



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Ιατρική Σχολή
Π.Μ.Σ. Νευροεπιστήμες

Διπλωματική Εργασία

"Μελέτη του μηχανισμού δράσης συνθετικών μικρονευροτροφινών στους υποδοχείς νευροτροφινών σε νευρικά κύτταρα."

Παπαδοπούλου Μαρία-Άννα

Επιβλέπων Καθηγητής,
Χαραλαμπόπουλος Ιωάννης

Ηράκλειο, 2018

"Study of the mechanisms of action of synthetic microneurotrophins on neurotrophin receptors on neuronal cells."

Τριμελής Επιτροπή

Γραβάνης Αχιλλέας, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή

Θερμού Κυριακή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή

Χαραλαμπίδης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων	4
Ευχαριστίες	5
Περίληψη.....	6
Abstract	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Νευροτροφίνες	10
Υποδοχείς Νευροτροφινών	11
Υποδοχείς Trk	12
Υποδοχέας p75NTR.....	14
1.2. Νευροστεροειδή	17
Διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA).....	17
Βιολογική Δράση της DHEA	18
1.3. Νευροεκφύλιση και Νευροπροστασία	20
1.4. Απόπτωση νευρικών κυττάρων.....	21
1.5. Συνθετικά Ανάλογα – Παράγωγα της DHEA	22
Χημικό Ανάλογο 27 (BNN27)	24
Χημικό ανάλογο 20 (BNN20).....	24
Συνθετικά ανάλογα που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία	25
1.6. Σκοπός της Εργασίας.....	26
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
3. Αποτελέσματα	33
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση	45
5. Βιβλιογραφία.....	51

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς, τον επιβλέποντα καθηγητή κ.Ιωάννη Χαραλαμπίδου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου Αναγεννητικής Φαρμακολογίας. Η βοήθειά του, το ενδιαφέρον και οι παρατηρήσεις του, όλο αυτό το διάστημα υπήρξαν για μένα πολύτιμα αγαθά, όχι μόνο για την επιτέλεση της παρούσας ερευνητικής εργασίας αλλά και για οποιαδήποτε μελλοντική μου ενασχόληση.

Επίσης, δε θα μπορούσα να παραλείψω την κ.Θερμού, διευθύντρια του ΠΜΣ των Νευροεπιστημών για τις συμβουλές που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Τόσο η κ. Θερμού, όσο και ο κ.Χαραλαμπίδου, μου προσέφεραν ηθική υποστήριξη και επιστημονική καθοδήγηση. Η συμβολή και των δύο υπήρξε καθοριστική στις αποφάσεις μου για τη μετέπειτά μου πορεία. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Γραβάνη, για τον χρόνο που διέθεσε για την αξιολόγηση της εν λόγω εργασίας.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ, οφείλω στην οικογένειά μου, για την υποστήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια. Τους είμαι ευγνώμων για την υπομονή και κατανόησή τους, για την εμπιστοσύνη τους σε κάθε μου απόφαση αλλά κυρίως για την αγάπη που μου δείχνουν.

Για το τέλος άφησα την ομάδα του εργαστηρίου Αναγεννητικής Φαρμακολογίας. Σε κάθε έναν από αυτούς οφείλω ένα ξεχωριστό ευχαριστώ. Στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Καραλή Κανερίνα για την άποψη σχέση και συνεργασία μας, για τη βοήθεια που μου παρείχε, καθώς και για τις συμβουλές που με τόση χαρά μου έδωσε και στην υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Κόκκαλη, για τη συνεργασία και βοήθεια όλο αυτό το διάστημα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μουράτ Βεζήρ και Χρυσάνθη Βουτυράκη, καθώς και στην προπτυχιακή φοιτήτρια Γωγώ Σκαρμαλιωράκη, για την απεριόριστη στήριξή τους και φιλία.

Η συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα και η βοήθεια όλων, σε θεωρητικά και πρακτικά προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου, θα αποτελούν για μένα πολύτιμη παρακαταθήκη για το μέλλον.

Εις το επανιδείν...

Περίληψη

Ο αποπτωτικός θάνατος νευρικών κυττάρων ως το κοινό τελικό φαινόμενο είναι άμεσα συνδεδεμένος με μία πληθώρα νευρολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των Νόσων Αλτσχάιμερ (NA) και Πάρκινσον, της ασθένειας του Χάντινγκτον, του εγκεφαλικού επεισοδίου και της πολλαπλής σκλήρυνσης. Τα τελευταία χρόνια πολλαπλές ερευνητικές προσπάθειες έχουν δείξει τον σημαντικό νευροπροστατευτικό ρόλο ενδογενών ουσιών, έναντι των προαναφερθέντων ασθενειών, όπως οι Νευροτροφίνες και τα Νευροστεροειδή.

Οι μεγαλομοριακές ενδογενείς νευροτροφίνες ανήκουν στην υπερικογένεια των αυξητικών παραγόντων κι αποτελούν σημαντικά μόρια ελέγχου της νευρωνικής ανάπτυξης, επιβίωσης κι επιδιόρθωσης. Οι πρωτεΐνες αυτές ταυτοποιήθηκαν αρχικά σαν παράγοντες επιβίωσης των συμπαθητικών και αισθητικών νευρώνων κι έκτοτε έχει δειχθεί πως ελέγχουν μια σειρά λειτουργιών επιβίωσης, ανάπτυξης και κυτταρικής λειτουργίας στο νευρικό ιστό. Οι βιολογικές δράσεις κάθε νευροτροφικού παράγοντα διαμεσολαβούνται ειδικά μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων Trk και του υποδοχέα p75NTR. Ωστόσο, παρά τις αποδεδειγμένες ευεργετικές τους επιδράσεις στην επιβίωση και προστασία των νευρώνων, η θεραπευτική χρησιμότητα των νευροτροφινών περιορίζεται εξαιτίας της πολυπεπτιδικής τους φύσης και της περιορισμένης διαπερατότητας τους μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB).

Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας ανέδειξαν την δυνατότητα του ενδογενούς νευροστεροειδούς διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) να εμποδίζει τη νευρωνική απόπτωση, μέσω εκλεκτικής δέσμευσής της στους υποδοχείς των νευροτροφινών, TrkA και p75NTR. Ωστόσο, η DHEA μεταβολίζεται *in vivo* σε ανδρογονικά κι οιστρογονικά στεροειδή και μπορεί να αυξήσει το ρίσκο ανάπτυξης νεοπλασιών.

Στοχεύοντας στην φαρμακολογική ανάπτυξη, μικρών μορίων, αναλόγων της DHEA, που θα μπορούσαν να μιμηθούν τα αποτελέσματα των ενδογενών νευροτροφινών, η συνεργάτης μας Δρ. Θ. Καλογεροπούλου συνέθεσε μόρια που στερούνται ενδοκρινικών παρενεργειών και τα οποία ελέγχθησαν από την ομάδα μας για τις αντι-αποπτωτικές, νευροπροστατευτικές ιδιότητες τους. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε κι αναφέρουμε την ικανότητα νέων αναλόγων να αναστρέψουν στατιστικώς σημαντικά την απόπτωση που προκαλείται λόγω στέρησης τροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες PC12 και NIH-3T3 κυττάρων. Συγκεκριμένα, δεικνύουμε μέσω της ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής και με τη χρήση της μεθόδου TUNEL, την αντι-αποπτωτική δράση τους. Τέλος, εξετάστηκε επίσης και η ικανότητά τους να επάγουν τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων Trk, σε κύτταρα σταθερά διαμολυσμένα με το cDNA του υποδοχέα που μελετούνταν κάθε φορά.

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη μικρομοριακών αναλόγων της DHEA, που στερούνται ενδοκρινικών δράσεων και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, παρέχει την δυνατότητα

ανάπτυξης νέων συνθετικών μορίων (lead molecules), αγωνιστών των υποδοχέων των νευροτροφινών, στοχεύοντας στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων των νευροεκφυλιστικών νόσων και του εγκεφαλικού τραύματος.

Abstract

Apoptotic cell death is the common endpoint of- and directly related to- a variety of neurological disorders, including Alzheimer's Disease (AD), Parkinson's Disease, Huntington's Disease, stroke and Multiple Sclerosis. Recent research studies have depicted the significant neuroprotective role of the endogenous neurotrophins and neurosteroids against these deleterious diseases.

The fate of neuronal cells is predominantly controlled by the effects of growth factors, such as neurotrophins. These proteins were originally identified as survival factors of sympathetic and sensory neurons and have been shown to control a series of survival, growth and cellular functions in neural tissue. The biological effects of each neurotrophic factor are specifically mediated through the high affinity Trk receptors and the low affinity p75 pan-neurotrophin receptor. However, despite their proven beneficial effects on the survival and protection of neurons, the therapeutic usefulness of neurotrophins is limited due to their polypeptide nature and limited BBB permeability.

Recent research efforts of our lab have revealed the ability of the endogenous neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) to block neuronal apoptosis by binding and activating the NGF receptors, namely TrkA and p75NTR. However, DHEA is metabolized *in vivo* to androgens and estrogens, and thus can increase the risk for hormone-dependent cancer development.

To overcome these problems, small molecules – analogs of DHEA - that could mimic the effects of neurotrophins would be therapeutically ideal. Recently, DHEA analogs have been synthesized with anti-apoptotic and neuroprotective properties lacking endocrine side effects. In the present study, we report their ability to statistically reverse apoptosis induced by serum deprivation in PC12 and NIH-3T3 cell cultures. Specifically, we have demonstrated using flow cytometry analysis on TUNEL assay, their anti-apoptotic effects. Finally, their ability to induce phosphorylation of Trk receptors was also examined in cells that are stably transfected with the receptors' cDNAs.

In conclusion, the development of small neuroprotective molecules - DHEA analogues - lacking endocrine effects and crossing the blood-brain barrier, provides the potential for the development of new lead molecules, neurotrophin receptor agonists, aiming on the development of new therapeutic approaches to neurodegenerative diseases and brain trauma.

1. Εισαγωγή

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος αποτελεί το βασικό όργανο της νόησης, της αντίληψης, της μνήμης και της συμπεριφοράς. Είναι αυτός που μας επιτρέπει να πραγματοποιούμε την κάθε μας κίνηση, την κάθε μας δραστηριότητα καθώς και το να δημιουργούμε το οποιοδήποτε συναίσθημα στην καθημερινότητά μας. Πολύ πιο περίπλοκος από ό, τι φανταζόμαστε, γεγονός που οι επιστήμονες επιβεβαιώνουν σχεδόν καθημερινά με κάθε νέα ανακάλυψη. Φαίνεται λοιπόν πως η γνώση περί της έκτασης των δυνατοτήτων του μας είναι άγνωστη, αλλά και απολύτως απαραίτητη.

Βασικό στοιχείο του ανθρώπινου εγκεφάλου, αποτελεί το νευρικό κύτταρο. Η αρχιτεκτονική δομή και οι αλληλεπιδράσεις των νευρικών κυττάρων, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η νευρογένεση αποτελούν εντατικό πεδίο έρευνας, με συμβολή στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας των νευροεκφυλιστικών παθήσεων, της γήρανσης και της νευροαναγέννησης. Οι νευροεπιστήμονες αναλαμβάνουν το δύσκολο έργο της αποκρυπτογράφησης του μυστήριου και πολύπλοκου αυτού οργάνου σχετικά με το πως δεσκατομμύρια νευρικά κύτταρα παράγονται, αναπτύσσονται, οργανώνονται κι επιδιορθώνονται τόσο αποτελεσματικά σε λειτουργικά ενεργά συστήματα, καθόλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου.

Το κίνητρο είναι διττό: να κατανοήσουμε την ανθρώπινη συμπεριφορά και να ανακαλύψουμε τρόπους πρόληψης ή θεραπείας για πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές του εγκεφάλου. Βασιζόμενοι λοιπόν στο κίνητρο αυτό, μεγάλο κομμάτι της έρευνας στο χώρο των Νευροεπιστημών, τα τελευταία χρόνια, έχει αφιερωθεί στη μελέτη ενδογενών παραγόντων με σημαντικό ρόλο στον νευρικό ιστό, όπως οι Νευροτροφίνες και οι υποδοχείς τους.

Οι νευροτροφικοί παράγοντες μπορούν να γίνουν κατανοητοί ως εκκρινόμενες πρωτεΐνες που έχουν ευρύτερη θρεπτική επίδραση στους νευρώνες. Το πρωτότυπο μόριο που πρωτοανακαλύφθηκε είναι ο νευρικός τροφικός παράγοντας (NGF, *Nerve Growth Factor*), με πειράματα που πραγματοποίησε η Rita Levi-Montalcini (Levi-Montalcini 1953). Έπειτα, στη δεκαετία του 1980-1990, το έργο των Hans Thoenen και Yves-Alain Barde άνοιξε το δρόμο για την ανακάλυψη νέων μελών αυτής της οικογένειας, όπως ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF, *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Barde et al. 1982). Παράλληλα με αυτές τις ανακαλύψεις και άλλα μέλη της οικογένειας των νευροτροφινών ανακαλύφθηκαν. Οι γνώσεις μας σχετικά με τη βιολογία των νευροτροφικών παραγόντων εντατικοποιήθηκαν τα τελευταία 15 χρόνια και έχει καταστεί εμφανές ότι τα μέλη της οικογένειας των νευροτροφινών παίζουν σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, αλλά και στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία του εγκεφάλου. Η έρευνα για τις νευροτροφίνες συνεχίζει να δίνει πολλές ελπίδες σχετικά με θεραπευτικό δυναμικό τους σε μια ευρεία ποικιλία νευροεκφυλιστικών ασθενειών, ενώ τα τελευταία

χρόνια έχει σημειωθεί εξαιρετική πρόοδος στην κατανόηση των λειτουργιών τους μέσω των υποδοχέων τους.

Άλλα ενδογενή μόρια πέραν των νευροτροφινών, με σημαντικά ευεργετικά αποτελέσματα στην λειτουργία πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένου του νευρικού, αποτελούν τα νευροστεροειδή, όπως η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Τα μόρια αυτά όπως έχει δειχθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, κατέχουν σημαντικές νευροπροστατευτικές δράσεις. Η μελέτη του τρόπου δράσης της DHEA κι η αλληλεπίδρασή της με τους υποδοχείς των νευροτροφινών, μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη φαρμακευτικών ουσιών προσαρμοσμένων να προσομοιάζουν τη δράση των τελευταίων, χωρίς όμως την πρόκληση παρενεργειών. Τέτοιες ουσίες όχι μόνο έχουν ήδη αναπτυχθεί, αλλά βρίσκονται και σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

1.1. Νευροτροφίνες

Οι νευροτροφίνες αποτελούν οικογένεια πρωτεϊνών με κύριο ρόλο την επαγωγή της επιβίωσης και της ανάπτυξης των νευρώνων, καθώς και τη ρύθμιση της ευρύτερης λειτουργίας των νευρικών κυττάρων. Ανήκουν στην κατηγορία των αυξητικών παραγόντων, που αποτελούν γενικότερα εκκρινόμενες πρωτεΐνες με την ικανότητα σηματοδότησης, έχοντας ως τελικό στόχο την επιβίωση συγκεκριμένων κυττάρων, καθώς και τη διαφοροποίηση κι ανάπτυξή τους. Εκκρίνονται από τον ιστό στόχο και δρουν παρεμποδίζοντας τον προσυναπτικό νευρώνα από την έναρξη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δίνοντας έτσι στους νευρώνες τη δυνατότητα για επιβίωση. Μπορούν επίσης να επάγουν τη διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων, προς το σχηματισμό νευρώνων (Huang & Reichardt 2001; Allen & Dawbarn 2006). Οι λειτουργίες τους περιλαμβάνουν επίσης διαδικασίες νευρογένεσης, νευροπλαστικότητας, καθώς συμβάλλουν και στην ομοίωση του πόνου (Pezet & McMahon 2006; Mcallister et al. 1999; Eriksson et al. 1998).

Ο NGF είναι ιδιαίτερα κρίσιμος για την επιβίωση και διατήρηση των συμπαθητικών και αισθητικών νευρώνων του αναπτυσσόμενου κι ώριμου νευρικού ιστού. Απελευθερώνεται από τα κύτταρα στόχους, δεσμεύεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα υψηλής χημικής συγγένειας TrkA και δύναται να ενδοκυτταρωθεί στον αποκρινόμενο νευρώνα (Lewin & Carter 2014). Το σύμπλεγμα NGF/TrkA στη συνέχεια μεταφέρεται οπισθόδρομα στο σώμα του νευρώνα (Harrington & Ginty 2013). Γενικότερα, ο υποδοχέας TrkA εκφράζεται τόσο σε νευρικά, όσο και σε μη νευρικά κύτταρα. Ο ιππόκαμπος και ο φλοιός, αποτελούν στόχο της χολινεργικής εννεύρωσης και εκφράζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του NGF στο ΚΝΣ. Σε μη νευρικά κύτταρα, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης απαντώνται στους σιελογόνους αδένες και την καρδιά (Lewin & Carter 2014).

Ακολούθησαν πειράματα που οδήγησαν στην ανακάλυψη και τη μοριακή κλωνοποίηση του BDNF, ως τροφικού παράγοντα (Barde et al. 1982). Ο BDNF αποτελεί νευροτροφικό παράγοντα που βρίσκεται τόσο στον εγκέφαλο, όσο και στην περιφέρεια. Είναι μια πρωτεΐνη που έχει δράση μέσω

του υποδοχέα υψηλής συγγένειας TrkB σε ορισμένους νευρώνες του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος και βοηθά στην επιβίωση των νευρώνων, καθώς και στην ανάπτυξη και διαφοροποίησή τους. Δραστηριοποιείται στον ιππόκαμπο, στο φλοιό, στην παρεγκεφαλίδα και στον πρόσθιο εγκέφαλο, περιοχές ζωτικής σημασίας για τη μάθηση και τη μνήμη (Hofer et al. 1990). Μεγάλο ρόλο διαδραματίζει επίσης και στη διαδικασία της νευρογένεσης, ενώ του έχει αποδοθεί μεγάλη σπουδαιότητα όσον αφορά και τον ρόλο του στην νευροπλαστικότητα (Lewin & Carter 2014).

Ανάλυση της αλληλουχίας τόσο του γονιδίου που εκφράζει τον NGF, όσο και του γονιδίου που εκφράζει τον BDNF, έδειξε ότι οι δύο πρωτεΐνες είναι δομικά συγγενείς (Leibrock et al. 1989). Οι αναλύσεις αυτές έδειξαν ότι διατηρημένες περιοχές των μεταγράφων του NGF και του BDNF επιτρέπουν το σχεδιασμό εκκινητών για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, που θα ανιχνεύσει ακολουθίες προερχόμενες και από τα δύο γονίδια. Η χρήση των εκκινητών αυτών, έφερε όμως στο φως επιπλέον μέλη της ίδιας γονιδιακής οικογένειας, όπως η νευροτροφίνη-3 (NT3) και η νευροτροφίνη-4/5 (NT4/5). Η NT-3 είναι μοναδική μεταξύ των νευροτροφινών, στον αριθμό των νευρώνων που έχει τη δυνατότητα να διεγείρει κι αυτό λόγω της ικανότητάς της να ενεργοποιεί δύο από τους υποδοχείς νευροτροφινών (TrkC και TrkB) (Davies et al. 1993; Jones & Reichardt 1990; Maisonnier et al. 1990; Berkemeier et al. 1991).

Όσον αφορά τη δομική τους κατάσταση στην ενεργή μορφή τους, οι ώριμες νευροτροφίνες υπάρχουν ως συνδεδεμένα διμερή, με μη ομοιοπολικό τρόπο μεταξύ μονομερών μοριακού βάρους ~13.500 Da (Bothwell & Shooter 1977). Οι ώριμοι παράγοντες BDNF και NT-3 αποτελούνται από 119 αμινοξέα με τον NGF να είναι μικρότερος κατά 1 αμινοξύ. Οι νευροτροφίνες εμφανίζουν περίπου 55% κοινή αλληλουχία που περιλαμβάνει έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία, στον NGF (Radziejewski et al. 1992), σχηματίζουν τρεις δισουλφιδικές γέφυρες. Δομές υψηλής ανάλυσης έχουν προσδιοριστεί για κάθε μία από τις υπάρχουσες νευροτροφίνες. Η ιδιαίτερα συντηρημένη αλληλεπίδραση των διμερών νευροτροφίνης επιτρέπει τον σχηματισμό ετεροδιμερών, μεταξύ διαφορετικών νευροτροφινών *in vitro* (Jungbluth et al. 1994).

Υποδοχείς Νευροτροφινών

Οι νευροτροφίνες αλληλεπιδρούν με τέσσερις υποδοχείς, τους TrkA, TrkB, TrkC και p75NTR. Η λειτουργία αυτών των υποδοχέων είναι πολύπλοκη, καθώς ο p75NTR (p75 NeuroTrophin Receptor) αλλά και οι υποδοχείς Trk (Tropomyosin Receptor Kinase), μπορούν να λειτουργήσουν ανεξάρτητα, σε νευρώνες που εκφράζουν και τους δύο, αλλά κι αλληλεπιδρώντας φυσικά και λειτουργικά μεταξύ τους, με τρόπους που μπορεί να μεταβάλλουν τα χαρακτηριστικά της σηματοδότησης του καθενός. Και οι τέσσερις νευροτροφίνες, τόσο ως ανώριμες μορφές που ονομάζονται προνευροτροφίνες, όσο και ως ώριμες, μπορούν να δεσμευτούν –με διαφορετικά

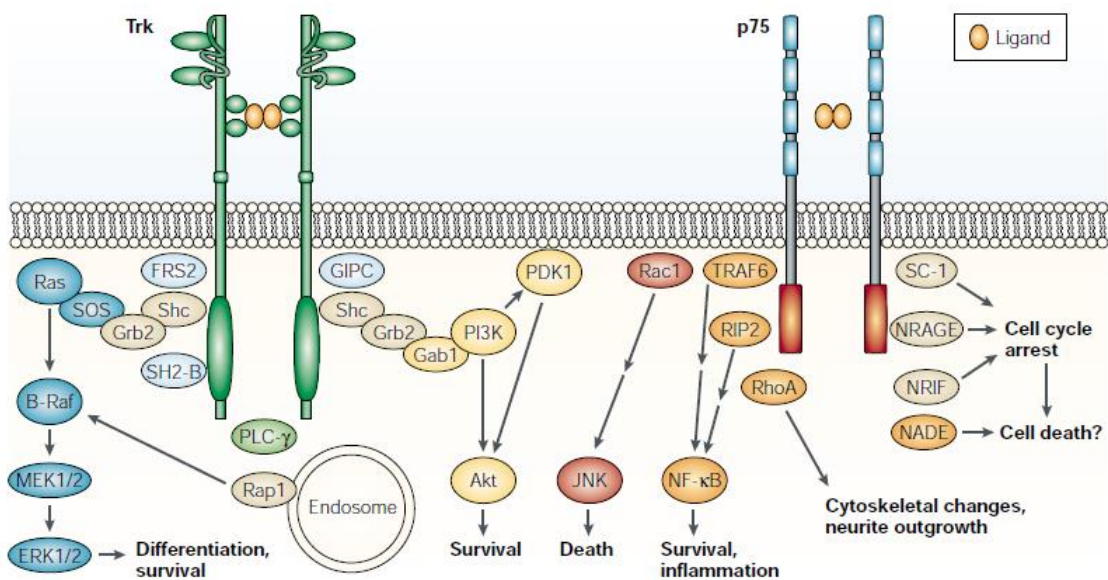
χαρακτηριστικά ωστόσο- και να ενεργοποιήσουν τη σηματοδότηση μέσω του p75NTR, όσο και μέσω των υποδοχέων Trk.

