



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: Μελέτες κέρδους-και-απώλειας λειτουργίας της κίνησης Mirk/Dyrk1B και του miR-9-5p στην Ταυ παθολογία

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΜΑΡΙΑ ΓΑΪΤΑΝΟΥ (ΕΙΠ)

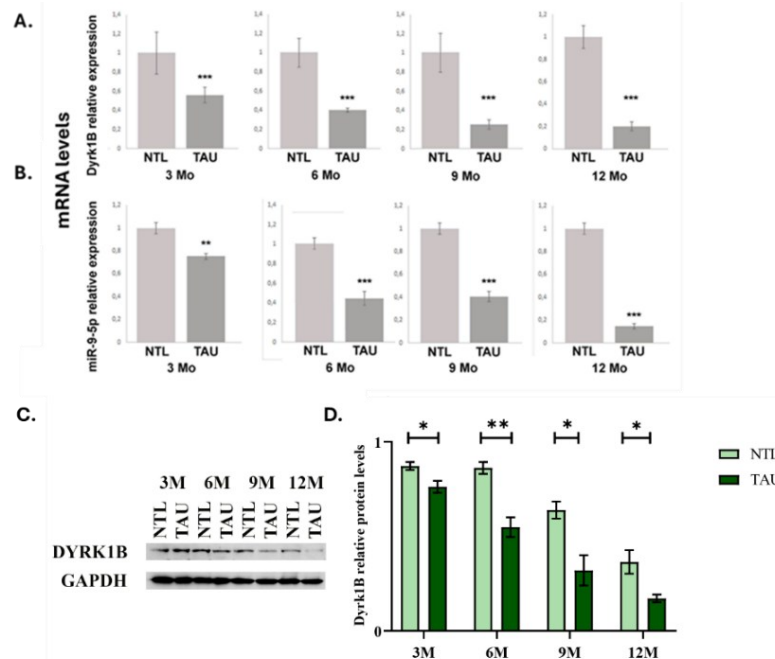
Μελέτες κέρδους-και-απώλειας λειτουργίας της κινάσης Mirk/Dyrk1B και του miR-9-5p στην Ταυ παθολογία

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

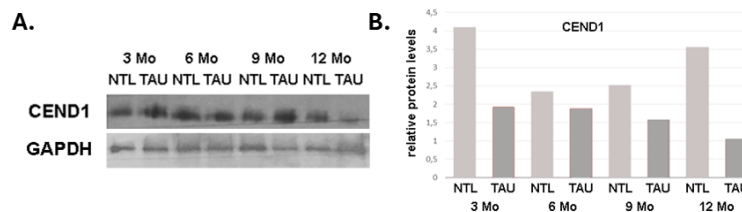
Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε αρχικά η έκφραση σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο της κινάσης Mirk/Dyrk1B καθώς και του νευρογενετικού ρυθμιστικού της microRNA, miR-9-5p, σε σχέση με την προοδευτική ανάπτυξη της Ταυ παθολογίας στις ταυοπάθειες και κατά επέκταση στη νόσο Alzheimer, στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ποντικών THY-Tau22, με χρήση Real-time qPCR και Western Blot ανάλυσης αντίστοιχα. Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενήλικη νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου των THY-Tau22 ποντικών 3, 6, 9 και 12 μηνών με ανοσοϊστοχημεία και ανάλυση Western Blot έναντι πρωτεϊνών-δεικτών που χαρακτηρίζουν τα διάφορα στάδια της ενήλικης νευρογένεσης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν in vitro πειράματα κέρδους και απώλειας λειτουργίας της κινάσης Mirk/Dyrk1B, και επιπλέον μελετήθηκε η φαρμακολογική αναστολή της κινάσης Mirk/Dyrk1B με την χρήση του εκλεκτικού της αναστολέα AZ191, σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων προερχόμενων από τον εγκέφαλο ποντικών THY-Tau22 εμβρυικής ηλικίας E14.5 και των αντίστοιχων ποντικών ελέγχου και εξετάστηκε η επίπτωση της απώλειας λειτουργίας της κινάσης Mirk/Dyrk1B στην έκφραση και την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Ταυ, στην απόπτωση (Bax), στην έκφραση των πρωτεϊνών MAP2, Synapsin I, και PSD95.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

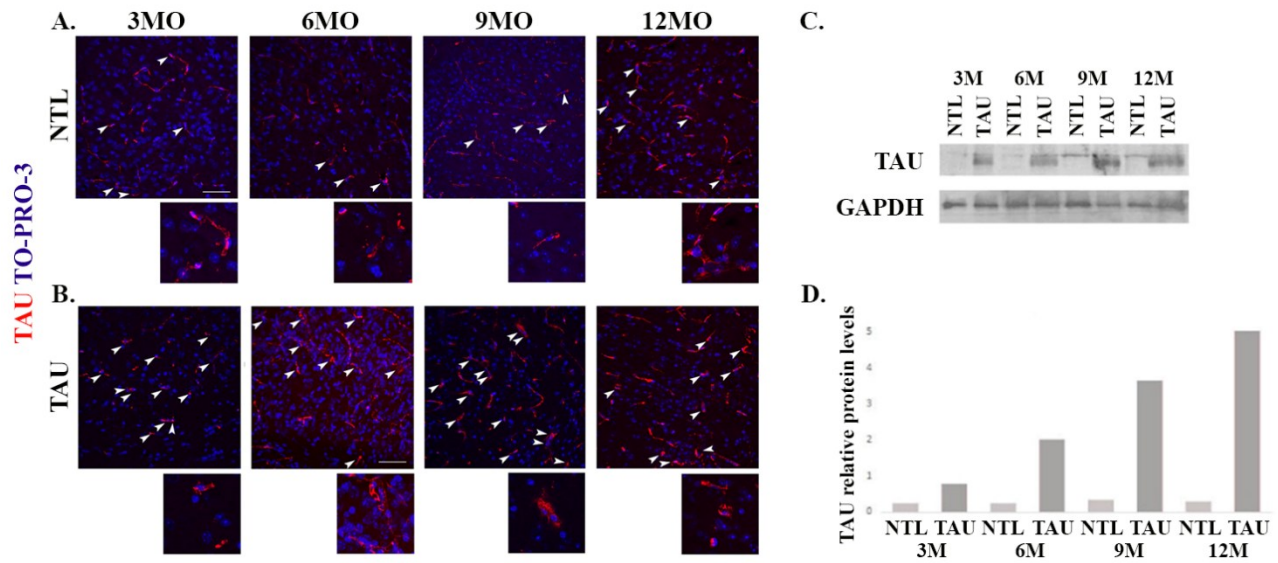
α) Μελέτη της έκφρασης της κινάσης Mirk/Dyrk1B και του νευρογενετικού ρυθμιστικού της microRNA, miR-9 (miR-9-5p) στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των επιπέδων έκφρασης της κινάσης Mirk/Dyrk1B, καθώς και του νευρογενετικού ρυθμιστικού της microRNA, miR-9-5p, με απομόνωση ολικού mRNA καθώς και ολικών πρωτεϊνών από εγκεφάλους THY-Tau22 ποντικών ηλικίας 3, 6, 9 και 12 μηνών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL), με την εφαρμογή RT- qPCR και Western Blot ανάλυσης αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι η έκφραση της κινάσης Mirk/Dyrk1B και του νευρογενετικού ρυθμιστικού της miR-9-5p μειώνεται σημαντικά στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών σε συνάρτηση με την πρόοδο του νευροεκφυλισμού. Συγκεκριμένα, η έκφραση του mRNA της κινάσης Mirk/Dyrk1B στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών βρέθηκε μειωμένη κατά 50% στους 3 μήνες, κατά 60% στους 6 μήνες και κατά 80% στους 9 και 12 μήνες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL) στις ίδιες ηλικίες, όπως ανέδειξε RT- qPCR ανάλυση. Μείωση παρατηρήθηκε επίσης και στην έκφραση του miR-9-5p κατά 35% στους 3 μήνες, κατά 60% στους 6 και 9 μήνες και κατά 80% στους 12 μήνες αντίστοιχα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL) στις ίδιες ηλικίες, όπως ανέδειξε RT- qPCR ανάλυση (**Εικόνα 38A, 1B**). Η μειωμένη έκφραση της κινάσης Mirk/Dyrk1B στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών παρατηρήθηκε αντίστοιχα και στα πρωτεϊνικά της επίπεδα στους 3, 6, 9 και 12 μήνες (**Εικόνα 38C, 1D**). Παρομοίως μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν και για τη νευροειδική πρωτεΐνη Cend1 στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL) στις ίδιες ηλικίες σύμφωνα με Western Blot ανάλυση (**Εικόνα 39**). Τα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης Ταυ είναι αυξημένα στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών και αυξάνονται περεταίρω με την πάροδο του χρόνου και του νευροεκφυλισμού (**Εικόνα 40**).



