



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ -
ΒΪΟΙΑΤΡΙΚΗ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΟΥΣ DHEA, BNN27, ΣΤΟ 5xFAD ΖΩΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ ALZHEIMER

Διονυσία Μάρκου

Υπεύθυνος καθηγητής: Αχιλλέας Γραβάνης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	1
---------------	---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1	Η νόσος Alzheimer (AD).....	2
1.1.1	Γενικά για τη νόσο.....	2
1.1.2	Τύποι της νόσου.....	2
1.1.3	Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.....	2
1.2	Πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein, APP).....	3
1.3	Υπόθεση του αμυλοειδούς για την παθογένεση της νόσου.....	4
1.3.1	Διαμορφώσεις του Αβ πεπτιδίου.....	4
1.4	Περιοχές που πλήττονται στο AD.....	5
1.5	Νευρογένεση στο AD.....	6
1.6	Ζωικά μοντέλα για τη μελέτη του AD.....	8
1.6.1	Γενικά.....	8
1.6.2	Μεταλλάξεις στα 5xFAD ποντίκια.....	8
1.6.3	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά 5xFAD ποντικών.....	9
1.7	Νευροτροφίνες.....	10
1.7.1	Γενικά για τις νευροτροφίνες.....	10
1.7.2	Παραγωγή και φυσιολογία νευροτροφινών.....	10
1.7.3	Νευροτροφίνες στο AD.....	11
1.8	Νευροστεροειδή.....	11
1.8.1	Γενικά για τα νευροστεροειδή.....	11
1.8.2	DHEA.....	12
1.8.3	Διακυμάνσεις της DHEA με την ηλικία.....	12
1.9	Trk (Tyrosine kinase related kinase) υποδοχείς.....	14
1.9.1	Γενικά για τους Trk υποδοχείς.....	14
1.9.2	Δομή Trk υποδοχέων.....	15
1.9.3	Μονοπάτια ενεργοποίησης από TrkA.....	15
1.10	p75 ^{NTR} υποδοχέας.....	17
1.10.1	Γενικά για τον p75 ^{NTR}	17

1.10.2	Ρόλος του p75 ^{NTR}	17
1.10.3	Αλληλεπιδράσεις p75 ^{NTR} - p75 ^{NTR} ρυθμιζόμενα μονοπάτια.....	18
1.10.4	p75 ^{NTR} στο AD.....	19
1.10.5	p75 ^{NTR} – Αβ πεπτιδίο.....	20
1.10.6	Η γήρανση ρυθμίζει την παραγωγή Αβ πεπτιδίου μέσω του p75 ^{NTR} υποδοχέα.....	21
1.11	Nerve Growth Factor (NGF).....	21
1.11.1	Γενικά για τον NGF.....	21
1.11.2	NGF-AD.....	22
1.11.3	Θεραπείες βασισμένες στον NGF.....	22
1.11.4	DHEA βασιζόμενη θεραπεία.....	23
1.11.5	Λειτουργικά χαρακτηριστικά της DHEA που την καθιστούν υποψήφιο μόριο για θεραπεία..	24
1.11.6	Εκλεκτικότητα του αναλόγου BNN27.....	25
1.12	Σύγκριση μηχανισμών δράσης NGF - BNN27.....	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Σκοπός.....	27
-------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Υλικά και μέθοδοι.....	28
------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αποτελέσματα.....	31
-------------------	----

Abstract:

AD is the most common neurodegenerative disease characterized by various neuropathological hallmarks including amyloid plaque deposits and neurofibrillary tangles. Other AD-related pathologies are neural stem cell (NSCs) proliferation potential decrease, neuronal loss, demyelination and axonal cytoskeleton lesions. According to amyloid hypothesis Ab peptide seems to play a pathogenic role in AD during which hippocampus and entorhinal cortex (EC) are seriously affected. Another aspect of AD is the low concentration of neurotrophins, which under normal circumstances exert various neuroprotective actions in the brain. The most common neurosteroid in humans, DHEA exerts its neurotrophic actions through binding on NGF neurotrophin receptors TrkA and p75^{NTR} whereas low levels of DHEA are associated with neural dysfunction and degeneration. Nonetheless, the use of natural DHEA as therapeutic agent is compromised, as it is a steroid hormone-precursor molecule, being able to enhance hormone-dependent cancers. For that reason, DHEA C-17 derivatives, such as BNN27, were developed, which sustain their neurotrophic effects, without being hormone-precursors. Using 5xFAD animal model, we investigated the potential effects of BNN27 in 5xFAD brain phenotype, as well as the effects of BNN27 at HNSC cultures treated with synthetic cytotoxic Ab40 and Ab42 oligomers. At the first part of this study, we tested potential effects of BNN27 at Ab plaque formation, demyelination and axonal cytoskeleton at the DG and EC areas of 5xFAD animal brains. First of all, it was demonstrated that BNN27 has little or no effect on myelination and axonal cytoskeleton profiles, whereas the genotype of 5xFAD animals seems to have a strong negative effect on axon, but not on myelin integrity. Secondly, the presence of BNN27 at 5xFAD animal brains showed a significant reduction at amyloid plaque formation at DG area and also a reduction of intracellular Ab accumulation at CA1-CA3 areas. At the second part of the study, the presence of BNN27 in NSC cultures treated or no with different concentrations of cytotoxic Ab40/42 peptide demonstrated an enhancement in the viability of NSCs, but also in the proliferation of them. Together our results indicate that BNN27 neurosteroid analogue has a strong positive effect at 5xFAD animal brains reducing the number of Ab plaques, while it does not seem to affect myelination and axonal cytoskeleton. Furthermore BNN27 seems to obstruct or reverse the cytotoxic effects that oligomeric Ab has on NSCs proliferation. Therefore, it seems that BNN27 could be a potent molecule for therapy strategies targeting either brain Ab plaques or the proliferation of NSCs, which could replace degenerated neurons. Of course, more experiments need to be done towards this direction in order to finally confirm if and how exactly BNN27 interacts NSCs to enhance proliferation, but also how it participates in removing or obstructing Ab plaque formation.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η νόσος Alzheimer (AD)

1.1.1 Γενικά για τη νόσο

Η νόσος Alzheimer (AD) είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσος που ευθύνεται για το ~70% των περιπτώσεων άνοιας σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών. Η εμφάνισή της κατά 70% οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες, όμως η ακριβής αιτία βρίσκεται υπό εντατική έρευνα, με στόχο την ανάπτυξη ασφαλούς και αποτελεσματικής θεραπευτικής προσέγγισης για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων.

1.1.2 Τύποι της νόσου

Ανάλογα την ηλικία εμφάνισης, διακρίνονται 2 τύποι της νόσου: *όψιμης εμφάνισης (late onset) ή σποραδικό AD* υπεύθυνο για το 99% των περιπτώσεων άνοιας σε άτομα άνω των 85 ετών. Στον τύπο αυτό, η πιθανότητα εμφάνισης, διπλασιάζεται κάθε πέντε χρόνια μετά τα 65 έτη, ενώ ο δεύτερος τύπος, *πρώιμης εμφάνισης (early onset) ή οικογενές (eFAD, early familial) AD*, εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας κάτω των 65 ετών. Είναι σπανιότερος τύπος, παρουσιάζει ταχύτερη εξέλιξη, ενώ ως υπεύθυνες έχουν χαρακτηριστεί μεταλλάξεις στα γονίδια APP (amyloid precursor protein), PS1 (presenillin 1) και PS2 (presenillin 2). Παρουσιάζεται σε λιγότερο από 1% του πληθυσμού, ενώ εμφανίζεται ακόμα και στην ηλικία των 30-40 ετών. Ω υπεύθυνες θεωρούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλάξεις στο γονίδιο της PS1 ενώ μεταλλάξεις στα αντίστοιχα των APP και PS2 είναι σπανιότερες.

1.1.3 Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

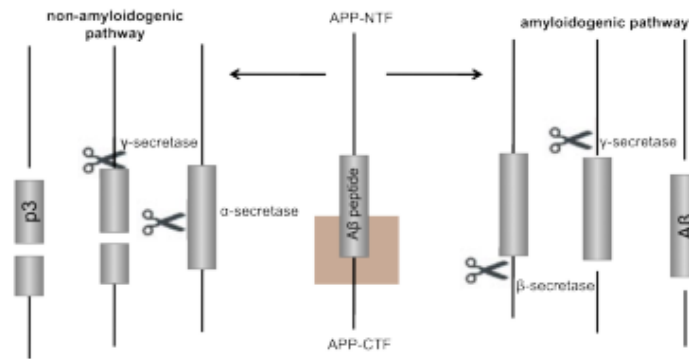
Τα κύρια παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι:

- **Πλάκες αμυλοειδούς**, οι οποίες αποτελούν εξωκυττάρια αποθέσεις αποτελούμενες από ένα κεντρικό πυρήνα Αβ πεπτιδίου (40 ή 42 αμινοξέων) περιβαλλόμενο από εκφυλισμένους δενδρίτες. Εξαιτίας της υδροφοβικότητας του πεπτιδίου, σχηματίζει ολιγομερή, τα οποία κατακρημνίζονται ως αμυλοειδικές αποθέσεις εγκέφαλο. Το Αβ42 εμφανίζει μεγαλύτερη τάση συσσωμάτωσης από το Αβ40 (Alberto Serrano, 2011).

- **Νευροϊνιδιακά δεμάτια**, τα οποία σχηματίζονται ενδοκυτταρικά από υπερφωσφορυλιωμένα μόρια της σχετιζόμενης με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης Tau (Crews and Masliah, 2010).
- **Απομυελίνωση**, η οποία κατά κύριο λόγο παρατηρείται σε άξονες που βρίσκονται κοντά σε αμυλοειδικές πλάκες, ενώ η απώλεια της μυελίνης είναι εντονότερη στον πυρήνα των πλακών απ' ό,τι στην περιφέρεια (Stanislaw Mitew et al., 2010).
- **Νευρωνική απώλεια**: Με την προοδευτική εξέλιξη του AD, παρατηρείται βλάβη των νευρώνων σε τέτοιο βαθμό, ώστε τελικά χάνουν τη λειτουργικότητά τους και πεθαίνουν. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η ατροφία των αντίστοιχων περιοχών του εγκεφάλου.

1.2 Πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein, APP)

Η APP είναι μέλος της οικογένειας των συντηρημένων τύπου I γλυκοπρωτεϊνών. Διαθέτει ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό και ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό τμήμα. Η οικογένεια APP των θηλαστικών εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο. Μέσω εναλλακτικού ματίσματος, προκύπτουν APP mRNAs, τα οποία κωδικοποιούν για διαφορετικές ισομορφές της APP, που ποικίλουν από 365 έως 770 αμινοξέα. Από αυτές τις ισομορφές, οι πρόδρομες για το Αβ πεπτίδιο, είναι οι APPs με 695, 751 και 770 αμινοξέα (APP695, APP751, APP770 αντίστοιχα). Οι APPs 751 και 770 εκφράζονται στους περισσότερους εξεταζόμενους ιστούς, ενώ η APP695 εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες (J. Neurosci, 1993). Η APP υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία μέσω δύο μονοπατιών, ενός παθολογικού αμυλοειδογενούς και ενός μη αμυλοειδογενούς (**εικόνα 1**). Μέσα από το αμυλοειδογενές μονοπάτι παράγεται το Αβ πεπτίδιο (39-42 αμινοξέα), του οποίου η πρωτοϊνώδης διαμόρφωση είναι το βασικό συστατικό των αμυλοειδικών πλακών. Από τα κυρίως παραγόμενα Αβ40 και Αβ42 πεπτίδια, το Αβ40 είναι πιο κοινό, ενώ το Αβ42 θεωρείται πιο τοξικό. Το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι, οδηγεί στην παραγωγή ενός p3 πεπτιδίου. Λίγα είναι γνωστά για τη συμπεριφορά ολιγομερισμού του τελευταίου, καθώς επίσης δεν είναι γνωστό εάν έχει τοξικές συνέπειες για το κύτταρο. Οι χρησιμοποιούμενες θεραπείες επικεντρώνονται στην αναστολή του αμυλοειδογενούς μονοπατιού, αυξάνοντας την ενεργότητα της α σεκρετάσης.



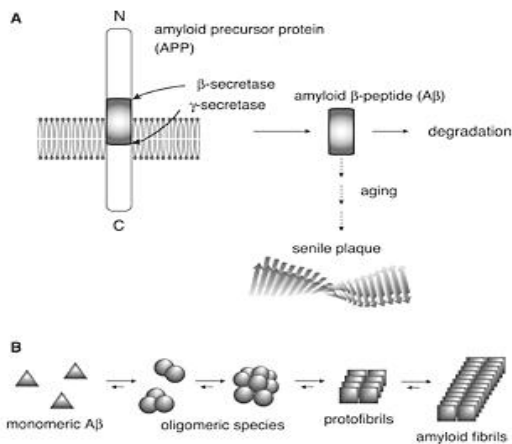
Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής του Αβ πεπτιδίου από την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP). Κατά το αμυλοειδογενές μονοπάτι, διαδοχική πρωτεόλυση από τις β- και γ- σεκρετάσες παράγεται το Αβ πεπτιδίο. Εναλλακτικά η APP μπορεί να υποστεί πέψη από τις α- και γ- σεκρετάσες προς παραγωγή του p3 πεπτιδίου, μέσω του μη αμυλοειδογενούς μονοπατιού. (http://www.utwente.nl/tnw/nbp/studentprojects/bsc_msc/studproj010/)

1.3 Υπόθεση του αμυλοειδούς για την παθογένεση της νόσου

Σύμφωνα με την αμυλοειδική υπόθεση, η εναπόθεση του Αβ πεπτιδίου σε αμυλοειδικές πλάκες είναι η βασική αιτία της παθογένεσης της νόσου, ενώ τα νευροϊνιδιακά δεμάτια και ο νευρωνικός εκφυλισμός είναι άμεσες συνέπειες αυτής της εναπόθεσης. Για την εκδήλωση της παθολογίας του AD σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, απαιτούνται δύο γεγονότα: α) παραγωγή Αβ πεπτιδίου και β) το Αβ πεπτιδίο πρέπει να είναι ικανό να καταστήσει τα κύτταρα ευάλωτα σε/ή να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο (Hardy and Gerald A. Higgins, 1992). Σύμφωνα με έρευνες, το Αβ δεν είναι τοξικό από μόνο του, αλλά καθιστά τους νευρώνες ευάλωτους σε τοξική καταστροφή (J. Koh et al., 1991). Γενικά θεωρείται πως το πεπτιδίο παρεμποδίζει την ομοίωση του Ca^{+2} αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του.

1.3.1 Διαμορφώσεις του Αβ πεπτιδίου

Εξωκυττάρια χορήγηση Αβ πεπτιδίου σε καλλιέργειες νευρώνων ή ένεση σε εγκεφάλους ποντικών αποδεικνύεται τοξική (Yanker et al., 1989). In vitro έρευνες δείχνουν ότι τα Αβ μονομερή σχηματίζουν πρώτα ολιγομερή πριν συσσωματωθούν προς το σχηματισμό πλακών (Kirkkitadze et al., 2002), ενώ την ίδια στιγμή



Εικόνα 2. Α. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής του Αβ πεπτιδίου. Το Αβ είναι το κύριο συστατικό των αμυλοειδικών πλακών στον εγκέφαλο ασθενών με AD **Β. Σχηματική αναπαράσταση της συσσωμάτωσης των Αβ σε αμυλοειδικά ινίδια.** Τα διαλυτά μονομερή είναι μη αμυλοειδικές διαμορφώσεις που σταδιακά μεταπίπτουν σε ολιγομερή τα οποία αποτελούν τις αμυλοειδικές-παθολογικές διαμορφώσεις. Από τα ολιγομερή σταδιακά προκύπτουν τα πρωτοϊνίδια και και αμυλοειδικά ινίδια

αυξανόμενος αριθμός στοιχείων υποστηρίζει πως η τοξική βιοφυσική διαμόρφωση του Αβ είναι εκείνη των διαλυτών ολιγομερών και πρωτοϊνιδίων (Selkoe 2001, Klein 2002) (εικόνα 2). Τα ολιγομερή αυτά σχηματίζονται κατά προτίμηση ενδοκυτταρικά (Walsh et al., 2000) και προκαλούν συναπτικές αλλαγές (Lacor et al., 2004), ενώ σε εγκεφάλους ασθενών παρουσιάζουν μία κατά 70% αύξηση σε σχέση με υγιείς εγκεφάλους (Gong et al., 2003). Στο παρελθόν έχουν εμπλακεί στην αναστολή της μακρόχρονης ενύσχισης (Long Term Potentiation, LTP) στον ιππόκαμπο, καθώς και στην παρεμπόδιση της συναπτικής πλαστικότητας (Lambert et al., 1998). Συνοψίζοντας, τα ολιγομερή και πρωτοϊνίδια του Αβ42 είναι οι πιο τοξικές διαμορφώσεις και θεωρείται ότι τα επίπεδά τους σχετίζονται καλύτερα –από τα επίπεδα των πλακών- με την γνωστική δυσλειτουργία που παρατηρείται στα αρχικά στάδια του AD (McLean et al., 1999).

1.4 Περιοχές που πλήττονται στο AD

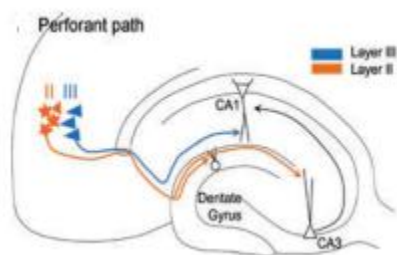
Οι κύριες περιοχές που σχετίζονται με την παθολογία του AD είναι ο ιππόκαμπος και το EC (entorhinal cortex). Ο πρώτος είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό βραχυπρόθεσμης μνήμης, ενώ το σύστημα ιπποκάμπου-EC παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό μνήμης, ιδιαιτέρως χωρικής. Παθολογικές καταστάσεις, όπως το AD, αλλά και φυσιολογικές καταστάσεις, όπως η γήρανση χαρακτηρίζονται από προσβολή των επιφανειακών στιβάδων του EC.

Ο EC αποτελείται από 5 στιβάδες είναι μία περιοχή εσωτερικά της ρινικής αύλακας που αποτελεί τη σύνδεση μεταξύ ιπποκάμπου και νεοφλοιού και έχει άμεσες συνδέσεις με τον ιππόκαμπο. Κατέχει σημαντικό ρόλο στις γνωστικές λειτουργίες όπως αποδεικνύεται από τις ανατομικές του συνδέσεις (Canto, Wouterlood & Witter, 2008). Συγκεκριμένα, οι στιβάδες II και III του EC παρέχουν τις

κύριες πληροφορίες από το φλοιό στον ιππόκαμπο (Witter et al., 1989). Οι άξονες των στιβάδων ακολουθούν ένα μονοπάτι που λέγεται «perforant path» (εικόνα 3), καθώς οι άξονες «διατηρούν» το άγκιστρο (subiculum) στην πορεία τους προς τον ιππόκαμπο. Συγκεκριμένα, οι πληροφορίες από το φλοιό μεταφέρονται στις βαθύτερες στιβάδες των πυραμιδικών κυττάρων του EC απ' όπου μεταφέρονται στις στιβάδες II και III αυτού. Οι νευρικές ώσεις από τις επιφανειακές στιβάδες του EC μεταδίδονται σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου, ενώ οι νευρώνες του ιπποκάμπου προβάλλουν πίσω σε βαθύτερες στιβάδες του EC. Έτσι, το perforant path νευρώνει κάθε υποπεριοχή του ιπποκάμπου σχηματισμού: την οδοντωτή έλικα (DG) και τις CA1-CA3 περιοχές γύρω από τον ιππόκαμπο.

Έχει προταθεί ότι οι βραχυπρόθεσμες μνήμες που σχηματίζονται στον ιππόκαμπο, μετατρέπονται σε μακροπρόθεσμες μέσω της μεταφοράς της νεοσχηματισθείσας -στον ιππόκαμπο- πληροφορίας στις βαθύτερες στιβάδες του EC (Buzsaki, 1989). Έτσι, το EC είναι μία σημαντική διέξοδος από και προς τον ιππόκαμπο και παίζει κύριο ρόλο στο σχηματισμό της μνήμης.

Στο AD, ο EC είναι από τις πρώτες περιοχές που λόγω νευρωνικού εκφυλισμού ατροφούν (de Leon et al., 2001). Συγκεκριμένα, φαίνεται να ατροφεί πριν τον ιππόκαμπο (Pennanen et al., 2004), οπότε μία πιθανή υπόθεση για την εξέλιξη του AD είναι ότι ο αρχικός εκφυλισμός του EC οδηγεί σε διακοπή των συνδέσεων EC-ιπποκάμπου και κατ' επέκταση εκφυλισμό του ιπποκάμπου.