Μέσω της ταυτόχρονης ενεργοποίησης των Trk και p75NTR, οι νευροτροφίνες μπορούν να συντονίσουν τις λειτουργίες των δύο υποδοχέων, σύμφωνα με τη χωρική και χρονική έκφραση αυτών. Κατά την ανάπτυξη νευρώνων, η διαφοροποίηση προκαλείται από αυξημένα επίπεδα νευροτροφινών. Η διέγερση της απόπτωσης από τον p75NTR ρυθμίζει το μέγεθος των εξαρτώμενων από νευροτροφίνη κυτταρικών πληθυσμών και όταν αυτό επιτευχθεί και η έκφραση p75NTR δε χρειάζεται πλέον ή μπορεί να προκαλέσει υπερβολικό κυτταρικό θάνατο, τότε οι προ-επιβιωτικοί υποδοχείς Trk ασκούν έναν αντι-αποπτωτικό ρόλο και σταθεροποιούν τον νευρικό πληθυσμό (Blöchl & Blöchl 2007). Η αναλογία των υποδοχέων λοιπόν, είναι σημαντική στον τελικό αριθμό κυττάρων που θα επιβιώσουν.

Υποδοχείς Trk

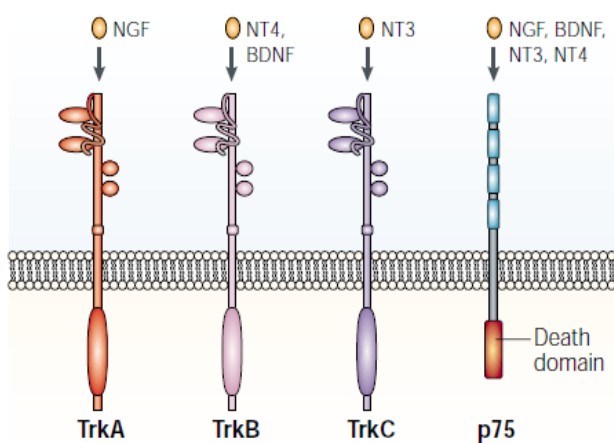
Οι νευροτροφίνες δεσμεύονται στους υποδοχείς τους και οδώνουν τον διμερισμό του υποδοχέα Trk που οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση και στην ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Τα πρώτα υποστρώματα που φωσφορυλιώνουν οι Trks, είναι η έτερη μονάδα του διμερισμένου υποδοχέα. Θέσεις/αμινοξικά κατάλοιπα με δυνατότητα αυτοφωσφορυλίωσης στην περιοχή της κινάσης παίζουν σημαντικό ρόλο. Πρόσθετες τυροσίνες στη συνέχεια αυτοφωσφορυλιώνονται σε άλλα μέρη της κυτταροπλασματικής περιοχής των περισσότερων υποδοχέων. Οι προκύπτουσες φωσφοτυροσίνες λειτουργούν ως ειδικές θέσεις για την πρόσδεση σηματοδοτικών μορίων που προσλαμβάνονται στον υποδοχέα. Τα κυτταροπλασματικά αυτά μόρια σηματοδότησης, περιέχουν Src ομολογία-2 (SH2) και περιοχές δέσμησης φωσφοτυροσίνης (PTB) (Lemmon & Schlessinger 2010).

Οι υποδοχείς Trk επηρεάζουν την νευρωνική ανάπτυξη και διαφοροποίηση μέσω της ενεργοποίησης διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι τρεις γνωστές οδοί είναι της PLCγ (φωσφολιπάση γ), της Ras/MAPK (πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο παράγοντα) και της PI3K (3-κινάση φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης) (Εικόνα 1). Αυτοί οι καταρράκτες σηματοδότησης, τελικά οδηγούν στην ενεργοποίηση παραγόντων μεταγραφής, όπως είναι ο CREB (*cAMP response element-binding protein*), οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα γονίδια-στόχους που εκφράζονται για να επάγουν, είτε την επιβίωση κυττάρων, είτε το θάνατό τους (Lemmon & Schlessinger 2010; Chao 2003).



Εικόνα 1. Σηματοδότηση υποδοχέων νευροτροφινών. Οι Trks επάγουν τη σηματοδότηση που οδηγεί στην επιβίωση, μέσω της εξωκυττάριας κινάσης Ras, μέσω της κινάσης 3φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) και της φωσφολιπάσης C-γ (PLC-γ). Ο υποδοχέας p75NTR ενεργοποιεί την NF-κB και την Jun N-τερματική κινάση (JNK) και ρυθμίζει την δραστηριότητα της RhoA. Αυτές οι αποκρίσεις διαμεσολαβούνται μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στον κυτταροπλασματική περιοχή του p75NTR (Chao 2003).

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *trk A*, μια διαμεμβρανική κινάση τυροσίνης, λειτουργεί ως υποδοχέας του NGF. Ομοίως, το προϊόν του γονιδίου *trk B*, είναι λειτουργικός υποδοχέας για τον παράγοντα BDNF και NT-4 (Squinto et al. 1991; Klein et al. 1991). Επιπλέον, η NT-3 εμφανίζει συγγένεια για τον υποδοχέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *trk C* (Lamballe et al. 1991) – (Εικόνα 2). Η NT3 λόγω του εναλλακτικού ματίσματος που υφίσταται το μετάγραφο του *TrkA*, μπορεί να ενεργοποιήσει αποτελεσματικά και τον υποδοχέα *TrkA* (Clary & Reichardt 1994). Παρ'όλα αυτά, NGF και NT3 επηρεάζουν τη σηματοδότηση μέσω *TrkA* με διαφορετικό τρόπο.

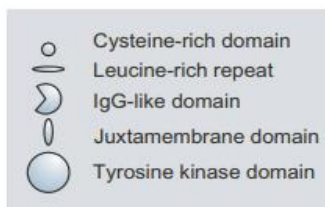
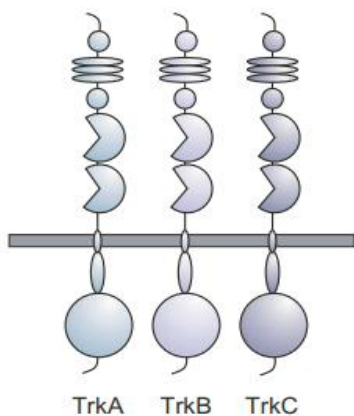


Εικόνα 2. Μοντέλα ενεργοποίησης Trk και p75NTR υποδοχέων από τους προσδέτες τους. Η κάθε νευροτροφίνη, δεσμεύεται επιλεκτικά σε συγκεκριμένο υποδοχέα, ενώ όλες δεσμεύονται στον p75NTR (Chao 2003).

Ένας ή περισσότεροι από τους τέσσερις υποδοχείς εκφράζονται σε μία ευρεία ποικιλία νευρικών και γλοιακών κυττάρων, τόσο στο κεντρικό όσο και στο

περιφερικό νευρικό σύστημα, όπως επίσης και σε μη-νευρικά κύτταρα. Έτσι, οι νευροτροφίνες παρουσιάζουν ξεχωριστές βιολογικές λειτουργίες λόγω της προτίμησης νευροτροφινών για συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς που προσδιορίζονται από συγκεκριμένο υποδοχέα. Επιπλέον, το διαφορετικό μάτισμα των μεταγράφων των TrkA, TrkB και TrkC, έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση πρωτεϊνών με διαφορές στις εξωκυτταρικές περιοχές τους, επηρεάζοντας έτσι και τις αλληλεπιδράσεις με τον προσδέτη (Pataroutian & Reichardt 2001).

Όσον αφορά τη δομή τους, οι Trks αποτελούνται από μία εξωκυττάρια περιοχή, η οποία δεσμεύει τον προσδέτη, μια διαμεμβρανική περιοχή και έναν ενδοκυτταρικό καταλυτικό τομέα, ο οποίος είναι ικανός να δεσμεύει και να φωσφορυλιώνει επιλεγμένα υποστρώματα (Εικόνα 3). Η σύνδεση ενός προσδέτη στην εξωκυτταρική περιοχή προκαλεί μια σειρά δομικών αναδιατάξεων στον υποδοχέα που οδηγούν στην ενζυματική ενεργοποίησή του. Μετά την ενεργοποίησή τους, οι υποδοχείς υποβάλλονται στη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης και το σύμπλοκο υποδοχέα με προσδέτη υφίσταται αξονική μεταφορά, και τελικά είτε την ανακύκλωση, είτε την καταστροφή του (Ginty 2002).

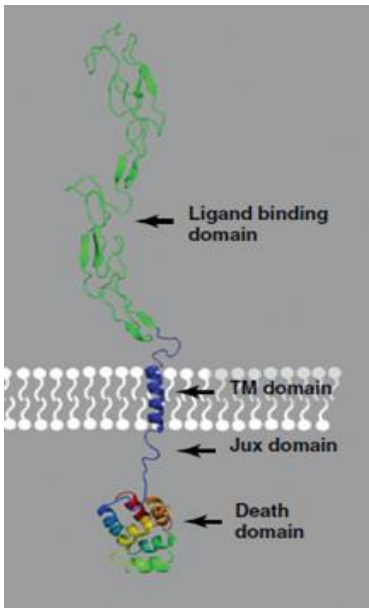


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των υποδοχέων Trk. Κάθε εξωκυτταρική περιοχή (γλυκοζυλιωμένη), περιλαμβάνει τρεις επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LRR-Leucine Rich Repeat), πλαισιωμένες από δύο επαναλήψεις κυστεΐνης και μετέπειτα από δύο περιοχές παρόμοιες των ανοσοσφαιρινών (IgG like domains). Ενδοκυττάρια, οι υποδοχείς Trk διαθέτουν την περιοχή κινάσης τυροσίνης. Τα κατάλοιπα Y490 και Y785, χρησιμεύουν ως κύριες θέσεις πρόσδεσης για την εκκίνηση της σηματοδότησης (Dechant & Barde 2002).

Υποδοχέας p75NTR

Σε αντίθεση με τους υποδοχείς Trk, οι οποίοι έχουν καθορισμένο νευροτροφικό-προστατευτικό ρόλο, ο p75NTR έχει ρόλο που κυμαίνεται από την κυτταρική επιβίωση, έως τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, έχοντας την ικανότητα δέσμευσης όλων τις νευροτροφινών. Επιπροσθέτως, ως ειδικός υψηλής συγγένειας υποδοχέας ετεροδιμεριζόμενος με την πρωτεΐνη Σορτιλίνη (sortilin) δεσμεύει εκλεκτικά τις ανώριμες μορφές των νευροτροφινών, τις προνευροτροφίνες. Είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων [Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFR)], κι ήταν το πρώτο μέλος αυτής της υπεριοικογένειας υποδοχέων που χαρακτηρίστηκαν (Radeke et al. 1987; Johnson et al.

1986). Εκφράζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος αλλά και μετά από τραυματισμό ή νευροεκφύλιση. Η δομή του, διαφέρει σε σχέση με τους Trk υποδοχείς, καθώς στερείται ενζυμικής δραστηριότητας και διαμεσολαβεί τη δράση του μέσω της περιοχής θανάτου (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Δομή υποδοχέα p75NTR. Δέσμευση με νευροτροφίνες μέσω των τεσσάρων πλούσιων σε κυστεΐνη περιοχών στην εξωκυτταρική περιοχή του (Baldwin & Shooter 1995). Πρόκειται για διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με μέγεθος 75kDa, όπου υφίσταται γλυκοζυλίωση στην εξωκυτταρική περιοχή της (Johnson et al. 1986). Το δισουλφίδιο στην διαμεμβρανική περιοχή δρα ως σημείο περιστροφής, έτσι ώστε όταν ο εξωκυτταρικός τομέας συσφίγγει πάνω στη νευροτροφίνη, οι ενδοκυτταρικές περιοχές διαχωρίζονται (Vilar et al. 2009a, 2009b). Η διάσπαση του υποδοχέα διευκολύνει τη μετέπειτα σύνδεση μορίων σηματοδότησης απαραίτητη για κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τον p75NTR. Ο ενδοκυτταρικός τομέας (ICD - "περιοχή θανάτου") του p75NTR περιέχει μια περιοχή παρόμοια με αυτή του TNFR (Chapman & Kuntz 1995; Ibáñez & Simi 2012).

Η πιο διευρημένη λειτουργία του υποδοχέα είναι η ικανότητα πρόκλησης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Μία από τις πρώτες ενδείξεις γι 'αυτό, ήταν μια μελέτη της ομάδας του Bredesen που έδειξε ότι η εκτοπική έκφραση του p75NTR σε μια σειρά νευρικών κυττάρων, αύξησε την απόπτωση μετά από στέρηση ορού (Rabizadeh et al. 1993). Η ικανότητα του p75NTR για την επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε απόκριση της δέσμευσης του προσδέτη, παρατηρείται σε μια ευρεία ποικιλία τύπων νευρικών και μη νευρικών κυττάρων. Αυτές οι μελέτες έχουν καθιερώσει αυτόν τον υποδοχέα ως κρίσιμο ρυθμιστή της αναπτυξιακής απόπτωσης.

Αυτός ο αναπτυξιακός ρόλος του p75NTR έχει χαρακτηριστεί ιδιαίτερα στους συμπαθητικούς νευρώνες. Αυτοί οι νευρώνες εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς του NGF, TrkA και p75NTR, οι οποίοι μαζί μεσολαβούν σε ένα σήμα επιβίωσης σε απόκριση στον NGF. Ωστόσο, ο Miller και συνεργάτες του έδειξαν ότι η εκλεκτική ενεργοποίηση του p75NTR από τον BDNF οδηγεί σε απόπτωση (Bamji et al. 1998).

Γενικότερα, εκφράζεται από πολλούς νευρωνικούς τύπους κυττάρων, καθώς επίσης και από νευρικά βλαστοκύτταρα, αστροκύτταρα, πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα, κύτταρα Schwann και γλοία. Εκφράζεται ευρέως στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα, αλλά και εκλεκτικά κατά την ενηλικίωση. Ωστόσο, μερικές περιοχές διατηρούν την έκφραση p75NTR σε χαμηλότερα επίπεδα συμπεριλαμβανομένων των βασικών χολινεργικών νευρώνων του προσθίου εγκεφάλου, των αισθητικών νευρώνων και των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Friedman et al. 1991; Ernfors

et al. 1989; Verge et al. 1992). Αρκετοί μη νευρικοί ιστοί εκφράζουν επίσης τον υποδοχέα κατά τη διάρκεια κάποιων σταδίων ανάπτυξης, όπως οι νεφροί και οι μύες (Ernfors & Persson 1991; Wheeler & Bothwell 1992). Έχει αποδειχθεί λοιπόν, ότι ρυθμίζει μια συστοιχία κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής επιβίωσης, του κυτταρικού κύκλου, της συναπτικής λειτουργίας και μυελίνωσης, καθώς και της πλαστικότητας. Η πολλαπλότητα των κυτταρικών αυτών λειτουργιών που ρυθμίζει, προκύπτει από την ποικιλία των μορίων που προσδέονται σε αυτόν και των συν-υποδοχέων οι οποίοι συνδέονται με το p75NTR και ρυθμίζουν τη σηματοδότησή του.

Ο p75NTR προάγει την επιβίωση μέσω αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς Trk- ρυθμίζοντας την ικανότητα πρόσδεσης του προσδέτη στους υποδοχείς Trk (Pataroutian & Reichardt 2001), αναστέλλει την αξονική αναγέννηση μέσω των υποδοχέων του Nogo (Nogo-R) και του Lingo-1, και προάγει την απόπτωση μέσω της σύνδεσης με την Sortilin (DeFreitas et al. 2001; Chao 2003). Οι προ-αποπτωτικές του δράσεις, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα λειτουργικά προσδέματα που συνδέονται σε αυτόν και την έκφραση άλλων υποδοχέων με τους οποίους αλληλεπιδρά. Η περαιτέρω σηματοδότηση, περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις που διαμορφώνονται μέσω της ενδομεμβρανικής πρωτεόλυσης (RIP) του p75NTR (Lewin & Carter 2014) (*Εικόνα 1*).

Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής NFκappaB, μέσω της αλληλεπίδρασης της RIP2 πρωτεΐνης και του p75NTR, μπορεί να οδηγήσει στην επιβίωση των νευρώνων (Vicario et al. 2015), ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την απελευθέρωση της RhoGDI από τον υποδοχέα και την επακόλουθη απενεργοποίηση της RhoA (Charalampopoulos et al. 2012). Η σύνδεση του Rho-GDI με το p75NTR μπορεί να ευοδωθεί από ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από τη γλυκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με μυελίνη (MAG) και με τον ταυτόχρονο διμερισμό των υποδοχέων NgR/Lingo1R, οι οποίοι χρησιμεύουν ως συν-υποδοχείς του p75NTR (Yamashita & Tohyama 2003).

Από την άλλη, η επαγόμενη από p75NTR φωσφορυλίωση της cJun/JNK, επάγει το κυτταρικό θάνατο. Μία ομάδα παραγόντων που συμβάλλει στην ενεργοποίηση της JNK, μέσω αλληλεπιδράσεων με την ICD του p75NTR υποδοχέα, είναι η οικογένεια των παραγόντων που σχετίζονται με τον υποδοχέα του TNF (TRAFs) (Khursigara et al. 1999).

Ο θάνατος κυττάρων που προκαλείται από p75NTR σχετίζεται και με άλλους συνυποδοχείς του, όπως η sortilin, η SorCS2 και η SorL1 (Nykjaer et al. 2004; Nykjaer & Willnow 2012), που ενεργοποιούνται επιλεκτικά μέσω της σύνδεσης προνευροτροφινών. Οι προνευροτροφίνες μπορούν να εκκριθούν για να λειτουργήσουν ως ισχυροί ενεργοποιητές της σηματοδότησης p75NTR (Lebrun-Julien et al. 2010). Επιπλέον, και άλλοι προσδέτες μπορούν να προσδεθούν σε υποδοχείς p75NTR, όπως το Αβ-αμυλοειδές (Yaar et al. 2002), καθορίζοντας έτσι και την επακόλουθη σηματοδότηση.

Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η σηματοδότηση μέσω p75NTR συμβάλλει στον νευροεκφυλισμό που προκαλείται από πολλές ασθένειες, ενώ, η σύνδεση μεταξύ του

p75NTR και της Νόσου Αλτσχάιμερ (NA) έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Εκτός από τους νευρώνες Purkinje στην παρεγκεφαλίδα, ο p75NTR εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε χολινεργικούς νευρώνες του βασικού προσθίου εγκεφάλου ενηλίκων, πληθυσμός που υφίσταται σοβαρό εκφυλισμό νωρίς στην εξέλιξη της παθολογίας της NA. Επιπλέον, αρκετές *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το Αβ-αμυλοειδές, το κύριο συστατικό που απαντάται στους εγκεφάλους ατόμων που πάσχουν από NA, είναι ένας προ-αποπτωτικός προσδέτης για τον p75NTR (Yaar et al. 1997). Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι η ενεργοποίηση του p75NTR από το Αβ συμβάλλει στον νευροεκφυλισμό. Αυτή η ιδέα όμως παρέμεινε αμφιλεγόμενη, εξαιτίας άλλων αναφορών, όπου η έκφραση του p75NTR είναι προστατευτική κατά της επαγόμενης από Αβ τοξικότητας (Bengoechea et al. 2009). Τέλος μελετάται επίσης και η εμπλοκή του proNGF στην παθολογία της NA, καθώς αυξημένη έκφραση του proNGF έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπινους εγκεφάλους ασθενών (Pedraza et al. 2005).

1.2. Νευροστεροειδή

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, περιγράφηκε από τον Etienne Baulieu η ικανότητα των νευρώνων και της γλοίας να παράγουν στεροειδή (Baulieu & -E. Baulieu 1981) μετά από το μεταβολισμό πρόδρομων ορμονών που φτάνουν εκεί μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (καθώς τόσο τα νευρικά όσο και τα γλοιακά κύτταρα του νευρικού συστήματος διαθέτουν όλα τα απαραίτητα μεταβολικά ένζυμα), αλλά και εκ νέου (*de novo*) από χοληστερόλη. Κατόπιν, στο σημείο παραγωγής τους δρουν με τρόπο αυτοκρινή ή παρακρινή (Baulieu et al. 2001). Τα νευροστεροειδή, συντίθενται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα σε νευρογλοιακά κύτταρα, σε αστροκύτταρα και νευρώνες. Έχειδειχθεί ότι τα στεροειδή τα οποία δρουν στο νευρικό σύστημα (νευροδραστικά), επηρεάζουν τη νευρωνική λειτουργία και τη διαφοροποίηση και παρέχουν νευροπροστασία (Compagnone & Mellon 2000).

Πρόσφατες μελέτες που διερευνούν τη φυσιοπαθολογία των νευροστεροειδών στη NA, έχουν δείξει σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων των νευροστεροειδών σε εγκεφαλικές περιοχές ατόμων που πάσχουν από NA σε σύγκριση με άτομα που δεν εμφανίζουν κάποια παθολογική κατάσταση. Η χορήγηση ενδογενών νευροστεροειδών στην NA δείχνει πιθανό νευροπροστατευτικό ρόλο (Brinton & Wang 2006). Όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο, τα νευροστεροειδή επάγουν γενικότερα τις λειτουργίες τους, αυτές σχετίζονται με την ενεργοποίηση υποδοχέων όπως, οι GABA_A και NMDA υποδοχείς καθώς και οι sigma-1 (σ-1) (Compagnone & Mellon 2000; Charalampopoulos et al. 2008).

Διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA)

Το πρώτο νευροστεροειδές το οποίο μελετήθηκε, ήταν η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Αποτελεί το πιο άφθονο σε συγκέντρωση στην συστηματική κυκλοφορία στεροειδές στον ενήλικο

άνθρωπο κι είναι πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση οιστρογόνων και ανδρογόνων. Η παραγωγή της επιτελείται κυρίως στα επινεφρίδια, στις γονάδες, καθώς και τοπικά στον εγκέφαλο, ενώ συντίθεται από χοληστερόλη με τη βοήθεια του ενζύμου του κυτοχρώματος 17 (CYP17). Υπάρχει σε ελεύθερη μορφή και σε συνδεδεμένη με θείο (DHEAS) (Baulieu 1998). Η DHEA που παράγεται στον εγκέφαλο, ενεργεί τοπικά με παρακρινή τρόπο, ενώ η DHEA των επινεφριδίων έχει συστημικό ρόλο. Η ημερήσια σύνθεσή της είναι συνάρτηση της ηλικίας, με μέγιστη συγκέντρωση στην πρώιμη ενήλικη ζωή, ενώ στη συνέχεια η συγκέντρωσή της στον εγκέφαλο και στην κυκλοφορία σταδιακά μειώνεται και ιδιαίτερα σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, όπως η NA (Weill-Engerer et al. 2002; Schumacher et al. 2003; Baulieu 1998; Gravanis et al. 2012).

