Front Mol Neurosci, 13*, 569520. doi:10.3389/fnmol.2020.569520

Kim, Y., Choi, H., Lee, W., Park, H., Kam, T. I., Hong, S. H., . . . Jung, Y. K. (2016). Caspase-cleaved tau exhibits rapid memory impairment associated with tau oligomers in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis, 87*, 19-28. doi:10.1016/j.nbd.2015.12.006

Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2010). Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in Drosophila. *J Neurosci, 30*(2), 464-477. doi:10.1523/jneurosci.1490-09.2010

Kotoula, V., Moressis, A., Semelidou, O., & Skoulakis, E. M. C. (2017). Drk-mediated signaling to Rho kinase is required for anesthesia-resistant memory in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A, 114*(41), 10984-10989. doi:10.1073/pnas.1704835114

Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Clos, A. L., Jackson, G. R., & Kayed, R. (2011a). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener, 6*, 39. doi:10.1186/1750-1326-6-39

Lee, V. M., Goedert, M., & Trojanowski, J. Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci, 24*, 1121-1159. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1121

Liu, C., & Götz, J. (2013). Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS One, 8*(12), e84849. doi:10.1371/journal.pone.0084849

Mershin, A., Pavlopoulos, E., Fitch, O., Braden, B. C., Nanopoulos, D. V., & Skoulakis, E. M. (2004). Learning and memory deficits upon TAU accumulation in Drosophila mushroom body neurons. *Learn Mem, 11*(3), 277-287. doi:10.1101/lm.70804

Messaritou, G., Leptourgidou, F., Franco, M., & Skoulakis, E. M. (2009). A third functional isoform enriched in mushroom body neurons is encoded by the Drosophila 14-3-3zeta gene. *FEBS Lett, 583*(17), 2934-2938. doi:10.1016/j.febslet.2009.08.003

Montejo de Garcini, E., Serrano, L., & Avila, J. (1986). Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun, 141*(2), 790-796. doi:10.1016/s0006-291x(86)80242-x

Mudher, A., Shepherd, D., Newman, T. A., Mildren, P., Jukes, J. P., Squire, A., . . . Lovestone, S. (2004). GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in Drosophila. *Mol Psychiatry, 9*(5), 522-530. doi:10.1038/sj.mp.4001483

Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S., & Skoulakis, E. M. (2010). Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. *Biochem Soc Trans, 38*(4), 981-987. doi:10.1042/bst0380981

Papanikolopoulou, K., Roussou, I. G., Gouzi, J. Y., Samiotaki, M., Panayotou, G., Turin, L., & Skoulakis, E. M. C. (2019). Drosophila Tau Negatively Regulates Translation and Olfactory Long-Term Memory, But Facilitates Footshock Habituation and Cytoskeletal Homeostasis. *J Neurosci, 39*(42), 8315-8329. doi:10.1523/jneurosci.0391-19.2019

Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2011). The power and richness of modelling tauopathies in Drosophila. *Mol Neurobiol, 44*(1), 122-133. doi:10.1007/s12035-011-8193-1

Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2015). Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in Drosophila. *Hum Mol Genet, 24*(7), 2065-2077. doi:10.1093/hmg/ddu726

Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. C. (2020). Altered Proteostasis in Neurodegenerative Tauopathies. *Adv Exp Med Biol, 1233*, 177-194. doi:10.1007/978-3-030-38266-7_7

Prifti, E., Tsakiri, E. N., Vourkou, E., Stamatakis, G., Samiotaki, M., & Papanikolopoulou, K. (2021). The Two Cysteines of Tau Protein Are Functionally Distinct and Contribute Differentially to Its Pathogenicity in Vivo. *J Neurosci, 41*(4), 797-810. doi:10.1523/jneurosci.1920-20.2020

Rábano, A., Cuadros, R., Calero, M., Hernández, F., & Avila, J. (2013). Specific profile of tau isoforms in argyrophylic grain disease. *J Exp Neurosci, 7*, 51-59. doi:10.4137/jen.s12202

Robinow, S., & White, K. (1988). The locus elav of Drosophila melanogaster is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev Biol, 126*(2), 294-303. doi:10.1016/0012-1606(88)90139-x

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., . . . Ashe, K. H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science, 309*(5733), 476-481. doi:10.1126/science.1113694

Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., & Mandelkow, E. (2011). "Lest we forget you--methylene blue...". *Neurobiol Aging, 32*(12), 2325.e2327-2316. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012

Sealey, M. A., Vourkou, E., Cowan, C. M., Bossing, T., Quraishe, S., Grammenoudi, S., . . . Mudher, A. (2017). Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy. *Neurobiol Dis, 105*, 74-83. doi:10.1016/j.nbd.2017.05.003

Shin, S., Kim, D., Song, J. Y., Jeong, H., Hyeon, S. J., Kowall, N. W., . . . Kim, Y. K. (2020). Visualization of soluble tau oligomers in TauP301L-BiFC transgenic mice demonstrates the progression of tauopathy. *Prog Neurobiol*, 101782. doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101782

Soeda, Y., Yoshikawa, M., Almeida, O. F., Sumioka, A., Maeda, S., Osada, H., . . . Takashima, A. (2015). Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. *Nat Commun, 6*, 10216. doi:10.1038/ncomms10216

Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol, 12*(6), 609-622. doi:10.1016/s1474-4422(13)70090-5

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L., & Feany, M. B. (2007a). Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol Biol Cell, 18*(12), 5060-5068. doi:10.1091/mbc.e07-04-0327

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Mulkearns, E. E., Shulman, J. M., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Feany, M. B. (2007b). S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in Drosophila. *J Neurosci Res, 85*(6), 1271-1278. doi:10.1002/jnr.21232

Sydow, A., Van der Jeugd, A., Zheng, F., Ahmed, T., Balschun, D., Petrova, O., . . . Mandelkow, E. M. (2011). Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic

Tau mutant. *J Neurosci, 31*(7), 2511-2525. doi:10.1523/jneurosci.5245-10.2011

Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2005). Pathological tau: a loss of normal function or a gain in toxicity? *Nat Neurosci, 8*(9), 1136-1137. doi:10.1038/nn0905-1136

Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., & Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila. *Cell, 79*(1), 35-47. doi:10.1016/0092-8674(94)90398-0

Van der Jeugd, A., Hochgräfe, K., Ahmed, T., Decker, J. M., Sydow, A., Hofmann, A., . . . Mandelkow, E. M. (2012). Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. *Acta Neuropathol, 123*(6), 787-805. doi:10.1007/s00401-012-0987-3

von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A, 97*(10), 5129-5134. doi:10.1073/pnas.97.10.5129

Wang, X., Blanchard, J., Tung, Y. C., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2015). Inhibition of Protein Phosphatase-2A (PP2A) by I1PP2A Leads to Hyperphosphorylation of Tau, Neurodegeneration, and Cognitive Impairment in Rats. *J Alzheimers Dis, 45*(2), 423-435. doi:10.3233/jad-142403

Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci, 17*(1), 5-21. doi:10.1038/nrn.2015.1

Wischik, C. M., Edwards, P. C., Lai, R. Y., Roth, M., & Harrington, C. R. (1996). Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(20), 11213-11218. doi:10.1073/pnas.93.20.11213

Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., & Feany, M. B. (2001). Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science, 293*(5530), 711-714. doi:10.1126/science.1062382

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες περιλαμβάνουν ένα σύνολο ασθενειών που σχετίζονται με τη προοδευτική απώλεια της δομής ή της λειτουργίας των νευρώνων (εκφύλιση) και οδηγούν στο θάνατο των νευρώνων και των ιστών και συνεπώς στην επικείμενη δυσλειτουργία του εγκεφάλου. Μια ιδιαίτερη κατηγορία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών αποτελούν οι Τ-πρωτεϊνοπάθειες, δηλαδή οι ασθένειες που χαρακτηρίζονται από υπερ-φωσφορυλιωμένη και μη φυσιολογικά φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Τ ή από μεταλλάξεις στο γονίδιο τ.

Η εμβάθυνση της γνώσης πάνω στους μοριακούς μηχανισμούς που αφορούν νευροεκφυλιστικές παθολογίες είναι ιδιαίτερα σημαντική κυρίως λόγω της εφαρμογής τους στη διάγνωση και στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Με γνώμονα αυτό και με χρήση της *D. melanogaster,* ως πειραματικό μοντέλο μελέτης των Τ-πρωτεϊνοπαθειών, η παρούσα έρευνα κινήθηκε σε τέσσερις παράλληλους άξονες:

i. **Χαρακτηρισμός συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, οι οποίες και καθορίζουν την τοξικότητά της.** Η αναγνώριση συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης, οι οποίες δρουν ως «θυροφύλακες» για μια σειρά άλλων επικείμενων φωσφορυλιώσεων, είναι σημαντική για την παρακολούθηση και εξέλιξη διαφόρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών και μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο βιοδείκτη για την πρόγνωση των Τ-πρωτεϊνοπαθειών.

ii. **Μελέτη μηχανισμών τοξικότητας των 3R και 4R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ.** Οι διαφορές που εξαρτώνται από την ισομορφή, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία ερευνητικών δεδομένων στα μοντέλα των Τ-πρωτεϊνοπαθειών και μπορεί να ρίξουν φως στον διαφορετικό ρόλο της κάθε ισομορφής στη παθογένεση των ασθενειών.

iii. **Μελέτη των γνωστικών δυσλειτουργιών των Τ-πρωτεϊνοπαθειών.** Η διερεύνηση εάν τα ελλείμματα που προκύπτουν είναι απόρροια ναι μεν δυσλειτουργικών νευρώνων, αλλά άθικτων δομικά, δίνει πιθανότητες να είναι εφικτή και η αναστροφή των γνωστικών ελλειμμάτων με φάρμακα και σε ασθενείς, τουλάχιστον πριν τα μεταγενέστερα εκφυλιστικά στάδια της νόσου.

iv. **Διερεύνηση του ρόλου των μη διαλυτών συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ σε διεργασίες που απαιτούνται για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη.** Η μελέτη αυτή μπορεί να υποδείξει πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους (π.χ φάρμακα που επάγουν ή αναστέλλουν τη συσσωμάτωση), ως καταλληλότερους για την θεραπεία των γνωστικών δυσλειτουργιών και στον άνθρωπο.

1. Χαρακτηρισμός συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Τ, οι οποίες και καθορίζουν την τοξικότητά της.

Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί πληθώρα μελετών για την ανάδειξη των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους η πρωτεΐνη Τ οδηγεί σε νευροεκφυλισμό. Η φωσφορυλίωση θεωρείται ότι είναι ένα από τα πρώιμα συμβάντα της Τ-μεσολαβούμενης παθογένεσης, πριν ακόμα την εσφαλμένη αναδίπλωσή της ή την δημιουργία των συσσωματωμάτων της (Noble et al., 2013). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ μπορεί να ξεκινήσει από μια συγκεκριμένη θέση και να επάγει την φωσφορυλίωση άλλων επιπρόσθετων θέσεων φωσφορυλίωσης (Hanger et al., 2009). Συνεπώς, ορισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης δρουν ως «θυροφύλακες» φωσφορυλιώσεων και μπορούν να προάγουν ή να αποτρέψουν την φωσφορυλίωση άλλων θέσεων, συχνά απομακρυσμένων (Jeganathan et al., 2008); (Sibille et al., 2012); (Schwalbe et al., 2015). Αυτό θεωρείται ότι συμβαίνει διότι η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ, με αποτέλεσμα να αποκτήσει μια πιο σφιχτή αναδίπλωση και να επαχθεί ή να ανασταλεί ο σχηματισμός τοπικών τριτογενών δομών (Uversky, 2015).

Εάν η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων επηρεάζει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ, τότε πιθανόν να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο και στις δομικές και λειτουργικές διαφορές των έξι ισομορφών της, όπως αντικατοπτρίζονται στις διαφορετικές Τ-πρωτεϊνοπάθειες (Regan et al., 2017). Ωστόσο, ο μηχανισμός των διαδοχικών γεγονότων φωσφορυλίωσης που εμφανίζονται στη πρωτεΐνη Τ καθώς και ποιες θέσεις είναι απαραίτητες για τη συντήρηση και την εξέλιξη της παθολογίας είναι ακόμη ασαφής. Η ταυτοποίηση των θέσεων φωσφορυλίωσης στη πρωτεΐνη Τ που είτε δρουν ως «διευκολυντές θυροφύλακες», δηλαδή επάγουν τη φωσφορυλίωση θέσεων που σχετίζονται με την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ, είτε ως «κατασταλτικοί θυροφύλακας», δηλαδή εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση άλλων θέσεων που είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την παθολογία της πρωτεΐνης Τ, είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της Τ-μεσολαβούμενης νευρωνικής δυσλειτουργίας και τοξικότητας.

Με γνώμονα όλα τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη εστίασε στον χαρακτηρισμό συγκεκριμένων θέσεων, οι οποίες και καθορίζουν την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ. Συνολικά, δημιουργήθηκαν οκτώ διαγονιδιακά στελέχη, ένα για την ανθρώπινη ισομορφή 0N4R της πρωτεΐνης Τ ($0N4R^{II}$), τρία στελέχη στα οποία έχει αντικατασταθεί η Ser ή η Thr των θέσεων Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262}, με την φωσφο-ανθεκτική αλανίνη (Ala) μπλοκάροντας με αυτό τον τρόπο την φωσφορυλίωσή της ($0N4R^{S238A}$, $0N4R^{T245A}$ και $0N4R^{S262A}$), τρία στελέχη στα οποία έχει αντικατασταθεί η Ser ή η Thr των θέσεων Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262} με το φωσφο-μιμητικό γλουταμινικό οξύ(Glu) οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε ψευδο-φωσφορυλίωση ($0N4R^{S238E}$,

0N4R^{T245E} και 0N4R^{S262E}), καθώς και το διαγονίδιο STA, στο οποίο έχουμε ταυτόχρονη αντικατάσταση των Ser/Thr των Ser^{238} και Thr^{245} σε αλανίνη (0N4R^{STA}, STA$^{S238A,\ T245A}$). Όλα τα παραπάνω διαγονίδια δημιουργήθηκαν στο γενετικό υπόβαθρο της 0N4R ισομορφής, καθότι σε προηγούμενες μελέτες είχε χρησιμοποιηθεί, σε ορισμένα από αυτά, το γενετικό υπόβαθρο της 2N4R ισομορφής (Papanikolopoulou et al., 2010); (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015).

Η μελέτη της τοξικότητας όλων των παραπάνω διαγονιδίων στη *D.melanogaster* πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους, με καταμέτρηση είτε του προσδόκιμου ζωής είτε της αντίστασης στο οξειδωτικό στρες. Όσο αφορά το προσδόκιμο ζωής, ενδιαφέρον είχε η παρατήρηση ότι όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Ser^{238} (0N4R^{S238A}) ή είναι ψευδο-φωσφορυλιωμένη (0N4R^{S238E}) δεν επέρχεται βελτίωση στη τοξικότητα της πρωτεΐνης και παραμένει εξίσου τοξική όσο στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη Τ, υποδεικνύοντας ότι η φωσφορυλίωση στη Ser^{238} μπορεί να είναι απαραίτητη, αλλά δεν επαρκεί από μόνη της για να επάγει τη τοξικότητά της. Επιπλέον, όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Thr^{245} (0N4R^{T245A}) επέρχεται αυξημένη θνησιμότητα, ενώ η ψευδο-φωσφορυλίωσή της (0N4R^{T245E}) αποδίδει ζώα που συμπεριφέρονται όπως οι μύγες πειραματικού ελέγχου. Αυτό υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη θέση φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη για την καταστολή της τοξικότητας που οδηγεί σε πρώιμη θνησιμότητα, ενώ η έλλειψή της είναι απαραίτητη για την επαγωγή της τοξικότητας. Όσο αφορά την καταμέτρηση της αντίστασης στο οξειδωτικό στρες, έπειτα από την συσσώρευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ, βρέθηκε ότι όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Ser^{238} (0N4R^{S238A}) ή είναι ψευδο-φωσφορυλιωμένη (0N4R^{S238E}) δεν επέρχεται βελτίωση στη τοξικότητα της πρωτεΐνης και παραμένει εξίσου τοξική όσο και στις 0N4R^{II} μύγες. Ενώ, όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Thr^{245} (0N4R^{T245A}) παρουσιάζεται αυξημένη τοξικότητα σε σύγκριση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N4R^{II}, η οποία όμως δεν εξαλείφεται, έπειτα από ψευδο-φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης θέσης (0N4R^{T245E}). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι και οι δύο θέσεις ταυτόχρονα θα πρέπει πιθανότατα να μπλοκάρονται, ώστε να εξαλείφεται ή να καταστέλλεται η τοξικότητα στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από την έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ. Οι διαφορές που αναδύθηκαν όσο αφορά την θνησιμότητα των μυγών Ser^{238} και Thr^{245} ανάμεσα στη καταμέτρηση του προσδόκιμου ζωής και της αντίστασης στο οξειδωτικό στρες υποδεικνύει για ακόμα μια φορά ότι αυτές οι μετρήσεις τοξικότητας αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς παθολογικούς μηχανισμούς.

Για την διερεύνηση μιας πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ των θέσεων Ser^{238}, Thr^{245} και Ser^{262} καθώς και των συνεπειών τους σε άλλες απομακρυσμένες θέσεις, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες σχετίζονται με παθολογία. Σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι η

απώλεια ή η καταστολή της φωσφορυλίωσης Thr^{245} οδηγεί σε κατάληψη των θέσεων Ser^{238} και Ser^{262}. Καθότι το αντίσωμα $pThr^{245}$ δεν είναι διαθέσιμο, δεν κατέστη εφικτό να μελετηθεί αν ισχύει και το αντίστροφο, δηλαδή αν η κατάληψη της Ser^{238} καταστέλλει την φωσφορυλίωση της Thr^{245}. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η κατάληψη της θέσης Thr^{245} είναι απαραίτητη για την επικείμενη φωσφορυλίωση των AT8 και AT100 επιτόπων, ενώ η φωσφορυλίωση της Ser^{238} καταστέλλει την κατάληψη της Ser^{396}, γεγονός που παρέχει σαφείς ενδείξεις πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων θέσεων φωσφορυλίωσης. Επιπροσθέτως, η κατάληψη της θέσης Ser^{262} είναι ανεξάρτητη από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της Ser^{238}, ενώ η κατάληψή της είναι απαραίτητη για την επικείμενη φωσφορυλίωση της Ser^{238}. Συνεπώς, η φωσφορυλίωση της Thr^{245} φαίνεται να είναι ανασταλτική όχι μόνο για τη Ser^{262} και κατά συνέπεια και για τη Ser^{238}, αλλά επίσης και για τις Ser^{202}/Thr^{205} και Thr^{212}/Ser^{214} και πιθανώς να αντιπροσωπεύει έναν ευρύτερο ανασταλτικό παράγοντα της τοξικότητας και της νευρωνικής δυσλειτουργίας. Ως εκ τούτου, η φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης θέσης φαίνεται να λειτουργεί ως «θυροφύλακας» εναντίον επιπρόσθετων φωσφορυλιώσεων σε θέσεις που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις. Αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση της Thr^{245} εμφανίζεται αποκλειστικά σε δείγματα από φυσιολογικό ανθρώπινο εγκέφαλο (Martin et al., 2013).

