



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Παραγωγή νανοανσωμάτων και μεθοδολογίας αναστροφής μνημονικής έκπτωσης και νευροτοξικότητας

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 6: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΕΥΘΥΜΙΟΣ ΣΚΟΥΛΑΚΗΣ (ΕΚΕΒΕ “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”)

Παραγωγή νανοαντισωμάτων και μεθοδολογίας αναστροφής μνημονικής έκπτωσης και νευροτοξικότητας

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Εκτιμήθηκε η δυνατότητα των νανοαντισωμάτων να μετριάσουν τις παθολογικές επιδράσεις της πρωτεΐνης tau, τόσο προληπτικά όσο και θεραπευτικά in vivo, χρησιμοποιώντας τη *Drosophila melanogaster* ως μοντέλο. Για τον σκοπό αυτό, επιλεγμένες αλληλουχίες που κωδικοποιούν νανοαντισώματα κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης της *Drosophila* και δημιουργήθηκαν πολλαπλά διαγονιδιακά στελέχη με δυνατότητα ιστικά και χρονικά ειδικής έκφρασης

ΠΑΡΑΔΟΤΕΑ

Συλλογή διαγονιδιακών στελεχών νανοαντισωμάτων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ - ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ενότητα ολοκληρώθηκε σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό και οδήγησε σε δημοσίευση υψηλής απήχησης

Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από προοδευτική απώλεια και δυσλειτουργία νευρώνων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Οι παθήσεις αυτές οδηγούν σε σταδιακή επιδείνωση των γνωστικών, κινητικών και συμπεριφορικών λειτουργιών, επηρεάζοντας τελικά την καθημερινή ζωή.

Οι ταυοπάθειες είναι μια υποομάδα νευροεκφυλιστικών διαταραχών, οι οποίες ορίζονται από την παθολογική συσσώρευση της μικροσωληνισυνδεδεμένης πρωτεΐνης tau εντός των νευρώνων, με αποτέλεσμα νευρωνική δυσλειτουργία και κυτταρικό θάνατο. Οι ταυοπάθειες περιλαμβάνουν σποραδικές νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος Pick (PiD) και η Προϊούσα Υπερπυρηνική Παράλυση (PSP), ενώ η Μετωποκροταφική Άνοια με Παρκινσονισμό συνδεδεμένη με το χρωμόσωμα 17 (FTDP-17) αποτελεί τη μοναδική γνωστή ταυοπάθεια που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο MAPT. Παρά τις διαφορές στα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, οι ταυοπάθειες μοιράζονται κοινούς μηχανισμούς όπως η πρωτεϊνική συσσωμάτωση, το οξειδωτικό στρες και η νευροφλεγμονή, οι οποίοι συνολικά συμβάλλουν σε απώλεια νευρώνων και εγκεφαλική ατροφία.

Το γονίδιο MAPT, στο χρωμόσωμα 17q21.1, κωδικοποιεί την tau, μια πρωτεΐνη που υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων 2, 3 και 10, παράγοντας έξι ισομορφές. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν ως προς την παρουσία ή απουσία ενός (1N) ή δύο (2N) N-τελικών ενθέτων και ως προς τον αριθμό των C-τελικών επαναλήψεων δέσμησης μικροσωληνίσκων—τρεις (3R) ή τέσσερις (4R). Η tau εντοπίζεται κυρίως στους άξονες, όπου ρυθμίζει τη δυναμική των μικροσωληνίσκων, την αξονική μεταφορά και τη μορφολογία των νευρώνων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία μεταξύ φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης

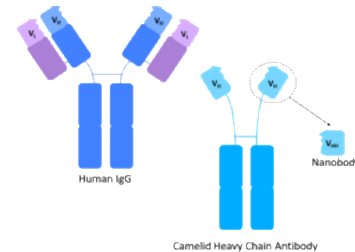
διατηρεί την ταυ σε χαμηλό βαθμό φωσφορυλίωσης, υποστηρίζοντας τη δέσμευσή της στους μικροσωληνίσκους και τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία.

Στη νόσο Alzheimer (AD) και σε άλλες πρωτοπαθείς ταυοπάθειες, η ταυ γίνεται προοδευτικά υπερφωσφορυλιωμένη, οδηγώντας σε αυτο-συναρμολόγηση σε νευροϊνιδιακά δεμάτια (NFTs). Αυτή η συσσωμάτωση—από διαλυτά ολιγομερή έως αδιάλυτα NFTs—θεωρείται ότι οδηγεί σε νευρωνική δυσλειτουργία και εκφύλιση.

Η υπερφωσφορυλίωση της ταυ θεωρείται ένα από τα πρώιμα παθογενετικά γεγονότα που προηγούνται της κακοδίπλωσης και της συσσωμάτωσης. Μελέτες *in vitro* για ψευδο-φωσφορυλίωση της ταυ έχουν δείξει ισομορφο-ειδικές διαφορές στη συμπεριφορά συσσωμάτωσης. Η ετερογένεια μεταξύ των ταυοπαθειών υποδεικνύει ότι οι μηχανισμοί νόσου μπορεί να εξαρτώνται από την συγκεκριμένη ισομορφή ταυ και τον κυτταρικό τύπο που προσβάλλεται. Οι βιοχημικές αναλύσεις δείχνουν ότι τα συσσωματώματα ταυ διαφέρουν ως προς την ισομορφική σύσταση και την κατάσταση φωσφορυλίωσης. Παρότι τα αδιάλυτα συσσωματώματα είναι χαρακτηριστικά των ταυοπαθειών, το ποια μορφή ταυ ευθύνεται κυρίως για τη νευροτοξικότητα παραμένει ασαφές. Συνολικά, σε παθολογικές συνθήκες η ταυ γίνεται υπερφωσφορυλιωμένη, κακοδίπλωμένη και επιρρεπής σε συσσωμάτωση, οδηγώντας σε απώλεια φυσιολογικής λειτουργίας.

