

2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ

UNIVERSITY
OF CRETE



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών
Σπουδών «Εγκέφαλος και
Νους»

«Μελέτη των σηματοδοτικών οδών συνθετικών μικρονευροτροφινών μέσω υποδοχέων νευροτροφινών σε νευρικά κύτταρα»

Μουράτ Βεζήρ

1040147

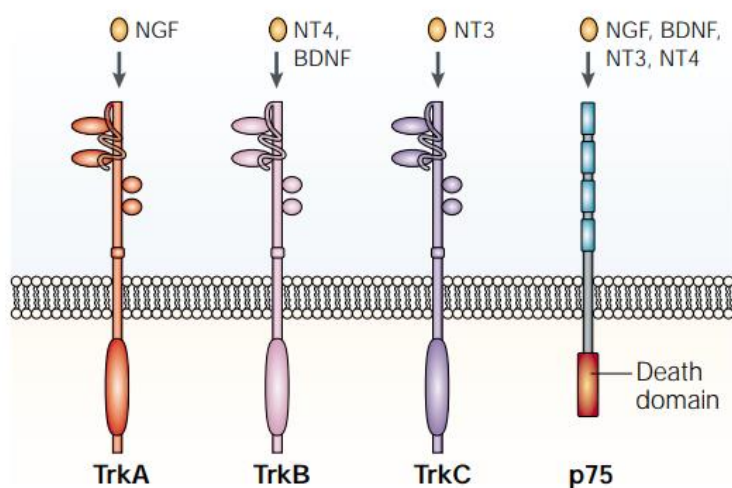
Επιβλέπων καθηγητής : Ιωάννης Χαραλαμπόπουλος

*Εργαστήριο Αναγεννητικής Φαρμακολογίας,
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης.*

1. Εισαγωγή.....	2
1.2 NGF.....	3
1.3 BDNF.....	4
1.4 p75NTR υποδοχείς.....	4
1.5 Υποδοχείς νευροτροφίνης και μονοπάτια σηματοδότησης.....	5
2. Διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA).....	6
2.1 Χημικά τροποποιημένα ανάλογα της Δεϋδροεπιανδροστερόνης.....	8
3. Υπόθεση.....	9
4. Υλικά και Μέθοδοι.....	11
5. Αποτελέσματα.....	14
5.1 Ενεργοποίηση TrkB.....	14
5.2 Ενεργοποίηση TrkA.....	19
5.3 Ανίχνευση της απόπτωσης με βάση την κυτταρομετρία.....	21
6. Συζήτηση.....	25
7. Βιβλιογραφία.....	27

Εισαγωγή

Η ανάπτυξη των περισσότερων τύπων νευρώνων γίνεται υπό τον έλεγχο μιας μικρής οικογένειας αυξητικών παραγόντων που ονομάζονται νευροτροφίνες. Οι πρώτοι νευροτροφικοί παράγοντες που ανακαλύφθηκαν είναι ο NGF (nerve growth factor) και ο BDNF (brain-derived neurotrophic factor), οι οποίοι εκκρίνονται από τον ιστό-στόχο και έχουν την ικανότητα να υποστηρίζουν την επιβίωση των νευρώνων και των νευρίτων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Barde, Edgar, and Thoenen 1982; Levi-Montalcini and Angeletti 1963). Οι νευροτροφίνες δρουν με δέσμευση τους σε δύο τύπους υποδοχέων, την οικογένεια Trk (Kaplan et al. 1991) και τον υποδοχέα νευροτροφινών p75 (p75^{NTR}) (M V Chao et al. 1986). Τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από νευροτροφίνες μέσω υποδοχέων Trk έχουν ως αποτέλεσμα πολλές νευρωνικές λειτουργίες και ενεργοποίηση διαφόρων οδών σηματοδότησης. Ο NGF συνδέεται με τον υποδοχέα TrkA, ο BDNF και NT-4 με τον TrkB και η νευροτροφίνη NT-3 αλληλεπιδρά κυρίως με TrkC υποδοχείς, ενώ όλα τα μέλη της οικογένειας νευροτροφινών δεσμεύονται με χαμηλότερη συγγένεια με το p75^{NTR} (Moses V Chao 2003). Οι νευροτροφίνες έχουν συσχετιστεί με λειτουργίες όπως η μνήμη, η μάθηση και συμπεριφορά, καθώς επίσης είναι απαραίτητες για την σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Επίσης η επίδραση τους έχει δειχθεί ότι εξαρτάται από την διαθεσιμότητα τους (Moses V Chao, Rajagopal, and Lee 2006). Ο NGF και ο BDNF προάγουν την ανάπτυξη των νευραξόνων και των δενδριτών και την αύξηση του σχηματισμού συνάψεων (Zagrebelsky and Korte 2014).



Οι νευροτροφίνες και η νευροτροφικοί υποδοχείς Trk καθώς και ο παν-νευροτροφικός υποδοχέας p75^{NTR} (Moses V Chao 2003).

Nerve growth factor (NGF)

Ο NGF συντίθεται ως πρόδρομη ένωση, proNGF, η οποία διασπάται και παράγεται η ώριμη μορφή, η οποία ομοδιμερίζεται με ομοιοπολικό δεσμό και το μοριακό του βάρος είναι περίπου 26 kDa. Έχει ένα χαρακτηριστικό σχηματισμό βρόχου με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Στον εγκέφαλο, ο NGF παράγεται στον φλοιό και στον ιππόκαμπο, οι στόχοι των νευρώνων του είναι οι χολινεργικοί προμετωπιαίοι νευρώνες (ChBF) και ορισμένοι νευρώνες του ραβδωτού και του ιπποκάμπου (Crowley et al. 1994). Μετά την έκκριση του, ο NGF συλλαμβάνεται μέσω των αλληλεπιδράσεων του στους υποδοχείς στις νευρωνικές απολήξεις, όπου δρα τοπικά και ρυθμίζει την ένταση στόχευσης και τη λειτουργία των νευρωνικών απολήξεων (Zhang, Huang, and McNaughton 2005). Η έκφραση του είναι επίσης σημαντική μετά από τραυματισμό ή μετά από εκτομή των περιφερικών νευρώνων, όπου τα μακροφάγα διεισδύουν στο νεύρο ως μέρος μιας φλεγμονώδους αντίδρασης. Αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες που επάγουν τη σύνθεση του NGF και στα κύτταρα Schwann και στους ινοβλάστες (Heumann et al. 1987). Όπως αναφέραμε και παραπάνω, η δράση του NGF επιτελείται έπειτα από σύνδεση με δυο βασικούς τύπους υποδοχέων, τον TrkA και τον p75^{NTR}. Η πρόσδεση του NGF στο διμερές του υποδοχέα TrkA πυροδοτεί την αυτοφωσφορυλίωση τριών καταλοίπων τυροσίνης (Y490, Y785, Y674, Y675) που βρίσκονται στην ενδοκυττάρια περιοχή ενεργοποίησης του υποδοχέα. Η σύνδεση συνεπάγεται την αυτοφωσφορυλίωσή του, την ενεργοποίηση του AKT, PI3K, NFκB αφενός και των src, ras, raf, MAPK κινάσων. Ειδικότερα, η σύνδεση στον υποδοχέα TrkA ενεργοποιεί τις MAPK κινάσες, που προστατεύουν τον νευρώνα από την απόπτωση, ενώ η σύνδεση στον υποδοχέα p75^{NTR} διεγείρει τους παράγοντες TRAF6, NRIF, TNF, NFκB (Reichardt 2006). Αν και τόσο ο NGF όσο και ο proNGF είναι σε θέση να δεσμεύτουν και να ενεργοποιήσουν τους TrkA και p75^{NTR}, το κάνουν με διαφορετικό βαθμό συγγένειας. Ο TrkA έχει υψηλότερη συγγένεια για τον ώριμο NGF από ό,τι για το proNGF. Το σύμπλοκο υποδοχέων p75^{NTR} /σορτιλίνη, από την άλλη πλευρά, έχει υψηλότερη συγγένεια για τον proNGF από ό,τι για τον ώριμο NGF (Clewes et al. 2008). Απουσία ενεργοποίησης του TrkA, ο p75^{NTR} επάγει απόπτωση μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της p53, του ceramide και της κινάσης c-Jun (Roux and Barker 2002).

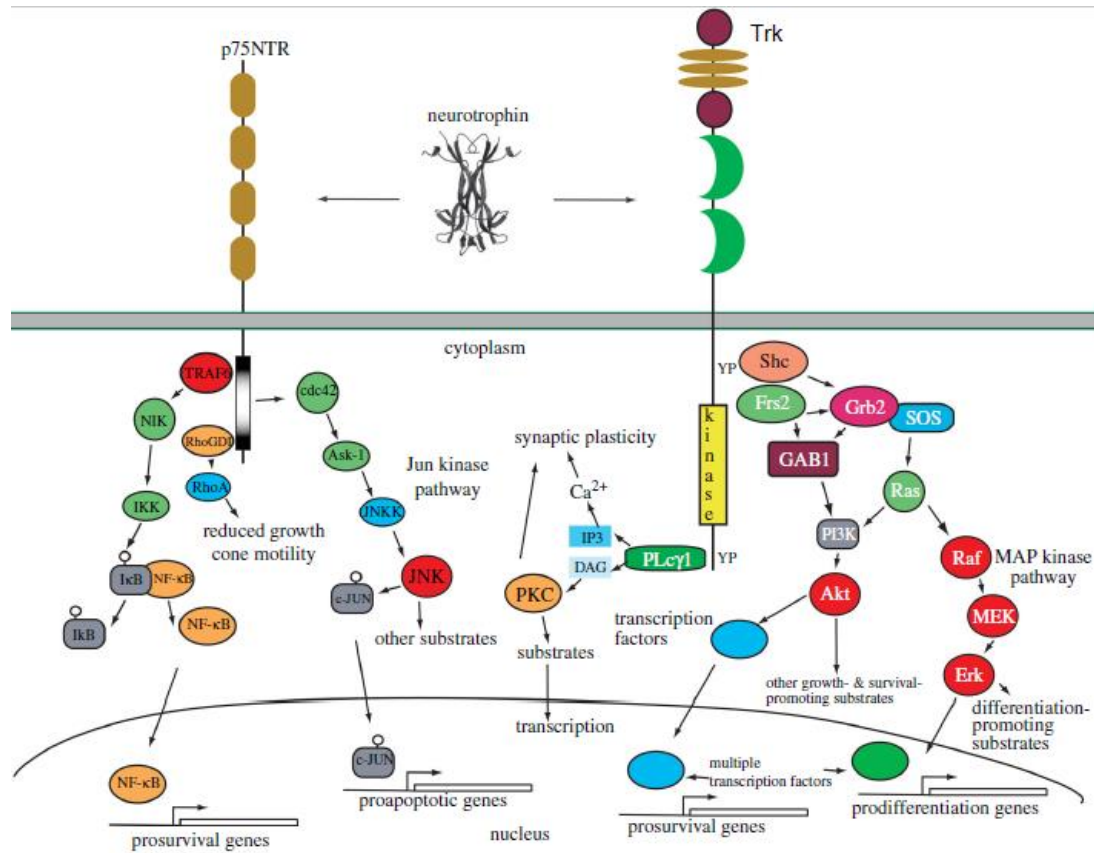
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Ο BDNF υποστηρίζει την επιβίωση και τη διατήρηση των αισθητήριων νευρώνων, των γαγγλίων του αμφιβληστροειδούς των κινητήριων νευρώνων του νωτιαίου μυελού και ορισμένων ντοπαμινεργικών νευρώνων (Snider 1988). Στον εγκέφαλο, η σύνθεση του BDNF, πραγματοποιείται στον ιππόκαμπο και