Βιολογική Δράση της DHEA

Η DHEA ασκεί την πολλαπλή της δράση, είτε αλληλεπιδρώντας με υποδοχείς GABA_A, NMDA και υποδοχείς sigma1 ή μετά τη μετατροπή της σε οιστρογόνα και ανδρογόνα. Ωστόσο, μέχρι πρότινος δεν είχε αναφερθεί κανένας συγκεκριμένος υποδοχέας του οποίου η σηματοδότηση συμβάλει στη νευροπροστασία. Οι πρώτες μελέτες είχαν δείξει, ότι ενεργοποίηση μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης της DHEA οδηγούν σε παροδική και διαδοχική φωσφορυλίωση των MEK/ERK κινασών ή των PI3K/Akt, οι οποίες, με τη σειρά τους, ενεργοποιούν τους παράγοντες μεταγραφής CREB και NFκB, οι οποίοι ελέγχουν τη μεταγραφή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 ή στη φωσφορυλίωση/απενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής Bad πρωτεΐνης, αντίστοιχα, έχοντας ως επακόλουθο την προστασία των PC12 κυττάρων από την απόπτωση (Charalampopoulos, Margioris, et al. 2008; Charalampopoulos et al. 2006; Charalampopoulos et al. 2004).

Όσον αφορά το πειραματικό κομμάτι, τα νευροενδοκρινικά κύτταρα PC12 αποτελούν χρήσιμο μοντέλο μελέτης των μεμβρανικών δράσεων της DHEA σε νευρικά κύτταρα και αυτό γιατί δεν εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς GABA_A ή NMDA και δεν μπορούν να μεταβολίσουν την DHEA σε οιστρογόνα και ανδρογόνα (Greene & Tischler 1976). Οπότε μέσω του μοντέλου αυτού θα μπορούσε να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο η DHEA ασκεί τις μεμβρανικές δράσεις της στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και συγκεκριμένα μέσω ποιων υποδοχέων.

Τόσο ο NGF όσο και η DHEA προστατεύουν αποτελεσματικά τα νευρικά κύτταρα κατά της απόπτωσης. Η αποπτωτική τους δράση ξεκινά στην πλασματική μεμβράνη, ακολουθούμενη από ενεργοποίηση παρόμοιων μονοπατιών που οδηγούν σε αντι-αποπτωτικές δράσεις (Riccio et al. 1999). Λόγω αυτών των ομοιοτήτων, στις οδούς μεταγωγής σήματος που ενεργοποιήθηκαν από DHEA και NGF, προτάθηκε ένας ρόλος για τους υποδοχείς του NGF στην αντιαποπτωτική δράση της DHEA (Lazaridis et al., 2011).

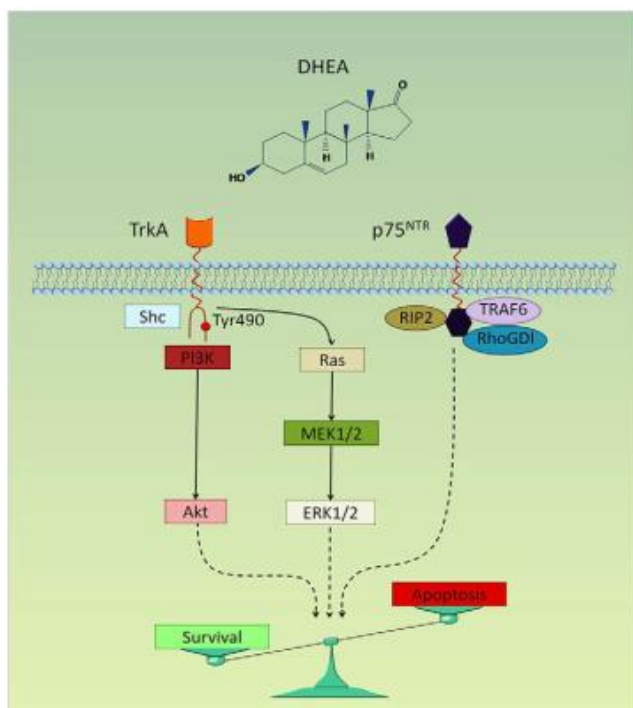
Επιπλέον, θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί, πως η DHEA και το ένζυμο CYP17, το οποίο απαιτείται για τη βιοσύνθεση της DHEA, εμφανίστηκαν νωρίς κατά την εξελικτική ιστορία. Οι

νευροτροφίνες από την άλλη, εμφανίστηκαν με την εμφάνιση των σπονδυλωτών που συμπίπτει με την ανάπτυξη ενός σύνθετου και χωρικά απομονωμένου νευρικού συστήματος (Hallböök 1999). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, υποθέτουμε ότι η DHEA θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει έναν «προγονικό» νευροτροφικό παράγοντα, καθοδηγώντας την ανάπτυξη ανατομικά απλούστερων νευρικών συστημάτων πριν από την εμφάνιση των σπονδυλωτών. Αργότερα στην εξέλιξη, όταν η πολυπλοκότητα του νευρικού συστήματος αυξήθηκε, πεπτιδικές νευροτροφίνες εξελίχθηκαν για να υποστηρίξουν και να ρυθμίσουν αποτελεσματικότερα και πιο συγκεκριμένα την ανάπτυξη του εγκεφάλου (Pediaditakis et al. 2015; Gravanis et al. 2012).

Όσον αφορά τη βιολογική της δράση, στη μελέτη των (Lazaridis et al. 2011) παρέχονται αποδείξεις ότι η DHEA δεσμεύεται στους υποδοχείς NGF. Αυτή ήταν και η πρώτη αναφορά που έδειξε την άμεση πρόσδεση ενός στεροειδούς σε υποδοχείς νευροτροφινών. Σύνδεση λοιπόν της DHEA με TrkA, έχει ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορύλιωση του TrkA και την έναρξη ενός μονοπατιού σηματοδότησης, μέσω κινασών επιβίωσης, όπως το μονοπάτι των Shc-PI3K/Akt και Src-MEK-ERK (Εικόνα 5). Επιπλέον, σύνδεση της DHEA με τον υποδοχέα p75^{NTR} επηρεάζει τη σύνδεση του p75^{NTR} με τους τελεστές TRAF6, RIP2 και RhoGDI, ενώ η αναλογία μεταξύ υποδοχέων TrkA και p75^{NTR} είναι και αυτή που εν τέλει καθορίζει, εάν η μοίρα των κυττάρων θα είναι η απόπτωση ή η επιβίωση (Lazaridis et al. 2011).

Κάνοντας ένα βήμα παρακάτω, εκτός από τα νευροπροστατευτικά αποτελέσματα και τα αποτελέσματα επιβίωσης που επιφέρει η DHEA, εμφανίζει επίσης και δράση όσον αφορά τη νευρογένεση, καθώς αυξάνει τον αριθμό των νεοσυσταθέντων νευρώνων στον αρουραίο και συγκεκριμένα στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπου (Karishma & Herbert 2002). Στην πραγματικότητα, η DHEA είναι ικανή να προάγει την νευρογένεση και την νευρωνική επιβίωση σε καλλιέργειες ανθρώπινων νευρικών βλαστικών κυττάρων και έχει αποδειχθεί ότι και τα παράγωγά

της, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστοκυττάρων μακροπρόθεσμα, δρώντας μέσω υποδοχέων NMDA και Sigma-1 (Charalampopoulos, Remboutsika, et al. 2008; Suzuki et al. 2004).



Εικόνα 5. Υποθετικό μοντέλο των σηματοδοτικών οδών των υποδοχέων NGF που εμπλέκονται στις δράσεις της DHEA. Η DHEA δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια με TrkA και p75^{NTR} (Lazaridis et al. 2011).

Στον ανθρώπινο οργανισμό κατά την εμβρυογένεση εκκρίνονται μεγάλα ποσά DHEA, τα οποία μειώνονται στους πρώτους 6 μήνες μετά τη γέννηση και αρχίζουν να αυξάνονται ξανά μετά και την ανάπτυξη της δικτυωτής μοίρας του φλοιού των επινεφριδίων. Στα μισά της δεύτερης δεκαετίας, παρατηρείται η υψηλότερη συγκέντρωση της DHEA στην κυκλοφορία του αίματος αλλά και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ αργότερα αρχίζει να μειώνεται σταδιακά, έως ότου φτάσει στο χαμηλότερο όριο γύρω στην ηλικία των 70 χρόνων (Conley & Bird 1997). Τα μειωμένα αυτά επίπεδα, προκύπτουν όχι μόνο λόγω του γήρατος, αλλά και εξαιτίας νευροεκφυλιστικών ασθενειών, ενώ επιπλέον λόγοι μείωσης της DHEA είναι το φυσικό ή συναισθηματικό άγχος, με βασικά παραδείγματα την κατάθλιψη και την χρόνια φλεγμονή (Charalampopoulos et al. 2004).

Υπάρχει λοιπόν ανάγκη για την ανάπτυξη νέων ενώσεων για την προστασία των νευρικών κυττάρων και τη νευρογένεση. Η θεραπεία ασθενειών μέσω της χρήσης DHEA ελκύει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Παρόλα αυτά, τα ενδογενή νευροστεροειδή μεταβολίζονται στον άνθρωπο σε οιστρογόνα, ανδρογόνα ή προγεστερόνες που είναι γνωστό ότι οδηγούν σε γενικευμένες ενδοκρινικές παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένων των ορμονο-εξαρτώμενων νεοπλασιών (Compagnone & Mellon 2000), περιορίζοντας έτσι την κλινική τους χρήση.

1.3. Νευροεκφύλιση και Νευροπροστασία

Η νευροεκφύλιση αποτελεί την προοδευτική απώλεια της λειτουργίας των νευρώνων, οδηγώντας σταδιακά στο θάνατο των νευρικών κυττάρων. Πολλές ασθένειες εμφανίζονται ως αποτέλεσμα νευροεκφυλιστικών διαδικασιών. Συνήθως, οι ασθένειες αυτές είναι ανίατες, με αποτέλεσμα τον προοδευτικό εκφυλισμό και θάνατο των νευρικών κυττάρων, ενώ εμφανίζουν επίσης πολλές ομοιότητες σε υποκυτταρικό επίπεδο, όσο και διαφορές (Green 2011). Μια αρχή στην οποία θα μπορούσαμε να επενδύσουμε για την εξάλειψη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, είναι να επιβραδύνουμε ή να σταματήσουμε την εξέλιξη και τελικά αν είναι δυνατόν, να αποτρέψουμε την εκδήλωση της νόσου.

Οι νευροτροφίνες αποτελούν ενδογενή μόρια με ισχυρά νευροπροστατευτικά και νευροαναγεννητικά αποτελέσματα έναντι πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Η εξωγενής χορήγηση NGF διασώζει τους χολινεργικούς νευρώνες στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο και βελτιώνει τη γνωστική λειτουργία σε ηλικιωμένους αρουραίους με βλάβες σε διαδικασίες μνήμης-μάθησης (Fischer 1994). Μεταμόσχευση ινοβλαστών γενετικά τροποποιημένων για να εκκρίνουν NGF, οδήγησε σε επιβράδυνση των γνωσιακών ελλειμμάτων σε ασθενείς που πάσχουν από ήπια μορφή της NA (Tuszynski et al. 2005). Η στέρηση NGF προκαλεί παραγωγή τοξικού αμυλοειδούς-βήτα (Aβ) και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε νευρώνες του ιπποκάμπου σε πρωτογενείς καλλιέργειες (Matrone et al. 2008). Εκτός από τη σύνδεση μεταξύ του NGF και της NA, υπάρχουν στοιχεία που

υποδηλώνουν αλλαγές και στον BDNF και τον υποδοχέα του TrkB. Τα επίπεδα του mRNA του BDNF μειώθηκαν σε δείγματα ιπποκάμπου ασθενών με ΝΑ (Phillips et al. 1991), ενώ η ανοσοιστοχημεία, έδειξε μεγάλη μείωση στην έκφραση TrkA, TrkB και TrkC (Salehi et al. 1996). Ωστόσο, οι νευροτροφικοί παράγοντες δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά, λόγω των δυσκολιών στη χορήγησή τους που οφείλονται στο μέγεθός τους και στην δομή τους.

Η DHEA από την άλλη, είναι ένα από τα πιο ισχυρά νευροστεροειδή και η απότομη μείωσή της, τόσο στον εγκέφαλο όσο και στο κυκλοφοριακό, με το πέρασ της ηλικίας έχει συσχετισθεί με την νευρική δυσλειτουργία και τον νευροεκφυλισμό. Σήμερα είναι ευρέως διαδεδομένο ότι η DHEA εμφανίζει νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ. Επιπλέον, η DHEA έχει πρόσφατα δειχθεί ότι διεγείρει τη νευρογένεση σε διάφορα πειραματικά μοντέλα. Παρόλα αυτά όμως, όπως προαναφέρθηκε δε μπορεί ούτε αυτή να επάγει τη θεραπευτική της δράση λόγω των ανεπιθύμητων μεταβολικών προϊόντων της.

Η έλλειψη μιας αποτελεσματικής θεραπείας για τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μέσων που μπορούν να αποτρέψουν ή να θεραπεύσουν την προοδευτική απώλεια της νευρικής λειτουργίας, δρώντας νευροπροστατευτικά ή επάγοντας διαδικασίες νευρογένεσης.

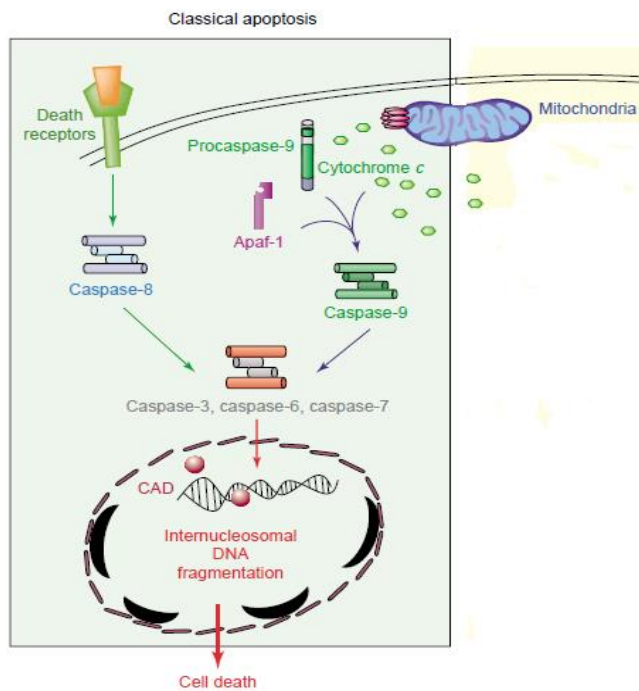
1.4. Απόπτωση νευρικών κυττάρων

Ο θάνατος των νευρικών κυττάρων μέσω απόπτωσης είναι το "τελικό κοινό σημείο" στο οποίο καταλήγουν πολλές από τις ανθρώπινες νευρολογικές διαταραχές. Αποπτωτικά νευρικά κύτταρα παρατηρούνται επίσης και στον γηράσκοντα εγκέφαλο, ως φυσιολογική διαδικασία. Η απόπτωση αποτελεί διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία λαμβάνει μέρος τόσο σε ενήλικα, όσο και εμβρυικά κύτταρα. Άλλοτε, κρίνεται απαραίτητη για τη ρύθμιση του αριθμού των κυττάρων ενός οργανισμού, άλλοτε όμως η αυξημένη απόπτωση μπορεί να αποβεί μοιραία και να οδηγήσει σε εκφυλισμό (Mattson 2000).

Η ταυτοποίηση συγκεκριμένων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που ευθύνονται για αυτές τις ασθένειες έχει ενισχύσει τις γνώσεις μας σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν σε μια κοινή πορεία κυτταρικού θανάτου, την απόπτωση. Τέτοιοι παράγοντες είναι το οξειδωτικό στρες, οι αλλαγές στα επίπεδα φυσιολογικής συγκέντρωσης ασβεστίου, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η ενεργοποίηση πρωτεασών κυστεΐνης που ονομάζονται κασπάσες (Mattson 2000).

Η κλασική διαδικασία της απόπτωσης αποτελείται από τουλάχιστον δύο φάσεις: την εκκίνηση και την εκτέλεση. Κατά την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας, γίνεται η στρατολόγηση πρωτεϊνών, όπως η προ-κασπάση 2, 8 και 10, ενώ ενεργοποιείται επίσης και η κασπάση 9, μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c. Τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν, οδηγώντας στην ενεργοποίηση

της προ-κασπάσης-3 και μετέπειτα στην ενεργοποίηση της κασπάσης 6 και 7. Όλα αυτά τα μονοπάτια σχετίζονται με τη θρυματοποίηση που υφίσταται εν τέλει το ενδο-νουκλεοσωμικό DNA (Hengartner 2000) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Η διαδικασία της κλασσικής απόπτωσης, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των κασπασών και καταλήγει στη θρυματοποίηση του DNA (Krantic et al. 2005).

1.5. Συνθετικά Ανάλογα – Παράγωγα της DHEA

Η μεγάλη έλλειψη που υπάρχει όσον αφορά αποτελεσματικές θεραπείες για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, έχει ενισχύσει το μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νευροπροστατευτικών παραγόντων που μπορούν να αντιστρέψουν ή και να

αποτρέψουν την προοδευτική απώλεια της λειτουργίας των νευρικών κυττάρων.

Αρκετές ερευνητικές ομάδες, εργάζονται πάνω στην ανάπτυξη τέτοιων παραγόντων, μικρομοριακών αγωνιστών που προσδένονται σε υποδοχείς νευροτροφινών και που θα μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές, χωρίς φυσικά να προκαλούν παρενέργειες.

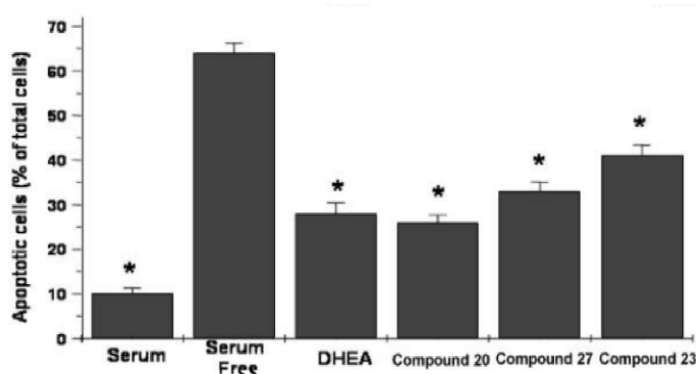
Η ιδιότητα της DHEA, να προστατεύει διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων μέσω της πρόσδεσής της σε υποδοχείς νευροτροφινών, την καθιστά υποψήφια για χρήση στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων. Η μείωση της συγκέντρωσής της στο πέρασμα του χρόνου ή η ελάττωσή της εξαιτίας κάποιας νευροεκφυλιστικής ασθένειας, καθιστά χρήσιμο θεραπευτικά μια αύξηση της συγκέντρωσής της. Παρ'όλα αυτά, η DHEA μεταβολίζεται *in vivo* σε οιστρογόνα, ανδρογόνα και συναφείς μεταβολίτες που επηρεάζουν το ενδοκρινικό σύστημα, μεταβάλλοντας το ορμονικό μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου. Ως εκ τούτου, η μακροχρόνια χρήση της DHEA ως πιθανή θεραπεία είναι προβληματική, ιδιαίτερα σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση για ορμονοεξαρτώμενους όγκους. Επιπλέον, η DHEA αποτελεί μόριο που αλληλεπιδρά με πολλούς νευροδιαβιβαστές και ορμονο-υποδοχείς.

Από την άλλη, η χρήση NGF στη θεραπεία αυτών των παθήσεων είναι επίσης περιορισμένη, λόγω της μη διαπερατότητας του μέσω του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, ενώ γενικότερα όσον αφορά τις νευροτροφίνες, παρά την αποδεδειγμένη ευεργετική επίδρασή τους, η θεραπευτική τους

χρησιμότητα αναστέλλεται από την πολυπεπτιδική τους φύση και το μεγάλο τους μέγεθος. Γι'αυτό και κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μικρών μορίων, αγωνιστών των υποδοχέων νευροτροφινών, με θεραπευτικές εφαρμογές που θα μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

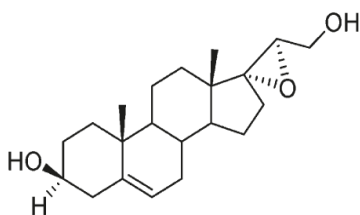
Συνθετικά ανάλογα λοιπόν της DHEA, που στερούνται ενδοκρινικών επιδράσεων, αντιπροσωπεύουν μια νέα κατηγορία μορίων, που διαπερνούν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και προσδένονται σε υποδοχείς νευροτροφινών, έχοντας νευροπροστατευτική δράση. Έχουν συντεθεί, 17-σπειρο εποξικά ανάλογα της DHEA, με τροποποιήσεις στις θέσεις C3 και C17, που στερούνται ικανότητας μεταβολισμού σε οιστρογόνα ή ανδρογόνα, και μπορούν να χρησιμεύσουν ως αγωνιστές υποδοχέων νευροτροφινών, ενώ μπορούν επίσης να διαπεράσουν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό με πιθανές εφαρμογές στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Με βάση αυτές τις ιδιότητες, οι συνθετικές αυτές ενώσεις ονομάστηκαν "νευροστεροειδικές μικρονευροτροφίνες" (steroidal microneurotrophins), των οποίων τα πνευματικά δικαιώματα δομής και λειτουργίας τους έχουν κατοχυρωθεί με διεθνείς πατέντες της εταιρείας τεχνολογίας (spinoff company) Bionature E.A. Ltd. (Calogeropoulou et al. 2009; Gravanis et al. 2012).

Οι πιο δραστικές ενώσεις που έχουν ήδη μελετηθεί, είναι τα ανάλογα 17β-spiro[5-androstene-17,20-oxiran]-3β-ol (BNN20), (20S)-3β,21-dihydroxy-17β,20-epoxy-5-pregnene (BNN23) και (20R)-3β,21-dihydroxy-17R,20-epoxy-5-pregnene (BNN27). Αυτά τα ανάλογα δεσμεύονται με TrkA και p75NTR υποδοχείς, επάγοντας την φωσφορύλιωση του TrkA και τον διαχωρισμό του p75NTR από τον ενδοκυττάριο τελεστή του, RhoGDI. Τα συνθετικά αυτά μόρια, ελέγχθηκαν και για τη σχέση τους, όσον αφορά την πρόσδεση με υποδοχείς ERα, ERβ, TrkB ή TrkC, καθώς γνωρίζουμε πως η DHEA, προσδέεται σε όλους αυτούς τους τύπους υποδοχέων. Τα ανάλογα, δεν παρουσίασαν αλληλεπίδραση με ER υποδοχείς, παρά μόνο με Trk's, όπως για παράδειγμα το BNN20 που δεσμεύεται και στους τρεις τύπους. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε και η νευροπροστατευτική επίδραση των αναλόγων αυτών σε κυτταροκαλλιέργειες PC12 κυττάρων (Calogeropoulou et al. 2009). Η αντιαποπτωτική ικανότητα των αναλόγων αυτών σε PC12 κύτταρα μετά από στέρηση ορού, φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 7):



Εικόνα 7. Σύγκριση της αντιαποπτωτικής δράσης του φυσικού νευροστεροειδούς DHEA και των τριών χημικών αναλόγων του BNN20, BNN27 και BNN23, μετά από στέρηση ορού σε κυτταροκαλλιέργεια PC12 (Calogeropoulou et al. 2009).