Εικόνα 3. Perforant path. Σχηματική αναπαράσταση του perforant path εγκεφάλου τρωκτικού. Οι νευρώνες της στιβάδας II (πορτοκαλί), προβάλλουν στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας (DG) και στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής. Τα πυραμιδικά κύτταρα της στιβάδας III (μπλε) προβάλλουν στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής (Helen E. Scharfman & Moses V. Chao, 2013)

1.5 Νευρογένεση στο AD

Στον ενήλικο εγκέφαλο υπάρχουν δύο περιοχές με νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells, NSCs) όπου επιτελείται νευρογένεση: η υποκοιλιακή περιοχή (subventricular zone, SVZ) εγγύς των πλαγίων κοιλιών, και η υποκοκκιώδης ζώνη (subgranular zone, SGZ), απ' όπου οι νέοι νευρώνες προορίζονται για τον οσφρητικό βολβό και την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus, DG) του ιπποκάμπου, αντίστοιχα (Orly Lzarov et al., 2010) (εικόνα 4). Μία υπόθεση σχετικά με τα NSCs είναι πως με την αύξηση της ηλικίας μειώνεται το δυναμικό πολλαπλασιασμού αυτών, ενώ ο

εγκέφαλος διατηρεί τη δυνατότητα να αυξήσει τη νευρογένεση σε απόκριση φυσιολογικών (Kempermann et al., 2002) ή παθολογικών παραγόντων (Gray et al., 2002).

Τα κύρια νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά του AD -αμυλοειδικές πλάκες και νευροϊνιδιακά δεμάτια- εμφανίζονται αρχικά στον ιπποκάμπειο σχηματισμό και κάποιες περιοχές του φλοιού συμπεριλαμβανομένων των SVZ και SGZ. Έτσι, στα αρχικά στάδια της νόσου παρατηρείται μία αύξηση στη νευρογένεση με στόχο την αναπλήρωση των εκφυλισμένων νευρώνων, γεγονός που όμως δεν επιτυγχάνεται εξαιτίας της περιορισμένης υφιστάμενης νευρογένεσης στις μεγάλες ηλικίες. Παρ' όλα αυτά η δυνατότητα αυτή του εγκεφάλου προσφέρει νέες προοπτικές στην αντικατάσταση κυττάρων σε παθολογικές καταστάσεις. Το AD είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα, όπου παρατηρείται σε υψηλό βαθμό εκφυλισμός των κυττάρων του ιπποκάμπου, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με την απώλεια πρόσφατης μνήμης. Με βάση τα παραπάνω, το βασικό αυτό χαρακτηριστικό του AD ίσως θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με ενίσχυση της νευρογένεσης στον ιππόκαμπο (Shors et al., 2002). Μια άλλη υπόθεση για τα NSCs είναι πως με την αύξηση της ηλικίας πολλά απ' αυτά μεταπίπτουν σε «quiescence», μια κατάσταση που μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στο μικροπεριβάλλον αυτών, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης παρουσίας νευροτροφινών.

Έτσι, μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η ενίσχυση της ενδογενούς νευρογένεσης μέσω ποικιλίας τροφικών παραγόντων -συμπεριλαμβανομένων νευροτροφινών- που θα μπορούσαν να αποτελέσουν για τα NSCs το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Μία τέτοια στρατηγική θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε περιοχές, όπως ο ιππόκαμπος, που βλάπτονται κυρίως στο AD και πιο δύσκολα σε φλοιϊκές και υποφλοιϊκές περιοχές όπου νευροεκφυλισμός παρατηρείται τόσο σε παθολογικές καταστάσεις όσο και κατά τη φυσιολογική διαδικασία γήρανσης.

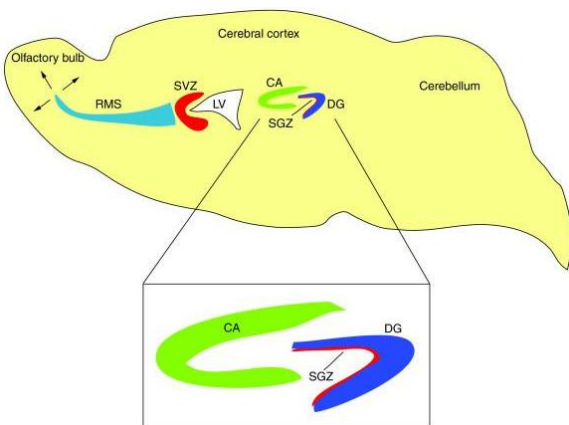


Figure 4. Νευρογενείς ζώνες στον εγκέφαλο ενήλικου ποντικού. Η ενήλικη νευρογένεση είναι καλύτερα χαρακτηρισμένη σε 2 ζώνες: την υποκοιλιακή περιοχή (SVZ) εγγύς των πλαγίων κοιλιών, απ' όπου οι νέοι νευρώνες μεταναστεύουν στον οσφρητικό βολβό μέσω του πρόσθιου μεταναστευτικού μονοπατιού (rostral migratory stream, RMS) και την οδοντωτή έλικα (DG) του ιπποκάμπου. Ο ιππόκαμπος (σε μεγέθυνση)

αποτελείται από 2 ζώνες κυττάρων- τα πυραμιδικά κύτταρα (CA) και την οδοντωτή έλικα (DG). Πολλαπλασιαζόμενα νευρικά πρόδρομα κύτταρα και νευρικά βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται σε quiescence, βρίσκονται σε μία ζώνη εγγύς της οδοντωτής έλικας, που λέγεται υποκοκκιώδης ζώνη (subgranular zone, SGZ) (<http://www.genomebiology.com/>)

1.6 Ζωικά μοντέλα για τη μελέτη του AD

1.6.1 Γενικά

Υπάρχει μία ισχυρή γενετική συσχέτιση ανάμεσα στο πρόωμης εμφάνισης AD (FAD) και το Αβ42 πεπτίδιο. Αυτοσωμικές επικρατείς μεταλλάξεις στα γονίδια APP, PS1 και PS2 αυξάνουν την παραγωγή Αβ42 και οδηγούν σε FAD. Το Αβ42 είναι περισσότερο ινωδογόνο από τα βραχύτερα πεπτίδια και αυξημένη συγκέντρωσή του θεωρείται ότι οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτων ινιδίων που σχηματίζουν τις αμυλοειδικές πλάκες.

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει να παραχθούν διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία να εμφανίζουν τον παθολογικό φαινότυπο του AD. Ο Games και οι συνεργάτες του, το 1995 ήταν οι πρώτοι που κατασκεύασαν διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία έφεραν αμυλοειδικές πλάκες στον εγκέφαλο. Από τότε πολλά διαγονιδιακά ποντίκια κατασκευάστηκαν, με κοινό χαρακτηριστικό την υπερπαραγωγή της APP και τον σχηματισμό Αβ πλακών (Sturchler-Pierrat et al., 1997, Hsiao et al., 1996). Όλα αυτά τα μοντέλα έχουν αποδειχθεί χρήσιμα στη μελέτη πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων με βάση ανάλογα που στοχεύουν στην αμυλοειδική υπόθεση (Hardy and Higgins, 1992). Προς την κατεύθυνση αυτή, είναι και το 5xFAD ζωικό μοντέλο που κατασκευάστηκε από Oakley και τους συνεργάτες του το 2006.

1.6.2 Μεταλλάξεις στα 5xFAD ποντίκια

Μεταλλάξεις στην APP695, PS1 και PS2 είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση οικογενούς μορφής της νόσου και εμπλέκουν το Αβ πεπτίδιο σαν εναρκτήριο παράγοντα στην παθογένεση του AD (Holtzman DM et al., 2011). Η APP695 αναφέρθηκε παραπάνω, ενώ η PS1 και PS2 αποτελούν υπομονάδες του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης (Ester and Wolfe, 2001). Προκειμένου να υπάρχει μαζική παραγωγή Αβ42 σε ένα μοντέλο ταχείας προόδου του AD σχεδιάστηκαν διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία συνεκφράζουν ένα σύνολο 5 μεταλλάξεων στις οποίες περιλαμβάνονται οι:

K670N/M671L (Sweedish), I716V (Florida), V717I (London) στο ίδιο μόριο της APP695 και M146L και L286V στο ίδιο μόριο της PS1. Η Sweedish αυξάνει την παραγωγή του συνολικού Αβ, ενώ η London και Florida, καθώς και οι M146L και L286V της PS1 αυξάνουν συγκεκριμένα την παραγωγή του Αβ42. Όλες μαζί δρουν συνεργατικά για τη μαζική παραγωγή Αβ42. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τελικά το Αβ42 προκαλεί νευροτοξικότητα είναι ελάχιστα κατανοητός. Συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού Αβ42 παρατηρούνται τόσο σε εγκεφάλους FAD διαγονιδιακών ποντικών όσο και σε εγκεφάλους ασθενών AD υποδεικνύοντας ότι το Αβ42 παίζει κρίσιμο ρόλο στη νευροεκφυλιστική διαδικασία του AD (Gouras GK et al., 2010).

1.6.3 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά 5xFAD ποντικών

Στην Tg6799 ζωική σειρά (Oakley et al., 2006) που χαρακτηρίζεται από την πιο έντονη έκφραση των μεταλλάξεων και επομένως αντίστοιχη παθολογία, τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συνοψίζονται στα εξής: ενδοκυττάρια συσσώρευση Αβ42 στον 1.5 μήνα, εμφάνιση αμυλοειδικών πλακών από τους 2 μήνες, ελλείματα μνήμης στους 4 μήνες και εμφανής απώλεια νευρώνων από τους 9 μήνες και πλέον (Oakley et al., 2006).

Πιο συγκεκριμένα, τα 5xFAD εμφανίζουν, παρομοίως όπως στο AD, αυξημένα επίπεδα φλεγμονοδών δεικτών, καθώς επίσης και γλοίωση που σχετίζεται χωρικά με τις αμυλοειδικές πλάκες (Games et al., 1995). Τομές εγκεφάλου 5xFAD ποντικών παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα αστροκυττάρων (με GFAP δείκτη), καθώς και μικρογλοίας (με F4/80 δείκτη), η οποία μάλιστα είναι ανάλογη των επιπέδων Αβ42 και συμπίπτει χρονικά με την έναρξη εναπόθεσης πλακών. Επίσης, το χωρικό πρότυπο των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων ακολουθεί την κατανομή των αμυλοειδικών πλακών. Τα 5xFAD δηλαδή εμφανίζουν χαρακτηριστικά νευροφλεγμονής όμοια με εκείνα που παρατηρούνται σε εγκεφάλους ασθενών με AD και είναι από τα λίγα αμυλοειδικά μοντέλα που επιδεικνύουν σημαντικό νευρωνικό θάνατο.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται ποσοτική μείωση των πυραμιδικών νευρώνων στη στιβάδα V του φλοιού και στο άγκιστρο στους 9 μήνες (Oakley et al., 2006), ενώ στους 4 και 6 μήνες δεν υπάρχει ορατή απώλεια νευρώνων στις αντίστοιχες περιοχές. Ο παρατηρούμενος αυτός νευροεκφυλισμός φαίνεται να σχετίζεται με την ενδοκυττάρια συσσώρευση Αβ42, η οποία παρατηρείται από τον 1.5 μήνα στους πυραμιδικούς νευρώνες των βαθύτερων στιβάδων του φλοιού, ενώ η απώλεια των νευρώνων είναι ακόμα πιο έντονη στους 12 μήνες σύμφωνα με τον Jawhar και συνεργάτες.

Σε ηλικία 4 μηνών τα 5xFAD ποντίκια εμφανίζουν μέτρια εναπόθεση αμυλοειδικών πλακών στη στιβάδα V του φλοιού (William A Eimer and Robert Vassar, 2013). Στους 6, 9, 12 μήνες, ο αριθμός των πλακών αυξάνεται σημαντικά και αποθέσεις Αβ42 παρατηρούνται και σε περιοχές κοντά στην V

στιβάδα, όπως η CA1, CA2 CA3, το DG και στιβάδα IV και VI του φλοιού. Υγιή συνομίληκα ζώα δεν εμφανίζουν αντίστοιχη νευρωνική απώλεια και Αβ42 αποθέσεις. Η εκφύλιση των συνάψεων είναι ένα ακόμη χαρακτηριστικό των FAD και αποδεικνύεται με τη χρήση του δείκτη συναπτοφυσίνη. Τομές εγκεφάλου από ζώα 6, 9, 12 μηνών δείχνουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα του δείκτη αυτού σε σύγκριση με υγιή ζώα. Χαρακτηριστικά, στους 9 μήνες τα επίπεδα συναπτοφυσίνης είναι μειωμένα κατά 75% σε σχέση με υγιή συνομίληκα ζώα.

Όλα αυτά τα παθολογικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά προκαλούνται από τις 5 μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι οποίες αυξάνουν την παραγωγή του Αβ42.

1.7 Νευροτροφίνες

1.7.1 Γενικά για τις νευροτροφίνες

Οι νευροτροφίνες αποτελούν μία οικογένεια αυξητικών παραγόντων που απαρτίζεται από 4 μέλη: NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived nerve factor), NT-3 (neurotrophin 3), NT-4 (neurotrophin 4) που έχουν καλά χαρακτηρισμένες λειτουργίες στο νευρικό σύστημα (Snider, 1994). Ενδεικτικά, ο BDNF στο ΚΝΣ υποστηρίζει την νευρωνική επιβίωση και αύξηση. Ο NGF στο ΚΝΣ συμβάλλει στη διατήρηση και επιβίωση χολινεργικών, αισθητικών και συμπαθητικών νευρώνων. Οι NT3 και NT4 στο ΚΝΣ και ΠΝΣ υποστηρίζουν την επιβίωση ώριμων και διαφοροποίηση νέων νευρώνων.

1.7.2 Παραγωγή και φυσιολογία νευροτροφινών

Οι νευροτροφίνες παράγονται σαν μεγάλα πρόδρομα μόρια, τις προνευροτροφίνες, μεγέθους 30-34 kDa, τα οποία αμέσως ομοδιμερίζονται (Ibanez, 2002). Στη συνέχεια υφίστανται πρωτεολυτική επεξεργασία από τη φουρίνη και από προκονβεργτάσες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το Golgi προς σχηματισμό ώριμων νευροτροφινών μεγέθους ~13kDa. **Και τα δύο είδη μορίων χρησιμοποιούν ένα σύστημα δύο υποδοχέων για να μεσολαβήσουν τις δράσεις τους** (Kenneth K. et al., 2010). Για τις ώριμες νευροτροφίνες το σύστημα αυτό απαρτίζεται από έναν από τους υποδοχείς Trk (TrkA-C, tropomyosin related kinase receptor) (Kaplan and Miller, 2000) και τον p75^{NTR} (p75 pan-neurotrophin receptor), οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω. Στο σύστημα αυτό, ο Trk μεσολαβεί τη μετάδοση του σήματος για επιβίωση και διαφοροποίηση, ενώ ο p75^{NTR} είναι ρυθμιστής της ειδικότητας και της συγγένειας με την οποία ο συνδέτης (η εκάστοτε νευροτροφίνη) συνδέεται στον εκάστοτε Trk για να τον ενεργοποιήσει. Αντίστοιχα, το σύστημα υποδοχέων για τις προνευροτροφίνες περιλαμβάνει τον p75^{NTR} και τη σορτιλίνη που μαζί είναι υπεύθυνα για τη μεσολάβηση κυτταρικού θανάτου (Willnow et al., 2008). Τα δύο είδη μορίων συνδέονται με

διαφορετική συγγένεια στα δύο σύμπλοκα υποδοχέων και ασκούν διαφορετικές δράσεις. Χαρακτηριστικά, ο proNGF και proBDNF συνδέονται πολύ ειδικά στον p75^{NTR} και όχι στους Trks και μεσολαβούν απόπτωση (Lee et al., 2001).

Γενικά, η ειδική σύνδεση των προνευροτροφινών στον p75^{NTR} γίνεται μέσω του αφαιρούμενου τμήματος του πρόδρομου μορίου και για το λόγο αυτό οι προνευροτροφίνες συνδέονται με μεγαλύτερη συγγένεια στον p75^{NTR} (Suter et al., 1991). Αντίθετα, περιοχές του ώριμου μορίου είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση αυτών στους Trks και τη μεσολάβηση των διαφορετικών τους δράσεων.

1.7.3 Νευροτροφίνες στο AD

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι κατά τη γήρανση και τις σχετιζόμενες με την γήρανση νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως το AD, μειωμένα επίπεδα νευροτροφινών μπορεί να ευθύνονται για τη μειωμένη προστασία έναντι του νευρωνικού θανάτου, καθώς και για το μειωμένο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση πρόδρομων νευρικών κυττάρων (I. Charalampopoulos et al., 2008). Πολλές δράσεις των νευροτροφινών σχετίζονται ειδικά με το AD. Παράδειγμα αποτελεί ο NGF που αποτελεί κριτικής σημασίας παράγοντα για τη διατήρηση των χολινεργικών νευρώνων του προσθίου εγκεφάλου που είναι απαραίτητοι για τη φυσιολογική λειτουργία του φλοιού (Tuszynski, U, Amaral, Cage 1990). Έχει προταθεί ότι ελλείματα του NGF ή TrkA (που θα αναφερθεί παρακάτω) έχουν αποτέλεσμα τον εκφυλισμό των χολινεργικών νευρώνων (Tuszynski, 2007). Επίσης ο NGF είναι σημαντικός για τη διατήρηση της συναπτικής πλαστικότητας και μνήμης στον ιππόκαμπο, καθώς επίδραση με NGF in vivo ενισχύει τη μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP) στον ιππόκαμπο, ενώ χαμηλά επίπεδα NGF βλάπτουν τη χωρική μνήμη (Conner et al., 2009). Μία ακόμη ζωτικής σημασίας δράση των νευροτροφινών που άμεσα σχετίζεται με το AD διαφαίνεται από την καταστροφή της μυελίνης που φυσιολογικά παρατηρείται στη νόσο αυτή. Συγκεκριμένα, υπάρχει αδυναμία αντικατάστασης των μυελωδών ελύτρων, καθώς η διαφοροποίηση των απαραίτητων για τη διαδικασία αυτή κυττάρων -των ολιγοδενδροκυττάρων- απαιτεί την παρουσία BDNF (Vondran et al., 2010).

1.8 Νευροστεροειδή

1.8.1 Γενικά για τα νευροστεροειδή

Τα νευροστεροειδή παράγονται στο ΚΝΣ και ΠΝΣ από νευρώνες και αστρογλοιακά κύτταρα που διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα. Συντίθενται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και έχουν πολλαπλές

δράσεις. Επηρεάζουν τη νευρωνική λειτουργία, τη διαφοροποίηση (Brinton R.D., 2006), τη ρύθμιση της μυελίνωσης (Cago N. Et al., 2001), τον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυττάρων (Wang et al., 2005), την νευρογένεση στον ιππόκαμπο και άλλα. Η σύνθεση νευροστεροειδών μειώνεται με την ηλικία, κάτω από στρεσογόνες καταστάσεις, καθώς και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Τα πιο μελετημένα από αυτά, η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), πρεγνενολόνη, οι θεϊκοί εστέρες αυτών καθώς και προγεστερόνη και αλλοπρεγναλόνη επηρεάζουν την νευρωνική επιβίωση και αυξάνουν τη νευρογένεση. Πολλές μελέτες συσχετίζουν τη μείωση παραγωγής νευροστεροειδών με τη νευρωνική δυσλειτουργία και τον εκφυλισμό. Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στο μόριο της DHEA, τα επίπεδα της οποίας είναι πολύ υψηλά στο ΚΝΣ.

1.8.2 DHEA

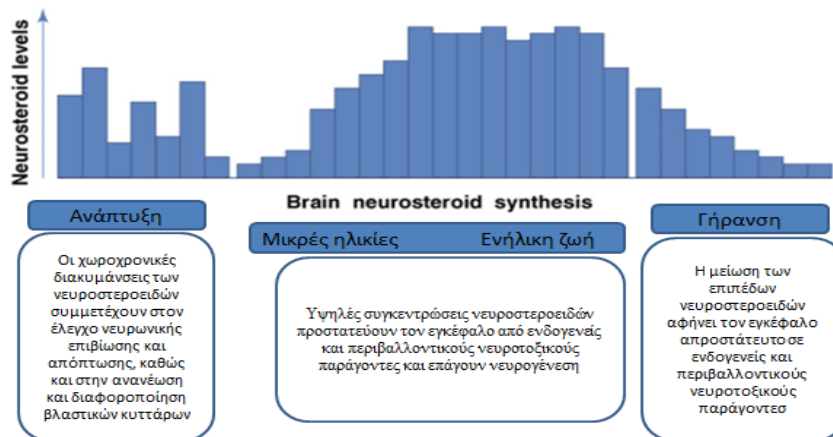
Η DHEA και DHEAS είναι τα πιο άφθονα νευροστεροειδή στον άνθρωπο. Παράγονται στον εγκέφαλο και τα επινεφρίδια (Schumacher et al., 2003), με την DHEA του εγκεφάλου να εμφανίζει παρακρινή δράση, ενώ των επινεφριδίων συστημική. Η τοπική δράση DHEA έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των νευρώνων στο φλοιό σε έμβρυα τρωκτικών, ενώ σε συγκεντρώσεις nM προωθεί την αύξηση των αξόνων (Comragnone et al., 1998), όχι όμως των δενδριτών (Brinton, R.D., 1994). Δρα σαν νευροτροφικός παράγοντας προστατεύοντας νευρικά κύτταρα από απόπτωση μέσω σύνδεσης και ενεργοποίησης των υποδοχέων TrkA και p75^{NTR} (που όπως θα αναφερθεί παρακάτω είναι υποδοχείς του NGF). Εκτός από τη νευροπροστατευτική δράση της η DHEA επάγει τη νευρογένεση και την επιβίωση των νευρώνων. Έχει δειχθεί ότι αυξάνει τον αριθμό των νεοσηματισθέντων νευρώνων στο DG του ιππόκαμπου σε εγκέφαλο αρουραίου. Το γεγονός ότι τα νευροστεροειδή, συμπεριλαμβανομένης της DHEA, μειώνονται με την ηλικία, δείχνει τη δυναμική τους στη στρατολόγηση βλαστικών κυττάρων, καθώς κατά τη γήρανση -όπως αναφέρθηκε παραπάνω- μειώνεται σημαντικά η παραγωγή νέων νευρώνων.