Με τις πρόσφατες εξελίξεις—όπως η ανάπτυξη και έγκριση θεραπειών για AD, η ταυτοποίηση νέων βιοδεικτών και η δημιουργία αντισωμάτων έναντι της ταυ—έχει σημειωθεί πρόοδος στη διάγνωση και θεραπεία της AD και συγγενών διαταραχών. Τα αντισώματα που στοχεύουν την ταυ περιλαμβάνουν εκείνα που αναγνωρίζουν επιτόπους στην N-τελική ή προλινο-πλούσια περιοχή, αντισώματα ειδικά για φωσφο-επιτόπους, καθώς και αντισώματα που αναγνωρίζουν διαμορφωσιακά ή ειδικά για συσσωματώματα επιτόπους.

Τα νανοαντισώματα (nanobodies), γνωστά και ως μονο-περιοχικά αντισώματα, προέρχονται από βαρέως τύπου αντισώματα καμηλιδών. Λόγω του μικρού μεγέθους, της υψηλής διαλυτότητας, της σταθερότητας, της χαμηλής ανοσογονικότητας και της καλύτερης διείσδυσης στους ιστούς, αποτελούν υποσχόμενα εργαλεία για θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές σε νευροεκφυλιστικές νόσους, συμπεριλαμβανομένης της AD. Με επιλεκτική δέσμευση και εξουδετέρωση τοξικών ειδών ταυ, μπορούν δυνητικά να αναστείλουν την εξέλιξη της νόσου και να βελτιώσουν τη γνωστική έκπτωση.



Στόχος του έργου στη *Drosophila*

Στόχοι του έργου είναι να διερευνηθούν:

- 1. Ο ρόλος των συσσωματωμάτων της Ταυ στην μαθησιακή και μνημονική λειτουργία**
- 2. Η δυνατότητα των νανοαντισωμάτων να μετριάσουν τις παθολογικές επιδράσεις της πρωτεΐνης ταυ, τόσο προληπτικά όσο και θεραπευτικά *in vivo*, χρησιμοποιώντας τη *Drosophila melanogaster* ως μοντέλο.** Για τον σκοπό αυτό, επιλεγμένες αλληλουχίες που κωδικοποιούν νανοαντισώματα κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης της *Drosophila* και δημιουργήθηκαν πολλαπλά διαγονιδιακά στελέχη με δυνατότητα ιστικά και χρονικά ειδικής έκφρασης.

3. Ηλικιοεξαρτώμενος μαθησιακός και πρωτεωμικός χαρακτηρισμός ποντικών μοντέλου νόσου Alzheimer

Αυτό περιλαμβάνει:

- αξιολόγηση των συσσωματωμάτων Ταυ στην εγκλεφαλο *Drosophila*,
- αξιολόγηση της έκφρασης των νανοαντισωμάτων,
- και μελέτη της επίδρασής τους στα συνολικά επίπεδα ταυ και στη συσσωμάτωση, με Western blot και δοκιμές κλασματοποίησης συσσωματωμάτων.
- Αξιολόγηση της ηλικιοεξαρτώμενης μαθησιακής ικανότητας ποντικών ελέγχου και μοντέλου νόσου Alzheimer

Παρότι τα μεγάλα συσσωματώματα ταυ όπως τα NFTs σχετίζονται με νευρωνικό θάνατο, υπάρχουν ενδείξεις ότι δεν προκαλούν άμεσα τη νευρωνική δυσλειτουργία (η οποία μπορεί να είναι αναστρέψιμη). Αντίθετα, μικρότερα, διαλυτά ολιγομερή ταυ θεωρούνται περισσότερο νευροτοξικά. Επομένως, βασικός στόχος είναι να διακριθούν τα ολιγομερή ταυ από τα μεγάλα ινιδιακά συσσωματώματα, να προσδιοριστούν τα είδη ταυ που υπάρχουν στα δείγματα και να ταυτοποιηθεί ποια στοχεύονται από συγκεκριμένα νανοαντισώματα.

Για τη μελέτη θεραπευτικών επιδράσεων, η έκφραση νανοαντισωμάτων θα ελέγχεται χρονικά με σύστημα επαγωγής θερμικού σοκ (heat-shock), επιτρέποντας καθυστερημένη έκφραση μετά την έναρξη της παθολογίας ταυ και μοντελοποιώντας θεραπευτική παρέμβαση σε μεταγενέστερα στάδια. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την καθυστερημένη έκφραση νανοαντισωμάτων μετά την έναρξη της παθολογίας ταυ, μοντελοποιώντας έτσι τη θεραπευτική παρέμβαση σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου. Αυτός ο σχεδιασμός αντικατοπτρίζει την κλινική πραγματικότητα της νόσου Alzheimer, στην οποία οι περισσότερες περιπτώσεις είναι σποραδικές.

Επιπλέον, θα αξιολογηθούν οι επιδράσεις των νανοαντισωμάτων στην τοξικότητα που προκαλεί η ταυ (οξειδωτικό στρες, εμβρυϊκή θνησιμότητα, διάρκεια ζωής) και στη νευρωνική λειτουργία (μάθηση και μακροπρόθεσμη μνήμη).

Βελτιστοποιώντας και χρησιμοποιώντας νανοσώματα που στοχεύουν στην πρωτεΐνη ταυ, αυτή η μελέτη επιδιώκει να προωθήσει την κατανόησή μας για την νευροεκφύλιση που προκαλείται από την πρωτεΐνη ταυ και να εντοπίσει πολλά υποσχόμενους μοριακούς στόχους για θεραπευτική παρέμβαση στις ταυοπάθειες. Τελικά, αυτή η εργασία στοχεύει να διασαφηνίσει τις μοριακές οδούς που διέπουν την παθολογία της πρωτεΐνης ταυ και να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την αναστολή ή την αντιστροφή της εξέλιξης της νόσου.

Μέθοδοι (σύνοψη)

A.

- **Έλεγχος** συσχέτισης παρουσίας πρώιμων η ώριμων συσσωματωμάτων με την ηλικιοεξαρτώμενη μαθησιακή και μνημονική έκπτωση στο μοντέλο *Drosophila*. Τα αποτελέσματα του στόχου 1 είναι δημοσιευμένα και θα αναφερθεί μόνο η περίληψη της δημοσίευσης που επισυνάπτεται.

B.