στον φλοιό, επηρεάζεται από τη δραστηριότητα των νευρώνων και έχει ένα μοναδικό ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα (Allen et al. 2013). Όταν ο BDNF προσδένεται στο ομοδιμερές σύμπλοκο του TrkB υποδοχέα, επάγει την φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης της ενδοκυτταρικής του επικράτειας, όπως τα Y515, Y705/6 και Y816. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί την επερχόμενη σηματοδότηση της ενεργοποιημένης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK) και του ERK/CREB μονοπατιού, της PI3K και της φωσφολιπάσης C γ (Phospholipase C γ , PLC γ)(Moses V Chao 2003). Ο BDNF είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής των διαδικασιών μάθησης και μνήμης. Το ώριμο BDNF ενισχύει τις συνάψεις, ενώ ο proBDNF αποδυναμώνει τις συνάψεις, καθιστώντας τη σχέση του proBDNF με το BDNF σημαντική για τη συναπτική πλαστικότητα (Yang et al. 2014). Ο BDNF ρυθμίζει επίσης την δραστηριότητα ChAT (ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης) και προάγει την επιβίωση των νευρώνων (Klein et al. 1999).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο BDNF έχει σημαντική δομική ομοιότητα με τον NGF (υπάρχει 50% αμινοξική ταύτιση). Ο BDNF δεσμεύεται με τουλάχιστον δύο υποδοχείς στον TrkB και στον p75^{NTR} υποδοχέα (Pataroutian and Reichardt 2001). Η δυσλειτουργία του NGF και του BDNF είναι εμφανής ακόμη και στην ήπια γνωστική εξασθένηση (MCI) (Bruno et al. 2009), η οποία θεωρείται ως προδρομικό στάδιο της νόσου του Alzheimer. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι η παθολογία του Alzheimer αναπτύσσεται δεκαετίες πριν από την έναρξη της άνοιας είναι σημαντικό να καθοριστεί πόσο νωρίς κατά την εξέλιξη της νόσου εμφανίζονται αυτές οι αλλοιώσεις στον NGF και στον BDNF (Dubois et al. 2016). Είναι γνωστό επίσης, πως μέσω της σηματοδότησης BDNF, καταστέλλεται η αυτοφαγία, η οποία απαιτείται για την συναπτική πλαστικότητα στον πρόσθιο εγκέφαλο του ενήλικου ποντικού (Nikoletopoulou et al. 2017). Δρώντας μέσω του υποδοχέα TrkB, ο BDNF, ως εκκρινόμενος νευροτροφικός παράγοντας απαιτείται για την ορθή ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας (Schwartz et al. 1997). Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας εκφράζουν BDNF. Οι προκλινικές ενδείξεις αποκαλύπτουν ότι οι νευρωνικοί υποδοχείς της ντοπαμίνης των ασθενών με Parkinson εμφανίζουν αξιοσημείωτα μειωμένα επίπεδα BDNF (Howells et al. 2000)

Υποδοχείς νευροτροφινών και μονοπάτια σηματοδότησης τους



Εικόνα α . Σηματοδότηση νευροτροφινών μέσω p75^{NTR} και Trk υποδοχών.

Στην εικόνα α απεικονίζονται όλες οι αλληλεπιδράσεις κάθε νευροτροφίνης με υποδοχείς Trk και p75^{NTR}. Καθώς επίσης και οι κύριες ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μέσω κάθε υποδοχέα (Reichardt 2006). Ο υποδοχέας p75^{NTR} ρυθμίζει τρεις σημαντικές οδούς σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση του NF-κB οδηγεί σε μεταγραφή πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων αρκετών που προάγουν την επιβίωση των νευρώνων (Vicario et al. 2015). Η ενεργοποίηση της οδού κινάσης Jun ελέγχει παρομοίως την ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων, μερικά από τα οποία προάγουν την νευρωνική απόπτωση (Bhakar et al. 2003). Οι δράσεις προ-απόπτωσης του p75^{NTR} φαίνεται να απαιτούν την παρουσία σορτιλίνης, η οποία λειτουργεί ως συν-υποδοχέας (Nykjaer et al. 2004) (Η σορτιλίνη δεν απεικονίζεται σε αυτό το σχήμα). Κάθε υποδοχέας Trk ελέγχει επίσης τρεις κύριες οδούς σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση του Ras οδηγεί σε ενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης κινάσης MAP, το οποίο προάγει νευρωνική διαφοροποίηση συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης νευριτών. Η ενεργοποίηση της PI3 κινάσης μέσω Ras ή GAB1 προάγει την επιβίωση και την ανάπτυξη των νευρώνων και άλλων κυττάρων. Η ενεργοποίηση του PLC-g1 έχει ως

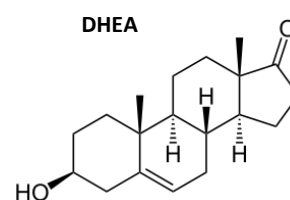
αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μονοπατιών που ρυθμίζονται από Ca^{2+} και πρωτεϊνική κινάση C που προάγουν τη συναπτική πλαστικότητα (Huang and Reichardt 2003). Κάθε μία από αυτές τις οδούς σηματοδότησης ρυθμίζει επίσης τη γονιδιακή μεταγραφή.

p75^{NTR} υποδοχέας

Στον παν-νευροτροφικό υποδοχέα, p75^{NTR}, αποδίδονται ποικίλες λειτουργίες, πολύπλοκες και μερικές φορές αντιφατικές. Ο p75^{NTR} έχει εμπλακεί τόσο στην προαγωγή της επιβίωσης όσο και στην επαγωγή της απόπτωσης. Επιπλέον, ο p75^{NTR} διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μυελίνωση (Cosgaya, Chan, and Shooter 2002). Πρωτοαναγνωρίστηκε το 1973 (Herrup & Shooter, 1973) ως ο πρώτος υποδοχέας του νευρικού αυξητικού παράγοντα NGF. Μετά από χρόνια έρευνας ανακαλύφθηκε ότι λειτουργεί ως υποδοχέας όλων των νευροτροφινών, καθώς και ότι αποτελεί τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα των προ-νευροτροφινών (Moses V Chao and Bothwell 2002). Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος, (ΚΝΣ) ο p75^{NTR} εκφράζεται ευρέως στον τελεγκέφαλο, στον νεοφλοιό, στον ιππόκαμπο και στον μεσεγκέφαλο (Chen, Mufson, and Kordower 1996). Στο ώριμο ΚΝΣ όμως, η έκφραση του p75^{NTR} περιορίζεται στους χολινεργικούς νευρώνες του βασικού προσθγκεφάλου, σε κινητικούς νευρώνες και σε νευρώνες Purkinje της παρεγκεφαλίδας (McKay et al. 1996).

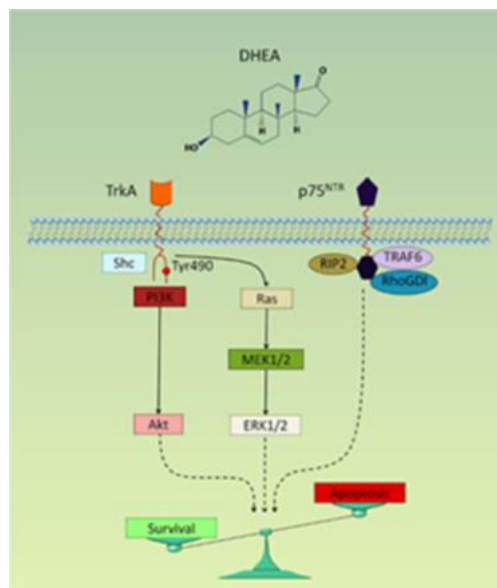
Διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA)

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, περιγράφηκε η ικανότητα των νευρώνων και της γλοίας να παράγουν στεροειδή (Baulieu 1981). Τα νευροστεροειδή, όπως ονομάζονται, συντίθενται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα σε νευρογλοιακά κύτταρα,



αλλά και σε αστροκύτταρα και νευρώνες. Το πρώτο νευροστεροειδές το οποίο μελετήθηκε, ήταν η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Η παραγωγή της DHEA ξεκινά με βάση τη χοληστερόλη που μεταβολίζεται, με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων, σταδιακά σε πρεγνολόνη, έπειτα σε 17α-Υδροξυπρεγνολόνη και τελικά σε DHEA, η παραγωγή της, επιτελείται κυρίως στα επινεφρίδια, στις γονάδες καθώς και τοπικά στον εγκέφαλο. Αποτελεί το πιο άφθονο σε συγκέντρωση στεροειδές στον άνθρωπο και είναι πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση οιστρογόνων και ανδρογόνων (Baulieu et al. 1998). Μελέτες έδειξαν πως η DHEA διαθέτει νευροπροστατευτικές και αντιαποπτωτικές ιδιότητες, οι οποίες όμως δεν πραγματοποιούνται μέσω των κοινών υποδοχέων στους οποίους προσδένεται η DHEA, όπως οι είναι οι NMDA, GABA_A, σ1 και

οιστρογόνων (Compagnone and Mellon 2000). Έχει δειχθεί πως δρά ως νευροτροφικός παράγοντας, προστατεύοντας τα νευρικά κύτταρα από αποπτωτικό θάνατο μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων TrkA και p75^{NTR} (Lazaridis et al. 2011). Η πρόσδεση της DHEA στους υποδοχείς αυτούς επάγει φωσφορυλίωση κι ενεργοποίηση των ERK1/2 και Akt κινασών που είναι οι κύριοι μεσολαβητές της νευρωνικής επιβίωσης, ενώ αποτυγχάνει να ενεργοποιήσει τη φωσφολιπάση Cγ που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση και συναπτική πλαστικότητα (Pediaditakis et al. 2015).



Προτεινόμενο μοντέλο των μεσολαβούμενων από υποδοχείς νευροτροφικών δράσεων της DHEA. Συγκεκριμένα, η DHEA συνδέεται σε TrkA & p75^{NTR} υποδοχείς και ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά μονοπάτια. (Lazaridis et al., 2011)

Άλλες μελέτες σχετικά με την παθοφυσιολογία του Alzheimer (AD), έχουν δείξει σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων των νευροστεροειδών σε εγκεφαλικές περιοχές ατόμων που πάσχουν από AD σε σύγκριση με άτομα που δεν εμφανίζουν κάποια παθολογική κατάσταση (Wang, Irwin, and Brinton 2006). Επιπλέον λόγοι μείωσης της DHEA είναι το φυσικό ή συναισθηματικό άγχος, με βασικά παραδείγματα την κατάθλιψη και την χρόνια φλεγμονή. Αυτή η μείωση σχετίζεται με δυσλειτουργία των νευρώνων και νευροεκφύλιση, κυρίως επειδή αυτά τα νευροστεροειδή προστατεύουν το ΚΝΣ από επιβλαβείς παράγοντες (Charalampopoulos et al. 2004)

Η DHEA αυξάνεται σε λοίμωξη, χρόνια στρες και σε αυτοάνοσα νοσήματα. Δεν επιδρά στον ενεργειακό μεταβολισμό, ούτε στην σύνθεση ή αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Έχει φανεί ότι έχει νευροπροστατευτική δράση στους νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος μειώνοντας την απόπτωση (Charalampopoulos 2006; Charalampopoulos et al. 2004). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδράσεις της DHEA εστιάζονται στον νευρικό άξονα και ότι η DHEA έχει περιορισμένη επίδραση στην δενδριτική αύξηση. Επίσης, η DHEA φαίνεται να επηρεάζει και την νευρογένεση καθώς αυξάνει τον αριθμό των νεοσχηματιζόμενων νευρώνων της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου και ανταγωνίζεται την ανασταλτική δράση της κορτικοστερόνης τόσο στην νευρογένεση όσο και στον πρόδρομο νευρικό πολλαπλασιασμό (Charalampopoulos et al. 2008). Για τους παραπάνω λόγους, η θεραπεία ασθενειών μέσω της DHEA έχει ελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δύο δεκαετίες.