1.8.3 Διακυμάνσεις της DHEA με την ηλικία

Οι μεγάλες διακυμάνσεις της DHEA και DHEAS κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος, υποδεικνύουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο των νευροστεροειδών στο σχεδιασμό της αρχιτεκτονικής του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος (**εικόνα 5**). Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται κι από μελέτες που σχετίζουν την DHEA με ανανέωση ή διαφοροποίηση πρόδρομων νευρικών κυττάρων, καθώς και με έλεγχο της επιβίωσης και απόπτωσης ώριμων νευρικών κυττάρων. Μετά τη γέννηση η DHEA αυξάνεται σημαντικά και παραμένει σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής συμβάλλοντας στην προστασία των νευρώνων από τοξικούς και προαποπτωτικούς παράγοντες, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων σε

κατεστραμμένες περιοχές. Σήμερα είναι γνωστό ότι οι δράσεις αυτές της DHEA, μεσολαβούνται μέσω της ρύθμισης ποικίλων υποδοχέων νευροδιαβιβαστών (Compagnone et al., 2000). Τα χαμηλά επίπεδα της DHEA που παρατηρούνται κατά τη γήρανση (Belanger et al., 1994) σχετίζονται με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών διαδικασιών (I, Charalampopoulos et al., 2008). Συγκεκριμένα σε ηλικία 70 ετών τα επίπεδα της κυκλοφορούσας DHEA έχουν φτάσει το 10-20% των μεγίστων επιπέδων. Επίσης, ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου ασθενών με AD έχουν βρεθεί χαμηλά επίπεδα DHEA και DHEAS σε σύγκριση με αντίστοιχες περιοχές εγκεφαλών υγείων συνομήλικων ατόμων (Schumacher et al., 2003) τονίζοντας το νευροπροστατευτικό ρόλο της DHEA.

Με βάση τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι φυσικά και συνθετικά νευροστεροειδή έχουν ένα πολλά υποσχόμενο ρόλο στην παρεμπόδιση και θεραπεία της -σχετιζόμενης με την ηλικία- εγκεφαλικής ατροφίας, καθώς και νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Ανακαλύπτοντας μηχανισμούς μέσω των οποίων φυσικά και τεχνητά νευροστεροειδή επηρεάζουν μονοπάτια επιβίωσης και απόπτωσης, καθώς και την ανανέωση και διαφοροποίηση νευρικών βλαστικών κυττάρων, θα δώσει νέες ιδέες για θεραπευτικές προσεγγίσεις με σκοπό την αντιμετώπιση συμπτωμάτων νευροεκφυλιστικών νόσων.



Εικόνα 5. Αλλαγές στη συγκέντρωση των νευροστεροειδών κατά τη διάρκεια της ζωής. Οι διακυμάνσεις των νευροστεροειδών κατά την ανάπτυξη ή τη γήρανση, μπορεί να ελέγχουν τη νευρωνική επιβίωση, απόπτωση ή/και την ανανέωση και διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων συμβάλλοντας στο σχεδιασμό της αρχιτεκτονικής του εγκεφάλου. Κατά την ενηλικίωση, οι υψηλές συγκεντρώσεις νευροστεροειδών συμβάλλουν στην προστασία των νευρώνων από τοξικούς και προαποπτωτικούς παράγοντες και συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των ενήλικων βλαστικών κυττάρων σε κατεστραμμένες περιοχές.

Διαταραχές στη νευρογένεση που παρατηρούνται σε χρόνιες στρεσογόνες καταστάσεις –συμπεριλαμβανομένων κατάθλιψης, χρόνιο ψυχολογικό στρες και χαμηλού επιπέδου χρόνια φλεγμονή– μπορεί να οδηγήσουν σε χαμηλά επίπεδα νευροστεροειδών και νευροεκφυλισμό (Charalampopoulos et al., 2008).

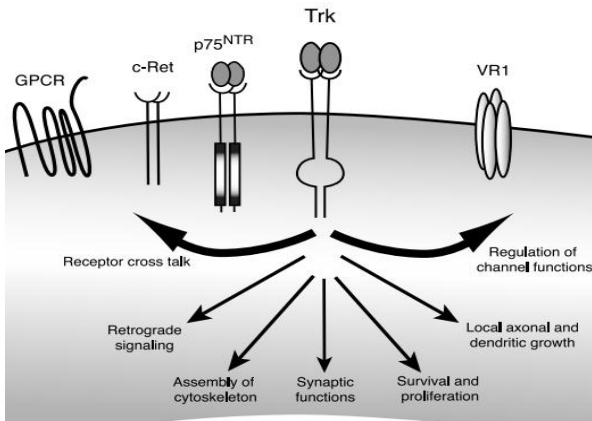
1.9 Trk (Tropomyosin related kinase) υποδοχείς

1.9.1 Γενικά για τους Trk υποδοχείς

Οι Trk αποτελούν μία οικογένεια 3 υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (TrkA, TrkB, TrkC) κάθε ένας από τους οποίους μπορεί να ενεργοποιηθεί από μία ή περισσότερες νευροτροφίνες (BDNF, NGF NT-3, NT-4).

Συγκεκριμένα ο NGF συνδέεται και ενεργοποιεί τον TrkA (Kaplan et al., 1991), ο BDNF και NT-4 τον TrkB, ενώ ο NT-3 τον TrkC (Huang EJ, Reichardt LF, 2001). Οι νευροτροφίνες συνδέονται με διαφορετική συγγένεια στον κάθε υποδοχέα, ενώ η ακολουθούμενη σηματοδότηση ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη μοίρα των νευρικών πρόδρομων κυττάρων και αξόνων, αναδιαμόρφωση κυτταροσκελετού, καθώς και την έκφραση και ενεργότητα σημαντικών -για το κύτταρο- πρωτεϊνών, όπως ιοντικά κανάλια και υποδοχείς νευροδιαβιβαστών (εικόνα 6).

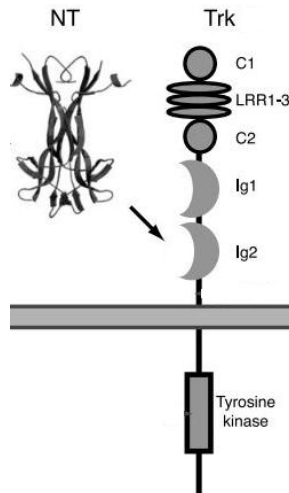
Οι Trk βρίσκονται στο αναπτυσσόμενο και ώριμο ΚΝΣ και ΠΝΣ, ενώ η ενεργοποίησή τους μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικό αποτέλεσμα στα διαφορετικά είδη κυττάρων ανάλογα το είδος των μορίων που εκφράζονται στο κύτταρο και εκείνων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των Trk είναι η αλληλεπίδραση με τον $p75^{NTR}$ (pan-neurotrophin receptor) υποδοχέα. Ο τελευταίος ενεργοποιεί πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία μπορεί να δρουν συνεργατικά ή ανταγωνιστικά προς εκείνα που ενεργοποιούνται από τους Trk. Πολλά από τα $p75$ -ενεργοποιούμενα μονοπάτια που είναι προαποπτωτικά καταστέλλονται από Trk-μεσολαβούμενα σήματα, ενώ ο $p75$ μπορεί να επηρεάζει τη διαμόρφωση των Trk υποδοχέων αλλάζοντας την ειδικότητα και τη συγγένεια προς τους συνδέτες τους, διαδικασία πολύ σημαντική ιδιαίτερα κατά την ανάπτυξη (Eric J. Huang and F. Reichardt, 2003). Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στον TrkA.



Εικόνα 6. Βασικές λειτουργίες των Trk υποδοχέων. Η ενεργοποίηση των Trk υποδοχέων από τις νευροτροφίνες οδηγεί σε μια ποικιλία βιολογικών αποκρίσεων που περιλαμβάνουν πολλαπλασιασμό, επιβίωση, αξονική και δενδριτική ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση, αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, μεμβρανική μεταφορά, καθώς επίσης και τροποποιήσεις στη συναπτική λειτουργία. Επίσης, ο Trk επικοινωνεί με άλλους μεμβρανικούς υποδοχείς, όπως ο $p75$, σχετιζόμενους με G πρωτεΐνες υποδοχείς, υποδοχείς βαλινοειδούς και c-Ret (Eric J. Huang and Louis F. Reichardt, 2003).

1.9.2 Δομή Trk υποδοχέων

Πρόκειται για μεμβρανικούς υποδοχείς με μία διαμεμβρανική περιοχή που διαθέτει στην κυτταροπλασματική του πλευρά πολλά κατάλοιπα Tyr που αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης και στρατολόγησης /ενεργοποίησης μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι των Trk και μία μόνο θέση με δράση κινάσης Tyr (Huang EJ, Reichardt, 2001). Η εξωκυττάρια περιοχή τους, διακρίνει τους υποδοχείς αυτούς από άλλους της οικογένειας κινάσης Tyr (Sneider R. And Schweiger M. 1991). Στο εξωκυττάριο τμήμα του μορίου υπάρχουν τρία μοτίβα πλούσια σε λευκίνη (24 αμινοξέα έκαστο), τα οποία οριοθετούνται από 2 συμπλέγματα Cys. Αμέσως μετά υπάρχουν δύο C2 περιοχές όμοιες με περιοχές ανοσοσφαιρίνης, ενώ η θέση σύνδεσης των νευροτροφινών είναι η Ig2 (εικόνα 7) (Perez P. Coll PM et al, 1995).



Εικόνα 7. Δομή των Trk υποδοχέων. Απεικονίζεται η εξωκυττάρια περιοχή αποτελούμενη κατά σειρά από 2 συμπλέγματα κυστεΐνης (C1, C2) που περιβάλλουν 3 πλούσια σε λευκίνη μοτίβα (LRR), και 2 όμοιες με ανοσοσφαιρίνη περιοχές (Ig1, Ig2) από τις οποίες η δεύτερη είναι η βασική θέση σύνδεσης νευροτροφινών για τους TrkA και TrkB. Ακολουθεί μια μόνο διαμεμβρανική περιοχή και η ενδοκυττάρια περιοχή με μία μοναδική θέση με δράση κινάσης τυροσίνης (Huang and Louis F. Reichardt, 2003).

1.9.3 Μονοπάτια ενεργοποίησης από TrkA

Η σύνδεση νευροτροφινών στους Trk προκαλεί τον ομοδιμερισμό τους και παρέχει το πρώτο σήμα για ενεργοποίηση των υποδοχέων, όμως η συγγένεια σύνδεσης και η ειδικότητα ρυθμίζονται από τον $p75^{NTR}$. Ο τελευταίος αλληλεπιδρά με τον TrkA μεταβάλλοντας τη στερεοδιαμόρφωσή του κι έτσι αυξάνεται η συγγένεια σύνδεσης με την αντίστοιχη νευροτροφίνη, δηλαδή τον NGF (Bibel M. et al., 1999). Μετάλλαξη στην κυτταροπλασματική περιοχή του $p75$ ή TrkA εμποδίζει το σχηματισμό συμπλόκου υψηλής συγγένειας. Η ενεργοποίηση του TrkA συνοδεύεται από φωσφορυλίωση μιας σειράς καταλοίπων Tyr στην κυτταροπλασματική πλευρά του υποδοχέα (Stephens RM et al., 1994). Τρία από τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται μέσα στην περιοχή κινάσης Tyr -Y670, Y674, Y675- στον ανθρώπινο TrkA, ενώ δύο απ' αυτά -Y490, Y785- βρίσκονται έξω από την περιοχή αυτή και

αποτελούν μείζουσες θέσεις φωσφορυλίωσης (Stephens RM et al., 1994). Η φωσφορυλίωση των καταλοίπων αυτών δημιουργεί μία πλατφόρμα για τη στρατολόγηση πρωτεϊνών προσαρμοστών, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν πληθώρα κυτταροπλασματικών μορίων διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Σ' αυτά περιλαμβάνονται τα Ras-Raf-Erk, PI3K-Akt, PLCγ-Ca⁺² και NFκb.

PLCγ-Ca⁺² σηματοδότηση: φωσφορυλίωση του TrkA στο Y785 κατάλοιπο (και σε ανάλογες θέσεις στους TrkB, TrkC) έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PLCγ (Kaplan DR, Miller FD, 2000). Η φωσφολιπάση C διασπά τη φωσφατυδιλινοσιτόλη σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η πρώτη δρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο επάγοντας τη μαζική απελευθέρωση ιόντων Ca⁺² στο κυτταρόπλασμα, ενώ η DAG ενεργοποιεί ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC).

Ras-Raf-Erk σηματοδότηση: είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από νευροτροφίνες διαφοροποίηση των νευρώνων. Μείζουσα θέση φωσφορυλίωσης είναι η Y490 και μέσω μίας σειράς πρωτεϊνών προσαρμοστών οδηγεί στην ενεργοποίηση της Ras πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό αποτελεί την έναρξη ενός καταρράκτη αντιδράσεων με τελικό στόχο την ενεργοποίηση των Erk1/2 κινασών από τις MEK1/2 κινάσες. Οι πρώτες ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που οδηγούν σε έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με διαφοροποίηση επιβίωση και έκφυση αξόνων.

PI3K-Akt σηματοδότηση: η άμεση φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της PI3K από τη Ras οδηγεί στη -μεσολαβούμενη από Trk- επιβίωση πολλών, όχι όμως όλων των νευρώνων (Vaillant AR et al, 1999). Ενεργοποίηση της PI3 κινάσης οδηγεί στην ενεργοποίηση της Akt1/2 που είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών που οδηγούν σε επιβίωση των νευρώνων. Ανάμεσα στους τελικούς στόχους της Akt είναι η αναστολή της Bad, η οποία προωθεί την απόπτωση (Yuan J. Yanker, 2000), ο NFκB που προωθεί την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην επιβίωση, καθώς και αναστολή της GSK3β (Hetman M et al, 2000) αυξημένα επίπεδα της οποία προκαλούν απόπτωση σε καλλιέργειες νευρώνων.

Την ενεργοποίηση του TrkA ακολουθεί η ενδοκύττωση του και η μεταφορά του σε ενδοσώματα απ' όπου συντηρείται η μετάδοση του σήματος στο κύτταρο. Τα ενδοσώματα αυτά είτε ξαναγυρνούν στην κυτταρική μεμβράνη ανακυκλώνοντας τον TrkA, είτε συντήκονται με λυσοσώματα στα οποία ο TrkA αποικοδομείται. Το ποιο μονοπάτι θα ακολουθηθεί εξαρτάται από το είδος του ενδοσώματος στο οποίο περικλείεται ο TrkA. Όταν πρόκειται για αξονική αύξηση και εξωκύττωση νευροδιαβιβαστών η δράση του NGF μπορεί να είναι τοπική. Όταν όμως πρόκειται για διαφοροποίηση και επιβίωση, το επαγόμενο από NGF σήμα πρέπει να φτάσει στον πυρήνα

(Harrington et al., 2004). Αυτό εξασφαλίζεται μέσω ενδοκύττωσης του TrkA μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη (Eric J. Huang and Louis F Reichardt, 2003).

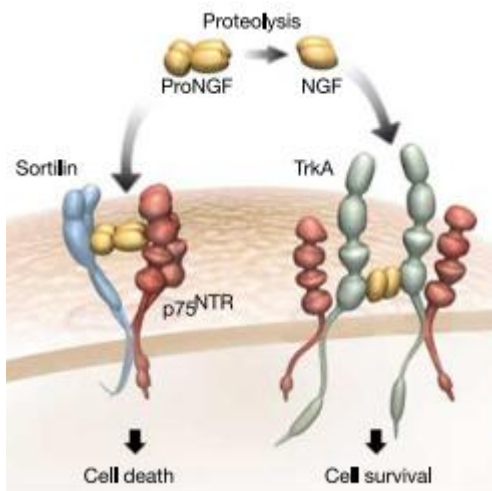
1.10 p75^{NTR} υποδοχέας

1.10.1 Γενικά για τον p75^{NTR}

Ο p75^{NTR} ήταν ο πρώτος υποδοχέας νευροτροφινών που χαρακτηρίστηκε (Tohnon et al, 1986), όμως οι βιολογικές του δράσεις και μηχανισμοί σηματοδότησης παραμένουν ανεπαρκώς χαρακτηρισμένοι εξαιτίας της ικανότητάς του να δρα σαν συνυποδοχέας κατά τη σύνδεση πολλών συνδετών σε άλλους υποδοχείς (Dechant and Bard, 2002). Ο p75^{NTR} ανήκει στην οικογένεια του TNFR (tumor necrosis factor receptors) και δεν διαθέτει ο ίδιος καταλυτική ενεργότητα (Hempstead, 2002). Διαθέτει μία κυτταροπλασματική «περιοχή θανάτου» (death domain) μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με κυτταρικά συστατικά επιτρέποντας τη ρύθμιση της σηματοδότησης (Roux et al, 2002). Χαρακτηρίζεται ως χαμηλής συγγένειας υποδοχέας για τις νευροτροφίνες.

1.10.2 Ρόλος του p75^{NTR}

Ο p75^{NTR} εκφράζεται έντονα στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Ωστόσο στο ενήλικο νευρικό σύστημα μερικές μόνο περιοχές συνεχίζουν να τον εκφράζουν, όπως οι χολινεργικοί νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου, αισθητικοί και κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού (Friedman, W.J. et al, 1991). Η έκφραση του p75^{NTR} αυξάνεται έντονα μετά από νευρωνικό τραυματισμό, ενώ την ίδια στιγμή είναι ένας υποδοχέας που συμβάλλει στη νευρωνική βλάβη, αξονικό εκφυλισμό και κυτταρικό στρες (Carlos F. Ibanez and Anastasia Simi, 2012). Έτσι, ο p75^{NTR} έχει ένα διττό ρόλο: από τη μία συμβάλλει στο θάνατο αξοτομηθέντων αισθητικών και κινητικών νευρώνων και από την άλλη έχει σημαντικό ρόλο στην επιβίωσή τους κατά την ανάπτυξη (Wiese S. et al, 1999). Το προς ποιά κατεύθυνση θα λειτουργήσει εξαρτάται από τα υπάρχοντα μέσα στο κύτταρο μόρια, τα οποία θα πάρουν μέρος στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ο NGF που αυξάνει την επιβίωση νεαρών καλλιέργειών κυττάρων Schwann μέσω p75^{NTR} σηματοδότησης μέσω της RIP2 πρωτεΐνης, ενώ την ίδια στιγμή προκαλεί απόπτωση σε πιο ώριμες καλλιέργειες από τις οποίες η RIP2 απουσιάζει (Khursigara G. Et al, 2001).