- **Στελέχη Drosophila** που εκφράζουν ανθρώπινες ισομορφές tau, μαζί με νανοαντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένες περιοχές της tau.
- **Προληπτική έκφραση** με συστήματα **GAL4-UAS** και **GeneSwitch** (επαγωγή/ηλικιοεξαρτώμενη με RU486).
- **Θεραπευτική προσέγγιση με heat-shock promoter** (37°C) για χρονικό έλεγχο έκφρασης νανοαντισωμάτων ανεξάρτητα από την έκφραση tau.
- **Western blot** για συνολική tau, φωσφο-επιτόπους, και είδη συσσωμάτωσης.
- **Κλασματοποίηση** σε διαλυτό, SDS-διαλυτό και SDS-αδιάλυτο κλάσμα (και επιπλέον πρωτόκολλα με φορμικό οξύ/ουρία για ανάκτηση συσσωματωμάτων).

Γ.

- **Ηλικιοεξαρτώμενος συμπεριφορικός και μαθησιακός χαρακτηρισμός ποντικών μοντέλου νόσου Alzheimer:** μάθηση/μνήμη (fear conditioning), κινητική δραστηριότητα
- **Ποσοτική Πρωτεωμική ανάλυση υποκάμπων ποντικών μοντέλου νόσου Alzheimer**

A. Συσχέτιση παρουσίας πρώιμων η ώριμων συσσωματωμάτων με την μαθησιακή και μνημονική έκπτωση στην Δροσόφιλα.

Οι ταυοπάθειες, συμπεριλαμβανομένης της νόσου Alzheimer, χαρακτηρίζονται από προοδευτική γνωστική έκπτωση, νευροεκφύλιση και ενδονευρωνικά συσσωματώματα που αποτελούνται σε μεγάλο βαθμό από την αξονική πρωτεΐνη Tau. Δεν έχει διευκρινιστεί εάν τα γνωστικά ελλείμματα είναι συνέπεια της συσσώρευσης συσσωματωμάτων, διακυβεύοντας τη γενικευμένη νευρωνική υγεία και οδηγώντας τελικά σε νευροεκφύλιση. Χρησιμοποιούμε το μοντέλο Ταυοπάθειας της Drosophila που εκφράζει τις ισομορφές ON4R και ON3R της ανθρώπινης πρωτεΐνης Tau και πληθυσμούς μικτού φύλου για την αξιολόγηση της συσχετιστικής μάθησης και μνήμης. Αποκαλύπτουμε μια παννευρωνική έναρξη στην ενήλικη ζωή της εξαρτώμενης από τη συσσώρευση Tau έκπτωσης στην αποτελεσματικότητα μάθησης, η οποία διασώζεται με εντατική εξαιρέτιση και ένα ειδικό έλλειμμα στην Εξαρτώμενη από την Πρωτεϊνοσύνθεση, αλλά όχι στην Ανεξάρτητη από την Πρωτεϊνοσύνθεση παραλλαγή της εδραιωμένης μνήμης. Αποδεικνύουμε ότι αυτά τα ελλείμματα νευροπλαστικότητας είναι αναστρέψιμα με την καταστολή της νέας έκφρασης της διαγονιδιακής ανθρώπινης πρωτεΐνης Tau, αλλά εκπλήσσει το γεγονός ότι συσχετίζονται με αύξηση των συσσωματωμάτων Tau. Η αναστολή του σχηματισμού συσσωματωμάτων μέσω οξείας από του στόματος χορήγησης Μπλε του Μεθυλενίου έχει ως αποτέλεσμα την επανεμφάνιση ελλειμματικής μνήμης σε ζώα με κατεσταλμένη έκφραση hTauON4R, ή την εμφάνιση ελλειμμάτων μνήμης σε ζώα που εκφράζουν hTauON4R, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένα συσσωματώματα χωρίς ελλείμματα μνήμης εν απουσία του φαρμάκου. Επιπλέον, η εξαρτώμενη από το Μπλε του Μεθυλενίου καταστολή των συσσωματωμάτων hTauON4R εντός των νευρώνων των μυκητοειδών σωμάτων ενηλίκων, οδήγησε επίσης σε εμφάνιση ελλειμμάτων μνήμης. Επομένως, τα ελλείμματα

συσχετιστικής μάθησης και μνήμης κατά την έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Ταυ στο ΚΝΣ της *Drosophila* δεν είναι συνέπεια νευροτοξικότητας επειδή είναι αναστρέψιμα, ούτε της συσσώρευσης συσσωματωμάτων, η οποία είναι επιτρεπτική αν όχι προστατευτική των διαδικασιών που υπόκεινται στη νευροπλαστικότητα.

ΔΗΛΩΣΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ

Η ενδονευρωνική συσσώρευση συσσωματωμάτων Ταυ έχει προταθεί ότι υπόκειται στη γνωστική έκπτωση και την τελική νευροτοξικότητα που χαρακτηρίζει τις νευροεκφυλιστικές άνοιες γνωστές ως Ταυοπάθειες. Ωστόσο, δείχνουμε σε τρεις πειραματικές ρυθμίσεις ότι τα συσσωματώματα Ταυ στο ΚΝΣ της *Drosophila* δεν διαταράσσουν, αλλά μάλλον φαίνεται να διευκολύνουν τις διαδικασίες που υπόκεινται στην αποτελεσματική μάθηση και στην Εξαρτώμενη από την Πρωτεϊνοσύνθεση μνήμη εντός των προσβεβλημένων νευρώνων.

Β. Διαγονιδιακά στελέχη Ταυ

Το σύστημα GAL4–UAS επιτρέπει την έκφραση διαγονιδίων ανθρώπινων ισομορφών ταυ και διαγονιδίων νανοαντισωμάτων σε νευρώνες από το ζυγωτικό στάδιο. Σε αυτό το σύστημα, η GAL4, ένας μεταγραφικός παράγοντας ζύμης που εκφράζεται με ιστό-ειδικό τρόπο, συνδέεται με μια ανοδική αλληλουχία ενεργοποίησης (UAS) που βρίσκεται πριν από το γονίδιο ενδιαφέροντος. Μύγες που φέρουν έναν νευρωνικό οδηγό, σε αυτή τη μελέτη *elav-GAL4*, διασταυρώθηκαν με μύγες που φέρουν την κατασκευή UAS-διαγονιδίου, επιτρέποντας την έκφραση τους επιλεκτικά μόνο σε νευρώνες. Το σύστημα GeneSwitch, αντίθετα, επιτρέπει την επαγωγική έκφραση. Η GAL4 συντήκεται με έναν ανθρώπινο υποδοχέα προγεστερόνης και η έκφραση διαγονιδίων ενεργοποιείται με την παροχή στις μύγες του αναλόγου προγεστερόνης RU486. Αυτό το σύστημα επιτρέπει την ταυτόχρονη έκφραση ανθρώπινων ισομορφών ταυ και νανοαντισωμάτων σε μεταγενέστερα στάδια της ενήλικης ζωής, μοντελοποιώντας την έναρξη της παθολογίας ταυ που σχετίζεται με την ηλικία και επιτρέποντας τη διερεύνηση φαινοτύπων έναρξης στην ενήλικη ζωή.

Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster* που εκφράζουν ανθρώπινα διαγονίδια ταυ

Genotype	Source	Locus	Notes
UAS-ON4R	Provided by J. Farnius	attp	
UAS-ON4R	Provided by M. Feany (Harvard Medical School)	Random insertion	
UAS- mCherry 2N4R	Provided by D. Allan (The University of British Columbia)	VK37	
UAS- mCherry 2N4R/CyO		attp40	
UAS-mCherry2N4R-De(VQIVYK)/CyO		attp40	Del1: Deletion at the PHF6
UAS-mCherry2N4R-Del(VQIINK)/CyO		attp40	Del2: Deletion at the PHF6*

Κατασκευή και Χαρακτηρισμός στελεχών διαγονιδίων νανοαντισωμάτων

Τα νανοαντισώματα σχεδιάστηκαν ώστε να στοχεύουν μοτίβα με υψηλή τάση συσσωμάτωσης μέσα στην περιοχή δέσμευσης μικροσωληνίσκων της tau. Περιλαμβάνονται:

- **Z70** (στόχος PHF6),
- **PD Z70** (στόχος PHF6, αλλά συνδεδεμένο με F-box για προώθηση ουβικουιτινώσης και πρωτεασωμικής αποδόμησης της tau),
- **A31** (στόχος PHF6*),
- καθώς και **διααντισώματα/diabodies** (Z70–Z70 και Z70–A5-2) για αύξηση avidity ή διπλό στόχο.

Β. Γενικές μέθοδοι

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *Drosophila melanogaster* που εκφράζουν ανθρώπινα διαγονίδια tau, μαζί με νανοαντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένες περιοχές της tau. Τα νανοαντισώματα εκφράζονται χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS, το οποίο επιτρέπει ιστοειδική έκφραση μέσω κατάλληλων οδηγών (drivers). Για τη χρονικά ελεγχόμενη έκφραση νανοαντισωμάτων σε ενήλικες μύγες θα χρησιμοποιηθεί σύστημα GeneSwitch (επαγωγή με RU486), καθώς και προαγωγέας θερμικού σοκ (heat-shock promoter) για θεραπευτικού τύπου πρωτόκολλα.

Ποσοτικοποίηση συνολικής tau (Quantification of total tau)

Τα συνολικά επίπεδα tau ποσοτικοποιήθηκαν με ανάλυση Western blot και πυκνομετρική ποσοτικοποίηση. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με κατάλληλα αντισώματα έναντι της tau, με κανονικοποίηση σε εσωτερικό μάρτυρα (π.χ. Syntaxin).

Κλασματοποίηση συσσωματωμάτων tau (Aggregate fractionation)

Για να προσδιοριστεί εάν η έκφραση νανοαντισωμάτων επηρεάζει επιλεκτικά συγκεκριμένα είδη tau, η tau κλασματοποιήθηκε σε διαλυτό κλάσμα και κλάσμα διαλυτό σε SDS. Τα κλάσματα αναλύθηκαν με Western blot και θα ποσοτικοποιήθηκαν.

Διάσωση εμβρυϊκής θνησιμότητας (Rescue of tau-induced embryonic lethality)

Η εμβρυϊκή θνησιμότητα στη *Drosophila melanogaster* αναφέρεται στην αποτυχία των εμβρύων να αναπτυχθούν και να εκκολαφθούν σε προνύμφες πρώτου σταδίου, ως αποτέλεσμα της έκφρασης ανθρώπινων ισομορφών tau. Αυτό αξιολογήθηκε με ποσοτικοποίηση του αριθμού των μυγών που προκύπτουν από συγκεκριμένες γενετικές διασταυρώσεις. Οι διασταυρώσεις σχεδιάστηκαν ώστε μόνο τα θηλυκά να εκφράζουν τόσο την tau όσο και το διαγονίδιο νανοαντισώματος υπό τον κατάλληλο οδηγό.

Μάθηση και μνήμη (Learning and memory)

Η γνωστική λειτουργία θα αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας δοκιμή οσφρητικής εξαρτημένης μάθησης με αρνητική ενίσχυση (negatively reinforced Pavlovian olfactory conditioning). Η απόδοση μάθησης θα υπολογιστεί ως δείκτης απόκρισης στις εκπαιδευμένες οσμές.

Γ. Αποτελέσματα

Χαρακτηρισμός στελεχών Νανοαντισωμάτων που στοχεύουν την πρωτεΐνη Tau.

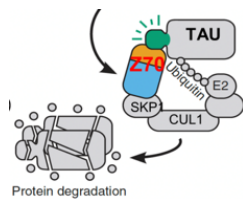
Όλες οι κατασκευές νανοαντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη σχεδιάστηκαν για να στοχεύουν μοτίβα επιρρεπή σε συσσωμάτωση εντός του τομέα δέσμευσης μικροσωληνίσκων tau.

