



Universidade de Aveiro  
2015

Departamento de Biologia

**Diana Raquel  
Monteiro Rodrigues**

**Caracterização da fosfatase String/Cdc25 como um  
regulador da neurotoxicidade de Tau em *Drosophila***

**String/Cdc25 phosphatase as a potential modulator of  
Tau neurotoxicity**



## Declaração

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.





**Diana Raquel  
Monteiro Rodrigues**

**Caracterização da fosfatase String/Cdc25 como um  
regulador da neurotoxicidade de Tau em *Drosophila***

**String/Cdc25 phosphatase as a potential modulator of  
Tau neurotoxicity**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Carla Sofia da Silva Lopes, Investigador auxiliar no Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) e da Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, Professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Este trabalho teve o apoio financeiro da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia/MEC - Ministério da Educação e Ciência através de fundos nacionais e quando aplicável cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de Parceria PT2020 referente à unidade de investigação nº 4293.



Aos meus Pais e ao meu Irmão

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."*

*Albert Einstein*









## **o júri**

presidente

**Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**

Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade do Aveiro

arguente

**Doutora Catarina Alexandra Brás Pereira**

Investigador Pós-Doutoramento no Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC)

orientador

**Doutora Carla Sofia da Silva Lopes**

Investigador auxiliar no Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC)



## **agradecimentos**

À minha orientadora Dra. Carla Lopes, um agradecimento especial pela oportunidade de estágio, por todo o tempo que disponibilizou para discussões e conversas sobre o estudo em causa, pelo interesse, dedicação, motivação, ajuda e dados que me forneceu para efetuar este estudo, sem os quais não teria sido possível progredir ao longo deste ano.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Paula Gonçalves, pelo apoio, pelo tempo que disponibilizou para resolver questões burocráticas e pela simpatia que me recebeu como co-orientanda.

Um agradecimento muito especial aos meus companheiros de projeto Rui Machado e Mafalda Pinho por toda a amizade, dedicação, ajuda, paciência e empenho, sem vocês tornava-se difícil a realização deste trabalho.

A todo o Grupo PIN do IBMC pela forma acolhedora com que me receberam e integraram assim como o auxílio que me forneceram nos diversos assuntos.

Ao André Ribeiro o meu agradecimento muito especial que sempre esteve presente quando mais precisei, por todo apoio, carinho e confiança.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes quando foi preciso, e que me acompanharam nestes últimos meses. À Débora Reis, à Filipa Mesquita fica o meu agradecimento por todo o apoio e bons momentos passados.

Por fim, e não por último agradeço à minha família por sempre me ter acompanhado e dado todas as condições e apoio emocional. Um especial obrigado à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão por terem acreditado em mim.



**palavras-chave**

*Drosophila*, Tau, emaranhados neurofibrilares, String/Cdc25, Tauopatias, Neurodegeneração

**resumo**

As tauopatias, grupo onde se inclui a doença de Alzheimer (AD), são caracterizadas pela deposição intracelular de emaranhados neurofibrilares (NFTs), compostos principalmente por formas hiperfosforiladas da proteína Tau, uma proteína que se associa aos microtúbulos. Os mecanismos moleculares subjacentes à neurotoxicidade induzida por Tau não são ainda claros. *Drosophila melanogaster* tem sido usada para modelar diversas doenças neurodegenerativas humanas, incluindo as tauopatias. Neste trabalho foi usado o sistema visual de *Drosophila* como modelo para identificar os passos que podem levar à acumulação de Tau em Tauopatias. Durante o desenvolvimento do olho de *Drosophila*, a expressão ectópica de hTau induz um olho rugoso, em consequência da neurotoxicidade, e que pode ser utilizado para identificar modificadores do fenótipo. A fosfatase codificada por *string/cdc25* (*stg*), um regulador universal da transição G2/M, foi previamente identificada como um supressor da neurotoxicidade associada à expressão da proteína Tau. No entanto, os mecanismos moleculares que estão na base desta interação genética nunca foram estudados, desconhecendo-se também se a atividade fosfatase de Stg/Cdc25 é essencial para modular os níveis de fosforilação de Tau. O objetivo deste projeto consistiu em elucidar os mecanismos que se encontram na base da interação Stg-Tau. Para alcançar este objectivo, usou-se uma abordagem genética e bioquímica. Os resultados obtidos sugerem que Stg é um possível modulador da neurotoxicidade de Tau.





**keywords**

*Drosophila*, Tau, neurofibrillary tangles, String/Cdc25, Tauopathies, Neurodegeneration

**abstract**

Tauopathies, including Alzheimer disease (AD), are characterised by the intracellular deposition of neurofibrillary tangles (NFTs), which are mainly composed by hyperphosphorylated forms of the microtubule-associated protein Tau. The molecular mechanisms of Tau-induced neurotoxicity are still unclear. *Drosophila melanogaster* has been used to model several human neurodegenerative diseases, including tauopathies. In this work, the *Drosophila* visual system has been used to elucidate the steps that may lead to accumulation of Tau in Tauopathies. The ectopic expression of hTau during *Drosophila* eye development induces a rough eye that can be used as readout of Tau neurotoxicity. The phosphatase encoded by *string/cdc25* (*stg*), the universal G2/M regulator, was previously identified as a strong suppressor of Tau-associated neurotoxicity. Yet, the molecular mechanisms that underlie this genetic interaction have never been addressed. Whether the phosphatase activity of Stg/Cdc25 is essential to modulate Tau phosphorylation levels also remains unknown. The aim of this project was to elucidate the mechanisms that underlie Stg-Tau interaction, using a genetic and biochemical approach. The results suggest that Stg is a potential modulator of Tau neurotoxicity.







Os resultados obtidos no âmbito deste trabalho foram apresentados em encontros científicos e fazem parte do manuscrito em preparação.

**Apresentações sob a forma de poster:**

- Gonçalves R., **Monteiro D.**, Pinho M., Lopes C. S. (2015). The role of String/Cdc25 phosphatase in neurodevelopment: an entry point to disease. 24<sup>th</sup> European *Drosophila* Research Conference. Heidelberg, Germany.
  
- **Monteiro D.**, Lopes C.S. (2014). Stg/Cdc25 phosphatase as a potential modulator of Tau neurotoxicity. I3S 4<sup>th</sup> Annual Meeting. Póvoa de Varzim, Portugal.









## Índice Geral

Agradecimentos .....	viii
Resumo .....	ix
Abstract .....	x
<b>1 Introdução .....</b>	<b>9</b>
1.1 Agregação de proteínas e neurodegeneração .....	9
1.2 Tauopatias.....	9
1.3 A Proteína Tau .....	11
1.3.1 A estrutura de Tau .....	11
1.3.2 Função de Tau .....	12
1.3.3 Modificações na atividade de Tau .....	14
1.4 <i>Drosophila</i> como modelo de tauopatia.....	15
1.4.1 O olho de <i>Drosophila</i> como modelo para estudar neurodegeneração .....	16
1.4.2 As evidências de neurodegeneração em <i>Drosophila</i> .....	19
1.5 O estudo da fosfatase String na neurodegeneração .....	21
1.6 Objetivo do trabalho .....	22
<b>2 Materiais e Métodos.....</b>	<b>23</b>
2.1 Manutenção de estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i> e genética .....	23
2.1.1 Linhas de <i>Drosophila melanogaster</i> usadas .....	23
2.1.2 Meio de cultura de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	25
2.1.3 Manutenção e cruzamento de estirpes de <i>Drosophila</i> .....	25
2.2 O sistema Gal4/ UAS e as suas variantes.....	26
2.3 Imunofluorescência em cérebros e discos imaginais de larvas de de <i>Drosophila</i> na 3 <sup>o</sup> fase larvar .....	26
2.4 Microscopia.....	28
2.4.1 Análise de olhos adultos de <i>Drosophila</i> .....	28
2.5 Quantificação dos extratos de proteína Tau .....	29
2.5.1 Preparação e quantificação de extratos proteicos .....	29







2.5.2	Eletrforese e deteção de proteínas .....	30
-------	--	----

### **3 Resultados..... 31**

#### **3.1 Fenótipo em olhos adultos de *Drosophila* associados com a expressão de diferentes isoformas de hTau ..... 31**

3.1.1	Consequências da expressão de hTau na organização da retina de <i>Drosophila</i> .....	34
3.1.2	Análise da projeção dos neurónios para o lóbulu cerebral após a expressão de hTau ..	34
3.1.3	Análise de marcadores do ciclo celular em neurónios que expressam hTau.....	36
3.1.4	Avaliação de morte celular em neurónios que expressam hTau. ....	39

#### **3.2 Análise do efeito supressor de Stg no fenótipo induzido por Tau humana 40**

3.2.1	A atividade de fosfatase de Stg é requerida para a supressão da toxicidade associada com a expressão de hTau .....	42
3.2.2	A redução dos níveis de Stg potencia o fenótipo promovido por hTau. ....	43
3.2.3	A expressão de Stg reverte a desorganização dos omatídeos induzida pela expressão hTau	44
3.2.4	A morfologia dos axónios dos fotorreceptores é recuperada na presença de Stg .....	45
3.2.5	A expressão de Stg reverte os defeitos no ciclo celular causados por hTau .....	46
3.2.6	Avaliação de morte celular numa condição de co-expressão de hTau e Stg.....	48
3.2.7	Análise dos níveis de fosforilação de hTau.....	49
3.2.8	Função de Stg quando o fenótipo já está estabelecido .....	51

### **4 Discussão ..... 53**

### **5 Conclusões Finais e Perspetivas futuras ..... 57**









## Índice de Figuras

Figura 1 -Isoformas de Tau humana. ....	13
Figura 2- Localização dos microtúbulos nos neurónios e a sua interação com Tau. ....	14
Figura 3 O ciclo de vida de Drosophila.....	17
Figura 4 A estrutura e desenvolvimento do olho de Drosophila. ....	19
Figura 5 Transgenes suprimem ou aumentam a toxicidade de h Tau na retina... 22	
Figura 6 - Caracterização do fenótipo associado à expressão das diferentes isoformas de Tau (2N4R) no olho de Drosophila.....	34
Figura 7 - Análise da organização dos omatídeos do olho de Drosophila após expressão de hTau.....	35
Figura 8 - Morfologia e projeção dos axónios dos fotoreceptores em discos imaginais selvagem e expressão ectópica de hTau. ....	36
Figura 9 - Análise de ciclina B em neurónios que expressam hTau.....	38
Figura 10 - Análise de marcador mitótico PH3 em discos imaginais do olho, que expressam hTau.....	39
Figura 11 – Análise de células em fase S com a marcação de BrdU. ....	40
Figura 12 - Análise de morte celular em discos imaginais de Drosophila que expressam hTau.....	41
Figura 13 - Caracterização do fenótipo de sobre-expressão de Stg no olho de Drosophila.. ....	42
Figura 14 - A sobre-expressão de Stg durante o desenvolvimento do olho de Drosophila reverte o fenótipo causado por expressão ectópica de hTau.....	42
Figura 15 - A actividade fosfatase de Stg é requerida para a supressão do fenótipo causado pela expressão de hTau.....	43
Figura 16 - Na ausência de expressão de Stg o fenótipo é mais severo.....	44
Figura 17 - String tem a capacidade de reverter o fenótipo ao nível da organização dos fotoreceptores.....	45
Figura 18 - A morfologia e projeção dos neurónios dos fotoreceptores é restabelecida pela ação de Stg. ....	46
Figura 19 - Inexistência de acumulação de ciclina B nos fotorreceptores deve-se à expressão de Stg.....	47







Figura 20 - Stg tem capacidade para reduzir acumulação de PH3 .....	47
Figura 21 – Stg tem a capacidade de reduzir acumulação de BrdU.....	48
Figura 22 - Análise de morte celular após a expressão ectópica de hTau e Stg em discos imaginais de Drosophila.....	49
Figura 23 – Os níveis de fosforilação de hTau.. .....	52
Figura 24 – Análise do efeito da expressão de Stg quando a doença já esta estabelecida.....	52









## Índice de tabelas

Tabela 1: Linhas de <i>Drosophila</i> utilizadas neste estudo.	24
Tabela 2: Receita do meio de cultura.	25
Tabela 3: Anticorpos primários e secundários usados neste estudo.	28







## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**A $\beta$**  – beta amiloide

**A** – ampère

**Ala** - alanina

**BrdU** – 5-bromo-2'deoxyuridine

**Casp 3** – Caspase 3

**Cdc25** – Cell division cycle 25

**CDKs** – cinases dependentes de ciclinas

**CD8** – Cluster of differentiation 8

**CycB** – ciclina B

**DA** – Doença de Alzheimer

**DAB** – 3, 3'-Diaminobenzidine

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**Elav** – Embryonic lethal abnormal vision

**FTD-17** – Demência fronto-temporal associada ao cromossoma 17

**Gal4** – Galactose-responsive transcription factor 4

**GFP** – Green fluorescent protein

**GMR** – Glass multimer reporter

**HRP** – Horseradish peroxidase

**hTau** – Tau humana

**kDa** - kilodalton

**L3** – Terceira fase larvar

**MAPT** – Proteína Tau associada a microtúbulos

**MT** – Microtúbulos

**NFTs** – Agregados neurofibrilares



**nm**- nanómetro

**µl**- microlitros

**PHFs** - Filamentos helicoidais emparelhados

**PH3** – Histona 3

**PPase** - fosfatase

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RNAi** - Ácido ribonucleico de interferência

**rpm** – rotação por minuto

**SDS** – Sodium dodecyl sulfate

**SDS-PAGE**- Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**Ser** – serina

**SM** – Sulco morfogénico

**SNC** – Sistema nervoso central

**Stg** – String

**UAS** – Upstream Activating Sequence

**V** - volt

**W** - white

**WB** – western blot

**WT** – Wild-type





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS E NEURODEGENERAÇÃO

A agregação de proteínas é um processo complexo que envolve a formação de oligómeros intermediários que, subsequentemente, podem culminar na formação de fibras agregadas. Estas pequenas estruturas estáveis e não fibrilares comprometem tanto a transmissão neuronal como também o funcionamento das sinapses (*Schulz-Schaeffer, 2010*). Quanto formam inclusões e depósitos intra e extracelulares tornam-se tóxicas e acabam por induzir morte neuronal (*Ross e Poirier, 2004; Lansbury e Lashuel, 2006*). Estudos recentes sugerem que a dispersão de proteínas incorrectamente processadas é um dos fatores responsáveis pela progressão da doença de Alzheimer (AD) (*Frost e Diamond, 2010*). A deposição do péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) e de Tau é a principal causa conhecida para a neurodegeneração observada na AD (*Hardy e Allsop, 1991*). A modificação pós-traducional das proteínas assim como o stress oxidativo (*Sultana e Butterfield, 2010*) constituem alterações que podem facilitar a sua agregação e precipitação.

## 1.2 TAUOPATIAS

As tauopatias são um grupo de doenças neurodegenerativas caracterizadas pela presença de agregados intra-celulares e insolúveis maioritariamente formados por formas hiperfosforiladas da proteína Tau, uma proteína associada aos microtúbulos (MAPT) (*Jellinger, 2012*). Este grupo inclui doenças em que a deposição de Tau é a principal característica neuropatológica (tais como a demência frontotemporal, doença de Pick, degeneração corticobasal, paralisia supranuclear progressiva), assim como doenças em que a deposição de Tau coincide com outras patologias (AD, doença de Parkinson, a doença de Creutzfeldt-Jakob, entre outras) (*Jellinger, 2012*). Embora a composição dos agregados, as regiões do cérebro onde se depositam e, os padrões sintomáticos sejam distintos consoante a tauopatia, os mecanismos celulares e moleculares associados à hiperfosforilação, enrolamento

anormal, agregação e formação das inclusões de Tau no cérebro são comuns (Jellinger, 2012).

A tauopatia mais comum é a AD, que se caracteriza pela perda progressiva de memória, culminando em disfunção cognitiva grave e morte. Esta doença é inicialmente caracterizada por alterações comportamentais e diminuição da capacidade de realizar atividades diárias. Com a progressão da doença, os sintomas clínicos refletem declínio cognitivo e comportamental principalmente a nível da linguagem, aprendizagem, raciocínio, atenção e resolução de problemas (Walsh e Selkoe, 2004). A nível celular, destacam-se a formação e deposição de placas neuríticas ricas em peptídeo  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), e emaranhados de tau (NFTs) e morte neuronal. As placas A $\beta$  são acumulações extracelulares de proteína A $\beta$ , produzidas por clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Já os NFTs são deposições intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada (Shulman e Feany, 2003). Estes agregados filamentosos são constituídos por uma porção equimolar das isoformas de Tau 3R e 4R (Shulman e Feany, 2003). Estes depósitos intracelulares podem ser distinguidos em filamentos helicoidais emparelhados (PHFs) ou filamentos em linha reta. Os PHFs são compostos por dois filamentos enrolados em espiral, enquanto os filamentos retos têm uma forma helicoidal (Shulman e Feany, 2003).

Tanto as modificações pós-traducionais acima mencionadas, assim como mutações ao longo do gene são factores que tornam propícia a agregação da proteína Tau. Várias mutações no gene *tau* foram associadas a formas específicas da demência, nomeadamente as mutações R406W e V337, que estão na origem da demência Fronto-Temporal associada ao cromossoma 17 (FTD-17) e que tornam tau mais propensa para agregar (van Swieten e Spillantini, 2007).

A hiperfosforilação de Tau ocorre em resíduos de aminoácidos com cadeias laterais de maiores dimensões que, em condições fisiológicas normais, não se encontram fosforilados, (Hanger et al, 2009). Como anteriormente mencionado, a fosforilação anormal de Tau leva ao comprometimento do transporte axonal e perda sináptica e contribuiu para a neurodegeneração (Morfini et al. 2009; Terry et al. 1991).

Vários estudos abordaram a correlação entre hiperfosforilação de Tau e formação dos NFTs com a progressão de doenças neurodegenerativas, como o AD.

A evidência genética para o papel causal de Tau na neurodegeneração foi obtida pela identificação de mutações dominantes no gene Tau, responsáveis pela FTD-17 (Hutton *et al.*, 2001).

## 1.3 A PROTEINA TAU

### 1.3.1 A estrutura de Tau

A proteína Tau pertence à família MAPT e é caracterizada pela capacidade de se associar e estabilizar os microtúbulos. Em 1975, Weingarten descreveu Tau como uma proteína termoestável capaz de se associar à tubulina e essencial para a adição de tubulina aos microtúbulos (MTs) (Weingarten *et al.* 1975). Em humanos, esta proteína é codificada por um gene localizado no braço longo do cromossoma 17 (17q21.1) (Himmler *et al.*, 1989). O transcrito primário de Tau contém 16 exões: a maioria são constitutivamente expressos; os exões 2, 3, e 10 resultam de “splicing” alternativo.