Εικόνα 8. Μοντέλο σχηματισμού του συμπλόκου proNGF/p75^{NTR}/σορτιλίνη καθώς και του NGF/ TrkA/ p75^{NTR} (Anders Nykjaer et al., 2004)

1.10.3 Αλληλεπιδράσεις p75^{NTR} - p75^{NTR} ρυθμιζόμενα μονοπάτια

Ο p75^{NTR} συνδέεται με τα μόρια ώριμων νευροτροφινών με την ίδια σχεδόν χαμηλή συγγένεια. Η σύνδεση των νευροτροφινών στον p75^{NTR} μπορεί να επάγει επιβίωση, απόπτωση, καθώς επίσης και να επηρεάσει στην αξονική αύξηση in vivo και in vitro. Μονοπάτια που οδηγούν σε επιβίωση περιλαμβάνουν τον NFκB και την Akt κινάση (Wooten et al., 2001), ενώ προαποπτωτικά μονοπάτια περιλαμβάνουν την Jun κινάση. Η μεσολαβούμενη από τους Trk σηματοδότηση από νευροτροφίνες μπορεί να μεταβάλλει τη φύση του p75^{NTR} μεσολαβούμενου σήματος. Μία σημαντική συνέπεια αυτού είναι ότι απουσία ενεργοποίησης των Trk υποδοχέων, οι νευροτροφίνες συνδέονται στον p75^{NTR} και προκαλούν απόπτωση. Βέβαια σε αντίθεση με τις προνευροτροφίνες, οι ώριμες νευροτροφίνες μπορούν μόνο σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση να προκαλέσουν μέτρια μόνο απόπτωση. Ο Hempstead και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι ο proNGF συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στον p75^{NTR} και μπορεί να προκαλέσει απόπτωση συμπαθητικών νευρώνων και ολιγοδενδροκυττάρων (Lee et al., 2001). Η προωθούμενη από proNGF απόπτωση γίνεται μέσω ενός συμπλόκου του p75^{NTR} με τη σορτιλίνη, ένα μόριο ~95 kDa το οποίο εκφράζεται κατά την εμβρυογένεση σε περιοχές που ο NGF και proNGF έχουν καλά χαρακτηρισμένα αποτελέσματα (Saret P. et al, 2003). Ο NGF ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο μέσω σύνδεσής του με τον TrkA και p75^{NTR} αντίστοιχα (Chao, M.V, 2003). Αντίθετα ο proNGF προωθεί την απόπτωση μόνο μέσω του p75^{NTR} και όχι του TrkA (Lee et al, 2001). Για να επαχθεί απόπτωση μέσω του proNGF σχηματίζεται ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο από τους proNGF, p75^{NTR} και σορτιλίνη. Σε αντίθεση με τον proNGF για τον οποίο η σορτιλίνη εμφανίζει πολύ υψηλή συγγένεια, ο NGF αναγνωρίζεται λιγότερο έως καθόλου απ' αυτήν (Anders Nykjaer et al., 2004) (**εικόνα 8**).

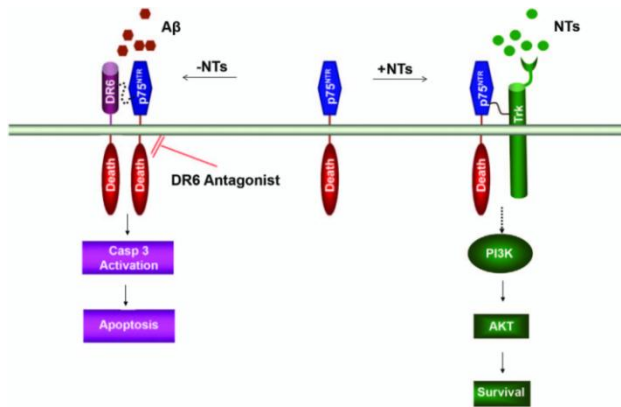
Συνοψίζοντας, οι νευροτροφίνες ρυθμίζουν τη νευρωνική επιβίωση και απόπτωση σε πολλά επίπεδα. Οι Trk υποδοχείς χρησιμοποιούν τουλάχιστον 2 μηχανισμούς για να επάγουν επιβίωση: α) Ras-PI3K-Akt μεσολαβούμενη καταστολή αποπτωτικών πρωτεϊνών και μονοπατιών και β) MEK/MAPK μεσολαβούμενη ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Ο p75^{NTR} μπορεί να ενισχύσει την ενεργότητα του TrkA μέσω ενεργοποίησης του NFκB. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως ο p75^{NTR} δρα σαν επαγόμενος από συνδέτη αποπτωτικός υποδοχέας επάγοντας την ενεργοποίηση του JNK μονοπατιού κι άλλων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόπτωση. Οι Trk μέσω του Ras-PI3K-Akt μπορούν να εμποδίσουν τη μεσολαβούμενη από p75^{NTR} απόπτωση, καταστέλλοντας το JNK μονοπάτι. Ο p75^{NTR} από την άλλη μπορεί να καταστείλλει την επαγόμενη από Trk επιβίωση μέσω παρεμπόδισης των Akt και Raf ενεργοτήτων. Αυτός ο λειτουργικός διάλογος είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη και επιδιόρθωση μετά από βλάβη του νευρικού συστήματος.

1.10.4 p75^{NTR} στο AD

Το AD χαρακτηρίζεται από προοδευτικό νευροεκφυλισμό και γνωστική βλάβη. Από τα πρώτα χαρακτηριστικά του AD είναι ο εκφυλισμός χολινεργικών νευρώνων στον πρόσθιο εγκέφαλο που νευρώνουν τον ιππόκαμπο και τον νεοφλοιό (Yan Z, Feng J, 2004). Δεδομένου ότι ο p75^{NTR} εκφράζεται έντονα στους χολινεργικούς νευρώνες, αυτός -όπως και άλλα μέλη της οικογένειας του TNFR- έχουν έρθει στην επιφάνεια ως φαρμακευτικοί στόχοι (Nikolaev A. et al., 2009). Ο p75^{NTR} εκφράζεται επίσης στον ιππόκαμπο (Barret et al., 2005) συμπεριλαμβανομένου του DG παίζοντας ρόλο στη μορφολογία του ιπποκάμπου, στη χολινεργική νύρωση και στη σχετιζόμενη με τον ιππόκαμπο συμπεριφορά. Για παράδειγμα στην CA1 ο p75^{NTR} φαίνεται να δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της πυκνότητας των δενδριτών τουλάχιστον in vitro (Zagrebelsky et al., 2005). Επίσης, κατά τη γήρανση υπάρχει δραματική μείωση της νευρογένεσης στο DG (Knoth et al., 2010), της πυκνότητας των δενδριτών στον ιππόκαμπο (von Bohlen and Hablach et al., 2006) καθώς επίσης εκφυλίζονται οι χολινεργικοί άξονες (Schliebs and Arendt, 2011), γεγονότα που σχετίζονται με την έντονη παρουσία του p75^{NTR} στις περιοχές αυτές.

Ο p75^{NTR} έχει ένα καλά καθορισμένο ρόλο στον κυτταρικό θάνατο και αξονικό εκφυλισμό. Σχηματίζοντας σύμπλοκο με τη σοτριλίνη, καθώς και με τον proNGF (ο οποίος αυξάνεται κατά τη γήρανση και το AD) οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Επίσης, ο p75^{NTR} αποτελεί υποδοχέα για το Αβ πεπτίδιο μεσολαβώντας κυτταρικό θάνατο σε νευρώνες ιπποκάμπου in vitro και χολινεργικούς

νευρώνες προσθίου εγκεφάλου *in vivo* (Yaar M, et al., 1997). Εκτός από τον $p75^{NTR}$ ένας άλλος υποδοχέας θανάτου είναι ο DR6 (death receptor 6). Αυξανόμενος αριθμός στοιχείων δείχνει ότι ο DR6 έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο με τον $p75^{NTR}$. Εκφράζεται σε φλοιικούς νευρώνες, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το AD, αυξάνεται όπως δείχνουν τα επίπεδα mRNA αλλά και ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα ειδικό για τον DR6. Ο Nikolaev και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο DR6 απουσία τροφικών παραγόντων προωθεί κυτταρικό θάνατο και αξονικό εκφυλισμό κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ μέσω σύνδεσης με το αμινοτελικό άκρο της APP. Επίσης προτείνεται ότι ο $p75^{NTR}$ σχηματίζει σύμπλοκο με τον DR6 μεσολαβώντας το θάνατο φλοιικών νευρώνων (Y Hu et al, 2013). Άλλωστε τα επίπεδα $p75^{NTR}$ και DR6 είναι αυξημένα στο AD. Έτσι, το μπλοκάρισμα DR6/ $p75^{NTR}$ είναι ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος για νευροεκφυλιστικές νόσους όπως το AD. Συνοψίζοντας, DR6, $p75^{NTR}$ και το Αβ πεπτιδίιο υπερεκφράζονται σε εγκεφάλους με AD, ενώ TrkA και νευροτροφίνες μειώνονται. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο για το $p75^{NTR}$ /DR6 σύμπλοκο στο νευρωνικό θάνατο μέσω του Αβ πεπτιδίου (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Μοντέλο για τη λειτουργία του DR6/p75 συμπλόκου σε φλοιικούς νευρώνες. Παρουσία νευροτροφινών ο $p75^{NTR}$ ενισχύει τη σύνδεση αυτών με τον Trk υποδοχέα που προωθεί την επιβίωση φλοιικών νευρώνων μέσω του μονοπατιού της Akt κινάσης. Απουσία νευροτροφινών, το Αβ πεπτιδίιο συνδέεται στο σύμπλοκο $p75^{NTR}$ /DR6, το οποίο προωθεί μέσω των περιοχών θανάτου των υποδοχέων, το μονοπάτι της κασπάσης 3 που οδηγεί σε απόπτωση. Στο AD, ποικίλοι παράγοντες, όπως το Αβ, η υπερέκφραση του DR6 ή η μειωμένη παραγωγή των Trk υποδοχέων, μπορεί να μετατρέψει το σήμα του $p75^{NTR}$, από σήμα επιβίωσης σε προαποπτωτικό σήμα. (Y Hu et al., 2013)

1.10.5 $p75^{NTR}$ – Αβ πεπτιδίιο

Σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς που αναφέρθηκε παραπάνω, το κύριο παθογενετικό χαρακτηριστικό που ευθύνεται για το νευροεκφυλισμό στο AD είναι η υπερβολική παραγωγή και συσσώρευση ινώδων Αβ40 και Αβ42 πεπτιδίων. Τα Αβ πεπτιδίδια είναι τοξικά *in vitro* και αυτή η ιδιότητα σχετίζεται με την ινώδη διαμόρφωση τους (Iversen et al., 1995), ενώ πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι όχι μόνο το ινώδες, αλλά και τα πρωτοϊνίδια και το διαλυτό Αβ μπορεί να είναι νευροτοξικά (Klein et al., 2001). Τόσο το ινώδες, όσο και το διαλυτό Αβ συνδέεται στον $p75^{NTR}$ σε καλλιέργειες πρωτογενών φλοιικών νευρώνων, όμως μόνο το πρώτο είναι κυτταροτοξικό.

Πιθανολογείται ότι για να δοθεί σήμα μέσω σύνδεσης $p75^{NTR}/A\beta$ πρέπει να υπάρχει δαιασύνδεση των $p75^{NTR}$ υποδοχέων και δεν αρκεί απλά η ύπαρξη μεμονομένων συμπλόκων $p75^{NTR}/A\beta$. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί μόνο το ινώδες και όχι το διαλυτό $A\beta$ είναι κυτταροτοξικό (Mina Yaar et al., 1997).

1.10.6 Η γήρανση ρυθμίζει την παραγωγή $A\beta$ πεπτιδίου μέσω του $p75^{NTR}$ υποδοχέα

Αποτελέσματα βασισμένα σε γενετικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι το μεσολαβούμενο από $p75^{NTR}$ αλλά όχι από $TrkA$ - μονοπάτι ενισχύει τη βιογένεση του $A\beta$ πεπτιδίου. Προηγούμενες μελέτες σε αισθητικούς και κινητικούς νευρώνες (Bergman et al., 1999) έδειξαν ότι κατά τη γήρανση αυξάνονται τα επίπεδα του $p75^{NTR}$ ενώ ταυτόχρονα μειώνονται εκείνα των Trk υποδοχέων. Ταυτόχρονα υπάρχει μία αύξηση στο συνολικό $A\beta$, στη β σεκρετάση και τα κεραμίδια (Claudio Costantini et al., 2005). Τα τελευταία ρυθμίζουν την πρωτεόλυση της APP από τη β σεκρετάση (Puglielli et al., 2003), οπότε μία αύξηση των κεραμιδίων στο κύτταρο οδηγεί σε αύξηση του αμυλοειδογενούς μονοπατιού και επομένως σε αύξηση του $A\beta$ πεπτιδίου. Με βάση αυτά προκύπτει μία σχετιζόμενη με τη ηλικία ρύθμιση των υποδοχέων νευροτροφινών που άμεσα σχετίζεται με την παραγωγή του $A\beta$ πεπτιδίου (Bergman et al., 1999).

1.11 Nerve Growth Factor (NGF)

1.11.1 Γενικά για τον NGF

Ο NGF είναι μία υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη με μεγάλο βαθμό ομολογίας ανάμεσα στα σπονδυλωτά. Είναι υπεύθυνος για την επιβίωση και διατήρηση των νευρώνων και συνδεδεμένος με τον $TrkA$ λειτουργεί σαν σηματοδοτικό μόριο (Fiore M. et al., 2009). Συμβάλλει στην επιβίωση αισθητικών και συμπαθητικών νευρώνων (Freeman RS. et al., 2004), ενώ προκαλεί αξονική αύξηση και διακλάδωση (Madduri S. et al., 2009). Ζωτικής σημασίας είναι ο ρόλος του στους χολινεργικούς νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου. Παρ' ότι η εξάρτηση των νευρώνων από τροφικούς παράγοντες κατά την ανάπτυξη είναι καθολική, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του πρόσθιου εγκεφάλου είναι ότι συνεχίζει να εξαρτάται για τη φυσιολογική συντήρησή του από τον NGF ακόμα και σε ενήλικο στάδιο (Berradi N. et al., 2007). Επίσης οι χολινεργικοί νευρώνες είναι τα κύτταρα που εκφράζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τον υψηλής συγγένειας $TrkA$ υποδοχέα -για τον NGF- και τον χαμηλής συγγένειας $p75^{NTR}$. Η παραγωγή του NGF είναι εντοπισμένη σε περιοχές του εγκεφάλου που νευρώνονται από τον πρόσθιο εγκέφαλο όπως ο ιππόκαμπος και το EC. Ο ώριμος NGF εξασκεί τις τροφικές του δράσεις μέσω ενεργοποίησης του $TrkA$, με τον $p75^{NTR}$ να ρυθμίζει θετικά αυτήν την

αλληλεπίδραση (Longo FM, Massa SM, 2005). Ο proNGF έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το σύμπλοκο p75^{NTR}/σορτιλίνη επάγοντας απόπτωση.

1.11.2 NGF-AD

Ο NGF είναι στενά συνδεδεμένος με το AD εξαιτίας της ιδιαίτερης ευαισθησίας των χολινεργικών νευρώνων του πρόσθιου εγκεφάλου. Στα αρχικά στάδια του AD παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα του proNGF και σορτιλίνης (Counts SE et al., 2004) παράλληλα με τη μείωση στα επίπεδα του TrkA. Επίσης παρατηρείται πολύ μικρή μετατροπή του proNGF σε NGF, καθώς επίσης και αυξημένη αποικοδόμηση του τελευταίου (Bruno MA et al., 2009), με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα του NGF. Τα βιολογικά αποτελέσματα του proNGF επηρεάζουν την ισορροπία ανάμεσα σε απόπτωση και επιβίωση (Nykjaer A et al., 2005).

Οι χολινεργικοί νευρώνες που πλήττονται ραγδαία στο AD παραμένουν αρκετά συρρικνωμένοι και μόνο ένα μικρό μέρος των κυττάρων πεθαίνει στα τελικά στάδια του AD (Parachikova et al., 2007). Ένα παράδειγμα της σημαντικότητας του NGF για τη διατήρηση των χολινεργικών νευρώνων αποτελούν φαρμακολογικές μελέτες, στις οποίες ένας ανταγωνιστής του NGF (για μπλοκάρισμα του TrkA στο ΚΝΣ) ή χορήγηση anti-NGF μονοκλωνικού αντισώματος (Yip HK et al., 1984) είχαν αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους και της πυκνότητας των προϋπάρχοντων φλοιϊκών χολινεργικών συνάψεων δείχνοντας ότι η κατάστασή τους εξαρτάται άμεσα από τον ενδογενή NGF σε ενήλικο στάδιο.

1.11.3 Θεραπείες βασισμένες στον NGF

Δεδομένου ότι στο AD μειώνεται ο NGF και αυξάνεται ο proNGF, μία πιθανή θεραπεία θα μπορούσε να περιλαμβάνει τη μετατροπή του ενδογενούς proNGF σε ώριμο NGF ή προστατεύοντας το ΚΝΣ από την εντατική αποικοδόμησή του NGF. Κάτι τέτοιο θα απαιτούσε απευθείας χορήγηση NGF στο ΚΝΣ ή εμφύτευση κυττάρων που εκκρίνουν NGF στον πρόσθιο εγκέφαλο, μέσω παρεμβατικής μεθόδου (όπως για παράδειγμα χειρουργική παρέμβαση για εμφύτευση αυτόλογου μοσχεύματος ινοβλαστών τροποποιημένων ώστε να εκκρίνουν NGF απευθείας στον εγκέφαλο). Όμως μία τέτοια προσέγγιση δεν θα ήταν πρακτικά εφικτή για μεγάλο αριθμό ασθενών με AD. Αυτό οδηγεί σε ανάγκη για την ανάπτυξη μίας μη επεμβατικής αλλά αποτελεσματικής μεταφοράς του NGF στον εγκέφαλο.

Η χορήγηση του ίδιου του NGF προϋποθέτει την επίλυση δύο βασικών προβλημάτων: την αποτελεσματική μεταφορά του στο ΚΝΣ (καθώς ο NGF δεν διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό) και τον περιορισμό των δυσάρεστων συνεπειών του πόνου, όπως αποδεικνύεται από κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με AD (Erikdotter et al, 1998). Ειδικά το τελευταίο γεγονός θέτει

περιορισμούς στη χορηγούμενη δόση, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Apfel SC, 2002).

Το ιδανικό NGF μόριο για μία θεραπεία βασισμένη στον NGF θα πρέπει να είναι διακριτό από τον ενδογενή NGF, να παρέχει την κατάλληλη δόση, ενώ την ίδια στιγμή να εξασκεί νευροτροφικές δράσεις χωρίς άλλες δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό, όπως πόνος ή νεοπλασίες (Antonino Cattaneo and Pietro Calissano, 2012). Με δεδομένο ότι ο NGF συνδέεται στον TrkA υποδοχέα, μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση θα μπορούσε να περιλαμβάνει ένα μόριο που προσομοιάζει τον NGF συνδεδεμένο στον υποδοχέα του TrkA. Ένα τέτοιο μόριο είναι το νευροστεροειδές DHEA (διϋδροεπιανδροστερόνη), το οποίο αλληλεπιδρά τόσο με τον TrkA όσο και με τον p75^{NTR} δρώντας ως νευροτροφίνη.

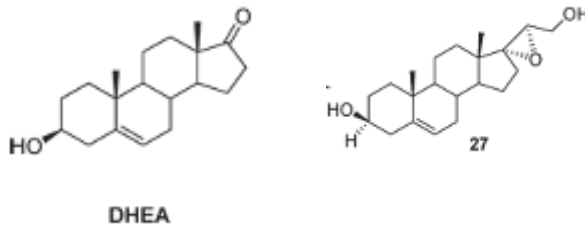
1.11.4 DHEA βασισμένη θεραπεία

Η DHEA είναι από τα πιο ισχυρά ενεργά νευροστεροειδή ενώ μείωση της DHEA του εγκεφάλου και της κυκλοφορίας κατά τη γήρανση έχει σχετιστεί με νευρωνική δυσλειτουργία και νευροεκφυλισμό (Baulieu, E. I and Robel P, 1998). Παρ' όλη την περιορισμένη αναγεννητική ικανότητα του νευρικού

συστήματος έχει παρατηρηθεί μία αυξημένη ενεργότητα βλαστικών κυττάρων στις SVZ και SGZ περιοχές. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως υπάρχουν σήματα στον εγκέφαλο που προωθούν τη νευρογένεση παρέχοντας μία δυνατή πιθανότητα (Charalampopoulos et al, 2005) για αναγέννηση συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου. Η DHEA δείχθηκε πρόσφατα πως μπορεί να επάγει

νευρογένεση σε διάφορα πειραματικά μοντέλα (Suzuki et al, 2004). Γενικά, φυσικά νευροστεροειδή, όπως η DHEA έχουν σημαντικές νευροπροστατευτικές ιδιότητες in vivo και in vitro σε πειραματόζωα. Όμως στον άνθρωπο τα φυσικά νευροστεροειδή μεταβολίζονται σε οιστρογόνα, ανδρογόνα και προγεστίνες που έχουν γενικευμένες ενδοκρινικές παρενέργειες συμπεριλαμβανομένων ορμονοεξαρτώμενων νεοπλασιών (Takahashi et al., 2006) καθιστώντας τη χρήση τους περιορισμένη. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν τα ανάλογα της DHEA τροποποιημένα στα C3 και C17, ώστε να διατηρούν τη νευροπροστατευτική και αντιαποπτωτική δράση χωρίς όμως να μεταβολίζονται σε οιστρογόνα και ανδρογόνα. Τα τροποποιημένα στο C3 κατάλοιπο ανάλογα αποτυγχάνουν να εξασκήσουν αντιαποπτωτική δράση τουλάχιστον σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 100nM. Έτσι, οι τροποποιήσεις επικεντρώθηκαν στο C17 που επίσης αποτελεί θέση μεταβολικής αλλαγής προς οιστρογόνα και ανδρογόνα. Με τροποποιήσεις αυτής της θέσης παρήχθησαν τα ανάλογα BNN 20, 23 και 27. Η σειρά αντιαποπτωτικής δράσης (20>27>23) και η συγγένεια

σύνδεσης στη θέση σύνδεσης της DHEA στη μεμβράνη (20>23>27) είναι παρόμοιες, γεγονός που υποδεικνύει πως η αποτελεσματικότητα σύνδεσης στη μεμβράνη είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την αντιαποπτωτική ικανότητα των αναλόγων αυτών (Kalogeropoulou et al., 2009). Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στο BNN27 ανάλογο (εικόνα 10).