Όπως προαναφέρθηκε, τα επίπεδα της DHEA μειώνονται κατά τη γήρανση και το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η θεραπεία με DHEA μπορεί να βελτιώσει νοητικά προβλήματα αποτρέποντας την απώλεια νευρικών κυττάρων (Charalampopoulos, Lazaridis, and Gravanis 2011). Μειωμένα επίπεδα DHEA έχουν βρεθεί σε περιοχές του εγκεφάλου ασθενών που πάσχουν από νόσο Alzheimer (Charalampopoulos, Lazaridis, and Gravanis 2011). Επιπλέον λόγοι μείωσης της DHEA είναι το φυσικό ή συναισθηματικό άγχος, με βασικά παραδείγματα την κατάθλιψη και την χρόνια φλεγμονή. Αυτή η μείωση σχετίζεται με δυσλειτουργία των νευρώνων και νευροεκφύλιση, κυρίως επειδή αυτά τα νευροστεροειδή προστατεύουν το ΚΝΣ από επιβλαβείς παράγοντες (Charalampopoulos et al. 2004).

Παρόλα αυτά, τα ενδογενή νευροστεροειδή μεταβολίζονται στον άνθρωπο σε οιστρογόνα, ανδρογόνα ή προγεστερόνες που είναι γνωστό ότι οδηγούν σε γενικευμένες ενδοκρινικές παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένων των ορμονοεξαρτώμενων νεοπλασιών (Compagnone and Mellon 2000), περιορίζοντας έτσι την κλινική τους χρήση.

Χημικά τροποποιημένα ανάλογα της διϋδροεπιανδροστερόνης

Τα νευροστεροειδή όπως ο DHEA, έχουν σημαντικές νευροπροστατευτικές και νευρογόνες επιδράσεις τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Ωστόσο, περιορισμοί, συμπεριλαμβανομένων της βραχείας ημίσειας ζωής και της μειωμένης δυνατότητας αυτών να διαπεράσουν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους τους, μας αποτρέπουν από το να τις χρησιμοποιήσουμε ως θεραπεία για τις νευροεκφυλιστικές νόσους. Για αυτό το λόγο, έχουν δημιουργηθεί συνθετικά ανάλογα DHEA με τροποποιήσεις στους άνθρακες C3 ή C17, που ονομάζονται μικρονευροτροφίνες, με σκοπό την αύξηση της αντιαποπτωτικής και νευροπροστατευτικής τους δράσης, αλλά και την αναστολή της ικανότητας μετατροπής τους σε οιστρογόνα ή ανδρογόνα (Calogeropoulou et al., 2009).

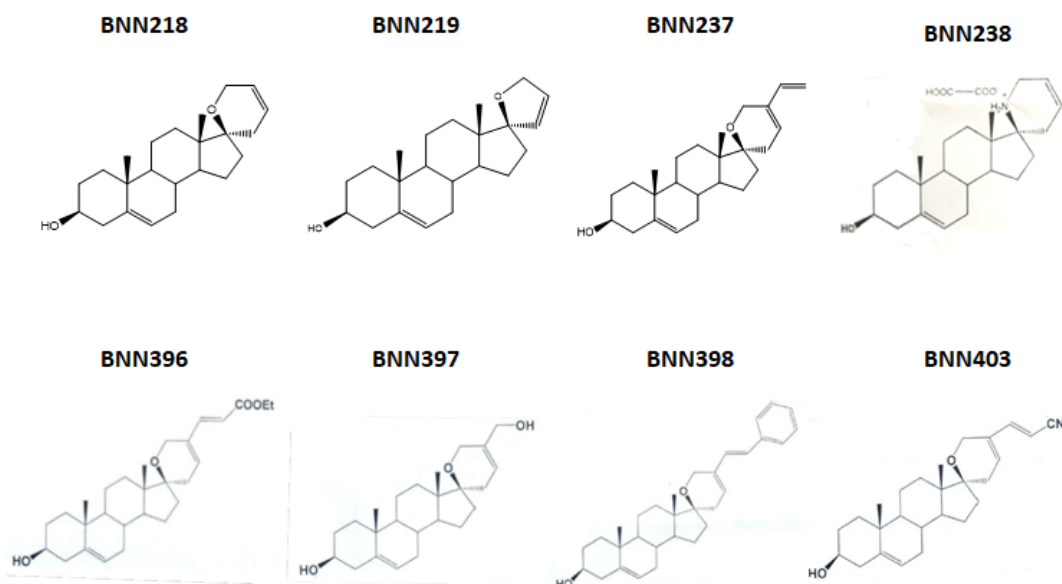
Μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα πρόσδεσης του BDNF *in vitro* όχι μόνο σε TrkA και p75NTR αλλά και σε TrkB υποδοχείς, έχοντας νευροπροστατευτική δράση ομοιομορφικός μηχανισμός που εμπλέκεται στην νευροπροστατευτική δράση του BDNF στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό κάτω από τον έλεγχο του TrkB υποδοχέα, μιμούμενος τη σηματοδότηση απ' τον ενδογενή νευροτροφικό παράγοντα BDNF. Την ίδια στιγμή, η πυροδότηση για αύξηση της παραγωγής του ίδιου του BDNF, οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση του TrkB υποδοχέα, και άρα συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη νευρωνική επιβίωση και προστασία (Botsakis et al. 2017).

Το BNN27 επίσης είναι ένα συνθετικό ανάλογο της DHEA, το οποίο διαθέτει στον άνθρακα C3 μία βουτυλ-ομάδα με β-διαμόρφωση, ενώ το υδροξύλιο του C3 έχει α-διαμόρφωση (Calogeropoulos et al. 2009). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το BNN27 ενεργοποιεί ειδικά τους υποδοχείς του NGF, TrkA και p75^{NTR}, ενώ είναι ικανό να σώσει από απόπτωση συγκεκριμένες ομάδες νευρώνων, όπως τους εξαρτώμενους από NGF αισθητικούς και συμπαθητικούς νευρώνες. Συνεπώς, οι νευρώνες που εκφράσουν p75^{NTR} αλλά όχι TrkA υποδοχείς ανταποκρίνονται στο BNN27 κυρίως μέσω ενίσχυσης της σηματοδότησης για επιβίωση (Pediaditakis et al. 2016). Νεότερα δεδομένα παρουσιάζουν μία θεραπευτική προσέγγιση για τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (DR), καθώς επιδρά στην νευροεκφύλιση, όσο και στη φλεγμονή που εμφανίζει η ασθένεια (Ibán-Arias et al. 2018).

Για τους παραπάνω λόγους, η θεραπεία ασθενειών μέσω της DHEA έχει ελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Όπως προαναφέρθηκε, τα επίπεδα της DHEA μειώνονται κατά τη γήρανση και το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η συμπλήρωση με DHEA μπορεί να βελτιώσει νοητικά προβλήματα αποτρέποντας την απώλεια νευρικών κυττάρων (Charalampopoulos et al., 2011).

Ερευνητικό Ερώτημα

Όλα τα ανάλογα, συντέθηκαν στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας και στο Ινστιτούτο Βιολογικής Έρευνας και Βιοτεχνολογίας της Αθήνας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), και φέρουν τροποποιήσεις στον άνθρακα C17 του μορίου της DHEA. Στις ενώσεις TC218 και TC219 αυξήθηκε το μέγεθος του C17 υποκαταστάτη. Στο TC219 έχει υποκατασταθεί από το 2,5-διϋδροφουράνιο (5-μελής ετεροκυκλικός δακτύλιος), ενώ στο TC218 από το 3,6-διϋδροπυράνιο (6-μελής ετεροκυκλικός δακτύλιος). Η ένωση TC237 είναι ένα παράγωγο του TC218 και φέρει μία ομάδα 5-βινυλο, 3,6-διϋδροπυρανίου στο C17.



Ανάλογα που μελετήθηκαν και έχουν τροποποιήσεις στον άνθρακα C17 του μορίου της DHEA

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας, αποτελεί η μελέτη της ικανότητας των συνθετικών αυτών μορίων νευροτροφίνων να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς νευροτροφίνης (TrkA και TrkB) μέσω της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα σε συγκεκριμένα υπολείμματα τυροσίνης (Y490 και Y816 αντιστοίχως) σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Επίσης, παράλληλα στο εργαστήριο μελετήθηκε η ικανότητα των νέων ενώσεων να διασώσουν τα κύτταρα από την απόπτωση. Με τελικό σκοπό τον χαρακτηρισμό της δράσης των νέων αυτών ενώσεων. Ο απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας αλλά και των μετέπειτα μελετών που θα ακολουθήσουν είναι να βρεθούν μόρια με κατάλληλες ιδιότητες ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά προϊόντα κατά των νευροεκφυλιστικών νόσων και του εγκεφαλικού τραύματος.

Υλικά και Μέθοδοι

Κυτταροκαλλιέργειες

Οι σειρές κύτταρων HEK-293 και CHO αναπτύχθηκαν σε DMEM Serum Free θρεπτικό μέσο, εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Σε επωαστήρα στα κύτταρα παραρίχθηκε 95% οξυγόνο και 5% CO₂ στους 37° C. Επίσης τα κύτταρα NIH-3T3 διαμολυσμένα σταθερά με υποδοχείς TrkA ή TrkB ήταν ευγενική χορηγία από τον καθηγητή Carlos F. Ibáñez (Karolinska Institutet) και αναπτύχθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες. Η καλλιέργεια γινόταν σε φλάσκες και τρυβλία Petri. Για την διατήρηση της καλλιέργειας πραγματοποιούταν αλλαγή του μέσου ανάπτυξης κάθε 2 ημέρες ή διάσπαση 1:4 με θρυψίνη όταν τα κύτταρα είχαν πυκνότητα > 80%. Η διαδικασία διαίρεσης περιλαμβάνει 1-2 πλύσεις με 1X PBS, επώαση στους 37 ° C με 0,05% θρυψίνη για 1-2 λεπτά, απενεργοποίηση θρυψίνης με χρήση πλήρους θρεπτικού μέσου, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1200 στροφές (rpm), απομάκρυνση υπερκείμενου υλικού και αραίωση των κυττάρων στο σωστό όγκος σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όταν ήταν απαραίτητο με μέσο κατάψυξης (70% DMEM · 20% FBS · 10% DMSO) στους -80 ° C. Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με πυκνότητα 95-98% κύτταρα.