É através de “splicing” alternativo que são geradas as diferentes isoformas de Tau, que diferem no número de inserções N-terminal e C-terminal que possuem. Os exões 2 e 3 codificam 29 aminoácidos e a sua inserção dá origem ao domínio N-terminal da proteína, que integra o domínio de projecção. Este domínio interage com elementos do citoesqueleto e é responsável pelo espaçamento entre os MTs nos axónios. Foi sugerido que o tamanho do domínio de projecção determina o diâmetro axonal (Chen *et al.*, 1992). Sabe-se ainda que este domínio está também envolvido em vias de transdução de sinal. A inexistência de inserção N-terminal, corresponde a 0N, enquanto que uma inserção N-terminal corresponde a 1N com o exão 2 presente, e por último duas inserções N-terminal corresponde a 2N com os exões 2 e 3 presentes. Por outro lado, o “splicing” alternativo do exão 10 origina as repetições observadas na região C-terminal, dando origem a isoformas de Tau que possuem 3 ou 4 repetições (3R e 4R) da região C-terminal (Fig. 1) (Andreadis *et al.*, 1992). Este domínio C-terminal é capaz de se associar aos MTs, regular a sua taxa de polimerização, bem como na interação com outras proteínas, como a proteína fosfatase 2A (PP2A) e a presilina 1 (PS1) (Buée *et al.*, 2000)

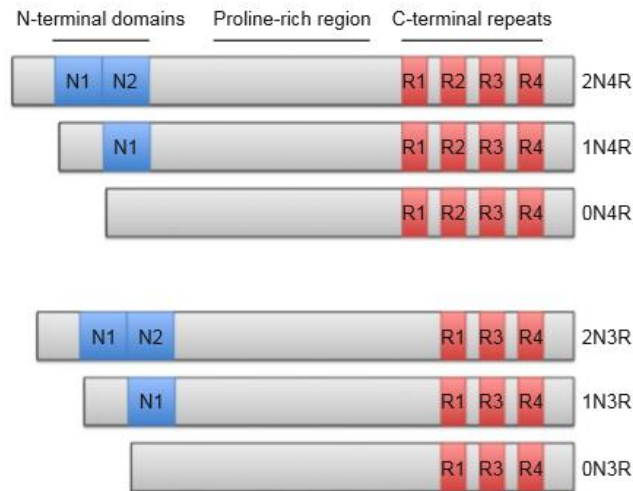


Figura 1 -**Isoformas de Tau humana.** O “splicing” alternativo gera seis isoformas de Tau que variam entre 352 e 441 aminoácidos. Essas variantes diferem no número de domínios N-terminais (2N, 1N ou 0N- azul) ou repetições C-terminal (3R ou 4R – vermelho) (adaptado de *Buée et al., 2000*).

A expressão das diferentes isoformas através de “splicing” alternativo é regulada durante o desenvolvimento, sendo que a isoforma 0N3R é expressa na fase embrionária e durante a fase adulta (*Buée et al., 2000*). No entanto, a expressão das restantes 5 isoformas de Tau no sistema nervoso central (SNC) ocorre especificamente durante a fase adulta (*Buée et al., 2000*).

### 1.3.2 Função de Tau

Embora as MAPTs possam estar presentes em diversos tipos celulares, em humanos, Tau é expressa predominantemente nos neurónios (*Buée et al. 2000*). Em células da glia, Tau é encontrada principalmente sob a forma de agregados. Dentro dos neurónios, Tau localiza-se principalmente nos axónios e a sua principal função é associar-se aos MTs, permitindo a interacção com outros elementos da célula, como o corpo celular e dendrites (*Kanai et al., 1992*). A interacção de Tau com os filamentos de actina e espectrina permite a interacção dos MTs com outros componentes celulares como os neurofilamentos, podendo restringir a flexibilidade dos microtúbulos (*Matus, 1994*) (Fig. 2).

Através das suas repetições no C-terminal, a Tau tem a capacidade de se ligar aos MTs promovendo a polimerização da tubulina, crescimento de neurites e transporte axonal. Sendo a inter-região R1-R2 exclusiva para Tau R4, isto confere a esta isoforma um significativo aumento da afinidade de ligação aos microtúbulos comparando com a isoforma 3R (Goode *et al.*, 1997). Além disso, Tau é essencial para a formação e manutenção de neurites *in vitro* (Yoshizaki *et al.*, 2004).

O crescimento das neurites é diretamente regulado por alterações na expressão de Tau em neurónios de ratos *in vitro* (Caceres *et al.*, 1991). Tem vindo a ser demonstrado que a fosforilação também pode ter um papel importante na interação de Tau e cinesinas e na sua capacidade de se ligar aos microtúbulos. (Cuchillo-Ibanez *et al*, 2008; E.-M. Mandelkow *et al*, 2003).

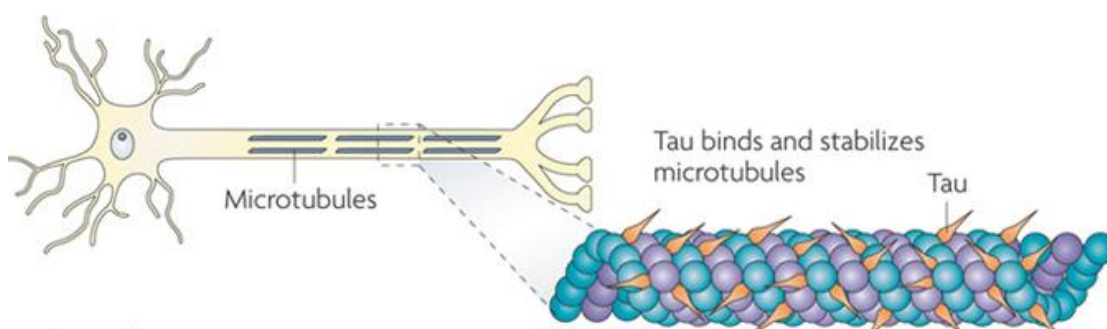


Figura 2 – **Localização dos microtúbulos nos neurónios e a sua interação com Tau.** Os microtúbulos formam filamentos ao longo dos axónios, que são estabilizados pela ligação da proteína Tau. (adaptado de Brumden *et al*, 2009).

### 1.3.3 Modificações na atividade de Tau

A atividade fisiológica de Tau e a ligação aos MTs é regulada especificamente por fosforilação (*Lindwall e Cole, 1984*). O desequilíbrio entre as atividades das cinases e fosfatases que regulam a fosforilação de Tau tem sido descrito como estando na origem de uma fosforilação anormal que contribui para agregação de Tau (*revisto em Martin et al., 2013*). Várias hipóteses têm sido levantadas para justificar a hiperfosforilação de Tau. Estudos em cérebros de doentes de AD revelaram a co-localização de várias cinases com os agregados de Tau, nomeadamente a GSK3- $\beta$ , JNK, CK1, PKA, PKN Fyn e c-Abl (*revisto em Martin et al., 2013; Liu et al., 2005*). Fosfatases como a PP2A, PP1 e PP5 são expressas em cérebros adultos saudáveis e desempenham funções essenciais em processos como a neurogênese e a plasticidade sináptica (*revisto em Tweedie- Cullen et al., 2010*). Entre elas, PP2A é a que possui maior atividade em cérebros humanos, aproximadamente 71% (*revisto em Martin et al., 2013*). Contudo, vários estudos têm demonstrado que a redução da atividade de fosfatases em cérebros com AD: PP2A parece reduzir para 50%, enquanto que as actividades de PP1 e PP5 reduzem para 20%. Deste modo, alterações ao nível da atividade de fosfatases que controlam Tau tornam-se numa outra fonte de hiperfosforilação e subquente agregação (*revisto em Martin et al., 2013; Gong et al., 1993*). Como consequência de uma fosforilação anormal, a conformação de Tau é modificada, implicando a sua desconexão dos MTs e a subsequente destabilização dos mesmos. Uma vez que o transporte axonal é dependente de uma estrutura de MTs estável, esta desconexão terá consequências sobre o transporte axonal e sinapses (*Hoover et al, 2010*)(*Amniai et al, 2009*), (*Dixit et al, 2008*).

Para além da fosforilação, Tau sofre outras alterações pós-traducionais que resultam na formação de NFTs (*Buée et al, 2000; Gong et al, 1993*). Um desses processos é a glicosilação, que induz a formação de PHFs e os estabiliza durante a doença (*Bancher et al, 1991*). Enquanto a N-glicosilação de Tau ocorre apenas durante a doença estabilizando a formação dos PHFs e a O-glicosilação modula a função de Tau em neurónios saudáveis (*Bancher et al., 1991*). Além disso, quando estabelecidos os PHFs, a Tau é ubiquitinada para ser degradada. A ubiquitinação de

Tau parece ser uma resposta da célula para eliminar os PHFs tóxicos (*Bancher et al., 1991*).

A agregação de Tau na forma PHF é uma das causas de morte celular (*Bancher et al., 1991*). *Bancher et al.* (1991) demonstrou também que não são necessários NFTs para a disfunção e toxicidade neuronal induzida por Tau (*Bancher et al., 1991*). Na maior parte dos modelos, como por exemplo na *Drosophila*, os NFTs ainda não estão formados quando se observa neurodegeneração (*Cowan e Mudher, 2013*).

#### 1.4 DROSOPHILA COMO MODELO DE TAUOPATIA

*Drosophila melanogaster* é um dos modelos usados para estudar os mecanismos responsáveis por diversas patologias, como é o caso das doenças neurodegenerativas (*Fortini e Bonini, 2000*). Para além disso, aproximadamente 75% dos genes associados a doenças humanas têm homólogos em *Drosophila* (*Reiter et al., 2001*), e vários aspetos a nível celular e molecular que são conservados. Isto sugere que mecanismos moleculares subjacentes a doenças possam ser conservados em *Drosophila*. Outros motivos de relevância que estão na base de se estudar neurodegeneração em *Drosophila* são o facto de o cérebro deste organismo ser organizado em diversas áreas com funções específicas, de forma similar ao observado no cérebro humano. O facto de ser fácil de manter em laboratório, ter um ciclo de vida cuja duração varia com a temperatura, não requer muitos custos e apresentar um período de geração rápido (cerca de 10 dias) (Fig. 3) (*Reiter et al., 2001*).

Existe uma grande variedade de ferramentas genéticas muito úteis na investigação, aplicáveis à *Drosophila*, como o sistema Gal4/UAS (*Duffy, 2002*). Através do sistema GAL4/UAS é possível induzir a expressão de genes específicos de uma forma espacial e temporalmente controlada. Para tal, são necessárias duas linhas de moscas diferentes: uma das linhas transporta o factor de transcrição da levedura, GAL4, que está sob o controlo de um promotor específico; a outra linha transporta o gene de interesse, que está fundido a montante da sequência UAS, onde o GAL4 se ligará. Deste modo, na progenia resultante do cruzamento destas duas

linhas, GAL4 liga-se a UAS ativando a expressão do gene de interesse, que reflete o padrão de expressão do GAL4. Várias empresas fornecem uma vasta coleção de linhas, desde linhas de Gal4 específicas para determinados tecidos ou tipo celulares, linhas de RNAi e linhas mutantes (Duffy, 2002). Outra vantagem deste modelo consiste na possibilidade de realizar estudos genéticos com o objetivo de caracterizar genes a nível funcional (Li et al, 2007).

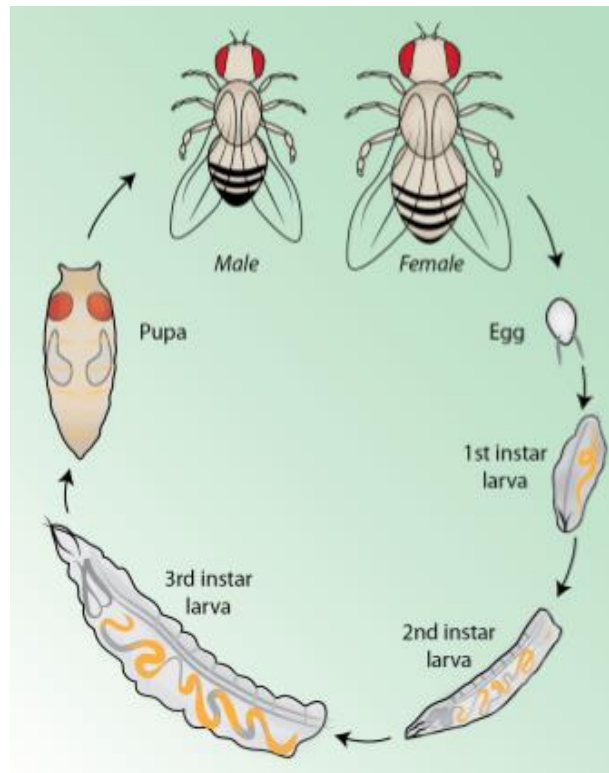


Figura 3 O ciclo de vida de *Drosophila*. O desenvolvimento desde o ovo-fertilizado para uma mosca adulta decorre num período aproximado de 10 dias, a 25°C. Após a eclosão, as larvas passam por 3 fases antes de atingir a forma de pupa. Durante a fase de pupa esta é sujeita à metamorfose que posteriormente dá origem à mosca adulta. ( Reiter et al, 2001)

#### 1.4.1 O olho de *Drosophila* como modelo para estudar neurodegeneração

O olho composto de *Drosophila* é um neuroepitélio que provém de um complexo primordial designado disco imaginal (Dill et al, 1993). A retina é composta por 750-800 unidades idênticas chamadas omatídeos, que são organizados numa matriz hexagonal regular. Cada omatídeo contém oito fotorreceptores (R1-R8), quatro



células acessórias e duas células pigmentares primárias dispostas num padrão estereotipado, e estas unidades são rodeadas por uma rede de células pigmentares secundárias e terciárias. Os fotorreceptores projetam axónios no lóbulo ótico do cérebro, onde formam projeções retinotópicas em dois gânglios separados, a lâmina e a medula (*Clandinin e Zipursky, 2000*). Os fotorreceptores enervam camadas distintas nos gânglios óticos. Neurónios R1-R6 formam conexões sinápticas no primeiro gânglio ótico, a lâmina. Os axónios R7 e R8 projetam através da lâmina para a medula, terminando em duas camadas separadas.

A formação e diferenciação dos fotorreceptores iniciam-se durante a terceira fase larvar (*Ready et al, 1976*) e envolve uma rede de fatores de transcrição conhecidos, como os genes de determinação da retina (*Silver e Rebay, 2005*). A primeira evidência dessa diferenciação consiste no aparecimento de uma constrição apico-basal, o sulco morfogenético (SM), na margem posterior do disco imaginal do olho (*Ready et al, 1976*). Este sulco avança progressivamente através do epitélio do disco do olho em direção à região anterior durante um período de 2 dias. Células anteriores ao SM são indiferenciadas e proliferam, enquanto as células posteriores ao SM são células diferenciadas, onde se incluem os fotorreceptores (*Tomlinson e Ready, 1987*) (Fig. 4). Porém, as células que se encontram posterior ao SM estão paradas em G1 do ciclo celular. O R8 é o primeiro fotorreceptor a ser especificado, e quando diferenciado recruta o pre-cluster (R2/R5) e depois (R3/R4) promovendo a re-entrada no ciclo celular na segunda onda mitótica das células que circundam o pre-cluster originando os restantes tipos celulares que constituem o omatídeo. O recrutamento celular é igualmente sequencial: primeiro R1/R6 e depois R7. Durante a fase de pupa surgem ainda as células cone e uma matriz de células pigmentares primárias, secundárias, terciárias, e células mecano-sensoriais (*Tomlinson e Ready, 1987; Wolff e Ready, 1991*).

No olho de *Drosophila*, os axónios dos fotorreceptores estabelecem a conexão direta entre o sistema visual e o cérebro. A expressão da proteína Tau humana no olho de *Drosophila* resulta num fenótipo característico, facilmente detectável (*Jackson et al, 2002*).

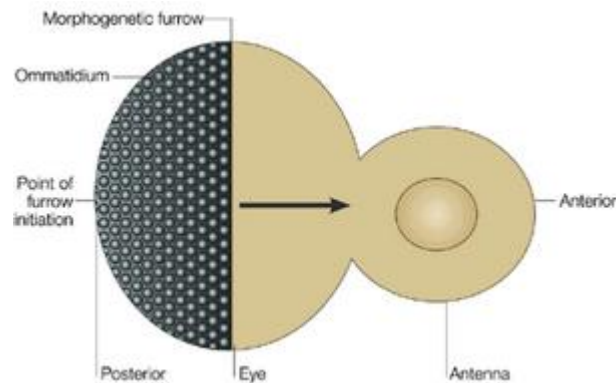


Figura 4 A estrutura e desenvolvimento do olho de *Drosophila*. O disco imaginal do olho é dividido em duas regiões: posterior e anterior. O SM avança ao longo do disco da região posterior para anterior. As células pós SM encontram-se diferenciadas formando os ommatídeos que são compostos por fotorreceptores. (adaptado de Tomlinson e Ready, 1987)

No ciclo celular, a síntese de DNA ocorre durante a fase S e a mitose na fase M, existindo dois intervalos entre estas duas fases, G1 e G2, respectivamente. Entre estas duas divisões as células encontram-se em G0. Geralmente, os neurónios pós-mitóticos permanecem em G0. Assim sendo, é possível identificar cada uma destas fases utilizando marcadores de ciclo celular. A histona H3 marca a fase M onde ocorre a condensação dos cromossomas. 5'-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) marca células que se encontrem na fase S, durante a qual ocorre síntese de DNA. As cinases dependentes de ciclinas de (CDKs), que catalisam as reações essenciais para a progressão do ciclo celular, mais especificamente a Cdk1/ciclina B que regula a progressão da mitose.

Tendo em conta os estudos já realizados sobre a re-entrada em ciclo na condição de hTau hiperfosforilada, sugeriu-se que a hiperfosforilação de hTau pode ser a causa da desregulação do ciclo celular, havendo células na segunda onda mitótica que permanecem em mitose e células diferenciadas que voltam a re-entrar em ciclo (Yang *et al*, 2003). Por sua vez, esta causa pode levar à morte celular e ser mais uma das razões para neurodegeneração em tauopatias (Yang *et al*, 2003). Outros estudos mostraram ainda que as células podem permanecer em mitose

durante alguns meses ou não completarem o ciclo celular (*Khurana e Feany, 2007*). Estas observações sugerem que o fato de haver células em mitose não significa que estejam a re-entrar no ciclo celular.

Deste modo, os modelos de tauopatias foram criados com o intuito de expressar hTau em fotorreceptores e neurónios de *Drosophila* (*Bonini e Fortini, 2003*). A expressão de hTau neste modelo leva a um fenótipo conhecido por olho rugoso. Este fenótipo é caracterizado por uma redução aparente no tamanho do olho e pela desorganização da retina (*Bonini e Fortini, 2003*).