Εικόνα 38. Τα επίπεδα mRNA των *Mirk/Dyrk1B* και *miR-9-5p* μειώνονται σημαντικά στον εγκέφαλο των ποντικών *THY-Tau22* κατά τη γήρανση και την εξέλιξη της παθολογίας *Tau*. A, B: Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA των *Mirk/Dyrk1B* και *miR-9-5p* μειώνονται κατά 50%, 60%, 80%, 80% και 35%, 60%, 60%, 80%, αντίστοιχα, σε ολόκληρο τον εγκέφαλο ποντικών *THY-Tau22* ηλικίας 3, 6, 9 και 12 μηνών, σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου (NTL), όπως αποκαλύφθηκε από την ανάλυση RT-qPCR. n=3 ανεξάρτητα πειράματα από n=3 εγκεφάλους σε κάθε περίπτωση, γραμμές σφάλματος: SEM, t-test του Student. C, D: Σε συμφωνία με την ανάλυση RT-qPCR, τα επίπεδα έκφρασης της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* εκτιμήθηκαν μειωμένα σε εγκεφάλους *THY-Tau22*, όπως αποκαλύφθηκε από την ανάλυση Western Blot σε συνολικά λύματα πρωτεϊνών ολόκληρου εγκεφάλου. Η πυκνομετρική ανάλυση και η κανονικοποίηση με τα επίπεδα GAPDH πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού ImageJ. n=3 ανεξάρτητα πειράματα από n=3 εγκεφάλους σε κάθε περίπτωση, γραμμές σφάλματος: SEM, t-test Student.



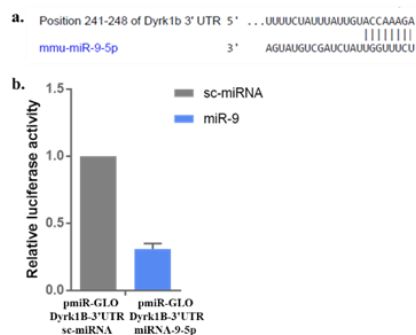
Εικόνα 39. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της νευροειδικής-νευρογεννητικής πρωτεΐνης *Cend1* είναι μειωμένα στον εγκέφαλο των ποντικών *THY-Tau22*. A,B: Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της *Cend1* εκτιμήθηκαν μειωμένα σε εγκεφάλους *THY-Tau22*, όπως αποκαλύφθηκε από την ανάλυση Western Blot σε συνολικά λύματα πρωτεϊνών ολόκληρου εγκεφάλου. Η πυκνομετρική ανάλυση και η κανονικοποίηση με τα επίπεδα GAPDH πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού ImageJ.



Εικόνα 40. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης *Tau* αυξάνονται κατά την εξέλιξη της νευροεκφύλισης στον εγκέφαλο των ποντικών *THY-Tau22*. A,B: Ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης *Tau* (κόκκινο) παρατηρείται αυξημένη με την πάροδο της ηλικίας στον φλοιό ποντικών *THY-Tau22* ηλικίας 3, 6, 9 και 12 μηνών, αλλά και σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου (NTL). Κλίμακα: 100 μ m. TO-PRO-3: χρώση πυρήνων. C,D: Western blot ανάλυση σε λύματα ολικής πρωτεΐνης εγκεφάλου *THY-Tau22* ποντικών ηλικίας 3, 6, 9 και 12 μηνών δείχνουν την αύξηση της *Tau*. Η πυκνομετρική ανάλυση και η κανονικοποίηση με τα επίπεδα *GAPDH* πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού *ImageJ*.

β) Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* από το νευρογενετικό microRNA, *miR-9* (*miR-9-5p*).