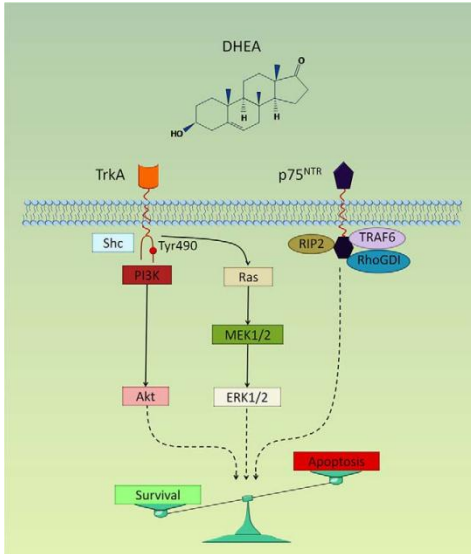
Εικόνα 10. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της DHEA και του τροποποιημένου στο C17 αναλόγου αυτής, BNN27.

1.11.5 Λειτουργικά χαρακτηριστικά της DHEA που την καθιστούν υποψήφιο μόριο για θεραπεία

Η DHEA αλληλεπιδρά με τους TrkA και p75^{NTR} μεμβρανικούς υποδοχείς του NGF δρώντας ως νευροτροφίνη. Πειράματα (Iakovos Lazaridis et al., 2011) έδειξαν ότι η DHEA:

- Έχει αντιαποπτωτικές δράσεις που αναστέλλονται μετά από χρήση siRNA αλλά και αναστολέα ειδικό για τον TrkA υποδοχέα
- Βρίσκεται συνδεδεμένη στις μεμβράνες HEK293 κυττάρων που έχουν υποστεί διαμόλυνση με TrkA και p75^{NTR}
- Κατακρημνίζει φυσικό ή τεχνητό TrkA και p75^{NTR}
- Προκαλεί φωσφορυίωση του TrkA και το μεσολαβούμενο από NGF σήμα περιλαμβάνει τα μόρια Sch, Akt και Erk1/2 κάτωθεν του TrkA, καθώς και το μεσολαβούμενο από p75^{NTR} σήμα με τα μόρια προσαρμοστές TRAF6, RIP2 και RhoGDI.

Η ενεργοποίηση των θέσεων δέσμευσης της DHEA στη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα διαδοχικές και παροδικές φωσφορυλιώσεις των MEK/ERK κινασών, οι οποίες ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο CREB και NFκB επάγοντας την έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl2). Παράλληλα η δέσμευση της DHEA σε αντίστοιχες θέσεις στη μεμβράνη οδηγεί σε φωσφορυλίωση των PI3K/Akt κινασών οδηγώντας σε φωσφορυλίωση/απενεργοποίηση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bad (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Υποθετικό μοντέλο της μεσολαβούμενης από NGF σηματοδότησης, που εμπλέκεται στις επιδράσεις της DHEA στη νευρωνική μούρα. Η DHEA συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στους TrkA και p75 υποδοχείς, εκκινώντας μια αλληλουχία γεγονότων: 1) Η DHEA προκαλεί τη μεσολαβούμενη από TrkA Tyr490 φωσφορυλίωση των Shc, ERK1/2, and Akt κινασών, ελέγχοντας την έκφραση και λειτουργία των αντιαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών και 2) η DHEA προωθεί την αλληλεπίδραση των p75 υποδοχέων με τις πρωτεΐνες προσαρμοστές TRAF6, RIP2, και RhoGDI, επηρεάζοντας την απόπτωση των νευρικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η απόφαση ανάμεσα στην επιβίωση και την απόπτωση -σε ανταπόκριση στην DHEA- καθορίζεται από την αναλογία αλληλεπιδράσεων της DHEA με τους 2 υποδοχείς (Iakovos Lazaridis et al., 2011)

1.12.6 Εκλεκτικότητα του αναλόγου BNN27

Το BNN27 έχει κάποια χαρακτηριστικά που το καθιστούν εκλεκτικό μόριο, όπως θα πρέπει να είναι ένα αποτελεσματικό ανάλογο της DHEA (Iakovos Lazaridis et al., 2011):

- συνδέεται εκλεκτικά στο σύμπλοκο TrkA/p75^{NTR} ενεργοποιώντας και τους 2 υποδοχείς. Τον TrkA μέσω φωσφορυλίωσης και τον p75^{NTR} μέσω αποσύνδεσης από την RhoGDI
- δεν συνδέεται στους TrkB και TrkC
- δεν μετατρέπεται σε οιστρογόνα και ανδρογόνα (όπως η DHEA) εξαιτίας της τροποποίησης στο C17 κατάλοιπο

1.13 Σύγκριση μηχανισμών δράσης NGF - BNN27

Το BNN27 συνδέεται εκλεκτικά στον υποδοχέα του NGF, TrkA (και τον p75^{NTR}) (I. Padiaditakis et al., 2014). Συνδεόμενο στον TrkA, το BNN27 προκαλεί τη φωσφορυλίωση του πρώτου, που οδηγεί σταδιακά σε ενεργοποίηση των Akt και MAPK μεσολαβούμενων μονοπατιών σε καλλιέργειες συμπαθητικών νευρώνων, καθώς και σε ενδοκύττωση του TrkA με ένα τρόπο διαφορετικό από την μεσολαβούμενη από NGF ενδοκύττωση.

Η επαγόμενη από NGF ενδοκύττωση του TrkA οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση των Erk και MAPK κινασών, η οποία εξαρτάται από την ενδοκύττωση του υποδοχέα, ενώ παροδική ενεργοποίηση των Erk και MAPK κινασών συμβαίνει από ενεργοποίηση στην πλασματική μεμβράνη

(York et al., 2000). Ο NGF συνδεόμενος στον TrkA προωθεί είτε επιβίωση, είτε διαφοροποίηση: από την πλασματική μεμβράνη ο NGF προκαλεί παροδική ενεργοποίηση των Erk και MAPK κινασών και μεσολαβεί την επιβίωση, ενώ σηματοδότηση από τα ενδοσώματα – μετά από ενδοκύττωση του TrkA – οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση των Erk και MAPK κινασών και προωθεί τη διαφοροποίηση (York et al., 2000). Αντίθετα, το BNN27 προκαλεί παροδική μόνο ενεργοποίηση των Erk και MAPK κινασών. Αυτή η διαφορά στο πρότυπο ενεργοποίησης της Erk κινάσης, ίσως είναι η αιτία για την αδυναμία του BNN27 να μεσολαβήσει διαφοροποίηση ή μακρόχρονη επιβίωση σε NGF εξαρτώμενες καλλιέργειες.

Το BNN27 δεν είναι ικανό από μόνο του να μιμηθεί τη δράση του NGF, τουλάχιστον όσον αφορά στην ανάπτυξη των νευριτών, όμως μπορεί να δράσει συνεργατικά με αυτόν. Επίσης, έχει δειχθεί πως το BNN27 προστατεύει αποτελεσματικά PC12 κύτταρα από επαγόμενη - από αποστέρηση NGF – απόπτωση (Calogeropoulou et al., 2009), ενώ σε καλλιέργειες συμπαθητικών νευρώνων, μειώνει την ενεργοποίηση της p-JNK (Jun amino-terminal kinase) κινάσης μετά από αποστέρηση NGF για 18 ώρες, «σώζοντας» τελικά τα κύτταρα από απόπτωση (Estus et al., 1994, Palmada et al., 2002). Η - επαγόμενη από NGF - ενδοκύττωση του pTrkA και η επακόλουθη σηματοδότηση από τα ενδοσώματα είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από NGF νευριτική ανάπτυξη (Grimes et al., 1996, Liu et al., 2007). Η ενδοκύττωση αυτή ενισχύεται 15 και 30 λεπτά έπειτα από την χορήγηση BNN27 σε καλλιέργειες PC12 κυττάρων (I. Peditakis et al., 2014). Το BNN27 δεν αλληλεπιδρά με τον NGF απουσία TrkA, όμως παρουσία NGF προωθείται ο σχηματισμός συμπλόκων NGF/TrkA (2:2) που διευκολύνουν την πρόσδεση του BNN27. Το BNN27 με τη σειρά του προωθεί την ενδοκύττωση του TrkA σε πρώιμα ενδοσώματα και στη συνέχεια τον «παγιδεύει» σε ενδοσώματα ανακύκλωσης που τον μεταφέρουν πάλι στην κυτταρική μεμβράνη αυξάνοντας έτσι, την παρουσία του TrkA στην μεμβράνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΠΟΘΕΣΗ

Δεδομένης της παθολογίας του AD, υποθέσαμε πως στους εγκεφάλους 5xFAD ποντικών θα υπάρχουν αλλοιώσεις στο πρότυπο της μυελίνης και του αξονικού κυτταροσκελετού, καθώς επίσης και συσσωρεύσεις αμυλοειδικών πλακών και ενδοκυττάριου Αβ πεπτιδίου. Επίσης, δεδομένης της κυτταροτοξικότητας του Αβ πεπτιδίου, υποθέσαμε ότι διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού θα έχουν αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυττάρων υποκάμπου (HNSCs) in vitro. Θεωρώντας ότι στο AD τα επίπεδα της DHEA είναι μειωμένα, υποθέσαμε πως εξωγενής χορήγηση του αναλόγου της DHEA, BNN27, in vivo σε 5xFAD ζώα και in vitro σε HNSCs, θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση τόσο στο φαινότυπο εγκεφάλων 5xFAD ποντικών, όσο και σε καλλιέργειες NSCs αντίστοιχα.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν πρώτον η διερεύνηση της επίδρασης του νευροστεροειδούς της DHEA, BNN27 σε εγκεφάλους 5xFAD ποντικών, αλλά και στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των HNSCs, υπό και χωρίς την παρουσία των κυτταροτοξικών Αβ40 και Αβ42 πεπτιδίων. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο μέρος της εργασίας, σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης του BNN27 αναλόγου στα πρότυπα μυελίνωσης, αξονικού κυτταροσκελετού, αλλά και της εναπόθεσης αμυλοειδικών πλακών στην περιοχή του υποκάμπου. Προς την κατεύθυνση αυτή εξετάστηκαν οι περιοχές DG και CA1-CA3 ως προς την παρουσία Αβ πλακών και ενδοκυτταρικού Αβ πεπτιδίου, αντίστοιχα, και οι περιοχές DG και EC ως προς τα πρότυπα μυελίνωσης και αξονικού κυτταροσκελετού. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, σκοπός ήταν η μελέτη τόσο της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων Αβ40 και Αβ42 ολιγομερών σε καλλιέργειες HNSCs (εμβρυϊκής ημέρας 17.5), όσο και της δυνατότητας του BNN27 να παρεμποδίσει ή/και αναστρέψει τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα τα προκαλούμενα από την παρουσία Αβ πεπτιδίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Υλικά και μέθοδοι

Απομόνωση νευρικών βλαστικών κυττάρων: Η απομόνωση βλαστικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε από τον ιππόκαμπο εμβρύων κατά την 17.5 ημέρα της κύησης. Αρχικά οι ιππόκαμποι απομονώθηκαν σε HBSS (1x) με 5% πενικιλίνη/στρεπταβιδίνη. Στη συνέχεια, υπό στείρες συνθήκες ο ιστός κόπηκε σε μικρότερα κομμάτια και ακολούθησε επώαση με θρυψίνη για 20 λεπτά στους 37°C. Αραιώσαμε σε δεκαπλάσιο όγκο με DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco®) με N2 συμπλήρωμα (Life Sciences) υπό βοηθούμενη μηχανική ανάδευση προς πλήρη διάσταση του ιστού σε μεμονωμένα κύτταρα. Αυτά καλλιεργήθηκαν σε DMEM/F12 (με N2 συμπλήρωμα, L-Glutamine, D-glucose, primokine, EGF/FGF 20ng/ml) μέχρι το σχηματισμό νευροσφαιρών, ενώ ανακαλλιεργούνταν κάθε 4-5 μέρες.

Κυτταρική καλλιέργεια: Για κάθε επίστρωση σε καλλιέργεια προηγήθηκε επώαση 2 ωρών με πολύ D-λυσίνη (PDL, SIGMA) ακολουθούμενη από δίωρη επώαση με λαμινίνη (15mg/ml) στους 37°C. Τα βλαστικά κύτταρα ιπποκάμπου διατηρήθηκαν σε θρεπτικό DMEM με N2 συμπλήρωμα παρουσία των αυξητικών παραγόντων EGF/FGF (20ng/ml), σε συνθήκες 37 °C με 5% CO₂. Μετά από σχηματισμό ικανού αριθμού και μεγέθους νευροσφαιρών, οι νευροσφαίρες επωάστηκαν με ακιουτάση και μετά από μηχανική διάσπαση προέκυψε εναιώρημα μονήρων κυττάρων, τα οποία στρώθηκαν σε 10⁵ cells/ml. τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για **πείραμα τοξικότητας παρουσία των πεπτιδίων Αβ40 και Αβ42**. Στις καλλιέργειες προστέθηκαν διαφορετικές συνθήκες που περιελάμβαναν τα τοξικά Αβ40 και Αβ42 πεπτίδια, καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναλόγου νευροστεροειδούς, της DHEA, BNN27. Τα Αβ40 και Αβ42 χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 1μM και 5μM, ενώ το BNN27 (αρχικής συγκέντρωσης 0.01M) χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 10⁻⁶ M και 10⁻⁷M. Η επώαση των καλλιεργιών παρουσία των συνθηκών έγινε σε DMEM/F12 θρεπτικό με N2 συμπλήρωμα, απουσία των αυξητικών παραγόντων EGF/FGF, με εξαίρεση την καλλιέργεια μάρτυρα με πλήρες θρεπτικό. Πριν την προσθήκη των συνθηκών στις καλλιέργειες, τα κύτταρα υπέστησαν αποστέρηση για 2 ώρες και μονιμοποιήθηκαν 24 ώρες από την επίδραση των συνθηκών.

Αβ πεπτίδια: Συνθετικά λυοφυλιωμένα Αβ40 και Αβ42 (**Eurogentec**) διαλύθηκαν αρχικά σε 1% NH₄OH σε H₂O και στη συνέχεια σε PBS σε τελική συγκέντρωση 200μM. Για τον ολιγομερισμό των πεπτιδίων, πραγματοποιήθηκε επώαση σε DMEM στους 37°C για 24 ώρες.

Ανοσοκυτταροχημεία: Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΐδη (PFA, **Sigma Aldrich**) σε PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων πραγματοποιήθηκε με 10% ορού αλόγου (Normal Horse Serum, NHS) σε PBS με Triton X (PBSTx) 0.3%. Πραγματοποιήθηκε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα Ki67 (**AbCam**, rabbit polyclonal), ειδικό για μία πυρηνική πρωτεΐνη που ενέχεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε αραιώση 1:200 σε PBSTx 0.1%+ NHS 5% στους 4°C όλη νύχτα και το δευτερογενές αντίσωμα Alexa 546 (donkey, anti-rabbit, **Invitrogen**), σε αραιώση 1:1000 σε PBSTx 0.1%+ NHS 5% για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος προστέθηκε Hoescht (**Life technologies**) σε αραιώση 1:5000 σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αποτελέσματα της χρώσης αναλύθηκαν από μικροσκόπιο φθορισμού Leica χρησιμοποιώντας τον 40x αντικειμενικό φακό και μετρώντας κύτταρα σε 8 διαφορετικά οπτικά πεδία σε κάθε πηγάδι.

5xFAD μοντέλο ζώων: Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το 5xFAD μοντέλο ζώων. Πρόκειται για διπλά διαγονιδιακά ποντίκια (ετερόζυγα), τα οποία συνεκφράζουν 5 μεταλλάξεις: K670N/M671L (Swedish), I716V (Florida), V717I (London) στο ίδιο μόριο της APP695 και M146L και L286V στο ίδιο μόριο της PS1, που έχουν συσσωρευτικό αποτέλεσμα στο φαινότυπο (Oakley et al., 2006). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά ζώα (3.5 μηνών, n=12). Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν WT ζώα από την ίδια γενιά. Η γονοτύπηση των ζώων πραγματοποιήθηκε βάση του πρωτοκόλλου της Viagen που περιλαμβάνει επώαση του ιστού με πρωτεΐνωση K (**Ambion**) και διάλυμα λύσης (**Viagen**) για 3 ώρες στους 56°C, απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης στους 85°C για 45 λεπτά και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**Applied Biosystems**) με εκκινητές οι οποίοι είναι ειδικοί για μία FAD μετάλλαξη στην αλληλουχία της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς, με θερμοκρασία υβριδοποίησης 58°C. Τέσσερις ομάδες αρσενικών ζώων (12 ζώα συνολικά) χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του BNN27 στο φαινότυπο 5xFAD και αγρίου τύπου (WT) ζώων. **1η ομάδα:** 2 WT ζώα με εικόνικη πελέτα (placebo), **2η ομάδα:** 3 WT ζώα με πελέτα BNN27, **3η ομάδα:** 4 5xFAD ζώα με placebo, **4η ομάδα:** 3 5xFAD ζώα με BNN27. Τα WT-placebo ήταν η ομάδα μάρτυρας, τα WT-BNN27 χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής ενισχυτικής επίδρασης του BNN27 αναλόγου σε υγιείς φαινοτύπους, τα 5xFAD-placebo αποτελούσαν την ομάδα-μάρτυρα για την πελέτα, ώστε να είμαστε σίγουροι, ότι οποιαδήποτε πιθανή επίδραση στα 5xFAD-BNN27 ζώα είναι αποτέλεσμα της παρουσίας του BNN27 αναλόγου που εμπεριέχεται στην πελέτα.

Οι πελέτες παρουσίαζαν ημερήσια απελευθέρωση δραστικής ουσίας 10mg/ημέρα και εισήχθησαν στα ζώα σε ηλικία 1.5 μηνών, ενώ σε ηλικία 3.5 μηνών τα ζώα θυσιάστηκαν.

Ανοσοϊστοχημεία: Τα ζώα θυσιάστηκαν μετά από αναισθητοποίηση και ενδοκαρδιακή έγχυση 10 mL φυσιολογικού ορού (0.9% NaCl) τον οποίο ακολούθησε εκγυση 10mL παραφορμαλδεύδης 4% σε 0.1M διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer, PB), pH=7.4. Οι εγκέφαλοι κόπηκαν στην περιοχή του ιπποκάμπου σε τομές των 40μm με vibratome και διατηρούνταν σε κρυοπροστατευτικό 30%, glycerol/30% ethylene glycol σε PBS διάλυμα στους -20oC. Τρεις τομές ιπποκάμπου από κάθε ζώο, αρχικά ξεπλύθηκαν από το κρυοπροστατευτικό με 0.1% PBSTx, στην συνέχεια για να την ανάκτηση των ειδικών επιτόπων επεξεργάστηκαν 0.3% PBSTx ή κιτρικό οξύ (pH=6.4) (για NeuF & MBP) για 15 λεπτά στους 85°C. Οι μη ειδικοί επιτόποι επικαλύφθηκαν με φυσικό ορό αλόγου. Ακολούθως, οι τομές επεξεργάστηκαν με τα παρακάτω πρωτογενή αντισώματα στους 4oC όλη νύχτα: anti-Neurofilament (NeuF), ειδικό για μία περιοχή της βαριάς αλυσίδας πρωτεΐνης των νευρονηματίων (**AbCam**, mouse polyclonal) σε αραιώση 1:200, anti-MBP (myelin basic protein), ειδικό για τη βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (**AbCam**, rabbit polyclonal) σε αραιώση 1:100 και anti-Aβ peptide (mouse, 6E10 clone, AbCam), ειδικό για την εντόπιση τόσο των σχηματιζόμενων από Αβ πεπτίδιο πλακών, όσο και ενδοκυτταρικού Αβ πεπτιδίου σε αραιώση 1:1000. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για ακτίνη (**Santa Cruz biotechnology**) σε συγκέντρωση 1:2000. Στη συνέχεια, οι τομές επωάστηκαν με τα δευτερογενή αντισώματα Alexa 488 (anti-mouse, **Life Technologies**) και Alexa 546 (anti-rabbit, **Life Technologies**) σε αραιώση 1:1000 σε PBST0.1%, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Η λήψη των φθορίζουσών εικόνων έγινε από την περιοχή της οδοντωτής έλικας (DG) του ιπποκάμπου καθώς και από το EC (υποφλοιϊκή περιοχή εγγύς του ιπποκάμπου) και πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica, με χρήση του 40x αντικειμενικού φακού.