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα περιγράφουν μια ακολουθία στις φωσφορυλιώσεις που δρουν ως «θυροφύλακες» και επηρεάζουν την τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ. Για την μελέτη των επιπτώσεων των παραπάνω ακολουθιών σε επίπεδο νευρωνικής δυσλειτουργίας μελετήθηκε η απόδοση των παραπάνω ζώων στη μάθηση. Η έκφραση του $0N4R^{STA}$ προκαλεί σημαντικά ελλείμματα στη συνειρμική μάθηση, παρόμοια με αυτά του $0N4R^{II}$. Σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι η έκφραση των διαγονιδίων $0N4R^{S238A}$ και $0N4R^{T245A}$ έχει ως αποτέλεσμα εξίσου σημαντικά μαθησιακά ελλείμματα. Δεδομένου ότι στα συγκεκριμένα διαγονίδια, η Ser^{262} είναι υπερ-φωσφορυλιωμένη, τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τα μαθησιακά ελλείμματα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Πράγματι, όπως ήταν αναμενόμενο, όταν μπλοκάρεται η φωσφορυλίωση της Ser^{262} ($0N4R^{S262A}$) δεν παρατηρούνται μαθησιακά ελλείμματα, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Οι $0N4R^{T245E}$ παρουσιάζουν φυσιολογική μάθηση, γεγονός το οποίο έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Ser^{262} (μειωμένα επίπεδα) και ενισχύοντας την άποψη ότι η φωσφορυλίωση της Thr^{245} δρα ως κατασταλτικός παράγοντας για την τοξικότητα και δυσλειτουργία που μεσολαβείται από την ανθρώπινη πρωτεΐνη Τ.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες τοξικότητας και δυσλειτουργίας, υπό το πλαίσιο του προφίλ φωσφορυλίωσης, υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση της Thr^{245} εξασθενεί ή αποκλείει την κατάληψη της Ser^{262}, η οποία με τη σειρά της είναι απαραίτητη για την φωσφορυλίωση της Ser^{238}, οδηγώντας σε τοξικότητα. Επομένως, η φωσφορυλίωση της Ser^{262} προηγείται και λειτουργεί ως «θυροφύλακας» για την κατάληψη της Ser^{238}, η οποία με τη σειρά της προάγει τη πρόωρη θνησιμότητα που εξαρτάται από την ανθρώπινη πρωτεΐνη Τ ή οδηγεί στη μειωμένη αντίσταση στο οξειδωτικό στρες. Συνεπώς, φαίνεται να υπάρχουν δυο ειδών «θυροφύλακες» φωσφορυλιώσεων, αυτοί οι οποίοι καταστέλλουν τη φωσφορυλίωση επιπρόσθετων θέσεων, όπως η Thr^{245} και άλλοι οι οποίοι την ενεργοποιούν, όπως η Ser^{262}. Συμπερασματικά, η φωσφορυλίωση της Thr^{245} δρα ως «κατασταλτικός θυροφύλακας», εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση του «διευκολυντή θυροφύλακα» Ser^{262} και κατά συνέπεια και της Ser^{238}. Μέχρι τώρα δεν γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό ή το έναυσμα για την ακολουθία των φωσφορυλιώσεων που παρατηρούνται, αν και πιθανότατα να μεσολαβείται από διάφορες αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Τ, με τα 24 αμινοξέα που διαχωρίζουν τη Ser^{238} από τη Ser^{262} να έχουν καθοριστικό ρόλο στη τοξικότητα και νευρωνική δυσλειτουργία.

2. Μελέτη μηχανισμών τοξικότητας των 3R και 4R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ.

Τυπικά και οι έξι ισομορφές της πρωτεΐνης Τ έχουν θεωρηθεί ως λειτουργικά παρόμοιες. Ωστόσο, η διαφορική εμπλοκή τους σε συγκεκριμένες Τ πρωτεϊνοπάθειες εγείρει την πιθανότητα να υπάρχουν διαφορές στη φυσιολογική λειτουργία τους και στο παθολογικό δυναμικό τους. Στην πραγματικότητα, οι διαφορές στις ιδιότητες δέσμευσης των μικροσωληνίσκων για κάθε ισομορφή είναι γνωστές (Goode et al., 2000) και θεωρείται ότι οφείλονται στο γεγονός ότι οι 4R ισομορφές έχουν μια επιπλέον περιοχή πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους, που επιτρέπει την 3-φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τους μικροσωληνίσκους. Επίσης, η καρβοξυ-τελική περιοχή ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο την πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους και φαίνεται να επηρεάζει την πρόσδεση των 3R ισομορφών σε μεγαλύτερο βαθμό, σε σύγκριση με τις 4R ισομορφές (Goode et al., 2000). Εκτός από την πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους, διάφορες μελέτες έχουν δείξει επιπρόσθετες διαφορές μεταξύ των ισομορφών, όσο αφορά την τάση τους να συσσωματώνονται (Adams et al., 2010) και την ικανότητα συσσωμάτωσης της κάθε ισομορφής σε διαφορετικές μορφές (Dinkel et al., 2011).

Για την αξιολόγηση των διαφορετικών φαινοτύπων των 0N3R και 0N4R ισομορφών της πρωτεΐνης Τ μελετήθηκε η κινητικότητα των προνυμφών, η ικανότητα αναρρίχησης ενήλικων μυγών με τη δοκιμασία του αρνητικού γεωτροπισμού, ο

βαθμός νευροεκφυλισμού των αισθητήριων νευρώνων και η επιρροή της έκφρασης κάθε ισομορφής στην γνωσιακή συμπεριφορά. Ενώ για την μελέτη των μηχανισμών τοξικότητας της κάθε ισομορφής αξιολογήθηκαν τα επίπεδα διαλυτότητας και συσσωμάτωσης, η κατάσταση φωσφορυλίωσης, το προσδόκιμο ζωής και το δυναμικό του οξειδωτικού στρες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η φαινοτυπική ανάλυση, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ισομορφών 0N3R και 0N4R. Η έκφραση της 0N3R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ βρέθηκε ότι προκαλεί κινητικές ανωμαλίες, οι οποίες προκύπτουν από την μειωμένη αξονική μεταφορά, σε αντίθεση με την έκφραση της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ, η οποία δεν προκαλεί σημαντικές κινητικές αλλοιώσεις ή βλάβες κατά την αξονική μεταφορά. Επιπλέον, οι ενήλικες μύγες που εκφράζουν τις 0N3R και 0N4R ισομορφές παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα αναρρίχησης, με τις 0N3R μύγες να παρουσιάζουν εντονότερη μείωση από την πρώτη κιόλας εβδομάδα σε σχέση με τις 0N4R μύγες και να καθίστανται σχεδόν πλήρως ακίνητες έπειτα από 5 εβδομάδες. Όσο αφορά τον νευροεκφυλισμό των αισθητήριων νευρώνων, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της 0N3R ισομορφής επάγει ασθενή εκφυλισμό των νευρώνων και οι άξονες στην ουσία παραμένουν άθικτοι έπειτα και από 20 ημέρες επαγωγής της έκφρασης. Ωστόσο, παρουσιάζει αυξημένη τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων κατά μήκος των αξόνων και στις συνάψεις. Σε αντίθεση, η έκφραση της 0N4R ισομορφής παρουσιάζει ισχυρότερο νευροεκφυλισμό. Συγκεκριμένα, την $40^{η}$ ημέρα οι αισθητήριοι νευρώνες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή έχουν πλήρως εκφυλιστεί με λίγους άξονες να απομένουν, ενώ παρατηρείται και ισχυρότερη απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε η παρατήρηση ότι οι ενήλικες μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή παρουσιάζουν ελλειμματική μάθηση σε συμφωνία και με τα προηγούμενα αποτελέσματα (Kosmidis et al., 2010); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015) καθώς και στην μακροπρόθεσμη μνήμη, ενώ σε αντίθεση η έκφραση της 0N3R ισομορφής δεν προκαλεί γνωσιακές εκπτώσεις.

Δεδομένου ότι η φωσφορυλίωση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη παθογένεση που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη Τ, κρίθηκε απαραίτητη μια σύγκριση των επιπέδων συσσωμάτωσης και φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων θέσεων των δύο ισομορφών σε προνύμφες και σε ενήλικες μύγες. Πολλές in vitro έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην διερεύνηση του ρόλου της ψευδο-φωσφορυλίωσης στη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης Τ και έχουν ταυτοποιηθεί ενδιαφέρουσες διαφορές ειδικές για κάθε ισομορφή (Combs, Voss, & Gamblin, 2011). Παρόλα αυτά, με βάση την ανάλυση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα έρευνα, δεν μπόρεσαν να ανιχνευθούν διαφορές στα επίπεδα συσσωμάτωσης των δύο ισομορφών σε σχέση με την ηλικία. Όσο αφορά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων θέσεων ανάμεσα στις δύο ισομορφές 0N3R και 0N4R της πρωτεΐνης

Τ, αναδείχθηκαν σαφείς διαφορές, υποστηρίζοντας την άποψη ότι οι δύο ισομορφές αλληλεπιδρούν με διαφορετικές κινάσες και φωσφατάσες. Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι οι διαφορές αυτές εξαρτώνται και από το στάδιο ανάπτυξης της μύγας, καθότι διαφορές ανάμεσα στις δύο ισομορφές που υπήρχαν στο στάδιο των προνυμφών εξαλείφονταν στις ενήλικες μύγες ή αντίστροφα. Για παράδειγμα, στις ενήλικες μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή παρουσιάστηκαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των θέσεων $Ser^{396/404}$ (PHF-1) σε σχέση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στο στάδιο των προνυμφών. Επίσης, σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι η 0N3R ισομορφή είναι περισσότερο ανοσοδραστική με το αντίσωμα MC1 σε σχέση με την 0N4R ισομορφή, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην αναδίπλωσή των δύο ισομορφών.

Η διαφορετική διαμόρφωση των δύο ισομορφών, υποδεικνύει ότι προφανώς θα υπάρχουν και διαφορές και στο παθολογικό τους δυναμικό. Προς αποσαφήνιση αυτού μελετήθηκε η τοξικότητα της πρωτεΐνης Τ με δύο μεθόδους, την καταμέτρηση του προσδόκιμου ζωής και της αντίστασης στο οξειδωτικό στρες. Όσο αφορά το προσδόκιμο ζωής των ενήλικων μυγών που εκφράζουν είτε την 0N3R είτε την 0N4R ισομορφή, βρέθηκε ότι η έκφραση και των δύο ισομορφών παρουσιάζει αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με τις μύγες πειραματικού ελέγχου. Ωστόσο, όταν συγκρίνονται οι δύο ισομορφές μεταξύ τους, παρατηρείται ότι η θνησιμότητα είναι μεγαλύτερη στις 0N3R μύγες, σε σχέση με τις 0N4R μύγες. Σε αντίθεση, έπειτα από μέτρηση της αντίστασης στο οξειδωτικό στρες βρέθηκε ότι οι μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή παρουσιάζουν διπλάσια επίπεδα οξείδωσης, σε σχέση με τις μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή. Οι δύο αυτές μετρήσεις υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι υπάρχουν σαφείς διαφορές ανάμεσα στις δύο ισομορφές όσο αφορά το παθολογικό δυναμικό τους.

Συγκεντρωτικά όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν μια σειρά από διαφορετικούς φαινοτύπους ανάμεσα στις δύο ισομορφές που εξετάστηκαν καθώς και σαφείς διαφορές στο μηχανισμό τοξικότητας που επάγει η κάθε ισομορφή. Μελέτες όπως αυτή, εγείρουν στοχευμένα ερωτήματα που μπορεί να ρίξουν φως στον διαφορετικό ρόλο της κάθε ισομορφής στη παθογένεση των διαφόρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών και θα πρέπει να λαμβάνονται υπ όψιν κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3. Μελέτη των γνωστικών δυσλειτουργιών των Τ-πρωτεϊνοπαθειών.

Ένα από τα πιο κοινά χαρακτηριστικά των περισσοτέρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν εμπλέκουν μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Τ, όπως η νόσος του Alzheimer, είναι τα χρονο-εξαρτώμενα ελλείμματα στη μάθηση

και μνήμη, γεγονός που εμφανίζεται ξεκάθαρα και στο δικό μας μοντέλο Τ-πρωτεϊνοπαθειών της *D. melanogaster*. Οι ενήλικες μύγες, οι οποίες εκφράζουν την 0N4R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ για 6 ημέρες έχουν φυσιολογική μάθηση και μνήμη (εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSD-M), ενώ έπειτα από 12 ημέρες παρουσιάζουν ισχυρά ελλείμματα, επαληθεύοντας την χρονικά εξαρτώμενη εκδήλωση της νευρωνικής δυσλειτουργίας, όπως αυτή εμφανίζεται και στους ανθρώπους.

Τα αποτελέσματα αυτά θέτουν το ερώτημα, εάν η συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ προκαλεί μια γενικότερη νευρωνική δυσλειτουργία ή επηρεάζει συγκεκριμένες συμπεριφορικές διεργασίες. Για το σκοπό αυτό, ελέγχθηκε η απόδοση των ζώων αυτών και σε μια σειρά άλλων συμπεριφορικών διεργασιών, όπως η άμεση απόδοση, έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση και η απόδοση σε ένα διαφορετικό είδος μνήμης που απαντάται στη *D. melanogaster*, την ανεξάρτητη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSI-M. Ενδιαφέρον είχαν τα αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ δεν επηρεάζει την απόδοση των ζώων έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση, υποδηλώνοντας ότι πιθανότατα τα ελλείμματα που παρατηρούνται στη μάθηση και μνήμη δεν είναι αποτέλεσμα μιας γενικότερης δυσλειτουργίας και πιθανόν να μπορούν και να αναστραφούν. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα ζώα αυτά παρουσίασαν φυσιολογική απόδοση στην PSI μνήμη, υποδηλώνει ότι τα ελλείμματα είναι ειδικά για την PSD μνήμη. Επιπλέον, το γεγονός ότι η συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ επηρεάζει μόνο την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη και όχι την ανεξάρτητη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, υποδηλώνει ότι επηρεάζεται και η μετάφραση, όπως πρόσφατα έχει αναφερθεί (Papanikolopoulou et al., 2019).

Μέχρι τώρα, δεν είναι σαφές εάν αυτά τα ελλείμματα στη μάθηση και μνήμη είναι απόρροια μη αναστρέψιμων δυσλειτουργιών ή εκφυλισμένων νευρώνων. Έχοντας ως δεδομένο ότι η συσσώρευση της 0N4R ισομορφής της πρωτεΐνης Τ δίνει φυσιολογική απόδοση, έπειτα από εκτεταμένη εκπαίδευση και ταυτόχρονα με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών σε ποντίκια (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al., 2011); (Van der Jeugd et al., 2012), είναι μάλλον απίθανο το ΚΝΣ να φέρει μόνιμη και εκτεταμένη νευροεκφυλιστική βλάβη. Με γνώμονα όλα τα παραπάνω, έγιναν διάφορες προσπάθειες αναστροφής των ελλειμμάτων στη PSD-M μνήμη, έπειτα από καταστολή έκφρασης του διαγονιδίου 0N4R. Μια πιθανή αναστροφή των γνωστικών ελλειμμάτων δίνει πιθανότητες αυτό να μπορεί να είναι εφικτό και σε ασθενείς με χορήγηση φαρμάκων, τουλάχιστον πριν τα μεταγενέστερα εκφυλιστικά στάδια της νόσου.

Ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι οι μύγες, οι οποίες βρίσκονται υπό συνθήκες καταστολής παρουσίασαν τουλάχιστον 50% μείωση στα μετάγραφα της ανθρώπινης 0N4R ισομορφής, σε σύγκριση με τις μύγες στις οποίες ευνοείται η

έκφραση της πρωτεΐνης, ωστόσο δεν υπήρξε μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι η 0N4R είναι σταθερή στο ΚΝΣ της μύγας. Αξιοσημείωτο επίσης είναι, ότι στις μύγες αυτές βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα συσσωματωμάτων και πιθανόν σε αυτό να οφείλονται τα φαινομενικά σταθερά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Τ που παρατηρήθηκαν, παρά τα μειωμένα επίπεδα μεταγράφων. Η παρατήρηση αυτή, έρχεται σε συμφωνία με διάφορες μελέτες στη Drosophila και στο ποντίκι, οι οποίες δείχνουν ότι η παρατεταμένη συσσώρευση της πρωτεΐνης Τ οδηγεί και στο σχηματισμό συσσωματωμάτων (Cowan et al., 2015); (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015); (Santacruz et al., 2005). Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα της διαλυτής πρωτεΐνης, υποδεικνύει ότι τα συσσωματώματα πιθανόν να συσσωρεύονται στο ΚΝΣ της μύγας από τη προϋπάρχουσα διαλυτή 0N4R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ. Τέλος, στις συνθήκες καταστολής έκφρασης του διαγονιδίου (μειωμένα μετάγραφα και αυξημένος σχηματισμός συσσωματωμάτων) υπήρξε αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD μνήμη. Το αποτέλεσμα αυτό, υποδεικνύει ότι η νευρωνική δυσλειτουργία που παρατηρείται δεν είναι συνέπεια μη αναστρέψιμων βλαβών ή εκφυλισμένων νευρώνων του ΚΝΣ της Drosophila και πιθανόν τα συσσωματώματα να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τουλάχιστον όσο αφορά τις διεργασίες που είναι απαραίτητες για την PSD-M μνήμη.

4. Τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι των διεργασιών που απαιτούνται για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη.

Λαμβάνοντας υπ όψιν, ότι η μεταγραφική καταστολή των διαγονιδίων αυξάνει τα επίπεδα των μη διαλυτών συσσωματωμάτων της ανθρώπινης πρωτεΐνης Τ, με ταυτόχρονη αναστροφή της ελλειμματικής μνήμης, γεννάται το ερώτημα αν τα συσσωματώματα αυτά στη πραγματικότητα μπορεί όχι μόνο να μην επισπεύδουν τη νευρωνική δυσλειτουργία αλλά ίσως και να την καταστέλλουν ή να την αποτρέπουν. Προς απάντηση του παραπάνω ερωτήματος που τέθηκε, χρησιμοποιήθηκαν ανεξάρτητα τρεις διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης του θέματος.