Κάθε διαγονίδιο νανοαντισώματος εισήχθη τυχαία στο γονιδίωμα της *Drosophila* υπό έλεγχο UAS. Δημιουργήθηκαν δύο ανεξάρτητα στελέχη για το νανοαντίσωμα Z70 και για την

Γ1. Η λίστα των κατασκευασθέντων διαγονιδίων νανοαντισωμάτων είναι:

Nanobody name	Nanobody Construct	Target Epitope
C2M1	UAS Z70	PHF6
C2M3	UAS Z70	PHF6
A1F4	UAS PD Z70	PHF6
A1F5	UAS PD Z70	PHF6
A31	UAS A31	PHF6*
ZZ	UAS Z70-Z70 Diabody	PHF6
ZA	UAS Z70-A5-2 Diabody	PHF6 and 4 th repeat
HsZ	Z70 heat shock promoter	PHF6
HsZ Prot	PD Z70 heat shock promoter	PHF6

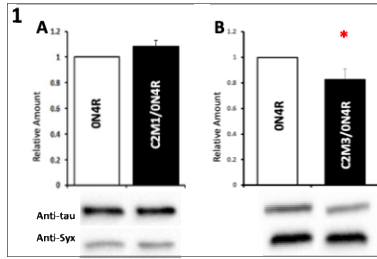
παραλλαγή του που κατευθύνεται στο πρωτεάσωμα, PD Z70 (εικόνα), επιτρέποντας την αξιολόγηση πιθανών επιδράσεων θέσης στην έκφραση του διαγονιδίου. Το νανοαντίσωμα Z70 στοχεύει το μοτίβο εξαπεπτιδίου PHF6, μια κρίσιμη θέση πυρήνωσης για τον σχηματισμό β-φύλλου και τη συναρμολόγηση νηματίων tau. Το PD Z70 συνδέει το Z70 με μια περιοχή F-box για να προωθήσει την ουβικιτίνη και την πρωτεασωματική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης tau. Το νανοσώμα A31 στοχεύει το μοτίβο PHF6* εντός της δεύτερης επανάληψης δέσμευσης μικροσωληνίσκων, μιας δευτερογενούς αλληλουχίας επιρρεπούς σε συσσωμάτωση (Danis et al. 2025). Επιπλέον, δημιουργήθηκαν κατασκευασμένα διασώματα (Z70–Z70 και Z70–A5-2) για να αυξηθεί η ισχύς δέσμευσης ή να καταστεί δυνατή η στόχευση διπλού επιτόπου. Χρησιμοποιήθηκε μια γραμμή Z70 και PD Z70 που επάγεται από θερμικό σοκ για να επιτραπεί η χρονικά ελεγχόμενη έκφραση νανοαντισωμάτων. Μια επισκόπηση όλων των κατασκευών νανοαντισωμάτων και των διαγονιδιακών γραμμών παρέχεται στον Πίνακα 1.



Γ.2 Επιδράσεις της έκφρασης νανοαντισωμάτων στα συνολικά επίπεδα Tau

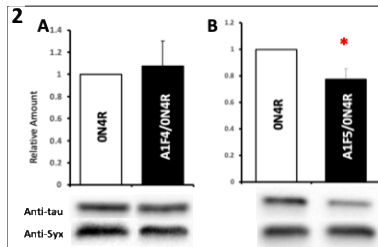
Τα συνολικά επίπεδα tau ποσοτικοποιήθηκαν με ανάλυση Western blot χρησιμοποιώντας πυκνομετρία. Η ένταση του σήματος tau ομαλοποιήθηκε σε Syntaxin (Syx) ως έλεγχος φόρτωσης και εκφράστηκε σε σχέση με τον αντίστοιχο γονότυπο ελέγχου μόνο tau. Η στατιστική ανάλυση

πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μονόδρομη ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμή post hoc του Dunnett.



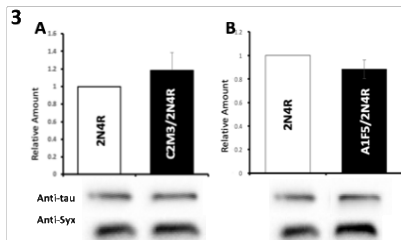
Εικόνα 1. Συνολικά επίπεδα tau. Ποσοτικοποίηση των συνολικών επιπέδων tau σε μύες που εκφράζουν ON4R Tau και (A) τη γραμμή νανοαντισώματος Z70 C2M1 (B) το νανοαντίσωμα Z70 C2M3, χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά

Σε μύες που εκφράζουν την ισομορφή tau ON4R, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα συνολικά επίπεδα tau κατά την ταυτόχρονη έκφραση με τη σειρά νανοαντισωμάτων Z70 C2M1 ή τη σειρά νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F4 σε σύγκριση με τα στελέχη ελέγχου εκφράζοντας μόνο tau (1A και 2A). Αντίθετα, η ταυτόχρονη έκφραση της tau ON4R με τη σειρά νανοαντισωμάτων Z70 C2M3 ή με τη σειρά νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F5 οδήγησε σε σημαντική μείωση των συνολικών επιπέδων tau (1B και 2B).



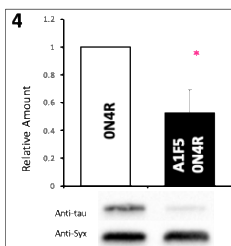
Εικόνα 2. Συνολικά επίπεδα tau. Ποσοτικοποίηση των συνολικών επιπέδων tau σε μύες που εκφράζουν ON4R Tau και το νανοαντίσωμα PD Z70 A1F4 χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει σημαντική διαφορά.

Με βάση αυτά τα ευρήματα, τα συνολικά επίπεδα tau εξετάστηκαν περαιτέρω σε μύες που εκφράζουν την ισομορφή tau 2N4R μαζί με τη σειρά νανοαντισωμάτων Z70 C2M3 ή τη σειρά νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F5. Σε αυτό το πλαίσιο, δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές στα συνολικά επίπεδα tau σε σχέση με τις μύες που εκφράζουν μόνο 2N4R tau (3).



Εικόνα 3. Συνολικά επίπεδα tau. Ποσοτικοποίηση των συνολικών επιπέδων tau σε μύες που εκφράζουν 2N4R Tau και τα αντίστοιχα στελέχη νανοαντισωμάτων, χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS.