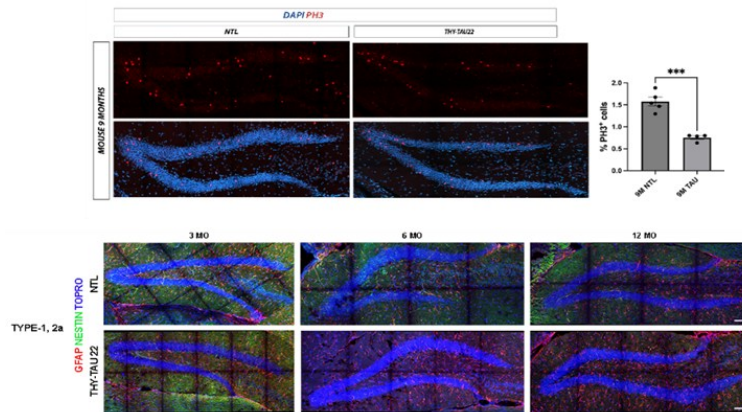
Το νευρογενετικό microRNA, *miR-9* (*miR-9-5p*) ρυθμίζει την έκφραση της κινάσης *Mirk/Dyrk1B*. Το microRNA *miR9* (*miR-9-5p*) στοχεύει το 3'-UTR του mRNA της κινάσης *Mirk/Dyrk1B*. Η έκφραση της *Mirk/Dyrk1B* ρυθμίζεται αρνητικά από το microRNA *miR9* (*miR-9-5p*). Βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο *TargetScan 7.2* (<https://www.targetscan.org>) προέβλεψε ότι το *miR-9-5p* δεσμεύει απευθείας το 3'-UTR του mRNA της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* του ποντικίου με τέλεια συμπληρωματικότητα (στη θέση δέσμευσης 8μερούς). Ανάλυση της δοκιμασίας της λουσιφεράσης σε κύτταρα *HEK293T* κατά τη συν-επιμόλυνση με αλληλουχίες *sc-miRNA* ή *miR-9-5p* κλωνοποιημένες στον πλασμιδιακό φορέα *pCMV-miR* και με το πλασμίδιο αναφοράς *pmiR-GLO* που περιέχει το 3'-UTR του mRNA της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* συμπεριλαμβανομένης της πιθανής θέσης δέσμευσης 8μερών, έδειξε μείωση 65% στη δραστηριότητα της λουσιφεράσης (n=3 ανεξάρτητα πειράματα, εις τριπλούν το καθένα) (Εικόνα 41).



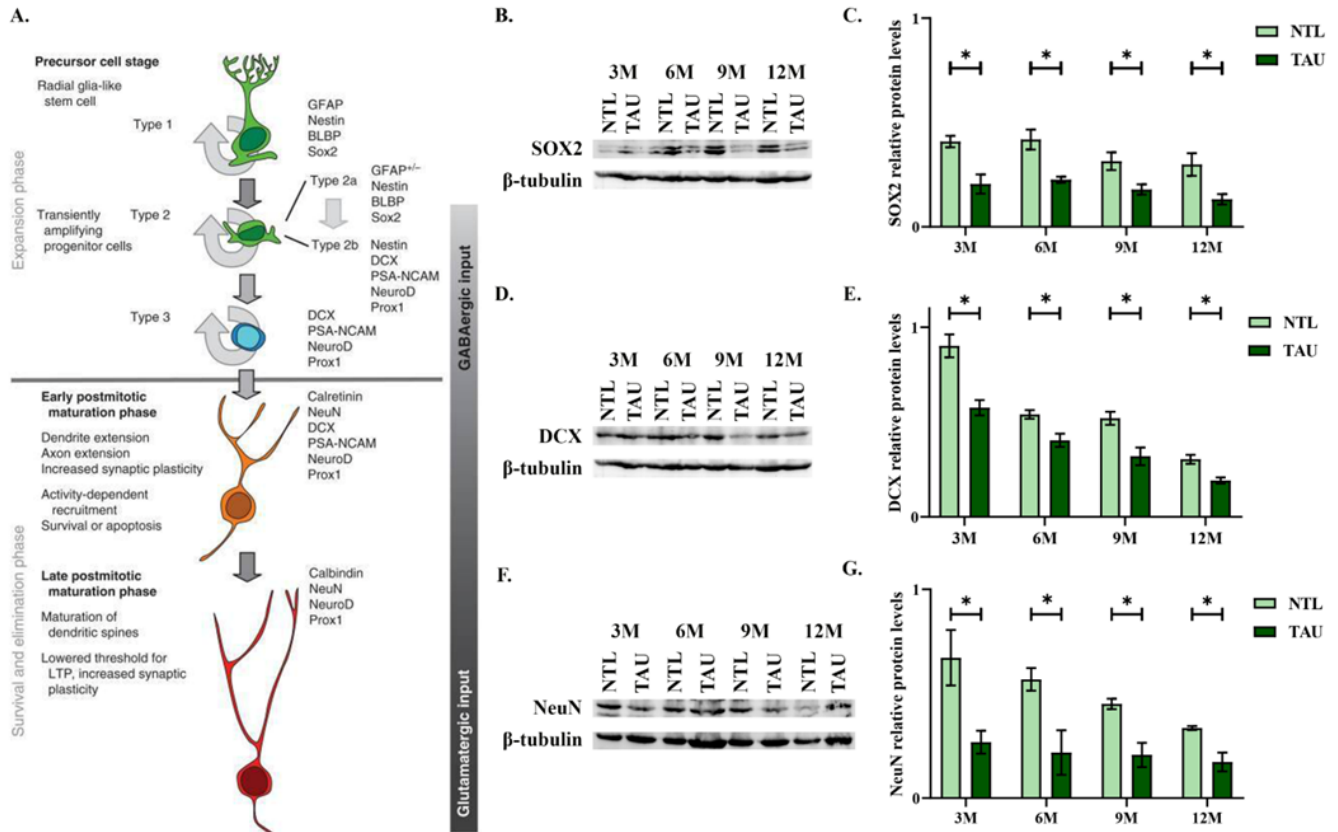
Εικόνα 41. Το microRNA *miR-9-5p* στοχεύει το 3'-UTR του mRNA *Dyrk1B*. A: Η έκφραση της κινάσης *Dyrk1B* ρυθμίζεται αρνητικά από το microRNA *miR9* (*miR-9-5p*). Η βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο *Target Scan 7.2* (<https://www.targetscan.org>) προέβλεψε ότι το *miR-9-5p* συνδέεται άμεσα με το 3'-UTR του mRNA *Dyrk1B* ποντικίου με τέλεια συμπληρωματικότητα βάσεων (θέση σύνδεσης 8μερών). B: Η ανάλυση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης σε κύτταρα *HEK293T* με αλληλουχίες *sc-miRNA* ή *miR-9-5p* που κλωνοποιήθηκαν σε φορέα *pCMV-miR* με

το κατασκεύασμα αναφοράς *pmiR-GLO* που περιείχε το 3'-UTR της κινάσης *Dyrk1B* του ποντικού, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής θέσης σύνδεσης 8μερών, έδειξε μείωση 65% στη δραστικότητα της λουσιφεράσης ($n=2$ ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν). Η κανονικοποιημένη δραστικότητα λουσιφεράσης *Firefly* για το *sc-miRNA* έχει οριστεί σε 1.