#### 1.4.2 As evidências de neurodegeneração em *Drosophila*

Os modelos de *Drosophila* produzidos até agora têm vindo a centrar-se na identificação de genes de *Drosophila*, que sejam capazes de modificar a toxicidade da hTau (*Chatterjee et al, 2009; Shulman e Feany, 2003; Wittmann et al, 2001; Jackson et al, 2002; Chau et al, 2006*). As causas de neurodegeneração induzidas pela expressão de hTau em *Drosophila* tem sido investigada recentemente (*Shulman e Feany 2003; Wittmann et al, 2001; Jackson et al, 2002*). Alguns estudos revelaram que genes endógenos de *Drosophila* que codificam para, principalmente, proteínas-quinases e fosfatases são capazes de potenciar ou suprimir a toxicidade induzida pela expressão de hTau (*Shulman e Feany, 2003*).

*Wittmann et al (2001)*, demonstraram, através de um modelo de tauopatia *in vivo*, que pode haver neurodegeneração sem que haja formação de NFTs. Na verdade, este estudo demonstrou também que a expressão da proteína Tau humana 0N4R no SNC da mosca conduz a vacuolização e progressiva degeneração dos neurónios do córtex sem a formação de agregados de Tau. Além disso, a expressão de formas mutadas de Tau (R406W e V337M) associadas a FTDP-17, aumenta a toxicidade de hTau em moscas, mostrando que a neurodegeneração era mais grave no cérebro da mosca (*Wittmann et al, 2001*). A mutação R406W também causa o aumento da degeneração observada no olho e na fosforilação de Tau por cinases endógenas nos resíduos T181, S202, T205, T231 e S235 (*Chau et al, 2006*).

A facilidade de manipulação genética em *Drosophila* permite a investigação dos efeitos das mutações sobre a fosforilação de Tau e a toxicidade da hTau em moscas.

Por exemplo, mutações pontuais na isoforma 0N4R, que impedem a fosforilação, não aumentam a neurodegeneração causada por Tau tipo selvagem no olho da mosca. No entanto, a presença de mutações na maioria dos locais de fosforilação conduz à diminuição da toxicidade de Tau. Estes factos sugerem que os locais de fosforilação contribuem, de forma isolada, para a toxicidade da hTau. Em contraste, as mutações de locais específicos demonstraram que a fosforilação de S396 e S404 pode contribuir substancialmente para a fosforilação Tau *in vivo* (Steinhibl *et al.*, 2007). Além disso, algumas proteíno-cinases de *Drosophila* são necessárias para a neurodegeneração mediada por Tau, incluindo Shaggy e PAR-1, os órtologos de *Drosophila* GSK3 $\beta$  e EMK/MARK, respetivamente (Steinhibl *et al.*, 2007). Estas proteíno-cinases são capazes de aumentar a toxicidade produzida pelas isoformas de hTau 2N4R, 0N4R e da mutação R406W no olho de *Drosophila*. Shaggy promove a fosforilação de Tau nos resíduos: S202, T212, S214, T231, S235, S396 e S404. Enquanto PAR-1 para além destes resíduos de aminoácidos também tem fosforila o resíduo S262 (Steinhibl *et al.*, 2007). Através de análise de formas mutantes de Tau, os resíduos S262 e S396 foram identificados como sendo os principais locais de fosforilação pela PAR-1 (Jackson *et al.*, 2002). Além disso, a expressão de Cdk5, das proteíno-cinases JNK e PKA promove o aumento da toxicidade causada por hTau humana, observando-se também que o grau de fosforilação de Tau é superior (Steinhibl *et al.*, 2007).

Outros estudos demonstraram que a toxicidade da hTau em *Drosophila* é determinada não só por hiperfosforilação e formação de NFTs, mas também pela alteração das propriedades de ligação aos MTs (Talmat-Amar *et al.*, 2011). Como mencionado anteriormente, a fosforilação regula a associação de Tau aos MTs. Formas hiperfosforiladas de Tau têm menor afinidade para com os MTs (Shulman e Feany, 2003). Por outro lado, um estudo em *Drosophila*, utilizando a isoforma de hTau 0N4R com 14 mutações S/T, demonstrou que uma isoforma hipofosforilada de Tau afecta o transporte axonal, levando a uma redução no número de vesículas, bem como da sua mobilidade (Talmat-Amar *et al.*, 2011). Como referido anteriormente, a fosforilação é um fator determinante na ligação de Tau aos MTs (Talmat-Amar *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, para o transporte axonal. Tais observações têm motivado para identificar as cinases e fosfatases responsáveis por modular a

fosforilação de Tau em AD e doenças relacionadas (Tenreiro *et al*, 2014). Em conclusão, o uso do olho de *Drosophila* constitui um bom modelo para o estudo de cinases e fosfatases capazes de modular a neurodegeneração provocada pela atividade de Tau.

## 1.5 O ESTUDO DA FOSFATASE STRING NA NEURODEGENERAÇÃO

O estudo de Schulman & Feany (2003) demonstrou que em *Drosophila* a sobreexpressão de uma isoforma de hTau mutada (hTau<sup>V337M</sup>) causa aumento da fosforilação de Tau e a formação de agregados (Shulman e Feany, 2003). A expressão desta forma mutada de Tau induz um fenótipo na retina de *Drosophila*, caracterizado pela redução aparente do tamanho do olho e rugosidades na retina (Fig. 5). Este fenótipo foi usado num *screen* para identificar possíveis supressores e potenciadores do fenótipo de Tau. Um dos supressores identificados foi *string* (*stg*) o homólogo de *cdc25*, regulador universal da transição G2/M em *Drosophila* (Fig. 5) (Shulman e Feany, 2003).

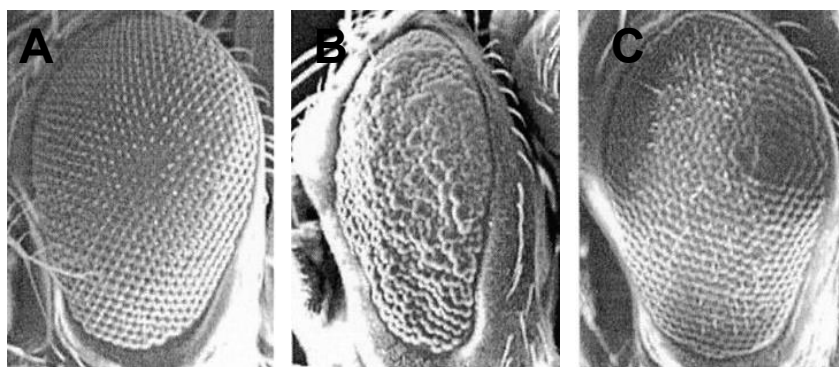


Figura 5 - Transgenes suprimem ou aumentam a toxicidade de hTau na retina. Olho selvagem com a forma regular dos omatídeos e superfície lisa (A). O fenótipo olho rugoso resultante da expressão da forma mutada de hTau (Tau<sup>V337M</sup>) com GMR-G4 (B). A expressão ectópica de Stg reverte a toxicidade provocada pela expressão hTau (C). (Adaptado de Shulman e Feany, 2003)

Em células de mamífero, esta família de fosfatases compreende 3 isoformas: Cdc25A; Cdc25B e Cdc25C cuja função é conservada. As Cdc25 promovem a activação das CDKs por desfosforilação de locais inibitórios compostos por resíduos de tirosina e

treonina. No final de G2, Cdc25 desfosforila tais resíduos de CDK1 do complexo CDK1/ciclina B, promovendo a entrada em mitose. A expressão e actividade de String/Cdc25 tem sido descrita em cérebros adultos mas a sua função nunca foi estudada num contexto não-proliferativo.

## 1.6 OBJETIVO DO TRABALHO

Estudos anteriores demonstraram que a Stg/Cdc25 tem capacidade de reverter o fenótipo resultante da expressão da isoforma de Tau mutada, Tau<sup>V337M</sup>, (*Shulman e Feany, 2003*). O nosso estudo tem como objetivo avaliar o efeito repressor de Stg/Cdc25, em células diferenciadas, utilizando uma isoforma de hTau selvagem.

O principal objetivo deste estudo foi perceber a interação genética entre hTau e Stg, e o papel de Stg como regulador da atividade e toxicidade de Tau, usando como modelo o sistema visual de *Drosophila*. Para alcançar este objetivo utilizámos uma abordagem genética e bioquímica. Em última análise pretendemos utilizar este modelo *in vivo* para determinar a função de Stg na fosforilação de Tau e verificar se esta fosfatase modula a toxicidade provocada por esta proteína. Sendo um possível alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas como o AD.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MANUTENÇÃO DE ESTIRPES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* E GENÉTICA

#### 2.1.1 Linhas de *Drosophila melanogaster* usadas

Todas as linhas usadas neste trabalho, foram adquiridas a partir da *Bloomington Drosophila Stock Center*, estão descritas abaixo na Tabela 1. *w<sup>1118</sup>* e Oregon R foram usadas como linhas-controlo ao longo das experiências realizadas. Como posteriormente referenciado ao longo das experiências foi usada a linha transgénica *Elav-Gal4 ; GMR::hTau*. Para expressão ectópica de *stg* foi usada a linha *UAS-stg* no cromossoma 3 e *UAS-stg.HA* no cromossoma 2. Os marcadores genéticos e balanceadores de cromossomas usados estão descritos na base de dados Flybase (<http://flybase.org/>).

Genótipo	Notas
<i>Oregon R</i>	Wild type
<i>w<sup>1118</sup></i>	Wild type
<i>Elav<sup>C155</sup>-Gal4; UAS-mCD8GFP</i>	
<i>GMR-G4; UAS-GFP</i>	
<i>w; P{UAS.Tau<sup>wt</sup>}</i>	hTau 2N4R; alelo selvagem
<i>W<sup>1118</sup>; P{GMR::hTau.<sup>P301L</sup>}</i>	hTau 2N4R com a mutação em P301L associada à Demência Fronto –Temporal associada ao cromossoma 17
<i>w; P{UAS-Tau} chr 2</i>	hTau 2N4R; alelo selvagem

<i>yw; P{UAS-Tau.<sup>S2A</sup>}1.62</i>	hTau 2N4R alteração de Ser por Ala nos resíduos S262A e S356A fosforilados por Par-1
<i>w; P{UAS-Tau.<sup>S2A</sup>}1.33</i>	hTau 2N4R alteração de Ser por Ala nos resíduos S262A e S356A fosforilados por Par-1
<i>w; {UAS-Tau.<sup>S11A</sup>}</i>	hTau 2N4R com 11 resíduos Ser fosforilados por Shaggy alterados para Ala.
<i>Elav-Gal4;GMR::hTau</i>	
<i>w; P{UAS-stg} chr2</i>	Transgene <i>string</i>
<i>w; P{UAS-stg} chr3</i>	Transgene <i>string</i>
<i>w; P{UAS-stg.Ha} chr2</i>	Transgene <i>string</i>
<i>w; Sp/Cyo; UAS-stgRNAi</i>	
<i>UAS-stg/Cyo;TubGal80/TM6B</i>	

Tabela 1: Linhas de *Drosophila* utilizadas neste estudo.



### 2.1.2 Meio de cultura de *Drosophila melanogaster*

Durante o decurso das experiências, todas as moscas foram mantidas em frascos com meio de cultura. A composição do meio e o modo de preparação encontram-se descritos na Tabela 2.

Volume: 7,5 L	Volume	Tempo	Temperatura (°C)
Açúcar	750 g	1h	110°C
Levedura	750 g		
Agar	56,3 g		
Farinha de milho	375 g	1h30min	110°C
Ácido Propiônico	37,5 ml		65°C
Nipagin	188 ml		

Tabela 2: Receita do meio de cultura.

Para além deste meio, foi utilizado um meio com menor teor de levedura, igualmente composto por agar, farinha de milho, farinha de soja, levedura, extrato de malte e açúcar.

### 2.1.3 Manutenção e cruzamento de estirpes de *Drosophila*

Os stocks de moscas foram mantidos a 18°C ou à temperatura ambiente, com ciclo de luz regulado. Os jovens adultos foram transferidos para novo meio cada 4 semanas. Os cruzamentos foram mantidos a 18°C ou 25°C (excepcionalmente a 29°C), e transferidos cada 2/3 dias, para garantir condições adequadas de crescimento.

O sexo das moscas pode ser facilmente distinguido, enquanto as moscas são anestesiadas com auxílio de difusores de CO<sub>2</sub>. As fêmeas geralmente são maiores

que os machos. No entanto, os machos apresentam um abdómen mais escuro que o das fêmeas, e também é mais arredondado. Para além disso, os machos apresentam outra característica que os distingue das fêmeas, os pentes sexuais (constituídos por pêlos) presentes nas patas dianteiras. Para todos os cruzamentos foi imprescindível a utilização de fêmeas virgens, pelo facto de o acasalamento irmã-irmão poder influenciar os resultados. As moscas virgens distinguem-se das restantes moscas pela sua cor de corpo pálida e a presença de uma mancha preta na parede abdominal ventral, o mecónio.

## **2.2 O SISTEMA GAL4/ UAS E AS SUAS VARIANTES**

O sistema Gal4/UAS foi usado para expressar hTau em diferentes tipos celulares que compõem a retina. Uma das variantes do sistema Gal4/UAS é o sistema Gal80, cuja temperatura é um fator determinante para a sua atividade. A 18°C, o Gal80 está ativo, impedindo a atividade do Gal4 e conseqüentemente a expressão do gene de interesse (*Sivanantharajah e Zhang, 2015*). No entanto, a 29°C, o Gal80 torna-se inativo permitindo a expressão do transgene sob a acção de Gal4. Particularmente neste trabalho, GAL80 foi utilizado para testar a atividade de Stg na reversão do fenótipo quando já está estabelecido.

## **2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CÉREBROS E DISCOS IMAGINAIS DE LARVAS DE DE *DROSOPHILA* NA 3º FASE LARVAR**

Recolheram-se as larvas na terceira fase larvar e colocaram-se em placas de porcelana com 1X PBS (700 mM NaCl, 10mM KCl, 50mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 7,4) mantidas a 4°C. Em seguida, dissecaram-se os lóbulos cerebrais e os discos imaginiais do olho com auxílio de duas pinças. Por último, colocaram-se os lóbulos cerebrais e os discos imaginiais do olho isolados em novos poços de porcelana com 1X PBS. O tecido foi sempre mantido em gelo. Para a fixação, usou-se formaldeído a 3,7% (Sigma-Aldrich) em 1X PBS durante 20 min à temperatura ambiente, com agitação. Em seguida, removeu-se o fixador e o tecido foi lavado com PBT (Triton X-100 a 0,1% em 1X PBS;) 3 vezes durante 10 minutos cada lavagem, com agitação.

Após fixação e lavagem dos tecidos, preparou-se a solução com os anticorpos primários diluídos em PBT. A incubação com o anticorpo primário foi feita durante a noite a 4°C com agitação, ou durante 2 horas à temperatura ambiente com agitação. Após este período, lavaram-se os tecidos com PBT, 3 vezes durante 10 minutos cada, com agitação. Os anticorpos secundários foram diluídos em PBT (Tabela 3), e a incubação decorreu durante 2 horas à temperatura ambiente, com agitação.

Após incubação os tecidos foram lavados com PBT, cada lavagem de 15 min à temperatura ambiente com agitação. Este processo repetiu-se por 3 vezes. Para finalizar o procedimento, os lóbulos cerebrais e os discos imaginais do olho foram incluídos em glicerol a 50% em 1X PBS, à temperatura de 4°C.

Para montar os tecidos na lâmina colocaram-se 8 µl da solução de inclusão e de seguida colocaram-se os lóbulos cerebrais e discos imaginais do olho e alinharam-se na mesma orientação para facilitar a análise da imagem. Em seguida, colocou-se a lamela. As amostras foram visualizadas através de microscopia confocal (Laser Scanning Confocal Microscope SP2 AOBS SE, Leica Microsystems). O tratamento das imagens foi realizado através de Adobe Photoshop® e Image J®.

<b>Nome</b>	<b>CONCENTRAÇÃO FINAL</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>FORNECEDOR</b>
BRDU	1:1000	Coelho	Cappel
BGAL	1:1000	Coelho	Cappel
	1:500	Rato	
CHAOPTIN (24B10)	1:20	Rato	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
CYCLIN B (RB271)	1:3000	Coelho	David Glover Pubmed
CYCLIN B (F2F4)	1:10	Rato	Hybridoma
ELAV	1:400	Rato	Hybridoma
FUTSCH (22C10)	1:100	Rato	Hybridoma

GFP	<b>1:1000</b>	<b>Coelho</b>	<b>Invitrogen</b>
GFP	<b>1:500</b>	<b>Rato</b>	<b>Invitrogen</b>
PH3	<b>1:4000</b>	<b>Coelho</b>	<b>Sigma</b>
H-TAU (5A6)	<b>1: 12000 (WB)</b>	<b>Rato</b>	<b>Hybridoma</b>

Tabela 3: Anticorpos primários e secundários usados neste estudo.

Para a imunohistoquímica, usaram-se anticorpos secundários conjugados com HRP, uma vez que o anticorpo primário proporciona a especificidade para localizar a proteína de interesse, e a enzima HRP, na presença de um substrato, produz um precipitado visível. Após a incubação com o anticorpo primário e lavagens, incubaram-se as amostras com a solução A+B (Kit ABC, Vector Stain) durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação. Procederam-se 3 lavagens com PBT, durante 20 min. Num volume de 300 µL de PBT, os discos foram incubados com 3 µl de DAB em agitação durante 5 minutos. De seguida, 3 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram acrescentados e a reação de precipitado foi bloqueada com a adição de PBT. Finalmente, a solução foi substituída por glicerol a 50% em 1X PBS e as amostras mantidas a 4°C.

## 2.4 MICROSCOPIA

### 2.4.1 Análise de olhos adultos de *Drosophila*

Para análise dos olhos adultos de *Drosophila*, as amostras foram transferidas para um tubo de 1,5 ml e guardadas a -20°C para depois serem fotografadas, usando uma ampliação de 70x na lupa (Nikon SMZ1500 Zoom Stereomicroscope with fluorescence). Para análise através de microscopia de varrimento as moscas representativas dos diferentes genótipos em estudo foram selecionadas, transferidas para um tubo de 1,5 ml e desidratadas numa série de etanol com diferentes concentrações: 25%, 50%, 75% e 100%, nas quais as amostras permaneceram durante 12h. O etanol a 100% foi substituído por hexametildisilazano: duas incubações de 30 minutos cada. As amostras foram deixadas a secar ao ar e à

temperatura ambiente. As amostras foram revestidas com filme fino de Au/Pd, por pulverização catódica (“sputtering”), utilizando o equipamento SPI Module Sputter Coater. Foi realizado o exame EDS com o Microscópio Eletrônico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Shottky), com Microanálise por Raios X e análise de padrões de difração de elétrons retrodifundidos: Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M.