Διαμόλυνση κυττάρων(Transfection)

Οι αναλογίες σε κάθε διάλυμα είναι ίδιες: Serum Free medium 100μl/well, Turbofect 3μl/well , πλασμίδιο 2μg/well Ύστερα, αφαιρώ το θρεπτικό από όλα τα πηγάδια και προσθέτω 1ml Serum Free medium και 100μl από το transfection διάλυμα σε κάθε πηγαδάκι. Επωάζω το 12- well πιάτο στους 37oC για 4-5 ώρες. Τέλος, αφαιρώ το μείγμα από κάθε πηγάδι και το αντικαθιστώ με 1ml Full medium, το οποίο αφήνω τελικά για 48 ώρες στον επωαστήρα. Τα επιμολυσμένα κύτταρα τυπικά χρησιμοποιήθηκαν την 2η ημέρα μετά την επιμόλυνση.

Δοκιμές συνθετικών μορίων

Τα κύτταρα ανασηκώθηκαν χρησιμοποιώντας scraper και όχι με θρυψίνη, καθώς διασπά τους υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη, στην συνέχεια

μετρήθηκε η βιωσιμότητα τους με την βοήθεια trypan blue και κυτταρομετρικής πλάκας. Οπού στρώθηκαν από 150.000 κύτταρα σε κάθε well(12-well) και καλλιεργήθηκαν. Την επόμενη ημέρα, απομακρύνθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο από τα wells και προστέθηκε μέσο χωρίς ορό για 4 ώρες. Στη συνέχεια, τα ανάλογα BNN αραιώθηκαν στις υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (10⁻⁷M ή 10⁻⁸M) και προστεθήκαν στα wells αντίστοιχα για 30, 20 και 10 λεπτά. Οι συνθήκες ελέγχου στα πειράματα ήταν: επώαση με πλήρες μέσο (ήπια ενεργοποίηση υποδοχέων με πρωτεΐνες ορού), προσθήκη NGF σε 100ng / ml (ενεργοποίηση TrkA), προσθήκη BDNF σε 100ng / ml ή BNN20 σε 10⁻⁷M (ενεργοποίηση του TrkB) και επώαση με μέσο SF (χωρίς ενεργοποίηση). Μετά την επεξεργασία, τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο PBS και εναιωρήθηκαν σε 100 μL ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% Triton-X100, pH 7.4) συμπληρωμένο με αναστολείς πρωτεάσης και φωσφατάσης. Τα κυτταρολύματα χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για ανοσοσύτωση ή ανοσοκατακρήμνιση όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, κινούνται μέσα σε υδατικά διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Μετά την λύση των κυττάρων, τα κυτταρολύματα εναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (0.125M Tris-HCl; 4% 2-mercaptethanol; 4% SDS; 40% ddH₂O; 0.3mM Bromophenol blue; 10% glycerol) και διαχωρίστηκαν με 12% SDS- PAGE. Το gel διαχωρισμού (Acrylamide 30%/Bis-acrylamide 0.8% w/v; Tris-HCl 1.5M pH=8.8; SDS 10%; APS 10%; TEMED; H₂O] και το stacking gel [Acrylamide 30%/Bis-acrylamide 0.8% w/v; Tris-HCl 0.5M pH=6.8; SDS 10%; APS 10%; TEMED; H₂O) αυτά παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας την συσκευή της Biorad. Μετά τη φόρτωση του δείγματος στα gel, στην συσκευή προστέθηκε Running Buffer (25mM Trizma Base; 192mM Glycine; 0.1% SDS) και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 80V για 30 λεπτά και σε 110V για 3 ώρες. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με ηλεκτροφόρηση στα 300mA για 70 λεπτά στην συσκευή προστέθηκε κρύο Transfer Buffer (25mM Tris-HCl; 192mM Glycine; 20% Methanol). Οι μεμβράνες επωαστήκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 5% BSA αραιωμένη σε TBS-Tween20 0,1% και επώαστηκαν με το αντίστοιχα πρωτογενή αντισώματα

κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 ° C σε πλατφόρμα ανακίνησης. Όλα τα πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1: 1000 σε 5% BSA, TBS-Tween20 0,1%. Την επόμενη ημέρα, οι μεμβράνες πλύθηκαν 3-4 φορές για 15 λεπτά με TBS-T 0,1% και στη συνέχεια επώστηκαν με το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα (1: 5000 αραιώση σε 5% BSA, TBS-T 0,1%) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 πλύσεις των 15 λεπτών, οι μεμβράνες εμφανίστηκαν χρησιμοποιώντας ECL Western Blotting Kit και απεικονίστηκαν με το Chemi Doc MPimager (Bio-Rad). Το λογισμικό Image-Lab έκδοση 4.1 (Bio-Rad) χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση εικόνας. Όταν χρειαζόταν να απομακρυνθούν αντισώματα από της μεμβράνες, οι μεμβράνες πλένονταν δύο φορές με TBS-T 0,1% και επωζόταν σε stripping buffer (2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,8% 2-μερκαπτοαιθανόλη) επί 25 λεπτά στους 56 ° C. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες πλένονταν 5-6 φορές για 15 λεπτά και στη συνέχεια γινόταν η διαδικασία όπως περιγράφηκε ήδη. Η ανάλυση και η ποσοτικοποίηση των εντάσεων της ζώνης πραγματοποιήθηκε από το λογισμικό Image J (Fiji).

Ανοσοκατακρήμνιση (IP)

Όταν διεξήχθη IP, κυτταρολύματα προ-καθαρίστηκαν για 1 ώρα με σφαιρίδια Agarose πρωτεΐνης G-plus (Cat No. Sc-2002, Santa Cruz). Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια απορρίφθηκαν και τα λύματα επώστηκαν με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, όλη τη νύχτα στους 4 ° C σε έναν περιστρεφόμενο τροχό ανάδευσης. Την επόμενη ημέρα προστέθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης Protein G-Plus σε κάθε δείγμα και επώστηκαν για 4 ώρες στους 4 ° C σε έναν περιστρεφόμενο τροχό ανάδευσης. Τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, πλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό λύσης και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης SDS. Για ανάλυση ανοσοστυπώματος (IB), οι πρωτεΐνες υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα αναφέρονται ως ο μέσος όρος \pm SEM. Συγκρίνοντας δύο ομάδες διεξήχθη χρησιμοποιώντας μη συζευγμένο t-test. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση GraphPrism, έκδοση 7 (GraphPad Software Inc.). Μια τιμή p μικρότερη από 0,05 θεωρήθηκε σημαντική.

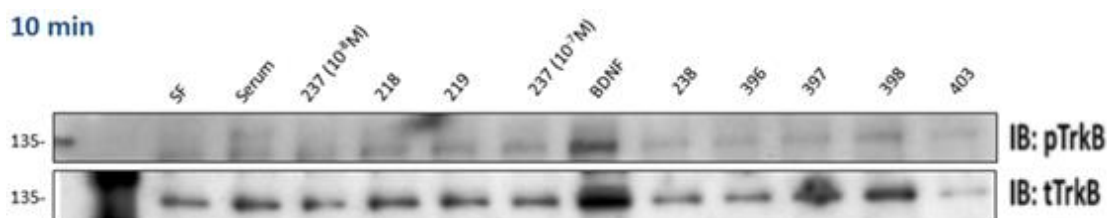
Αποτελέσματα

Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση TrkB υποδοχέων

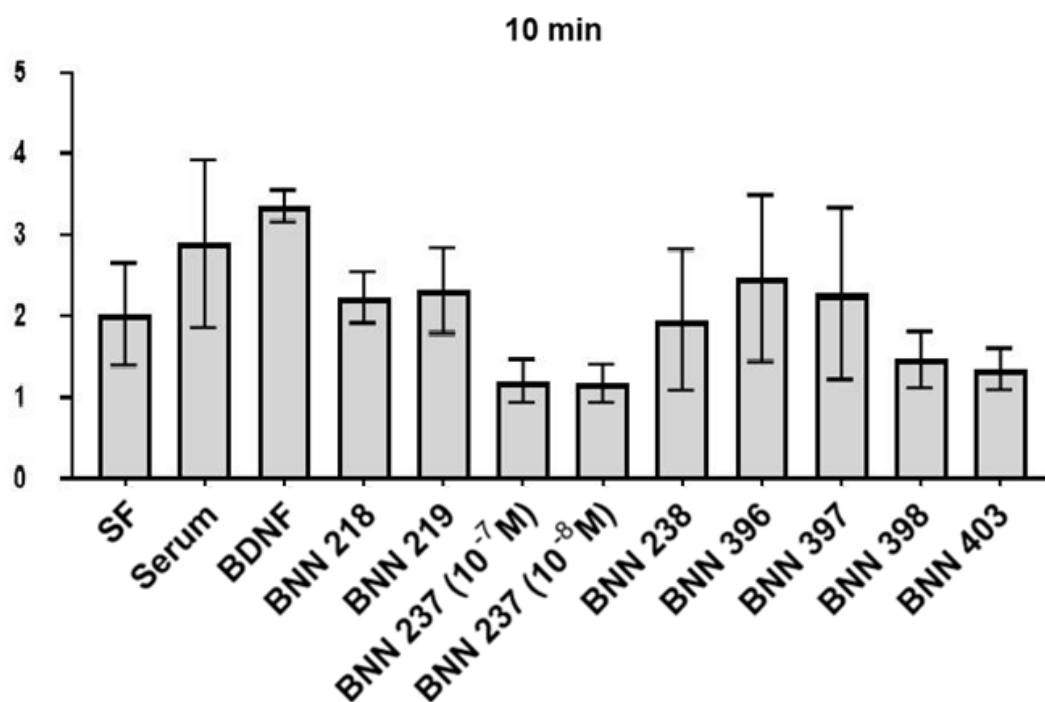
Από πειράματα που έγιναν στα NIH-3T3 κύτταρα, τα οποία είναι σταθερά διαμολυσμένα με τους υποδοχείς TrkB, σε χρονικές στιγμές 10, 20 και 30 λεπτών, μελετήθηκε η ενεργοποίηση των TrkB υποδοχέων και συγκεντρώθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Σε κάθε μελέτη, ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε η νευροτροφίνη BDNF και TrkB αντίστοιχα καθώς και οι συνθετικές μικρονευροτροφίνες BNN27 και BNN20, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν με μεγάλη αποτελεσματικότητα τους TrkA και TrkB υποδοχείς, αντίστοιχα.

Ενεργοποίηση του TrkB στα 10 λεπτά.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη δράση των αναλόγων στα 10 λεπτά στην Εικόνα 1 υποδεικνύουν ότι έχουμε μια αναμενόμενη ενεργοποίηση στο Serum το οποίο είναι θετικό control, ενώ η ενεργοποίηση μέσω BDNF στη δεδομένη μεμβράνη φάνηκε να είναι αποτελεσματική, αποτέλεσμα που ήταν αναμενόμενο. Μπορούμε να δούμε καλύτερα το αποτέλεσμα από το διάγραμμα 1. Από τα εξεταζόμενα μόρια, φαίνεται να επάγουν ενεργοποίηση του υποδοχέα το 218 και το 398, ενώ στα υπόλοιπα μόρια δεν υπάρχει σημαντική φωσφορυλίωση.