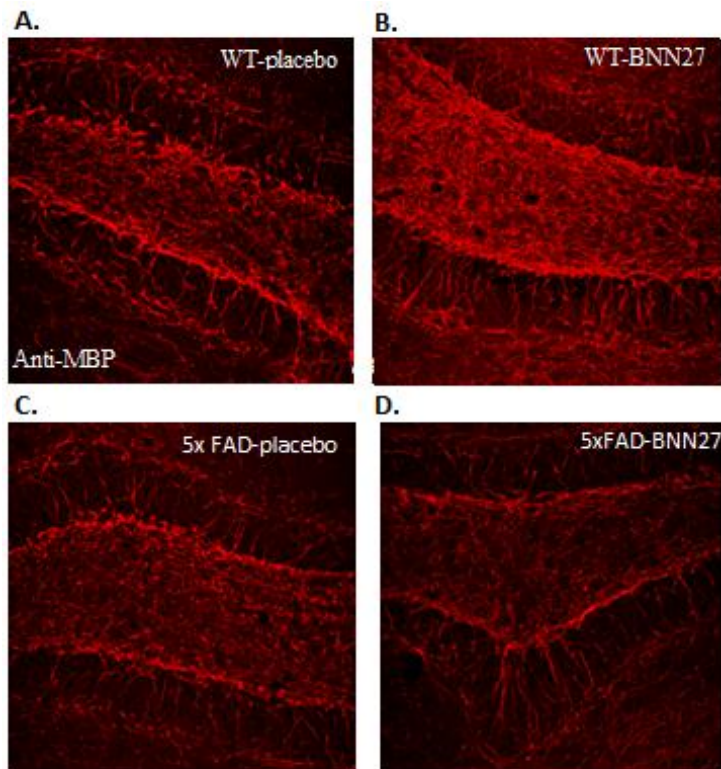
Στατιστική ανάλυση: Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας, πραγματοποιήθηκε με Two-Way ANOVA τεστ για την επίδραση του γονοτύπου και του αναλόγου στο φαινότυπο των ζώων, ακολουθούμενο από Bonferroni's posthoc ανάλυση. Για όλα τα στατιστικά τεστ, η σημαντικότητα καθορίστηκε με $p < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

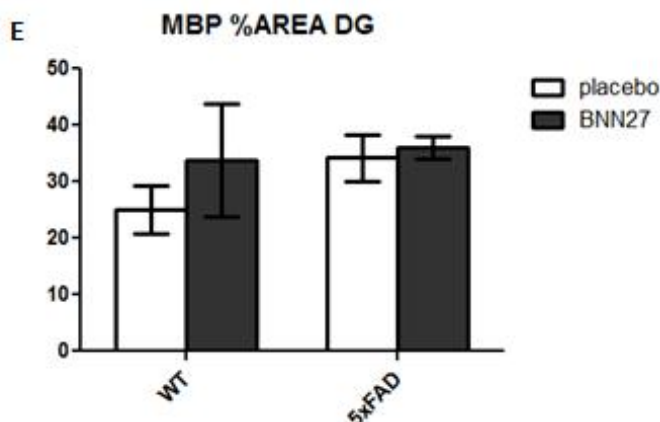
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Καμία ένδειξη για αλλαγή στο πρότυπο της μυελίνης υπό την επίδραση του BNN27 αναλόγου σε 5xFAD ζώα.

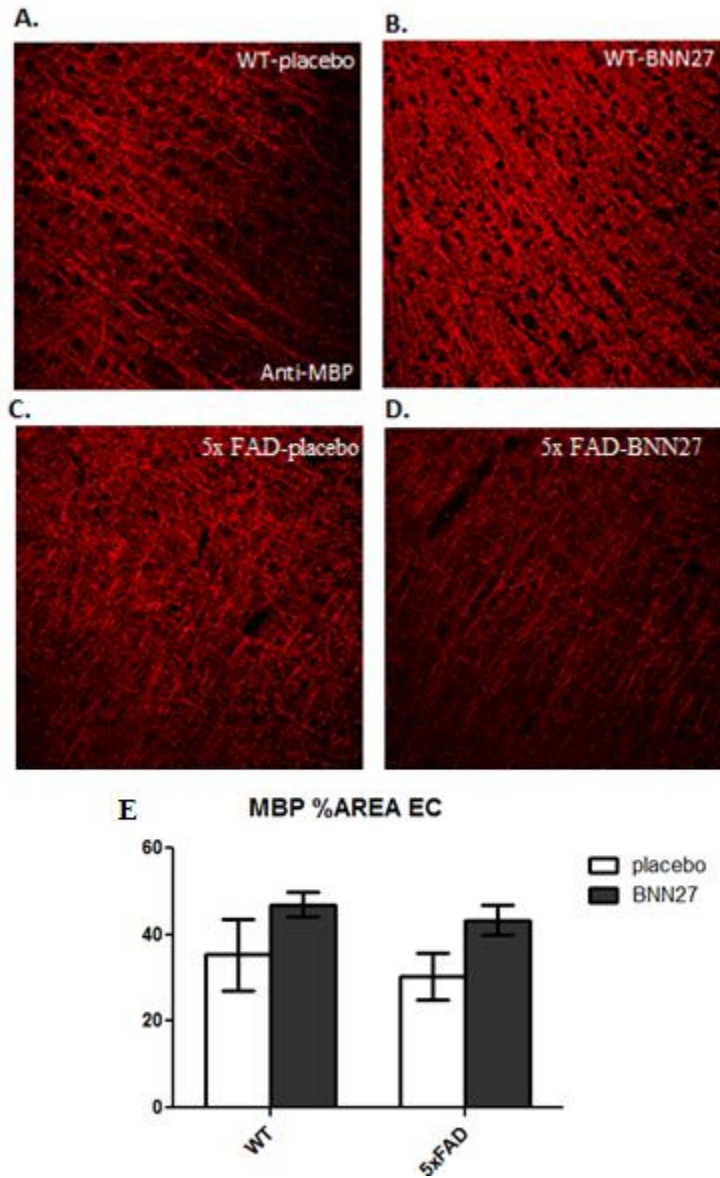
Δεδομένου ότι στο AD τα έλυτρα μυελίνης αλλοιώνονται, εξετάσαμε τομές εγκεφάλου στην περιοχή του υποκάμπου, ο οποίος βλάπτεται πρώτος στο AD, WT και 5xFAD ζώων, κάνοντας χρώση με αντίσωμα ειδικό για την MBP (Myelin Basic Protein) της μυελίνης. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν οι περιοχές DG και EC. Όπως φαίνεται (εικόνα 1), καμία επίδραση δεν είχε η παρουσία του BNN27 αναλόγου στο πρότυπο της μυελίνωσης εγκεφάλων 5xFAD ποντικών ($p=0.2904$), αλλά ούτε και ο γονότυπος των ζώων ($p=0.2624$), μιας και στα 5xFAD ζώα, δεν παρατηρήθηκε ορατή απομυελίνωση. Στην περιοχή του EC (εικόνα 2), το πρότυπο της μυελίνης δεν φαίνεται να επηρεάζεται στα 5XFAD ζώα σε σχέση με τα WT



Εικόνα 1. Επίδραση του αναλόγου νευροστεροειδούς BNN27 στο πρότυπο της MBP πρωτεΐνης της περιοχής DG, σε WT και 5xFAD ζώα. A-D. Διακρίνεται το πρότυπο της MBP αξόνων νευρικών κυττάρων στα WT-placero, WT-BNN, APP-placero, APP-BNN ζώα, αντίστοιχα. Οι άξονες φαίνονται να διασχίζουν την κοκκιώδη ζώνη (GZ), την περιοχή εξωτερικά αυτής, αλλά και εσωτερικά της υποκοκκιώδους (SGZ) E. Ανάλυση της (%) περιοχής χρώσης της MBP δεν έδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p>0.05$) τόσο για την επίδραση του BNN27 όσο και του γονοτύπου, στα 5xFAD ζώα. WT-placero: $n=3$, WT-BNN27: $n=3$, 5xFAD-placero: $n=3$, 5xFAD-BNN27: $n=3$. Τα γραφήματα δείχνουν $\text{mean} \pm \text{SEM}$



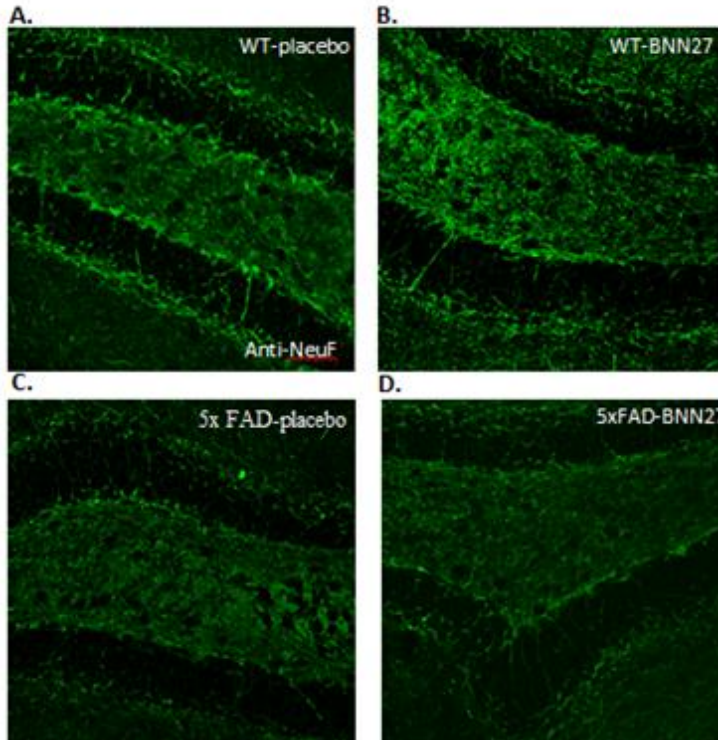
($p=0.4539$), όμως όσον αφορά στο BNN27 ανάλογο, φαίνεται πως η παρουσία του ίσως έχει κάποια πιθανή τάση για βελτίωση στην κατανομή της μυελίνης ($p=0.0550$).



Εικόνα 2. Επίδραση του αναλόγου νευροστεροειδούς BNN27 στο πρότυπο της MBP πρωτεΐνης της περιοχής EC, σε WT και 5xFAD ζώα. **A-D.** Διακρίνεται το πρότυπο της MBP αξόνων νευρικών κυττάρων στα WT-placebo, WT-BNN, APP-placebo, APP-BNN ζώα, αντίστοιχα **E.** Ανάλυση της (%) περιοχής χρώσης της MBP δεν έδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p>0.05$) της επίδρασης του γονοτύπου στον φαινότυπο των 5xFAD ζώων. Ενώ η επίδραση του BNN27 θα μπορούσε να έχει κάποια ενισχυτική επίδραση ($p\sim 0.05$) στο πρότυπο της μυελίνης στα 5xFAD ζώα. WT-placebo: $n=3$, WT-BNN27: $n=3$, 5xFAD-placebo: $n=3$, 5xFAD-BNN27: $n=3$. Τα γραφήματα δείχνουν $\text{mean}\pm\text{SEM}$

4.2 Καμία ένδειξη για αλλαγή στο πρότυπο του αξονικού κυτταροσκελετού υπό την επίδραση του BNN27 αναλόγου σε 5xFAD ζώα.

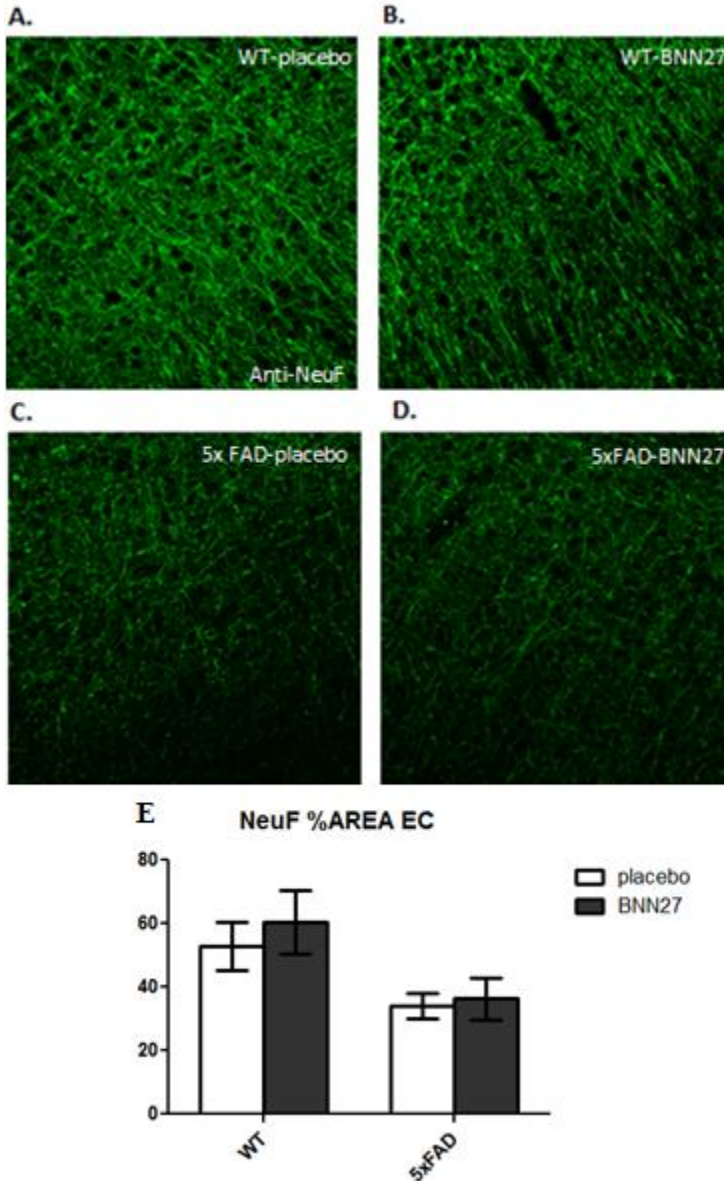
Δεδομένου ότι στο AD ο αξονικός κυτταροσκελετός αλλοιώνεται εξετάσαμε τομές εγκεφάλου στην περιοχή του ιπποκάμπου, ο οποίος βλάπτεται πρώτος στο AD, WT και 5xFAD ζώων, κάνοντας χρώση με αντίσωμα ειδικό για μία πρωτεΐνη που συνδέεται στους μικρισωληνίσκους NeuF (Neurofilament). Συγκεκριμένα εξετάστηκαν οι περιοχές DG και EC. Όπως φαίνεται (**εικόνα 3**), καμία επίδραση δεν είχε η



Εικόνα 3. Επίδραση του αναλόγου νευροστεροειδούς BNN27 στο πρότυπο της NeuF πρωτεΐνης της περιοχής DG, σε WT και 5xFAD ζώα. A-D. Διακρίνεται το πρότυπο της NeuF αξόνων νευρικών κυττάρων στα WT-placebo, WT-BNN, APP-placebo, APP-BNN ζώα, αντίστοιχα. Οι άξονες φαίνονται να διασχίζουν την κοκκιώδη ζώνη (GZ), την περιοχή εξωτερικά αυτής, αλλά και εσωτερικά της υποκοκκιώδους (SGZ). **Ε.** Ανάλυση της (%) περιοχής χρώσης της NeuF δεν έδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p > 0.05$) τόσο για την επίδραση του BNN27 όσο και του γονοτύπου, στα 5xFAD ζώα. WT-placebo: $n=3$, WT-BNN27: $n=3$, 5xFAD-placebo: $n=3$, 5xFAD-BNN27: $n=3$. Τα γραφήματα δείχνουν $\text{mean} \pm \text{SEM}$

παρουσία του BNN27 αναλόγου στους άξονες κυττάρων εγκεφάλων 5xFAD ποντικών ($p=0.9535$), αλλά ούτε και ο γόνουτος των ζώων ($p=0.3451$). Στην περιοχή του EC (**εικόνα 4**), το πρότυπο των αξόνων δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την επίδραση του BNN27 αναλόγου ($p=0.4974$), ενώ ο γόνουτος των

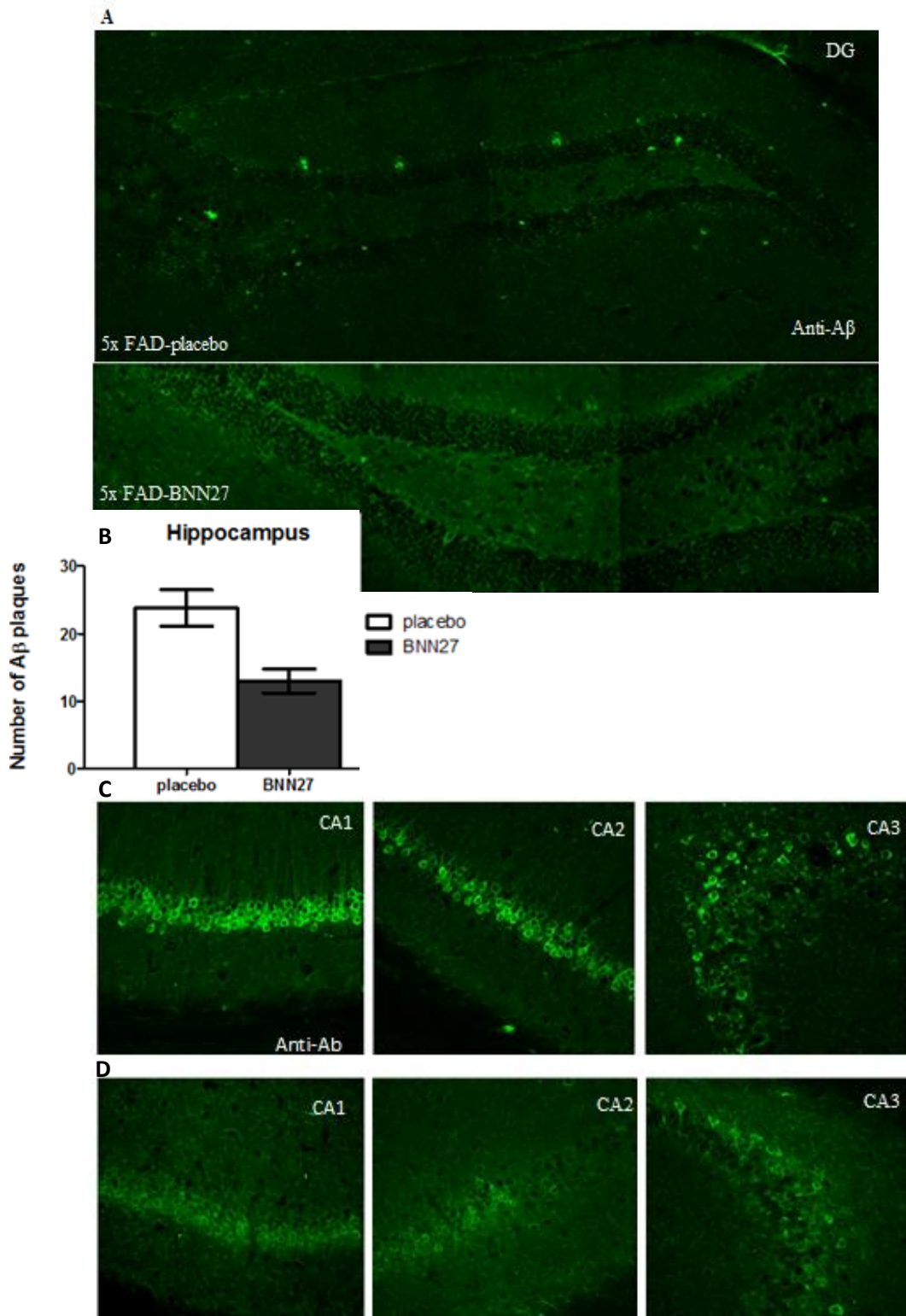
5xFAD ζώων έχει σημαντικά αρνητική επίδραση ($p= 0.0151$) στην μορφολογία του αξονικού κυτταροσκελετού.



Εικόνα 4. Επίδραση του αναλόγου νευροστεροειδούς BNN27 στο πρότυπο της NeuF πρωτεΐνης της περιοχής EC, σε WT και 5xFAD ζώα. A-D. Διακρίνεται το πρότυπο της NeuF αξόνων νευρικών κυττάρων στα WT-placebo, WT-BNN, APP-placebo, APP-BNN ζώα, αντίστοιχα **E.** Ανάλυση της (%) περιοχής χρώσης της NeuF δεν έδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p>0.05$) στην επίδραση του BNN27 στα 5xFAD ζώα. Αντίθετα, ο γονότυπος φαίνεται να επιδρά σημαντικά ($p<0.05$) στη μορφολογία των αξόνων. WT-placebo: $n=3$, WT-BNN27: $n=3$, 5xFAD-placebo: $n=3$, 5xFAD-BNN27: $n=3$. Τα γραφήματα δείχνουν $\text{mean} \pm \text{SEM}$

4.3 Το BNN27 ανάλογο δρα αποτελεσματικά σε εγκεφάλους 5xFAD ποντικών μειώνοντας αισθητά τον αριθμό των αμυλοειδικών πλακών από το DG, αλλά και το ενδοκυτταρικό Αβ πεπτιδίο από τις CA1-CA3 περιοχές.