## **2.5 QUANTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE PROTEÍNA TAU**

### **2.5.1 Preparação e quantificação de extratos proteicos**

As moscas foram transferidas para tubos de 1,5 ml e congeladas em azoto líquido antes da desagregação da cabeça do corpo da mosca. Colocaram-se 20 cabeças por 50 µl de solução 1X PBS, contendo 1X inibidores de proteases e 1X inibidores de fosfatases (Roche). As cabeças foram homogeneizadas e centrifugadas a uma velocidade de 10000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido, quantificado e armazenado em alíquotas a -80°C. Para a quantificação de proteína total, foi utilizado o método Lowry (BioRad). Este método é baseado em duas reações químicas: a primeira é a redução do íon cobre em condições alcalinas, formando um complexo com as ligações peptídicas (reação biureto); a segunda reação é a redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelo complexo cobre-ligação peptídica, causando uma mudança na coloração da solução para azul e que possui uma faixa de absorção entre os 650-750 nm. Numa microplaca foram adicionados 25 µl do reagente A' (20 µl do reagente S + 1 µl do reagente A). De seguida adicionaram-se 5 µl dos padrões ou de amostra e por fim 200 µl do reagente B. Aguardou-se 15 minutos, para que a reação colorimétrica ocorresse e depois executou-se a leitura no espectrofotómetro (Multiskan ascent V1.24 354-90058T) com o filtro de 630 nm. A absorvância de cada poço foi analisada e elaborou-se a curva padrão e respetiva quantificação de proteína total.

## 2.5.2 Eletroforese e detecção de proteínas

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições desnaturantes, que possibilita a separação de proteínas de acordo com a massa molecular relativa. As proteínas movem-se ao longo do gel em resposta a um campo elétrico. Tendo em conta o peso molecular da proteína em estudo preparou-se um gel de resolução de poliacrilamida a 10% w/v, cuja porosidade da matriz permite a separação de proteínas de peso molecular compreendido entre 5 e 250 kDa. Procedeu-se à desnaturação das amostras, que consistiu em colocar as amostras a uma temperatura de 95 °C por 5 minutos e de seguida foram centrifugadas a 8000 rpm durante 1 minuto. Utilizou-se tampão de carga SDS (SDS a 0,1%, glicina 348 mM; e Tris 50 mM), a uma concentração final de 1X. O padrão utilizado apresenta as bandas pré- coradas e foi adquirido à BioRad. Por último estabeleceram-se as condições da corrida da eletroforese: Voltagem (V) constante a 80 e Amperagem (A) a 150 durante 2 horas. Após separação, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (BioRad) por transferência electroforética durante 2 horas a 100 V em tampão Tris-Glicina (BioRad). Após transferência, as membranas de nitrocelulose foram submersas em solução de Ponceau-S (0,5 g Ponceau-S em 5 ml de ácido acético), para verificação da eficiência do processo de transferência. De seguida, a membrana foi lavada com a solução TBS-T (Tween 20 a 10%, NaCl 5 M e Tris 1M, pH=8). O bloqueio foi realizado com leite em pó a 5% w/v em TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação. Os anticorpos primários foram diluídos em de leite a 3% w/v em TBS-T e incubados com a membrana durante a noite, a 4°C. Após incubação com o anticorpo primário procedeu-se às lavagens com TBS-T, e repetiu-se o procedimento após incubação com o anticorpo secundário, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após as lavagens, de 10 em 10 minutos durante 1 hora, a solução de lavagem foi substituída por solução de ECL (GE Healthcare) para revelação da membrana. As bandas foram reveladas em filtros e visualizadas com auxílio do Scanner. A quantificação foi feita através do programa ChemiDoc (GS800 Calibrated Densitometer (BioRad), Quantify one I-D Analysis Software version 4.6 (BioRad)).

## 3 RESULTADOS

Os agregados neuropatológicos são compostos principalmente pelas formas hiperfosforiladas da proteína Tau. *In vitro*, a hiperfosforilação de Tau impede a ligação aos microtúbulos (MT), levando a uma destabilização da rede de MT e uma acumulação de formas hiperfosforiladas da proteína no citosol, resultando na formação de agregados (Cowan *et al*, 2011). Por conseguinte, a fosforilação de Tau é uma modificação pós-traducional que tem sido amplamente estudada nos últimos anos. Neste trabalho estudámos o potencial papel de Stg/Cdc25, como uma nova fosfatase capaz de modular a actividade de Tau.

### 3.1 FENÓTIPO EM OLHOS ADULTOS DE *DROSOPHILA* ASSOCIADOS COM A EXPRESSÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DE hTAU

O modelo de *Drosophila* é muito utilizado para estudar doenças neurodegenerativas, nomeadamente tauopatias (Fortini e Bonini, 2000). Neste estudo, foi usado o olho de *Drosophila* como modelo, um neuroepitélio cujos neurónios estabelecem uma conexão direta entre o disco do olho e o lóbulo cerebral. Desta forma, através de técnicas de genética dirigimos a expressão de transgenes de Tau e verificámos o seu fenótipo no olho adulto.

No nosso estudo, utilizámos dois promotores para dirigir a expressão de hTau: GMR-G4, que dirige a expressão de hTau em fotorreceptores e nas células acessórias; e Elav-G4 que dirige a expressão de hTau apenas em fotorreceptores. Estas linhas foram utilizadas para caracterizar o fenótipo associado à expressão de diferentes isoformas de hTau. Foram usados os construtos para expressar a isoforma 2N4R selvagem e com mutações associadas.

Foi analisado o fenótipo da expressão de diferentes isoformas de hTau resultante da fusão com o promotor GMR-G4 (Fig. 6 B - D). Na Fig. 6 B está representada uma mosca que expressa a isoforma 2N4R em fusão com o promotor GMR. É visível um fenótipo bastante severo caracterizado por uma redução aparente do tamanho do olho, e uma superfície com bastante rugosidade. Na Fig. 6 C, o

fenótipo resulta da expressão da mesma isoforma 2N4R em fusão com promotor GMR-G4, mas a inserção encontra-se no cromossoma 3. O fenótipo desta isoforma é mais fraco, sendo visível apenas na região posterior do olho. Na Fig. 6 D, estão representadas moscas que expressam a isoforma mutada que está associada à FTDP-17 (hTau<sup>P301L</sup>), que também resulta da fusão com o promotor GMR-G4 e apresenta um fenótipo agravado. Ambas as isoformas apresentaram fenótipo quando comparadas com olho controlo (Fig. 6 A), sendo o fenótipo induzido pela expressão de GMR::hTau no cromossoma 2 o mais severo (Fig. 6 B).

De seguida, foi avaliado o fenótipo de isoformas de hTau, em que a expressão de hTau foi dirigida por GMR-Gal4 (Fig. 6 F - H). Tanto a expressão da isoforma selvagem (Fig. 6 F) como da forma mutada S11A (Fig. 6 G) apresentaram fenótipo caracterizado por redução do tamanho do olho e rugosidades na retina. A expressão da isoforma mutada nos resíduos 262 e 365, em que o aminoácido serina (S) foi substituído por alanina (A) (S262A e S365A) (Fig. 6 H), não induz fenótipo (Fig. 6 E).

O fenótipo induzido por GMR-Gal4 foi comparado com o fenótipo induzido por ELav-Gal4, em que as diferentes isoformas e mutações de hTau são expressas apenas nos fotorreceptores (Fig. 6 J - M). Foi observado fenótipo tanto na isoforma selvagem (Fig. 6 J) como na forma mutante S11A (Fig. 6 L). No entanto na forma mutada S2A (Fig. 6 M) não foi visualizado fenótipo. Por conseguinte, nem todas as isoformas que expressam hTau em células diferenciadas apresentam fenótipo. Além disso, o fenótipo é mais severo nas isoformas cruzadas com GMR-Gal4 do que nas cruzadas com Elav-Gal4, dado que o promotor dirige a expressão hTau para todas as células do olho diferenciadas, enquanto o Elav-Gal4 apenas dirige para os fotorreceptores.

Em conclusão, a isoforma resultante da fusão do promotor GMR-Gal4, com inserção no cromossoma 2, é a que apresenta o fenótipo mais severo (Fig. 6 B). Portanto, seleccionámos esta isoforma para caracterizar o fenótipo de sobre-expressão de hTau em larvas de terceiro estágio. Analisámos quais as possíveis alterações no desenvolvimento da retina que originam o fenótipo mais severo e causam neurodegeneração visível em olho adulto.



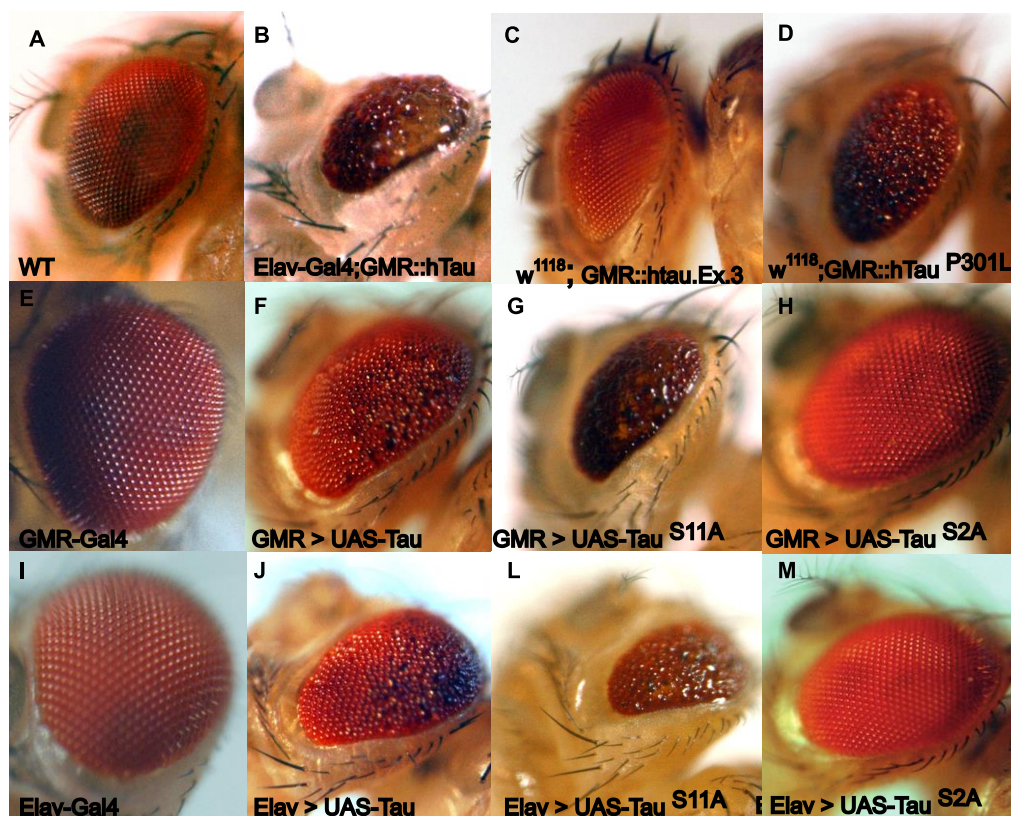


Figura 6 - Caracterização do fenótipo associado à expressão das diferentes isoformas de Tau (2N4R) no olho de *Drosophila*. Foi analisada a isoforma 2N4R em diversas situações, nomeadamente as que resultam: da fusão com o promotor GMR (B - D); do cruzamento com GMR-Gal4 (F - H); e do cruzamento com Elav-Gal4 (J - M). A expressão da isoforma resultante da fusão do promotor GMR (B) produz um fenótipo severo, caracterizado pela redução de tamanho do olho, rugosidades na superfície do olho com omatídeos desorganizados, quando comparado com o controlo (A). Foram também analisados os fenótipos de construtos da isoforma 2N4R, cuja expressão está sob o controlo do sistema Gal4/UAS: UAS-Tau (F); UAS-Tau<sup>S11A</sup> (G); e UAS-Tau<sup>S2A</sup> (H). Para dirigir a expressão destes construtos foram utilizadas as linhas GMR-Gal4 (F - H) e Elav-Gal4 (J - M). As construções UAS-Tau quando cruzadas com GMR-Gal4 (F, G) apresentam fenótipo mais severo do que quando cruzadas com Elav-Gal4 (J, L). O construto UAS-Tau<sup>S2A</sup> não apresenta fenótipo (H, M), sendo muito semelhante aos controlos (A, E e I).

### 3.1.1 Consequências da expressão de hTau na organização da retina de *Drosophila*

A organização dos omatídeos do disco imaginal do olho foi analisada por imunofluorescência, usando Elav como marcador nuclear neuronal. A marcação com Elav permite identificar as células diferenciadas, os fotorreceptores, desde a terceira fase larvar. Desta forma, o objetivo deste procedimento era avaliar a organização dos omatídeos diferenciados em células que expressam hTau. Na condição controlo, o disco apresenta uma forma regular e os fotorreceptores estão organizados (Fig. 7 A). Após a expressão de hTau observou-se perda de organização dos fotorreceptores e aparente perda celular (Fig. 7 B). Estes resultados evidenciam que a expressão de hTau causa desorganização da estrutura regular dos omatídeos, bem como uma aparente perda das células diferenciadas.

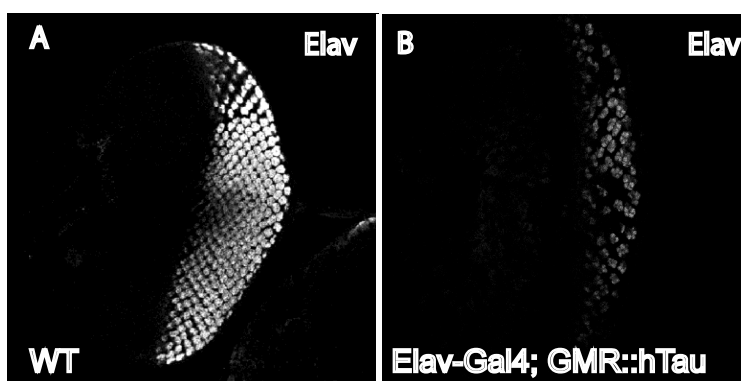


Figura 7 - Análise da organização dos omatídeos do olho de *Drosophila* após a expressão de hTau. Discos imaginiais de olho-antena da terceira fase larvar foram marcados com Elav (branco). Na condição controlo, o disco é regular e os fotorreceptores estão organizados (A). Após a expressão de hTau essa organização não é observável (B).

### 3.1.2 Análise da projeção dos neurónios para o lóbulo cerebral após a expressão de hTau

Durante o desenvolvimento do olho de *Drosophila*, os axónios dos fotorreceptores estendem-se em direção à superfície basal do disco do olho e projectam para o cérebro, através do nervo ótico (*Silver e Rebay, 2005*). Os axónios dos fotorreceptores projetam ainda para o lóbulo cerebral, respeitando a cadeia de projeção da lâmina para a medula (*Thomas R. et al, 2002; Silver e Rebay, 2005*).

Os efeitos da expressão de hTau na projeção dos axónios dos fotorreceptores para o lóbulo cerebral, foram caracterizados utilizando um anticorpo contra a proteína Futsch. Esta proteína encontra-se associada aos microtúbulos e, por conseguinte, permitiu avaliar a projeção dos axónios correspondentes aos fotorreceptores, para o lóbulo cerebral, em condições controlo e após expressão de hTau. Nos discos controlo (Fig. 8 A), a projeção dos axónios ocorre de forma regular, verificando-se a existência de projeção dos axónios da lâmina para a medula no lóbulo cerebral. Nos discos que expressam hTau, as projeções da lâmina para a medula não são visíveis, existindo apenas projeção dos axónios para a região da lâmina (Fig. 8 B), e há uma aparente sobreposição dos axónios quando projetam para o cérebro. Estes dados sugerem que a expressão de hTau induz alterações na morfologia dos axónios dos fotorreceptores, comprometendo a transmissão da informação para o cérebro.

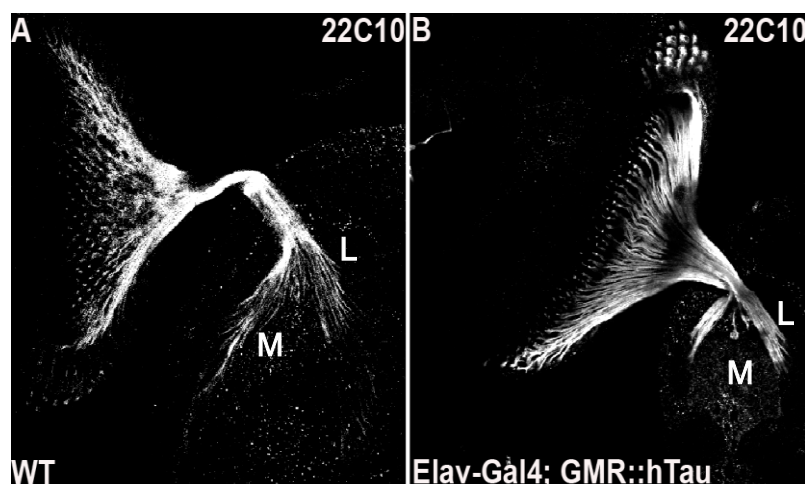


Figura 8 - **Morfologia e projeção dos axónios dos fotorreceptores em discos imaginais selvagem e após expressão ectópica de hTau.** Para esta análise, usou-se um anticorpo contra a proteína Futsch (22C10) (A, B). Na condição controlo (A) é visível a projeção dos axónios no lóbulo cerebral da lâmina (L) para a medula (M), mas esta projeção não se verifica em discos que expressam hTau (B). Para além de não haver projeção dos axónios da lâmina (L) para a medula (M), existe sobreposição dos axónios resultando na cor branca mais intensa nos locais onde essa sobreposição acontece.

### 3.1.3 **Análise de marcadores do ciclo celular em neurónios que expressam hTau**

Parece existir uma correlação entre um ciclo celular anormal e a neurodegeneração em neurónios pós-mitóticos (*Khurana e Feany, 2007*).

Para verificar a ocorrência de acumulação anormal de marcadores de ciclo celular após a expressão de hTau em células diferenciadas do olho, utilizámos diferentes marcadores associados ao ciclo celular: a histona 3 (PH3) que marca a fase M (mitose); o BrdU que marca células que apresentam síntese de DNA na fase S; e a ciclina B que marca células em progressão para a mitose. Estes marcadores permitiram-nos verificar se existe re-entrada no ciclo celular de células pós-mitóticas, durante o processo de neurodegeneração.