Ο πρώτος αφορά την μελέτη της PSD-M μνήμης έπειτα από χορήγηση ενός γνωστού αναστολέα των συσσωματωμάτων, του μπλε του μεθυλενίου, σε μύγες οι οποίες αρχικώς εκφράζουν την 0N4R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ σε όλους τους νευρώνες και εν συνεχεία τίθενται υπό μεταγραφική καταστολή, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Με τον τρόπο αυτό, ουσιαστικά μελετάται αν η αναστολή σχηματισμού συσσωματωμάτων, υπό συνθήκες καταστολής και έπειτα από την δημιουργία των

ελλειμμάτων στην PSD-M μνήμη, διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο. Πράγματι, η χορήγηση του μπλε του μεθυλενίου σε αυτές τις μύγες προκαλεί ελλείμματα στην PSD-M μνήμη, υποδεικνύοντας ότι η μείωση των αδιάλυτων συσσωματωμάτων επηρεάζει τις διεργασίες που απαιτούνται για μια φυσιολογική PSD μνήμη. Επιπλέον, η χορήγηση του μπλε του μεθυλενίου δεν προκαλεί καμία επίπτωση στην απόδοση των μυγών, όταν μελετήθηκε μια άλλη μορφή μνήμης που απαντάται στη Drosophila, στην ανεξάρτητη στην πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι επιπτώσεις της αναστολής του σχηματισμού των συσσωματωμάτων είναι ειδικές για την PSD-M μνήμη και δεν είναι απόρροια μιας γενικότερης τοξικότητας που θα μπορούσε να επιφέρει η χορήγηση του μπλε του μεθυλενίου. Συνεπώς, η αύξηση των συσσωματωμάτων που παρατηρείται κατά την μεταγραφική καταστολή της 0N4R ισομορφής πιθανότατα να είναι υπεύθυνη και για την προκύπτουσα αναστροφή των ελλειμμάτων στην PSD-M, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Συλλογικά αυτά τα δεδομένα εγείρουν την πιθανότητα τα αδιάλυτα συσσωματώματα να δρουν προστατευτικά όσο αφορά των διαδικασιών/ μηχανισμών που εμπλέκονται στην PSD-M ή έστω να τις επιτρέπουν.

Ο δεύτερος τρόπος αφορά την χορήγηση εξαρχής του μπλε του μεθυλενίου σε μύγες οι οποίες εκφράζουν είτε την 0N4R είτε την 0N3R ισομορφή της πρωτεΐνης Τ σε όλο το νευρικό σύστημα. Με τον τρόπο αυτό, μελετάται αν η αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων εξαρχής σε μύγες οι οποίες είναι γνωστό ότι έχουν ελλειμματική μνήμη (0N4R ζώα) ή σε μύγες με φυσιολογική μνήμη (0N3R ζώα) προκαλεί επιδείνωση ή εμφάνιση των ελλειμμάτων αντίστοιχα. Πράγματι στις μύγες που εκφράζουν την 0N4R ισομορφή στο νευρικό σύστημα για 12 ημέρες και είναι γνωστό ότι προκαλούν ελλειμματική PSD-M παρατηρήθηκε επιδείνωση του φαινοτύπου, έπειτα από αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ. Επιπλέον, οι μύγες που εκφράζουν την 0N3R ισομορφή για 12 ημέρες, όπως δείχτηκε πρωτύτερα παρουσιάζουν φυσιολογική μνήμη και αυξημένο βαθμό σχηματισμού συσσωματωμάτων σε σχέση με τις 0N4R μύγες. Χορήγηση του μπλε του μεθυλενίου σε αυτές τις μύγες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση σχηματισμού συσσωματωμάτων και την απόδοση ελλειμματικής μνήμης, υποδεικνύοντας για ακόμα μια φορά ότι τα συσσωματώματα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο.

Τέλος, με γνώμονα το γεγονός ότι η έκφραση της 0N4R ισομορφής στα μισχοειδή σωμάτια επάγει τον αυξημένο σχηματισμό συσσωματωμάτων και αποδίδει φυσιολογική μνήμη, θεωρήθηκε σκόπιμο ως μια τρίτη απόδειξη του ρόλου των συσσωματωμάτων να χορηγηθεί σε αυτές τις μύγες μπλε του μεθυλενίου. Με τον τρόπο αυτό, μελετάται αν η αναστολή σχηματισμού των συσσωματωμάτων εξαρχής, ακόμα και σε έναν μικρό αριθμό νευρώνων στη Drosophila, οι οποίοι είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη δημιουργία της PSD-M μνήμης (Davis, 2005); (Cognigni, Felsenberg, & Waddell, 2018) προκαλεί την εμφάνιση ελλειμμάτων στην μνήμη. Πράγματι προς ενίσχυση όλων των παραπάνω υποθέσεων, η αναστολή

σχηματισμού των συσσωματωμάτων στα μισχοειδή σωμάτια, απέδωσε ελλειμματική μνήμη, επιβεβαιώνοντας ανεξάρτητα την άποψη ότι η συσσώρευση συσσωματωμάτων δεν δρα ανασταλτικά έναντι των διεργασιών που εμπλέκονται στην PSD μνήμη.

Συνεπώς, με τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις του θέματος, υποδεικνύεται σθεναρά η άποψη ότι τα μη διαλυτά συσσωματώματα είναι προστατευτικά σε νευρωνικές διεργασίες (ή έστω τις επιτρέπουν), οι οποίες αποτελούν τη βάση για την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη, PSD-M. Αυτό έρχεται σε συμφωνία, εν μέρει, με άλλες ερευνητικές μελέτες που δείχνουν ότι στο μοντέλο ποντικού για την μετωποκροταφική άνοια τα συσσωματώματα παραμένουν, ενώ η γνωστική λειτουργία βελτιώνεται (Santacruz et al., 2005); (Sydow et al., 2011); (Van der Jeugd et al., 2012). Επιπλέον, με τη παρούσα έρευνα προκύπτουν σαφείς ενδείξεις ότι ίσως τα μικρά διαλυτά ολιγομερή ή τα μονομερή, διμερή και τριμερή της πρωτεΐνης Τ μπορεί να δρουν παρεμποδιστικά στις διεργασίες που απαιτούνται για την PSD-M.

Μέχρις στιγμής, δεν γνωρίζουμε τη διαμόρφωση των συσσωματωμάτων και των ολιγομερών που σχηματίζονται στο ΚΝΣ της μύγας, υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία. Ως εκ τούτου, δεν γνωρίζουμε εάν τα μη διαλυτά κοκκώδη ολιγομερή (GTOs) περιλαμβάνονται ή όχι στα συσσωματώματα που απομένουν, έπειτα την χορήγηση του μπλε του μεθυλενίου, και αν είναι αυτά ή τα διαλυτά ολιγομερή που προκαλούν τα ελλείμματα στην PSD-M μνήμη. Ωστόσο, πρόσφατα αποτελέσματα από το μοντέλο ποντικού για την μετωποκροταφική άνοια υποδεικνύουν ότι τα διαλυτά ολιγομερή της πρωτεΐνης Τ που φέρει τη μετάλλαξη P301L, είναι υπεύθυνα για την εξέλιξη της νόσου (Shin et al., 2020). Ενώ, σε ορισμένες μελέτες in vivo έχει δειχθεί ότι ορισμένα συσσωματώματα της πρωτεΐνης Τ, ιδιαίτερα τα ολιγομερή, μπορεί ακόμα και να έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της τοξικότητας της πρωτεΐνης Τ (Cowan et al., 2015). Μελλοντικά θα ήταν χρήσιμο να αποσαφηνιστεί το είδος των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται κατά τις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας έρευνα καθότι θα ρίξει άπλετο φως στο διαφορετικό ρόλο των συσσωματωμάτων σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις.

Συμπεράσματα:

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν δοκιμαστεί διαφορετικές θεραπείες για την αντιμετώπιση διαφόρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών. Ωστόσο, παρά τις εκτεταμένες μελέτες, τα σημαντικά έξοδα και τις διάφορες κλινικές προσπάθειες δεν έχουν εγκριθεί νέες θεραπείες. Η κύρια αιτία για αυτήν την αποτυχία είναι η μεγάλη ετερογένεια των κλινικών συμπτωμάτων στις νόσους αυτές και η έλλειψη βιολογικών δεικτών για την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση. Η χρήση βιοδεικτών για ειδικούς μοριακούς στόχους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προβλεφθεί η πιθανότητα ενός ατόμου να παρουσιάσει μια συγκεκριμένη Τ-πρωτεϊνοπάθεια πριν ακόμα εμφανιστούν τα συμπτώματα. Η πρωτεΐνη Τ και ιδιαίτερα η φωσφορυλίωσή της έχει αποτελέσει έναν ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο για την ανεύρεση διαφόρων βιοδεικτών, διότι εμπλέκεται στην πρώιμη εξέλιξη των νόσων και ιδιαίτερα της νόσου του Alzheimer. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην ανάπτυξη βιοδεικτών αίματος και πλάσματος, συμπεριλαμβανομένων των pThr181, pThr217 και pThr231, έδειξαν ότι υπήρξαν καλοί προγνωστικοί παράγοντες της εξέλιξης της νόσου και βοηθούν στην διαφοροποίηση των νόσων AD και FTD. Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση της θέσης Ser^{238} απουσιάζει χαρακτηριστικά από όλες τις μη τοξικές μορφές της πρωτεΐνης Τ στη *D. melanogaster*, στα νεαρά ασυμπτωματικά ποντίκια και σε δείγματα από εγκεφάλους φυσιολογικών δειγμάτων από ανθρώπους υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη θέση φωσφορυλίωσης θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ειδικό διαγνωστικό βιοδείκτη για τις Τ-πρωτεϊνοπάθειες τελικού σταδίου (Papanikolopoulou & Skoulakis, 2015). Στη παρούσα μελέτη, αναδείχτηκε μια επιπλέον θέση, η Thr^{245}, της οποίας η φωσφορυλίωση φαίνεται να δρα ως «κατασταλτικός θυροφύλακας» για τις επικείμενες φωσφορυλιώσεις που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις, αναδεικνύοντας τη θέση αυτή ως έναν πιθανό χρήσιμο βιοδείκτη πρόγνωσης των Τ-πρωτεϊνοπαθειών. Η ανάδειξη νέων βιοδεικτών θα βοηθήσει την έγκαιρη ανίχνευση και παρακολούθηση των διαφόρων Τ-πρωτεϊνοπαθειών, καθώς επίσης και στην ταυτοποίηση των κατάλληλων ασθενών για κλινικές δοκιμές, ώστε να εξακριβωθεί η βέλτιστη θεραπεία για τον κάθε ασθενή.

Όσο αφορά τη νόσο του Alzheimer, τα τελευταία χρόνια, διάφορες στρατηγικές που στοχεύουν το β-αμυλοειδές ή τη πρωτεΐνη Τ έχουν αναπτυχθεί και έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές (Ballard et al., 2011); (Bachurin et al., 2017); (Hey et al., 2018); (Hung & Fu, 2017). Μέχρις στιγμής, οι περισσότερες κλινικές δοκιμές που στοχεύουν το αβ πεπτίδιο έχουν δώσει αρνητικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν πλέον στη στόχευση της πρωτεΐνης Τ ως εναλλακτική θεραπεία (Hoskin et al., 2019). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Τ έχει αποτελέσει πιθανό στόχο για κλινικές θεραπείες. Διάφορες κατηγορίες φαρμάκων βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές, όπως αναστολείς κινασών και ενεργοποιητές φωσφατασών και φαίνεται να έχουν κάποια θετικά αποτελέσματα στην επιβράδυνση της εξέλιξης της

νόσου, ωστόσο φαίνεται να έχουν διάφορες επιπτώσεις λόγω δράσης και σε άλλες πρωτεΐνες εκτός της Τ. Επιπλέον, πολλά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανοσοθεραπεία p-tau βρίσκονται ακόμα στη Φάση I και II των κλινικών δοκιμών, με τα δεδομένα μέχρις στιγμής να δείχνουν ότι είναι ασφαλέστερα και με λιγότερες παρενέργειες σε σύγκριση με τους αναστολείς κινασών ή τους ενεργοποιητές φωσφατασών. Τις επόμενες δεκαετίες, περισσότερα δεδομένα από τις κλινικές δοκιμές θα παράσχουν μια καλύτερη εικόνα σχετικά με το εάν τα φάρμακα έναντι της p-tau είναι αποτελεσματικά έναντι των Τ-πρωτεϊνοπαθειών και των πιθανών αρνητικών επιπτώσεών τους.

Τα τελευταία χρόνια την πιο ευρέως διαδεδομένη στρατηγική για την θεραπεία της νόσου του Alzheimer αποτελεί η αναστολή της συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης Τ (Jouanne et al., 2017). Ωστόσο, η χορήγηση του μπλε του μεθυλενίου, ενός γνωστού αναστολέα του σχηματισμού των συσσωματωμάτων (Hosokawa et al., 2012), όταν δοκιμάστηκε σε ασθενείς ως θεραπεία για την αναστολή της συσσωμάτωσης στο AD και πέρασε στις δοκιμές φάσης III, δεν απέδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα (Gauthier et al., 2016) πιθανότατα επειδή δεν αναστέλλει το σχηματισμό των GTOs (Soeda et al., 2015), τα οποία συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα. Προς ενίσχυση αυτού, στη παρούσα έρευνα αποδείξαμε ότι ορισμένα είδη συσσωματωμάτων μπορεί να έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι συγκεκριμένων διεργασιών. Γεγονός που μπορεί μερικώς να δικαιολογήσει την αποτυχία των αναστολέων των συσσωματωμάτων στις κλινικές δοκιμές. Συνεπώς, μελέτες όπως αυτή, εγείρουν στοχευμένα ερωτήματα που μπορεί να ρίξουν φως στον διαφορετικό ρόλο των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης Τ και θα πρέπει να λαμβάνονται υπ όψιν κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Συλλογικά τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας μαζί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών υποδεικνύουν ότι φάρμακα που προωθούν τη συσσωμάτωση (Dominguez-Meijide et al., 2020) μπορεί να είναι καταλληλότερα για την θεραπεία των γνωστικών ελλειμμάτων σε ασθενείς με AD παρά τα φάρμακα τα οποία δρουν ανασταλτικά.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε συνάρτηση με την ήδη υπάρχουσα επιστημονική γνώση, θα μπορούσαν να βοηθήσουν αρχικώς στην κατανόηση των Τ-πρωτεϊνοπαθειών και εν συνεχεία στην έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση τους στον άνθρωπο.

Βιβλιογραφία

Adams, S. J., DeTure, M. A., McBride, M., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2010). Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. *PLoS One, 5*(5), e10810. doi:10.1371/journal.pone.0010810

Bachurin, S. O., Bovina, E. V., & Ustyugov, A. A. (2017). Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. *Med Res Rev, 37*(5), 1186-1225. doi:10.1002/med.21434

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet, 377*(9770), 1019-1031. doi:10.1016/s0140-6736(10)61349-9

Cognigni, P., Felsenberg, J., & Waddell, S. (2018). Do the right thing: neural network mechanisms of memory formation, expression and update in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol, 49*, 51-58. doi:10.1016/j.conb.2017.12.002

Combs, B., Voss, K., & Gamblin, T. C. (2011). Pseudohyperphosphorylation has differential effects on polymerization and function of tau isoforms. *Biochemistry, 50*(44), 9446-9456. doi:10.1021/bi2010569

Cowan, C. M., Quraishe, S., Hands, S., Sealey, M., Mahajan, S., Allan, D. W., & Mudher, A. (2015). Rescue from tau-induced neuronal dysfunction produces insoluble tau oligomers. *Sci Rep, 5*, 17191. doi:10.1038/srep17191

Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in Drosophila: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci, 28*, 275-302. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651

Dinkel, P. D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., & Margittai, M. (2011). Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. *Biochemistry, 50*(20), 4330-4336. doi:10.1021/bi2004685

Dominguez-Meijide, A., Vasili, E., & Outeiro, T. F. (2020). Pharmacological Modulators of Tau Aggregation and Spreading. *Brain Sci, 10*(11). doi:10.3390/brainsci10110858

Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., Hardlund, J. H., . . . Wischik, C. M. (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet, 388*(10062), 2873-2884. doi:10.1016/s0140-6736(16)31275-2

Goode, B. L., Chau, M., Denis, P. E., & Feinstein, S. C. (2000). Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenetative disease. *J Biol Chem, 275*(49), 38182-38189. doi:10.1074/jbc.M007489200

Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med, 15*(3), 112-119. doi:10.1016/j.molmed.2009.01.003

Hey, J. A., Yu, J. Y., Versavel, M., Abushakra, S., Kocis, P., Power, A., . . . Tolar, M. (2018). Clinical Pharmacokinetics and Safety of ALZ-801, a Novel Prodrug of Tramiprosate in Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clin Pharmacokinet, 57*(3), 315-333. doi:10.1007/s40262-017-0608-3

Hoskin, J. L., Sabbagh, M. N., Al-Hasan, Y., & Decourt, B. (2019). Tau immunotherapies for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs, 28*(6), 545-554. doi:10.1080/13543784.2019.1619694

Hosokawa, M., Arai, T., Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Yamashita, M., Akiyama, H., & Hasegawa, M. (2012). Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One, 7*(12), e52389. doi:10.1371/journal.pone.0052389

Hung, S. Y., & Fu, W. M. (2017). Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J Biomed Sci, 24*(1), 47. doi:10.1186/s12929-017-0355-7

Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem, 283*(46), 32066-32076. doi:10.1074/jbc.M805300200

Jouanne, M., Rault, S., & Voisin-Chiret, A. S. (2017). Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem, 139*, 153-167. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.070

Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2010). Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in Drosophila. *J Neurosci, 30*(2), 464-477. doi:10.1523/jneurosci.1490-09.2010

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev, 12*(1), 289-309. doi:10.1016/j.arr.2012.06.003

Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C., & Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol, 4*, 83. doi:10.3389/fneur.2013.00083

Papanikolopoulou, K., Kosmidis, S., Grammenoudi, S., & Skoulakis, E. M. (2010). Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. *Biochem Soc Trans, 38*(4), 981-987. doi:10.1042/bst0380981

Papanikolopoulou, K., Roussou, I. G., Gouzi, J. Y., Samiotaki, M., Panayotou, G., Turin, L., & Skoulakis, E. M. C. (2019). Drosophila Tau Negatively Regulates

Translation and Olfactory Long-Term Memory, But Facilitates Footshock Habituation and Cytoskeletal Homeostasis. *J Neurosci, 39*(42), 8315-8329. doi:10.1523/jneurosci.0391-19.2019