Χημικό Ανάλογο 27 (BNN27)



Εικόνα 8. Χημικό ανάλογο BNN-27 (Calogeropoulou et al. 2009)

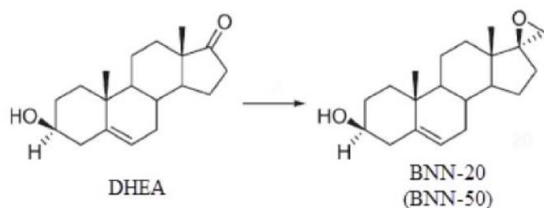
Το ανάλογο BNN27 (Εικόνα 8) προέκυψε με εποξείδωση του C17 χρησιμοποιώντας t-BuOOH παρουσία vanadyl acetylacetonate, όπου προέκυψε ένα μίγμα από τα διαστερομερικά εποξείδια 27 και 23, σε αναλογία 2:1 και σε 70% απόδοση παραγωγής.

Όσον αφορά λοιπόν το BNN27, αξιολογήθηκε η διαμεμβρανική πρόσδεσή του, σε TrkA ή p75NTR υποδοχείς, χρησιμοποιώντας δοκιμασίες δέσμησης (binding assays). Μετά και τη μελέτη της ικανότητας του BNN27 για πρόσδεση και στους δύο υποδοχείς NGF, διερευνήθηκε και η αντιαποπτωτική αποτελεσματικότητά του, μετά και την ενεργοποίηση των υποδοχέων TrkA και p75NTR, μέσω φωσφορύλιωσης και ελέγχου της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες RhoGDI, RIP2 και TRAF6, αντίστοιχα (Pediaditakis, Kourgiantaki, et al. 2016; Pediaditakis, Efstathopoulos, et al. 2016).

Άλλες ερευνητικές μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει μέχρι τώρα το ανάλογο BNN27 έχουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα, δεικνύοντας ότι μπορεί να ενισχύσει την μνήμη, ενδεχομένως αλληλεπιδρώντας με το χολινεργικό σύστημα (Pitsikas & Gravanis 2017). Επίσης, μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά σε πληθυσμούς ολιγοδενδροκυττάρων και στη μυελίνη, με πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές σε απομυελινωτικές διαταραχές (Bonetto et al. 2017) και τέλος, παρουσιάζει μία θεραπευτική δράση και για τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (DR), καθώς επιτίθεται τόσο στη νευροεκφύλιση, όσο και στη φλεγμονή που εμφανίζει η ασθένεια (Ibán-Arias et al. 2018).

Χημικό ανάλογο 20 (BNN20)

Η χημική τροποποίησή του, περιλαμβάνει την εποξείδωση της υδροξυλομάδας του 17ου άνθρακα του μορίου της δεϋδροεπιανδροστερόνης, με χρήση του αντιδραστηρίου trimethylsulfonium methylide, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 9) (Calogeropoulou et al. 2009).

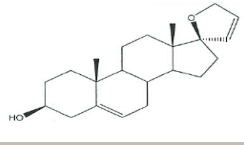
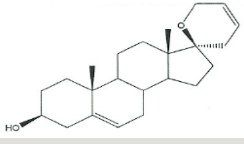
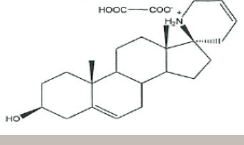
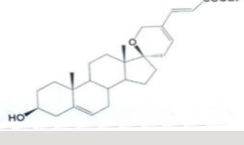
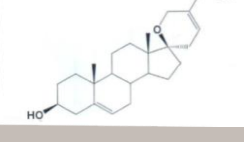
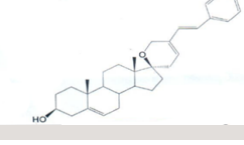


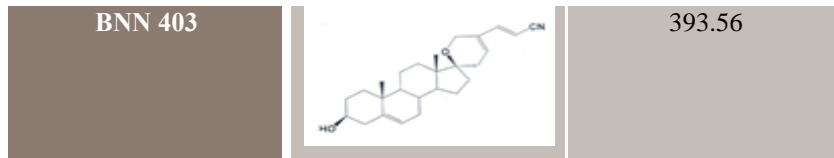
Εικόνα 9: Μετατροπή της DHEA, στο χημικό ανάλογο BNN-20 το οποίο δεν μεταβολίζεται σε οιστρογόνα (Calogeropoulou et al. 2009).

Στη μελέτη των (Botsakis et al. 2017), χρησιμοποιώντας το ποντίκι "weaver", ένα γενετικό μοντέλο της ασθένειας του Πάρκινσον (PD), το οποίο παρουσιάζει προοδευτικό ντοπαμινεργικό νευροεκφυλισμό στη μέλαινα ουσία (SN), παρουσιάστηκε ότι η μακροχρόνια χορήγηση του BNN-20, σε αυτά τα ζωικά μοντέλα, σχεδόν πλήρως προστατεύει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες.

Συνθετικά ανάλογα που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία

Όλα τα ανάλογα, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας και στο Ινστιτούτο Βιολογικής Έρευνας και Βιοτεχνολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), και φέρουν τροποποιήσεις στον άνθρακα C17 του μορίου της DHEA. Στις ενώσεις BNN218 και BNN219 αυξήθηκε το μέγεθος του C17 υποκαταστάτη. Στο BNN219 έχει υποκατασταθεί από το 2,5-διϋδροφουράνιο (5-μελής ετεροκυκλικός δακτύλιος), ενώ στο BNN218 από το 3,6-διϋδροπυράνιο (6-μελής ετεροκυκλικός δακτύλιος). Η ένωση BNN237 είναι ένα παράγωγο του BNN218 και φέρει μία ομάδα 5-βινυλο, 3,6-διϋδροπυρανίου στο C17.

ANALOG	STRUCTURE	MOL. WEIGHT (Mr)
BNN 218 (C ₂₂ H ₃₂ O ₂)		328.50
BNN 219 (C ₂₃ H ₃₄ O ₂)		342.52
BNN 238 (C ₂₅ H ₃₇ NO ₅)		431.57
BNN 396		440.61
BNN 397		372.54
BNN 398		444.65



1.6. Σκοπός της Εργασίας

Τα επίπεδα της DHEA στον εγκέφαλο μειώνονται σταδιακά κατά τη γήρανση και σε νευροεκφυλιστικές συνθήκες. Παρ'ότι υπάρχει σημαντικό κλινικό ενδιαφέρον για την DHEA, η ιδιότητα της να μεταβολίζεται σε ανδρογόνα και οιστρογόνα αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στη θεραπευτική χρήση της, καθώς οδηγεί σε ανεπιθύμητες παρενέργειες για τον άνθρωπο. Από την άλλη, οι νευροτροφίνες αποτελούν μεγαλομοριακά μόρια που δε μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Οπότε, εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα της DHEA να προσδέεται σε υποδοχείς νευροτροφινών και να προστατεύει διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων, σχεδιάστηκαν συνθετικά μόρια, ανάλογα αυτής, που δεν ενεργοποιούν τους κλασσικούς υποδοχείς στεροειδών. Επιπλέον, είναι μικρομοριακά και λιπόφιλα και έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Μπορούν έτσι, να χορηγηθούν περιφερικά και να δράσουν στον νευρικό ιστό. Οι προαναφερθείσες ιδιότητές τους καθιστούν τα μόρια αυτά (μικρονευροτροφίνες), υποψήφια για χρήση στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων.

Σκοπό της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ικανότητας ορισμένων τέτοιων συνθετικών μορίων να επάγουν τη προστασία των κυττάρων καθώς και η μελέτη της δράσης τους, μέσω των υποδοχέων Trk.

Για να εξακριβωθεί η ικανότητα των αναλόγων να αναστρέψουν στατιστικά σημαντικά την απόπτωση που προκαλείται λόγω στέρησης ορού σε καλλιέργειες κυττάρων PC12 και NIH-3T3, έγινε ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS) της αντι-αποπτωτικής τους δράσης, κυρίως με τη χρήση TUNEL assay αλλά και άλλων πειραματικών διαδικασιών. Τέλος, φαίνεται πως μερικά συνθετικά ανάλογα της DHEA, μιμούμενα τις ενδογενείς νευροτροφίνες, ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης τους Trk υποδοχείς. Εξετάστηκε γενικότερα η ικανότητά τους να επάγουν τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων Trk (TrkA και TrkB) σε κύτταρα σταθερά διαμολυσμένα με το cDNA του υποδοχέα που μελετούνταν κάθε φορά.

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη μικρομοριακών αναλόγων της DHEA, όπως του BNN27, που στερούνται ενδοκρινικών δράσεων και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, παρέχει την δυνατότητα ανάπτυξης νέων συνθετικών μορίων (lead molecules) ως αγωνιστές των υποδοχέων των νευροτροφινών, στοχεύοντας στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων των νευροεκφυλιστικών νόσων. Τέτοιου είδους μόρια, μελετώνται στην παρούσα έρευνα για την αντιαποπτωτική τους δράση και την ικανότητα ενεργοποίησης υποδοχέων νευροτροφινών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Αντιδραστήρια και Υλικά

RPMI 1640 (LM-R1643/500 Biosera), L-Glutamine (25030-024 Gibco), Pen/Strep (15140-122 Gibco), Horse Serum (16050-122 Gibco), Fetal Bovine Serum FBS (10270-106, Thermo Fisher Scientific), PBS (LM-S2041/500 Biosera), DMSO (D5879, Sigma-Aldrich), 6-well plates (140675 Thermo Scientific), PC12 cells (LGC Promochem), NIH-3T3 cells (kindly provided by Prof. Carlos F. Ibáñez, Karolinska Institutet), NGF (01-125 Millipore), Propidium Iodide (P3566 Thermo Fisher Scientific), Na₂HPO₄ (53264 Sigma), Triton X100 (9002-93-1 Sigma), RNase (EN0531, Thermo Fisher Scientific), FITC Annexin V/PI (556547 BD Pharmingen), In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (11 684 795 910 Roche), FACS tubes (352054 BD Falcon), Trypan blue 0.5% (T8154, Sigma), DMEM (LM-D1099/500, Biosera), BDNF (B-250, Alomone).

Κυτταρική Σειρά PC12

Το κυτταρικό μοντέλο PC12, προέρχεται από τη νευρική ακρολοφία και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μελέτη της απόπτωσης και της επιβίωσης των νευρικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, προέρχεται από το φαιοχρωμοκύτωμα του μυελού των επινεφριδίων του αρουραίου και μπορεί εύκολα να διαφοροποιηθεί ακόμα και σε νευρικά κύτταρα, τα οποία όμως δε θεωρούνται ενήλικοι νευρώνες και σταματούν να διαιρούνται, όταν τους χορηγηθεί ο NGF. Τα PC12 κύτταρα δεν εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς GABA_A ή NMDA και δε μπορούν να μεταβολίσουν την DHEA σε οιστρογόνα και ανδρογόνα, όπως ήδη έχει αναφερθεί στην παρούσα εργασία. Η καλλιέργεια των κυττάρων PC12, απουσία ορού (serum free) έχει ως αποτέλεσμα μία ισχυρή επαγωγή απόπτωσης, σε σύγκριση με τις κυτταρικές καλλιέργειες που έχουν συμπληρωθεί με ορό (serum).

Κυτταρική Σειρά NIH-3T3

Πρόκειται για κύτταρα εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού, που ξεκίνησαν από μια κυτταρική σειρά που απομονώθηκε το 1962 στο Τμήμα Παθολογίας του Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης. Το 3T3 αναφέρεται στο πρωτόκολλο μεταφοράς και εμβολιασμού των κυττάρων και σημαίνει "μεταφορά 3 ημερών, εμβολιασμός 3x10⁵ κυττάρων". Χρησιμοποιώντας αυτό το πρωτόκολλο, αυτή η κυτταρική σειρά αρχίζει να αναπτύσσεται και να σταθεροποιείται στην καλλιέργεια μετά από περίπου 20-30 γενιές, *in vitro*. Τα κύτταρα ελήφθησαν από ινοβλάστες εμβρύου NIH Swiss ποντικού, ενώ τα συγκεκριμένα κύτταρα αφορούν κυτταρικές σειρές σταθερά διαμολυσμένες με τα γονίδια των υποδοχέων TrkA και TrkB, αντίστοιχα.

Κυτταροκαλλιέργειες

Τα PC12 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 το οποίο περιέχει 2mM L-Glytamine, 1% Pen/Strep, 10% Horse Serum και 5% Fetal Bovine Serum σε 5% CO₂ στους 37°C. Τα NIH-3T3 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM το οποίο περιέχει 1% Pen/Strep, 10% Horse Serum και 5% Fetal Bovine Serum σε 5% CO₂ στους 37°C. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καταλαμβάνουν το 95-98% της επιφάνειας του χώρου, όπου έχουν επιστρωθεί. Τα κύτταρα διατηρούνταν και η αλλαγή του θρεπτικού γινόταν κάθε 2 ημέρες, ενώ μετά από 4 ημέρες, γινόταν η διάσπασή τους, αφού τα κύτταρα μαζεύονταν πρώτα μετά από πλύση με 1X PBS, προσθήκη πλήρους θρεπτικού, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1200 rpm, απομάκρυνση του υπερκειμένου και αραίωση των κυττάρων στον κατάλληλο όγκο πλήρους θρεπτικού. Το πάγωμα των κυττάρων για μακροπρόθεσμη αποθήκευσή τους, στους -80°C, πραγματοποιήθηκε με μέσο παγώματος 30% RPMI ή DMEM, 50% FBS, 20% DMSO.

Αρχικά, δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για τον έλεγχο της φυσιολογικής επιβίωσης των κυττάρων και της απόπτωσης που υφίστανται υπο απουσία ορού, καθώς πραγματοποιήθηκε επίσης και ο ορισμός των κατάλληλων ρυθμίσεων για την ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής των PC12 κυττάρων και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η ικανότητα των μικρονευροτροφινών για τη νευροπροστατευτική τους δράση με τη χρήση TUNEL assay.

Ανίχνευση της απόπτωσης μέσω της δοκιμασίας με χρωστική Propidium Iodide

Τα ζωντανά κύτταρα έχουν ανέπαφες μεμβράνες που αποκλείουν μια ποικιλία χρωστικών οι οποίες διεισδύουν εύκολα στις κατεστραμμένες, διαπερατές μεμβράνες μη ζωντανών κυττάρων. Το ιωδιούχο προπίδιο (PI-Propidium Iodide) αποτελεί χρωστική που γενικά απορρίπτεται από ζωντανά κύτταρα. Συνδέεται με το δίκλωνο DNA, καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Το PI διεγείρεται στα 488 nm και εκπέμπει ένα μέγιστο μήκος κύματος 617 nm. Λόγω αυτών των φασματικών χαρακτηριστικών, το PI μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα φθοροχρώματα που διεγείρονται στα 488 nm, όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) και η φυκοερυθρίνη (PE).

Καλλιεργήθηκαν λοιπόν, PC12 κύτταρα (passages 13-15, σε κάθε δοκιμή που έγινε) σε 6-well plates (10⁶cells/συνθήκη) και την επόμενη ημέρα, εφαρμόστηκε η διαδικασία στέρησης ορού (serum free), ώστε να ξεκινήσει η απόπτωση, στις συνθήκες εκείνες όπου θα εφαρμοστεί και η ανάλογη θεραπεία (treatments), καθώς και στο control δείγμα στο οποίο θα υπάρχει η μέγιστη απόπτωση χωρίς όμως την εφαρμογή κάποιας θεραπείας. Ένα ακόμη δείγμα αφορά το control στο οποίο τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί απόπτωση, δηλαδή δείγμα στο οποίο δε γίνεται στέρηση του

ορού (serum-complete medium). Τέλος, στο σημείο αυτό, προστίθεται και η ανάλογη θεραπεία ανά συνθήκη (θετικά control-BNN27 $10^{-7}M$, NGF 100ng/ml).

Μετά το πέρας 24 ωρών από τη θεραπεία, ακολουθείται η διαδικασία της χρώσης με ιωδιούχο προπίδιο (P3566 Thermo Fisher Scientific) και τέλος, τα αποτελέσματα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής (BD FACS Calibur).

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε 1ml PBS 1x/συνθήκη, στα 1200rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο και επαναδιαλυθούν τα κύτταρα σε 300 μ l DNA staining solution (20 μ g/ml propidium iodide, 0,2mg/ml RNase) ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στο σκοτάδι και στον πάγο. Τέλος, τα δείγματα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής. Δείγματα control για την κυτταρομετρία, αποτελούν τα δείγματα τα οποία δεν έχουν βαφτεί με PI, προκειμένου να γνωρίζουμε αν έχει γίνει η χρώση.

Ανίχνευση της απόπτωσης μέσω της δοκιμασίας Annexin V/PI

Η δοκιμή ανίχνευσης απόπτωσης με την χρήση FITC Annexin V (556547 BD Pharmingen) αποτελεί καθιερωμένη μέθοδο ανίχνευσης κυτταρικής απόπτωσης. Η απώλεια της πλασματικής μεμβράνης, είναι ένα από τα πρώτα στοιχεία της απόπτωσης. Στα αποπτωτικά κύτταρα, η μεμβράνη φωσφολιπιδίων φωσφατιδυλοσερίνης (PS) μετακινείται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της μεμβράνης, εκθέτοντας έτσι το PS στο εξωτερικό κυτταρικό περιβάλλον. Η ανεξίνη, προσδέεται σε φωσφολιπίδια και έχει υψηλή συγγένεια με το PS που βρίσκεται εκτεθειμένο στο εξωτερικό των κυττάρων. Μπορεί να συζευχθεί με φθοροχρώματα συμπεριλαμβανομένου του FITC. Η χρώση με FITC και ανεξίνη, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το ιωδιούχο προπίδιο για να επιτρέψει την αναγνώριση πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (PI αρνητικά, ανεξίνη θετικά). Τα βιώσιμα κύτταρα με ακέραιες μεμβράνες αποκλείουν το PI, ενώ οι μεμβράνες νεκρών κυττάρων είναι διαπερατές από το PI. Για παράδειγμα, τα κύτταρα τα οποία θεωρούνται βιώσιμα, είναι με ανεξίνη και PI αρνητικά, τα κύτταρα που βρίσκονται σε πρώιμη απόπτωση, είναι θετικά σε ανεξίνη και PI αρνητικά και κύτταρα που βρίσκονται σε καθυστερημένη απόπτωση ή είναι ήδη νεκρά είναι αμφότερα θετικά σε ανεξίνη και PI.

Καλλιεργήθηκαν λοιπόν, PC12 κύτταρα (passages 13-15 σε κάθε δοκιμή που έγινε) σε 6-well plates (10^6 cells/συνθήκη) και την επόμενη ημέρα, εφαρμόστηκε η διαδικασία στέρησης ορού (serum free), ώστε να ξεκινήσει η απόπτωση. Αρχικά, εφαρμόστηκε το pre-starvation (πρώτη στέρηση ορού για 16 ώρες-8 ώρες και 2 ώρες αντίστοιχα, σε κάθε δοκιμή), κατά το οποίο οι φάσεις στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων σε κάθε συνθήκη συγχρονίζονται και έπειτα επαναλαμβάνεται η στέρηση ορού (serum free), αυτή τη φορά όμως μόνο, στις συνθήκες εκείνες όπου θα εφαρμοστεί και η ανάλογη θεραπεία (treatments), καθώς και στο control δείγμα στο οποίο θα υπάρχει η μέγιστη απόπτωση, χωρίς όμως την εφαρμογή κάποιας θεραπείας. Ένα ακόμη δείγμα αφορά το control στο οποίο τα

κύτταρα δε θα υποστούν απόπτωση, δηλαδή δείγμα στο οποίο δε γίνεται στέρηση του ορού (serum-complete medium). Τέλος, στο σημείο αυτό, προστίθεται και η ανάλογη θεραπεία ανά συνθήκη (θετικά control-BNN27 10^{-7} M, NGF 100ng/ml).

Μετά το πέρας 24, 48 και 72 ωρών (αντίστοιχα σε κάθε δοκιμή) από τη θεραπεία, ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης με annexin V και propidium iodide και τέλος, τα αποτελέσματα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής (BD FACS Calibur).

Πιο συγκεκριμένα, γίνονται αρχικά πλύσεις των κυττάρων με κρύο PBS 1x ή ζεστό serum free και επαναδιάλυσή τους. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων (χρησιμοποιώντας Neubauer πλάκα) και απομόνωση 10^5 κύτταρα/συνθήκη, τα οποία και φυγοκεντρώνονται στα 2500 rpm για 10 λεπτά. Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος, σε 100 μl 1x binding buffer και μεταφορά σε FACS tubes, όπου γίνεται προσθήκη 5 μl FITC Annexin V και 5 μl PI ανά δείγμα. Έπειτα, γίνεται απαλή ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Τέλος, τα δείγματα είναι έτοιμα για την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, μετά από προσθήκη 400 μl 1x binding buffer. Δείγματα control για την κυτταρομετρία, αποτελούν τα δείγματα τα οποία δε βάφονται (Unstained cells), τα κύτταρα που βάφονται μόνο με Annexin V (serum και serum free συνθήκες) και τα κύτταρα που βάφονται μόνο με PI (serum και serum free συνθήκες).

Ανίχνευση της απόπτωσης μέσω της δοκιμασίας TUNEL

Η διαδικασία TUNEL αποτελεί μέθοδο για την ανίχνευση της απόπτωσης μέσω του κατακερματισμού του DNA και χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αποπτωτικών κυττάρων. Η δοκιμασία βασίζεται στη χρήση της τερματικής δεοξυνουκλεοτιδυλοτρανσφεράσης (TdT-terminal deoxynucleotidyl transferase), ένζυμο που καταλύει την ενσωμάτωση των δεοξυνουκλεοτιδίων, τα οποία είναι σημασμένα με κάποια χρωστική ή άλλο δείκτη, στο 3'-υδροξύλιο στα άκρα των DNA.

Η διάσπαση του γονιδιωματικού DNA κατά τη διάρκεια της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε δίκλινα θραύσματα. Αυτά, μπορούν να ταυτοποιηθούν αρχικά, με τη σήμανση μέσω της χρήσης της TdT, η οποία καταλύει τον πολυμερισμό των σημασμένων νουκλεοτιδίων στα ελεύθερα 3'-OH άκρα του DNA με τρόπο που δεν εξαρτάται από τη σύνθεση του εκμαγείου (αντίδραση TUNEL). Έπειτα, ετικέτες φλουορεσκίνης (FITC) ενσωματωμένες στα νουκλεοτιδικά πολυμερή που προστίθενται από το ένζυμο TdT, ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται με κυτταρομετρία ροής.