Inicialmente testou-se se as células pós-mitóticas que expressam hTau acumulam ciclina B. Para isso, utilizaram-se larvas de terceiro estágio e fez-se a imunomarcação da ciclina B e Elav (Fig. 9). Na situação controlo (Fig. 9 A') observou-se níveis elevados de ciclina B na região da segunda onda mitótica e na região anterior do disco. Estes domínios correspondem a zonas em que as células se encontram a proliferar. Nos discos que expressam hTau, para além da marcação da zona anterior do disco e na segunda onda mitótica, também é evidente a presença de ciclina B na zona diferenciada. Nestes discos ocorre colocalização de ciclina B com Elav (Fig. 9 B'), sugerindo a re-entrada no ciclo celular dos fotorreceptores.

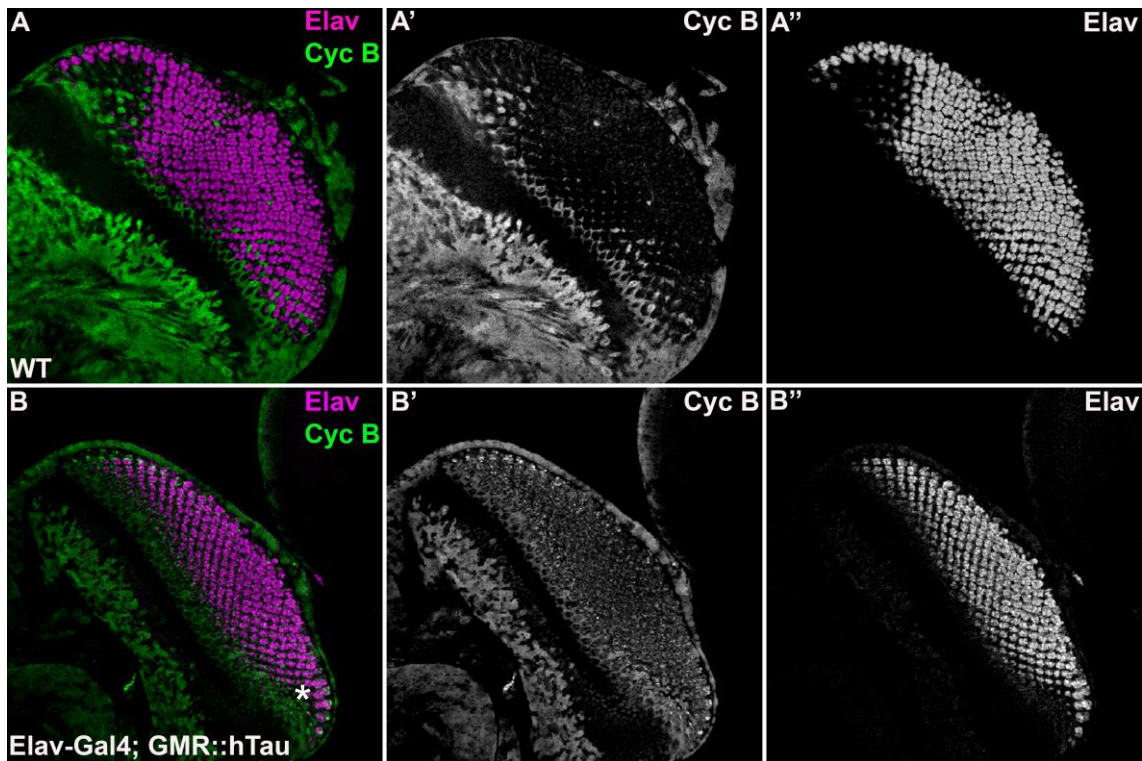


Figura 9 - Análise da expressão de ciclina B em neurónios que expressam hTau. Para esta análise utilizou-se como marcadores a ciclina B (CycB, verde) e Elav (magenta). No controlo (A), é visível a acumulação de ciclina B na zona anterior do disco, e na região correspondente à segunda onda mitótica. Na condição de expressão ectópica de hTau (B), verificou-se uma acumulação na região da segunda onda mitótica como observado em discos controlo. Para além disso, observou-se a colocalização de cycB e Elav (B), o que indica a possibilidade de existirem fotorreceptores em mitose (\*).

Para validar esta hipótese, avaliámos os restantes marcadores de ciclo celular. A histona 3 (PH3) é um marcador importante para o estudo do ciclo celular, uma vez que a fosforilação da Ser10 da histona 3 ocorre durante a condensação dos cromossomas em fase M (mitose), sendo por isso usado como marcador específico de mitose. Através da marcação com PH3 identificaram-se as células que se encontravam em mitose no disco imaginal do olho de *Drosophila*. Utilizaram-se larvas do terceiro estágio larvar e os imunomarcadores, PH3 que marca as células que estão em mitose e Elav que marca os fotorreceptores. Observámos que em discos com a expressão ectópica de hTau (Fig. 10 B) há uma maior acumulação de PH3 na segunda



onda mitótica, contrariamente ao que acontece nos disco controlo (Fig. 10 A). Esta acumulação de PH3 na segunda onda mitótica sugere que a maioria das células continua em mitose tendo dificuldade de sair do ciclo celular. Também foi visível acumulação de PH3 em células diferenciadas. No entanto, essa acumulação de PH3 coincide com células negativas para Elav, o que sugere que os fotoreceptores apesar de acumularem ciclina B não acumulam PH3, não podendo concluir que re-entram em ciclo.

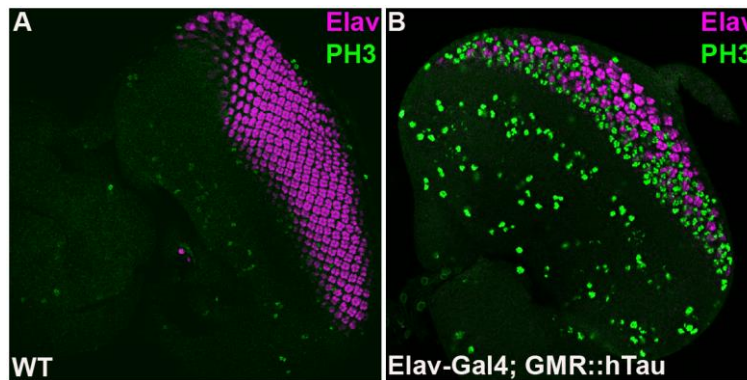


Figura 10 - Análise do marcador mitótico PH3 em discos imaginiais do olho, que expressam hTau. Utilizou-se o marcador mitótico a histona 3 fosforilada (PH3; magenta) e (Elav; verde). Após análise da marcação com estes marcadores, verifica-se uma maior acumulação de PH3 na segunda onda mitótica quando hTau é expressa (B), em contraste com o que se observa nos discos controlo (A).

BrdU é um análogo da timidina que é incorporado no DNA durante a replicação deste (Fase S) sendo utilizado para marcar células que se encontram na fase S do ciclo celular. Estudos anteriores revelaram que a incorporação com BrdU pode confirmar uma re-entrada em ciclo celular pelo facto de a célula continuar em fase S (*Andorfer et al, 2005*). Desta forma, utilizámos este marcador com o principal objetivo de determinar a presença de células na fase S do ciclo celular nos discos imaginiais do olho de *Drosophila* numa condição de sobre-expressão de hTau. Para além deste marcador, utilizámos o marcador neuronal Elav.

Verificou-se que, à semelhança do que acontece em discos controlo (Fig. 11 A), ocorre acumulação de BrdU na segunda onda mitótica quando hTau é expressa no disco (Fig. 11 B). No entanto, detetou-se que a acumulação de BrdU na segunda onda mitótica ocorre numa maior extensão de células em discos que expressam hTau (Fig. 11 B), o que significa que existe maior número de células em fase S. Para além

disso, também foi observada alguma incorporação de BrdU na zona posterior do disco do olho, ou seja, em células diferenciadas. No entanto, não foi visível colocalização de Elav e BrdU. Esta análise permitiu-nos concluir que a sobre-expressão de hTau pode causar desregulação do ciclo celular, havendo células na segunda onda mitótica que permanecem em mitose e células diferenciadas que re-entram no ciclo celular.

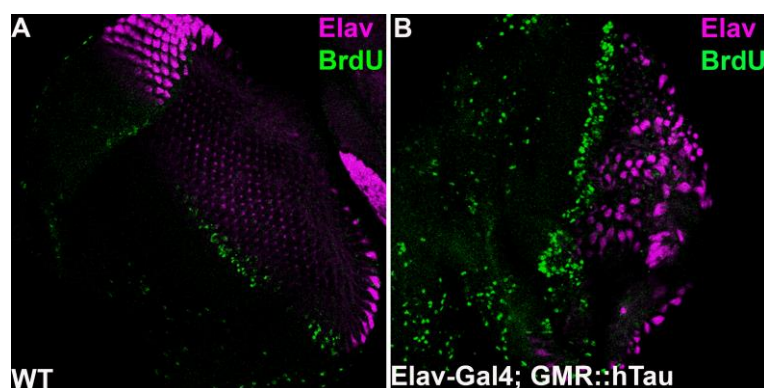


Figura 11 – Análise de células em fase S com a marcação de BrdU. Utilizou-se o marcador Elav (magenta) e o BrdU (verde). Na condição controlo (A) observam-se células BrdU positivas na segunda onda mitótica. No disco que expressa hTau (B) há um aumento da extensão de células d BrdU positivas na segunda onda mitótica e também se observam algumas células BrdU positivas na região posterior do disco.

#### 3.1.4 Avaliação de morte celular em neurónios que expressam hTau.

De forma a complementar os resultados acima referidos, analisou-se outro fator, morte celular, que leva à neurodegeneração. Para avaliar a morte celular usou-se um anticorpo específico contra caspase 3 (Andorfer *et al*, 2005), que marca células em apoptose. Em discos controlo não se observou marcação de Caspase 3 (Fig. 12 A), mas na condição que expressa hTau foi observada ativação de Caspase 3 na zona posterior do disco, indicando morte de células diferenciadas por apoptose (Fig. 12 B). A expressão ectópica de hTau em discos imaginiais de *Drosophila* promove a morte celular. No entanto, não podemos concluir que esta morte ocorre especificamente em fotorreceptores, pois não se verificou colocalização de Caspase 3 com Elav.

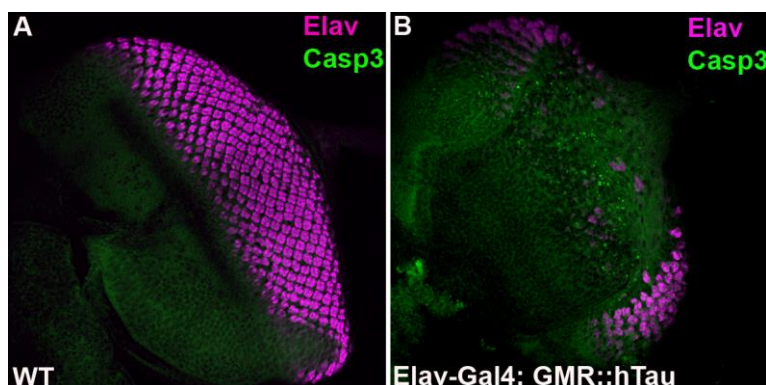


Figura 12 - Análise de morte celular em discos imaginais de *Drosophila* que expressam hTau. Para análise de morte celular usou-se Caspase 3 (verde). Os fotorreceptores foram identificados por marcação com Elav (magenta) (A, B). Em discos imaginais controlo (A), não há marcação de Caspase 3. Nos discos que expressam hTau, verifica-se a existência de células positivas para Caspase 3 na região diferenciada do disco imaginal onde se encontram os fotorreceptores (B). No entanto, não se observa colocalização de Caspase 3 com Elav.

### 3.2 ANÁLISE DO EFEITO SUPRESSOR DE STG NO FENÓTIPO INDUZIDO POR TAU HUMANA

Os resultados até agora obtidos demonstraram que a sobre-expressão da proteína hTau causa alterações a nível morfológico e do ciclo celular e da morte celular durante o desenvolvimento do olho de *Drosophila* e um fenótipo severo no adulto, caracterizado por uma aparente redução do tamanho do olho, desorganização dos fotorreceptores e rugosidades na superfície da retina.

Estudos anteriores demonstraram que a fosfatase codificada por *stg/cdc25*, o homólogo em *Drosophila* de *Cdc25*, tem a capacidade de diminuir significativamente a neurotoxicidade de hTau (Shulman e Feany, 2003). No entanto, os mecanismos moleculares deste efeito ainda não foram esclarecidos.

No nosso estudo foi avaliada a capacidade de *Stg* reverter o fenótipo associado à expressão de hTau nas situações anteriormente caracterizadas. Foram utilizados os transgenes *UAS-stg* e *UAS-stg.HA* associados a duas inserções distintas (Fig. 13 B - F). A expressão destas duas inserções, tanto com *Elav-Gal4* como com *GMR-Gal4*, não induziu alteração fenotípica no olho adulto (Fig. 13 B, C). De seguida, analisou-se o efeito da co-expressão de *Stg* com hTau (*Elav > UAS-stg, GMR::hTau*) (Fig. 13 D). Nestes ensaios verificou-se que a expressão ectópica de *Stg* nos fotorreceptores



é suficiente para reverter o fenótipo resultante da expressão de hTau nas células da região diferenciada do olho.

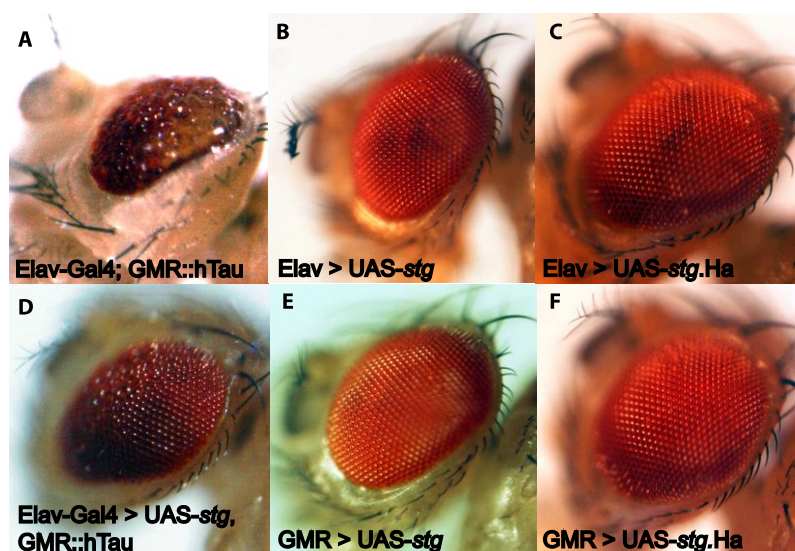


Figura 13 - Caracterização do fenótipo de sobre-expressão de *Stg* no olho de *Drosophila*. Utilizaram-se os “drivers” *Elav-Gal4* e o *GMR-Gal4* (B - F) e os efeitos da expressão de *Stg* (A) e da sua co-expressão com hTau (D) no olho foram comparados. Verificou-se que a sobre-expressão de *Stg* não induz qualquer fenótipo no olho adulto (B, C, E, F). Na condição de co-expressão de *Stg* e hTau observa-se uma melhoria do fenótipo (D).

Este fenótipo foi caracterizado com maior resolução usando a microscopia de varrimento (Fig. 14). A retina em moscas controlo é caracterizada por uma superfície regular e omatídeos organizados (Fig. 14 A - D). A expressão ectópica de hTau gerou o fenótipo olho rugoso, caracterizado por uma redução da área do olho adulto, superfície com rugosidades e omatídeos desorganizados (Fig. 14 E e F). De seguida, avaliou-se o efeito da co-expressão de *Stg* e hTau na retina de moscas adultas (Fig. 14 G e H). Foram usadas duas inserções diferentes de *UAS-stg* (uma no cromossoma 2 e outra no cromossoma 3). Em ambas as condições, a expressão de *Stg* conduziu a uma melhoria significativa do fenótipo associado à expressão de hTau, sendo estas retinas muito semelhantes às do controlo. Estes resultados sugerem que a fosfatase *Stg* é um modulador da toxicidade de hTau. Para identificar quais os defeitos associados à expressão de hTau que são revertidos por *Stg*, re-avaliámos os fenótipos previamente descritos.

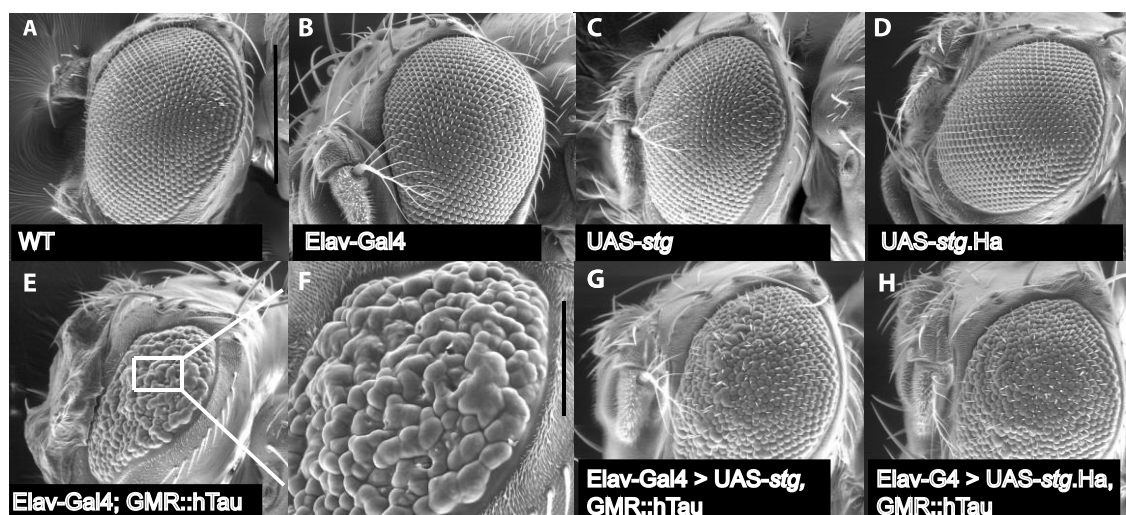


Figura 14 - A sobre-expressão de *Stg* durante o desenvolvimento do olho de *Drosophila* reverte o fenótipo causado pela expressão ectópica de hTau. As moscas controlo (A - D) mostram um olho normal, caracterizado por uma superfície regular e omatídeos organizados. A linha GMR::hTau (E, F), usada para promover a expressão de hTau no olho, produz um fenótipo caracterizado por um olho rugoso, com diminuição do tamanho do olho e por irregularidades na superfície, quando comparamos com o controlo (A). Após a sobre-expressão de *Stg*, num fundo genético com expressão ectópica de hTau (Elav-Gal4> UAS-*stg*, GMR::hTau e Elav-Gal4> UAS-*stg*.HA, GMR::hTau), ocorre melhoria do fenótipo (G, H). Esta melhoria é caracterizada pela diminuição de rugosidades na superfície da retina e omatídeos organizados muito similares aos dos olhos das moscas controlo (G, H) (a linha da escala representada corresponde a 300  $\mu\text{m}$  (A-E, G, H) e 100  $\mu\text{m}$  (F)).