Papanikolopoulou, K., & Skoulakis, E. M. (2015). Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in Drosophila. *Hum Mol Genet, 24*(7), 2065-2077. doi:10.1093/hmg/ddu726

Regan, P., Whitcomb, D. J., & Cho, K. (2017). Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau. *Neuroscientist, 23*(2), 137-151. doi:10.1177/1073858416633439

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., . . . Ashe, K. H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science, 309*(5733), 476-481. doi:10.1126/science.1113694

Schwalbe, M., Kadavath, H., Biernat, J., Ozenne, V., Blackledge, M., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2015). Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231. *Structure, 23*(8), 1448-1458. doi:10.1016/j.str.2015.06.002

Shin, S., Kim, D., Song, J. Y., Jeong, H., Hyeon, S. J., Kowall, N. W., . . . Kim, Y. K. (2020). Visualization of soluble tau oligomers in TauP301L-BiFC transgenic mice demonstrates the progression of tauopathy. *Prog Neurobiol*, 101782. doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101782

Sibille, N., Huvent, I., Fauquant, C., Verdegem, D., Amniai, L., Leroy, A., . . . Landrieu, I. (2012). Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins, 80*(2), 454-462. doi:10.1002/prot.23210

Soeda, Y., Yoshikawa, M., Almeida, O. F., Sumioka, A., Maeda, S., Osada, H., . . . Takashima, A. (2015). Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. *Nat Commun, 6*, 10216. doi:10.1038/ncomms10216

Sydow, A., Van der Jeugd, A., Zheng, F., Ahmed, T., Balschun, D., Petrova, O., . . . Mandelkow, E. M. (2011). Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci, 31*(7), 2511-2525. doi:10.1523/jneurosci.5245-10.2011

Uversky, V. N. (2015). Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci, 7*, 18. doi:10.3389/fnagi.2015.00018

Van der Jeugd, A., Hochgräfe, K., Ahmed, T., Decker, J. M., Sydow, A., Hofmann, A., . . . Mandelkow, E. M. (2012). Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. *Acta Neuropathol, 123*(6), 787-805. doi:10.1007/s00401-012-0987-3

OTHER SCIENTIFIC PUBLICATIONS

Neurobiology of Disease

The Two Cysteines of Tau Protein Are Functionally Distinct and Contribute Differentially to Its Pathogenicity *in Vivo*

Engie Prifti,[1*] Eleni N. Tsakiri,[1*] Ergina Vourkou,[1] George Stamatakis,[2] Martina Samiotaki,[2] and Katerina Papanikolopoulou[1]

[1]Institute for Fundamental Biomedical Research, and [2]Institute for Bio-innovation, Biomedical Sciences Research Centre "Alexander Fleming," Vari, 16672, Greece

Although Tau accumulation is clearly linked to pathogenesis in Alzheimer's disease and other Tauopathies, the mechanism that initiates the aggregation of this highly soluble protein *in vivo* remains largely unanswered. Interestingly, *in vitro* Tau can be induced to form fibrillar filaments by oxidation of its two cysteine residues, generating an intermolecular disulfide bond that promotes dimerization and fibrillization. The recently solved structures of Tau filaments revealed that the two cysteine residues are not structurally equivalent since Cys-322 is incorporated into the core of the fibril, whereas Cys-291 projects away from the core to form the fuzzy coat. Here, we examined whether mutation of these cysteines to alanine affects differentially Tau mediated toxicity and dysfunction in the well-established *Drosophila* Tauopathy model. Experiments were conducted with both sexes, or with either sex. Each cysteine residue contributes differentially to Tau stability, phosphorylation status, aggregation propensity, resistance to stress, learning, and memory. Importantly, our work uncovers a critical role of Cys-322 in determining Tau toxicity and dysfunction.

Key words: **aggregation; cysteines; dysfunction; Tau protein; toxicity; ubiquitination**

Significance Statement

Cysteine-291 and Cysteine-322, the only two cysteine residues of Tau present in only 4-Repeat or all isoforms, respectively, have competing functions: as the key residues in the catalytic center, they enable Tau auto-acetylation; and as residues within the microtubule-binding repeat region are important not only for Tau function but also instrumental in the initiation of Tau aggregation. In this study, we present the first *in vivo* evidence that their substitution leads to differential consequences on Tau's physiological and pathophysiological functions. These differences raise the possibility that cysteine residues play a potential role in determining the functional diversity between isoforms.

Introduction

Tau is a microtubule-associated protein that occurs mainly in neurons, crucial for the elongation of microtubule labile domains (Qiang et al., 2018) among several other physiological functions at the synapse and in the nucleus, as well as interactions with the plasma membrane and the actin cytoskeleton (Sotiropoulos et al., 2017). In the adult human brain, alternative splicing of a single-copy gene generates six Tau isoforms that differ by the number of N-terminal insertions and microtubule-binding repeats (MBRs). Tau has 85 potential phosphorylation sites that regulate its affinity for microtubules, with excess steady-state phosphorylation being associated with disease (Wang and Mandelkow, 2016).

Intracellular Tau aggregates are the defining feature of a group of neurodegenerative dementias called Tauopathies, presenting varying clinical symptoms (Arendt et al., 2016). In addition to serving as markers for differential diagnosis, Tau aggregates can mediate disease propagation (Peng et al., 2020) and serve as direct drivers of toxicity (Ballatore et al., 2007). In recent years, studies in animal models have shown that Tau oligomers correlate with synapse loss and behavioral deficits much better than the appearance of mature fibrils and prefibrillar events have gained considerable attention with respect to their toxic potential (Santacruz et al., 2005; Berger et al., 2007).

Tau presents conformational flexibility, rendering it highly soluble; and it is therefore surprising that it assembles into filaments (Wang and Mandelkow, 2016). It has been proposed that

Received July 23, 2020; revised Oct. 21, 2020; accepted Nov. 25, 2020.

Author contributions: E.P., E.N.T., E.V., and K.P. designed research; E.P., E.N.T., E.V., G.S., M.S., and K.P. performed research; E.P., E.N.T., E.V., G.S., M.S., and K.P. analyzed data; E.P., E.N.T., E.V., M.S., and K.P. edited the paper; K.P. wrote the paper.

*E.P. and E.N.T. contributed equally to this work.

This work was supported by Stavros Niarchos Foundation to the Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming," as part of the Foundation's initiative to support the Greek research center ecosystem, Fondation Sante, and the Hellenic Foundation for Research and Innovation. We thank Dr. Efthimios Skoulakis for fly strains and for critical reading of the manuscript; and Dr. Jean Y Gouzi for performing pilot LTM experiments.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Katerina Papanikolopoulou at papanikolopoulou@fleming.gr.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1920-20.2020

Copyright © 2021 the authors

Tau fibrillization may be associated with folding events, which allow Tau monomers to acquire partially folded, β-sheet-enriched structures that further self-assemble to form highly ordered fibrils (Jeganathan et al., 2008), potentially mediated by two hexapeptide motifs in the MBR (von Bergen et al., 2005). In addition, cysteines appear capable of forming disulfide-linked dimers that accelerate the conformational conversion of Tau into fibrillary aggregates *in vitro* (Schweers et al., 1995; Bhattacharya et al., 2001) and compounds that target these residues prevent Tau aggregation (Soeda et al., 2015). However, the specific events leading in Tau aggregation *in vivo* are not yet established.

Of the two Tau cysteines, Cys-322 is present in all isoforms, whereas Cys-291 is found only in 4R species. A recent study revealed the ability of Tau to perform thiol/disulfide exchanges with tubulin and brought new insights into the role of these two residues in the correct localization of Tau on microtubules (Martinho et al., 2018). In the two C-shaped protofilaments constituting the Tau filaments from AD brains, Cys-322 is incorporated into the core of the fibril, whereas Cys-291 is in the disordered portion of the protein forming the "fuzzy coat" (Fitzpatrick et al., 2017). This was evidence that two Tau cysteines are not structurally equivalent. Based on this distinction, we aimed to determine whether they were equivalent or contributed differentially to Tau-mediated neuronal toxicity and dysfunction *in vivo* using the established *Drosophila melanogaster* Tauopathy model (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2011).

Materials and Methods

Drosophila culture and strains

Flies were cultured in standard sugar-wheat flour food supplemented with soy flour and $CaCl_2$ (Acevedo et al., 2007). Pan-neuronal transgene expression was achieved using the *Elav*^{C155}-Gal4;Ras2-Gal4 driver (Robinow and White, 1988; Walker et al., 2006; Keramidis et al., 2020). The double driver was constructed using standard genetic crosses. The gstD-ARE:GFP (antioxidant response element [ARE] of the *gstD* gene) reporter transgenic line was a kind gift from Prof. D. Bohmann (University of Rochester). Experiments were performed at 25°C unless noted otherwise. To generate the new equivalently expressing transgenes within the same attp site, we used the *UAS-htau*$^{FLAG\text{-}2N4R}$, which has been described previously (Kosmidis et al., 2010). The same cDNA was subcloned into pUAS.attB (Bischof et al., 2007) as EcoRI/XbaI fragment. The Cys mutants were generated by replacing Cys-291 and Cys-322 with Ala using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. The mutagenic oligonucleotides for each mutant are shown below. The silent restriction site BamHI introduced for effective screening of positive clones appears underlined in italics, whereas the amino acid substitution is shown in bold. The mutagenic oligonucleotides for C291A 5′-GCAACGTCC AGTCCAAGGCT*GGATCC*AAGGATAATATC-3′ 5′- GATATTAT CCTT*GGATCC*AGCCTTGGACTGGACGTTGC-3′ and for C322A 5′-CCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGGCT*GGATCC*TTAGGCAACA TCC-3′ 5′- GGATGTTGCCTAA*GGATCC*AGCCTTGGAGGTCACC TTGCTCAGG-3′ were annealed onto the pUAS.attB *UAS-htau*$^{FLAG\text{-}2N4R}$ plasmid template. For the generation of the double Cys mutant, the pUAS.attB *UAS-htau*$^{C291A\ FLAG\text{-}2N4R}$ served as a template for cloning with the C322A primers. The sequence of the mutants was confirmed by dsDNA sequencing (VBC-Biotech). Transgenic flies were generated by phiC31-mediated transgenesis by BestGene. DNAs were injected into genomic landing site attP2 on the third chromosome (BDSC #8622).

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from *Drosophila* heads using TRI Reagent (Sigma Millipore) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription reaction from DNase I-treated total RNA was conducted using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Aliquots of 1 μg cDNA from each RT reaction were then subjected to PCR using the Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega). Semiquantitative PCR analyses were run using the following conditions: a denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 28 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, primer annealing at 62°C for 40 s, and primer extension at 72°C for 1 min. The ribosomal gene rp49 was used as a normalizer. The primers used were as follows: Tau-F:5′-CCCGCACCCCGTCCCTTCC-3′; Tau-R:5′-GATCTCCGCCCCGTGGTCTGTCTT-3′; rp49-F:5′-GATCGTGAAGAAGCGCAC-3′; and rp49-R: 5′-CTTCTTGAATC CGGTGGG-3′. Four independent experiments were performed. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, and quantification of gels was performed by scanning densitometry for the digital image analysis of PCR amplicons using the freely available ImageJ software.

Western blotting and antibodies

For Western blotting, adult female at 1-3 d after eclosion were homogenized in 1× Laemmli buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 100 mM DTT, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.01% bromophenol blue), the extracts heated for 3 min at 95°C, centrifuged at 11,000 × *g* for 5 min, and separated in 10% SDS-acrylamide gels. For Western blotting with phospho-antibodies, adult male heads at 1-3 d after eclosion have equally been used. Proteins were transferred to PVDF membranes and probed with mouse monoclonal anti-Tau (5A6, Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-Ub (P4D1, Santa Cruz Biotechnology), anti-GFP (B2, Santa Cruz Biotechnology), AT270, AT100, and AT8 from Thermo Fisher Scientific, and the polyclonal antibodies anti-pT212 (BioSource), anti-pS214 (BioSource), anti-pS262 (ProSci), and anti-pS396 (Cell Signaling). All Tau antibodies were used at 1:1000, whereas the appropriate anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody was applied at 1:5000 dilution. Anti-Ub was used at 1:5000 dilution and anti-GFP at 1:1000 dilution. To normalize for sample loading, the membranes were concurrently probed with an anti-syntaxin (Syx) primary antibody (8C3, Developmental Studies Hybridoma Bank) at a 1:3000 dilution or anti-tubulin (E7, Developmental Studies Hybridoma Bank) at a 1:500 dilution. Proteins were visualized with chemiluminescence (Immobilon Crescendo, Millipore), and signals were quantified by densitometry with the Image Lab 5.2 program (Bio-Rad). Results were plotted as mean ± SEM from at least three independent experiments. The data were analyzed by standard parametric statistics (*t* tests) as indicated in the figure legends.

Proteasome inhibitor treatment

Young transgenic flies (2 d after eclosion) were cultured for 2 d at 25°C in standard fly food with or without 20 μM bortezomib (Sigma Millipore). After that, treated flies were transferred in normal food for 5 d (Tsakiri et al., 2017). Four female heads from each group were homogenized in 1× Laemmli sample buffer and analyzed by Western blot.

LC-MS/MS analysis

Fly heads were homogenized in lysis buffer consisting of 50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. After centrifugation at 11,000 × *g* for 10 min, supernatants were incubated overnight at 4°C with anti-FLAG-coated agarose beads (Sigma Millipore) using a roller shaker. After washing the beads 3 times with 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, elution was performed under acidic conditions using 0.1 M glycine HCl, pH 3.5, following immediate neutralization of the sample according to the manufacturer's instructions. The eluent samples were subjected to the sp3 protein purification and digestion protocol (Hughes et al., 2019). Briefly, the immunoprecipitated eluates were subjected to alkylation with iodoacetamide at a final concentration of 100 mM and then mixed with 20 μg of a hydrophilic paramagnetic bead mixture at a final concentration of 50% ethanol. The samples were placed on a magnetic rack, and the supernatant was discarded. The beads were washed 3 times with 80% ethanol. The proteins were digested with trypsin/LysC mix (Promega) in 25 mM ammonium bicarbonate solution at an enzyme ratio of 1:50 overnight at 37 C on a shaking incubator. The next day, the

supernatant was kept and vacuum-dried. Finally, the samples were solubilized in 0.1% formic acid (FA) in water.

LC conditions. The samples were preconcentrated on a PepMap C18 trapping column at a rate of 30 μl of Buffer A (0.1% FA in water) for 1 min. The samples were injected on a 50-cm-long PepMap column, and the LC gradient used was 8% Buffer B (0.1% FA in acetonitrile) to 40% in 81.5 min followed by an increase to 90% in 0.5 min. The gradient was kept for 2 min, and the column was equilibrated for 15 min before next injection.

MS conditions. A full MS scan was acquired on a Q Exactive Orbitrap HF-X mass spectrometer operated in the range of 390-1400 m/z using 60K resolving power with an AGC of 3×10^6 and max IT of 45 ms, followed by MS/MS scans of the 15 most abundant ions, using 15K resolving power with an Automatic Gain Control (AGC) of 2×10^5 and max Injection Time (IT) of 22 ms. All survey scans were internally calibrated using the 445.1200 background ion mass. Selected ions were then dynamically excluded from further selection during 30 s.

Data analysis. The spectra were analyzed by MaxQuant 1.6.14.0 (Tyanova et al., 2016) using the wild-type Tau 2N4R FASTA sequence and the mutated 2N4R Tau at positions 291 and 322. The search was looking for fully tryptic peptides potentially modified by ubiquitination of lysine residues, deamidation of asparagines and glutamines, oxidation of methionines, and with FDR filtering at 5% (peptide, PSM and protein level).

Microtubule-binding assay

Endogenous microtubules. Microtubule-binding experiments were based on established methods (Feuillette et al., 2010; Gorsky et al., 2017; Papanikolopoulou et al., 2019) that use Taxol-stabilized microtubules isolated from head extracts (50 fly heads) by ultracentrifugation at 100,000 × *g* for 1 h. Soluble and insoluble fractions were probed with anti-Tau 5A6 and E7 β-tubulin 97EF at 1:1000 dilution from Developmental Studies Hybridoma Bank.

Exogenous microtubules. Determination of Tau binding to exogenously added bovine microtubules was performed according to the manufacturer's instructions (Cytoskeleton). Briefly, 50 heads were homogenized in 175 μl lysis buffer consisting of 80 mM PIPES, pH 7.0, 2 mM $MgCl_2$, and 0.5 mM EGTA, including protease and phosphatase inhibitors. Extracts were clarified with a low spin at 4000 × *g* for 5 min followed by a high spin of 7500 × *g* for 20 min at 4°C. Upon addition of Taxol at 20 μM, the supernatant was incubated with 10 μl of paclitaxel-stabilized *in vitro* polymerized microtubules (1 mg/ml) at room temperature for 30 min. Following incubation, fractions were loaded onto 300 μl of 50% glycerol gradient in 80 mM PIPES, pH 7.0, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, 20 μM Taxol, and centrifuged at 110,000 × *g* for 45 min. The supernatant and pellet fractions were collected and analyzed by immunoblotting with 5A6 to estimate the amount of Tau bound to microtubules.

F-actin precipitation assay

Total F-actin has been isolated as in Papanikolopoulou et al. (2019). Briefly, after dissection, eight brains from each genotype were homogenized in 25 μl of 100 mM Na_2HPO_4–NaH_2PO_4 at pH 7.2, 2 mM ATP, and 2 mM $MgCl_2$ buffer supplemented with phosphatase (Sigma Millipore) and protease (Thermo Fisher Scientific) inhibitor cocktails. Biotinylated phalloidin (Invitrogen) was added to a final concentration of 0.15 units per brain followed by precipitation with streptavidin-coupled Dynabeads (Invitrogen). The precipitated material and supernatant were probed with 5A6 (1:1000) and anti-actin (1:1000, Sigma Millipore).

Tau solubility assay

As described by Sealey et al. (2017), 10 fly heads were homogenized in 100 μl buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 175 mM NaCl, 1 M sucrose, and 5 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitors). The samples were then spun for 2 min at 1000 × *g*, and the supernatant was centrifuged at 186,000 × *g* for 2 h at 4°C. The supernatants were retained and regarded as the soluble S1 fraction. The resulting pellets were then resuspended in SDS buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 175 mM NaCl, 5% SDS) and centrifuged for 2 h at 200,000 × *g* (25°C). The supernatants were collected as the SDS-soluble (S2). S1 and S2 fractions were diluted in 2× Laemmli buffer, boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting as described previously using 5A6 and 8C3 antibodies.