Το κιτ ανίχνευσης θανάτου που χρησιμοποιήθηκε (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein by Roche; Cat.No. 11 684 795 910) είναι σχεδιασμένο ως μη-ραδιενεργή τεχνική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Επισημαίνει κατά προτίμηση τις θραύσεις των κλώνων DNA που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης και αυτό επιτρέπει τη διάκρισή της από τη νέκρωση.

Καλλιεργήθηκαν λοιπόν, κύτταρα PC12 (passages 13-15 σε κάθε δοκιμή που έγινε) σε 6-well plates (10^6 cells/συνθήκη), καθώς και NIH-3T3 που εκφράζουν TrkB (10^6 cells/συνθήκη) και την επόμενη ημέρα, εφαρμόστηκε η διαδικασία στέρησης ορού, ώστε να ξεκινήσει η απόπτωση. Προηγήθηκε, το στάδιο του pre-starvation (3 ώρες), κατά το οποίο οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου όλων των κυττάρων συγχρονίζονται και έπειτα επαναλήφθηκε η στέρηση ορού (serum free), αυτή τη φορά όμως μόνο, στις συνθήκες εκείνες όπου θα εφαρμοστεί και η ανάλογη θεραπεία (treatments), καθώς και στο control δείγμα στο οποίο επιθυμείται μέγιστη απόπτωση χωρίς όμως την εφαρμογή κάποιας θεραπείας. Ένα ακόμη δείγμα αφορά το control στο οποίο τα κύτταρα δεν υφίστανται απόπτωση, δηλαδή δείγμα στο οποίο δε γίνεται στέρηση του ορού (serum-complete medium). Τέλος, στο σημείο αυτό, προστίθεται και η ανάλογη θεραπεία ανά συνθήκη, δηλαδή το ανάλογο το οποίο ελέγχεται κάθε φορά (BNN218,-219,-238,-396,-397,-398,-403 με συγκέντρωση 10-7M, θετικά control-NGF 100ng/ml και BDNF 100ng/ml).

Μετά το πέρας 24 ωρών από τη θεραπεία, ακολουθείται η διαδικασία της TUNEL και τέλος, τα αποτελέσματα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής (BD FACS Calibur).

Πιο αναλυτικά, αφαιρείται το θρεπτικό από κάθε συνθήκη και μαζεύονται τα κύτταρα έχοντας προσθέσει ζεστό serum free. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων, έτσι ώστε να φυγοκεντρηθούν τελικά 10^6 κύτταρα/συνθήκη για 10λεπτά στα 2500rpm. Σε αυτό το σημείο, η διαδικασία μπορεί να γίνει εκτός απαγωγού και απαραίτητα σε πάγο. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκειμένου προσεκτικά και επαναδιάλυση του ιζήματος (κύτταρα) σε 500λ PBS 1x. Έπειτα, αφού το επαναδιάλυμα μεταφερθεί σε erpendorf (1,5ml) και φυγοκεντρηθεί για 10 λεπτά στα 600g και στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και ακολουθεί το φιζάρισμα, όπου προστίθενται 500λ PFA 4% και τα δείγματα επωάζονται για 20λεπτά στον πάγο σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα 300g στους 4°C και αφαίρεση του υπερκειμένου προστίθενται 500λ PBS 1x για πλύσεις και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση. Ακολουθεί προσθήκη 500λ 0,1%Triton X-100 (σε PBS) στο ίζημα και επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 10λεπτά. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντριση για 10 λεπτά στα 300g στους 4°C και αφαίρεση του υπερκειμένου. Στο σημείο αυτό, γίνεται η προσθήκη του *Tunel reaction Mix* (labeling solution και ένζυμο σε αναλογία 1/10, συνολικά χρησιμοποιούνται 40λ/συνθήκη). Έπειτα, γίνεται επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 37 °C σε σκοτάδι (ανάδευση κάθε 10 λεπτά).

Μετά από 1 ώρα, προστίθενται 500λ PBS 1x και ακολουθεί φυγοκέντριση, ενώ στο ίζημα προστίθενται ξανά 500λ PBS 1x. Τέλος, το κάθε δείγμα μεταφέρεται στα FACS tubes, ενώ αυτά διατηρούνται στον πάγο μέχρι και την ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής. Δείγματα control για την κυτταρομετρία, αποτελούν τα δείγματα όπου αντί για το tunel reaction mix, γίνεται χρήση είτε μόνο του labeling solution, είτε μόνο του PBS 1x, προκειμένου να γνωρίζουμε αν έχει δουλέψει η αντίδραση αλλά και για να καθορίσουμε τα όρια των αξόνων.

Όσον αφορά τα κύτταρα PC12, ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία και για τα δείγματα εκείνα, τα οποία αναλύθηκαν μετά το πέρας 48 ωρών, όπου είχαμε και τα πιο έντονα πλέον φαινόμενα απόπτωσης και νέκρωσης, καθώς και τα πιο διακριτά αποτελέσματα (n=3) όσον αφορά τη δράση των αναλόγων, σε σύγκριση πάντα με τη δράση τους στις 24 ώρες (n=1).

Ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής

Αρχικά, ξεκινώντας την ανάλυση, έχουν καθοριστεί τα όρια των FSC (εμπρόσθια σκέδαση - Forward Scattering) που σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και SSC (πλάγια σκέδαση - Side Scattering) που εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης), συγκεκριμένα για την κυτταρική σειρά των PC12 ή των NIH-3T3. Έπειτα, όσον αφορά τη χρώση με PI, ορίζεται το κανάλι FL2, που καθορίζει το χρώμα κόκκινο (PE), ενώ για τη χρώση με ανεξίνη και PI, ορίζεται και το κανάλι FL1 (πράσινο χρώμα) και το FL2. Όσον αφορά τη χρώση με Tunel, ορίζεται το κανάλι FL1, που καθορίζει το χρώμα πράσινο (Fluorescein-FITC) στα 480 για τα PC12 κύτταρα και για τα NIH-3T3 κύτταρα στα 350. Σε κάθε μέτρηση, απορροφήθηκαν 10.000 κύτταρα από κάθε δείγμα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος BD CellQuest™ Pro Software και η μετέπειτα επεξεργασία μέσω του Flowjo. Αρχικά, ορίζεται ο εξεταζόμενος πληθυσμός (gating), όπου απομακρύνονται θραύσματα κυττάρων (debris) από την ανάλυση. Στη συνέχεια, ορίζονται τα όρια αποπτωτικών και βιώσιμων κυττάρων, σύμφωνα με τις συνθήκες serum, serum free και τα δείγματα control της κυτταρομετρίας.

Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα αναφέρονται ως ο μέσος όρος \pm SEM. Η σύγκριση μεταξύ δύο δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το unpaired t-test. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του προγράμματος GraphPrism, έκδοση 7 (GraphPad Software Inc.). Τιμή p μικρότερη από 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Παράλληλα πειράματα (ενεργοποίηση υποδοχέων)

Παράλληλα πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο από τους Βεζήρ και Βουτηράκη, αφορούν την αξιολόγηση της ικανότητας που έχουν τα ανάλογα να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς νευροτροφινών (επαγωγή φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα τυροσίνης Y490 και Y816). Περιληπτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει αρχικά, την καλλιέργεια των κυττάρων NIH-3T3 (σταθερά διαμολυσμένα με τα cDNA των υποδοχέων TrkA, TrkB). Έπειτα από 24 ώρες ακολούθησε το pre-starvation για 4 ώρες και οι δοκιμές των αναλόγων στις κατάλληλες συγκεντρώσεις για 10, 20

και 30 λεπτά. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν και τα κυτταρολύματα, ηλεκτροφορήθηκαν μέσω πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδιου. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι οποίες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία σύμφωνα με την κλασική διαδικασία του Western Blotting και επώαστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα. Το Image Lab-BioRad, χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πρωτεϊνών. Οι μεμβράνες αρχικά ανιχνεύτηκαν για την φωσφορυλιωμένη μορφή των πρωτεϊνών και έπειτα για την ολική πρωτεΐνη.

3. Αποτελέσματα

Χρώση νεκρωτικών κυττάρων με Ιωδιούχο προπίδιο

Προκειμένου να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για τον έλεγχο της φυσιολογικής επιβίωσης των κυττάρων και της απόπτωσης που υφίστανται υπό απουσία ορού, αλλά και για να οριστούν οι κατάλληλες ρυθμίσεις για την ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής των PC12 κυττάρων, η διαδικασία του πειραματισμού ξεκίνησε με τη χρήση της χρωστικής ιωδιούχου προπίδιου. Παρ' όλα αυτά, η συγκεκριμένη χρωστική έδειξε ότι διεισδύει στις κατεστραμμένες, διαπερατές μεμβράνες κάθε μη ζωντανού κυττάρου, κάτι που σημαίνει πως τα χρωσμένα κύτταρα είναι και νεκρωτικά και όχι μόνο αποπτωτικά. Για το λόγο αυτό λοιπόν κι επειδή η συγκεκριμένη μελέτη αφορά ειδικά την απόπτωση των υπό μελέτη κυττάρων, η μέθοδος αυτή απορρίφθηκε και προχωρήσαμε σε συνδυασμό της χρωστικής PI μαζί με ανεξίνη, καθώς έτσι μπορεί να διαχωριστεί ο νεκρωτικός θάνατος από τον αποπτωτικό.

Ορισμός κατάλληλων συνθηκών για τον έλεγχο της φυσιολογικής επιβίωσης των κυττάρων και της απόπτωσης που υφίστανται υπο απουσία ορού και των κατάλληλων ρυθμίσεων για την ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής των PC12 κυττάρων, μέσω της δοκιμασίας Annexin V/PI

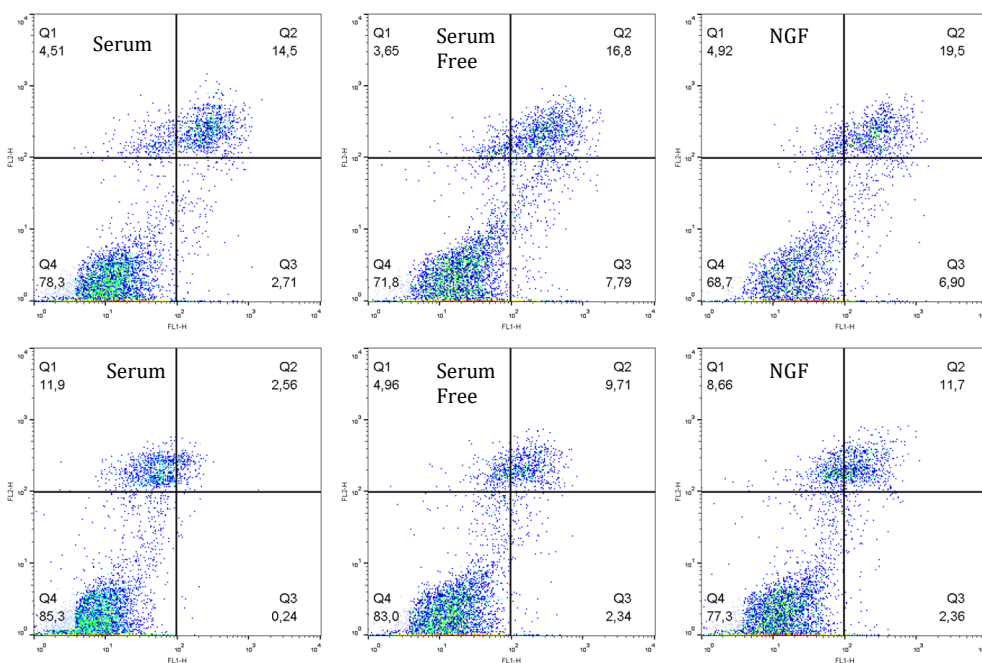
Δοκιμή 1

Οι πρώτες δοκιμές με Annexin V/PI, περιλαμβάνουν δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε η διαδικασία της στέρησης ορού, της προσθήκης συμπληρωμένου ορού και της παράλληλης χορήγησης NGF ως θετικού μαρτυρα (positive control), για διάρκεια 24 και 48 ωρών αντίστοιχα, χωρίς να προηγηθεί η διαδικασία του pre-starvation. Μετά και το πέρας 24 και 48 ωρών αντίστοιχα, τα κύτταρα υπέστησαν χρώση με ανεξίνη V και ιωδιούχο προπίδιο.

Ο συγκεκριμένος συνδυασμός χρωστικών διαχωρίζει τον αριθμό των νεκρωτικών κυττάρων έναντι των αποπτωτικών, καθώς στη μετέπειτα ανάλυση που γίνεται, υπάρχουν κύτταρα τα οποία θα αφορούν πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, που είναι και αυτά που αφορούν τη συγκεκριμένη μελέτη (PI

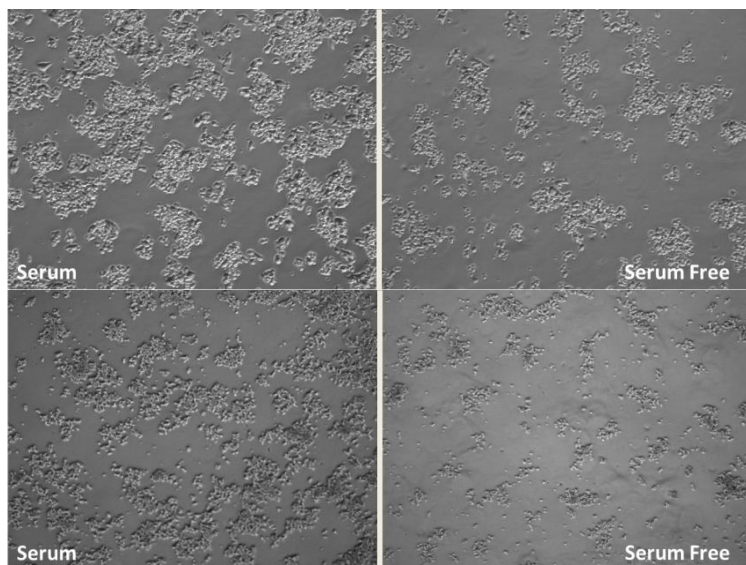
αρνητικά, annexin θετικά → τεταρτημόριο Q3), βιώσιμα κύτταρα (annexin και PI αρνητικά → τεταρτημόριο Q4), κύτταρα που βρίσκονται σε νέκρωση αποκλειστικά, (annexin αρνητικά και PI θετικά → τεταρτημόριο Q1) και τέλος κύτταρα που βρίσκονται σε καθυστερημένη απόπτωση ή είναι ήδη νεκρά και είναι αμφοτέρα θετικά σε annexin και PI (τεταρτημόριο Q2).

Κατά την 1^η δοκιμή, παρατηρήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Εικόνα 10), όπου η απόπτωση των κυττάρων στις 24 ώρες (τεταρτημόριο Q3), παρουσιάζει μία πολύ μικρή διαφορά μεταξύ serum και serum free συνθηκών (της τάξεως του 2-5%) και το ίδιο συμβαίνει και στις 48 ώρες. Επιπλέον, γενικότερα τα ποσοστά καθυστερημένης απόπτωσης (τεταρτημόριο Q2) είναι πολύ χαμηλά, χωρίς να υπάρχουν έτσι εμφανείς διαφορές μεταξύ των συνθηκών. Παρ'όλα αυτά, οι εικόνες των κυττάρων δείχνουν τάση ύπαρξης διαφορών στην κυτταρική απόπτωση (Εικόνα 11). Επίσης, ο NGF δεν έχει δράσει, πιθανόν λόγω των μικρών διαφορών που δε μας επιτρέπουν να δούμε προστασία των κυττάρων ή λόγω των επαναλαμβανόμενων κύκλων κατάψυξης/απόψυξης του φιαλιδίου NGF. Επιπλέον, ενώ θα περιμέναμε πως τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου θα ήταν υψηλότερα στις 48 ώρες, κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται, αντιθέτως τα κύτταρα παρουσιάζονται ιδιαίτεως ανθεκτικά (Εικόνα 10) και θα πρέπει να υποστούν ένα ισχυρό στρες, προκειμένου να παρουσιαστεί το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 10: Αναλύσεις dot plots κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων μετά το πέρας 24 ωρών (πάνω) και 48 ωρών (κάτω), μετά και τη χρήση συμπληρωμένου ορού (serum), τη στέρηση ορού (serum free) και την εφαρμογή NGF. Η χρώση έγινε με Annexin v/PI. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα ποσοστά της απόπτωσης.

Συνθήκες	Πρώιμη Απόπτωση (24 ώρες)	Καθυστερημένη Απόπτωση (24 ώρες)	Πρώιμη Απόπτωση (48 ώρες)	Καθυστερημένη Απόπτωση (48 ώρες)
Serum	2,71%	14,5%	0,24%	2,56%
Serum Free	7,79%	16,8%	2,34%	9,71%
NGF	6,90%	19,5%	2,36%	11,7%



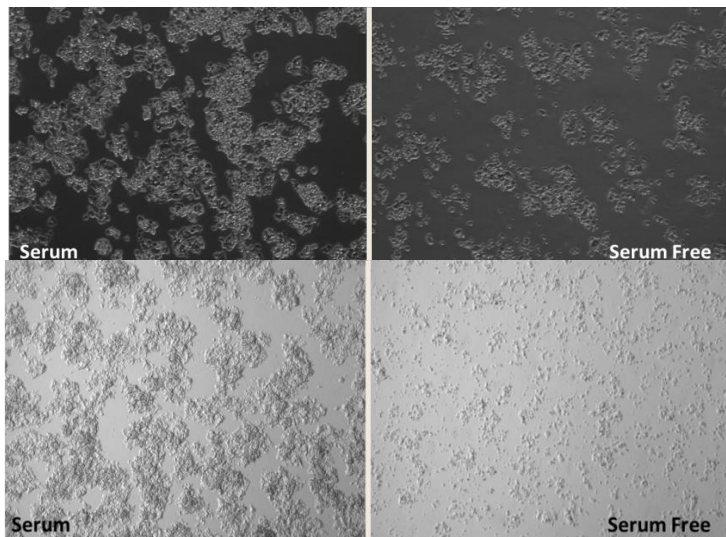
Εικόνα 11: Φωτογραφίες PC12 κυττάρων, μετά το πέρας 24 ωρών (πάνω) και 48 ωρών (κάτω). Εμφανής διαφορά μεταξύ serum και serum free συνθήκης (serum συνθήκη με ορό, serum free συνθήκη απουσία ορού).

Δοκιμή 2

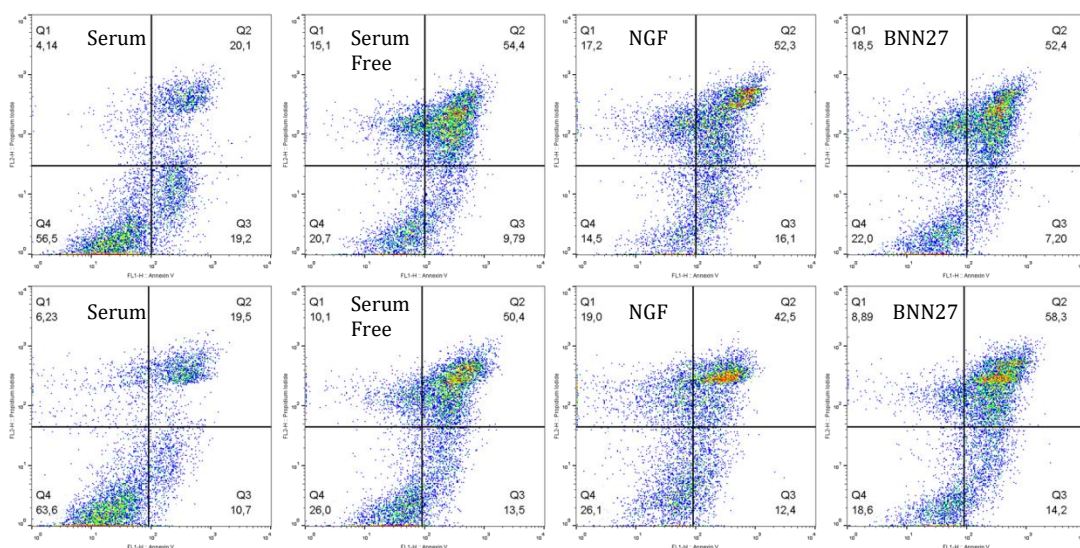
Αποφασίσαμε επομένως, να συνεχίσουμε αυτή τη φορά πραγματοποιώντας τη διαδικασία του pre-starvation για 16 ώρες, κατά το οποίο οι φάσεις στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων σε κάθε συνθήκη συγχρονίζονται και έπειτα επαναλαμβάνεται η στέρηση ορού μόνο στις συνθήκες εκείνες όπου θα χορηγηθούν NGF και BNN27 αντίστοιχα, καθώς και στο control δείγμα στο οποίο θα υπάρχει η μέγιστη απόπτωση. Επιπλέον, ελέγχθηκαν οι 48 και οι 72 ώρες, προκειμένου να επιτύχουμε υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης.

Κατά την 2^η δοκιμή λοιπόν, παρατηρήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Εικόνες 12-13), όπου η κατάσταση serum στις 48 ώρες παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης (τεταρτημόριο Q3) σε σχέση με τη serum free συνθήκη, κάτι το οποίο δεν αναμένουμε και θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως σε αυτή τη φάση τα κύτταρα της serum free συνθήκης, έχουν χαθεί κατά την πειραματική διαδικασία και λόγω της εξασθένησής τους-κυρίως κατά την αποκόλληση, γι' αυτό και τα ποσοστά παρουσιάζονται χαμηλότερα από τις serum συνθήκες. Όσον αφορά όμως την καθυστερημένη απόπτωση (τεταρτημόριο Q2), φαίνεται ότι υπάρχει εμφανής διαφορά μεταξύ serum και serum free και στις 48 και στις 72 ώρες και αυτό φαίνεται και από τις φωτογραφίες των κυττάρων. Παρ' όλα αυτά η διαφορά αυτή είναι η ίδια και στους δύο χρόνους κάτι που δε θα έπρεπε να συμβαίνει, αφού στις 72 ώρες αναμένουμε υψηλότερα ποσοστά. Κι εδώ οι NGF και BNN27, δεν καταφέρνουν να επάγουν την επιβίωση των κυττάρων, πιθανόν εξαιτίας των επαναλαμβανόμενων

κύκλων κατάφυξης/απόφυξης των φιαλιδίων NGF και BNN27. Επιπλέον, γενικότερα ο κυτταρικός θάνατος είναι πολύ υψηλότερος απ'ότι θα αναμέναμε στις serum συνθήκες. Πιθανόν, οι υψηλές τιμές κυτταρικού θανάτου να οφείλονται στη διάρκεια των 16 ωρών του pre-starvation, που καταφέρνει να στρεσάρει σε μεγάλο βαθμό τα κύτταρα. Επιπλέον, μετά το πέρας των 48 ωρών, τα ποσοστά πρόιμου αποπτωτικού θανάτου μειώνονται, καθώς τα περισσότερα κύτταρα οδηγούνται πλέον σε νέκρωση.