### 3.2.1 A atividade de fosfatase de *Stg* é requerida para a supressão da toxicidade associada com a expressão de hTau

Tendo em conta os resultados anteriormente descritos, foi importante verificar se atividade de *Stg* era requerida para a supressão do fenótipo de hTau. Para tal, foi gerado um alelo mutante de *Stg* no domínio catalítico (UAS-*Stg*<sup>PPase mut</sup>). Após análise dos resultados obtidos, verificámos que a co-expressão do alelo mutante de *Stg* com hTau não alterou o fenótipo para hTau anteriormente descrito (Fig. 15 B).

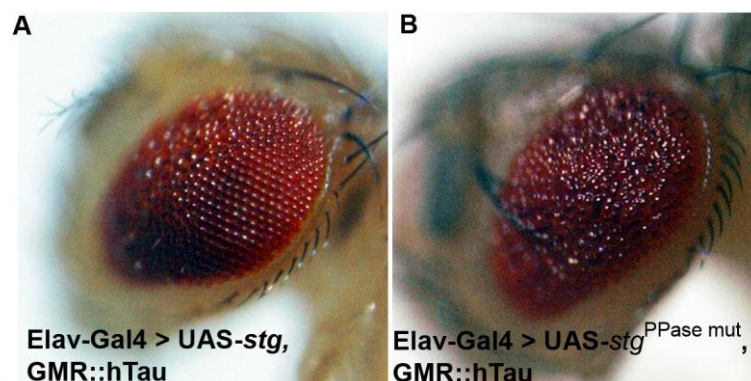


Figura 15 - A actividade fosfatase de Stg é requerida para a supressão do fenótipo causado pela expressão de hTau. Comparou-se o fenótipo em olhos adultos de *Drosophila* (A e B). Co-expressão de hTau e Stg na retina (A); co-expressão de hTau com um alelo de Stg sem actividade de fosfatase (UAS-Stg<sup>PPase mut</sup>) (B). Verificou-se que quando Stg não tem actividade de fosfatase perde a capacidade de reverter o fenótipo causado pela expressão de hTau (B).

### 3.2.2 A redução dos níveis de Stg potencia o fenótipo promovido por hTau.

Após o fenótipo ter sido caracterizado no olho adulto e em desenvolvimento, tornou-se importante perceber se a ausência de Stg nas células causava um fenótipo ainda mais severo que hTau. Para testar esta hipótese, a ausência de Stg foi mimetizada por silenciamento do gene de Stg com RNA de interferência. As moscas Elav-Gal4; GMR::hTau foram cruzadas com moscas que tinham o transgene UAS-*stg* RNAi, permitindo a expressão ectópica de hTau e o silenciamento de *stg*. A descendência foi analisada e apenas as fêmeas eclodiram. O fenótipo do olho das fêmeas foi similar ao fenótipo induzido apenas por expressão ectópica de hTau (Fig. 16). Porém, o facto dos machos não terem eclodido, só por si, indica que a ausência de Stg agrava a toxicidade induzida pela sobre-expressão de hTau.

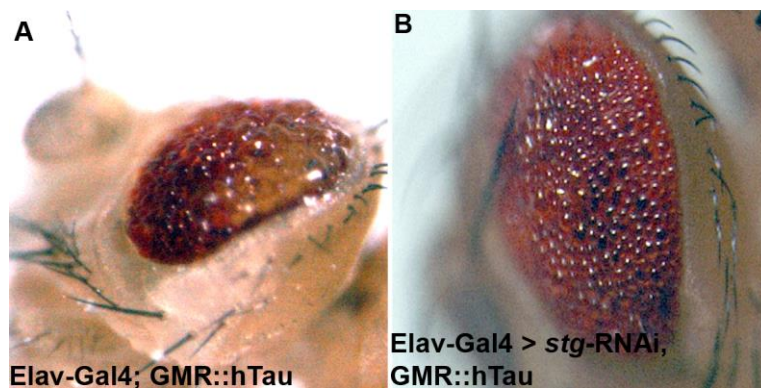


Figura 16 - Na ausência de expressão de *Stg* o fenótipo é mais severo. Comparou-se o fenótipo em olhos adultos de *Drosophila*. Retina de *Drosophila* numa condição de expressão de hTau (A) e numa condição em que a expressão de hTau é acompanhada pelo silenciamento de *stg* através de RNAi (B). Verificou-se a expressão de hTau por si só já resulta num fenótipo bastante severo, não sendo visível diferenças após o silenciamento de *stg* através de RNAi.

Estes resultados sugerem que a fosfatase *Stg/Cdc25* pode ter uma ação neuroprotectora em condições de sobre-expressão de hTau. Por outro lado, a ausência da mesma leva a um agravamento do fenótipo associado à sobre-expressão de Tau. Por último pode-se concluir que tem de existir um equilíbrio entre cinases e fosfatases para que as condições sejam ideais para um desenvolvimento correto.

### 3.2.3 A expressão de *Stg* reverte a desorganização dos omatídeos induzida pela expressão hTau

Com o objetivo de esclarecer o mecanismo de reversão do fenótipo associado à expressão de hTau por *Stg* (Fig. 17) utilizou-se o marcador *Elav* para visualizar a organização dos omatídeos do disco imaginal do olho em discos controlo (Fig. 17 A) e em discos que co-expressam hTau e *Stg* (Fig. 17 B). Após a sobre-expressão de *Stg* o disco imaginal do olho apresenta uma organização semelhante ao disco controlo (Fig. 17 A). Os fotorreceptores apresentam-se de forma mais organizada que quando expressam hTau. Concluiu-se que *Stg* tem a capacidade de reverter a desorganização dos omatídeos provocada pela sobre-expressão de hTau.

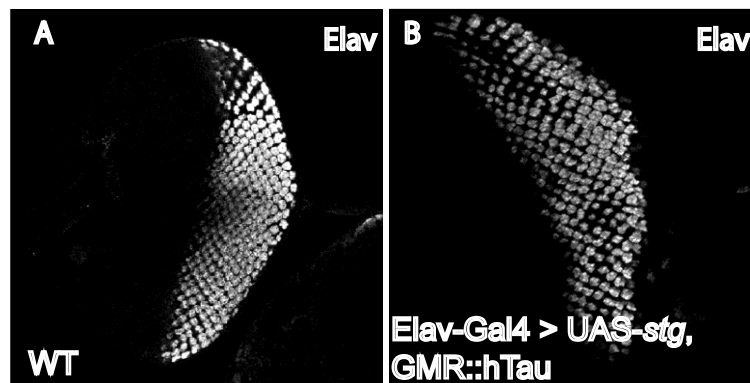


Figura 17 - *Stg* tem a capacidade de reverter o fenótipo ao nível da organização dos fotorreceptores. Discos imaginais de olho-antena foram marcados com o marcador neuronal *Elav* (A,B). Após a sobreexpressão de *Stg*, num fundo genético que expressa *hTau* (B) o disco imaginal apresenta uma estrutura muito semelhante ao disco controlo (A). Além disso, é visível que os fotorreceptores estão mais organizados do que o observado após a expressão ectópica de *hTau* (ver Fig. 7).

### 3.2.4 A morfologia dos axónios dos fotorreceptores é recuperada na presença de *Stg*

O estudo do efeito da expressão de *hTau* na projecção dos axónios dos fotorreceptores para o lóbulo cerebral mostrou que a projecção dos axónios da lâmina para a medula é afectada (Fig. 8). Avaliámos este parâmetro na condição de co-expressão de *hTau* e *Stg*. Para isso, realizámos os ensaios nas condições anteriormente descritas (págs. 35 e 36). A projecção dos axónios da lâmina para a medula nos discos que co-expressam *hTau* e *Stg* (Fig. 18 B) é similar à observada em discos controlo (Fig. 18 A). Desta forma, os resultados obtidos permitem afirmar que tanto a morfologia como a projecção normal dos neurónios dos fotorreceptores são recuperadas na presença de *Stg*.

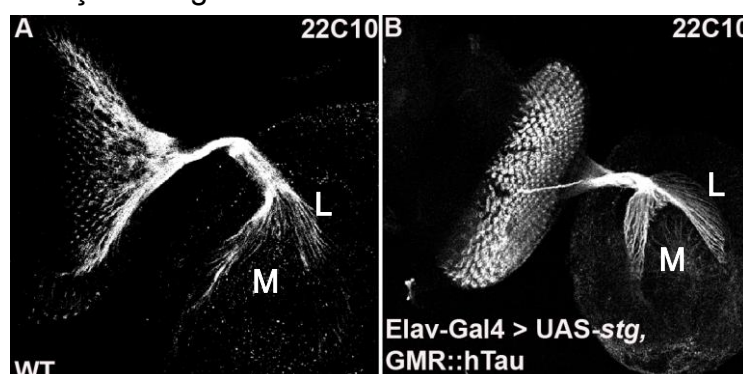




Figura 18 - A morfologia e projeção dos neurónios dos fotorreceptores é restabelecida pela ação de **Stg**. Foi estudada a projeção dos axónios dos fotorreceptores através do marcador Futsch /22C10 (branco) em discos controlo (A) e em discos que co-expressam hTau e Stg (B). Não se observam alterações ao nível da projeção dos axónios da lâmina (L) para a medula (M) no lóbulo cerebral.

### 3.2.5 A expressão de Stg reverte os defeitos no ciclo celular causados por hTau

O efeito da co-expressão de hTau e Stg também foi avaliado a nível do ciclo celular. A identificação de diferentes fases do ciclo celular foi efetuada com os mesmos marcadores de ciclo celular anteriormente usados, nomeadamente ciclina B, PH3 e BrdU (págs. 37-40). Nos discos que co-expressam hTau e Stg a ciclina B foi detectada na região da segunda onda mitótica e na zona anterior do disco (Fig. 19 B'), tal como nos discos que expressam hTau (Fig. 9). Para além disso, o padrão de distribuição de ciclina B nestes discos (Fig. 19 B) é muito semelhante ao observado em discos controlo (Fig. 19 A). Perante estes resultados, conclui-se que após expressão de hTau e Stg, as células diferenciadas, entre elas os fotorreceptores, não ficam paradas em mitose.

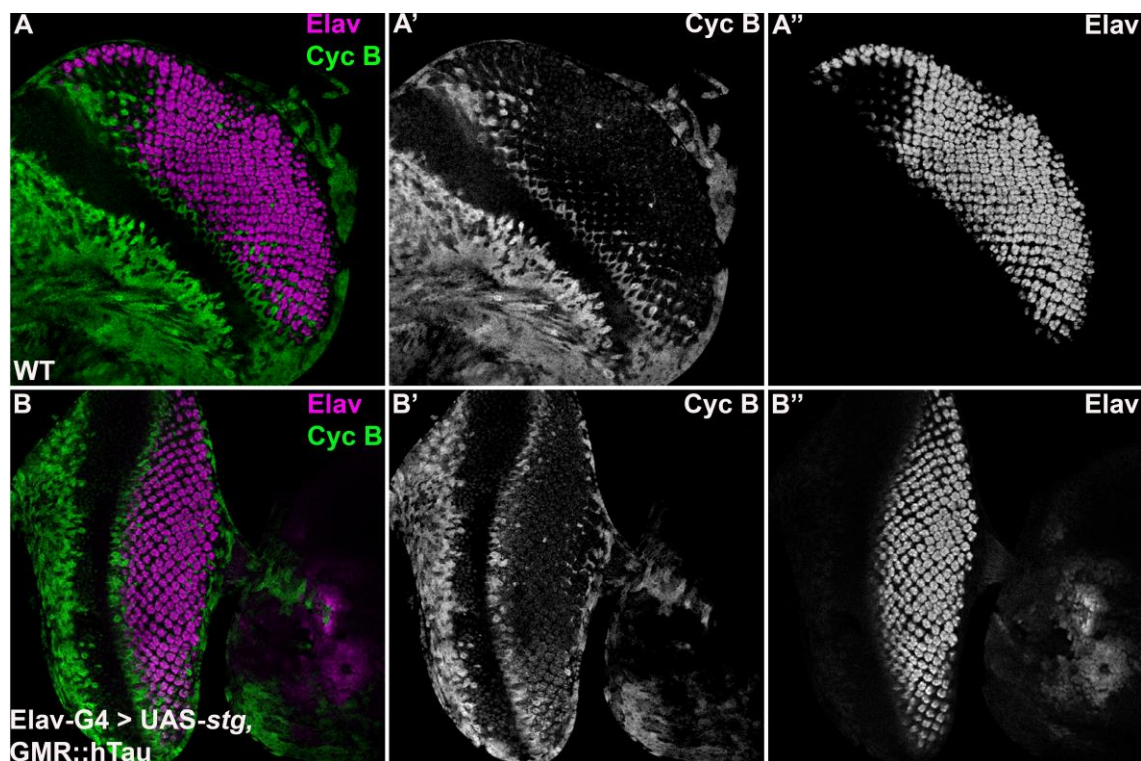


Figura 19 - **Inexistência de acumulação de ciclina B nos fotorreceptores deve-se à expressão de Stg.** Conforme avaliado na presença de hTau, seguiu-se o mesmo procedimento para avaliar se Stg teria a capacidade de reverter a acumulação de ciclina B nos fotorreceptores. Para isso, usaram-se os marcadores CycB e Elav. Na condição da co-expressão de Stg e hTau, verificou-se que os fotorreceptores não acumulam Cyc B, daí não ser visível a co-localização de Cyc B com Elav (B).

Verificou-se que acumulação de PH3 na segunda onda mitótica é menor em discos que co-expressam hTau e Stg do que naqueles que expressam apenas hTau. Ainda assim, quando comparámos com discos controlo (Fig. 20 A), verificou-se que existem células na segunda onda mitótica retidas em mitose (Fig. 20 B). Após análise destes resultados, concluiu-se que Stg pode reverter as alterações ao nível do ciclo celular provocadas pela expressão ectópica de hTau, tais como a maior acumulação de PH3 na segunda onda mitótica e zona posterior do disco. Seguidamente, verificou-se se ocorre incorporação de BrdU neste fundo genético.

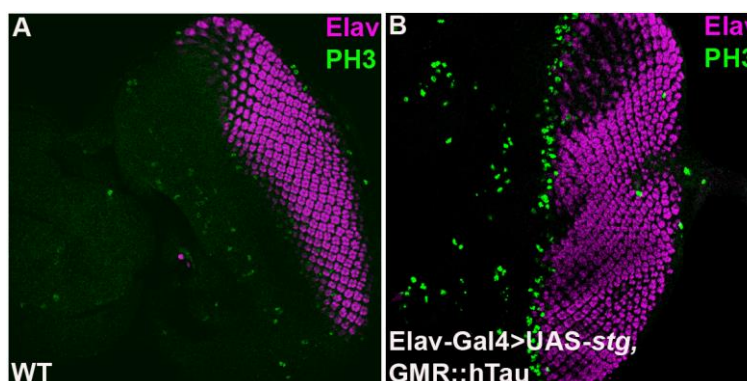


Figura 20 - **Stg tem capacidade para reduzir acumulação de PH3.** Tal como na análise da expressão PH3 na presença de hTau, comparámos a acumulação de PH3, nos discos controlo (A) com os discos em que há co-expressão de Stg e hTau (B). É visível uma menor acumulação de PH3 na segunda onda mitótica, comparando com discos que expressam hTau.

Como já foi referido anteriormente, a incorporação de BrdU marca células na fase S, onde replicam DNA. Portanto, utilizou-se BrdU e Elav como marcadores para verificar se existiam fotorreceptores em fase S, numa condição de co-expressão de Stg e hTau. Perante os resultados analisados, verificou-se que a co-expressão de hTau e Stg levou a uma redução de células em fase S na segunda onda mitótica quando comparámos com discos que expressam hTau, e também não é visível a incorporação de BrdU em células diferenciadas (Fig. 21 B).

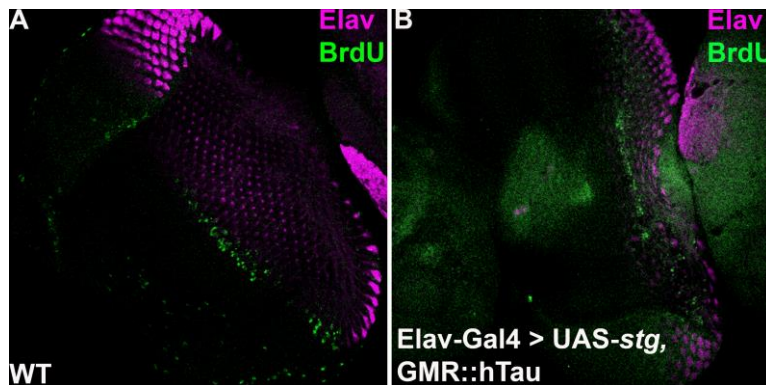


Figura 21 – **Stg tem a capacidade de reduzir acumulação de BrdU.** Analisou-se a presença de células em fase S em discos controlo (A) e em discos que co-expressam hTau e Stg (B). Verificou-se uma redução no número de células BrdU positivas na segunda onda mitótica.

Em suma, os resultados obtidos com marcadores de ciclo celular: em discos que expressam apenas hTau, em discos que co-expressam hTau e Stg e em discos controlo sugerem que Stg pode prevenir a re-entrada em ciclo de células diferenciadas e das células da segunda onda mitótica retidas em mitose.

### 3.2.6 Avaliação de morte celular numa condição de co-expressão de hTau e Stg

Avaliámos também a morte celular em discos imaginais que co-expressam hTau e Stg (Fig. 22). Para tal, procedeu-se à dupla marcação dos discos imaginais com Elav e caspase 3 para identificar fotorreceptores apoptóticos. Os resultados obtidos indicam que em discos com expressão ectópica de hTau e Stg (Fig. 22 B) existe alguma morte celular, mas estas células não coincidem com fotorreceptores. A marcação de caspase 3 na segunda onda mitótica e na zona diferenciada é distinta



da que a que foi observada em células que expressam hTau, verificando-se menor número de células com marcação de caspase 3. O aparecimento de células mortas na segunda onda mitótica é normal (Yang *et al*, 2003). Uma das razões é o fato de as células estarem mais propícias a erros durante as fases do ciclo celular do que quando já estão diferenciadas. No entanto, não foi observada morte celular em discos normais (Fig. 22 A).