For the extraction of aggregates with Formic Acid (FA) as described previously (Feuillette et al., 2010; Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015), flies were raised at 25°C and then aged for 10 d at 30°C. Thirty fly heads were homogenized in 100 μl RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 supplemented with protease and phosphatase inhibitors). Samples were agitated for 1 h at 4°C and then centrifuged at 11,300 × *g* for 20 min at 4°C. The supernatants were retained and regarded as the RIPA fraction. Pellets were resuspended in RIPA buffer as a washing step and recentrifuged. The resulting pellets were then re-extracted with 50 μl of 70% FA. The supernatants were collected as the FA fraction after centrifugation at 11,300 × *g* for 20 min at 4°C. FA was removed by Speed-Vac centrifugation, and 50 μl of SDS buffer (240 mM Tris, pH 6.8, 6% SDS, 30% glycerol, and 0.06% bromophenol blue) was then added to the samples. RIPA and FA fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting as described previously (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). MC1 antibody was a kind gift from P. Davies and used at 1:100.

Lifespan determination

Animals accumulating wt and mutant Tau protein under the control of the pan-neuronal $Elav^{C155}$-Gal4;Ras2-Gal4 driver were raised at 25°C together with control driver heterozygotes. Groups of 20 young male flies (1-3 d old) were collected and were maintained at 29°C until they expired. Flies were transferred to fresh vials every 3 d. Two independent experiments with a total of 300 flies were assessed per genotype. Survival curves were compared using log-rank tests (JMP 7.1 statistical software package, SAS Institute Inc).

Paraquat and H_2O_2 sensitivity

Animals accumulating wt and mutant Tau protein under the control of the pan-neuronal $Elav^{C155}$-Gal4;Ras2-Gal4 driver were raised at 25°C together with control driver heterozygotes. Oxidative stress tests were performed at 25°C using medium containing 10% sucrose, 1× PBS, 0.8% low melt agarose, and 5% H_2O_2. Twenty young males (1-3 d old) were transferred to fresh medium every 24 h (Svensson and Larsson, 2007). Paraquat feeding has been performed as described by Dias-Santagata et al. (2007). Groups of 20 male flies (1-3 d old) were fed 30 mM of methyl viologen (Acros Organics) in standard fly food. At least 300 flies were assessed per genotype.

Heat stress assay

Animals accumulating wt and mutant Tau protein under the control of the pan-neuronal $Elav^{C155}$-Gal4;Ras2-Gal4 driver were raised at 25°C together with control driver heterozygotes. Groups of 30 young male flies were collected in vials containing fresh medium. The next day, flies were incubated at 40°C in empty vials, and the time until all individuals were paralyzed was recorded. Assays were videotaped for scoring, and at least 150 flies were assessed per genotype.

Behavioral analyses

Mixed sex population flies were trained with classical olfactory aversive conditioning protocols (Tully and Quinn, 1985) as previously described (Sealey et al., 2017; Papanikolopoulou et al., 2019). The aversive odors used for conditioning were benzaldehyde (5% v/v) and 3-octanol (50% v/v) diluted in isopropylmyristate (Fluka). Training and testing were conducted at 25°C and 75% relative humidity under dim red light. To assess learning, flies were tested immediately after a single training cycle consisting of 30 s Odor A with six 90 V shocks at 5 s interstimulus interval, 30 s air, and 30 s Odor B without reinforcement. For limited training, flies were tested immediately after a single training cycle consisting of 15 s Odor A with three 90 V shocks at 5 s interstimulus interval, 30 s air, and 15 s Odor B without reinforcement. For long-term memory (LTM), flies underwent five training cycles spaced at 15 min rest

intervals, and tested 24 h later. For LTM–anesthesia-resistant memory (ARM), flies were submitted to five massed conditioning cycles, and memory was tested after 24 h. In each cycle, flies were exposed for 1 min to Odor A paired with twelve 90 V electric shocks at 5 s interstimulus interval, followed by 30 s of air and 1 min Odor B without reinforcement. To obtain animals for both learning and memory assays, UAS-hTau transgenes were crossed *en masse* with $Elav^{C155}$-Gal4;Ras2-Gal4 driver at 25°C. Upon eclosion, they were separated in groups of 50-70 animals in vials and placed at 30°C overnight. All experiments were conducted in a balanced manner, where all genotypes involved in an experiment were tested per day. Data were analyzed parametrically with the JMP statistical package (SAS Institute) as described previously (Sealey et al., 2017; Papanikolopoulou et al., 2019).

Experimental design and statistical analysis

For all experiments, controls and experimental genotypes were tested in the same session in balanced design. The order of training and testing these genotypes was randomized. We required an experimental result to be significantly different from both genetic controls. Data are mean ± SEM. Data were analyzed parametrically with the JMP 7.1 statistical software package (SAS Institute) as described previously. Following initial ANOVA, planned multiple comparisons were performed using $p = 0.05$. The level of significance was adjusted for the experiment-wise error rate. Detailed results of all ANOVA and planned comparisons are reported in the text. Detailed results of all ANOVA and planned comparisons using the Least Squares Means (LSM) approach are reported in the text.

Results

Cys-322 plays a dominant role in regulating tau stability

To unravel the effect of each cysteine mutation *in vivo*, we used a site-directed integration strategy to generate transgenic fly lines expressing the WT human Tau 2N4R isoform, as well as its single (C291A and C322A) and double (C291A/C322A, hereafter called Cd) cysteine mutants. The attP/attB-targeted integration system has previously been shown to ensure comparable expression levels among transgenes (Markstein et al., 2008). However, despite comparable levels of transgene-encoded messenger RNAs (Fig. 1*A*, for C291A, C322A, and Cd, respectively: $p = 0.931$, $p = 0.994$, $p = 0.996$, $n = 4$), their protein levels appeared significantly altered compared with wt Tau (Fig. 1*A*, for C291A, C322A, and Cd, respectively: $p = 0.839$, $p = 0.00053$, $p = 6.72e\text{-}12$, $n = 4$). Mutation of Cys-322, but not of Cys-291, resulted in decreased Tau levels, suggesting that Cys-322 is one key residue involved in stability of the protein. Noteworthy, mutation of both cysteines led to a dramatic decrease of total Tau levels.

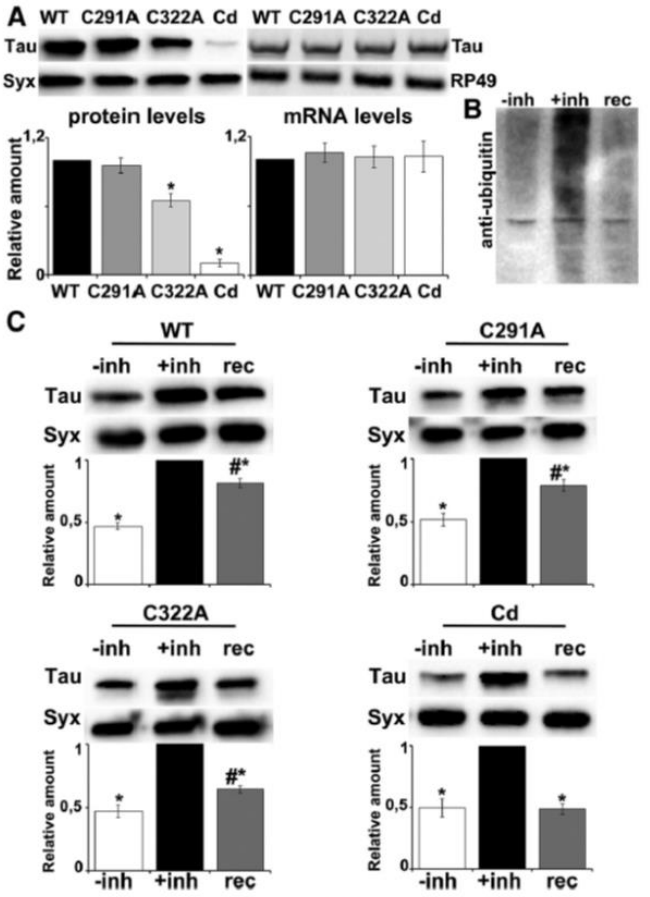


Figure 1. Cys-322 substitution alters Tau stability. ***A***, Left, Representative blot from head lysates of flies accumulating wt Tau pan-neuronally compared with similar lysates from site-specific Cys mutants. For the quantifications, total Tau levels (revealed with the 5A6 antibody) were normalized using Syx and shown as ratios of their means ± SEM relative to their respective levels in fly heads expressing wt Tau alone, which is arbitrarily set to 1. $*p < 0.05$, significantly reduced levels of the indicated mutant from wt Tau (Dunnett's). Right, Representative RT-PCR of Tau mRNA levels in flies expressing pan-neuronally the indicated Tau transgenes. The RP49 RNA served as an internal reference gene for the reaction and has been used as a normalization control for the quantifications. The normalized level of wt Tau for each quantification was fixed to 1. Error bars indicate mean ± SEM relative mRNA levels of mutant transgenes, over that of the wt Tau. ***B***, Flies expressing pan-neuronally the Tau transgenes were treated with 20 μM of the proteasomal inhibitor bortezomib for 2 d and after transferred in normal food for 5 d to allow recovery of proteasome function. Lysates were immunoblotted with anti-ubiquitin to probe the accumulation of ubiquitinated proteins on inhibition of the proteasome. ***C***, Representative Western blots demonstrate the Tau levels for each condition as described in ***B*** (untreated, treated with the inhibitor, and after recovery of proteasome function). For the quantifications below, levels of the protein were normalized using the Syx loading control and shown as a ratio of their means ± SEM relative to their respective levels in fly heads treated with the inhibitor, which is set to 1. $*p < 0.05$, significantly altered levels compared with +inh. $^{\#}p < 0.05$, significant differences between levels after the drug is removed and predrug levels (rec vs −inh) (each pair Student's *t* test). Detailed statistics can be found in the text.

It has previously been reported that mutation of both cysteines abolished the auto-acetylation activity of Tau (Cohen et al., 2013). Since Lys-directed modifications play key regulatory roles with respect to rates of Tau turnover through the ubiquitin-proteasome system (Min et al., 2010), we hypothesized that cysteine-deficient Tau may be more prone to ubiquitination, which subsequently could enhance its proteasomal degradation (Morris et al., 2015). To test our hypothesis, we first treated flies with the proteasome inhibitor bortezomib (Tsakiri et al., 2017) for 2 d, to block proteasome function as indicated by the accumulation of ubiquitinated proteins (Fig. 1*B*, +inh). This resulted in a twofold increase in the levels of all four Tau lines (Fig. 1*C*, −inh vs +inh, WT $p = 0.00105$, C291A $p = 0.00798$, C322A $p = 5.66e\text{-}05$, Cd $p = 7.22e\text{-}05$, $n = 4$). Five days after removing the inhibitor and hence reactivation of the proteasome, we measured the amount of Tau present in the cell. We detected persistently elevated wt Tau levels over the pretreated Tau levels (Fig. 1*C*, rec vs −inh, $p = 0.0006$, $n = 4$) with only 20%

Table 1. Relative ubiquitin occupancy ratios for the indicated lysine residues from each one of the four biological replicas per genotype

Ratio ubiquitinated/unmodified peptide										
	K87	K254	K280	K281	K290	K311	K331	K340	K369	K370
Tau	0.01408	0.06801	0	0.12651	0.01316	0	0	0	0.080482	0.090157
Tau	0	0.0788	0	0.20541	0	0	0	0	0.13288	0.10792
Tau	0	0	0	0.09234	0.00753	0.52086	0	0	0.07066	0.27483
Tau	0	0	0	0.15705	0.01631	0.07942	0	0	0.10758	0.2004
C291A	0.01695	0.06085	0	0.16463	0.01826	0	0	0	0.089301	0.066477
C291A	0.01131	0	0	0.2876	0	0.20959	0	0	0.060651	0.053265
C291A	0	0	0	0.09248	0	0.5864	0	0	0.084816	0
C291A	0	0	0	0.04654	0	0.29649	0	0	0.04709	0.19023
C322A	0.01756	0	0	0	0	0.04257	0.73966	0.28838	0.10684	0.0087613
C322A	0.02865	0.0649	0	0.20924	0.01769	0	0.7793	0.31489	0.13978	0.22778
C322A	0	0	0	0	0	0.04826	0.81804	0.35677	0.11204	0.084214
C322A	0	0	0	0.06676	0	0	0.30261	0	0.0855	0.061038
Cd	0.02242	0.07693	0.11869	0.13441	0.02257	0	0.38529	0	0.099263	0.072858
Cd	0	0	3.4277	0.09718	0.0036	0.24817	0.3703	0	0.085122	0.064483
Cd	0	0	4.6141	0.2954	0.00292	0.03007	1.6025	0	0.10357	0
Cd	0	0	0.67599	0.16907	0.00284	0.02692	0.19647	0	0.083227	0.046969

being degraded (+inh vs rec, p = 5e-10, n = 4). Similarly, a 20% reduction was observed for the C291A mutant (+inh vs rec, p = 9.64e-06, rec vs –inh, p = 0.0008, n = 4), 40% reduction for C322A (+inh vs rec, p = 1.8e-07, rec vs –inh, p = 0.0051, n = 4), and 50% reduction for the double mutant (+inh vs rec, p = 5.9e-05, n = 4), which reached its initial expression levels before addition of the inhibitor (rec vs –inh, p = 0.8805, n = 4).

To explore the biochemical mechanism underlying Tau destabilization induced by Cys substitution, we decided to perform mass spectrometry analysis for potential differences in the ubiquitination profile among the different Tau lines. The approach for the present investigation was to use FLAG immunoprecipitation to enrich for Tau and perform LC-MS/MS to localize ubiquitin modification to specific lysine residues. When the conjugated ubiquitin is cleaved with trypsin, it leaves two Gly residues on the modified lysine residues, generating a "ubiquitin signature peptide" (Peng et al., 2003). The LC-MS/MS analyses from four biological replicas yielded tryptic peptides from the Tau protein with a sequence coverage of ~80%. It should be noted here that it is particularly challenging to identify ubiquitination sites because of the low abundance of ubiquitinated proteins under normal conditions in the cell mostly because they are rapidly degraded by the proteasome (Wilkinson et al., 1995; Mann and Jensen, 2003). In congruence, as shown in Table 1, for each biological replicate, the ratio of ubiquitinated/unmodified peptide for Lys-87, Lys-254, Lys-281, Lys-290, Lys-311, Lys-369, and Lys-370 is particularly low in all samples. In that table, zero denotes that peptides containing the ubiquitinated residue were not captured in the proteomic experiments. Interestingly, ubiquitinated peptides for Lys-331, which is the first lysine residue downstream Cys-322 (Fig. 2*D*), have been detected only for C322A and Cd mutants with relatively high ratios. Representative spectra of detected modified and unmodified peptide species for Lys-331 are shown in Figure 2*B*, *E*. To further validate this result, we decided to include in our analysis three additional biological and two technical replicas for wt Tau reaching 93% coverage of the protein sequence. Only in one sample, we have detected ubiquitinated peptides for Lys-331 (Fig. 2*A*) with the ratio of ubiquitinated/unmodified peptide being equal to 0.07 and 0.05 in the two technical replicas of this sample. Moreover, peptides of the sequence ^{322}C(A)GSLGNIHHK^{331}PGGGQVEVK^{340} containing two diglycine-modified lysines have been positively identified only in the samples of the C322A mutant (Table 1, Lys340; Fig. 2*C*). A final striking difference is the particularly high ratio of Lys280 ubiquitination observed only for the Cd mutant (Table 1; Fig. 2*F*) and not for the other Tau lines. Given the critical role of ubiquitination in Tau turnover (Petrucelli et al., 2004; Tan et al., 2008), the above differences in the ubiquitination profile likely account for the decreased stability of the C322A and Cd mutants. Because we focus on the potentially differential contribution of each Cys to Tau properties and pathogenicity and also because of the decreased stability and particularly low Cd protein levels, the double mutant was not included in subsequent analyses.

Both cysteines impact the interaction of tau with microtubules, but only cys-322 affects tau actin-binding properties

One of the most important physiological functions of the Tau protein is to regulate assembly, dynamic behavior, and the spatial organization of microtubules (Barbier et al., 2019). Therefore, microtubule-binding affinity was tested for the three Tau constructs using two different assays. First, endogenous microtubules were sedimented by ultracentrifugation from fly head lysates in the presence of the microtubule stabilizing agent Taxol (Fig. 3, top) (Papanikolopoulou et al., 2019). The second assay was conducted by incubating lysates of wt or mutant Tau with preformed Taxol stabilized bovine microtubules (Fig. 3, middle). The pellet and supernatant fractions were subsequently probed for Tau and tubulin. Quantification of at least four independent experiments representing the relative level of Tau in the supernatant and pellet fractions showed that, in contrast to wt Tau, both cysteine-mutated proteins remained mostly in the supernatant and did not coprecipitate with microtubules (Fig. 3, top; C291A p = 2.35e-06, C322A p = 0.0005, n = 4; Fig. 3, middle; C291A p = 0.01,466, C322A p = 8.59e-06, n = 5). In congruence with the recently published Tau-binding mode to Taxol-stabilized