Εικόνα 1. Ενεργοποίηση υποδοχέα TrkB σε συνθήκες control και δοκιμής αναλόγων στα 10 λεπτά. Βλέπουμε τα δείγματα κατά σειρά : Serum Free(SF), Serum, BDNF, 218, 219, 237, 238, 396, 397, 398, 403. Στην πρώτη μεμβράνη έγινε ανοσοτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα (pTrkB) Αντίστοιχα στην δεύτερη μεμβράνη έγινε ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα για την συνολική παρουσία του υποδοχέα (tTrkB) IB:tTrkB βλέπουμε το ολικό υποδοχέα. (n=3)



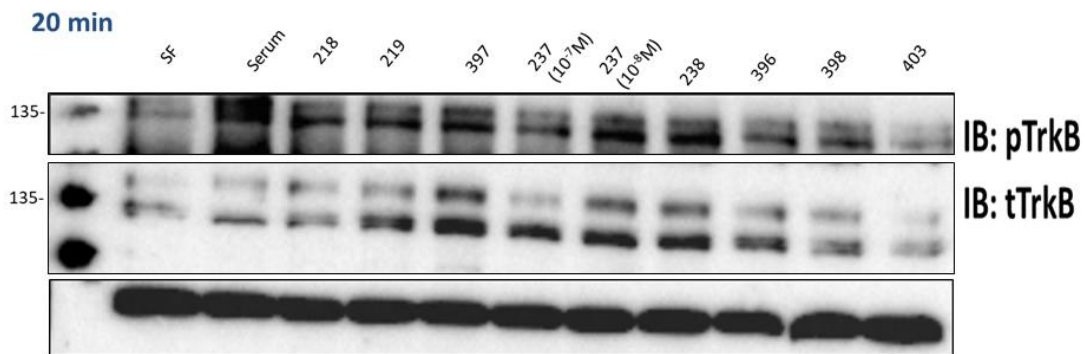
Διάγραμμα 1. Ανάλυση των αποτελεσμάτων λόγω ενεργοποίησης του υποδοχέα TrkB (n=3) σε συνθήκες control και δοκιμής αναλόγων στα 10 λεπτά. Βλέπουμε τα δείγματα κατά σειρά : Serum Free(SF), Serum, BDNF, 218, 219, 237, 238, 396, 397, 398, 403. (mean ± SEM, *P < 0,05, σύγκριση με IB:pTrkB / IB:tTrkB).

Το **διάγραμμα 1**, προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και είναι ενδεικτικό του προφίλ ενεργοποίησης του TrkB υποδοχέα από τις προς εξέταση ουσίες όταν αυτές εφαρμόζονται για 10 λεπτά. Παρατηρώντας το διάγραμμα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ενεργοποίηση του υποδοχέα με τις ουσίες 218, 219 και 396. Όσον αφορά τα υπόλοιπα μόρια δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση.

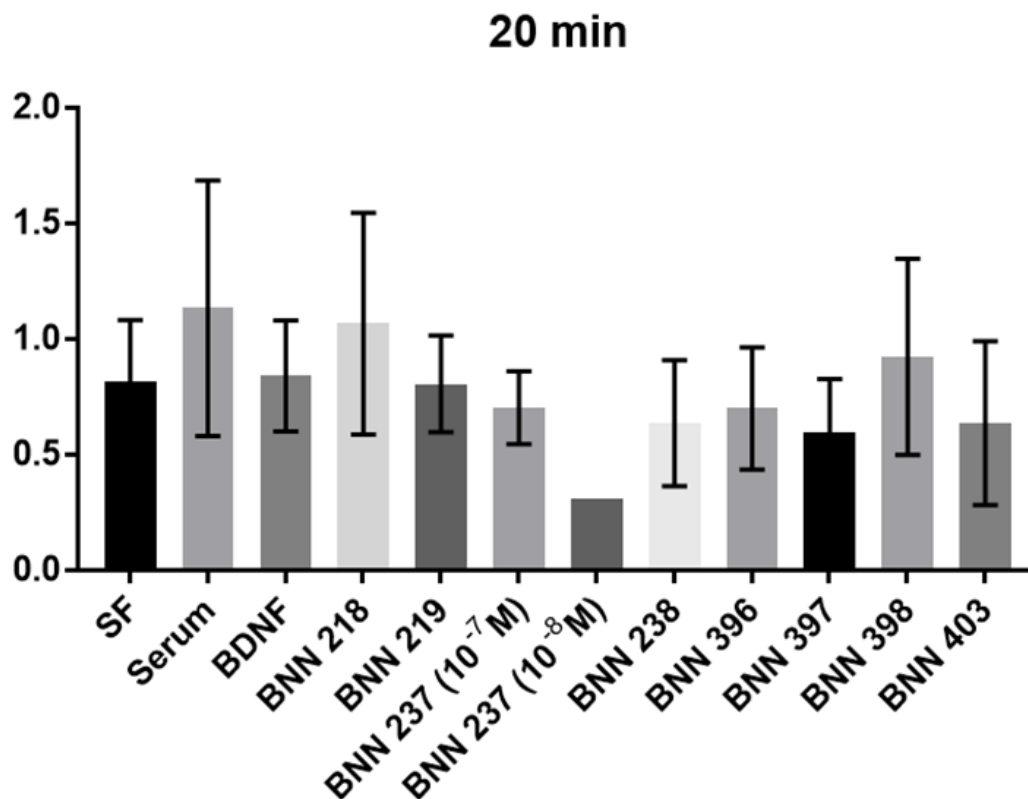
Ενεργοποίηση του TrkB στα 20 λεπτά

Στην **εικόνα 2**, μπορούμε να διακρίνουμε καλύτερα την ενεργοποίηση του υποδοχέα στα 20 λεπτά έκθεσης με τις ουσίες 218 και 398. Όσον αφορά τις υπόλοιπες ενώσεις δεν υπάρχει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ενεργοποίησης. Αυτό μπορούμε να το διαπιστώσουμε και στο **διάγραμμα 2**, όπου μετά από αναλύσεις των μεμβρανών από τις τρεις πειραματικές επαναλήψεις

μπορούμε να πούμε ότι στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα έχουμε από το 218 και 398. Όσον αφορά τις συνθήκες control, βλέπουμε ότι έχουμε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, όπου έχουμε την θετική επίδραση του serum και την μη επίδραση του Serum Free. Το BDNF δεν απέδωσε το αναμενόμενο αποτέλεσμα, πράγμα που οφείλεται στη μη λειτουργικότητα τις ουσίας.



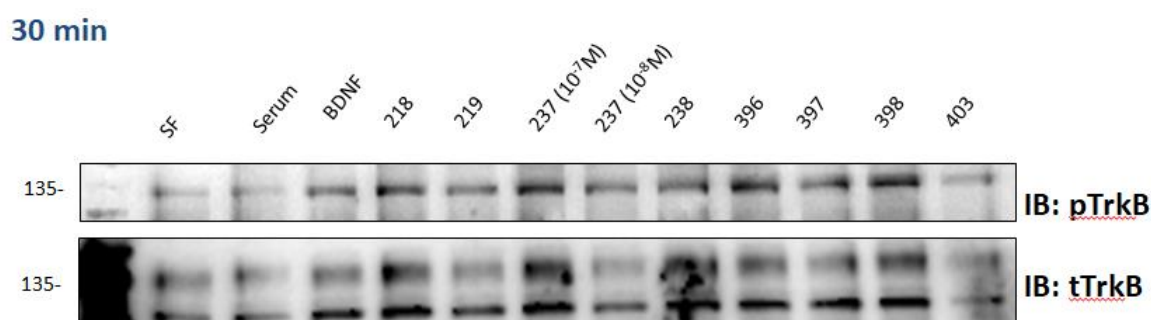
Εικόνα 2. Ενεργοποίηση υποδοχέα TrkB σε συνθήκες control και δοκιμής αναλόγων στα 20 λεπτά. Βλέπουμε τα δείγματα κατά σειρά : Serum Free(SF), Serum, 218, 219, 237, 238, 396, 397, 398, 403. Στην πρώτη γραμμή έχουμε το IB:pTrkB όπου εμφανίζετε ο φωσφορυλιωμενος υποδοχέας. Αντίστοιχα στην δεύτερη IB:tTrkB βλέπουμε το ολικό υποδοχέα (n=3). Η τρίτη μεμβράνη αντιπροσωπεύει την GAPDH η οποία υποδεικνύει ότι υπάρχει ισοφόρτωση των δειγμάτων.



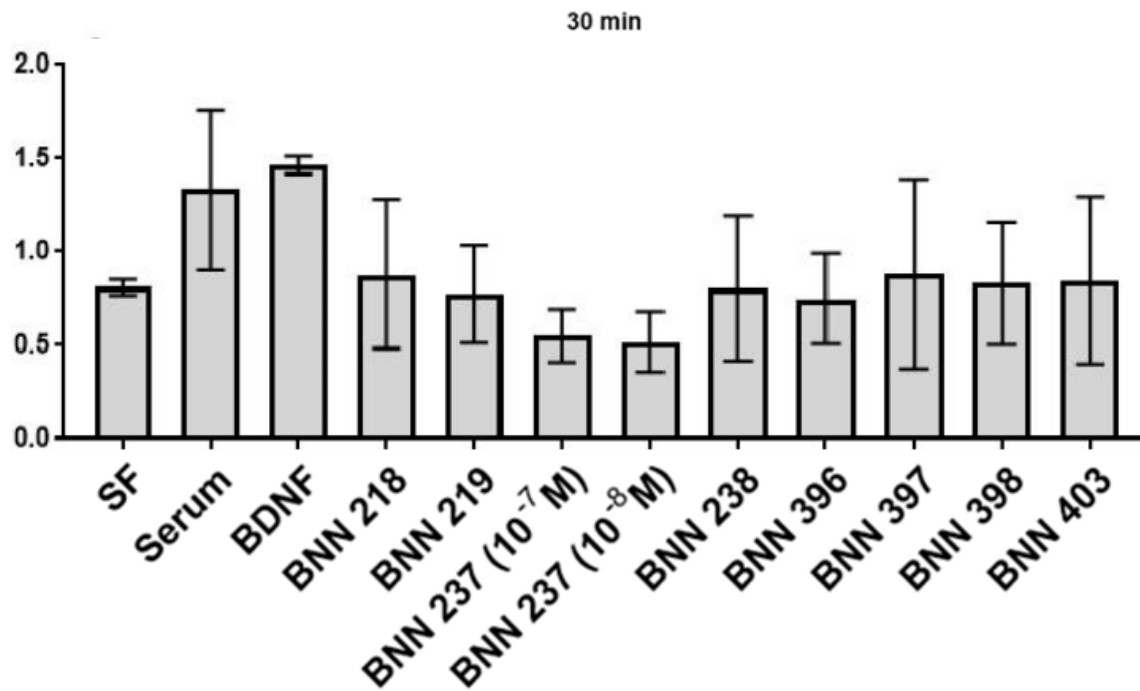
Διάγραμμα 2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ενεργοποίηση υποδοχέων TrkB (n=3) σε συνθήκες control και δοκιμής αναλόγων στα 20 λεπτά. Βλέπουμε τα δείγματα κατά σειρά : Serum Free(SF), Serum, BDNF, 218, 219, 237, 238, 396, 397, 398, 403. (mean ± SEM, *P < 0,05, σύγκριση με IB:pTrkB / IB:tTrkB),

Ενεργοποίηση του TrkB στα 30 λεπτά

Στην Εικόνα 3. στην έκθεση των κυττάρων στα 30 λεπτά μπορούμε να δούμε ότι το 218 και το 398 εμφανίζουν ενεργοποίηση σε σχέση με τα αλλά προς εξέταση μόρια που έχουν μείωση στην ενεργοτητα τους. Αυτό φαίνεται καλύτερα στο Διάγραμμα 2, όπου μετά από ανάλυση όλων των πειραματικών επαναλήψεων δεν προκύπτει κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στα 30 λεπτά για καμία από τις προς εξέταση ουσίες. Αυτό πιθανά να οφείλεται στον χρόνο που μπορεί να παραμείνει ενεργοποιημένος ο υποδοχέας μας, καθώς και στο χρόνο ημίσειας ζωής της ουσίας μας. Στην εικόνα 2 και 3 έχουμε background που μπορεί να οφείλεται στην όχι μεγάλη ειδικότητα του αντισώματος καθώς και όχι κάλο blocking. Τα NIH-3T3 κύτταρα λόγω τις υπερεκφρασεις του υποδοχέα TrkB έχουν την τάση να αυτόφωσφορυλιωνονται αυτό δικαιολογεί και τα υψηλό επίπεδο ενεργοποίησης στο SF.