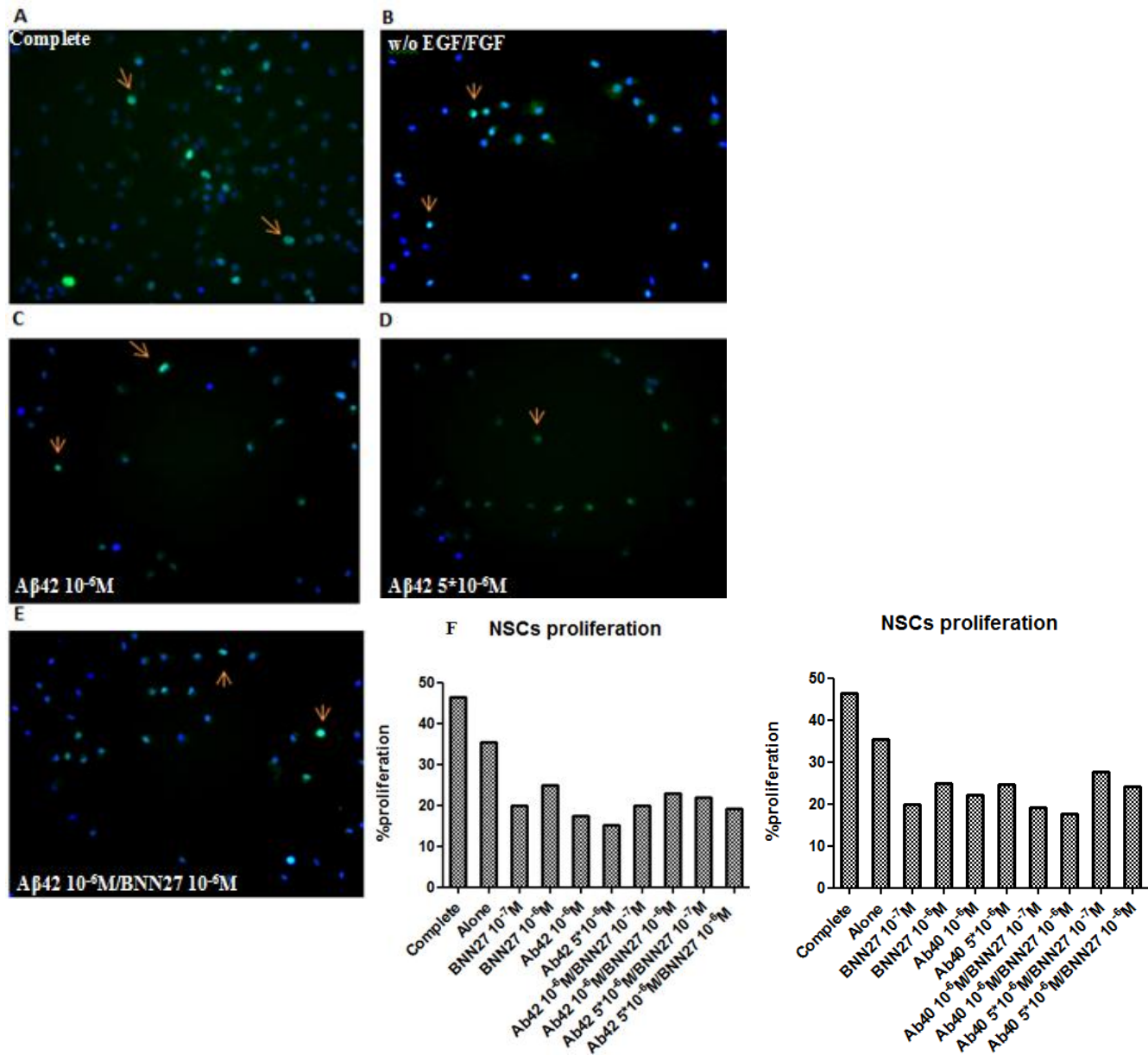
Με δεδομένο πως το κύριο νευροπαθολογικό γνώρισμα στο AD είναι ο σχηματισμός αμυλοειδικών πλακών εξωκυτταρικά, εξετάσαμε τομές από την περιοχή του ιπποκάμπου, ο οποίος πρώτος πλήττεται στο AD. Συγκεκριμένα εξετάσαμε την περιοχή DG ως προς το σχηματισμό αμυλοειδικών πλακών και τις CA1-CA3 ως προς την ενδοκυττάρια συσσώρευση Αβ πεπτιδίου, κάνοντας χρώση με αντίσωμα ειδικό για το Αβ πεπτιδίο, που εντοπίζει τόσο πλάκες, όσο και ενδοκυττάρια Αβ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (εικόνα 5) στο η παρουσία BNN27 στα 5xFAD-BNN27 ζώα μειώνει αισθητά ($p=0.0069$) τον αριθμό των αμυλοειδικών πλακών που παρατηρούνται στις τομές εγκεφάλου των 5xFAD-placebo ζώων. Όσον αφορά στις CA1-CA3 περιοχές, η παρουσία BNN27 ομοίως φαίνεται να έχει θετική επίδραση στο φαινότυπο των εγκεφάλων 5xFAD ζώων, καθώς όπως διακρίνεται στις εικόνες, το ενδοκυτταρικό Αβ παρουσιάζει ένα πιο αδρό πρότυπο στα 5xFAD-BNN27 σε σχέση με τα 5xFAD-placebo ζώα.



Εικόνα 5. Συσσωρευτικό πρότυπο Αβ πεπτιδίου σε τομές υποκάμπου 5xFAD-placebo (A,C) και 5xFAD-BNN27 (B,D) ποντικών. **A.** Στην περιοχή DG, στα 5xFAD-placebo ζώα διακρίνονται με πράσινο χρώμα πλάκες αμυλοειδούς γύρω από την κοκκιώδη ζώνη (GZ), μέσα σε αυτήν, καθώς και στην περιοχή εσωτερικά της υλοκοκκιώδους ζώνης (SGZ). Αντίθετα, στα 5xFAD-BNN27 ζώα δεν παρατηρούνται εμφανείς σχηματισμοί αμυλοειδικών πλακών Η χρώση έγινε με antiAβ αντίσωμα, ειδικό τόσο για διαλυτό Αβ πεπτίδιο, όσο και για αμυλοειδικές πλάκες. Ομοίως και στις παρακάτω εικόνες. **B.** Ιστόγραμμα που απεικονίζει την επίδραση του BNN27 στον συνολικό αριθμό πλακών από τομές εγκεφάλου 5xFAD ζώων. **C,D.** Περιοχές CA1, CA2, CA3, όπου παρατηρείται ενδοκυττάρια συσσώρευση Αβ πεπτιδίου γύρω από τον πυρήνα που ελεγκτείται και στους άξονες στα 5xFAD-placebo και 5xFAD-BNN27 ζώα αντίστοιχα.

4.4 Το BNN27 ανάλογο φαίνεται να αναστρέφει τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα που έχουν τα ολιγομερή των πεπτιδίων Αβ40 και Αβ42 στη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυττάρων ιπποκάμπου.

Στο AD - όπως και κατά τη φυσιολογική γήρανση - τα νευρικά βλαστικά κύτταρα χάνουν το δυναμικό αναγέννησης που φυσιολογικά παρουσιάζουν. Με δεδομένο αυτό, καθώς και την υπέρμετρη συσσώρευση Αβ πεπτιδίων σε εγκεφάλους ασθενών με AD, εξετάσαμε την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ολιγομερών Αβ40 και Αβ42 πεπτιδίων ($10^{-6}M$, $5*10^{-6}M$) στον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυττάρων ιπποκάμπου (p17.5), καθώς και την πιθανή επίδραση του BNN27 αναλόγου υπό αυτές τις συνθήκες. Τα αποτελέσματα (**εικόνα 6**) δείχνουν πως παρουσία ολιγομερούς Αβ42 πεπτιδίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μειώνεται τόσο η πυκνότητα των βλαστικών κυττάρων (**6C, D**) όσο και ο πολλαπλασιασμός τους (**6F**) σε σχέση με την καλλιέργεια- μάρτυρα (**6B**). Παρουσία BNN27 στις αντίστοιχες συνθήκες φαίνεται να υπάρχει μία βελτίωση τόσο ως προς την πυκνότητα (**6E**) - και άρα βιωσιμότητα - των κυττάρων όσο και ως προς τον πολλαπλασιασμό αυτών (**6F**). Ομοίως με το Αβ40 πεπτίδιο.



Εικόνα 6. Επίδραση με Αβ40/42 και BNN27 σε καλλιέργειες νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs) ιπποκάμπου. A-E. Για τις αναγραφόμενες συνθήκες, διακρίνεται με μπλε (DAPI) χρώση ο συνολικός αριθμός κυττάρων, ενώ τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα διακρίνονται με πράσινο χρώμα. Η χρώση έγινε με αντίσωμα Ki67, ειδικό για μία πυρηνική πρωτεΐνη που βρρίσκειται στη φάση της μεσόφασης στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Για κάθε συνθήκη μετρήθηκαν κύτταρα από 8 οπτικά πεδία ανά πηγάδι. **F.** Ιστόγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό πολλαπλασιασμού των νευρικών βλαστικών κυττάρων υπό τις αναγραφόμενες συνθήκες. Τα αποτελέσματα προέρχονται από το μέσο όρο 3 πειραμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, αποδεικνύεται πώς: ο γονότυπος των 5xFAD ποντικών δεν έχει κάποια επίπτωση στο πρότυπο του αξονικού κυτταροσκελετού στο DG του ιπποκάμπειου σχηματισμού, σε αντίθεση με το EC όπου φαίνεται να υπάρχει σαφής αποδιοργάνωση. Επίσης ο γονότυπος των 5xFAD ποντικών δεν φαίνεται να έχει κάποια επίπτωση στο πρότυπο της μυελίνης τόσο στο DG όσο και στο EC. Ακόμη, in vivo χορήγηση του αναλόγου νευροστεροειδούς της DHEA, BNN27, σε 5xFAD ποντίκια δεν έχει επίδραση στο πρότυπο της μυελίνωσης και του αξονικού κυτταροσκελετού στις περιοχές DG και EC του ιπποκάμπειου σχηματισμού, ενώ παρουσιάζει ισχυρή θετική επίδραση εμποδίζοντας ή/και μειώνοντας το σχηματισμό αμυλοειδικών πλακών στο DG και την ενδοκυττάρια συσσώρευση του Αβ40-42 στις CA1-CA3 περιοχές. Αντίστοιχα, από την in vitro προσθήκη BNN27 σε καλλιέργειες νευρικών βλαστικών κυττάρων ιπποκάμπου (hipNSCs), υπό και χωρίς την παρουσία κυτταροτοξικών ολιγομερών Αβ40-42, αποδεικνύεται πως το ανάλογο αναστρέφει ή/και εμποδίζει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις που έχουν τα ολιγομερή Αβ πεπτίδια στον πολλαπλασιασμό των hipNSCs.

5.1 Ο γονότυπος των 5xFAD ποντικών δεν έχει κάποια επίπτωση στο πρότυπο του αξονικού κυτταροσκελετού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ο γονότυπος των 5xFAD ποντικών φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην περιοχή EC του ιπποκάμπειου σχηματισμού, όπου η % περιοχή κάλυψης με τη NeuF πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων είναι σημαντικά μειωμένη ($p=0.0151$) στα 5xFAD σε σχέση με τα WT συνομήλικα, ενώ δεν φαίνεται να έχει κάποια επίπτωση στο πρότυπο του αξονικού κυτταροσκελετού στην περιοχή DG ($p>0.05$). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με στοιχεία που δείχνουν πως στο AD παρατηρείται καθολικός και σαφής αξονικός εκφυλισμός (Jack T. Wang et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, στο AD παρατηρούνται σημαντικές αλλοιώσεις στον κυτταροσκελετό των αξόνων, οι οποίες γίνονται ορατές σαν «αξονικές διογκώσεις» (De Vos et al., 2008), κατάσταση που καλείται αξονοπάθεια. Στα αρχικά στάδια του AD οι αλλοιώσεις παρατηρούνται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος (Probst et al., 1983), ο φλοιός καθώς και υποφλοιϊκές περιοχές, όπως η μέλαινα ουσία (McNeil et al., 1984), υποδηλώνοντας πως βλάβες στην αξονική μεταφορά παίζουν ρόλο στην παθολογία της νόσου. Επίσης MRI μελέτες έχουν δείξει πως η αξονική μεταφορά αλλοιώνεται και σε μοντέλα τρωκτικών με AD (Smith et al., 2007), όπως άλλωστε είναι και τα 5xFAD.

Η απουσία αλλοιώσεων των αξόνων που παρατηρείται στο DG δεν μπορεί να οφείλεται στο νεαρό της ηλικίας των ποντικών (3.5 μηνών), καθώς στην ηλικία αυτή τα 5xFAD έχουν ήδη εκδηλώσει στοιχεία αξονοπάθειας (όπως άλλωστε είναι φανερό στο EC). Το αποτέλεσμα ίσως να οφείλεται στο σχετικά μικρό αριθμό ζώων 5xFAD που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη ανάλυση (n=7). Ένας μεγαλύτερος αριθμός ζώων ίσως να έδινε μία πιο ξεκάθαρη εικόνα.

5.2 Το BNN27 ανάλογο δεν έχει καμία θετική επίδραση στους άξονες 5xFAD ζώων.

Όπως προκύπτει από την παρούσα εργασία, το BNN27 δεν φαίνεται να έχει κάποια θετική επίδραση στο πρότυπο του αξονικού κυτταροσκελετού τόσο στο DG, όσο και στο EC ($p>0.05$) στα 5xFAD-BNN27 σε σχέση με τα 5xFAD-placebo συνομήλικα ζώα.

Γενικά είναι γνωστό πως η DHEA σε nanoMolar συγκεντρώσεις προωθεί την αύξηση των αξόνων (Compagnone et al., 1998) και επομένως την επέκταση του κυτταροσκελετού. Επίσης, στο παρελθόν έρευνες έχουν δείξει πως νευροστεροειδή αλληλεπιδρούν με τη σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη MAP2 και με τον τρόπο αυτό προωθούν τον πολυμερισμό της τουμποουλίνης σε καλλιέργειες νευρώνων (Rammouz et al., 2011). Συγκεκριμένα η DHEA έχει δείχθει ότι συνδέεται με την MAP2 μέσω του αμινοτελικού άκρου της τελευταίας και προωθεί την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι εκτός από την αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών με τους υποδοχείς τους, άμεση αλληλεπίδραση των πρώτων με τον κυτταροσκελετό μπορεί να συμμετέχει στην πλαστικότητα του εγκεφάλου (Murakami et al., 2000). Το γεγονός ότι το ανάλογο της DHEA, BNN27, δεν επιδρά στο πρότυπο του αξονικού κυτταροσκελετού στα 5xFAD-BNN27 ζώα σε σχέση με τα 5xFAD-placebo συνομήλικα ζώα, μπορεί να οφείλεται είτε στην αδυναμία σύνδεσης του BNN27 στις MAP2 ισομορφές, είτε στο γεγονός ότι η χορήγηση του αναλόγου είναι εξωγενής με αποτέλεσμα το BNN27 να μην μπορεί να εισαχθεί μέσα στα κύτταρα για να συνδεθεί με τις MAP2 ισομορφές. Παρ' όλα αυτά, για πιο σαφή και αξιόπιστα αποτελέσματα απαιτείται η επανάληψη του πειράματος με μεγαλύτερο αριθμό ζώων, καθώς στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα με 3 μόνο 5xFAD-placebo ζώα.

5.3 Ο γονότυπος των 5xFAD ποντικών δεν έχει κάποια επίπτωση στο πρότυπο της μυελίνωσης των αξόνων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις στο πρότυπο της μυελίνωσης των αξόνων ($p > 0.05$) τόσο στο DG, όσο και στο EC, στα 5xFAD σε σχέση με τα WT ζώα. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με στοιχεία από διάφορες μελέτες που δείχνουν πως στο AD υπάρχει ορατή απώλεια ελύτρων μυελίνης (Stanislaw Mitew et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, είναι γνωστό πως στο AD παρατηρείται απομυελίνωση κατά κύριο λόγο σε άξονες που βρίσκονται κοντά σε αμυλοεδικές πλάκες, ενώ η απώλεια μυελίνης είναι εντονότερη στον πυρήνα των πλακών απ' ό,τι στην περιφέρεια (Stanislaw Mitew et al., 2010). Την ίδια στιγμή, σημαντικό ρόλο παίζει και η διαμόρφωση και πυκνότητα των Αβ πεπτιδίων, που ποικίλει από διάχυτες άμορφες συσσωρεύσεις Αβ, έως πυκνούς πυρήνες Αβ πεπτιδίου και ινώδη συσσωματώματα (Dickson Tc, 2001). Οι τελευταίες δύο διαμορφώσεις είναι αυτές που σχετίζονται στενά με την απομυελίνωση. Το γεγονός αυτό ίσως αποτελεί μία εξήγηση για τη απουσία αποδιοργάνωσης της μυελίνης. Με άλλα λόγια, με δεδομένο ότι στα 5xFAD ζώα, οι πλάκες αρχίζουν να γίνονται εμφανείς μετά τους 2 μήνες, ίσως στη ηλικία των τομών που εξετάστηκαν (3.5 μήνες) δεν έχουν σχηματισθεί ακόμα τόσο πυκνοί πυρήνες Αβ που απαιτούνται ώστε να προκληθεί απομυελίνωση. Σύμφωνα με το συμπέρασμα αυτό είναι παρόμοιες μελέτες σε APP^{SL}PS1^{M146L} ποντίκια 5-6 μηνών, οι οποίες έδειξαν σαφή πρότυπα απομυελίνωσης, εξαρτημένα από την ηλικία (Sarah L.Cole and Robert Vassar).

Σε αντίθεση, μελέτες του Desai και των συνεργατών (Desai MK. et al., 2009) σε τριπλά διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι τα επίπεδα των - σχετιζόμενων με μυελίνη - πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένης της MBP) παρουσιάζουν σημαντική μείωση σε σχέση με τα WT ζώα, ακόμα και πριν την ορατή εμφάνιση της παθολογία του Αβ πεπτιδίου. Σύμφωνα με το δεδομένο αυτό, ίσως μία πιο ξεκάθαρη εικόνα δινόταν από τη μελέτη άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μυελίνη και είναι γνωστό p_{mw} βλάπτονται στο AD όπως η myelin associated glycoprotein, MAG ή η myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG.

5.4 Το BNN27 ανάλογο δεν έχει καμία θετική επίδραση στο πρότυπο της μυελίνωσης των 5xFAD ζώων.

Όσον αφορά στην παρουσία του BNN27 στα 5xFAD ζώα, αυτό δεν δείχνει να έχει κάποια εμφανή θετική επίδραση στο πρότυπο της μυελίνωσης στο DG ($p > 0.05$). Στην περιοχή του EC, επίσης δεν παρατηρείται εμφανής αλλαγή, όμως στην περίπτωση αυτή, το BNN27 θα μπορούσε να έχει κάποια πιθανή τάση ενισχυτικής δράσης ($p \sim 0.05$) στο πρότυπο της MBP.

5.5 Η παρουσία του BNN27 μειώνει τον αριθμό των αμυλοειδικών πλακών και τις ενδοκυττάρια συσσωρεύσεις Αβ πεπτιδίου σε εγκεφάλους 5xFAD ζώων.

Αποτελέσματα από την εισαγωγή του BNN27 αναλόγου σε ζώα 1.5 μήνα, δείχνουν πως σε ηλικία 3.5 μηνών ο αριθμός των πλακών είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τα 5xFAD-placebo ζώα. Επίσης, το BNN27 φαίνεται να μειώνει την ενδοκυττάρια συσσώρευση Αβ πεπτιδίων στους πυραμιδικούς νευρώνες των CA1-CA3 περιοχών στα 5xFAD-BNN27 ζώα, ενώ στα FAD-placebo ζώα στους 3.5 μήνες, η συσσώρευση είναι ιδιαίτερα έντονη.

Σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς η εναπόθεση Αβ πεπτιδίου σε αμυλοειδικές πλάκες είναι η βασική αιτία παθογένεσης της νόσου. Στα 5xFAD ποντίκια οι πλάκες αρχίζουν να γίνονται ορατές μετά τους 2 μήνες ζωής (Oakley et al., 2006), ενώ στους 6 μήνες έχουν καθολική παρουσία σε περιοχές του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος και ο νεοφλοιός (Oakley et al., 2006). Δεδομένου ότι οι πελέτες εισήχθησαν στα ποντίκια στον 1.5 μήνα, το BNN27 φαίνεται να δρα περισσότερο εμποδίζοντας το σχηματισμό των πλακών, παρά απομακρύνοντας τις. Έτσι στα 5xFAD-placebo ζώα, ο σχηματισμός των αμυλοειδικών πλακών ξεκινώντας από τους 2 μήνες εξελίχθηκε έως τους 3,5 μήνες, ενώ στα 5xFAD-BNN27 ζώα, η παρουσία του αναλόγου παρεμπόδισε την εκτεταμένη εναπόθεση Αβ πεπτιδίου προς σχηματισμό πλακών. Ο τρόπος με τον οποίο το BNN27 δρα προς αυτήν την κατεύθυνση μένει να διευκρινιστεί. Σύμφωνα με την παραπάνω υπόθεση, το Αβ εκκρίνεται από τα κύτταρα από τα οποία παράγεται και ως υδρόφοβο μόριο ολιγομερίζεται σχηματίζοντας τις αμυλοειδικές αποθέσεις. Με βάση τη θεωρία αυτή και δεδομένου ότι στα 5xFAD υπάρχει υπερπαραγωγή του Αβ, το BNN27 θα μπορούσε να δρα συνδεδεμένο με τον TrkA (Lazaridis et al., 2011, I. Padiaditakis et al., 2014) και να ενεργοποιεί μονοπάτια τα οποία αλληλεπιδρούν με το αμυλοειδογενές μονοπάτι προς την κατεύθυνση μείωσης της παραγωγής και έκκρισης του Αβ πεπτιδίου και που τελικά οδηγούν σε μειωμένο σχηματισμό πλακών.

Με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, θα μπορούσε να δρα το BNN27 και στα πυραμιδικά κύτταρα των CA1-CA3 περιοχών, μειώνοντας την παραγωγή του Αβ. Ακόμα θα μπορούσε μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών να επάγει την ενεργοποίηση κατάλληλων μορίων υπεύθυνων για την εκκαθάριση των ενδοκυτταρικών Αβ πεπτιδίων, οι οποίες όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι ήδη ορατές από τον 1.5 μήνα.

5.6 Το BNN27 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των hipNSCs παρουσία των κυτταροτοξικών Αβ40-42 πεπτιδίων.

Η παρουσία Αβ40 και Αβ42 σε συγκέντρωσεις 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-6}$ M αποδεικνύεται κυτταροτοξική, καθώς μειώνεται τόσο ο αριθμός των HNSCs στην καλλιέργεια όσο και το ποσοστό πολλαπλασιασμού αυτών. Με προσθήκη BNN27 (10^{-6} M και 10^{-7} M) στις καλλιέργειες, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού πολλαπλασιασμού των hipNSCs. Επομένως το BNN27 φαίνεται να εμποδίζει ή/και αναστρέφει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις των ολιγομερών Αβ40 και Αβ42 πεπτιδίων στα NSCs. Παρ'όλα αυτά, δεν φαίνεται να έχει καποια ενισχυτική δράση σε καλλιέργειες hipNSCs απουσία των αυξητικών παραγόντων EGF/FGF.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με στοιχεία που αποδεικνύουν πως τα Αβ40 και Αβ42 πεπτιδία είναι κυτταροτοξικά (Alberto Serrano, 2011), ενώ αξίζει να σημειωθεί πως η συγκέντρωση των Αβ πεπτιδίων που συναντάται στον εγκέφαλο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με AD είναι της τάξης nanoMolar (Dennis J. Selkoe, 2015). Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, μία πιθανή αιτία για τον αυξημένο κυτταρικό θάνατο στο AD θεωρείται η αλληλεπίδραση του Αβ πεπτιδίου με τα αυξημένα επίπεδα του p75^{NTR} υποδοχέα (Yaar M, et al., 1997). Για το λόγο αυτό, παρουσία των κυτταροτοξικών ολιγομερών Αβ40 και Αβ42 πεπτιδίων μειώνεται η βιωσιμότητα των hipNSCs, ενώ με την προσθήκη BNN27 στις καλλιέργειες αυτό συνδέεται στον περιορισμένο αριθμό μορίων TrkA και ανταγωνιζόμενο το σύμπλοκο Αβ/ p75^{NTR} προωθώντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Το BNN27 ως τροποποιημένο ανάλογο του νευροστεροειδούς της DHEA, συνδέεται στους υποδοχείς νευροτροφινών TrkA (I. Padiaditakis et al., 2014) και p75^{NTR} ασκώντας τις νευροπροστατευτικές του δράσεις. Συνδεδεμένο στον TrkA, ελέγχει την έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, ενώ μέσω σύνδεσης στον p75^{NTR} προωθεί την απόπτωση. Το τελικό αποτέλεσμα, εξαρτάται από την αναλογία αλληλεπιδράσεων του αναλόγου της DHEA με τον TrkA και p75^{NTR} (I. Lazaridis et al., 2011). Στο AD μειώνεται τόσο το ποσό της κυκλοφορούσας DHEA, όσο και τα επίπεδα του TrkA υποδοχέα. Έτσι εξηγείται ο αυξημένος νευρωνικός εκφυλισμός που παρατηρείται. Παρουσία BNN27 στα 5xFAD ζώα, αυξάνεται ο αριθμός των διαθέσιμων «μορίων νευροστεροειδούς» - ακριβέστερα αναλόγων νευροστεροειδούς - και έτσι περισσότερα μόρια αυτών ανταγωνίζονται για λίγες θέσεις TrkA, με αποτέλεσμα μέσω ενεργοποίησης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, να προωθούνται τόσο η επιβίωση όσο και ο πολλαπλασιασμός των βλαστικών κυττάρων.

Συνοψίζοντας:

Σε 5xFAD ζώα 3.5 μηνών παρατηρείται έντονη αλλοίωση του αξονικού κυτταροσκελετού στο EC, όχι όμως στο DG του ιπποκάμπου, ενώ η κατανομή της MBP της μυελίνης δεν φαίνεται να παρουσιάζει αλλοιώσεις σε καμία από τις δύο περιοχές. Επίσης, το BNN27 ανάλογο δεν φαίνεται να έχει κάποια ενισχυτική επίδραση στα πρότυπα μυελίνωσης και αξονικού κυτταροσκελετού σε 5xFAD ζώα 3.5 μηνών, στα οποία είχε γίνει χορήγηση BNN27 για 2 μήνες. Αντίθετα, το BNN27 δείχνει να εμποδίζει το σχηματισμό αμυλοειδικών πλακών στο DG και να μειώνει την ενδοκυττάρια συσσώρευση Αβ πεπτιδίου στις CA1-CA3 περιοχές. Σε καλλιέργειες HNSCs, προσθήκη BNN27 παρουσία κυτταροτοξικών ολιγομερών πεπτιδίων Αβ40 και Αβ42, δείχνει να αναστρέφει ή/και εμποδίζει τις τοξικές επιδράσεις των πεπτιδίων και να έχει θετική επίδραση τόσο στη βιωσιμότητα όσο και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενισχύοντάς τον. Για πιο διευκρινιστικά και αξιόπιστα αποτελέσματα απαιτείται τόσο η επανάληψη των ανωτέρω πειραμάτων in vivo με τη χρήση μεγαλύτερων ομάδων ζώων, καθώς και η πραγματοποίηση νέων πειραμάτων in vitro στα HNSCs τα οποία να προτείνουν πιθανά μόρια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση κάτωθεν του TrkA.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η DHEA είναι από τα πιο ισχυρά ενεργά νευροστεροειδή ενώ μείωσή της στην κυκλοφορία έχει σχετιστεί με νευρωνική δυσλειτουργία και νευροεκφυλισμό (Baulieu, E. I and Robel P, 1998). Για το λόγο αυτό η ανάπτυξη αναλόγων της DHEA, όπως το BNN27, που διατηρούν τη νευροπροστατευτική τους δράση, ενώ ταυτόχρονα δεν αποτελούν πρόδρομα μόρια ορμονών, είναι πολλά υποσχόμενη για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων νευροεκφυλιστικών νόσων. Γενικά, θεωρείται πως θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν ταυτόχρονα πολλούς – σχετιζόμενους με το AD – νευροεκφυλιστικούς μηχανισμούς, μπορούν να έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τις μέχρι σήμερα, πιο στοχευμένες, προσεγγίσεις.

REFERENCES

1. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) **Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease.** *Science* 245:417–420
2. John A. Hardy and Gerald A. Higgins (1992) **Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis.** *Science* 10;256(5054):184-5
3. Alberto Serrano-Pozo, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah and Bradley T. Hyman (2011) **Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011;1:a006189
4. Crews L, Masliah E. (2010) **Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease.** *Hum Mol Genet* 19: R12–R20
5. Stanislaw Mitew, James C. Vickers, Matthew T.K. Kirkcaldie, Tracey C. Dickson, Glenda M. Halliday, Claire E. Shepherd (2010). **Focal demyelination in Alzheimer's disease and transgenic mouse models.** *Acta Neuropathologica* 119(5):567–77
6. Selkoe DJ (2001) **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.** *Physiol Rev* 81:741–766.
7. Kirkitadze MD, Bitan G, Teplow DB (2002) **Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies.** *J Neurosci Res* 69:567–577
8. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) **Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.** *Ann Neurol* 46:860 –866
9. Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B. and Selkoe, D.J.(2000) **The oligomerization of amyloid β -protein begins intracellularly in cells derived from human brain.** *Biochemistry* 39, 10831–10839
10. Lacor, P.N., Buniel, M.C., Chang, L., Fernandez, S.J., Gong, Y., Viola, K.L., Lambert, M.P., Velasco, P.T., Bigio, E.H., Finch, C.E. et al. (2004) **Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid β oligomers.** *J. Neurosci.* 24, 10191–10200
11. Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A. and Klein, W.L. (2003) **Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10417–10422
12. Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L. et al. (1998) **Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β are potent central nervous system neurotoxins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6448–6453
13. Orly Lazarov, Mark P. Mattson, Daniel A. Peterson, Sanjay W. Pimplikar and Henriette van Praag (2010). **When neurogenesis encounters aging and disease.** *Trends in Neurosciences* 0166-2236
14. Kempermann, G. and Gage, F.H. (2002) **Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task.** *Eur J. Neurosci.* 16,129–136
15. Jeremy R. Gray, Todd S. Braver, and Marcus E. Raichle (2002) **Integration of emotion and cognition in the lateral prefrontal cortex.**
16. Shors, T.J. et al. (2002) **Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning.** *Hippocampus* 12, 578–584
17. Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. (2008). **What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us?.** *Neural Plasticity*, 2008, 381243

18. Witter, M.P., Groenewegen, H.J., Lopes da Silva, F.H., & Lohman, A. H. (1989). **Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region.** *Progress in Neurobiology*, 33, 161–253
19. Buzsáki, G. (1989). **Two-stage model of memory trace formation: A role for “noisy” brain states.** *Neuroscience*, 31, 551–570
20. Pennanen, C., Kivipelto, M., Tuomainen, S., Hartikainen, P., Hanninen, T., Laakso, M. P., ... Soininen, H. (2004). **Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early ad.** *Neurobiology of Aging*, 25, 303–310
21. Helen E. Scharfman & Moses V. Chao (2013) **The entorhinal cortex and neurotrophin signaling in Alzheimer’s disease and other disorders.** *Cognitive neuroscience* 3–4, 123–135
22. Chao, M. V. (2003). **Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signaling pathways.** *Nature reviews. Neuroscience*, 4, 299–309
23. Tuszynski, M. H., U, H. S., Amaral, D. G., & Gage, F. H. (1990). **Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration.** *Journal of Neuroscience*, 10, 3604–3614.
24. Tuszynski, M. H. (2007). **Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease.** *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 21, 179–189
25. Conner, J. M., Franks, K. M., Titterness, A. K., Russell, K., Merrill, D. A., Christie, B. R., Tuszynski, M. H. (2009). **NGF is essential for hippocampal plasticity and learning.** *Journal of Neuroscience*, 29, 10883–10889.
26. Vondran, M. W., Clinton-Luke, P., Honeywell, J. Z., & Dreyfus, C. (2010). **BDNF^{+/−} mice exhibit deficits in oligodendrocyte lineage cells of the basal forebrain.** *Glia*, 58, 848–856
27. Compagnone, N.A. and Mellon, S.H. (1998) **Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4678–4683
28. Brinton, R.D. (1994) **The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alphapregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons.** *J. Neurosci.* 14, 2763–2774
29. Belanger, A., Candas, B., Dupont, A., Cusan, L., Diamond, P., Gomez, J.L., and Labrie, F. (1994) **Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79, 1086–1090.
30. Migeon, C.J., Keller, A.R., Lawrence, B., and Shepart, T. (1957) **Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human placenta. Effects of age and sex: day-to-day and diurnal variations.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 17, 1051–1062
31. Charalampopoulos, I., Margioris, A., and Gravanis, A. (2008) **Neurosteroid dehydroepiandrosterone exerts anti-apoptotic effects by membrane-mediated, integrated genomic and non-genomic pro-survival signaling pathways.** *J. Neurochem.*, 107, 1457–1469
32. Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, F., Franklin, R.J., Garcia-Segura, L.M., Lambert, J.J., Mayo, W., Melcangi, R.C., Parducz, A., Suter, U., Carelli, C., Baulieu, E.E., and Akwa, Y. (2003) **Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system.** *Prog. Neurobiol.*, 71, 3–29
33. Snider WD (1994). **Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us.** *Cell.* 77:627–638.
34. Ibanez CF. Jekyll-Hyde (2002) **Neurotrophins: The story of proNGF.** *Trends Neurosci.* 2002; 25:284–286.
35. Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. **VPS10P-domain receptors-Regulators of neuronal viability and function.** *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9:899–909.
36. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. **Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.** *Science.* 2001; 294:1945–1948.

37. Suter U, Heymach JV Jr, Shooter EM. **Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF.** EMBO J. 1991; 10:2395–2400.
38. Eric J. Huang and Louis F. Reichardt (2003) **Trk receptors: roles in neuronal signal transduction.** Annu. Rev. Biochem. 2003.72:609-642
39. Kaplan DR, Hempstead BL, MartinZanca D, Chao MV, Parada LF. 1991. Science 252:554 – 58
40. Schneider R, Schweiger M. 1991. Oncogene 6:1807–11
41. Pe´rez P, Coll PM, Hempstead BL, Marti´n-Zanca D, Chao MV. 1995. Mol. Cell. Neurosci. 6:97–105
42. Bibel M, Hoppe E, Barde YA. 1999. EMBO J. 18:616 –22
43. Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR. 1994. Neuron 12:691–705
44. Vaillant AR, Mazzoni I, Tudan C, Boudreau M, Kaplan DR, Miller FD. 1999. J. Cell Biol. 146:955–6
45. Yuan J, Yankner BA. 2000. Nature 407:802–9
46. Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia ZG. 2000. J. Neurosci. 20:2567–74
47. Hempstead BL (2002) **The many faces of p75NTR.** Curr Opin Neurobiol.12(3):260-7.
48. Friedman, W.J. et al. (1991) **Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization.** Brain Res. Dev. Brain Res. 63, 43–51
49. Wiese, S. et al. (1999) **The role of p75(NTR) in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons.** Eur. J.Neurosci. 11, 1668–1676
50. Khursigara, G. et al. (2001) **A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptorinteracting protein 2.** J. Neurosci. 21, 5854–5863
51. Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipud V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J. (2001). J. Biol. Chem. 276: 7709–12
52. Sarret, P. et al. (2003) **Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system.** J. Comp. Neurol. 461, 483–505
53. . Chao, M. V. (2003) **Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.** Nature Rev. Neurosci. 4, 299–309
54. Yan Z, Feng J.(2004) **Alzheimer’s disease: interactions between cholinergic functions and beta amyloid.** Curr Alzheimer Res ; 1: 241–248
55. Nikolaev A, McLaughlin T, O’Leary DD, Tessier-Lavigne M.(2009) **APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases.** Nature; 457: 981–989
56. von Bohlen und Halbach O, Zacher C, Gass P, Unsicker K (2006b) **Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice.** J Neurosci Res 83(4):525531.
57. Schliebs R, Arendt T (2011) **The cholinergic system in aging and neuronal degeneration.** Behav Brain Res 221(2):555–563.
58. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010) **Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years.** PLoS ONE 5(1):e8809.
59. Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE et al. (1997) **Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer’s disease.** J Clin Invest; 100: 2333–2340
60. Nikolaev A, McLaughlin T, O’Leary DD, Tessier-Lavigne M. (2009) **APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases.** Nature; 457: 981–989
61. Iversen, L.L., R.J. Mortishire-Smith, S.J. Pollack, and M.S. Shearman. (1995). **The toxicity in vitro of amyloid protein.** Biochem. J. 311:1–16

62. Klein, W.L., G.A. Krafft, and C.E. Finch. 2001. **Targeting 916 Neuronal Damage by A_β Is Mediated by p75 small A_β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?** Trends Neurosci. 24:219–224
63. Mina Yaar, Sen Zhai, Paul F. Pilch, Sinead M. Doyle, Patricia B. Eisenhauer (1997) **Binding of β-Amyloid to the p75 Neurotrophin Receptor Induces Apoptosis: A Possible Mechanism for Alzheimer's Disease.** The Journal of Clinical Investigation 2333–2340
64. Antonino Cattaneo & Pietro Calissano (2012) **Nerve Growth Factor and Alzheimer's Disease: New Facts for an Old Hypothesis.** Springer Science+Business Media
65. Iakovos Lazaridis, Ioannis Charalampopoulos, Vassilia-Ismini Alexaki, Nicolaos Avlonitis, Iosif Padiaditakis, Paschalis Efstathopoulos, Theodora Calogeropoulou, Elias Castanas, Achille Gravanis (2011) **Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors, Preventing Neuronal Apoptosis.**
66. Bergman, E., Fundin, B. T. and Ulfhake, B. (1999) **Effects of aging and axotomy on the expression of neurotrophin receptors in primary sensory neurons.** J. Comp. Neurol. 410, 368–38
67. Berardi N, Braschi C, Capsoni S, Cattaneo A, Maffei L (2007) **Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration.** J Alzheimers Dis 11:359–370
68. Longo FM, Massa SM (2005) **Neurotrophin receptor-based strategies for Alzheimer's disease.** Curr Alzheimer Res 2(2):167–169
69. Counts SE, Nadeem M, Wu J, Ginsberg SD, Saragovi HU, Mufson EJ (2004) **Reduction of cortical TrkA but not p75 (NTR) protein in early-stage Alzheimer's disease.** Ann Neurol 56:520–531
70. Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005) p75NTR—live or let die. Curr Opin Neurobiol 15:49–57
Theodora Calogeropoulou, Ioannis Charalampopoulos, Michael N. Alexis, Nicolaos Avlonitis, Maria Zervou, Varvara Vergou, Vassilios Minas, Xanthippi Alexi, Efrosini S. Katsanou, Athanasia Pantzou, Iakovos Lazaridis, and Achille Gravanis (2009) **Novel Dehydroepiandrosterone Derivatives with Antiapoptotic, Neuroprotective Activity**
71. Apfel SC (2002) **Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold?** Int Rev Neurobiol 50:393–413
72. Brinton, R. D.; Wang, J. M. **Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: Allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent.** Curr. Alzheimer Res. 2006, 3, 185–190
73. Schumacher, M.; Weill-Engerer, S.; Liere, P.; Robert, F.; Franklin, R. J.; Garcia-Segura, L. M.; Lambert, J. J.; Mayo, W.; Melcangi, R. C.; Parducz, A.; Suter, U.; Carelli, C.; Baulieu, E. E.; Akwa, Y. **Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system.** Prog. Neurobiol. 2003, 71,3–29
74. Baulieu, E. E.; Robel, P. **Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998, 95, 4089–409
75. Suzuki, M.; Wright, L. S.; Marwah, P.; Lardy, H. A.; Svendsen, C. N. **Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004, 101, 3202–3207
76. Charalampopoulos, I.; Dermitzaki, E.; Vardouli, L.; Tsatsanis, C.; Stourmaras, C.; Margioris, A. N.; Gravanis, A. (2005) **Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization.** Endocrinology, 146, 3309–3318
77. Esler WP, Wolfe MS (2001) **A portrait of Alzheimer secretases-new features and familiar faces.** Science 293:1449–1454.

78. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, GraffRadford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J (1997) **A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43).** HumMol Genet 6:2087–2089.
79. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM: **Alzheimer's disease: the challenge of the second century.** Sci Transl Med 2011, 3:77sr71.
80. Gouras GK, Tampellini D, Takahashi RH, Capetillo-Zarate E: **Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease.** Acta Neuropathol 2010, 119:523–541.
81. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConglue L, et al. (1995) **Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein.** Nature 373:523–527.
82. C. Sturchler-Pierrat, et al. (1997) **Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94, pp. 13287–1329
83. K. Hsiao, et al. (1996), **Correlative memory deficits: Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice** Science, 274 pp. 99–102
84. J.A. Hardy, G.A. Higgins (1992) **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis** Science, 256 (5054) pp. 184–185