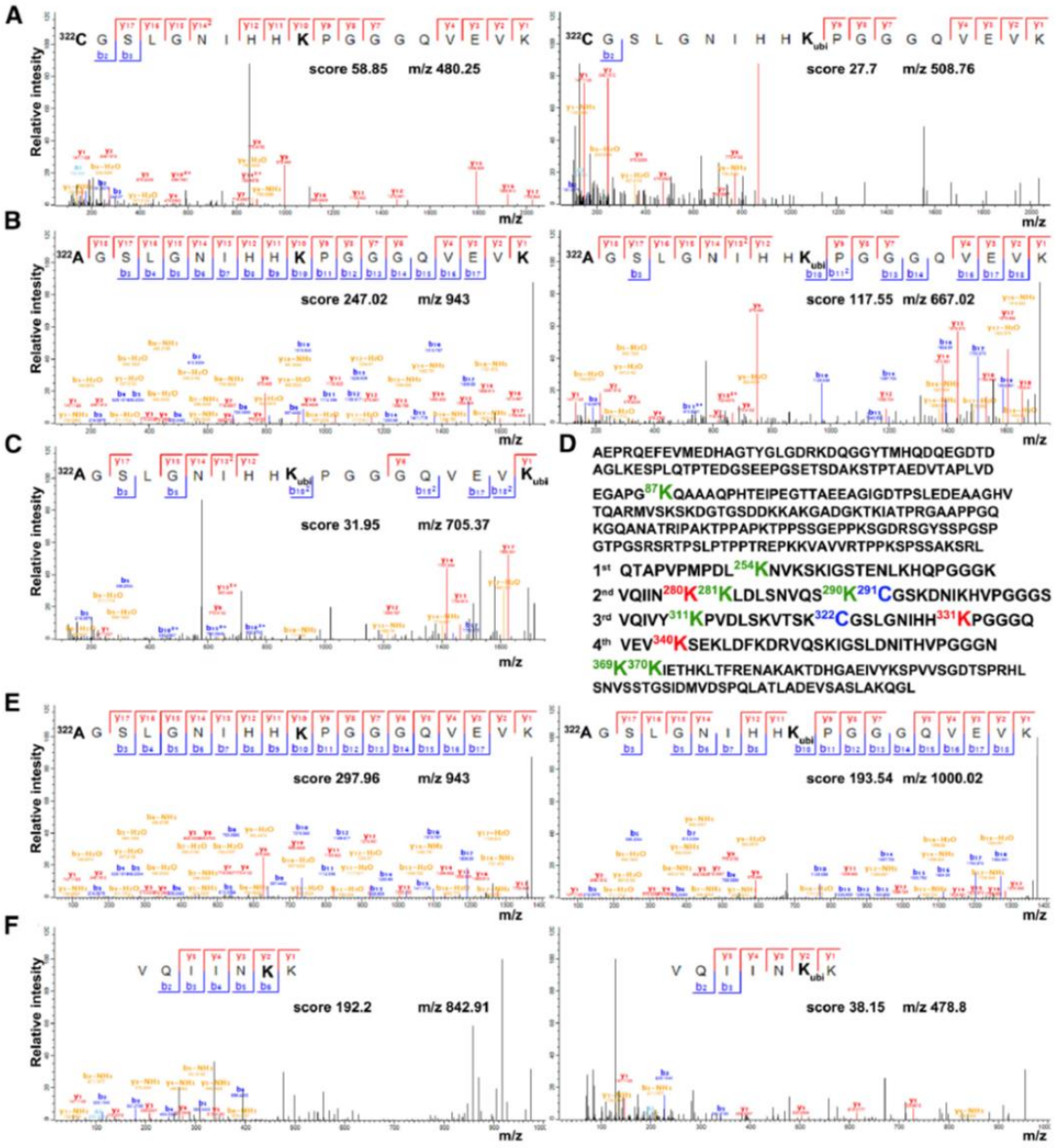


Figure 2. Cys-322 substitution affects the ubiquitination of Tau. ***A-C, E, F,*** Annotated spectrum of the indicated peptides unmodified or carrying the motif GlyGly (114.0429 Da) on the highlighted in bold lysine residues, characteristic of the ubiquitin remnant after tryptic cleavage. The annotation is done in the MaxQuant viewer, and the MaxQuant score is displayed together with the precursor ion mass. ***A,*** Modified Lys331 identified in wt Tau samples. ***B,*** Modified Lys331 identified in C322A samples. ***C,*** Modified Lys340 identified in C322A samples. ***E,*** Modified Lys331 identified in Cd samples. ***F,*** Modified Lys280 identified in Cd samples. ***D,*** Amino acid sequence of the Tau protein with the mutated cysteine residues shown in blue. Lys-87, Lys-281, Lys-290, Lys-254, Lys-311, Lys-369, and Lys-370 display low ubiquitination in all Tau variants and are highlighted in green. Red represents the lysine residues with high ubiquitinated/unmodified ratios identified in C322A and Cd samples.

microtubules (Martinho et al., 2018) suggesting that Cys-291 in R2 interacts with Cys-347 of α-tubulin and Cys-322 in R3 with Cys-131 of β-subunit, substitution of any of these two residues dramatically decreases the affinity of Tau for microtubules *in vivo*. Interestingly, these tubulin cysteines are conserved in vertebrate and invertebrate species (Little and Seehaus, 1988), and both *Drosophila* and bovine microtubules possess them.

In addition to microtubules, Tau is also implicated in the regulation of actin cytoskeleton (Elie et al., 2015), and *in vivo* human Tau interacts with endogenous filamentous actin in *Drosophila* neurons (Fulga et al., 2007). Therefore, we tested the potential effects of cysteine substitution on actin-binding affinity. F-actin was isolated from fresh brain extracts using biotinylated-phalloidin, and the precipitated material was probed for Tau. As

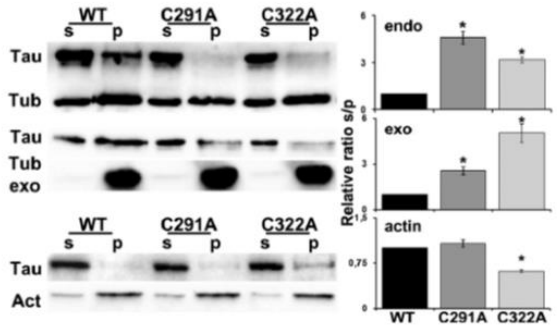


Figure 3. Effect of individual cysteine mutations on the association of Tau with the cytoskeleton. Top, Endogenous microtubules were purified from fly head lysates expressing pan-neuronally the indicated transgenes in the presence of Taxol. Pellet (p) and supernatant (s) fractions were analyzed by Western blotting using antibodies against Tau (5A6) and tubulin (E7). The ratio of the relative level of Tau in the supernatant to the Tau in the pellet fractions was used for quantification and shown as ratios of their means ± SEM relative to the ratio of wt Tau, which is arbitrarily set to 1. $*p < 0.05$, significantly reduced levels of Tau coprecipitated with microtubules for both Cys mutants (Dunnett's) compared with wt Tau. Middle, Preformed bovine microtubules have been added to fly head lysates expressing pan-neuronally the indicated transgenes and have been probed and quantified as above. $*p < 0.05$, significantly reduced levels of microtubule-bound Tau for both Cys mutants (Dunnett's) compared with wt Tau. Bottom, Phalloidin-bound F-actin was isolated from fresh brain extracts of flies expressing pan-neuronally the indicated transgenes, and pellet (p) and supernatant (s) fractions have been probed for Tau and actin. The ratio of the relative level of Tau in the supernatant to the Tau in the pellet fractions was used for quantification and shown as ratios of their means ± SEM relative to the ratio of wt Tau, which is arbitrarily set to 1. $*p < 0.05$, significantly increased levels of Tau coprecipitated with actin for C322A mutant (Dunnett's) compared with wt Tau.

shown in Figure 3 (bottom), quantification of three independent experiments representing the relative ratio of Tau in the supernatant and pellet fractions did not reveal differences between wt and the C291A mutant ($p = 0.3929$, $n = 3$), but a striking fraction of the C322A protein coprecipitated with F-actin (Fig. 3, bottom; $p = 0.0009$, $n = 3$). These results indicate that, although both cysteine residues are equally important for the interaction of Tau with microtubules, Cys-322 seems to be a differential negative regulator of Tau binding to actin filaments.

Cysteines regulate phosphorylation of tau at disease-associated epitopes

Since the cytoskeletal interactions of Tau depend critically on the phosphorylation status of the protein (Wang and Mandelkow, 2016), we hypothesized that, apart from making critical contacts with tubulin, cysteine substitution could alter the phosphorylation state of Tau, and therefore its ability to interact with the microtubules. To address this, we examined whether cysteine residues affect the overall phosphorylation pattern of Tau protein. All variants, of both sexes, were probed with a panel of antibodies targeting specific phosphorylated sites, and phospho-Tau levels were normalized against total Tau levels (Fig. 4). These phospho-antibodies recognize sites that are reported to be highly enriched AD brains and include pT181 (AT270), pS202/pT205 (AT8), pT212/pS214 (AT100), pT212, pS214, pS262, and pS396. Among these epitopes, only occupation of pS396 follows total Tau levels (Fig. 4, pS396: females, C291A $p = 0.9584$, C322A $p = 0.4894$; and males, C291A $p = 0.4009$, C322A $p = 0.9971$, $n = 6$), indicating no specific effects of loss of either Cys. However, all other sites appeared significantly suppressed in both mutants regardless of the fly sex (Fig. 4, pT212: females, C291A $p = 9.16e\text{-}06$, C322A $p = 1.73e\text{-}06$; and males, C291A $p = 5.37e\text{-}05$, C322A $p = 3.03e\text{-}05$, $n = 4$; AT8: females, C291A $p = 3.77e\text{-}09$, C322A $p = 2.32e\text{-}09$; and males, C291A $p = 1.25e\text{-}08$, C322A $p = 2.32e\text{-}09$, $n = 6$; AT270: females, C291A $p = 5.22e\text{-}08$, C322A $p = 1.48e\text{-}09$; and males, C291A $p = 3.19e\text{-}06$, C322A $p = 1.22e\text{-}06$, $n = 4$; and pS262: females, C291A $p = 7.19e\text{-}06$, C322A $p = 5.63e\text{-}09$; and males, C291A $p = 6.91e\text{-}05$, C322A $p = 3.38e\text{-}07$, $n = 4$). An exception was phosphorylation at pS214, which appears elevated in the C291A mutant (Fig. 4, pS214: females, C291A $p = 0.0004$, C322A $p = 0.0167$; and males, C291A $p = 0.0002$, C322A $p = 0.0073$, $n = 5$). Such quantitative effects may be mediated by local conformational changes precipitated by cysteine substitution potentially constraining access of kinases or phosphatases to these epitopes.

Phosphorylation at pT212 and pS214 in the proline-rich region creates a phosphoepitope recognized specifically by the AT100 antibody, which is prominent in the paired helical filamentous form of Tau, and often used in histopathological assessments (Zheng-Fischhofer et al., 1998; Regalado-Reyes et al., 2019). Interestingly, both mutants lack AT100 immunoreactivity, but apparently for different reasons. Reduced Ser-214 and Thr-212 occupation probably abolishes the AT100 signal in the C322A mutant, whereas a skewed ratio of phosphorylated pT212 to pS214 (Fig. 4, pS214 is highly occupied but not pT212) is apparently not conducive to recognition by the AT100 antibody (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015) in the case of C291A mutant. In addition to ubiquitination, this finding reveals further subtle differences in the biochemical profile of the mutants.

Cys-322 affects tau aggregation propensity

It has been reported that formation of intermolecular disulfide bonds accelerates Tau aggregation *in vitro* (Schweers et al., 1995; Bhattacharya et al., 2001; Sahara et al., 2007; Furukawa et al., 2011). Hence, it is anticipated that Cys substitution would affect Tau aggregation propensity *in vivo*, so we assessed the solubility profile of the mutants. Head lysates from animals expressing pan-neuronally these proteins were fractionated into soluble and insoluble materials and were probed for Tau. As shown in Figure 5*A*, Cys-291 has no effect on Tau solubility, whereas the ratio of soluble/insoluble fraction greatly increases on Cys-322 substitution (Fig. 5*A*, C291A $p = 0.6181$, C322A $p = 3.30e\text{-}07$, $n = 5$). Similar results were obtained with a different method on RIPA fractionation and extraction of the insoluble material with 70% FA (Fig. 5*B*, FA insoluble fraction). These results clearly differentiate the role of each cysteine residue in regulating Tau aggregation propensity.

Finally, to evaluate potential conformational alterations induced by the mutation of cysteines, we probed the immunoreactivity of the mutants with the MC1 antibody (Fig. 5*B*). MC1 targets a disease-specific conformational modification of Tau (Weaver et al., 2000) formed when discontinuous residues in the amino terminus become proximal to the MBRs (Jicha et al., 1997). Interestingly, both mutants were immunoreactive with the MC1 antibody, suggesting no differences in folding or pathology-related structure with wt Tau. Given that all Tau variants share common structural elements, this implies that other factors are likely modulating Tau self-assembly *in vivo* affecting the stability of the aggregates (i.e., post-translational modifications, such as ubiquitination, formation of disulfide bonds, etc.) (Dickey et al., 2006; Park et al., 2018).

Differential contribution of cysteine residues to tau-dependent toxicity

Does blocking these two cysteines have phenotypic consequences to Tau-induced toxicity? To address this, age-dependent

mortality as well as fly survival to heat and oxidative stress were assessed. Neuronal homeostatic responses to environmental stressors are essential for maintaining robust behavioral outputs, and Tau-induced toxicity has been shown to be accompanied by impaired neuronal fitness and function (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2011). Flies experiencing increased oxidative stress because of pathologic hTau accumulation have increased susceptibility to oxidative injury (Dias-Santagata et al., 2007; Keramidis et al., 2020). To that end, we first tested whether Tau mutant transgenic flies manifest altered responses to oxidative stress. Compared with the nontransgenic controls, flies pan-neuronally expressing wt Tau and the C291A mutant presented significantly higher sensitivity to the exogenous reactive oxygen species inducers H_2O_2 and paraquat (Fig. 6*A*, H_2O_2: WT $p = 2.7e\text{-}08$, C291A $p = 0.000176$ and paraquat: WT $p = 1.39e\text{-}08$, C291A $p = 9.27e\text{-}05$). It should be noted, however, that the sensitivity of the C291A mutants was intermediate between control and wt Tau-expressing flies (each pair Student's *t* test, C291A vs WT, H_2O_2: $p = 0.011$ and paraquat: $p = 5.15e\text{-}05$). In contrast, administration of H_2O_2 over 52 h and 30 mM paraquat over 28 h induced the same lethality in control and C322A mutant flies (Fig. 6*A*, H_2O_2: C322A $p = 0.7181$ and paraquat: C322A $p = 0.2908$).

One of the defense mechanisms against oxidative stress as well as other stressors is the activation of the Nrf2 pathway (Sykiotis and Bohmann, 2008). Upon oxidative injury, the transcription factor Nrf2 is released from its repressor Keap1 and is transferred to the nucleus where it binds to AREs and activates its targets (antioxidant genes, mitochondrial biosynthesis genes, etc.). Because the mutants present differential resistance to oxidative stress, we investigated the status of the Keap1/Nrf2 antioxidant pathway in Tau-expressing flies by crossing them with a GFP reporter line bearing the ARE of the *gstD1* gene (Sykiotis and Bohmann, 2008). Detection of ARE-dependent GFP expression by Western blot revealed that, compared with nontransgenic control flies, wt Tau caused potent induction of Keap1/Nrf2 signal transduction system (Fig. 6*B*, WT: $p = 7.46e\text{-}07$, $n = 4$). Interestingly, the antioxidant response was significantly suppressed in C291A-expressing flies (Fig. 6*B*, C291A: $p = 2.11e\text{-}05$, $n = 4$), suggesting that the wt and this mutant protein decrease the resistance to paraquat and H_2O_2-mediated oxidation via different mechanisms. Significantly, in the C322A-expressing flies, activation of genes under the regulatory control of the ARE promoter sequence was similar to that of control flies (Fig. 6*B*, C322A: $p = 0.6181$, $n = 4$), indicating that the presence of this Cys contributes to Tau-mediated oxidative stress.

We next analyzed fly survival under constant conditions of hyperthermia. To this end, Tau-expressing adult flies were subjected to a sustained 40°C heat shock to assess neuronal robustness by determining their ability to withstand environmental stress. Nontransgenic control flies were gradually affected by the thermal stress such that, by 30 min, almost 50% of the population was unresponsive (Fig. 6*C*). By comparison, wt Tau-expressing flies succumb more rapidly to heat stress starting at 18 min of continuous stress, with nearly 90% of the animals affected after 30 min (Fig. 6*C*, WT at 18 min $p = 0.0024$ and at all time points $p < 0.001$). Flies expressing the C291A mutant Tau also became catatonic and unresponsive more rapidly than control flies (Fig. 6*C*, C291A at 18 min $p = 0.2287$, at 22 min $p = 0.0074$, and at all time points $p < 0.01$). Finally, flies expressing C322A presented similar sensitivity to heat shock with control flies (Fig. 6*C*, C322A at all time points $p > 0.05$).

Tau toxicity ultimately results in the death of the organism, which can easily be scored by counting the number of surviving flies over time (Wittmann et al., 2001; Colodner and Feany,

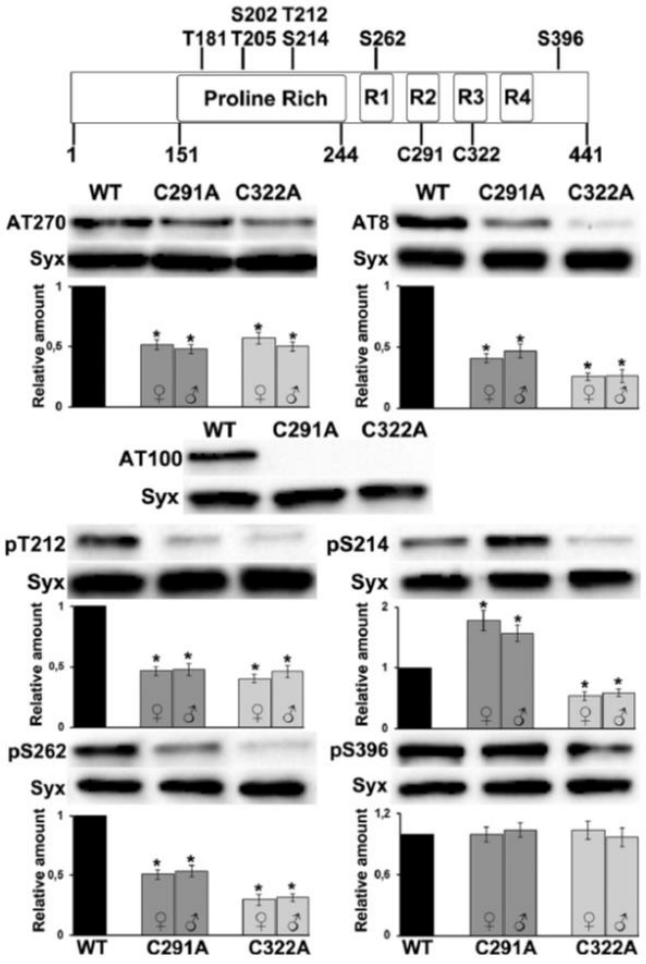


Figure 4. Effect of individual cysteine mutations on Tau phosphorylation at disease-associated sites. Schematic representation of human microtubule-associated protein Tau and the serine (S) and threonine (T) residues targeted by the phosphor antibodies used in this study. Most of the Ser and Thr are located in the proline-rich region flanking the four microtubule-binding repeats (R1-R4), and include T181, S202, T205, T212, S214, S262, and S396. Representative Western blots from head lysates of flies accumulating wt Tau pan-neuronally compared with similar lysates from single Cys mutants probed with the antibodies indicated on the right are shown below together with quantifications of at least four independent biological replicates for both female (♀) and male (♂) flies. Levels of the phosphorylated protein were first normalized using the Syx loading control and then against total Tau levels. The normalized level of wt Tau for each quantification was fixed to 1. Error bars indicate mean ± SEM relative levels of mutants phosphorylated at the given sites, over that of the wt Tau. $*p < 0.05$, significantly altered levels (Dunnett's).