Εικόνα 3. Ενεργοποίηση υποδοχέα TrkB σε συνθήκες control και δοκιμής αναλόγων στα 20 λεπτά. Βλέπουμε τα δείγματα κατά σειρά : Serum Free(SF), Serum, 218, 219, 237, 238, 396, 397, 398, 403. Στην πρώτη γραμμή έχουμε το IB:pTrkB όπου εμφανίζετε ο φωσφορυλιώμενος υποδοχέας. Αντίστοιχα στην δεύτερη IB:tTrkB βλέπουμε το ολικό υποδοχέα (n=3).

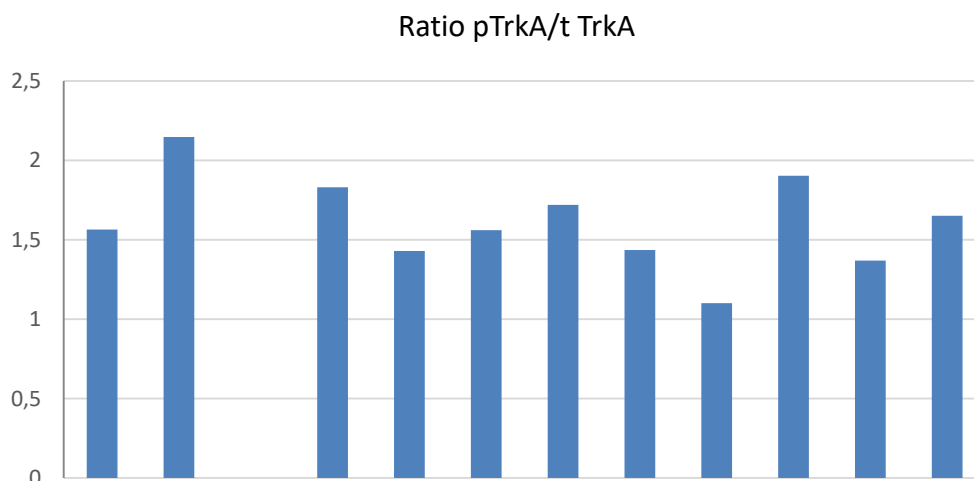


Διάγραμμα 3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων ενεργοποίηση υποδοχέων TrkB (n=3) σε συνθήκες control και δοκιμής αναλόγων στα 20 λεπτά. Βλέπουμε τα δείγματα κατά σειρά : Serum Free(SF), Serum, BDNF, 218, 219, 237, 238, 396, 397, 398, 403. (mean ± SEM, *P < 0,05, σύγκριση με IB:pTrkB / IB:tTrkB),

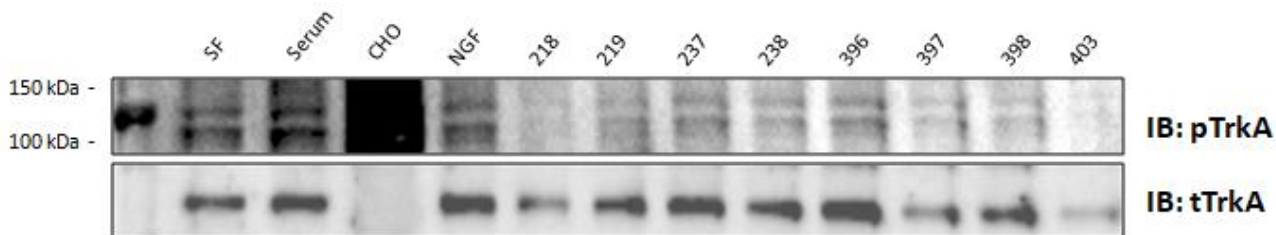
Φωσφορύλιωση και ενεργοποίηση TrkA υποδοχέων

Παράλληλα με τα πειράματα στον υποδοχέα TrkB στο εργαστήριο πραγματοποιούνταν πειράματα και μελέτες φωσφορύλιωσης και για TrkA υποδοχείς, κάποια από τα οποία παρατίθενται παρακάτω και είναι ευγενική χορηγία από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χρυσάνθη Βουτυράκη.

Όπως στα TrkB, έτσι και στα TrkA έχουμε καλύτερο προφίλ ενεργοποίησης στα 20 λεπτά. Αυτό μπορούμε να το δούμε στην εικόνα 4 όπου αντίστοιχα με τα προηγούμενα αποτελέσματα έχουμε τον συνολικό και τον φωσφορύλιωμένο υποδοχέα στη μεμβράνη και τη στατιστική ανάλυση με το ραβδογράμμο για το αντίστοιχο εξεταζόμενο μόριο . Από τα δεδομένα αυτά μπορούμε να δούμε ότι στα 20 λεπτά στα TrkA έχουμε την ενεργοποίηση του υποδοχέα στα ανάλογα BNN237, BNN397 και BNN403. Η CHO κυτταρική σειρά χρησιμοποιείται εδώ ως control και δεν διαθέτει υποδοχέα TrkB.



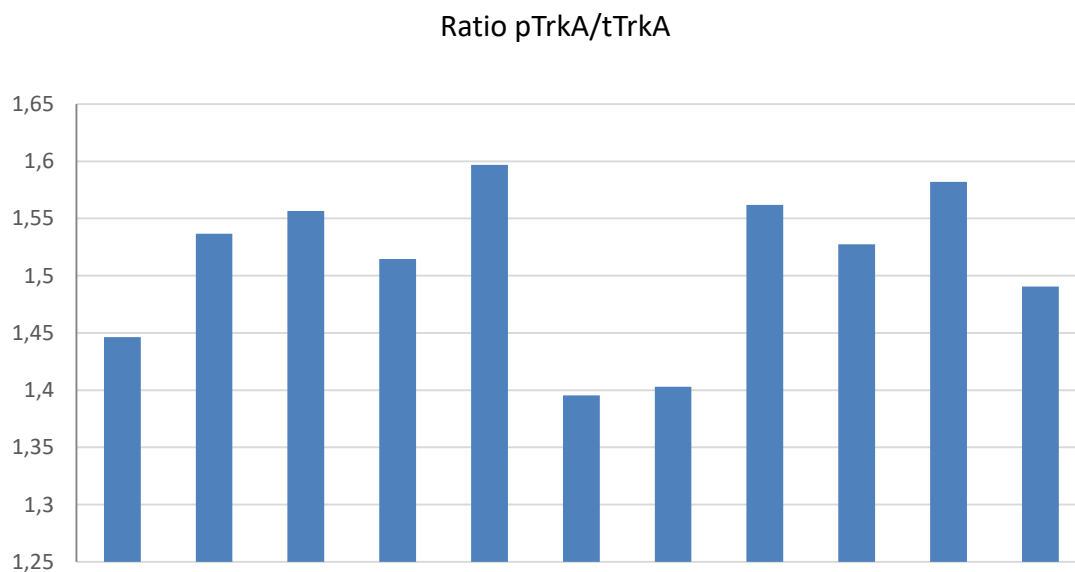
Εικόνα 4. Ενεργοποίηση του TrkA μετά από 20 λεπτά εφαρμογής των ανάλογων. Μετά τις κατεργασίες, τα



κυτταρολύματα ανοσοαποτυπώθηκαν με αντίσωμα pY490 και στη συνέχεια για το ολικό TrkA. Σε αυτό το σχήμα, παρουσιάζεται επίσης με το διάγραμμα ο λόγος pTrkA / tTrkA.

Από επιπλέον δεδομένα, στην **εικόνα 5**, σε έκθεση των κυττάρων σε 30 λεπτά στα ανάλογα στους TrkA υποδοχείς, βλέπουμε σημαντική ενεργοποίηση με τα ανάλογα BNN219, BNN396 και BNN398. Επίσης, τα μόρια BNN397, BNN218 και BNN403 δίνουν ένα μικρότερο σήμα.

Ενεργοποίηση του TrkA στα 30 λεπτά.

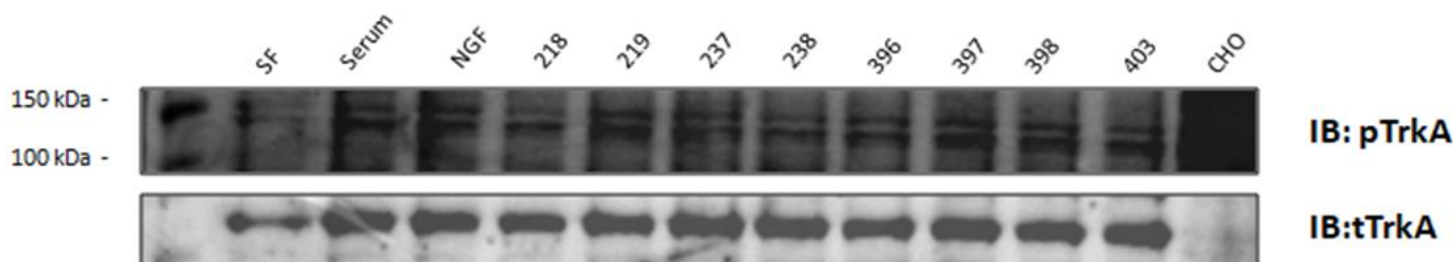


Εικόνα 5. Ενεργοποίηση του TrkA μετά από 30 λεπτά εφαρμογής των ανάλογων. Μετά τις κατεργασίες, τα κυτταρολύματα ανοσοαποτυπώθηκαν με αντίσωμα pY490 και στη συνέχεια για το ολικό TrkA. Σε αυτό το σχήμα, παρουσιάζεται επίσης με το διάγραμμα ο λόγος pTrkA / tTrkA.