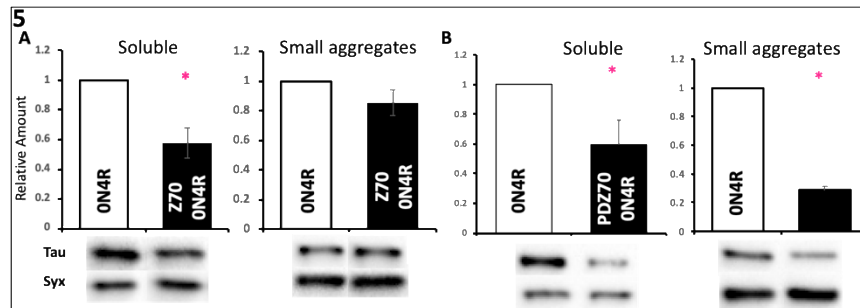
Επιπλέον, η σειρά νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F5 εκφράστηκε σε ένα γενετικό υπόβαθρο που χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη έκφραση tau. Σε αυτό το πλαίσιο, η συνέκφραση του PD Z70 A1F5 οδήγησε σε σημαντική μείωση στα συνολικά επίπεδα tau σε σύγκριση με τους μάρτυρες που εξέφραζαν μόνο tau (4).



Εικόνα 4. Συνολικά επίπεδα tau. Ποσοτικοποίηση των συνολικών επιπέδων tau σε μύες που εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα ON4R Tau και το νανοαντίσωμα PD Z70 A1F5 χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει σημαντική διαφορά.

Γ3. Επιδράσεις Νανοαντισωμάτων στη Διαλυτότητα και Συσσωμάτωση Ταυ

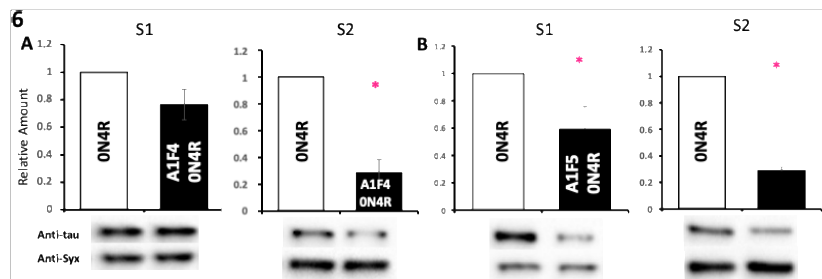
Για να προσδιοριστεί εάν η έκφραση νανοαντισωμάτων επηρέασε επιλεκτικά συγκεκριμένα είδη ταυ, η ταυ κλασματώθηκε σε διαλυτά και SDS-διαλυτά κλάσματα πριν από την ανάλυση Western blot. Σε μύγες που εκφράζουν την ισομορφή ταυ ON4R, η συνέκφραση με τη σειρά νανοαντισωμάτων Z70 C2M1 οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων διαλυτής ταυ, ενώ τα



Εικόνα 5. Κλασματοποίηση συσσωματωμάτων. Ποσοτικοποίηση των διαλυτών και SDS-διαλυτών κλασμάτων ταυ σε μύγες που εκφράζουν ON4R Ταυ και (A) και το νανοαντίσωμα Z70 C2M1 (B) το νανοαντίσωμα Z70 C2M3 χρησιμοποιώντας

το σύστημα GAL4-UAS. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει στατιστική σημαντικότητα.

επίπεδα ταυ διαλυτής σε SDS δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά (5A). Αντίθετα, η συνέκφραση με τη σειρά νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F4 οδήγησε σε σημαντική μείωση του κλάσματος ταυ διαλυτής σε SDS, χωρίς σημαντική αλλαγή στο διαλυτό κλάσμα (5B). Αξιοσημείωτα, η συνέκφραση της ισομορφής ταυ ON4R με τη σειρά νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F5 οδήγησε σε σημαντική μείωση τόσο των διαλυτών όσο και των SDS-διαλυτών κλασμάτων ταυ (6).



Εικόνα 6. Κλασματοποίηση συσσωματωμάτων. Ποσοτικοποίηση των διαλυτών και SDS-διαλυτών κλασμάτων ταυ σε μύγες που εκφράζουν ON4R Ταυ και το νανοαντίσωμα PD Z70 A1F4 χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει

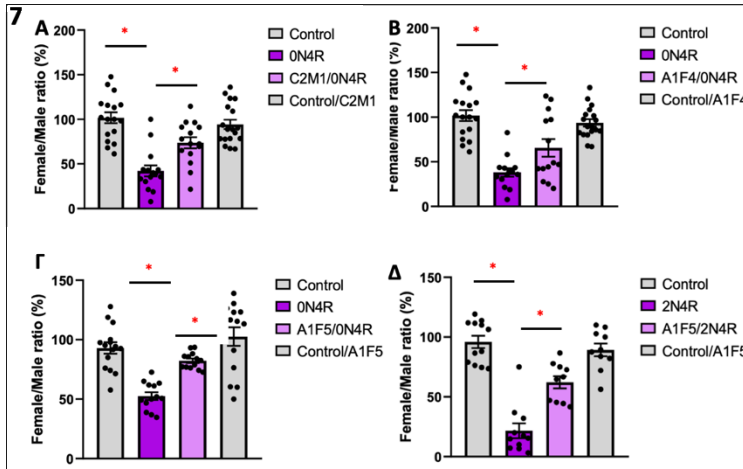
σημαντικότητα.

Τα ευρήματα δείχνουν ότι η έκφραση νανοαντισωμάτων μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά τις διαφορετικές ισομορφές και μορφές συσσωματωμάτων ταυ, επιδράσεις που δεν αντικατοπτρίζονται πάντα από τις μετρήσεις των συνολικών επιπέδων ταυ.

Γ3. Διάσωση της εμβρυϊκής θνησιμότητας που προκαλείται από την Ταυ

Η εμβρυϊκή θνησιμότητα στη *Drosophila melanogaster* αναφέρεται στην αποτυχία των εμβρύων να αναπτυχθούν και να εκκολαφθούν σε προνύμφες πρώτου σταδίου που προκαλείται

από την έκφραση ανθρώπινων ισομορφών ταυ. Αυτό αξιολογήθηκε με ποσοτικοποίηση του αριθμού των μυγών που προκύπτουν από συγκεκριμένες γενετικές διασταυρώσεις. Οι διασταυρώσεις οργανώθηκαν έτσι ώστε μόνο τα θηλυκά να εκφράζουν τόσο την Ταυ όσο και