γ) Μελέτη της ενήλικης νευρογένεσης στα THY-Tau22 ποντίκια. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της ενήλικης νευρογένεσης με τη χρήση κατάλληλων νευρογενετικών δεικτών *Sox2*, *NeuN*, *Dcx*, για τον προσδιορισμό των νευρογεννητικών πληθυσμών που χαρακτηρίζουν την ενήλικη νευρογένεση όπως: *type1/2a*, *type CR* καθώς και του μιτωτικού δείκτη πολλαπλασιασμού *PH3* των νευροβλαστών στην περιοχή της οδοντωτής έλικας (*dentate gyrus*, *DG*) του ιπποκάμπου (*hippocampus*, *hp*) στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL) (**Εικόνα 42**). Σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε μια σημαντική μείωση των παραπάνω πληθυσμών στα THY-Tau22 ποντίκια σε σύγκριση με τα αντίστοιχα NTL, αποτελέσματα που επαληθεύτηκαν και με Western blot ανάλυση, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά πρωτεϊνικά ομογενοποιημένα προερχόμενα από απομονωμένους ιπποκάμπους των THY-Tau22 ποντικών 3, 6, 9 και 12 μηνών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL) (**Εικόνα 43**).

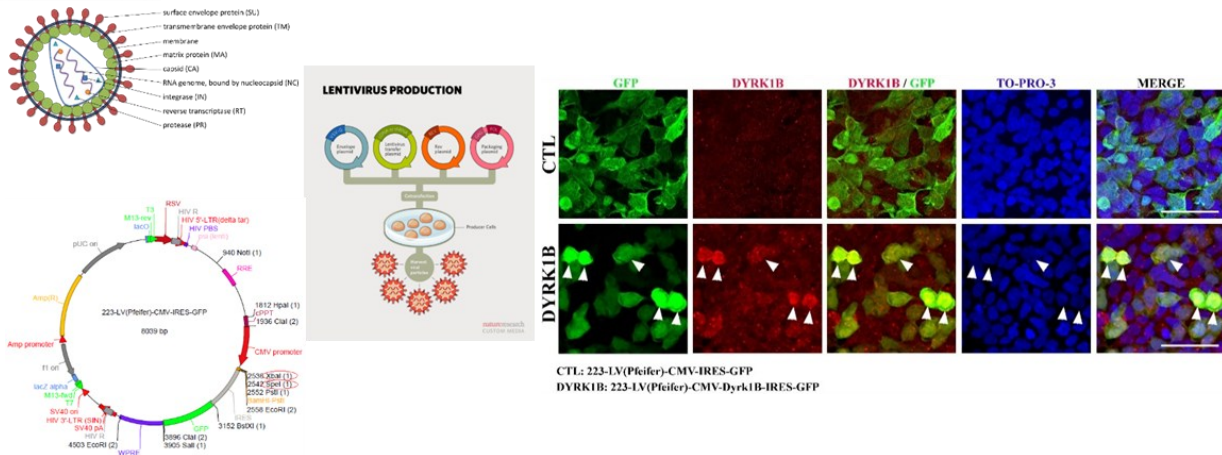


Εικόνα 42. Τα THY-Tau22 ποντίκια εμφανίζουν ελαττωματική ενήλικη νευρογένεση στην περιοχή της οδοντωτής έλικας (*dentate gyrus*, *DG*) του ιπποκάμπου (*hippocampus*, *hp*). **A:** Ο αριθμός των $PH3^+$ νευροβλαστών (μιτωτικός δείκτης) στην περιοχή της οδοντωτής έλικας (*dentate gyrus*, *DG*) του ιπποκάμπου (*hippocampus*, *hp*) στον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών είναι σημαντικά μειωμένος κατά 3-φορές σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL) στην ηλικία των 9 μηνών. Κλίμακα: 100 μ m. DAPI: χρώση πυρήνων, $n=3$ εγκέφαλοι κάθε συνθήκης, γραμμές σφάλματος: SEM, *t*-test του Student. **B:** Ο αριθμός των διπλά θετικών κυττάρων $GFAP^+/Nestin^+$ που αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό των *type1*, *2a* βρέθηκε σημαντικά μειωμένος στα THY-Tau22 ποντίκια στους 3, 6 και 12 μήνες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου (NTL).

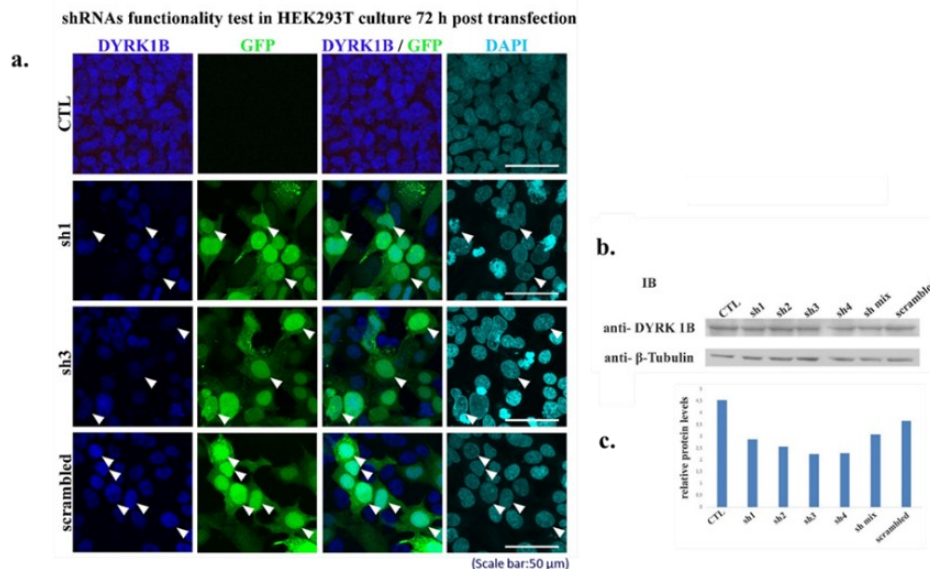


Εικόνα 43. Η ενήλικη νευρογένεση είναι ελαττωματική στα THY-Tau22 ποντίκια. A: Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών τύπων της νευρωνικής γενεαλογίας στην περιοχή της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus, DG) του ιπποκάμπου (hippocampus, hp) και οι πρωτεϊνικοί δείκτες που εκφράζει ο κάθε κυτταρικός τύπος. B-G: Western blot ανάλυση και ποσοτικοποίηση των νευρογενετικών δεικτών Sox2, Dcx, NeuN σε συνολικά πρωτεϊνικά ομογενοποιημένα προερχόμενα από απομονωμένους ιπποκάμπους των THY-Tau22 ποντικών 3, 6, 9 και 12 μηνών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα από ποντίκια ελέγχου (NTL). Σε κάθε περίπτωση φαίνεται η σημαντική μείωση στην έκφραση των Sox2, Dcx (doublecortin) και NeuN ανάμεσα στα THY-Tau22 και NTL ποντίκια αλλά και με την πάροδο του χρόνου και την πορεία του νευροεκφυλισμού. n=3 εγκέφαλοι σε κάθε περίπτωση, γραμμές σφάλματος: SEM, t-test του Student.