Ανίχνευση της απόπτωσης με βάση την κυτταρομετρία

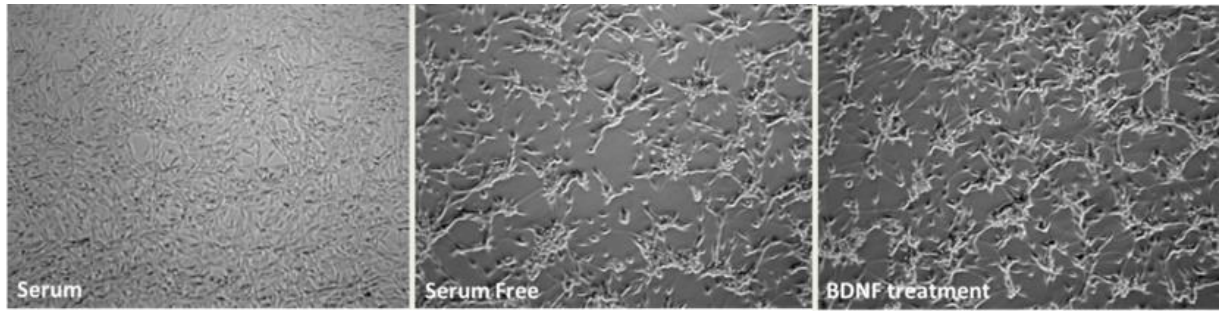
Παράλληλα με τα πειράματα φωσφορυλίωσης – ενεργοποίησης των υποδοχέων TrkA και TrkB, στο εργαστήριο πραγματοποιούνταν πειράματα σχετικά με την αντιαποπτωτική δράση των συνθετικών αναλογών, δεδομένα σχετικά με την δική μου μελέτη παρατίθενται παρακάτω και είναι ευγενική χορηγία από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια, Μαριάννα Παπαδοπούλου και την Διδακτορικό του εργαστηρίου, Μαρία Κόκκαλη.

Έχοντας μία πρώτη εικόνα για το ποια ανάλογα ενδεχομένως να δρουν

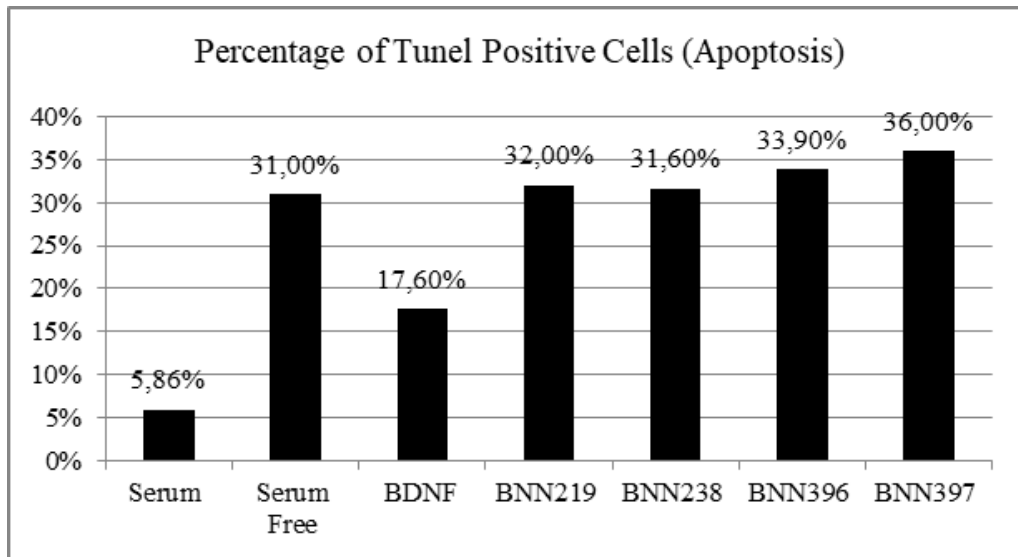


προστατευτικά μέσω των υποδοχέων TrkA και p75NTR, προχωρήσαμε στην παρούσα δοκιμή, όπου αξιολογήθηκε η αντιαποπτωτική δράση των συνθετικών αναλόγων που στα PC12 κύτταρα απείχαν στατιστικά σημαντικά από το να μειώσουν την απόπτωση, μέσω καλλιέργειών των NIH-3T3 κυττάρων, τα οποία εκφράζουν τον TrkB. Θελήσαμε με αυτόν τον τρόπο να εξετάσουμε αν τα υπόλοιπα συνθετικά ανάλογα της DHEA είναι ικανά να αντιστρέψουν την απόπτωση που προκαλείται στα κύτταρα σε συνθήκες στέρησης ορού, αυτή τη φορά, όμως, δρώντας μέσω TrkB. Αρχικά, υπήρξε το στάδιο του pre-starvation για 3 ώρες κι έπειτα εφαρμόστηκαν οι κατάλληλες θεραπείες (χρήση αναλόγων) για 24 ώρες. Τα δείγματα μελετήθηκαν μέσω της χρώσης με TUNEL και ακολούθησε η μετέπειτα ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής.

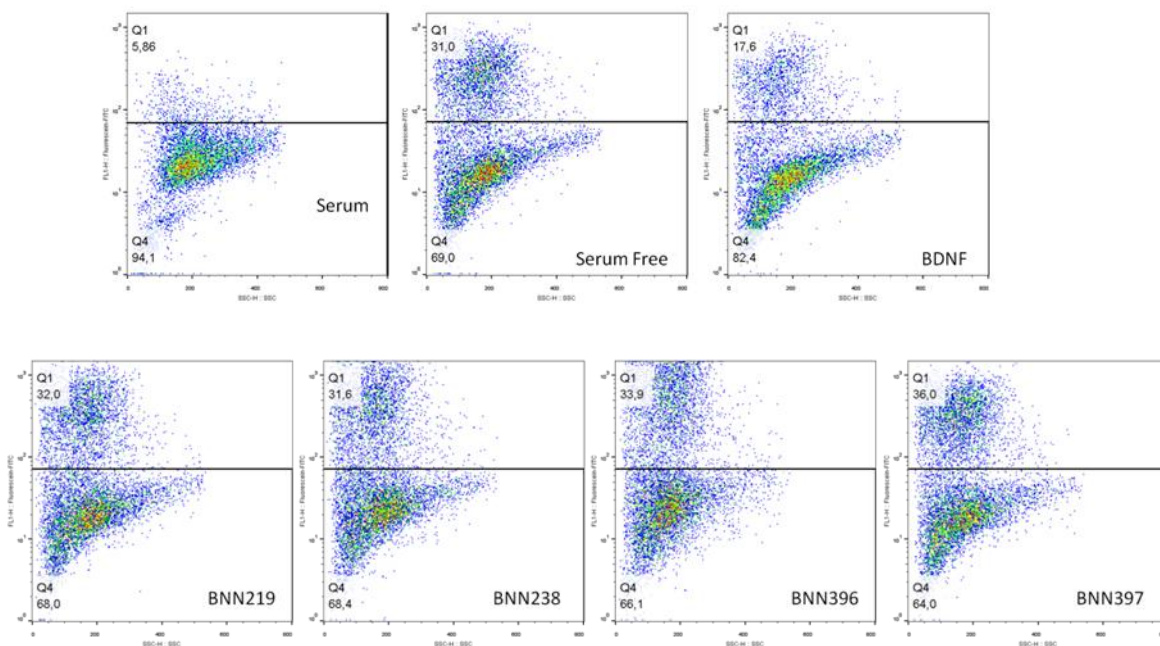
Όσον αφορά τα αποτελέσματα, ανάμεσα σε serum και serum free συνθήκη, υπήρξε μια διαφορά της τάξεως του 25%, που είναι εμφανής τόσο πριν την ανάλυση, μέσω της παρατηρησέως της μορφολογίας των κυττάρων στην εικόνα 7, όσο και μετά την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (εικόνες 8 και 9). Ο BDNF δρα προστατευτικά, μειώνοντας την απόπτωση περίπου κατά 15%. Εν συνεχεία όμως, παρατηρήθηκε πως τα BNN219,-238,-396 και -397, παρουσιάζουν το ίδιο ποσοστό απόπτωσης με τη συνθήκη στέρησης ορού, πράγμα που σημαίνει πως δε δρουν προστατευτικά, ούτε μέσω TrkB.



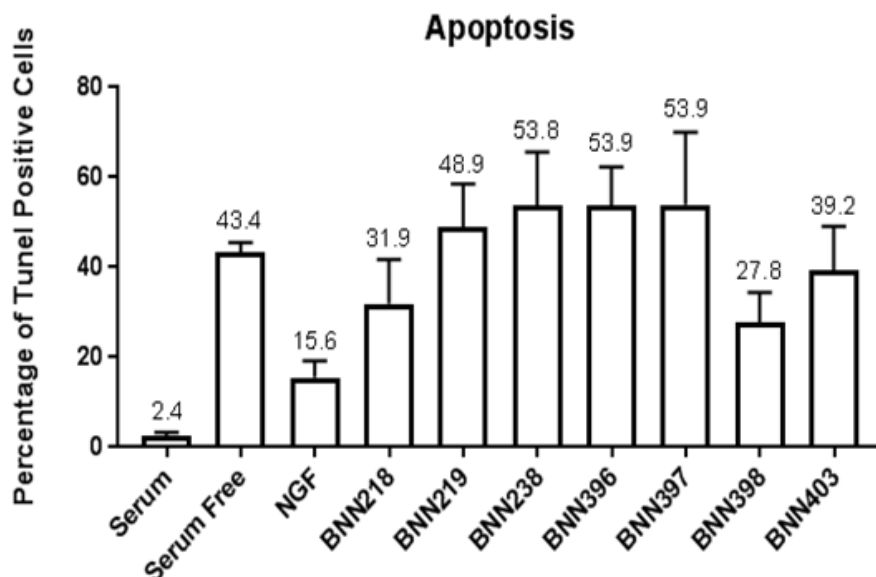
Εικόνα 6 Φωτογραφίες NIH-3T3 κυττάρων μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών. Χρήση BDNF ως θετικό control. Εμφανής διαφορά μεταξύ serum και serum free συνθήκης (serum συνθήκη με ορό, serum free συνθήκη απουσία ορού, BDNF treatment θεραπεία με BDNF).



Εικόνα 7 Ραβδόγραμμα ποσοστών απόπτωσης που προέκυψαν από τις αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής NIH-3T3 κυττάρων, μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών. Η χρώση έγινε με TUNEL.



Εικόνα 8 Αναλύσεις dot plots κυτταρομετρίας ροής NIH-3T3 κυττάρων μετά pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 24 ωρών. Η χρώση έγινε με Tunel. Στο πάνω τμήμα του άξονα, παρουσιάζεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, ενώ ακριβώς από κάτω παρουσιάζεται το ποσοστό των υγιών. Ποσοστά απόπτωσης για τις 24 ώρες: serum 5,86%, serum free 31%, BDNF 17,6%, BNN219 32%, BNN238 31,6%, BNN396 33,9%, BNN397 36%.



Εικόνα 10 Ραβδόγραμμα ποσοστών απόπτωσης που προέκυψαν από τις αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής PC12 κυττάρων μετά το pre-starvation 3 ωρών και το πέρας 48 ωρών. Η χρώση έγινε με Tunel και οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις επαναλήψεις (n=3). Όσον αφορά τις τιμές στατιστικής σημαντικότητας, προέκυψαν μετά από σύγκριση του κάθε δείγματος, με τη συνθήκη στέρησης ορού (ανάλυση t test, μέσος όρος \pm SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, **P<0,01).

Στα αποτελέσματα των 48 ωρών εικόνα 10, ανάμεσα σε serum και serum free συνθήκη, υπήρξε μια διαφορά της τάξεως του 40% ($40,97 \pm 2,364$), κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα μας πειράματα, όπου η απόπτωση σε αυτή τη χρονική στιγμή είναι ιδιαίτερα υψηλή. Ο NGF δρα προστατευτικά, μειώνοντας την απόπτωση κατά $27,79\% \pm 4,223\%$.