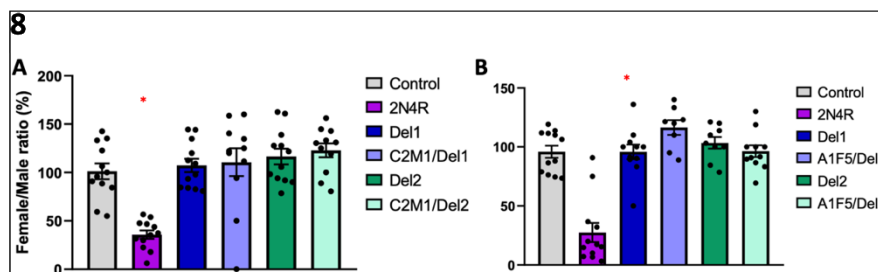
Εικόνα 7. Μύγες που εκφράζουν 0N4R Ταυ με (Α) το νανοαντίσωμα Z70 (Β) τη γραμμή νανοαντισώματος PD Z70 A1F4 (Γ) PD Z70 A1F5, και (Δ) 2N4R Ταυ και PD Z70 A1F5 με το σύστημα GAL4-UAS. Ο αστερίσκος(*) υποδεικνύει σημαντικότητα

το διαγονίδιο νανοαντισώματος υπό τον κατάλληλο οδηγό.

Μετά την εμφάνιση ενηλίκων, καταγράφηκαν οι

αριθμοί των αρσενικών και θηλυκών μυγών. Σε μια κανονική διασταύρωση, η αναλογία θηλυκών προς αρσενικά αναμένεται να είναι περίπου 1:1 (100% βιωσιμότητα). Οι αποκλίσεις από αυτήν την αναμενόμενη αναλογία, όπως η μείωση του αριθμού των μυγών του πειραματικού γονότυπου, υποδεικνύουν μερική ή πλήρη θνησιμότητα που συμβαίνει κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η ταυτόχρονη έκφραση της ισομορφής ταυ 0N4R με τη σειρά νανοαντισωμάτων Z70 C2M1 μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από ταυ θνησιμότητα σε σύγκριση με τις μύγες που εκφράζουν μόνο ταυ (7Α). Ομοίως, η ταυτόχρονη έκφραση με τις σειρές νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F4 και A1F5 διέσωσε σημαντικά τη θνησιμότητα (7Β, 7Γ). Για την ισομορφή ταυ 2N4R, η συνέκφραση με τη σειρά νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F5 μείωσε σημαντικά τη θνησιμότητα (7Δ).



Εικόνα 8. Μύγες που εκφράζουν 2N4R Ταυ με διαγραφή στη PHF6 (Del 1) και διαγραφή στη PHF6* (Del 2) με (Α) το νανοαντίσωμα Z70 C2M1 (Β) τη γραμμή PD Z70 A1F5 χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS. Ο

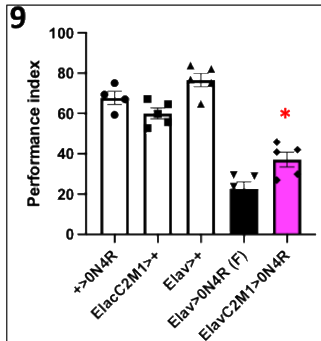
αστερίσκος (*) υποδεικνύει σημαντικότητα.

Η έκφραση παραλλαγών Ταυ που δεν έχουν τα μοτίβα PHF6 (Del 1) ή PHF6* (Del 2) τα οποία στοχεύουν τα νανοαντισώματα δεν οδήγησε σε θνησιμότητα και η έκφραση νανοαντισωμάτων από μόνη της δεν ήταν τοξική, επιβεβαιώνοντας ότι η παρατηρούμενη θνησιμότητα εξαρτάται από την ταυ (8).

Γ4. Επιδράσεις της έκφρασης νανοαντισωμάτων στη Ταυ εξαρτώμενη μαθησιακή έκπτωση

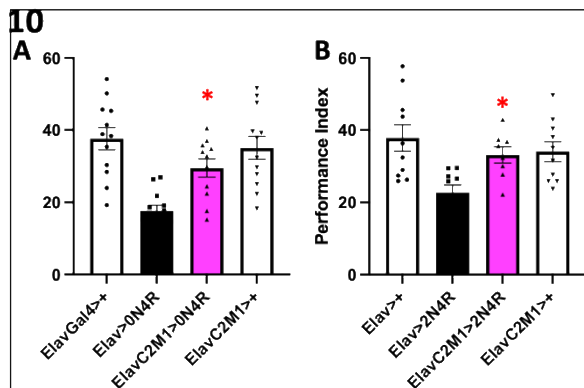
Η μαθησιακή απόδοση αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μια αρνητικά ενισχυμένη δοκιμασία οσφρητικής προετοιμασίας. Οι μύγες που εκφράζουν ανθρώπινες ισομορφές ταυ εμφάνισαν μειωμένη μάθηση σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Αρχικά εκτιμήθηκε η ικανότητα των νανοαντισωμάτων να μειώσουν την μαθησιακή έκπτωση σε μύγες που εκφράζουν 0N4R Ταυ.



Εικόνα 9. Δείκτης μάθησης μυγών που εκφράζουν 0N4R Ταυ (μαύρη στήλη) και το νανοαντίσωμα Z70 (ματζέντα) σε σχέση με ζώα ελέγχου (ανοιχτές στήλες) χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS.

Συνεπώς, η συνέκφραση της σειράς νανοαντισωμάτων PD Z70 A1F5 αποκατέστησε μερικώς μεν, αλλά σημαντικά την μαθησιακή απόδοση σε μύγες που εκφράζουν την ισομορφή ταυ 0N4R (9). Επειδή φάνηκε μία μικρή μεν αλλά σημαντική βελτίωση δοκιμάστηκε αντιστροφή του μνημονικού ελλείματος.

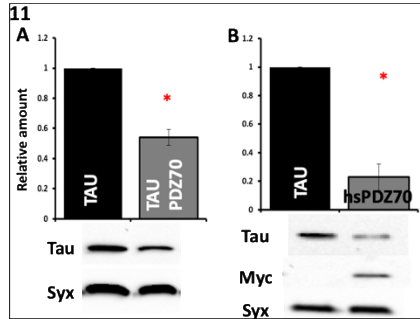


Εικόνα 10. Δείκτης μνήμης μυγών που εκφράζουν (A) 0N4R Ταυ (μαύρη στήλη) και το νανοαντίσωμα Z70 (ματζέντα) ή (B) την 2N4R Ταυ (μαύρη στήλη) και το νανοαντίσωμα Z70 (ματζέντα) Ταυ σε σχέση με ζώα ελέγχου (ανοιχτές στήλες) χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS.