δ) Δημιουργία των κατάλληλων μοριακών εργαλείων για την υλοποίηση πειραμάτων κέρδους και απώλειας λειτουργίας της κινάσης Mirk/Dyrk1B. Συγκεκριμένα κατασκευάστηκε ο λεντι-ϊικός φορέας έκφρασης LV-Dyrk1B-IRES-GFP, που εκφράζει ξεχωριστά την πρωτεϊνική κινάση Mirk/Dyrk1B, καθώς και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (για την επισήμανση των διαμολυσμένων νευρώνων), με σκοπό την εφαρμογή πειραματικών προσεγγίσεων κέρδους λειτουργίας σε E14.5 πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων προερχόμενων από τον εγκέφαλο των THY-Tau22 ποντικών και των αντίστοιχων ποντικών ελέγχου (NTL) (Εικόνα 44). Παράλληλα ελέγχθηκαν για την δραστικότητα σίγασης (gene silencing) 4 διαφορετικά shRNAs έναντι του γονιδίου Mirk/Dyrk1B του ποντικού στην κυτταρική σειρά HEK293T και επιλέχθηκε το sh3 για την παραγωγή λεντι-ιού (Εικόνα 45).



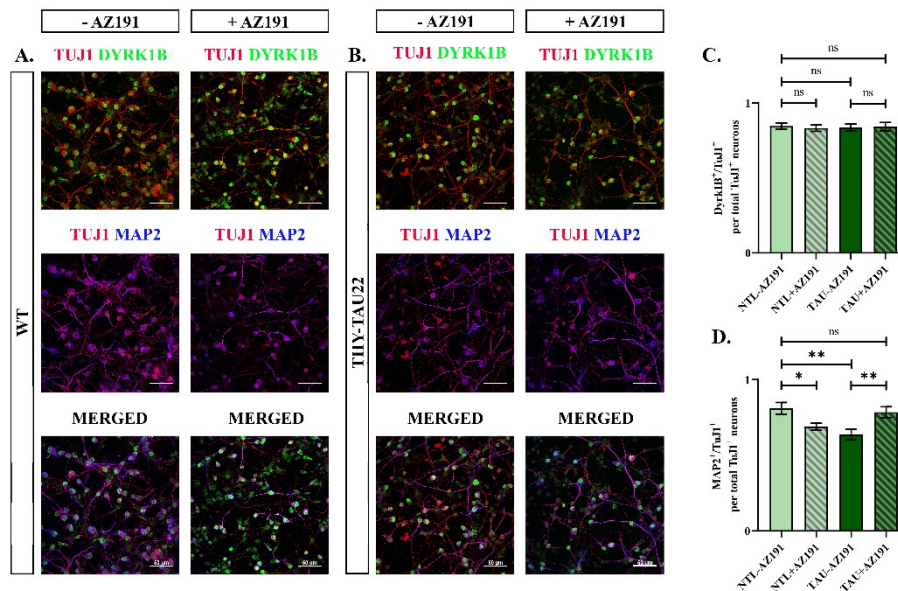
Εικόνα 44. Δημιουργία λεντιοίου που εκφράζει *Dyrk1B-IRES-GFP* για προσεγγίσεις κέρδους λειτουργίας. Προκειμένου να πραγματοποιήσουμε μελέτες κέρδους λειτουργίας της κινάσης *Dyrk1B*, δημιουργήσαμε τον λεντιοίο *LV-Dyrk1B-IRES-GFP*, κλωνοποιώντας την κωδική περιοχή του *cDNA* της κινάσης *Dyrk1B* ποντικού στις περιοριστικές θέσεις κλωνοποίησης *XbaI* και *SpeI*. Οι πρωτεΐνες *Dyrk1B* και *GFP* εκφράζονται υπό τον υποκινητή *CMV*, ως ξεχωριστές πρωτεΐνες, λόγω της αλληλουχίας *IRES*. Οι λεντι-ιοί που εκφράζουν *GFP* (*CTL*) και *Dyrk1B-GFP* δοκιμάστηκαν σε κύτταρα *HEK293*. Στο άνω πλαίσιο, τα *GFP+* κύτταρα, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση με *LV-IRES-GFP* εκφράζουν *GFP* αλλά όχι *Dyrk1B*, ενώ στο κάτω πλαίσιο, τα κύτταρα που έχουν υποστεί διαμόλυνση με τον λεντιοίο *LV-Dyrk1B-IRES-GFP* είναι κύτταρα διπλά θετικά για *GFP+* και *Dyrk1B+*. *TO-PRO-3*: χρώση πυρήνων. Κλίμακα: 50 μm .



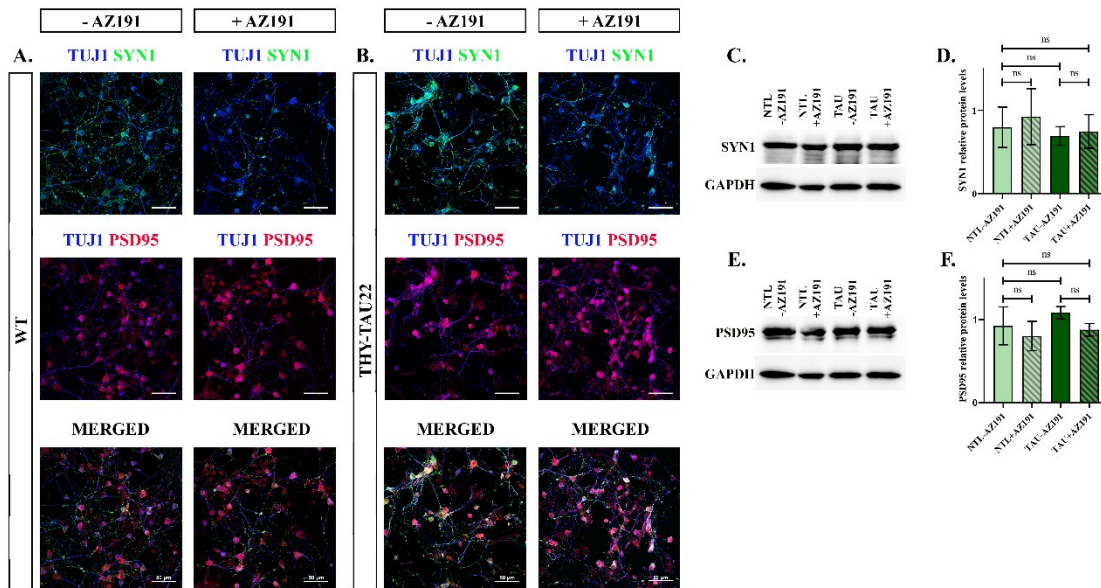
Εικόνα 45. Αξιολόγηση της λειτουργικότητας 4 διαφορετικών *shRNAs* έναντι του *mRNA* της κινάσης *Dyrk1B* του ποντικού σε κύτταρα *HEK293T*. Προκειμένου να πραγματοποιήσουμε μελέτες απώλειας λειτουργίας της *Dyrk1B*, εξετάσαμε, μέσω παροδικού μετασχηματισμού (*transient transfection*), σε *HEK293T* κύτταρα, 4 διαφορετικά πλασμίδια έκφρασης *shRNAs-Dyrk1B* που εκφράζουν και *GFP* και στοχεύουν το *mRNA* της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* ποντικού (*sh1*, *sh2*, *sh3*, *sh4*) ξεχωριστά και ανά μείγμα (*sh mix*), χρησιμοποιώντας για αρνητικό δείγμα ένα *scrambled shRNA*. Η λειτουργικότητά τους αξιολογήθηκε 72 ώρες μετά τον μετασχηματισμό με (a) ανοσοκυταροχημεία, και (b) *Western blot* ανάλυση με σχετική ποσοτικοποίηση των