Εικόνα 12: Φωτογραφίες PC12 κυττάρων, μετά το pre-starvation 16 ωρών και το πέρας 48 ωρών (πάνω) και 72 ωρών (κάτω), αντίστοιχα. Εμφανής διαφορά μεταξύ serum και serum free συνθήκης (serum συνθήκη με ορό, serum free συνθήκη απουσία ορού).



Εικόνα 13: Αναλύσεις dot plots κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων, μετά το pre-starvation 16 ωρών και το πέρας 48 ωρών (πάνω) και 72 ωρών (κάτω), αφού έγινε χρήση συμπληρωμένου ορού (serum), στέρηση ορού (serum free) και εφαρμογή NGF και BNN27. Η χρώση έγινε με Annexin V/PI. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα ποσοστά της απόπτωσης.

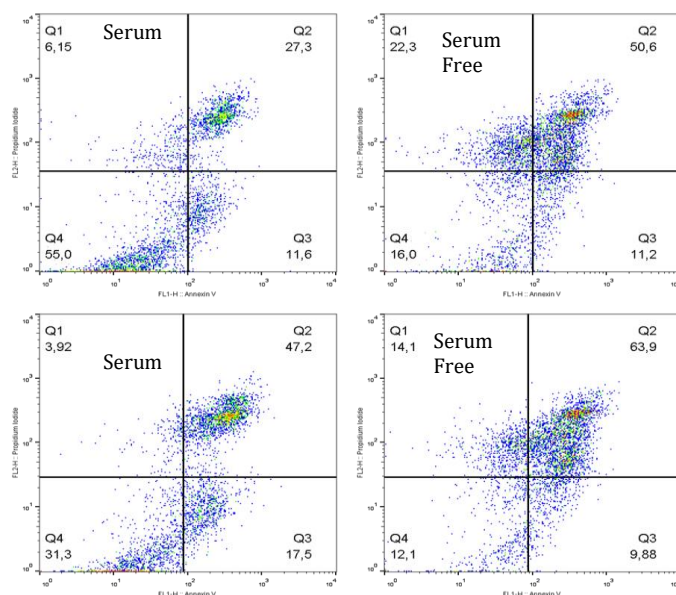
	Πρόιμη Απόπτωση (48 ώρες)	Καθυστερημένη Απόπτωση (48 ώρες)	Πρόιμη Απόπτωση (72 ώρες)	Καθυστερημένη Απόπτωση (72 ώρες)
Serum	19,2%	20,1%	10,7%	19,5%
Serum Free	9,79%	54,4%	13,5%	50,4%
NGF	16,1%	52,3%	12,4%	42,5%

BNN27	7,20%	52,4%	14,2%	58,3%
-------	-------	-------	-------	-------

Δοκιμή 3

Εξαιτίας των υψηλών ποσοστών απόπτωσης που παρατηρήθηκαν μετά τις 16 ώρες pre-starvation και λόγω του υψηλού στρες που δέχτηκαν τα κύτταρα, επιλέξαμε να μειώσουμε τις ώρες του pre starvation σε 8 ώρες. Μετά και το πέρας 24 και 48 ωρών αντίστοιχα, πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα (Εικόνα 14).

Η πρώιμη απόπτωση των κυττάρων στις 24 ώρες δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ serum και serum free συνθηκών. Στις 48 ώρες φαίνεται πως η πρώιμη απόπτωση είναι υψηλότερη στη serum συνθήκη από την serum free, που πιθανόν να οφείλεται στο ότι σε αυτή τη φάση απόπτωσης τα κύτταρα της serum free συνθήκης, έχουν χαθεί κατά την πειραματική διαδικασία και λόγω της εξασθένησής τους-κυρίως κατά την αποκόλληση, γ'αυτό και τα ποσοστά παρουσιάζονται χαμηλότερα από τις serum συνθήκες. Τα ποσοστά καθυστερημένης απόπτωσης παρουσιάζονται με υψηλότερες τιμές σε serum free συνθήκη σε σχέση με serum και στα δύο χρονικά σημεία, ενώ τα ποσοστά στις 48 ώρες, είναι αυξημένα σε σχέση με τις 24 ώρες. Επιπλέον, ο κυτταρικός θάνατος στις serum συνθήκες παραμένει υψηλότερος απ'ότι θα αναμέναμε, πιθανόν λόγω των 8 ωρών του pre-starvation.

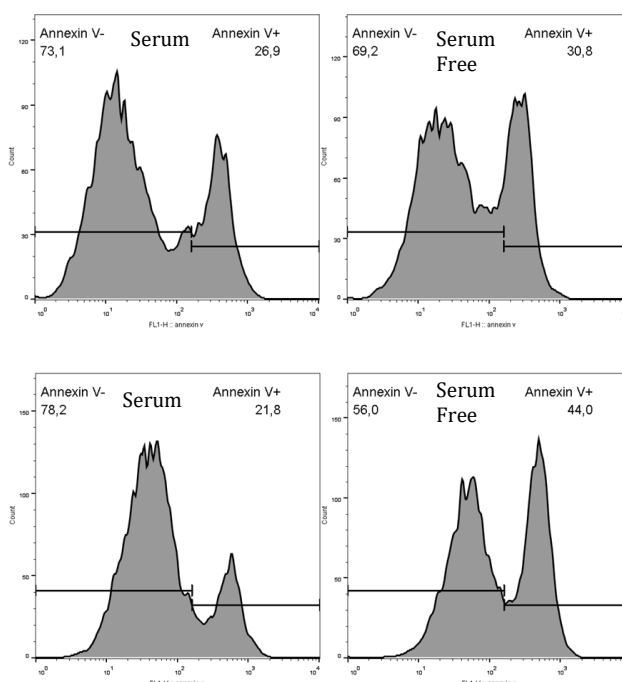


Εικόνα 14: Αναλύσεις dot plots κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων μετά το pre-starvation 8 ωρών και το πέρας 24 ωρών (πάνω) και 48 ωρών (κάτω), αφού έγινε χρήση συμπληρωμένου ορού (serum) και στέρηση ορού (serum free). Η χρώση έγινε με Annexin V/PI. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα ποσοστά της απόπτωσης.

	Πρώιμη Απόπτωση (24 ώρες)	Καθυστερημένη Απόπτωση (24 ώρες)	Πρώιμη Απόπτωση (48 ώρες)	Καθυστερημένη Απόπτωση (48 ώρες)
Serum	11,6%	27,3%	17,5%	47,2%
Serum Free	11,2%	50,6%	9,88%	63,9%

Δοκιμή 4

Καθώς λοιπόν τα υψηλά ποσοστά θανάτου συνέχισαν να παρατηρούνται στη serum συνθήκη, μειώσαμε τις ώρες του pre-starvation σε 2 ώρες, ενώ αυτή τη φορά, δοκιμάσαμε τη χρήση serum free το οποίο έχει θερμομανθεί, αντί για παγωμένο PBS 1x, προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα από τα τρυβλία, υποθέτοντας πως ο αυξημένος κυτταρικός θάνατος οφείλεται στο παγωμένο PBS 1x και στο στρες που υφίστανται τα κύτταρα. Μετά από 24 ώρες λοιπόν και αφού σε αυτή τη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε μόνο η ανεξίνη (για να μειωθεί η ενίσχυση του θανάτου που παρατηρούμε εξαιτίας του PI), παρατηρήσαμε τα παρακάτω αποτελέσματα όσον αφορά την πρόιμη απόπτωση και μόνο, των κυττάρων (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Αναλύσεις ιστογραμμάτων κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων μετά το pre-starvation 2 ωρών και το πέρας 24 ωρών. Η αποκόλληση των κυττάρων έγινε με παγωμένο PBS 1x (πάνω) ή ζεστό serum free (κάτω), μετά και τη χρήση συμπληρωμένου ορού (serum) και τη στέρηση ορού (serum free). Η χρώση έγινε με Annexin v/PI και η απόπτωση των κυττάρων, εντοπίζεται στα δεξιά του άξονα, ενώ τα υγιή κύτταρα, εμφανίζονται στα αριστερά. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα ποσοστά της απόπτωσης.

	Παγωμένο PBS 1x Πρώιμη Απόπτωση	Ζεστό Serum Free Πρώιμη Απόπτωση
Serum	26,9%	21,8%
Serum Free	30,8%	44%

Στις εικόνες της πάνω σειράς, φαίνεται ότι η αποκόλληση των κυττάρων με παγωμένο PBS έχει αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στη serum συνθήκη χωρίς διαφορά από τη serum free, ενώ στην

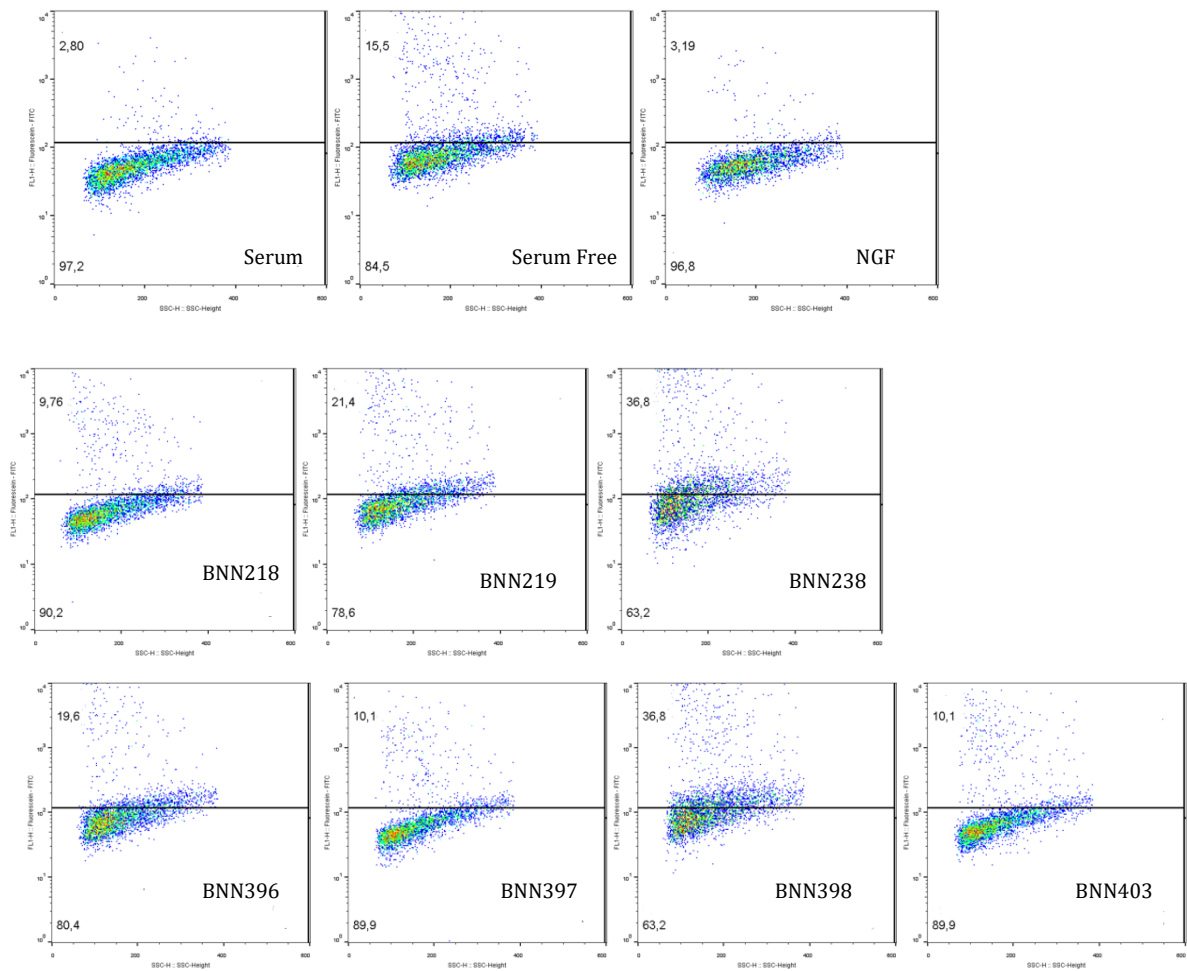
κάτω σειρά, τα κύτταρα που αποκόλληθηκαν με ζεστό ορό αντί για PBS, παρουσιάζουν μία εμφανή διαφορά μεταξύ serum και serum free συνθήκης. Παρ'όλα αυτά, η serum συνθήκη, παρουσιάζει κι εδώ υψηλό ποσοστό απόπτωσης, που πιθανόν να οφείλεται στο ότι κατά τη διάρκεια της αποκόλλησής και της πειραματικής διαδικασίας, τα κύτταρα υφίστανται θάνατο.

Συμπερασματικά, προσδιορίστηκε ότι ο ζεστός ορός διαμόρφωσε μια σημαντική μεταβολή σε σύγκριση με το παγωμένο PBS, ενώ ο χρόνος του pre-starvation καθορίστηκε στις 3 ώρες για τις επόμενες δοκιμές. Κατά συνέπεια, κατορθώσαμε να βελτιστοποιήσουμε τις βασικές ρυθμίσεις και τις πρακτικές που απαιτούνται για την εξέταση των μικρονευροτροφινών, τόσο σε επίπεδο κυττάρων, όσο και σε επίπεδο χειρισμού της κυτταρομετρίας ροής.

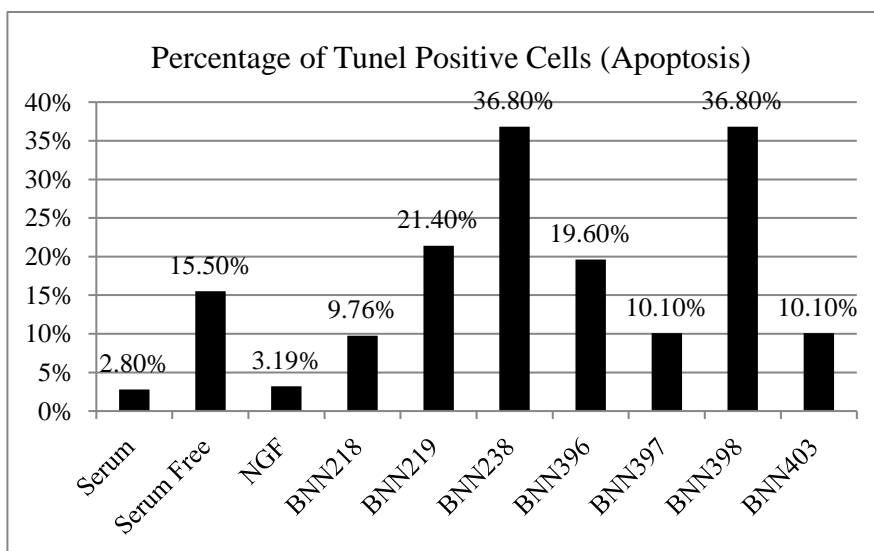
Μείωση της απόπτωσης - που προκαλείται λόγω στέρησης ορού σε καλλιέργειες των PC12 κυττάρων - μέσω της δράσης συγκεκριμένων συνθετικών αναλόγων για 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η αντιαποπτωτική δράση των νέων συνθετικών αναλόγων της DHEA, μέσω καλλιιεργειών των PC12 κυττάρων, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη μελέτη της νευρικής απόπτωσης και επιβίωσης. Τα PC12 κύτταρα, εκφράζουν ενδογενώς TrkA και p75 υποδοχείς, για το λόγο αυτόν λοιπόν, ελέγχθηκε η ικανότητα των συνθετικών αναλόγων να επάγουν την αντιαποπτωτική τους δράση, πιθανόν μέσω αυτών των υποδοχέων (πρόκειται να γίνουν περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση των υποδοχέων μέσω των οποίων δρουν). Για να εξεταστεί λοιπόν, αν τα συνθετικά ανάλογα της DHEA είναι ικανά να αντιστρέψουν την απόπτωση που προκαλείται στα κύτταρα σε συνθήκες στέρησης ορού, καλλιεργήθηκαν PC12 κύτταρα. Αρχικά, υπήρξε το στάδιο του pre-starvation για 3 ώρες κι έπειτα εφαρμόστηκαν οι κατάλληλες θεραπείες (χρήση αναλόγων) για 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Τα δείγματα μελετήθηκαν μέσω της χρώσης με TUNEL και ακολούθησε η μετέπειτα ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής.

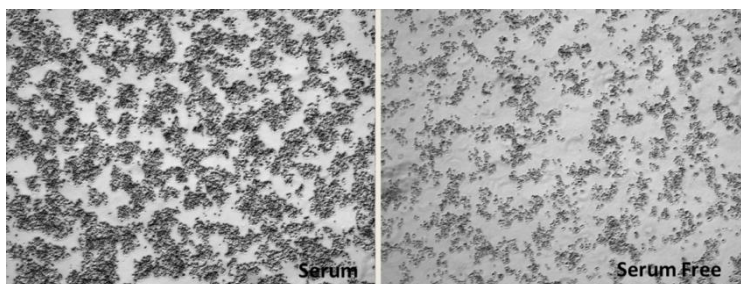
Όσον αφορά τα αποτελέσματα των 24 ωρών (*Εικόνες 16-17*), ανάμεσα σε serum και serum free συνθήκη, υπήρξε μια διαφορά της τάξεως του 10-12%, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα μας πειράματα, όπου η απόπτωση σε αυτή τη χρονική στιγμή είναι αρκετά χαμηλή. Παρ'όλα αυτά, στις φωτογραφίες των PC12 κυττάρων, παρατηρούμε πως οι διαφορές μεταξύ των δύο συνθηκών, είναι αρκετά εμφανείς (*Εικόνα 18*). Οι διαφορές των τιμών δεν είναι μεγάλες, αλλά παρατηρείται πως ο NGF δρα προστατευτικά, μειώνοντας την απόπτωση περίπου στο 3%, ενώ τα ανάλογα BNN218, BNN397 και BNN403, εμφανίζουν μία τάση για μείωση της απόπτωσης κατά τη δράση τους για 24 ώρες.



Εικόνα 16: Αναλύσεις dot plots κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών από τη στέρηση ορού. Η χρώση έγινε με TUNEL. Στο πάνω τμήμα του άξονα, παρουσιάζεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, ενώ ακριβώς από κάτω παρουσιάζεται το ποσοστό των υγιών.



Εικόνα 17: Ραβδόγραμμα ποσοστών απόπτωσης που προέκυψαν από τις αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων, μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών από τη στέρηση ορού. Η χρώση έγινε με TUNEL.



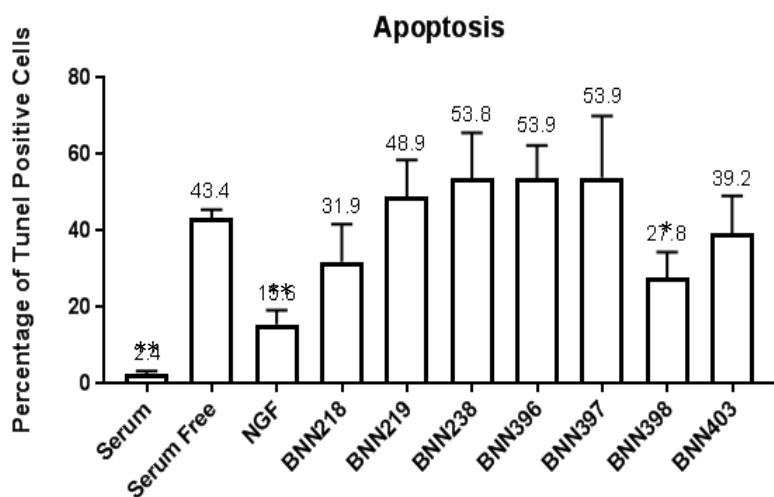
Εικόνα 18: Φωτογραφίες PC12 κυττάρων, μετά το πέρας 24 ωρών από τη στέρηση ορού. Εμφανής διαφορά μεταξύ serum και serum free συνθήκης (serum συνθήκη με ορό, serum free συνθήκη απουσία ορού).

Καθώς λοιπόν, τα γενικότερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου παρουσιάζονται ιδιαίτερα χαμηλά μετά τις 24 ώρες, προχωρήσαμε στις δοκιμές μετά το πέρας 48 ωρών, όπου προέκυψε η παρακάτω ανάλυση με $n=3$.

Όσον αφορά λοιπόν τα αποτελέσματα των 48 ωρών (Εικόνα 19), ανάμεσα σε serum και serum free συνθήκη, υπήρξε μια διαφορά της τάξεως του 40% ($40,97 \pm 2,364$), κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα μας πειράματα, όπου η απόπτωση σε αυτή τη χρονική στιγμή είναι ιδιαίτερα υψηλή. Ο NGF δρα προστατευτικά, μειώνοντας την απόπτωση κατά $27,79 \pm 4,223\%$.

Μετά από ανάλυση των τριών επαναλήψεων, προέκυψε ο μέσος όρος και με επεξεργασία στατιστικής ανάλυσης προέκυψαν οι τιμές στατιστικής σημαντικότητας, λαμβάνοντας υπόψη τις αποκλίσεις μεταξύ των τριών διαφορετικών δοκιμών.

Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τους μέσους όρους, παρατηρούμε συγκεκριμένα πως φαίνεται να παρέχουν προστατευτική δράση τα ανάλογα BNN218 και BNN398, με το BNN403 να δείχνει μία τάση προς μείωση της απόπτωσης. Παρ'όλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη τις αποκλίσεις μεταξύ των τριών επαναλήψεων (error bars), φαίνεται πως μόνο το 398 ανάλογο ($15,57 \pm 6,994$, με $P<0,05$) δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, πέρα από τη διαφορά μεταξύ serum και serum free ($P<0,01$) και τη διαφορά μεταξύ serum free και NGF ($P<0,01$), που αποτελούν τους θετικούς μάρτυρες. Οι τιμές στατιστικής σημαντικότητας των υπολοίπων δειγμάτων, μετά από σύγκριση με το δείγμα serum free, για το BNN218, ήταν $P=0,32$, για το BNN219, $P=0,61$, για το BNN238, $P=0,44$, για το BNN396, $P=0,23$, για το BNN397, $P=0,56$ και για το BNN403, $P=0,70$.