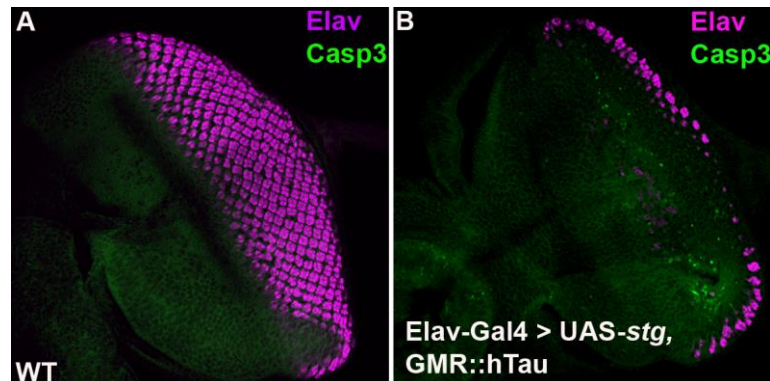


Figura 22 - Análise de morte celular após a expressão ectópica de hTau e Stg em discos imaginiais de *Drosophila*. Utilizaram-se os marcadores Caspase 3 (verde) que marca células em apoptose e Elav (azul), para os fotorreceptores. Verificou-se que quando se co-expressa hTau com Stg há uma aparente redução na marcação de Caspase 3 na zona diferenciada do disco. No entanto, comparando com discos controlo verificou-se que ainda existe alguma morte celular sendo esta mais visível na região segunda onda mitótica.

### 3.2.7 Análise dos níveis de fosforilação de hTau

A fosforilação de Tau desempenha um papel crítico em tauopatias, pelo facto de alterar a afinidade de ligação da Tau aos microtúbulos (Shulman e Feany, 2003). Assim, torna-se essencial estudar o efeito da fosfatase Stg/Cdc25 nos níveis de fosforilação de hTau.

Como já foi referido anteriormente, um estudo elaborado por Shulman e Feany em 2003 demonstraram que a sobre-expressão de Stg suprime o fenótipo resultante da expressão de uma isoforma mutada de hTau (hTau<sup>V337M</sup>) na retina de *Drosophila* (Shulman e Feany, 2003). Porém ficou por esclarecer se Stg prevenia a toxicidade induzida pelo mutante de hTau por redução do seu grau de hiperfosforilação.

Para tal, avaliámos os níveis de fosforilação de hTau em extratos proteicos de cabeças de *Drosophila*, por intermédio do Western-blot, usando anticorpo contra a proteína Tau 5A6 (5A6, Developmental Studies Hybridoma Bank) (Fig. 23 B). Os extractos foram preparados a partir de *Drosophilas* com os seguintes genótipos: Elav-Gal4; GMR::hTau, Elav-Gal4> UAS-*stg*, GMR::hTau e Elav-Gal4> UAS-*stg*.HA, GMR::hTau (Fig. 23 A). Verificámos que nos genótipos Elav-Gal4> UAS-*stg*, GMR::hTau e Elav-Gal4> UAS-*stg*.HA, GMR::hTau existe uma diminuição da expressão de hTau, quando comparada com a Elav-Gal4> UAS-*stg*, GMR::hTau de 41% para 28% (Fig.23 B2) e quando comparado com Elav-Gal4> UAS-*stg*.HA, GMR::hTau a diminuição é de 41% para 20% (Fig. 23 B3). Este resultado sugere que na presença de Stg os níveis totais de proteína hTau são reduzidos quando comparamos com a expressão de hTau, o que evidencia que Stg é um possível modulador de Tau.

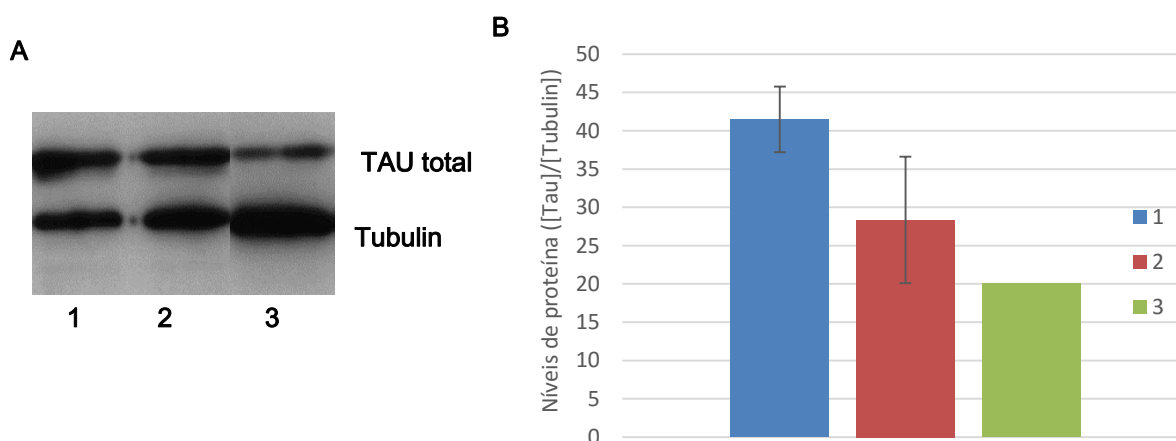


Figura 23 – Os níveis de fosforilação de hTau. Avaliou-se por intermédio do western-blot os níveis de expressão de Tau em 3 condições diferentes, 1- Elav-Gal4; GMR::hTau, expressão de hTau; 2- Elav-Gal4> UAS-*stg*, GMR::hTau, Co-expressão de hTau e Stg; e 3- Elav-Gal4> UAS-*stg*.HA, GMR::hTau Co-expressão de hTau e Stg.HA.(A) Análise dos níveis da proteína hTau através do western blot. (B) quantificação dos níveis de hTau nas diferentes condições experimentais. Para as condições 1, 2 e 3 foram analisados os resultados de 3 experiências independentes. Verificou-se que nas condições em que há co-expressão de hTau e Stg (B, C), há redução nos níveis de Tau.

### 3.2.8 Função de Stg quando o fenótipo já está estabelecido

Nas experiências anteriores, a isoforma 2N4R hTau foi expressa no olho durante o desenvolvimento da retina da mosca e verificamos que resulta num fenótipo severo (Fig. 6). O objetivo principal desta parte do trabalho é verificar a capacidade de Stg reverter o fenótipo de hTau e controlar os níveis de fosforilação de Tau, num contexto em que a doença já esteja estabelecida. Para tal, foi necessário garantir que a sobre-expressão de Stg só ocorria durante a fase adulta. Por conseguinte, utilizou-se o sistema Gal4/Gal80, que permite controlar a expressão de Stg (*Sivanantharajah e Zhang, 2015*). O promotor Elav-Gal4 foi inativado por Gal80 a 18°C, não permitindo a expressão de UAS-Stg. Quando as moscas foram transferidas para 29°C, Gal80 fica inativa e por sua vez o Elav-Gal4 dirige a expressão do transgene UAS-Stg. Este sistema permite mimetizar uma situação de doença já estabelecida e avaliar a modulação da toxicidade de hTau por Stg.

As moscas Elav-Gal4; GMR::hTau foram cruzadas com moscas UAS-Stg/Cyo;Gal80/TM6B. O desenvolvimento embrionário e larvar da descendência ocorreu a 18°C, a fim de evitar a expressão de Stg durante o desenvolvimento. Após eclosão, as moscas foram transferidas para 29°C permitindo a indução da expressão de Stg pela inatividade de Gal80. Estas moscas foram analisadas após 1 dia, 15 dias e 20 dias expostas à atividade de Stg a 29°C. Os resultados referentes ao olho adulto mostraram que as moscas no primeiro dia após eclosão exibiram fenótipo equivalente a hTau (Fig. 24A). Após 15 dias de expressão de Stg verificou-se diminuição do fenótipo (Fig. 24A). Quando a expressão de Stg foi induzida durante 20 dias após a eclosão, as moscas evidenciaram fenótipo semelhante às que expressam hTau (Fig. 24 A).

Em paralelo, foram analisados os níveis de fosforilação de Tau em extratos proteicos de cabeça aos dias 1, 15 e 20, por Western-blot (Fig. B). Os resultados obtidos indicam que ao longo do tempo a expressão de Stg tem capacidade para desfosforilar a proteína Tau. Isto porque aparecem 2 bandas correspondentes à proteína Tau (uma correspondente à forma hiperfosforilada e outra à forma desfosforilada) (Fig 24 B). Para além disso reparámos que ao longo do tempo desaparece a banda correspondente à forma fosforilada de Tau e por sua vez a banda

correspondente à forma desfosforilada de Tau aumentou a partir do 15º Dia, sendo mais notório ao 20ºDia (Fig. 24 B).

Após análise destes resultados verificou-se que Stg tem capacidade de desfosforilar a proteína Tau. Além disso, tem a capacidade de reverter o fenótipo de hTau mas em estados mais avançados que incluem morte celular a sua capacidade de reversão é mínima.

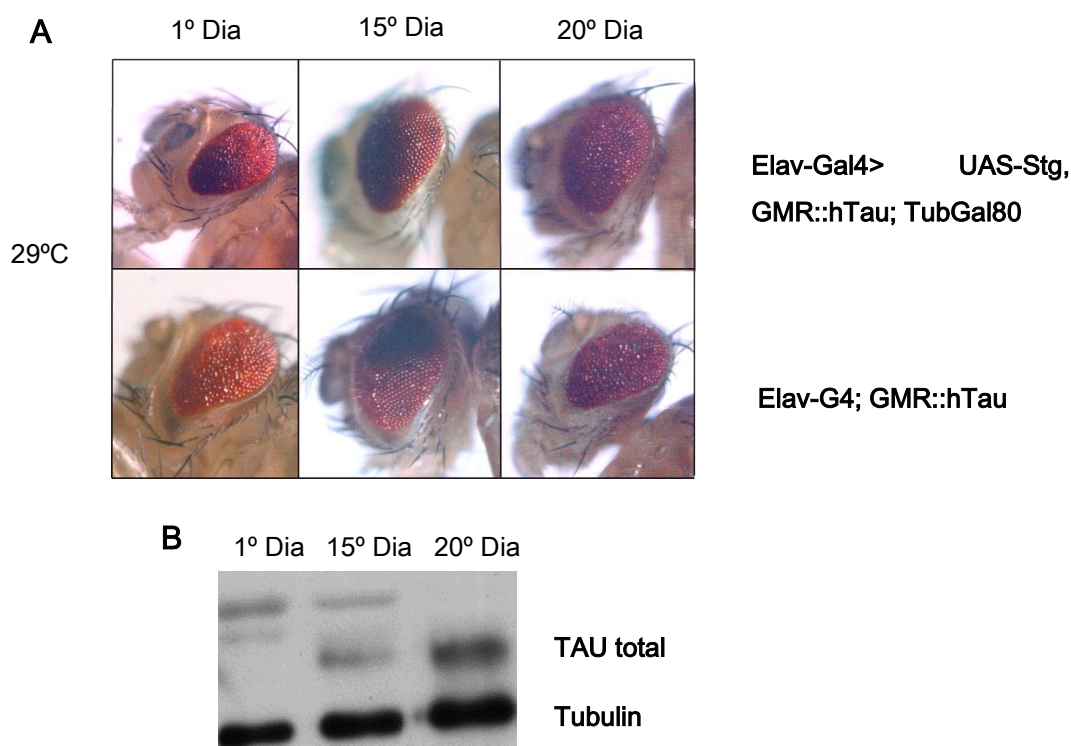


Figura 24 – Análise do efeito da expressão de Stg quando a doença já esta estabelecida. Análise do fenótipo em olho adulto (A) e dos níveis de fosforilação de Tau ao longo dos 20 dias (B). Na condição de co-expressão de hTau e Stg.Gal80, verifica-se que no 1ºDia a retina apresenta fenótipo, ao fim de 15 dias Stg tem a capacidade de reverter o fenótipo e ao 20ºDia o fenótipo piorou. Relativamente aos olhos que expressam hTau ao longo do tempo o fenótipo piora. Relativamente aos níveis de fosforilação de Tau verifica-se que se formam 2 bandas de Tau a referente à fosforilação e a referente à desfosforilação. Na condição de co-expressão hTau e Stg.Gal80 à medida que o tempo avança Stg tem a capacidade de desfosforilar Tau.

## 4 DISCUSSÃO

As formas hiperfosforiladas da proteína Tau são os principais constituintes das tranças neurofibrilares que caracterizam as tauopatias (Shulman e Feany, 2003). *In vitro*, a hiperfosforilação de Tau impede a ligação aos microtúbulos (Jellinger, 2012). A formação de NFTs associada ao aumento da fosforilação de Tau foi recentemente demonstrada por sobreexpressão de uma isoforma mutante de hTau (Bolkan e Kretschmar, 2014). Vários estudos abordaram a correlação entre o padrão de hiperfosforilação de Tau e a formação de agregados, com o avanço da doença (Bolkan e Kretschmar, 2014).

As causas de neurodegeneração induzida por hTau tem sido investigada em *Drosophila*. Genes endógenos de *Drosophila*, principalmente cinases e fosfatases, melhoram ou suprimem a toxicidade promovida pela expressão ectópica de hTau (Steinhilb et al, 2007; Shulman e Feany, 2003). Cinases, como a MARK, e fosfatases, como PP1 e PP2A, alteram o estado de fosforilação de Tau *in vitro* (Shulman e Feany, 2003). Estes estudos têm contribuído para identificar cinases e fosfatases responsáveis pelo equilíbrio dinâmico da fosforilação de Tau (Tenreiro et al, 2014).

A fosfatase codificada por *string* é considerada como um dos possíveis moduladores da neurotoxicidade da proteína Tau (Shulman e Feany, 2003). O primeiro objectivo deste trabalho consistiu em avaliar Stg como um potencial regulador da atividade e toxicidade da proteína Tau utilizando a retina de *Drosophila* como modelo (Fig. 17 a 24). O segundo objectivo foi avaliar como a expressão de Tau humana pode afetar o olho durante o desenvolvimento e em fase adulta e consequentemente contribuir para a neurodegeneração (Fig. 6 a 12).

As linhas utilizadas para sobreexpressar as diferentes isoformas hTau foram caracterizadas para avaliar o fenótipo associado à sua expressão. Estas isoformas derivam da isoforma selvagem 2N4R, sendo a forma resultante da fusão do promotor GMR-G4, a que apresentou o fenótipo mais severo (Fig. 6) Esta isoforma foi então escolhida para caracterizar o fenótipo de sobre-expressão de hTau no terceiro estadio larvar e avaliar as consequências da expressão de hTau durante o desenvolvimento

do olho de *Drosophila* (Fig 7 a 12), bem como o papel de Stg na modulação do fenótipo (Fig. 17 a 22). A sobreexpressão de hTau provoca alterações a nível da organização de omatídeos e da projeção dos axónios dos fotorreceptores da lâmina para a medula (Fig. 7 e 8), que podem comprometer a transmissão de informação do olho para o cérebro. Verificámos ainda que durante a co-expressão de Stg e hTau não ocorreram alterações assinaláveis na organização dos omatídeos e na morfologia dos axónios dos fotorreceptores (Fig. 17 e 18). Os resultados obtidos sugerem um papel relevante de Stg na modulação da toxicidade de Tau.

Estudos anteriores evidenciaram que muitas das estruturas que apresentam marcadores de ciclo celular anormais são agregados neurofibrilares (NFTs) (*Khurana e Feany, 2007*). A re-entrada no ciclo celular tem sido considerada como um dos mecanismos conducentes à morte neuronal durante a neurodegeneração (*Khurana e Feany, 2007*). Neste trabalho, a re-entrada em ciclo de células pós-mitóticas em resposta à sobreexpressão de hTau não foi evidenciada pelos marcadores de ciclo celular, ciclina B, PH3 e BrdU (Fig. 9 a 12). Os resultados obtidos pela imunomarcação de ciclina B em células que expressam hTau sugerem que pode ocorrer re-entrada em ciclo celular, uma vez que detetámos fotorreceptores que acumulam ciclina B (Fig. 9). Após marcação com PH3, não foi detetado nenhum fotorreceptor a re-entrar em ciclo, no entanto foi visualizado células retidas em mitose na segunda onda mitótica.

Estudos anteriores revelam que a incorporação com BrdU pode confirmar uma re-entrada em ciclo celular pelo facto da célula efetuar replicação de DNA (*Andorfer et al., 2005*). No entanto, não foi observado fotorreceptores em fase S, apenas na segunda onda mitótica foi observado uma maior extensão de células BrdU positivas. Esta análise permite-nos concluir que a sobre-expressão hTau causa desregulação do ciclo celular: na segunda onda mitótica as células permanecem em mitose e as células diferenciadas mantêm níveis elevados de ciclina B.

Os nossos resultados não concluem que a re-entrada em ciclo de neurónios pós-mitóticos em *Drosophila* deve-se à expressão de hTau. Sabendo que Stg é homólogo de Cdc25, um regulador da transição G2/M do ciclo celular, é esperado que esta fosfatase tenha uma função determinante no controlo da transição G2/M. Perante os resultados obtidos, conclui-se que após co-expressão de hTau e Stg as células

diferenciadas, entre elas os fotorreceptores, não re-entram em ciclo. Sendo mais uma vantagem deste modulador de neurotoxicidade de Tau.

Neste trabalho avaliamos se as alterações provocadas pela expressão de hTau elevam os níveis de morte celular (Fig. 12). Os resultados obtidos sugerem a inexistência de correlação entre a expressão ectópica de hTau e a ocorrência de morte celular dos fotorreceptores por apoptose nos discos imaginais de *Drosophila*. De facto, a marcação de caspase 3 foi notória principalmente na região da segunda onda mitótica, tal como anteriormente observado por as células estarem mais propícias a erros durante as fases do ciclo celular do que quando já estão diferenciadas (*Yang et al, 2003*).

Estudos anteriores identificaram algumas das proteíno- cinases responsáveis pela hiperfosforilação de Tau (*Jackson et al, 2002; Nishimura, 2004*), cuja relevância etiológica para as tauopatias tem sido salientada por muitos autores.

Shulman e Feany (*Shulman e Feany, 2003*) demonstraram que a sobre-expressão da proteíno-fosfatase Stg reverte o fenótipo resultante da expressão de uma isoforma mutante de Tau humana (hTau<sup>V337M</sup>) no olho adulto de *Drosophila*. Este estudo sugere que Stg é capaz de desfosforilar hTau.

No nosso trabalho avaliamos o desempenho de Stg como modulador dos níveis de fosforilação de Tau. Os resultados obtidos sugerem que na presença de Stg os níveis de fosforilação de hTau são reduzidos (Fig. 23 e 24) sendo uma evidência que Stg é um possível regulador dos níveis de fosforilação de Tau.

Além disso, foi avaliada a capacidade de Stg reverter o fenótipo na retina de *Drosophila* pela sobre-expressão de hTau (Fig. 17 a 22) e a capacidade de regular os níveis de fosforilação num contexto em que o fenótipo já estava estabelecido (Fig. 23 e 24). De acordo com os resultados obtidos, Stg não reverte o fenótipo associado à expressão de hTau em *Drosophila* apesar de diminuir o nível da fosforilação de Tau quando o fenótipo já está estabelecido (Fig. 24). Conclui-se que Stg tem a capacidade de desfosforilar Tau (Fig. 23), constatando-se a importância desta fosfatase para possíveis efeitos terapêuticos em tauopatias.