επιπέδων πρωτεΐνης *Dyrk1B*, αναφερόμενα σε επίπεδα πρωτεΐνης β-τουμπουλίνης με χρήση του λογισμικού *ImageJ*. (c). Στην ανοσοκυτταροχημεία (a) η έκφραση των *sh1* και *sh3* σε κύτταρα *GFP+* (πράσινο) μείωσε την ενδογενή έκφραση της *Dyrk1B* (μπλε) (βλ. κύτταρα που υποδεικνύονται με αιχμές βελών). *DAPI*: χρώση πυρήνων. Κλίμακα: 50 μm .

ε) Μελέτες κέρδους και απώλειας λειτουργίας της κινάσης *Dyrk1B* σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων προερχόμενων από τον εγκέφαλο ποντικών *THY-Tau22* εμβρυικής ηλικίας **E14.5**. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες κέρδους και απώλειας λειτουργίας της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων από τον εγκέφαλο ποντικών *THY-Tau22* εμβρυικής ηλικίας E14.5 με τη χρήση κατάλληλων λεντι-ιών υπερέκφρασης *LV-Dyrk1B-IRES-GFP* και σίγασης *LV-shRNA3Dyrk1B-IRES-GFP* για την κινάση *Mirk/Dyrk1B*, καθώς και μελέτες απώλειας λειτουργίας με την φαρμακολογική αναστολή της δράσης της κινάσης *Mirk/Dyrk1B*, χρησιμοποιώντας τον ειδικό της αναστολέα *AZ191*. Εξετάστηκε η επίδραση του *AZ191* στην έκφραση της πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού *MAP2* (**Εικόνα 46**), καθώς και στην έκφραση των πρωτεϊνών *Synapsin I* και *PSD95* (**Εικόνα 47**).

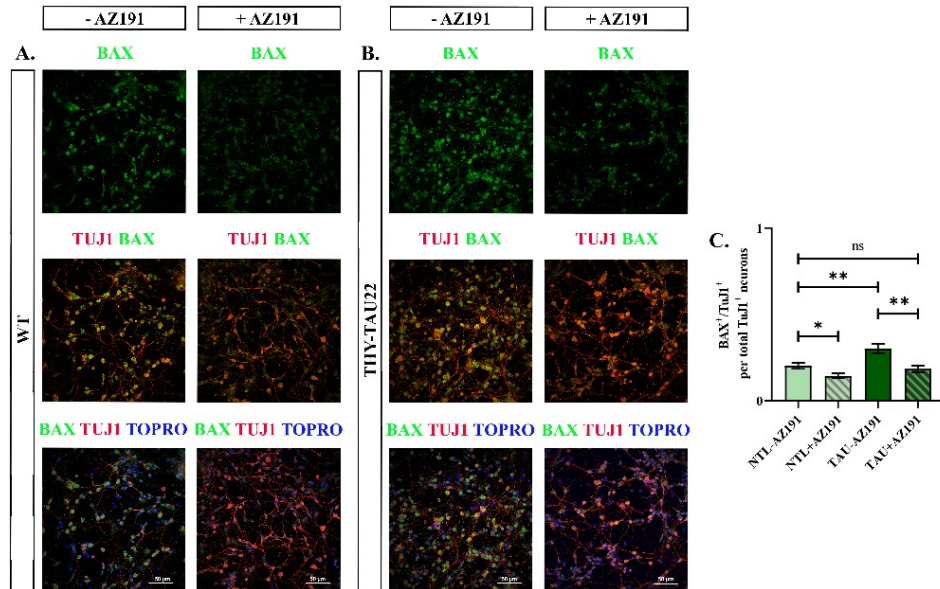


Εικόνα 46. Η αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* από τον εκλεκτικό αναστολέα της *AZ191*, αυξάνει τον αριθμό των διπλά θετικών νευρώνων *Tuj1*⁺/*Map2*⁺ του φλοιού σε καλλιέργειες E14.5 *THY-Tau22*. A,B,C: Η φαρμακολογική αναστολή της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* με τον ειδικό της αναστολέα *AZ191* δεν επηρεάζει την έκφραση της *Mirk/Dyrk1B*, όπως αναμενόταν. Η *Mirk/Dyrk1B* είναι μια πυρηνική κινάση, η οποία εκφράζεται από τους E14.5 WT και *THY-Tau22* νευρώνες του φλοιού. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μετά την προσθήκη *AZ191* στις WT και *THY-Tau22* καλλιέργειες αντίστοιχα. A,B,D: Η προσθήκη 1 μM αναστολέα *AZ191* σε πρωτογενείς καλλιέργειες *THY-Tau22* φλοιικών νευρώνων αυξάνει κατά 1,33 φορές τον αριθμό των διπλά θετικών *Tuj1*⁺/*MAP2*⁺ νευρώνων σε σύγκριση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες νευρώνων *THY-Tau22* χωρίς *AZ191*. Μετρήθηκαν $n=25$ κύτταρα από 3 έμβρυα κάθε συνθήκης. Γραμμές σφάλματος: SEM, *t*-test Student. Κλίμακα: 50 μm . *TUJ1*: β III-τουμπουλίνη. *TO-PRO-3*: χρώση πυρήνων.