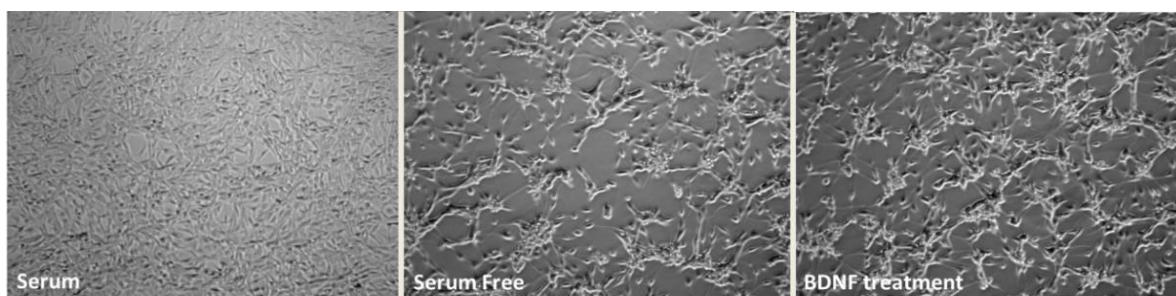


Εικόνα 19: Ραβδόγραμμα ποσοστών απόπτωσης που προέκυψαν από τις αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 48 ωρών. Η χρώση έγινε με TUNEL και οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις επαναλήψεις ($n=3$). Όσον αφορά τις τιμές στατιστικής σημαντικότητας, προέκυψαν μετά από σύγκριση του κάθε δείγματος, με τη συνθήκη στέρησης ορού (ανάλυση t test, μέσος όρος \pm SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, $**P<0,01$, $*P<0,05$).

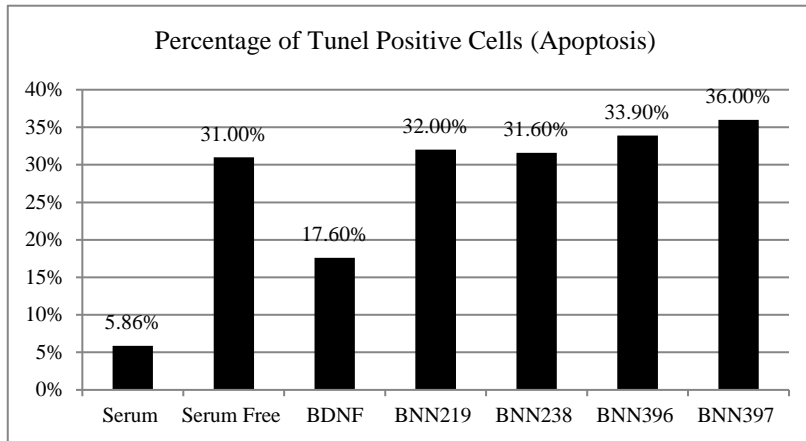
Μη αναστολή της απόπτωσης - που προκαλείται λόγω στέρησης ορού σε καλλιέργειες των NIH-3T3 κυττάρων (έκφραση TrkB) - μέσω της δράσης συγκεκριμένων συνθετικών αναλόγων για 24 ώρες

Έχοντας μία πρώτη εικόνα για το ποια ανάλογα ενδεχομένως να δρουν προστατευτικά στα κύτταρα PC12, προχωρήσαμε στην παρούσα δοκιμή, όπου αξιολογήθηκε η αντιαποπτωτική δράση των συνθετικών αναλόγων που στα PC12 κύτταρα απείχαν στατιστικά σημαντικά από το να μειώσουν την απόπτωση, μέσω καλλιέργειών των NIH-3T3 κυττάρων, τα οποία εκφράζουν τον TrkB. Θελήσαμε με αυτόν τον τρόπο να εξετάσουμε, αν τα υπόλοιπα συνθετικά ανάλογα της DHEA είναι ικανά να αντιστρέψουν την απόπτωση που προκαλείται στα κύτταρα σε συνθήκες στέρησης ορού, αυτή τη φορά όμως, πιθανόν δρώντας μέσω TrkB (πρόκειται να γίνουν περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση των υποδοχέων μέσω των οποίων δρουν). Αρχικά, υπήρξε το στάδιο του pre-starvation για 3 ώρες κι έπειτα εφαρμόστηκαν οι κατάλληλες θεραπείες (χρήση αναλόγων) για 24 ώρες. Τα δείγματα μελετήθηκαν μέσω της χρώσης με TUNEL και ακολούθησε η μετέπειτα ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής.

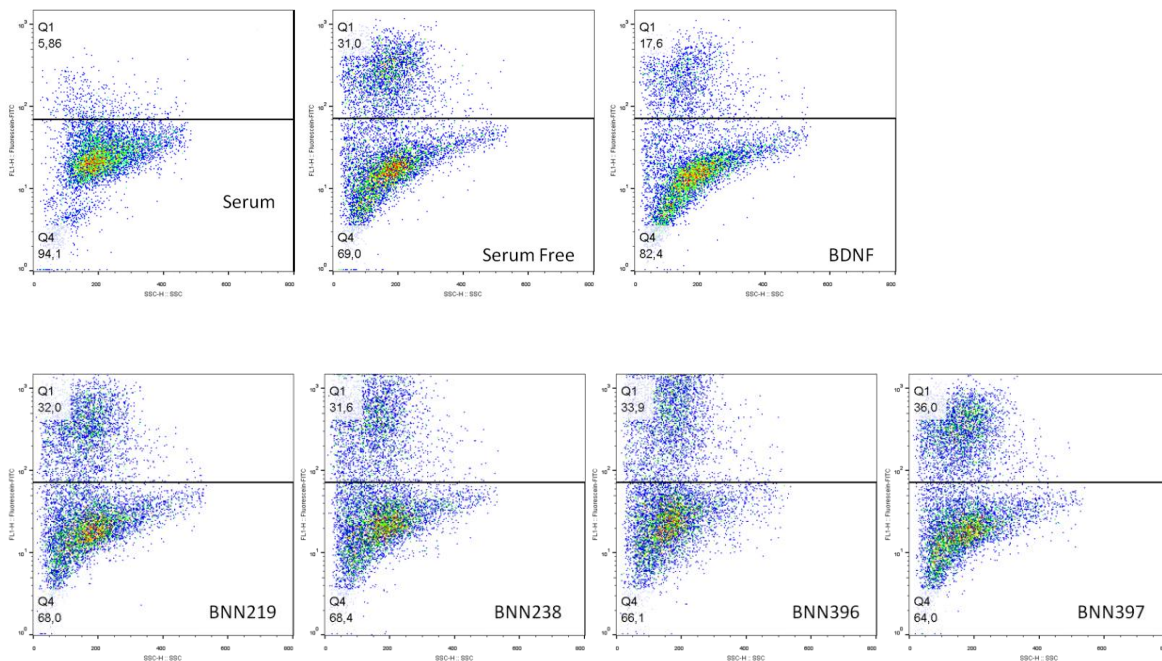
Όσον αφορά τα αποτελέσματα, ανάμεσα σε serum και serum free συνθήκη, υπήρξε μια διαφορά της τάξεως του 25%, που είναι εμφανής, τόσο πριν την ανάλυση, μέσω της παρατηρησέως της μορφολογίας των κυττάρων (*Εικόνα 20*), όσο και μετά την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (*Εικόνες 21-22*). Ο BDNF, δρα προστατευτικά, μειώνοντας την απόπτωση περίπου κατά 15%. Εν συνεχεία όμως, παρατηρείται πως τα BNN219,-238,-396 και -397, παρουσιάζουν το ίδιο ποσοστό απόπτωσης με τη συνθήκη στέρησης ορού, πράγμα που σημαίνει πως δε δρουν προστατευτικά, στη συγκεκριμένη περίπτωση.



Εικόνα 20: Φωτογραφίες NIH-3T3 κυττάρων μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών. Χρήση BDNF ως θετικό control. Εμφανής διαφορά μεταξύ serum και serum free συνθήκης (serum συνθήκη με ορό, serum free συνθήκη απουσία ορού, BDNF treatment θεραπεία με BDNF).



Εικόνα 21: Ραβδόγραμμα ποσοστών απόπτωσης που προέκυψαν από τις αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής NIH-3T3 κυττάρων, μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών. Η χρώση έγινε με Tunel.

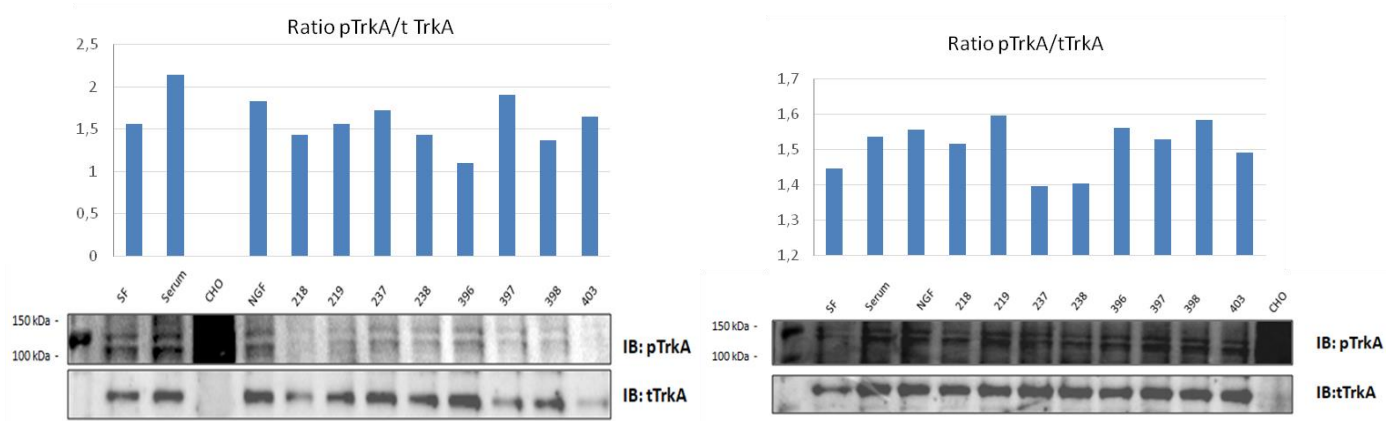


Εικόνα 22: Αναλύσεις dot plots κυτταρομετρίας ροής NIH-3T3 κυττάρων μετά pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών. Η χρώση έγινε με Tunel. Στο πάνω τμήμα του άξονα, παρουσιάζεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, ενώ ακριβώς από κάτω παρουσιάζεται το ποσοστό των υγιών.

Ενεργοποίηση υποδοχέων νευροτροφινών και επαγωγή φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα τυροσίνης Y490 και Y816 για TrkA και TrkB υποδοχείς, αντίστοιχα

Παράλληλα, οι Βεζήρ και Βουτυράκη, προκειμένου να εξεταστεί η πρόσδεση των συνθετικών αναλόγων της DHEA στους Trk υποδοχείς, αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητά τους να επάγουν τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης αυτών των υποδοχέων. Συγκεκριμένα για TrkA, χρησιμοποιήθηκε το p-Tyr490 αντίσωμα και παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα, μετά τη χρήση

των αναλόγων για διάρκεια 10, 20 και 30 λεπτών, αντίστοιχα και μετά από πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Όσον αφορά τα 10 λεπτά δεν παρατηρείται καμία ενεργοποίηση, ενώ στα 20 λεπτά θεραπείας με τα ανάλογα (Εικόνα 23), είναι σαφές ότι οι συνθήκες serum και NGF ενεργοποιούν τον υποδοχέα. Τα κύτταρα CHO από την άλλη, δεν εκφράζουν τον υποδοχέα TrkA (IB: tTrkA). Μετά από αναλύσεις της έντασης των ζωνών που προέκυψαν και της αναλογίας pTrkA/tTrkA (φωσφορυλιωμένος υποδοχέας/ολική έκφραση υποδοχέα), τα ανάλογα που φαίνεται να έχουν επίδραση στην ενεργοποίηση του υποδοχέα στα 20 λεπτά είναι τα BNN237, BNN397 και BNN403. Στα 30 λεπτά, τα BNN219, BNN396 και BNN398 παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση, ενώ τα BNN397, BNN218 και BNN403 δίνουν ένα χαμηλότερο σήμα. Το BNN238 δεν φαίνεται να ενεργοποιεί τον υποδοχέα στη δοκιμή των 30 λεπτών (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Ενεργοποίηση υποδοχέα TrkA, μετά από 4 ώρες pre-starvation και τη χρήση των αναλόγων για 20 λεπτά (αριστερά) και 30 λεπτά, αντίστοιχα (δεξιά). Παρουσιάζονται επίσης οι λόγοι των pTrkA / tTrkA.

Συμπερασματικά:

- Προστατευτική δράση τείνουν να εμφανίσουν τα ανάλογα BNN218, BNN397, BNN403 κατόπιν 24ωρης δράσης τους.
- Κατόπιν 48ωρης δράσης των αναλόγων στατιστικώς σημαντική νευροπροστατευτική δράση έδειξε το BNN398 και τάση για μείωση της απόπτωσης το BNN218.
- Η ενεργοποίηση του TrkA υποδοχέα φαίνεται να επιτυγχάνεται από τα ανάλογα BNN397 και BNN403 στα 20 λεπτά και
BNN219, BNN396, BNN398 (με μεγαλύτερη ένταση) } στα 30 λεπτά
BNN218, BNN397, BNN403 (με χαμηλότερη ένταση)
- Ανάλογα που μειώνουν την απόπτωση, πιθανόν δρουν μέσω επαγόμενης σηματοδότησης μονοπατιών επιβίωσης από τους TrkA υποδοχείς (πιθανές διεγερτικές ή ανασταλτικές δράσεις και/ή μέσω του υποδοχέα p75NTR δεν μπορούν να αποκλειστούν).
- Ανάλογα που αυξάνουν την απόπτωση, ίσως δρουν μέσω ενεργοποίησης του p75NTR.
- Ενεργοποίηση υποδοχέα & προστασία κυττάρων → σηματοδότηση μονοπατιών επιβίωσης κατόπιν ενεργοποίησης του TrkA υποδοχέα από τα ανάλογα BNN218, BNN397, BNN398, BNN403.
- Ενεργοποίηση υποδοχέα & απόπτωση κυττάρων → τα ανάλογα BNN219 και BNN396 ενδεχομένως δρουν ως μερικοί αγωνιστές του TrkA υποδοχέα και προκαλούν βιολογική απάντηση μικρότερης έντασης, ίσως εμπλέκονται σε άλλα κυτταρικά φαινόμενα αλλά όχι αυτό της κυτταρικής επιβίωσης, ή πιθανόν να ενεργοποιούν ισχυρότερα τον p75NTR και να οδηγούν σε απόπτωση (η αναλογία υποδοχέων TrkA:p75NTR υποδοχέων στα κύτταρα PC12 είναι υπέρ του δεύτερου υποδοχέα).
- Μη ενεργοποίηση υποδοχέα → πιθανόν δε δεσμεύονται σε TrkA ή δεσμεύονται αλλά δεν τον ενεργοποιούν και λειτουργούν ανταγωνιστικά, όσον αφορά τη δέσμευση αγωνιστών σε αυτόν.
- Απαραίτητος επανέλεγχος όλων των παραπάνω, λόγω διακυμάνσεων των τιμών μεταξύ των διαφορετικών επαναλήψεων.

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Μεγάλο εύρος νευροεκφυλιστικών ασθενειών συνδέεται με μειωμένη παραγωγή και δράση, τόσο των νευροτροφινών, όσο και των νευροστεροειδών. Η αποπτωτική διαδικασία, αποτελεί κοινό παθοφυσιολογικό μηχανισμό που παρατηρείται ως έκβαση σε πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ενώ νευροτροφίνες και νευροστεροειδή, εξαιτίας της μείωσης στην παραγωγή τους κατά την γήρανση ή σε παθολογικές καταστάσεις, συντελούν στο να καταστούν τα νευρικά κύτταρα, απροστάτευτα. Φαρμακευτικό στόχο λοιπόν, αποτελεί η αναστολή της αποπτωτικής απώλειας που εξετάζεται στην παρούσα μελέτη.

Νευροτροφίνες και νευροστεροειδή εμφανίζουν μεγάλη σημασία στο χώρο της νευροφαρμακολογίας, καθώς οι φυσιολογικές τους δράσεις σχετίζονται με μία σειρά λειτουργιών επιβίωσης, ανάπτυξης και κυτταρικής λειτουργίας στο νευρικό ιστό. Ωστόσο, παρά τις ευεργετικές τους επιδράσεις, η θεραπευτική τους χρησιμότητα περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό. Από τη μία πλευρά, οι νευροτροφίνες εξαιτίας της πολυπεπτιδικής τους φύσης και της περιορισμένης διαπερατότητας τους στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, και από την άλλη τα νευροστεροειδή, εξαιτίας του *in vivo* μεταβολισμού τους σε ανδρογόνα κι οιστρογόνα, και της μετέπειτα δράσης που μπορεί να έχουν λόγω δημιουργίας νεοπλασιών.

Η DHEA θεωρείται ως ένα πολλά υποσχόμενο μόριο για τη θεραπεία ορισμένων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μέσω των δράσεών της έναντι της αναστολής της νευρικής απόπτωσης. Τα πρώτα πειράματα σε νευρικά κύτταρα PC12 έδειξαν ότι οι δράσεις αυτές μεσολαβούνται από διαφορετικούς υποδοχείς, ανεξάρτητα των υποδοχέων οιστρογόνων, ανδρογόνων, των GABA_A και NMDA, (Charalampopoulos et al. 2005; Greene & Tischler 1976). Κατόπιν (Lazaridis et al. 2011) δείχθηκε ότι οι δράσεις αυτές οφείλονται στην πρόσδεση της ορμόνης με τους υποδοχείς του NGF, TrkA και p75NTR.

Ως εκ τούτου, εκμεταλλεζόμενοι την ιδιότητα της DHEA να προσδέεται σε υποδοχείς νευροτροφινών και να προστατεύει διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων, σχεδιάστηκαν συνθετικά μόρια, ανάλογα αυτής, που έχουν υποστεί τροποποιήσεις στους C3 και C17 και δε μεταβολίζονται σε ανδρογόνα κι οιστρογόνα (Calogeropoulou et al. 2009). Επιπλέον, είναι μικρομοριακά και λιπόφιλα και έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Όλα αυτά καθιστούν τα μόρια αυτά (μικρονευροτροφίνες), αγωνιστές υποδοχέων νευροτροφινών και θεραπευτικά χρήσιμα έναντι νευροεκφυλιστικών νόσων. Τέτοιου είδους μόρια, μελετώνται στην παρούσα έρευνα για την αντιαποπτωτική τους δράση και την ικανότητα ενεργοποίησης υποδοχέων νευροτροφινών.

Οι πιο ισχυρές ενώσεις που έχουν ήδη μελετηθεί, όπως προαναφέρθηκε είναι τα ανάλογα BNN20 και BNN27. Αυτά τα ανάλογα, δεσμεύονται με TrkA, TrkB και p75NTR υποδοχείς, δρώντας αντι-αποπτωτικά (Calogeropoulou et al. 2009). Περαιτέρω *in vivo* μελέτες με την χρήση των συγκεκριμένων αυτών αναλόγων έδωσαν ελπιδοφόρα θεραπευτικά αποτελέσματα (Botsakis et al. 2017; Bonetto et al. 2017; Ibán-Arias et al. 2018).

Σκοπό της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης, αποτελεί η εξακρίβωση της ικανότητας νέων συνθετικών μορίων – BNN218, BNN219, BNN238, BNN396, BNN397, BNN398, BNN403 – να επάγουν τη προστασία των κυττάρων, καθώς και η μετέπειτα μελέτη της δράσης τους, μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων Trk.

Για να εξακριβωθεί η ικανότητα τους να μειώσουν στατιστικά σημαντικά την απόπτωση που παρατηρείται σε καλλιέργειες κυττάρων PC12 και NIH-3T3, όπου έχει προηγηθεί στέρηση ορού, έγινε ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής της αντι-αποπτωτικής τους δράσης, κυρίως με τη χρήση

TUNEL assay αλλά και άλλων πειραματικών διαδικασιών, οι οποίες έγιναν σε πρώτο στάδιο ώστε, να οριστούν οι κατάλληλες πειραματικές συνθήκες, αλλά και για να καθοριστούν οι κατάλληλες ρυθμίσεις και μετρήσεις της κυτταρομετρίας.

Αρχικά λοιπόν, χρησιμοποιώντας χρώσεις μόνο με ιωδιούχο προπίδιο και έπειτα με ανεξίνη ν και ιωδιούχο προπίδιο σε συνδυασμό, καθορίστηκαν οι κατάλληλες συνθήκες τόσο των κυτταροκαλλιιεργειών των PC12 κυττάρων, όσο και οι ρυθμίσεις της κυτταρομετρίας ροής. Οι πρώτες δοκιμές, έδειξαν συμπερασματικά, ότι η μεγάλη διάρκεια του pre-starvation, μπορεί να στρεσάρει σε μεγάλο βαθμό τα κύτταρα, με αποτέλεσμα ακόμα και στις serum συνθήκες να υπάρχουν υψηλά ποσοστά απόπτωσης, επιπλέον αυτό μπορεί να οφείλεται και στον τεχνικό χειρισμό των κυττάρων, καθώς μπορεί κατά τη διάρκεια της αποκόλλησής τους να υφίστανται θάνατο και να χάνονται από την πειραματική διαδικασία. Όσον αφορά τις 24 ώρες, συμπερασματικά φάνηκε πως είναι ελάχιστος χρόνος για να παρατηρούμε διαφορές μεταξύ serum και serum free, καθώς στο χρόνο αυτό τα συγκεκριμένα κύτταρα παρουσιάζονται ιδιαίτερα ανθεκτικά και ίσως αυτό να οφείλεται και στο μεγάλο αριθμό κυττάρων που καλλιεργούμε αρχικά, καθώς τα PC12, έχουν την τάση υπό υψηλή πυκνότητα και συσσώρευση να εγκληματίζονται στη στέρηση ορού και να μην οδηγούνται σε απόπτωση. Για το λόγο αυτό, ο χρόνος στον οποίο παρατηρείται διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών, καθώς υπάρχει μεγάλο ποσοστό κυτταρικού θανάτου, είναι οι 48 ώρες. Παρατηρείται επίσης, πως η χρήση ζεστού ορού για την αποκόλληση των κυττάρων, λειτουργεί καλύτερα από τη χρήση παγωμένου PBS 1x και αυτό γιατί έτσι τα κύτταρα δε στρεσάρονται επιπλέον. Τέλος, ορίστηκαν και οι ρυθμίσεις της κυτταρομετρίας ροής με βάση τη μορφολογία των κυττάρων PC12 και NIH-3T3, αντίστοιχα.

Έπειτα συνεχίσαμε με τις δοκιμές των αναλόγων, όπου έγινε χρήση ειδικής μεθόδου μέτρησης απόπτωσης, TUNEL Assay, μετά από 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Οι ώρες του pre-starvation ορίστηκαν στις τρεις, χρόνος που είναι αρκετός, ώστε να συγχρονιστεί ο κυτταρικός κύκλος όλων των κυττάρων και δε θα προκαλέσει υψηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Οι ώρες της στέρησης ορού και της χρήσης των αναλόγων, καθορίστηκαν στις 24 και 48, αντίστοιχα, όπου στις 48 παρατηρούνται εμφανείς διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, καθώς τότε αρχίζει να αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος σε σχέση με τις 24 ώρες, όπου τα κύτταρα είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά.