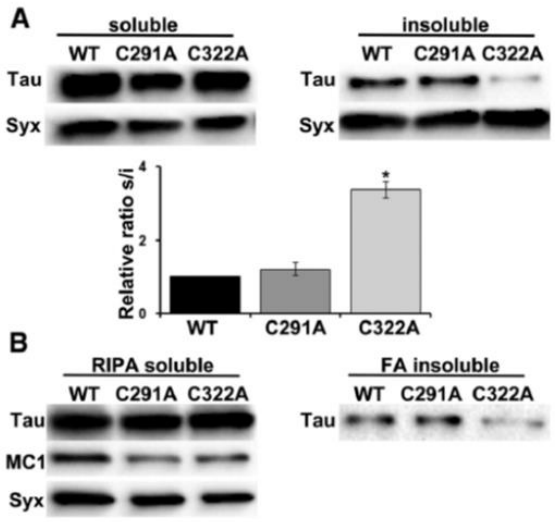


Figure 5. Effect of individual cysteine mutations on Tau conformation and aggregation propensity. ***A***, Representative Western blots of aqueous soluble and insoluble fractions generated from adult heads following pan-neuronal expression of the indicated transgenes. Syx was used as loading control. The Syx-normalized level of wt Tau in the soluble fraction over the insoluble fraction was fixed to 1. Error bars indicate mean ± SEM relative sol/ins ratios of the mutants, over that of the wt Tau. $*p < 0.05$, significantly low amount of the C322A mutant in the insoluble fraction (Dunnett's). Detailed statistics can be found in the text. ***B***, Transgenic flies expressing wt Tau or the single cysteine mutants under the control of the Elav;Ras-Gal4 driver were aged for 10 d. Proteins from adult heads were sequentially extracted with RIPA buffer and 70% FA and probed for Tau (5A6). Soluble RIPA fraction has also been probed with the conformation-specific MC1 antibody, and all transgenes displayed positive immunoreactivity. Syx was used as loading control.

2010; Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015; Sealey et al., 2017). Assaying lifespan at 30°C, wt Tau-expressing animals start to expire around day 18 (Fig. 6*D*, WT day 18 prob $\chi^2 = 0.0005$ and until day 29 prob $\chi^2 < 0.0001$) with 50% attrition occurring at day 24 (prob $\chi^2 =$ 1e-07). In contrast, 50% attrition in controls required at least 4 additional days (Fig. 6*D*, day 28). A reduction in lifespan was also observed for C291A starting at day 18 (Fig. 6*D*, C291A day 18 prob $\chi^2 = 0.00315$ and until day 29 prob $\chi^2 < 0.01$) with 50% attrition occurring at day 26 (prob $\chi^2 = 0.001$), yet the effect of C291A on decreasing lifespan was more modest than that of wt Tau (Fig. 6*D*, C291A vs WT day 21 prob $\chi^2 = 0.0236$, day 25 prob $\chi^2 =$ 5.68e-06, day 27 prob $\chi^2 = 0.001$, and day 28 prob $\chi^2 = 0.0405$). Finally, survival of C322A-expressing animals was statistically indistinguishable from that of control flies (Fig. 6*D*, C322A prob $\chi^2 > 0.2$ at all time points).

Collectively, these results indicate that Cys substitution is sufficient to alleviate Tau neurotoxicity *in vivo*. Abnormal Tau phosphorylation has traditionally been implicated in mediating Tau-induced toxicity (Wittmann et al., 2001; Nishimura et al., 2004), and the reduced toxic effects of both cysteine mutants compared with wt Tau could in part be correlated to their phosphorylation profile (Fig. 4). *Drosophila* models (Chatterjee et al., 2009; Feuillette et al., 2010; Talmat-Amar et al., 2011) provided further evidence that an optimal level of Tau phosphorylation is required to achieve a balance in the level of "free" and "microtubule bound" Tau. Both free cytosolic hyperphosphorylated forms of Tau with low affinity for microtubules and hypophosphorylated forms of Tau with abnormally high affinity for microtubule-binding cause an imbalance in the function of microtubules, eventually leading to toxicity. In the case of the cysteine mutants, it appears that the presence of unbound hypophosphorylated forms of Tau (Fig. 3) supports their lower toxicity compared with wt Tau. However, the mutants possess distinct biochemical characteristics that lead to differential ARE response (Fig. 6*B*) and actin-binding properties (Fig. 3), although it is not documented if and how the binding of hypophosphorylated forms of Tau to actin filaments affects its toxicity. Finally, differences in the biochemical profile of the mutants, such as ubiquitination (Table 1, Lys331 and Lys340), which leads to reduced Tau stability and expression levels, may also account for the benign character of C322A mutant compared with C291A.

Both cysteine residues impact hTau-associated dysfunction

Insights into Tau-mediated neuronal dysfunction can be assayed in the *Drosophila* model systems through investigation of learning and memory (Kosmidis et al., 2010; Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015; Sealey et al., 2017). Interestingly, phosphorylation at Ser-262 was proposed to be necessary for and predict learning deficits (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015; Keramidis et al., 2020); and given that this site is hypophosphorylated in the two mutants, we hypothesized that cysteine substitution could impact the cognitive performance of animals. To examine associative learning and memory, we used the olfactory classical conditioning paradigm (Tully and Quinn, 1985) and tested control and Tau-expressing animals immediately after training to assess 3 min memory and 24 h later to probe consolidated memories. Two forms of consolidated memories can be assayed in *Drosophila*: the protein synthesis-dependent LTM induced after multiple rounds of spaced training; and the protein synthesis-independent ARM, elicited after repeated massed training cycles (Tully et al., 1994).

Animals accumulating pan-neuronally the Tau transgenes were first subjected to an olfactory-associative learning task in which flies were presented with either 3 or 6 odor/shock pairings (Fig. 7*A*). In both conditions, wt Tau-expressing flies presented impaired performance compared with controls (Fig. 7*A*, 6 pairings ANOVA: $F_{(6,104)} = 3.7120$, $p = 0.0023$; subsequent LSM: $p = 0.00007876$ and $p = 0.003932$ vs controls, respectively; and 3 pairings ANOVA: $F_{(6,95)} = 4.8434$, $p = 0.0003$; subsequent LSM: $p = 0.001984$ and $p = 0.001123$ vs controls, respectively). In contrast, expression of the C322A mutant did not precipitate learning deficits (Fig. 7*A*; 6 pairings ANOVA: $F_{(6,104)} = 3.7120$, $p = 0.0023$; subsequent LSM: $p = 0.9312$ and $p = 0.2107$ vs controls, respectively; and 3 pairings ANOVA: $F_{(6,95)} = 4.8434$, $p = 0.0003$; subsequent LSM: $p = 0.8718$ and $p = 0.1268$ vs controls, respectively). Interestingly, flies expressing the C291A mutant performed equally well with controls at 6 pairings but limited training with just 3 pairings resulted in deficient learning (Fig. 7*A*, 6 pairings ANOVA: $F_{(6,104)} = 3.7120$, $p = 0.0023$; subsequent LSM: $p = 0.0758$ and $p = 0.4481$ vs controls, respectively; and 3 pairings ANOVA: $F_{(6,95)} = 4.8434$, $p = 0.0003$; subsequent LSM: $p = 0.001$ and $p = 0.0106$ vs controls, respectively). In agreement with previous reports (Sealey et al., 2017), pan-neuronal expression of wt human Tau resulted specifically in impaired LTM (Fig. 7*B*, ANOVA: $F_{(2,39)} = 17.9823$, $p < 0.0001$; subsequent LSM: $p =$ 2.37e-06 and $p = 0.000031$ vs controls, respectively), whereas ARM remained unaffected (Fig. 7*C*, ANOVA: $F_{(2,35)} = 3.8899$, $p = 0.0304$; subsequent LSM: $p = 0.9170$ and $p = 0.0257$ vs controls, respectively). In contrast, the memory performance of flies expressing the two cysteine mutants was not significantly different from controls (Fig. 7*B*, C291A ANOVA: $F_{(2,31)} =$

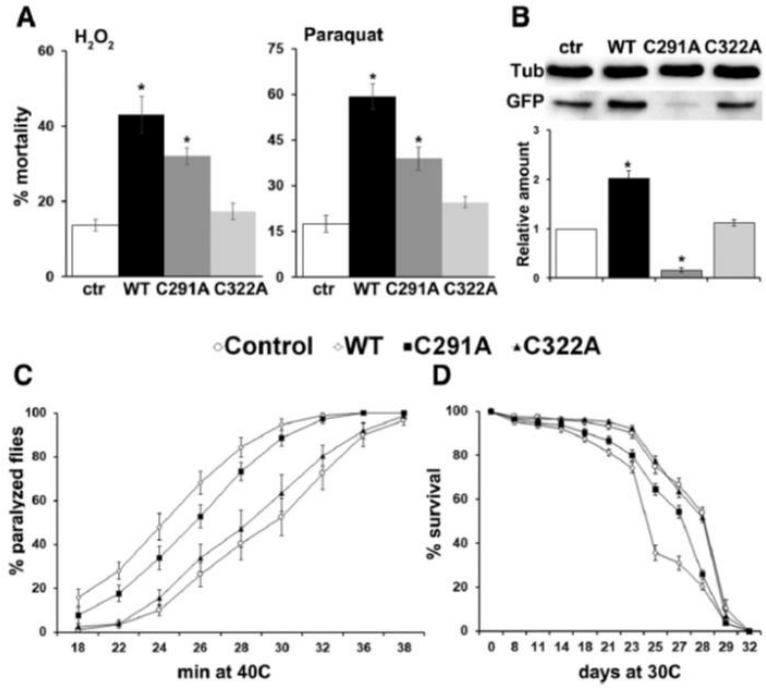


Figure 6. Cysteine substitution affects Tau neurotoxicity *in vivo*. ***A***, Response of flies expressing pan-neuronally the indicated transgenes to oxidant molecules. Flies have been treated either with 5% H_2O_2 or with 30 mM paraquat, and mortality was scored after 52 and 28 h, respectively. Data are mean ± SEM from two independent experiments, with a total of 300 flies assessed per genotype. $*p < 0.05$, significant difference (Dunnett's) from control driver heterozygote flies (Elav/+; Ras/+). ***B***, Representative Western blot of gstD1 (ARE)-GFP reporter expression in nontransgenic control flies and flies overexpressing pan-neuronally the indicated human Tau transgenes. For the quantifications below, levels of GFP expression were normalized using the tubulin (Tub) loading control and shown as a ratio of their means ± SEM relative to their respective levels in nontransgenic fly heads, which is set to 1. $*p < 0.05$, significantly altered levels (Dunnett's). ***C***, Flies expressing pan-neuronally the indicated Tau transgenes and control driver heterozygotes Elav/+; Ras/+ were subjected to a sustained 40°C heat shock. The rates at which flies of different genotypes succumb to heat shock are shown. Data are mean ± SEM from two independent experiments, with a total of 150 flies assessed per genotype. Increased susceptibility to heat shock was revealed for wt Tau and C291A-expressing flies ($p < 0.05$, Dunnett's). ***D***, Survival curves for animals expressing pan-neuronally the indicated transgenes at 30°C, in comparison with Elav/+; Ras/+ control heterozygotes. Data are mean ± SEM from two independent experiments, with a total of 300 flies assessed per genotype. Statistical analysis using the log rank test indicated significant differences in longevity after accumulation of wt Tau and C291A mutant (day 18 and until day 29 prob $\chi^2 < 0.01$). Detailed statistics can be found in the text.

6.0886, $p = 0.0062$; subsequent LSM: $p = 0.0015$ and $p = 0.1429$ vs controls, respectively; and C322A ANOVA: $F_{(2,39)} = 14.5887$, $p < 0.0001$; subsequent LSM: $p = 0.2914$ and $p = 7.52e\text{-}06$ vs controls, respectively). These results indicate that blocking cysteines of Tau confers a crucial role for this protein in neuronal dysfunction and support the proposal that elevated occupation of phosphor-Ser262 is indeed requisite for the learning deficits (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015; Keramidis et al., 2020).

Discussion

This work highlights the importance of cysteines to protein structure stabilization and to specific physiological and pathophysiological functions of Tau, including association with the cytoskeleton, neuronal toxicity, and dysfunction *in vivo*. How these residues influence such a range of functions is quite remarkable and is probably related to their redox-active nature and a complex array of intermolecular interactions with a variety of proteins (Bechtel and Weerapana, 2017). Our results point toward a synergistic interplay between cysteines to regulate Tau stability. Elimination of Cys-291 by itself cannot destabilize Tau, whereas Cys-322 substitution led to a significant reduction of Tau protein levels. This effect on stability was further exacerbated on concomitant mutation of Cys-291, as a consequence of differential protein degradation involving the ubiquitin-proteasome system (Fig. 1; Table 1).

Intriguingly, the elimination of cysteines seems to trigger perturbations to their local structural environment since blocking Cys-322 markedly influenced the ubiquitination of only its two proximal downstream lysines, namely, Lys-331 and Lys-340 (Table 1; Fig. 2*D*). It has also been reported that mutation of both cysteines abolishes Tau's intrinsic enzymatic acetyltransferase activity at lysines located only in the microtubule-binding domain (Cohen et al., 2013). Consistent with this observation, cysteine-deficient Tau was the only to present enhanced ubiquitination on Lys-280 located on the second MBR upstream of Cys-291, probably promoting proteasome-mediated Tau degradation and accounting for the extreme low protein levels of the mutant (Min et al., 2010; Tracy et al., 2016).

Tau protein is known to undergo highly regulated phosphorylation, which negatively regulates its affinity for microtubules (Morris et al., 2011). Interestingly, despite their decreased phosphorylation at disease-associated epitopes (Fig. 4), both single cysteine mutants bind very poorly to microtubules (Fig. 3), which, in agreement with structural studies (Kellogg et al., 2018; Martinho et al., 2018), highlights the role of these residues in making critical contacts with tubulin. It is worth mentioning,

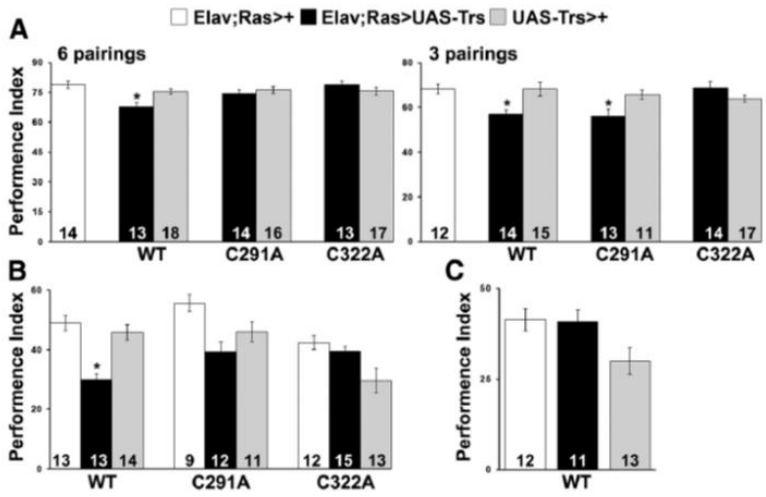


Figure 7. Cysteine substitution affects learning and memory performance. ***A***, Learning performance of animals at 6 and 3 pairings accumulating pan-neuronally the indicated Tau variants (black bars) compared with driver and transgene heterozygotes (white and gray bars). The genotypes of all animals are indicated below each bar. Data are mean ± SEM. $*p < 0.05$, significant differences from both controls. The number of experimental replicates (n) is indicated within the bars. Expression of wt Tau caused impairment in learning in both conditions, whereas expression of C291A mutant caused impairment in learning only under limited training with 3 pairings. ***B***, Memory performance of animals accumulating pan-neuronally the indicated Tau transgenes (black bar), compared with driver and transgene heterozygotes (white and gray bars). The genotypes of all animals are indicated below each bar. Data are mean ± SEM. $*p < 0.05$, significant differences from both controls. The number of experimental replicates (n) is indicated within the bars. Only expression of wt Tau caused impairment in LTM. ***C***, Pan-neuronal expression of wt Tau (black bar) does not affect memory after massed training (ARM, $p > 0.05$), compared with driver and transgene heterozygotes (white and gray bars). The number of experimental replicates (n) is indicated within the bars. Data are mean ± SEM. Detailed statistics can be found in the text. Trs, Transgene.

however, that *Drosophila* Tau does not possess any cysteine residues within its microtubule-binding repeats (Bouleau and Tricoire, 2015), indicating that it is not a conserved mechanism of interaction of Tau proteins with tubulin. That difference between *Drosophila* and human Tau could account for the observation that the two proteins do not compete *in vivo* for the binding to *Drosophila* microtubules (Feuillette et al., 2010). How phosphorylation impacts the interaction of Tau with F-actin remains to be elucidated; however, hyperphosphorylated forms of Tau have been shown to stabilize F-actin promoting Tau neurotoxicity *in vivo* (Fulga et al., 2007; Bardai et al., 2018). Strikingly, Cys-322 appears to be a negative regulator of the Tau-actin interaction (Fig. 3), in contrast to Cys-291, which appears to play no role, suggesting that, although the binding of Tau to both actin and microtubules is mediated by the MBRs (Elie et al., 2015), it clearly involves different mechanisms.

The recently identified cysteine-modifying MAPT mutation C291R in a patient diagnosed with corticobasal degeneration (Marshall et al., 2015) further highlights the importance of Cys residues in Tau physiology and pathology. Although this genetic form of corticobasal degeneration has not yet been studied postmortem, *in vitro* studies revealed that a C291R mutant Tau construct containing only the four MBRs aggregated into different kind of protofibrils than wt Tau construct (Karikari et al., 2020). In our *in vivo* model system, although all Tau variants adopt the MC1 conformation (Fig. 5*B*), a well-established marker that labels otherwise normal-appearing neurons early in disease progression and before neurofibrillary tangle formation (Hyman et al., 1988; Jicha et al., 1997, 1999), they present significant changes in their solubility. Both wt Tau and C291A mutant accumulated in the insoluble fraction, suggesting that modifying Cys-291 is not sufficient to change Tau aggregation propensity *in vivo*. In contrast, Cys-322 played an inhibitory role in the process since its elimination greatly reduced the formation of aggregates (Fig. 5).

Collectively, our results imply that, for the mechanism of Tau aggregation *in vivo*, several contributing factors may be envisaged, including a complex cross-talk of post-translational modifications (PTMs; i.e., ubiquitination, phosphorylation, acetylation, oxidation) that may not necessarily alter the conformation of Tau but reverse the stability of aggregates by weakening the Tau-Tau binding interactions needed to maintain the structure of the core of the aggregate and probably facilitating their degradation (Arakhamia et al., 2020). Still, it remains to be elucidated which combinations of PTMs can be considered as the rate-limiting step of Tau fibrillization, although considering the enormous heterogeneity of Tau PTMs, it is unlikely that there are only one or two triggering combinations.