## 5 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

As principais conclusões deste trabalho são:

- Stg tem a capacidade de reverter a desorganização da estrutura da retina de *Drosophila* provocada pela expressão de hTau.
- Stg facilita a saída de ciclo celular, na segunda onda mitótica, dos fotorreceptores em *Drosophila*.
- Stg regula os níveis de fosforilação de Tau em *Drosophila*.
- Stg não reverte o fenótipo associado à expressão de hTau em *Drosophila* quando o fenótipo já está estabelecido.

Em suma Stg tem a capacidade de modular a neurotoxicidade de Tau.

Como perspetivas futuras de desenvolvimento do estudo efetuado propõe-se:

- A identificação dos fosfoepítos desfosforilados por Stg.
- A identificação das vias de sinalização (GSK3, Par-1) envolvidas na regulação do grau de hiperfosforilação de Tau e que podem estar associadas a Stg.



## **BIBLIOGRAFIA**

- Amniai, Laziza, Pascale Barbier, Alain Sillen, Jean-Michel Wieruszeski, Vincent Peyrot, Guy Lippens, and Isabelle Landrieu. 2009. "Alzheimer Disease Specific Phosphoepitopes of Tau Interfere with Assembly of Tubulin but Not Binding to Microtubules." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (4): 1146–52. Doi:10.1096/fj.08-121590.
- Andorfer, Cathy, Christopher M. Acker, Yvonne Kress, Patrick R. Hof, Karen Duff, and Peter Davies. 2005. "Cell-Cycle Reentry and Cell Death in Transgenic Mice Expressing Nonmutant Human Tau Isoforms." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (22): 5446–54. Doi:10.1523/JNEUROSCI.4637-04.2005.
- Andreadis, A., W. M. Brown, and K. S. Kosik. 1992. "Structure and Novel Exons of the Human Tau Gene." *Biochemistry* 31 (43): 10626–33.
- Bancher, C., I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, V. A. Fried, H. T. Smith, and H. M. Wisniewski. 1991. "Abnormal Phosphorylation of Tau Precedes Ubiquitination in Neurofibrillary Pathology of Alzheimer Disease." *Brain Research* 539 (1): 11–18.
- Bolkan, Bonnie J., and Doris Kretschmar. 2014. "Loss of Tau Results in Defects in Photoreceptor Development and Progressive Neuronal Degeneration in *Drosophila*." *Developmental Neurobiology* 74 (12): 1210–25. Doi:10.1002/dneu.22199.
- Bonini, Nancy M., and Mark E. Fortini. 2003. "Human Neurodegenerative Disease Modeling Using *Drosophila*." *Annual Review of Neuroscience* 26: 627–56. Doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131425.
- Brady, R. M., R. P. Zinkowski, and L. I. Binder. 1995. "Presence of Tau in Isolated Nuclei from Human Brain." *Neurobiology of Aging* 16 (3): 479–86.
- Buée, L., T. Bussièrre, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, and P. R. Hof. 2000. "Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders." *Brain Research. Brain Research Reviews* 33 (1): 95–130.
- Caceres, A., S. Potrebic, and K. S. Kosik. 1991. "The Effect of Tau Antisense Oligonucleotides on Neurite Formation of Cultured Cerebellar Macroneurons." *The*

Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 11 (6): 1515–23.

Chang, Kuei-Hua, Fabien Vincent, and Kavita Shah. 2012. “Deregulated Cdk5 Triggers Aberrant Activation of Cell Cycle Kinases and Phosphatases Inducing Neuronal Death.” *Journal of Cell Science* 125 (Pt 21): 5124–37. Doi:10.1242/jcs.108183.

Chatterjee, Shreyasi, Tzu-Kang Sang, George M. Lawless, and George R. Jackson. 2009. “Dissociation of Tau Toxicity and Phosphorylation: Role of GSK-3beta, MARK and Cdk5 in a *Drosophila* Model.” *Human Molecular Genetics* 18 (1): 164–77. Doi:10.1093/hmg/ddn326.

Chau, Katy Wing-Kam, Wood-Yee Chan, Pang Chui Shaw, and Ho-Yin Edwin Chan. 2006. “Biochemical Investigation of Tau Protein Phosphorylation Status and Its Solubility Properties in *Drosophila*.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346 (1): 150–59. Doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.112.

Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan, and N. Hirokawa. 1992. “Projection Domains of MAP2 and Tau Determine Spacings between Microtubules in Dendrites and Axons.” *Nature* 360 (6405): 674–77. Doi:10.1038/360674a0.

Clandinin, Thomas R., and S. Lawrence Zipursky. 2002. “Making Connections in the Fly Visual System.” *Neuron* 35 (5): 827–41.

Clandinin, T. R., and S. L. Zipursky. 2000. “Afferent Growth Cone Interactions Control Synaptic Specificity in the *Drosophila* Visual System.” *Neuron* 28 (2): 427–36.

Cowan, Catherine M., and Amrit Mudher. 2013. “Are Tau Aggregates Toxic or Protective in Tauopathies?” *Frontiers in Neurology* 4: 114. Doi:10.3389/fneur.2013.00114.

Cowan, Catherine M., Megan A. Sealey, Shmma Quraishe, Marie-Therese Targett, Kristen Marcellus, Douglas Allan, and Amritpal Mudher. 2011. “Modelling Tauopathies in *Drosophila*: Insights from the Fruit Fly.” *International Journal of Alzheimer’s Disease* 2011: 598157. Doi:10.4061/2011/598157.

Crowther, R. A. 1991. "Straight and Paired Helical Filaments in Alzheimer Disease Have a Common Structural Unit." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (6): 2288–92.

Cuchillo-Ibanez, Inmaculada, Anjan Seereeram, Helen L. Byers, Kit-Yi Leung, Malcolm A. Ward, Brian H. Anderton, and Diane P. Hanger. 2008. "Phosphorylation of Tau Regulates Its Axonal Transport by Controlling Its Binding to Kinesin." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (9): 3186–95. Doi:10.1096/fj.08-109181.

Dill, M., R. Wolf, and M. Heisenberg. 1993. "Visual Pattern Recognition in *Drosophila* Involves Retinotopic Matching." *Nature* 365 (6448): 751–53. Doi:10.1038/365751a0.

Dixit, Ram, Jennifer L. Ross, Yale E. Goldman, and Erika L. F. Holzbaur. 2008. "Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau." *Science (New York, N.Y.)* 319 (5866): 1086–89. Doi:10.1126/science.1152993.

Duffy, Joseph B. 2002. "GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 34 (1-2): 1–15. Doi:10.1002/gene.10150.

Ferreira, A., J. Busciglio, and A. Cáceres. 1989. "Microtubule Formation and Neurite Growth in Cerebellar Macroneurons Which Develop in Vitro: Evidence for the Involvement of the Microtubule-Associated Proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau." *Brain Research. Developmental Brain Research* 49 (2): 215–28.

Fortini, M. E., and N. M. Bonini. 2000. "Modeling Human Neurodegenerative Diseases in *Drosophila*: On a Wing and a Prayer." *Trends in Genetics: TIG* 16 (4): 161–67.

Frost, Bess, and Marc I. Diamond. 2010. "Prion-like Mechanisms in Neurodegenerative Diseases." *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (3): 155–59. Doi:10.1038/nrn2786.

Gong, C. X., T. J. Singh, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1993. "Phosphoprotein Phosphatase Activities in Alzheimer Disease Brain." *Journal of Neurochemistry* 61 (3): 921–27.

Goode, B. L., P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson, and S. C. Feinstein. 1997. "Functional Interactions between the Proline-Rich and Repeat

Regions of Tau Enhance Microtubule Binding and Assembly.” *Molecular Biology of the Cell* 8 (2): 353–65.

Guo, Jing L., and Virginia M.-Y. Lee. 2011. “Seeding of Normal Tau by Pathological Tau Conformers Drives Pathogenesis of Alzheimer-like Tangles.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (17): 15317–31. Doi:10.1074/jbc.M110.209296.

Hanger, Diane P., Brian H. Anderton, and Wendy Noble. 2009. “Tau Phosphorylation: The Therapeutic Challenge for Neurodegenerative Disease.” *Trends in Molecular Medicine* 15 (3): 112–19. Doi:10.1016/j.molmed.2009.01.003.

Hardy, J., and D. Allsop. 1991. “Amyloid Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer’s Disease.” *Trends in Pharmacological Sciences* 12 (10): 383–88.

Himmler, A. 1989. “Structure of the Bovine Tau Gene: Alternatively Spliced Transcripts Generate a Protein Family.” *Molecular and Cellular Biology* 9 (4): 1389–96.

Hirokawa, N., Y. Shiomura, and S. Okabe. 1988. “Tau Proteins: The Molecular Structure and Mode of Binding on Microtubules.” *The Journal of Cell Biology* 107 (4): 1449–59.

Hoover, Brian R., Miranda N. Reed, Jianjun Su, Rachel D. Penrod, Linda A. Kotilinek, Marianne K. Grant, Rose Pitstick, et al. 2010. “Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration.” *Neuron* 68 (6): 1067–81. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.030.

Hutton, M., J. Lewis, D. Dickson, S. H. Yen, and E. McGowan. 2001. “Analysis of Tauopathies with Transgenic Mice.” *Trends in Molecular Medicine* 7 (10): 467–70.

Jackson, George R., Martina Wiedau-Pazos, Tzu-Kang Sang, Naveed Wagle, Carlos A. Brown, Sasan Massachi, and Daniel H. Geschwind. 2002. “Human Wild-Type Tau Interacts with Wntless Pathway Components and Produces Neurofibrillary Pathology in *Drosophila*.” *Neuron* 34 (4): 509–19.

Jeibmann, Astrid, and Werner Paulus. 2009. “*Drosophila Melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases.” *International Journal of Molecular Sciences* 10 (2): 407–40. doi:10.3390/ijms10020407.

Jellinger, Kurt A. 2012. "Interaction between Pathogenic Proteins in Neurodegenerative Disorders." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16 (6): 1166–83. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01507.x.

Kanai, Y., J. Chen, and N. Hirokawa. 1992. "Microtubule Bundling by Tau Proteins in Vivo: Analysis of Functional Domains." *The EMBO Journal* 11 (11): 3953–61.

Khurana, Vikram, and Mel B. Feany. 2007. "Connecting Cell-Cycle Activation to Neurodegeneration in *Drosophila*." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1772 (4): 446–56. doi:10.1016/j.bbadis.2006.10.007.

Lansbury, Peter T., and Hilal A. Lashuel. 2006. "A Century-Old Debate on Protein Aggregation and Neurodegeneration Enters the Clinic." *Nature* 443 (7113): 774–79. doi:10.1038/nature05290.

Lebouvier, Thibaud, Timothy M. E. Scales, Ritchie Williamson, Wendy Noble, Charles Duyckaerts, Diane P. Hanger, C. Hugh Reynolds, Brian H. Anderton, and Pascal Derkinderen. 2009. "The Microtubule-Associated Protein Tau Is Also Phosphorylated on Tyrosine." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 18 (1): 1–9. doi:10.3233/JAD-2009-1116.

Lindwall, G., and R. D. Cole. 1984. "Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly." *The Journal of Biological Chemistry* 259 (8): 5301–5.

Liu, Fei, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, and Cheng-Xin Gong. 2005. "Contributions of Protein Phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the Regulation of Tau Phosphorylation." *The European Journal of Neuroscience* 22 (8): 1942–50. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x.

Li, Xiao-Jiang, Meyer Friedman, and Shihua Li. 2007. "Interacting Proteins as Genetic Modifiers of Huntington Disease." *Trends in Genetics: TIG* 23 (11): 531–33. doi:10.1016/j.tig.2007.07.007.

Mandelkow, Eckhard, Martin von Bergen, Jacek Biernat, and Eva-Maria Mandelkow. 2007. "Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's

Disease.” *Brain Pathology* (Zurich, Switzerland) 17 (1): 83–90. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x.

Mandelkow, E.-M., K. Stamer, R. Vogel, E. Thies, and E. Mandelkow. 2003. “Clogging of Axons by Tau, Inhibition of Axonal Traffic and Starvation of Synapses.” *Neurobiology of Aging* 24 (8): 1079–85.

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., & Terro, F. 2013. Tau protein phosphatases in Alzheimer’s disease: The leading role of PP2A. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 39–49. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.008>

Matus, A. 1994. “Stiff Microtubules and Neuronal Morphology.” *Trends in Neurosciences* 17 (1): 19–22.

Morfini, Gerardo A., Matthew Burns, Lester I. Binder, Nicholas M. Kanaan, Nichole LaPointe, Daryl A. Bosco, Robert H. Brown, et al. 2009. “Axonal Transport Defects in Neurodegenerative Diseases.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (41): 12776–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.3463-09.2009.

Nishimura, Isao, Yufeng Yang, and Bingwei Lu. 2004. “PAR-1 Kinase Plays an Initiator Role in a Temporally Ordered Phosphorylation Process That Confers Tau Toxicity in *Drosophila*.” *Cell* 116 (5): 671–82.

Ready, D. F., T. E. Hanson, and S. Benzer. 1976. “Development of the *Drosophila* Retina, a Neurocrystalline Lattice.” *Developmental Biology* 53 (2): 217–40.

Reiter, L. T., L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov, and E. Bier. 2001. “A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences in *Drosophila Melanogaster*.” *Genome Research* 11 (6): 1114–25. doi:10.1101/gr.169101.

Ross, Christopher A., and Michelle A. Poirier. 2004. “Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease.” *Nature Medicine* 10 Suppl (July): S10–17. doi:10.1038/nm1066.

Schulz-Schaeffer, Walter J. 2010. “The Synaptic Pathology of Alpha-Synuclein Aggregation in Dementia with Lewy Bodies, Parkinson’s Disease and Parkinson’s



Disease Dementia.” *Acta Neuropathologica* 120 (2): 131–43. doi:10.1007/s00401-010-0711-0.

Shulman, Joshua M., and Mel B. Feany. 2003. “Genetic Modifiers of Tauopathy in *Drosophila*.” *Genetics* 165 (3): 1233–42.

Silver, Serena J., and Ilaria Rebay. 2005. “Signaling Circuitries in Development: Insights from the Retinal Determination Gene Network.” *Development (Cambridge, England)* 132 (1): 3–13. doi:10.1242/dev.01539.

Sivanantharajah, Lovesha, and Bing Zhang. 2015. “Current Techniques for High-Resolution Mapping of Behavioral Circuits in *Drosophila*.” *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 201 (9): 895–909. doi:10.1007/s00359-015-1010-y.

Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow, and E.-M. Mandelkow. 2002. “Tau Blocks Traffic of Organelles, Neurofilaments, and APP Vesicles in Neurons and Enhances Oxidative Stress.” *The Journal of Cell Biology* 156 (6): 1051–63. doi:10.1083/jcb.200108057.

Steinhilb, Michelle L., Dora Dias-Santagata, Tudor A. Fulga, Daniel L. Felch, and Mel B. Feany. 2007. “Tau Phosphorylation Sites Work in Concert to Promote Neurotoxicity in Vivo.” *Molecular Biology of the Cell* 18 (12): 5060–68. doi:10.1091/mbc.E07-04-0327.

Steinhilb, Michelle L., Dora Dias-Santagata, Erin E. Mulkearns, Joshua M. Shulman, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, and Mel B. Feany. 2007. “S/P and T/P Phosphorylation Is Critical for Tau Neurotoxicity in *Drosophila*.” *Journal of Neuroscience Research* 85 (6): 1271–78. doi:10.1002/jnr.21232.

Sultana, Rukhsana, and D. Allan Butterfield. 2010. “Role of Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 19 (1): 341–53. doi:10.3233/JAD-2010-1222.

Talimat-Amar, Yasmina, Yoan Arribat, Christelle Redt-Clouet, Sébastien Feuillet, Anne-Laure Bougé, Magalie Lecourtois, and Marie-Laure Parmentier. 2011. “Important

Neuronal Toxicity of Microtubule-Bound Tau in Vivo in *Drosophila*.” *Human Molecular Genetics* 20 (19): 3738–45. doi:10.1093/hmg/ddr290.

Tenreiro, Sandra, Katrin Eckermann, and Tiago F. Outeiro. 2014. “Protein Phosphorylation in Neurodegeneration: Friend or Foe?” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7: 42. doi:10.3389/fnmol.2014.00042.

Terry, R. D., E. Masliah, D. P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L. A. Hansen, and R. Katzman. 1991. “Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer’s Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment.” *Annals of Neurology* 30 (4): 572–80. doi:10.1002/ana.410300410.

Tomlinson, A., and D. F. Ready. 1987. “Neuronal Differentiation in *Drosophila* Ommatidium.” *Developmental Biology* 120 (2): 366–76.

Tweedie-Cullen, Y., Park, C. S., & Mansuy, I. M. 2010. Protein phosphatases in the brain: regulation, function and disease. In *Protein Reviews* (Vol. 13, pp. 233–257). <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-6382-6>

van Swieten, John, and Maria Grazia Spillantini. 2007. “Hereditary Frontotemporal Dementia Caused by Tau Gene Mutations.” *Brain Pathology* (Zurich, Switzerland) 17 (1): 63–73. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00052.x.

Walsh, Dominic M., and Dennis J. Selkoe. 2004. “Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer’s Disease.” *Neuron* 44 (1): 181–93. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.010.

Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. “A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858–62.

Wentzell, Jill, and Doris Kretschmar. 2010. “Alzheimer’s Disease and Tauopathy Studies in Flies and Worms.” *Neurobiology of Disease* 40 (1): 21–28. doi:10.1016/j.nbd.2010.03.007.

Wittmann, C. W., M. F. Wszolek, J. M. Shulman, P. M. Salvaterra, J. Lewis, M. Hutton, and M. B. Feany. 2001. “Tauopathy in *Drosophila*: Neurodegeneration without

Neurofibrillary Tangles.” *Science* (New York, N.Y.) 293 (5530): 711–14.  
doi:10.1126/science.1062382.

Wolff, T., and D. F. Ready. 1991. “The Beginning of Pattern Formation in the *Drosophila* Compound Eye: The Morphogenetic Furrow and the Second Mitotic Wave.” *Development* (Cambridge, England) 113 (3): 841–50.

Yang, Yan, Elliott J. Mufson, and Karl Herrup. 2003. “Neuronal Cell Death Is Preceded by Cell Cycle Events at All Stages of Alzheimer’s Disease.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (7): 2557–63.

Yoshizaki, Chihiro, Mariko Tsukane, and Takashi Yamauchi. 2004. “Overexpression of Tau Leads to the Stimulation of Neurite Outgrowth, the Activation of Caspase 3 Activity, and Accumulation and Phosphorylation of Tau in Neuroblastoma Cells on cAMP Treatment.” *Neuroscience Research* 49 (4): 363–71.  
doi:10.1016/j.neures.2004.04.005.