Είναι εμφανές ότι τα στελέχη που εκφράζουν ταυτόχρονα με την πρωτεΐνη Ταυ και τα νανοαντισώματα εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη απόδοση μνήμης σε σχέση με άτομα που εκφράζουν μόνο τις ισομορφές της Ταυ σχεδόν στο επίπεδο με τα στελέχη αναφοράς. Συνεπώς, τα νανοαντισώματα είναι ικανά να ανατρέψουν την μαθησιακή και μνημονική έκπτωση που συνεπάγεται η έκφραση της Ταυ.

Γ5. Θεραπευτική παρέμβαση νανοαντισωμάτων.

Αρχικά επικεντρωθήκαμε στον προσδιορισμό της ικανότητας (ή όχι), των νανοαντισωμάτων να περιορίσουν τα συσσωματώματα Ταυ εάν εκφραστούν χρονοειδικά σε ενήλικα άτομα.



Εικόνα 11. Επίπεδα ON4R Tau χωρίς και με τα πρωτεασωμικά κατευθυνόμενα νανοαντισώματα συνεκφραζόμενα σε ενήλικα άτομα (A) και μετά από επαγωγή (2X) σε ενήλικα άτομα που εκφράζουν ON4R Tau εφ' όρου ζωής (B). Το επαγώμενο με θερμικό σοκ νανοαντίσωμα ανιχνεύθηκε μέσω του μάρτυρα myc που έχει ενθεθεί στο τέλος της αλληλουχίας του.

Είναι προφανές ότι τα πρωτεασωμικά κατευθυνόμενα νανοαντισώματα σε ενήλικα άτομα μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της Tau (A). Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα προς θεραπευτικούς σκοπούς είναι η επαγώμενη σε ενήλικα άτομα που ήδη συσσωρεύουν Tau για 2 εβδομάδες μείωση των επιπέδων της με το νανοαντίσωμα hsPDZ70.

Δ. Σύνοψη Ευρημάτων

Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα νανοαντισώματα που στοχεύουν την Tau μπορούν να τροποποιήσουν την παθολογία της Tau. Ενώ οι αλλαγές στα συνολικά επίπεδα Tau ήταν μεταβλητές μεταξύ των γονότυπων και των σειρών νανοαντισωμάτων, οι αναλύσεις κλασμάτωσης αποκάλυψαν συνεπείς μειώσεις σε συγκεκριμένα είδη συσσωματωμένης Tau. Είναι σημαντικό ότι αρκετές κατασκευές νανοαντισωμάτων διέσωσαν σημαντικά την εμβρυϊκή θνησιμότητα που προκαλείται από την τοξικότητα της Tau, υποδεικνύοντας μια προστατευτική επίδραση. Επιπλέον υπό τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν, η έκφραση νανοαντισωμάτων αποκατέστησε τα μαθησιακά και μνημονικά ελλείμματα που σχετίζονται με την έκφραση της Tau.

Μελλοντικές Προοπτικές

Η μελλοντική εργασία θα επικεντρωθεί σε διάφορες βασικές κατευθύνσεις για να καθοριστεί περαιτέρω το θεραπευτικό δυναμικό των νανοαντισωμάτων που στοχεύουν την Tau.

Πρώτον, θα αξιοποιηθεί χρονικά ελεγχόμενη έκφραση νανοαντισωμάτων (π.χ. σύστημα θερμικού σοκ) ώστε να προσομοιωθεί κλινικά πιο σχετική θεραπευτική παρέμβαση. Η σύγκριση πρώιμης έναντι όψιμης επαγωγής θα βοηθήσει στον καθορισμό κρίσιμων χρονικών παραθύρων για αποτελεσματική θεραπεία.

Δεύτερον, θα αξιολογηθούν μηχανικά σχεδιασμένες κατασκευές διασωμάτων (diabody) που στοχεύουν πολλαπλούς επιτόπους tau για να καθοριστεί εάν η αυξημένη συγγένεια/αβιδότητα δέσμευσης ή η διπλή στόχευση ενισχύει την αποτελεσματικότητα. Αυτές οι κατασκευές μπορούν να βελτιώσουν την εξουδετέρωση των τοξικών ειδών tau ή να αντισταθμίσουν τις διαφορές που αφορούν τις ισομορφές στη συμπεριφορά συσσωμάτωσης. Τρίτον, θα επεκταθούν περαιτέρω αναλύσεις συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένων των δοκιμασιών μακροπρόθεσμης μνήμης και της αντοχής στο οξειδωτικό στρες, για να προσδιοριστεί εάν συγκεκριμένες κατασκευές νανοαντισωμάτων μπορούν να διασώσουν τη νευρωνική δυσλειτουργία. Η συσχέτιση των συμπεριφορικών αποτελεσμάτων με λεπτομερή βιοχημικά προφίλ των ειδών tau θα είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό των μορφών tau που είναι πιο σχετικές με τη γνωστική εξασθένηση. Τέλος, θα επιδιωχθεί η in vivo επικύρωση της εξειδίκευσης των νανοαντισωμάτων χρησιμοποιώντας παραλλαγές tau που δεν έχουν μοτίβα PHF6 ή PHF6* ως αρνητικούς ελέγχους. Αυτά τα πειράματα θα επιβεβαιώσουν εάν η διάσωση

που προκαλείται από νανοσώματα εξαρτάται αυστηρά από την αλληλεπίδραση με καθορισμένες περιοχές επιρρεπείς σε συσσώματωση και θα ενισχύσουν τα μηχανιστικά συμπεράσματα σχετικά με τη δράση των νανοαντισωμάτων.

- Επιπλέον είναι σημαντική η μεταφορά της τεχνολογίας των νανοαντισωμάτων και της αποκληθείσας τεχνογνωσίας σε ανάλογο σύστημα θηλαστικών (ποντικός) και για αυτήν την προοπτική πραγματοποιήθηκαν τα πειράματά της παρακάτω ενότητας.