Importantly, cysteines modulate Tau-induced neurotoxicity *in vivo* mainly because of their impact on Tau phosphorylation and microtubule-binding properties. What should be noted from the work herein is that targeting these residues may be one way to modify the early steps of Tau neurotoxicity. Blocking Cys-322 mutation significantly abolishes Tau toxicity as revealed by the increased resistance to oxidative injury, thermal stress, and longevity (Fig. 6). Upon Cys-291 substitution, Tau retains its toxicity, yet flies are not as severely affected as flies expressing wt Tau. It seems that a delicate balance between Tau modifications exists (i.e., ubiquitination), any deviation from which may lead to toxic effects of Tau. These subtle distinctions affecting Tau stability could contribute to the differences between the mutants. Interestingly, wt Tau and C291A mutant seem to follow different pathways to eventually trigger neurotoxicity, as suggested by their opposing effects on the activation of the Nrf2/Keap1 pathway (Fig. 6*B*). Nrf2 enables the cell to maintain redox balance under conditions of oxidative injury, whereas both pathway inhibition and overactivation can induce detrimental effects. For example, Nrf2 is inhibited in AD (Ramsey et al., 2007) as well as in animal models of AD (Kanninen et al., 2009; Kerr et al., 2017),

while its unregulated activation shortens lifespan in *Drosophila* (Tsakiri et al., 2013) and promotes cancer development in humans (Ohta et al., 2008; Shibata et al., 2008). Strikingly, it has been reported that expression of the hTau 0N3R isoform in the *Drosophila* CNS suppressed Nrf2 signaling similarly to hTau-2N4R C291A mutant (Fig. 6*B*). These results point toward a dominant role of Cys-322 in regulating the response of Nrf-2 and on its substitution Nrf-2 activity remained at control levels (Fig. 6*B*). However, the outcome of the response depends critically on Cys-291, since its absence (mutation or lack of the second MBR in 0N3R) suppressed the Nrf2 signaling, whereas its presence led to activation and upregulation of Nrf2 target genes. Therefore, our collective data strongly support the notion that cysteine-mediated interactions could define isoform-specific differences (3R vs 4R) (Goode et al., 2000; Sealey et al., 2017; Kadas et al., 2019).

In addition to dissecting mechanisms of Tau toxicity, research efforts are also focused on understanding aspects of Tau-mediated dysfunction mostly manifested as behavioral phenotypes, which have been key in dissociating Tau-mediated toxicity from Tau-mediated dysfunction (Mudher et al., 2004; Santacruz et al., 2005; Ubhi et al., 2007; Papanikolopoulou and Skoulakis, 2015). Along this line, we observed that, while wt Tau expression impaired associative learning (Fig. 7*A*) and LTM (Fig. 7*B*) in agreement with prior results (Kosmidis et al., 2010; Papanikolopoulou et al., 2010; Sealey et al., 2017), eliminating cysteines did not affect either of these processes. Only after limited training with three odor/shock pairings, the C291A mutant presented learning deficits (Fig. 7*A*), suggesting that this mutation potentially affects the efficiency of learning, but not learning ability per se.

It is interesting that, although blocking Cys-291 does not appear to affect the conformation or aggregation propensity of Tau, the mutant is less toxic than wt protein, and its accumulation in the insoluble fraction does not result in memory deficits. A possible explanation will be that the C291A mutation leads to aggregated forms of the protein with distinct structural characteristics and reduced toxicity compared with wt Tau (Cowan et al., 2015; Shammas et al., 2015). This again demonstrates the complex interplay of Tau PTMs (i.e., differences in phosphorylation) underpinning the differences in toxicity and dysfunction described here. Similar observations were made for the 0N3R isoform that, although it assumed an MC1 conformation with concomitant accumulation of aggregates, its overexpression in the *Drosophila* CNS did not precipitate impairments in learning or LTM (Sealey et al., 2017).

In addition to the structural information of Tau aggregates (Scheres et al., 2020), elucidating what defines isoform-specific molecular and physiological differences and what triggers the transition of Tau from a highly soluble form to insoluble toxic forms is imperative to identify an underlying pathogenic mechanism that occurs during the onset or progression of Tauopathies. It is a challenge of future work to elucidate, for example, the mechanisms mediating the effect of Tau isoforms on Nrf2 activity. Such studies could help to elucidate the apparent differential involvement of Tau isoforms in different Tauopathies and contribution to neuronal dysfunction and toxicity.

References

Acevedo SF, Froudarakis EI, Kanellopoulos A, Skoulakis EM (2007) Protection from premature habituation requires functional mushroom bodies in *Drosophila*. Learn Mem 14:376–384.

Arakhamia T, Lee CE, Carlomagno Y, Duong DM, Kundinger SR, Wang K, Williams D, DeTure M, Dickson DW, Cook CN, Seyfried NT, Petrucelli L, Fitzpatrick AW (2020) Posttranslational modifications mediate the structural diversity of tauopathy strains. Cell 180:633–644.e612.

Arendt T, Stieler JT, Holzer M (2016) Tau and tauopathies. Brain Res Bull 126:238–292.

Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat Rev Neurosci 8:663–672.

Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, Tsvetkov PO, Devred F, Landrieu I (2019) Role of tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects. Front Aging Neurosci 11:204.

Bardai FH, Wang L, Mutreja Y, Yenjerla M, Gamblin TC, Feany MB (2018) A conserved cytoskeletal signaling cascade mediates neurotoxicity of FTDP-17 tau mutations in vivo. J Neurosci 38:108–119.

Bechtel TJ, Weerapana E (2017) From structure to redox: the diverse functional roles of disulfides and implications in disease. Proteomics 17:1600391.

Berger Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, Wszolek Z, Ashe K, Knight J, Dickson D, Andorfer C, Rosenberry TL, Lewis J, Hutton M, Janus C (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. J Neurosci 27:3650–3662.

Bhattacharya K, Rank KB, Evans DB, Sharma SK (2001) Role of cysteine-291 and cysteine-322 in the polymerization of human tau into Alzheimer-like filaments. Biochem Biophys Res Commun 285:20–26.

Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. Proc Natl Acad Sci USA 104:3312–3317.

Bouleau S, Tricoire H (2015) *Drosophila* models of Alzheimer's disease: advances, limits, and perspectives. J Alzheimers Dis 45:1015–1038.

Chatterjee S, Sang TK, Lawless GM, Jackson GR (2009) Dissociation of tau toxicity and phosphorylation: role of GSK-3beta, MARK and Cdk5 in a *Drosophila* model. Hum Mol Genet 18:164–177.

Cohen TJ, Friedmann D, Hwang AW, Marmorstein R, Lee VM (2013) The microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity. Nat Struct Mol Biol 20:756–762.

Colodner KJ, Feany MB (2010) Glial fibrillary tangles and JAK/STAT-mediated glial and neuronal cell death in a *Drosophila* model of glial tauopathy. J Neurosci 30:16102–16113.

Cowan CM, Quraishe S, Hands S, Sealey M, Mahajan S, Allan DW, Mudher A (2015) Rescue from tau-induced neuronal dysfunction produces insoluble tau oligomers. Sci Rep 5:17191.

Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, Feany MB (2007) Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. J Clin Invest 117:236–245.

Dickey CA, Yue M, Lin WL, Dickson DW, Dunmore JH, Lee WC, Zehr C, West G, Cao S, Clark AM, Caldwell GA, Caldwell KA, Eckman C, Patterson C, Hutton M, Petrucelli L (2006) Deletion of the ubiquitin ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of both endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species. J Neurosci 26:6985–6996.

Elie A, Prezel E, Guerin C, Denarier E, Ramirez-Rios S, Serre L, Andrieux A, Fourest-Lieuvin A, Blanchoin L, Arnal I (2015) Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. Sci Rep 5:9964.

Feuillette S, Miguel L, Frebourg T, Campion D, Lecourtois M (2010) *Drosophila* models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. J Neurochem 113:895–903.

Fitzpatrick AW, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, Crowther RA, Ghetti B, Goedert M, Scheres SH (2017) Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. Nature 547:185–190.

Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB (2007) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. Nat Cell Biol 9:139–148.

Furukawa Y, Kaneko K, Nukina N (2011) Tau protein assembles into isoform- and disulfide-dependent polymorphic fibrils with distinct structural properties. J Biol Chem 286:27236–27246.

Goode BL, Chau M, Denis PE, Feinstein SC (2000) Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms: implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. J Biol Chem 275:38182–38189.

Gorsky MK, Burnouf S, Sofola-Adesakin O, Dols J, Augustin H, Weigelt CM, Grönke S, Partridge L (2017) Pseudo-acetylation of multiple sites on human Tau proteins alters Tau phosphorylation and microtubule-binding, and ameliorates amyloid beta toxicity. Sci Rep 7:9984.

Hughes CS, Moggridge S, Muller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J (2019) Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. Nat Protoc 14:68–85.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Wolozin BL, Davies P, Kromer LJ, Damasio AR (1988) Alz-50 antibody recognizes Alzheimer-related neuronal changes. Ann Neurol 23:371–379.

Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E (2008) The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. Biochemistry 47:10526–10539.

Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P (1997) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. J Neurosci Res 48:128–132.

Jicha GA, Berenfeld B, Davies P (1999) Sequence requirements for formation of conformational variants of tau similar to those found in Alzheimer's disease. J Neurosci Res 55:713–723.

Kadas D, Papanikolopoulou K, Xirou S, Consoulas C, Skoulakis EM (2019) Human Tau isoform-specific presynaptic deficits in a *Drosophila* central nervous system circuit. Neurobiol Dis 124:311–321.

Kanninen K, Heikkinen R, Malm T, Rolova T, Kuhmonen S, Leinonen H, Yla-Herttuala S, Tanila H, Levonen AL, Koistinaho M, Koistinaho J (2009) Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 106:16505–16510.

Karikari TK, Thomas R, Moffat KG (2020) The C291R Tau variant forms different types of protofibrils. Front Mol Neurosci 13:39.

Kellogg EH, Hejab NM, Poepsel S, Downing KH, DiMaio F, Nogales E (2018) Near-atomic model of microtubule-tau interactions. Science 360:1242–1246.

Keramidis I, Vourkou E, Papanikolopoulou K, Skoulakis EM (2020) Functional interactions of Tau phosphorylation sites that mediate toxicity and deficient learning in *Drosophila melanogaster*. Front Mol Neurosci 13:569520.

Kerr F, Sofola-Adesakin O, Ivanov DK, Gatliff J, Gomez Perez-Nievas B, Bertrand HC, Martinez P, Callard R, Snoeren I, Cocheme HM, Adcott J, Khericha M, Castillo-Quan JI, Wells G, Noble W, Thornton J, Partridge L (2017) Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. PLoS Genet 13:e1006593.

Kosmidis S, Grammenoudi S, Papanikolopoulou K, Skoulakis EM (2010) Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in *Drosophila*. J Neurosci 30:464–477.

Little M, Seehaus T (1988) Comparative analysis of tubulin sequences. Comp Biochem Physiol B 90:655–670.

Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. Nat Biotechnol 21:255–261.

Markstein M, Pitsouli C, Villalta C, Celniker SE, Perrimon N (2008) Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. Nat Genet 40:476–483.

Marshall CR, Guerreiro R, Thust S, Fletcher P, Rohrer JD, Fox NC (2015) A novel MAPT mutation causing corticobasal syndrome led by progressive apraxia of speech. J Alzheimers Dis 48:923–926.

Martinho M, Allegro D, Huvent I, Chabaud C, Etienne E, Kovacic H, Guigliarelli B, Peyrot V, Landrieu I, Belle V, Barbier P (2018) Two Tau binding sites on tubulin revealed by thiol-disulfide exchanges. Sci Rep 8:13846.

Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M, Gan L (2010) Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. Neuron 67:953–966.

Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011) The many faces of tau. Neuron 70:410–426.

Morris M, Knudsen GM, Maeda S, Trinidad JC, Ioanoviciu A, Burlingame AL, Mucke L (2015) Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. Nat Neurosci 18:1183–1189.

Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P, Jukes JP, Squire A, Mears A, Drummond JA, Berg S, MacKay D, Asuni AA, Bhat R, Lovestone S (2004) GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. Mol Psychiatry 9:522–530.

Nishimura I, Yang Y, Lu B (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. Cell 116:671–682.

Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T, Shibata T, Yamamoto M, Hirohashi S (2008) Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. Cancer Res 68:1303–1309.

Papanikolopoulou K, Skoulakis EM (2011) The power and richness of modelling tauopathies in *Drosophila*. Mol Neurobiol 44:122–133.

Papanikolopoulou K, Skoulakis EM (2015) Temporally distinct phosphorylations differentiate Tau-dependent learning deficits and premature mortality in *Drosophila*. Hum Mol Genet 24:2065–2077.

Papanikolopoulou K, Kosmidis S, Grammenoudi S, Skoulakis EM (2010) Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction. Biochem Soc Trans 38:981–987.

Papanikolopoulou K, Roussou IG, Gouzi JY, Samiotaki M, Panayotou G, Turin L, Skoulakis EM (2019) *Drosophila* Tau negatively regulates translation and olfactory long-term memory, but facilitates footshock habituation and cytoskeletal homeostasis. J Neurosci 39:8315–8329.

Park S, Lee JH, Jeon JH, Lee MJ (2018) Degradation or aggregation: the ramifications of post-translational modifications on tau. BMB Rep 51:265–273.

Peng C, Trojanowski JQ, Lee VM (2020) Protein transmission in neurodegenerative disease. Nat Rev Neurol 16:199–212.

Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. Nat Biotechnol 21:921–926.

Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, Taylor J, Snyder H, Grover A, De Lucia M, McGowan E, Lewis J, Prihar G, Kim J, Dillmann WH, Browne SE, Hall A, Voellmy R, Tsuboi Y, Dawson TM, Wolozin B, Hardy J, Hutton M (2004) CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. Hum Mol Genet 13:703–714.

Qiang L, Sun X, Austin TO, Muralidharan H, Jean DC, Liu M, Yu W, Baas PW (2018) Tau does not stabilize axonal microtubules but rather enables them to have long labile domains. Curr Biol 28:2181–2189.e2184.

Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Jordan-Sciutto KL (2007) Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. J Neuropathol Exp Neurol 66:75–85.

Regalado-Reyes M, Furcila D, Hernández F, Ávila J, DeFelipe J, León-Espinosa G (2019) Phospho-tau changes in the human CA1 during Alzheimer's disease progression. J Alzheimers Dis 69:277–288.

Robinow S, White K (1988) The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. Dev Biol 126:294–303.

Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen SH, Takashima A (2007) Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. Eur J Neurosci 25:3020–3029.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. Science 309:476–481.

Scheres SH, Zhang W, Falcon B, Goedert M (2020) Cryo-EM structures of tau filaments. Curr Opin Struct Biol 64:17–25.

Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E (1995) Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. Proc Natl Acad Sci USA 92:8463–8467.

Sealey MA, Vourkou E, Cowan CM, Bossing T, Quraishe S, Grammenoudi S, Skoulakis EM, Mudher A (2017) Distinct phenotypes of three-repeat and four-repeat human tau in a transgenic model of tauopathy. Neurobiol Dis 105:74–83.

Shammas SL, Garcia GA, Kumar S, Kjaergaard M, Horrocks MH, Shivji N, Mandelkow E, Knowles TP, Mandelkow E, Klenerman D (2015) A mechanistic model of tau amyloid aggregation based on direct observation of oligomers. Nat Commun 6:7025.

Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, Asamura H, Yamamoto M, Hirohashi S (2008) Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. Proc Natl Acad Sci USA 105:13568–13573.

Soeda Y, Yoshikawa M, Almeida OF, Sumioka A, Maeda S, Osada H, Kondoh Y, Saito A, Miyasaka T, Kimura T, Suzuki M, Koyama H, Yoshiike Y, Sugimoto H, Ihara Y, Takashima A (2015) Toxic tau

oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. Nat Commun 6:10216.

Sotiropoulos I, Galas MC, Silva JM, Skoulakis E, Wegmann S, Maina MB, Blum D, Sayas CL, Mandelkow EM, Mandelkow E, Spillantini MG, Sousa N, Avila J, Medina M, Mudher A, Buee L (2017) Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. Acta Neuropathol Commun 5:91.

Svensson MJ, Larsson J (2007) Thioredoxin-2 affects lifespan and oxidative stress in *Drosophila*. Hereditas 144:25–32.

Sykiotis GP, Bohmann D (2008) Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. Dev Cell 14:76–85.

Talmat-Amar Y, Arribat Y, Redt-Clouet C, Feuillette S, Bougé AL, Lecourtois M, Parmentier ML (2011) Important neuronal toxicity of microtubule-bound Tau in vivo in *Drosophila*. Hum Mol Genet 20:3738–3745.

Tan JM, Wong ES, Kirkpatrick DS, Pletnikova O, Ko HS, Tay SP, Ho MW, Troncoso J, Gygi SP, Lee MK, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL (2008) Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. Hum Mol Genet 17:431–439.

Tracy TE, Sohn PD, Minami SS, Wang C, Min SW, Li Y, Zhou Y, Le D, Lo I, Ponnusamy R, Cong X, Schilling B, Ellerby LM, Huganir RL, Gan L (2016) Acetylated tau obstructs KIBRA-mediated signaling in synaptic plasticity and promotes tauopathy-related memory loss. Neuron 90:245–260.

Tsakiri EN, Sykiotis GP, Papassideri IS, Terpos E, Dimopoulos MA, Gorgoulis VG, Bohmann D, Trougakos IP (2013) Proteasome dysfunction in *Drosophila* signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. Aging Cell 12:802–813.

Tsakiri EN, Terpos E, Papanagnou ED, Kastritis E, Brieudes V, Halabalaki M, Bagratuni T, Florea BI, Overkleeft HS, Scorrano L, Skaltsounis AL, Dimopoulos MA, Trougakos IP (2017) Milder degenerative effects of Carfilzomib vs. Bortezomib in the *Drosophila* model: a link to clinical adverse events. Sci Rep 7:17802.

Tully T, Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. J Comp Physiol A 157:263–277.

Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. Cell 79:35–47.

Tyanova S, Temu T, Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. Nat Protoc 11:2301–2319.

Ubhi KK, Shaibah H, Newman TA, Shepherd D, Mudher A (2007) A comparison of the neuronal dysfunction caused by *Drosophila* tau and human tau in a *Drosophila* model of tauopathies. Invert Neurosci 7:165–171.

von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2005) Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. Biochim Biophys Acta 1739:158–166.

Walker JA, Tchoudakova AV, McKenney PT, Brill S, Wu D, Cowley GS, Hariharan IK, Bernards A (2006) Reduced growth of *Drosophila* neurofibromatosis 1 mutants reflects a non-cell-autonomous requirement for GTPase-Activating Protein activity in larval neurons. Genes Dev 20:3311–3323.

Wang Y, Mandelkow E (2016) Tau in physiology and pathology. Nat Rev Neurosci 17:5–21.

Weaver CL, Espinoza M, Kress Y, Davies P (2000) Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 21:719–727.

Wilkinson KD, Tashayev VL, O'Connor LB, Larsen CN, Kasperek E, Pickart CM (1995) Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. Biochemistry 34:14535–14546.

Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. Science 293:711–714.

Zheng-Fischhofer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. Eur J Biochem 252:542–552.