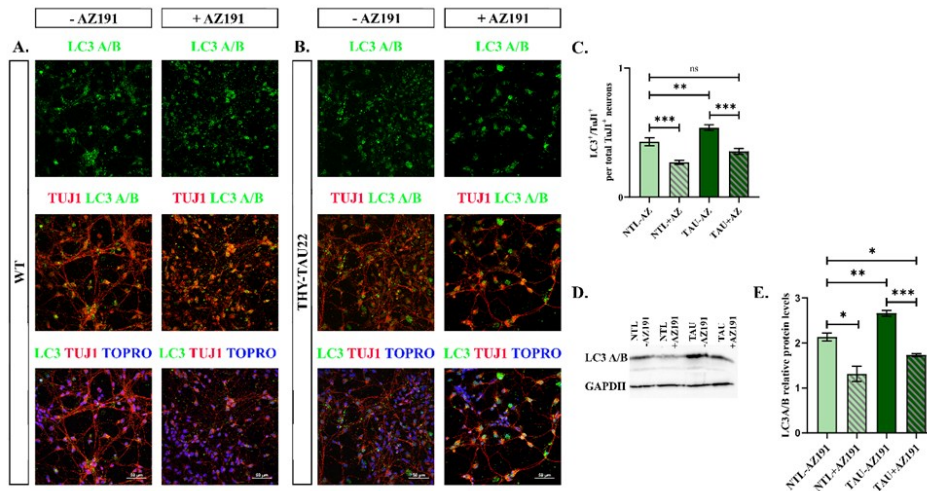


Εικόνα 47. Η αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* από τον εκλεκτικό αναστολέα της *AZ191* δεν μεταβάλλει την έκφραση των πρωτεϊνών *Synapsin I* και *PSD95*. A,B: Η φαρμακολογική αναστολή της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* με τον ειδικό της αναστολέα *AZ191* δεν επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών *Synapsin I* και *PSD95* όπως φάνηκε με ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Κλίμακα: 50 μ m. *TUJ1*: β III-τουμπουλίνη. *TO-PRO-3*: χρώση πυρήνων. C, D, E, F: Western blot ανάλυση σε πρωτεϊνικά λύματα από τις κυτταροκαλλιέργειες της κάθε περίπτωσης. Η πυκνομετρική ανάλυση και η κανονικοποίηση με τα επίπεδα *GAPDH* πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού *ImageJ*. Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες από $n=3$ έμβρυα στην κάθε περίπτωση. Γραμμές σφάλματος: SEM, *t*-test Student.

ζ) Μελέτη της επίδρασης της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *Tau*. Η ανώμαλη υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *Tau* που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου Αλτσχάιμερ και των σχετικών ταυοπαθειών. Η συσσώρευση υπερφωσφορυλιωμένης και συσσωματωμένης *Tau* έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενδοκυτταρικών νευροϊνδιακών συμπλεγμάτων (NFTs), τα οποία συσσωρεύονται στον εγκέφαλο και εντοπίζονται κυρίως στις νευρογενείς κόγχες, με αποτέλεσμα την διαταραχή της ενήλικης νευρογένεσης. Η φωσφορυλίωση *Tau* ρυθμίζεται από μια ισορροπία μεταξύ κινάσων και φωσφατασών. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας βρίσκεται στην αιτία της ανώμαλης υπερφωσφορυλίωσης *Tau* και συμβάλλει στη συσσωμάτωση της *Tau*. Ειδικότερα, ο συνδυασμός φωσφορυλίωσης της *Tau* στα υπολείμματα Thr212, Thr231 και Ser262 προκαλεί νευροεκφυλισμό και ιδιαίτερα η p-*Tau*Thr212 στο πλάσμα αποτελεί βιοδείκτη σποραδικής νόσου Αλτσχάιμερ (AD). Εδώ μελετήσαμε, την επίδραση του εκλεκτικού αναστολέα *AZ191* της κινάσης *Mirk/Dyrk1B*, σε πρωτογενείς καλλιέργειες E14,5 φλοιικών νευρώνων των THY-Tau22 όσον αφορά, την απόπτωση (Εικόνα 48) και την αυτοφαγία (Εικόνα 49), καθώς την έκφραση και τη φωσφορυλίωση της *Tau* στο αμινοξύ Thr212 (Εικόνα 50). Το κυριότερο εύρημα αυτής της μελέτης αποτελεί ότι η φαρμακολογική αναστολή της κινάσης *Mirk/Dyrk1B* με *AZ191* μειώνει τη φωσφορυλίωση *Tau* στο αμινοξικό κατάλοιπο Thr212 και παρέχει νευροπροστασία στους E14.5 φλοιικούς νευρώνες των THY-Tau22 ποντικών.