Τα κύτταρα PC12, εκφράζουν TrkA και p75NTR υποδοχείς, πράγμα που σημαίνει πως για πρώτο βήμα, ελέγχθηκε η προστασία των κυττάρων από ανάλογα που ενδεχομένως να δρουν μόνο μέσω αυτών των νευροτροφικών υποδοχέων και όχι των υπολοίπων, δηλαδή των TrkB και TrkC. Στην προκειμένη φάση όμως θα πρέπει να γίνουν κι άλλες μελέτες ώστε να εξακριβωθεί ο συγκεκριμένος υποδοχέας μέσω του οποίου δρα το κάθε ανάλογο. Στις 24 ώρες λοιπόν, φαίνεται πως τα ανάλογα τα οποία δρουν προστατευτικά, είναι τα BNN218, BNN397 και BNN403. Στις 48 ώρες, ενδεχομένως να μπορεί να δράσει προστατευτικά το BNN218 και το BNN398 (στατιστικά σημαντική

μείωση). Τα μόρια αυτά πιθανόν να δρουν μέσω ενεργοποίησης TrkA ή p75NTR και της περαιτέρω σηματοδότησης μονοπατιών επιβίωσης. Όσον αφορά τις 24 και 48, φαίνεται πως τα ανάλογα παρουσιάζουν διαφορές στο χρόνο δράσης τους, πράγμα που σημαίνει πως πολύ πιθανόν, τα BNN397 και BNN403, να χάνουν τη δράση τους μετά από 24 ώρες, ενώ το 398 πιθανόν να χρειάζεται περισσότερο χρόνο προκειμένου να δράσει προστατευτικά. Αυτό πιθανόν να σχετίζεται με τη συγγένεια προσδέτη-υποδοχέα και το χρόνο που παραμένει δεσμευμένο το ανάλογο σε αυτόν, καθώς και με την ενεργοποίηση των περαιτέρω σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα υπόλοιπα ανάλογα δε φαίνεται να έχουν καμία δράση στη μείωση της απόπτωσης, αντιθέτως, φαίνεται ότι την αυξάνουν (48 ώρες) κάτι που ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι μπορεί να μη δρουν μέσω υποδοχέα TrkA αλλά μέσω p75NTR. Επιπλέον, πιθανόν να προσδένονται και στους δύο υποδοχείς, αλλά η δράση τους να επηρεάζεται από την αναλογία των υποδοχέων TrkA και p75NTR. Πράγματι από παλαιότερες έρευνες του εργαστηρίου, έχει υποδηλωθεί η ικανότητα της DHEA να δρα ως θετικός ή αρνητικός ρυθμιστής της επιβίωσης των νευρικών κυττάρων, ανάλογα με το σε ποιον υποδοχέα δεσμεύεται (Lazaridis et al. 2011).

Έπειτα ελέγχθηκαν τα κύτταρα NIH-3T3, τα οποία εκφράζουν TrkB. Εδώ φάνηκε πως κανένα ανάλογο δεν καταφέρνει να μειώσει την απόπτωση και τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου, εμφανίζονται παρόμοια με αυτά της συνθήκης στέρησης ορού. Στην προκειμένη περίπτωση, τα ανάλογα δε δείχνουν να επάγουν κάποια προστατευτική δράση.

Τέλος, φαίνεται πως συγκεκριμένα συνθετικά ανάλογα από αυτά που μελετήθηκαν, ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης τους Trk υποδοχείς. Μελέτη των Βεζήρ και Βουτυράκη, εξέτασε τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων Trk στα κύτταρα NIH-3T3, σταθερά διαμολυσμένα με το cDNA του υποδοχέα που μελετούνταν κάθε φορά – TrkA και TrkB.

Παρατηρήθηκε λοιπόν, όσον αφορά τους TrkA υποδοχείς, πως τα BNN237, -397 και -403 στα 20 λεπτά, επάγουν τη φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση του υποδοχέα. Όσον αφορά την ενεργοποίηση στα 30 λεπτά, αυτή επιτυγχάνεται από τα BNN219, BNN396 και BNN398 με μεγαλύτερη ένταση και τα BNN397, BNN218 και BNN403, με χαμηλότερη ένταση.

Η ενεργοποίηση αυτή των υποδοχέων, στην περίπτωση που συμφωνεί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προστασία των κυττάρων, σχετίζεται με το ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί σε περαιτέρω σηματοδότηση, με απότερο σκόπο την προστασία από απόπτωση (BNN218, -397,-398 και -403 κατά την ενεργοποίηση του TrkA). Τα ανάλογα που φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς, αλλά δεν εμφανίζουν προστατευτική δράση, όπως τα BNN219 και BNN396 στον TrkA, ενδεχομένως να μπορούν να δράσουν ως μερικοί αγωνιστές, πράγμα που σημαίνει πως ενεργοποιούν τον υποδοχέα αλλά προκαλούν βιολογική απάντηση μικρότερης έντασης ή απάντηση διαφορετική της νευροπροστασίας ή όσον αφορά τα ανάλογα που ενεργοποιούν τον TrkA αλλά δεν καταφέρνουν να προστατέψουν τα κύτταρα, πολύ πιθανόν να ενεργοποιούν και τον p75NTR και να οδηγούν σε

απόπτωση, λόγω αναλογίας των υποδοχέων. Τέλος, τα ανάλογα που δε δείχνουν να φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς, πολύ πιθανόν να μη δεσμεύονται σε αυτούς ή να δεσμεύονται στον υποδοχέα αλλά να μην τον ενεργοποιούν και να λειτουργούν ανταγωνιστικά, όσον αφορά τη δέσμευση αγωνιστών σε αυτόν.

Τελειώνοντας, σε εξέλιξη της παρούσας μελέτης βρίσκονται πειράματα, που αφορούν την αλληλεπίδραση των συνθετικών αναλόγων με τους νευροτροφικούς υποδοχείς TrkC και p75NTR, αλλά και η δοκιμασία tunel σε κύτταρα NIH-3T3, που εκφράζουν υποδοχείς TrkC και p75NTR. Επιπλέον, χρειάζεται ο επανέλεγχος όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων, λόγω διακυμάνσεων των τιμών μεταξύ των διαφορετικών επαναλήψεων, οι οποίες πιθανόν να έχουν προκύψει λόγω λαθών σε τεχνικούς χειρισμούς ή να οφείλονται στο ότι τα ανάλογα μπορεί να έχουν χάσει την ενεργότητά τους και θα πρέπει να επαναδιαλυθούν εκ νέου στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Σε εξέλιξη βρίσκονται επίσης πειράματα ανίχνευσης της έκφρασης της κασπάσης-3, πρωτεΐνης που όπως προαναφέρθηκε, παίζει σημαντικό ρόλο σε αποπτωτικές διαδικασίες.

Επιπλέον, πρέπει να διερευνηθούν συγκεκριμένα τα μονοπάτια σηματοδότησης που ακολουθούν μετά και την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Θα πρέπει να μελετηθεί αν η σηματοδότηση, διαφέρει από αυτή των NGF και BDNF, όπως για παράδειγμα, στη μελέτη του BNN27, όπου διαπιστώθηκε ότι δρα μέσω διαφορετικών ενδοκυτταρικών μονοπατιών, σε σχέση πάντα με τον NGF (Pediaditakis et al. 2016). Θα μπορούσαμε γενικότερα να εξετάσουμε την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων (Shc, ERK1/2, Akt για TrkA ή TRAF6, RIP2 και RhoGDI για p75NTR), προκειμένου να καθοριστούν τα μονοπάτια σηματοδότησης που επάγονται μετά και την ενεργοποίηση υποδοχέα.

Τα πρώτα πειράματα όμως, σχετίζονται κυρίως με το να αποσαφηνιστεί η επιλεκτική πρόσδεση και η συγγένεια σύνδεσης των αναλόγων με τους υποδοχείς τους, γι'αυτό και εκκρεμούν δοκιμασίες ανοσοκατακρήμνισης (pull down assays), binding assays, καθώς και χρήση NMR. Θα μπορούσαν να γίνουν πειράματα σίγησης της έκφρασης των γονιδίων των υποψήφιων υποδοχέων, έτσι ώστε να παρατηρηθεί αν συνεχίζεται η ίδια δράση των αναλόγων, όπως για παράδειγμα η σίγηση της έκφρασης του TrkA με RNAi, που έφερε ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα σε σύγκριση με την προστασία που μπορεί να επέλθει λόγω δράσης της DHEA, σε καλλιέργειες PC12 κυττάρων (Lazaridis et al. 2011). Επίσης, στα κύτταρα PC12, θα πρέπει να διευκρινιστεί το αν η δράση του αναλόγου, οφείλεται στον TrkA ή στον p75NTR, ενώ εδώ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επίσης ο κλώνος των PC12, pnr5 όπου εκφράζει μόνο τον p75NTR. Τέλος, η εκλεκτικότητα των αναλόγων για τους υποδοχείς θα μπορούσε να ελεγχθεί και με τη χρήση ειδικών αναστολέων ή ανταγωνιστών αυτών.

Επιπλέον, εξαιτίας του ότι η DHEA, δεσμεύεται και στους τρεις τύπους Trk υποδοχέων και στον p75NTR - επάγει τη φωσφορυλίωση των TrkA και TrkC, όχι όμως των TrkB - είναι πιθανό,

όπως παρατηρήθηκε και στα πειράματα του εργαστηρίου, κάποια ανάλογα να δρουν και μέσω δύο ή περισσότερων υποδοχέων. Για παράδειγμα, το BNN27 δεσμεύεται και ενεργοποιεί τους TrkA και p75NTR ενώ, το BNN20 ενεργοποιεί όλους τους Trk υποδοχείς (Pediaditakis et al. 2016). Έτσι, γίνεται φανερό ότι η χημική δομική δομή των αναλόγων, καθορίζει και την ικανότητα δέσμησης και ενεργοποίησής τους. Η εξάρτηση της διαφορετικής αυτής ικανότητας δέσμησης για τους υποδοχείς νευροτροφινών βασίζεται στη διαφορετική χημική τους δομή και υποστηρίζει την εκλεκτικότητα και τη βιολογική σημασία της δέσμησης.

Τέλος, θα μπορούσε να διερευνηθεί το ακριβές κατάλοιπο το οποίο φωσφορυλιώνεται με τη δέσμηση του κάθε αναλόγου και το πόσο σημαντικό είναι το κάθε τμήμα του υποδοχέα, συγκεκριμένα με δοκιμασίες μεταλλαξιγένεσης στους υποδοχείς, όπως στην περίπτωση του BNN27, όπου η δέσμηση του στον TrkA, δεν απαιτεί το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, όπως η δέσμηση του NGF, ενώ όσον αφορά τον p75NTR, απαιτεί την ύπαρξη του εξωκυτταρικού τμήματος (Pediaditakis et al. 2016).

Γενικότερα λοιπόν, θα πρέπει να αποσαφηνιστεί, αν τα νέα αυτά ανάλογα λειτουργούν εν τέλει ως μικρονευροτροφίνες, ενώ οι μελλοντικοί στόχοι του εργαστηρίου επικεντρώνονται επίσης, στην *in vivo* δοκιμή των BNN αναλόγων σε πειραματικά ζωικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων (proof of concept studies *in vivo*), κυρίως στη νόσο Αλτσχάιμερ. Αυτή τη στιγμή βρίσκονται στη διάθεση του εργαστηρίου τα μοντέλα 5xFAD, τα οποία αντιμετωπίζουν εκτεταμένη απώλεια φλοιού, ελλείμματα στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο, ενώ η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP), οδηγεί σε συσσώρευση της Αβ που σχετίζεται με ελλείμματα μνήμης, εξαρτώμενα από τον υπόκαμπο. Ενώ τέλος, στο πλαίσιο των *in vivo* πειραμάτων, πρόκειται να μελετηθεί και η συσχέτιση που μπορεί ενδεχομένως να υπάρχει μεταξύ των συνθετικών αναλόγων και της νευρογένεσης.

Εν κατακλείδι, συνθετικά παράγωγα της DHEA, λιπόφιλα μόρια, τα οποία επιτυχώς περνούν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό, ελέγχονται για το αν μπορούν να μιμηθούν τα νευροπροστατευτικά αποτελέσματα των νευροτροφινών. Αναδεικνύονται ως πολλά υποσχόμενα μόρια και μπορούν να χρησιμεύσουν ως αγωνιστές και ανταγωνιστές για υποδοχείς νευροτροφινών με νευροπροστατευτική δράση και πιθανές εφαρμογές στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών και εγκεφαλικού τραύματος. Τα επόμενα χρόνια πρόκειται να αποσαφηνιστεί ο πλήρης μηχανισμός δράσεών τους, ενώ ήδη κάποιες από αυτές θα βρεθούν και υπό κλινικές δοκιμές.

5. Βιβλιογραφία

- Allen, S.J. & Dawbarn, D., 2006. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical science*, 110(2), pp.175–191.
- Baldwin, A.N. & Shooter, E.M., 1995. Zone mapping of the binding domain of the rat low affinity nerve growth factor receptor by the introduction of novel N-glycosylation sites. *The Journal of biological chemistry*, 270(9), pp.4594–4602.
- Bamji, S.X. et al., 1998. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *The Journal of cell biology*, 140(4), pp.911–923.
- Barde, Y.A., Edgar, D. & Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal*, 1(5), pp.549–553.
- Baulieu, E.E., 1998. NEUROSTEROIDS: A NOVEL FUNCTION OF THE BRAIN. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), pp.963–987.
- Baulieu, E.-E. & -E. Baulieu, E., 1981. STEROID HORMONES IN THE BRAIN: SEVERAL MECHANISMS? In *Steroid Hormone Regulation of the Brain*. pp. 3–14.
- Baulieu, E.E., Robel, P. & Schumacher, M., 2001. Neurosteroids: Beginning of the story. In *International Review of Neurobiology*. pp. 1–32.
- Bengoechea, T.G. et al., 2009. p75 reduces beta-amyloid-induced sympathetic innervation deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), pp.7870–7875.
- Berkemeier, L.R. et al., 1991. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*, 7(5), pp.857–866.
- Blöchl, A. & Blöchl, R., 2007. A cell-biological model of p75NTR signaling. *Journal of neurochemistry*, 102(2), pp.289–305.
- Bonetto, G. et al., 2017. The novel synthetic microneurotrophin BNN27 protects mature oligodendrocytes against cuprizone-induced death, through the NGF receptor TrkA. *Glia*, 65(8), pp.1376–1394.
- Bothwell, M.A. & Shooter, E.M., 1977. Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry*, 252(23), pp.8532–8536.
- Botsakis, K. et al., 2017. BNN-20, a synthetic microneurotrophin, strongly protects dopaminergic neurons in the “weaver” mouse, a genetic model of dopamine-denervation, acting through the TrkB neurotrophin receptor. *Neuropharmacology*, 121, pp.140–157.

- Brinton, R.D. & Wang, J.M., 2006. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Current Alzheimer research*, 3(3), pp.185–190.
- Calogeropoulou, T. et al., 2009. Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *Journal of medicinal chemistry*, 52(21), pp.6569–6587.
- Chao, M.V., 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(4), pp.299–309.
- Chapman, B.S. & Kuntz, I.D., 1995. Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 4(9), pp.1696–1707.
- Charalampopoulos, I. et al., 2004. Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), pp.8209–8214.
- Charalampopoulos, I. et al., 2012. Genetic dissection of neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Cell reports*, 2(6), pp.1563–1570.
- Charalampopoulos, I. et al., 2006. G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(3), pp.577–579.
- Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., et al., 2008. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 19(8), pp.300–307.
- Charalampopoulos, I., Lazaridis, I. & Gravanis, A., 2011. Neuroprotective and Neurogenic Properties of Dehydroepiandrosterone and its Synthetic Analogs. In *Hormones in Neurodegeneration, Neuroprotection, and Neurogenesis*. pp. 137–154.
- Charalampopoulos, I., Margioris, A.N. & Gravanis, A., 2008. Neurosteroid dehydroepiandrosterone exerts anti-apoptotic effects by membrane-mediated, integrated genomic and non-genomic pro-survival signaling pathways. *Journal of neurochemistry*, 107(5), pp.1457–1469.
- Clary, D.O. & Reichardt, L.F., 1994. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), pp.11133–11137.
- Compagnone, N.A. & Mellon, S.H., 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(1), pp.1–56.
- Conley, A.J. & Bird, I.M., 1997. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4

- pathways of steroidogenesis in mammals. *Biology of reproduction*, 56(4), pp.789–799.
- Davies, A.M. et al., 1993. Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(11), pp.4961–4967.
- Dechant, G. & Barde, Y.-A., 2002. The neurotrophin receptor p75 (NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature neuroscience*, 5(11), pp.1131–1136.
- DeFreitas, M.F., McQuillen, P.S. & Shatz, C.J., 2001. A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(14), pp.5121–5129.
- Eriksson, P.S. et al., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), pp.1313–1317.
- Ernfors, P. et al., 1989. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron*, 2(6), pp.1605–1613.
- Ernfors, P. & Persson, H., 1991. Developmentally Regulated Expression of HDNF/NT-3 mRNA in Rat Spinal Cord Motoneurons and Expression of BDNF mRNA in Embryonic Dorsal Root Ganglion. *The European journal of neuroscience*, 3(10), pp.953–961.
- Fischer, W., 1994. Nerve growth factor reverses spatial memory impairments in aged rats. *Neurochemistry international*, 25(1), pp.47–52.
- Friedman, W.J., Olson, L. & Persson, H., 1991. Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization. *Brain research. Developmental brain research*, 63(1-2), pp.43–51.
- Ginty, D., 2002. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Current opinion in neurobiology*, 12(3), pp.268–274.
- Gravanis, A. et al., 2012. Neurosteroids and microneurotrophins signal through NGF receptors to induce prosurvival signaling in neuronal cells. *Science signaling*, 5(246), p.t8.
- Green, D.R., 2011. *Apoptosis: Physiology and Pathology*, Cambridge University Press.
- Greene, L.A. & Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), pp.2424–2428.
- Hallböök, F., 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Current opinion in neurobiology*, 9(5), pp.616–621.

- Harrington, A.W. & Ginty, D.D., 2013. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(3), pp.177–187.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), pp.770–776.
- Hofer, M. et al., 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *The EMBO journal*, 9(8), pp.2459–2464.
- Huang, E.J. & Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual review of neuroscience*, 24(1), pp.677–736.
- Ibán-Arias, R. et al., 2018. The Synthetic Microneurotrophin BNN27 Affects Retinal Function in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes*, 67(2), pp.321–333.
- Ibáñez, C.F. & Simi, A., 2012. p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends in neurosciences*, 35(7), pp.431–440.
- Johnson, D. et al., 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*, 47(4), pp.545–554.
- Jones, K.R. & Reichardt, L.F., 1990. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20), pp.8060–8064.
- Jungbluth, S., Bailey, K. & Barde, Y.-A., 1994. Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/ neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *European journal of biochemistry / FEBS*, 221(2), pp.677–685.
- Karishma, K.K. & Herbert, J., 2002. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *The European journal of neuroscience*, 16(3), pp.445–453.
- Khursigara, G., Orlicki, J.R. & Chao, M.V., 1999. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *The Journal of biological chemistry*, 274(5), pp.2597–2600.
- Klein, R. et al., 1991. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 66(2), pp.395–403.
- Krantic, S. et al., 2005. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends in neurosciences*, 28(12), pp.670–676.
- Lamballe, F., Klein, R. & Barbacid, M., 1991. The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Princess Takamatsu symposia*, 22, pp.153–170.
- Lazaridis, I. et al., 2011. Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS biology*, 9(4), p.e1001051.

- Lebrun-Julien, F. et al., 2010. ProNGF induces TNF α -dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), pp.3817–3822.
- Leibrock, J. et al., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 341(6238), pp.149–152.
- Lemmon, M.A. & Schlessinger, J., 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), pp.1117–1134.
- Levi-Montalcini, R., 1953. A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J Exp Zool*, pp. 233–287.
- Lewin, G. & Carter, B.D., 2014. *Neurotrophic Factors*, Springer Science & Business Media.
- Maisonpierre, P. et al., 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, 247(4949), pp.1446–1451.
- Matrone, C. et al., 2008. NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and A β production in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), pp.13139–13144.
- Mattson, M.P., 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(2), pp.120–130.
- Mcallister, A.K. et al., 1999. NEUROTROPHINS AND SYNAPTIC PLASTICITY. *Annu. Rev. Neurosci.*
- Nykjaer, A. et al., 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 427(6977), pp.843–848.
- Nykjaer, A. & Willnow, T.E., 2012. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in neurosciences*, 35(4), pp.261–270.
- Patapoutian, A. & Reichardt, L.F., 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current opinion in neurobiology*, 11(3), pp.272–280.
- Pediaditakis, I., Kourgiantaki, A., et al., 2016. BNN27, a 17-Spiroepoxy Steroid Derivative, Interacts With and Activates p75 Neurotrophin Receptor, Rescuing Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis. *Frontiers in pharmacology*, 7, p.512.
- Pediaditakis, I. et al., 2015. Dehydroepiandrosterone: an ancestral ligand of neurotrophin receptors. *Endocrinology*, 156(1), pp.16–23.
- Pediaditakis, I., Efstathopoulos, P., et al., 2016. Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation.

- Neuropharmacology*, 111, pp.266–282.
- Pedraza, C.E. et al., 2005. Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *The American journal of pathology*, 166(2), pp.533–543.
- Pezet, S. & McMahon, S.B., 2006. NEUROTROPHINS: Mediators and Modulators of Pain. *Annu. Rev. Neurosci.*
- Phillips, H.S. et al., 1991. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, 7(5), pp.695–702.
- Pitsikas, N. & Gravanis, A., 2017. The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts delay-dependent and scopolamine-induced recognition memory deficits in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 140, pp.145–153.
- Rabizadeh, S. et al., 1993. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*, 261(5119), pp.345–348.
- Radeke, M.J. et al., 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*, 325(6105), pp.593–597.
- Radziejewski, C. et al., 1992. Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry*, 31(18), pp.4431–4436.
- Riccio, A. et al., 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science*, 286(5448), pp.2358–2361.
- Salehi, A. et al., 1996. Co-localization of high-affinity neurotrophin receptors in nucleus basalis of Meynert neurons and their differential reduction in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 75(2), pp.373–387.
- Schumacher, M. et al., 2003. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in neurobiology*, 71(1), pp.3–29.
- Squinto, S.P. et al., 1991. TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*, 65(5), pp.885–893.
- Suzuki, M. et al., 2004. Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), pp.3202–3207.
- Tuszynski, M.H. et al., 2005. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nature medicine*, 11(5), pp.551–555.
- Verge, V.M. et al., 1992. Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: responses to injury and infusion of NGF. *The Journal of neuroscience*:

- the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(10), pp.4011–4022.
- Vicario, A. et al., 2015. Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, p.62.
- Vilar, M. et al., 2009 (a). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*, 62(1), pp.72-83.
- Vilar, M. et al., 2009 (b). Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *Journal of Cell Science*, 122, pp.3351-3357.
- Weill-Engerer, S. et al., 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(11), pp.5138–5143.
- Wheeler, E.F. & Bothwell, M., 1992. Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(3), pp.930–945.
- Yaar, M. et al., 2002. Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*, 277(10), pp.7720–7725.
- Yaar, M. et al., 1997. Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *The Journal of clinical investigation*, 100(9), pp.2333–2340.
- Yamashita, T. & Tohyama, M., 2003. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nature neuroscience*, 6(5), pp.461–467.