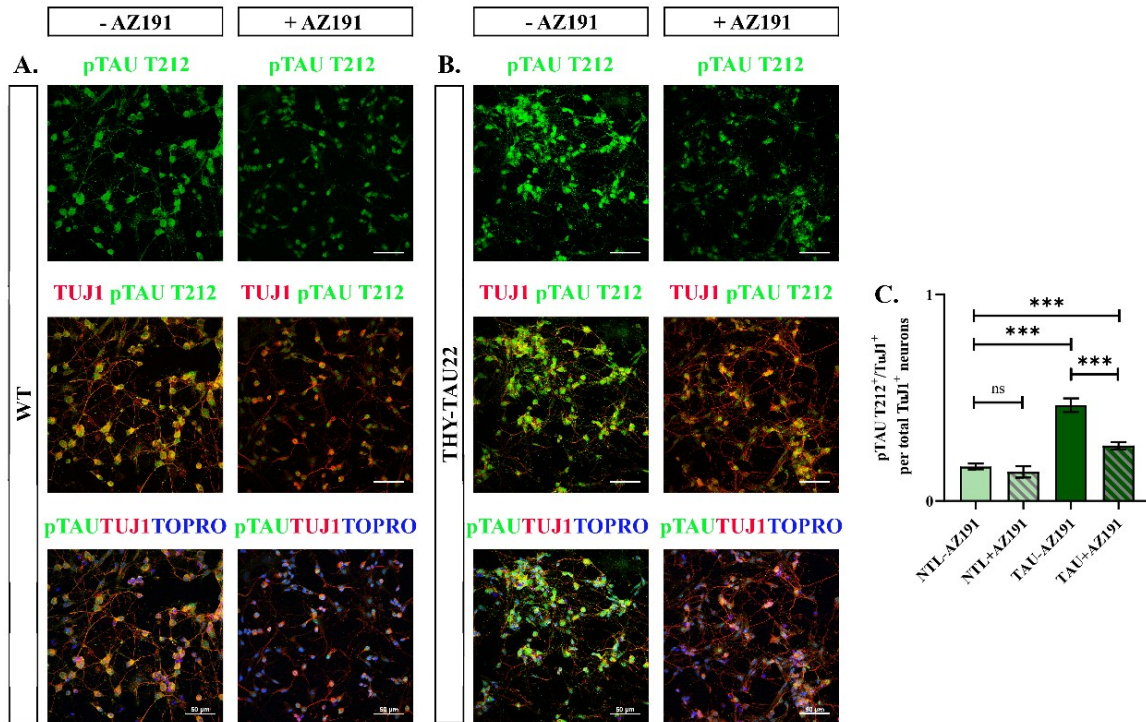


Εικόνα 48. Ο αναστολέας AZ191 μειώνει την απόπτωση των THY-Tau22 φλοιικών νευρώνων. **A,B,C:** Η προσθήκη αναστολέα AZ191 στις καλλιέργειες μειώνει την απόπτωση τόσο στους WT όσο και στους THY-Tau22 φλοιικούς νευρώνες, όπως υποδεικνύεται από τον μειωμένο αριθμό των διπλά θετικών *Tuj1*+/*Bax*+ νευρώνων και στις δύο περιπτώσεις. Ειδικότερα, στις THY-Tau22 καλλιέργειες, ο αριθμός των *Tuj1*+/*Bax*+ νευρώνων του φλοιού μειώνεται κατά 1,47 φορές μετά την προσθήκη του AZ191. Μετρήθηκαν $n=25$ κύτταρα από 3 έμβρυα κάθε περίπτωσης. Γραμμές σφάλματος: SEM, *t*-test Student. Κλίμακα: 50 μ m. *TUJ1*: β III-τουμπουλίνη. *TO-PRO-3*: χρώση πυρήνων.



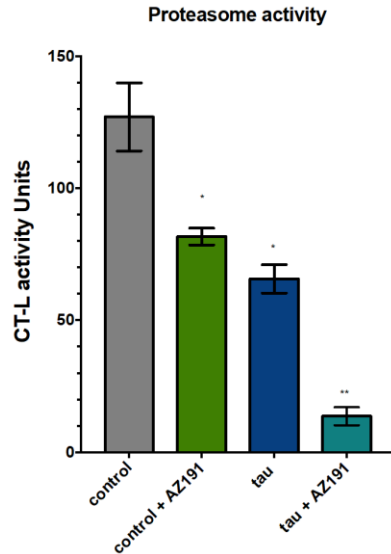
Εικόνα 49. Ο αναστολέας AZ191 ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία των THY-Tau22 φλοιικών νευρώνων. **A,B,C:** Η προσθήκη αναστολέα AZ191 στις καλλιέργειες μειώνει την έκφραση της LC3 A/B τόσο στους WT όσο και στους THY-Tau22 φλοιικούς νευρώνες, όπως υποδεικνύεται από τον μειωμένο αριθμό των διπλά θετικών *Tuj1*+/*LC3 A/B*+ νευρώνων και στις δύο περιπτώσεις. Ειδικότερα, στις THY-Tau22 καλλιέργειες, ο αριθμός των *Tuj1*+/*LC3 A/B*+ νευρώνων μειώνεται κατά 1,52 φορές μετά την προσθήκη του AZ191. Μετρήθηκαν $n=25$ κύτταρα από 3 έμβρυα κάθε περίπτωσης. Γραμμές σφάλματος: SEM, *t*-test του Student. Κλίμακα: 50 μ m. *TUJ1*: β III-τουμπουλίνη. *TO-PRO-3*: χρώση πυρήνων. **D, E:** Η μείωση της έκφρασης του

δείκτη αυτοφαγίας LC3 A/B επιβεβαιώθηκε και με Western blot ανάλυση σε πρωτεϊνικά λύματα από τις κυτταροκαλλιέργειες της κάθε περίπτωσης. Η πυκνομετρική ανάλυση και η κανονικοποίηση με τα επίπεδα GAPDH πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού ImageJ. Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες από 3 έμβρυα στην κάθε περίπτωση. Γραμμές σφάλματος: SEM, *t*-test Student.



Εικόνα 50. Ο αναστολέας AZ191 μειώνει τη φωσφορυλίωση Tau στο αμινοξύ Thr212. A,B,C: Η φαρμακολογική αναστολή της κινάσης Mirk/Dyrk1B με τον ειδικό αναστολέα της AZ191, σε E14.5 νευρώνες του φλοιού THY-Tau22, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 1,73 φορές της φωσφορυλίωσης Tau στο υπόλειμμα Thr212. Μετρήθηκαν $n=25$ κύτταρα από 3 έμβρυα σε κάθε περίπτωση. Γραμμές σφάλματος: SEM, *t*-test του Student. Κλίμακα: 50 μ m. TUJ1: β III-τουμπουλίνη. TO-PRO-3: χρώση πυρήνων.

Η φαρμακολογική αναστολή της Mirk/Dyrk1B κινάσης με τον AZ191 εξετάστηκε και ως προς την επίδραση της στη λειτουργία του πρωτεασώματος σε συνεργασία με την ομάδα του Δρ. Γκόνου (οριζόντια αλληλεπίδραση μεταξύ εταίρων της δράσης). Σε αντίθεση με την ευεργετική επίδραση του αναστολέα AZ191 στη νευροπροστασία και την μείωση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Tau στους THY-Tau22 φλοιικούς νευρώνες, ο αναστολέας δείχθηκε να επηρεάζει αρνητικά την ενεργότητα του πρωτεασώματος. (Εικόνα 51).



Εικόνα 51. Ο αναστολέας AZ191 μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στους WT και THY-Tau22 φλοιικούς νευρώνες. Η μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος πραγματοποιήθηκε σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα πρωτογενών κυτταροκαλλιιεργειών E14.5 WT και THY-Tau22 φλοιικών νευρώνων απουσία και παρουσία αναστολέα AZ191. Η ενεργότητα του πρωτεασώματος είναι ήδη μειωμένη κατά 1,78 φορές στους THY-Tau22 φλοιικούς νευρώνες σε σχέση με τους WT και μειώνεται στους THY-Tau22 περεταίρω δραματικά από την επίδραση του AZ191 κατά 7 φορές.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μέχρι τώρα μια ευεργετική δράση της φαρμακολογικής αναστολής της κινάσης Mirk/Dyrk1B με τον εκλεκτικό της αναστολέα AZ191 όσον αφορά την νευροπροστασία και τη μείωση της φωσφορυλίωσης της Tau στο αμινοξύ Thr212, αλλά και την αρνητική του επίδραση στους μηχανισμούς πρωτεόστασης των νευρώνων όπως είναι η αυτοφαγία και η ενεργότητα του του πρωτεασώματος.