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

Λαμβάνοντας υπόψιν μόνο τους μέσους όρους, παρατηρούμε συγκεκριμένα πως φαίνεται να παρέχουν νευροπροστατευτική δράση τα ανάλογα BNN218 και BNN398. Παρ'όλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψιν τις αποκλίσεις μεταξύ των τριών επαναλήψεων (error bars), φαίνεται πως κανένα ανάλογο δε δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, πέρα από τη διαφορά μεταξύ serum και serum free ($P < 0,05$) και τη διαφορά μεταξύ serum free και NGF ($P < 0,05$), που αποτελεί δείγμα control, καθώς και το BNN398 που δείχνει να έχει μία τάση προς σημαντικότητα ($15,57 \pm 6,994$, $P = 0,09$). Οι τιμές στατιστικής σημαντικότητας των υπόλοιπων δειγμάτων, μετά από σύγκριση με το δείγμα serum free, για το BNN218 ήταν $P = 0,32$, για το BNN219 $P = 0,61$, για το BNN238 $P = 0,44$, για το BNN396 $P = 0,23$, για το BNN397 $P = 0,56$ και τέλος, για το BNN403 ήταν $P = 0,70$.

Συζήτηση

Τα ευρήματα στο εργαστήριο μας υποδεικνύουν ότι η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), ένα λιπόφιλο μικρό μόριο, παρουσιάζει νευροπροστατευτικά αποτελέσματα μέσω δέσμησης σε υποδοχείς NGF, TrkA και $p75^{NTR}$, παρέχοντας έναν καλό φαρμακολογικό υποψήφιο με νευροτροφικές δράσεις (Lazaridis et al. 2011). Οι θεραπευτικές ικανότητες της ενεργοποίησης του TrkB χρησιμοποιώντας τον BDNF έχουν αποδειχθεί σε πολλά προκλινικά μοντέλα σε νόσους του ΚΝΣ (Leeds et al., 2005), επικυρώνοντας, έτσι, τον TrkB ως έναν υποσχόμενο στόχο φαρμάκου. Υπαρχει ανάγκη για μόρια που να έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Μελέτες έχουν δείξει ότι για τη διατήρηση ντοπαμινεργικών νευρώνων, ο BDNF μπορεί να αποτελέσει μια θεραπευτική ευκαιρία (Botsakis et al. 2017). Πολλά στοιχεία καταδεικνύουν έναν συγκεκριμένο ρόλο για τον BDNF στον νευρωνικό εκφυλισμό που παρατηρείται στο Parkinson. Είναι ξεκάθαρο, επίσης, ότι η δράση του BDNF στο ΚΝΣ είναι μεγάλη, καθώς και η δυσκολία που μπορεί να αντιμετωπίσουμε για να βρούμε μόρια ικανά να μιμούνται το ενδογενές BDNF.

Τα μόρια αυτά έχει δειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να δρουν ως αγωνιστές υποδοχέων νευροτροφινών στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων εγκεφαλικού τραύματος. Οχτώ νέες μικρονευροτροφίνες BNN- 218, 219, 237, 238, 396, 397, 398, 403 μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία και συγκεκριμένα στην ικανότητα αυτών να ενεργοποιούν τους υποδοχείς νευροτροφινών. Παράλληλα όμως με την μελέτη αυτή άλλες ομάδες του εργαστηρίου πραγματοποίησαν δόκιμες σχετικά με την ανταποδοτική δράση των αναλόγων αυτών.

Τα ευρήματα μας επιδεικνύουν ότι τα συνθετικό μας ανάλογα, BNN218 και BNN398 επάγουν σταθερή φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση της τυροσίνης του TrkB **εικόνα 1-2**. Αυτό φάνηκε σε όλες τις χρονικές δόκιμες, καλύτερος χρόνος ενεργοποίησης για τα προς εξέταση μόρια ήταν τα 10 λεπτά. Όπως είδαμε στα παραπάνω αποτελέσματα τα ανάλογα αυτά δεν επιδρούν στους υποδοχείς TrkA, αρα πιθανόν οι ενώσεις BNN218 και BNN398 έχουν επιλεκτική δράση ως αγωνιστές του TrkB υποδοχέα. Για να επιβεβαιωθεί αυτό είναι απαραίτητο να γίνουν μελέτες binding assay και στις 8 ενώσεις για δειχθεί η εξειδίκευσή τους ως συνδέτες του TrkB υποδοχέα.

Είναι δεδομένη η αντιαποπτωτική δράση του BDNF αυτό φάνηκε και με τα αποτελέσματα στην **εικόνα 6-7**. Οι ενώσεις BNN219, BNN238, BNN396 και BNN397 μελετήθηκαν για την αντιαπόπτωτική τους δράση μέσω κυτταρομετρίας ροής στα NIH-3T3 TrkB κύτταρα και δεν είχαν κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα καθώς επίσης είδαμε ότι δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς μας στα πειράματα φωσφοριώσεις, περάν αυτού όμως είναι απαραίτητο να γίνουν δόκιμες για την αντιαπόπτωτική δράση του BNN218 και BNN398. Ενδιαφέρον θα ήταν όμως να γίνουν μελέτες με τα 8 νέα ανάλογα σε υποδοχείς p75^{NTR} και TrkC.

Επίσης, είναι αναγκαία η μελέτη των μορίων αυτών όχι μόνο για την ενεργοποίηση αλλά και την διερεύνηση του σηματοδοτικού τους προφίλ. Προηγούμενα δεδομένα από το εργαστήριο μας είχαν δείξει ότι το BNN27 είχε διαφορετικό ενδοκυτταρικό μονόπατι σε σχέση με του NGF (Pediaditakis et al. 2016). Επιπλέον, είναι απαραίτητο η ανάπτυξη μικρών μορίων ικανών να ενεργοποιούν τον TrkB υποδοχέα με υψηλή ισχύ και εξειδίκευση. Όπως είπαμε και νωρίτερα το ανάλογο BNN20 μπορεί να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα TrkB όμως δεν έχει ειδίκευση δεδομένου ότι μπορεί να ενεργοποιήσει και τους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR}.

Σίγουρα υπάρχει πολύς δρόμος ακόμα για τη μελέτη αυτών των στοιχείων. Η βασική πληροφορία που μας λείπει είναι αν τα δεδομένα μόρια δρουν ως μίμοι των φυσιολογικών νευροτροφινών. Οι πιθανές ουσίες που θα δρουν ως μίμοι του BDNF και του NGF με τη σειρά τους θα διεγείρουν τους φυσικούς υποδοχείς TrkB και TrkA αντίστοιχα, ενεργοποιώντας έναν μηχανισμό πρόωθησης,

οδηγώντας στην κυτταρική επιβίωση και πιθανώς σε μια νευρογενή διαδικασία, η οποία όμως πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Ο τελικός στόχος μας είναι να ερευνήσουμε την αποτελεσματικότητα της χρόνιας χορήγησης των αναλόγων μας. Πέραν λοιπόν του μοριακού και κυτταρικού μηχανισμού, στόχος του εργαστηρίου είναι η *in vivo* δοκιμή των BDNN αναλόγων σε πειραματικά ζωικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων, κυρίως στη νόσο Alzheimer και Parkinson. Πληροφορίες όπως η αύξηση ή μείωση των νερώνων στις στιβάδες της εκάστοτε εξεταζόμενης περιοχής θα ήταν χρήσιμο στοιχείο για την επιβεβαίωση της δράσης των αναλόγων αυτών. Απώτερός μας σκοπός είναι τα ανάλογα αυτά να βρεθούν υπό κλινικές δοκιμές και τέλος να είναι χρήσιμα στους ανθρώπους που τα έχουν ανάγκη.

Βιβλιογραφία

- Allen, Shelley J. et al. 2013. "GDNF, NGF and BDNF as Therapeutic Options for Neurodegeneration." *Pharmacology and Therapeutics* 138(2): 155–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>.
- Barde, Y A, D Edgar, and H Thoenen. 1982. "Purification of a New Neurotrophic Factor from Mammalian Brain." *The EMBO journal* 1(5): 549–53. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=553086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- BAULIEU, E.-E. 1981. "STEROID HORMONES IN THE BRAIN: SEVERAL MECHANISMS?" In eds. Kjell Fuxe, Jan-Åke Gustafsson, and Lennart B T - Steroid Hormone Regulation of the Brain Wetterberg. Pergamon, 3–14. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080268644500074>.
- Baulieu, E E et al. 1998. "Neurosteroids: A Novel Function of the Brain." *Psychoneuroendocrinology*.
- Bhakar, Asha L et al. 2003. "Apoptosis Induced by P75NTR Overexpression

Requires Jun Kinase-Dependent Phosphorylation of Bad.” *The Journal of neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience.

- Botsakis, Konstantinos et al. 2017. “BNN-20, a Synthetic Microneurotrophin, Strongly Protects Dopaminergic Neurons in the ‘Weaver’ Mouse, a Genetic Model of Dopamine-Denervation, Acting through the TrkB Neurotrophin Receptor.” *Neuropharmacology* 121: 140–57.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.043>.
- Bruno, M A, E J Mufson, J Wu, and A C Cuello. 2009. “Increased Matrix Metalloproteinase 9 Activity in Mild Cognitive Impairment.” *J Neuropathol Exp Neurol* 68(12): 1309–18.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915485>.
- Chao, M V et al. 1986. “Gene Transfer and Molecular Cloning of the Human NGF Receptor.” *Science (New York, N.Y.)* 232(4749): 518–21.
- Chao, Moses V. 2003. “Neurotrophins and Their Receptors: A Convergence Point for Many Signalling Pathways.” *Nature reviews. Neuroscience* 4(4): 299–309.
- Chao, Moses V, and Mark Bothwell. 2002. “Neurotrophins: To Cleave or Not to Cleave.” *Neuron* 33(1): 9–12.
- Chao, Moses V, Rithwick Rajagopal, and Francis S Lee. 2006. “Neurotrophin Signalling in Health and Disease.” *Clinical science (London, England* : 1979) 110(2): 167–73.
- Charalampopoulos, Ioannis et al. 2004. “Dehydroepiandrosterone and Allopregnanolone Protect Sympathoadrenal Medulla Cells against Apoptosis via Antiapoptotic Bcl-2 Proteins.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- . 2006. “G Protein-Associated, Specific Membrane Binding Sites Mediate the Neuroprotective Effect of Dehydroepiandrosterone.” *The FASEB Journal*.
- Charalampopoulos, Ioannis, Iakovos Lazaridis, and Achille Gravanis. 2011. “Neuroprotective and Neurogenic Properties of Dehydroepiandrosterone and Its Synthetic Analogs.” In *Hormones in Neurodegeneration, Neuroprotection, and Neurogenesis*,.
- Charalampopoulos, Ioannis, Eumorphia Remboutsika, Andrew N. Margioris, and Achille Gravanis. 2008. “Neurosteroids as Modulators of Neurogenesis and Neuronal Survival.” *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- Chen, E Y, E J Mufson, and J H Kordower. 1996. “TRK and P75 Neurotrophin Receptor Systems in the Developing Human Brain.” *J Comp Neurol*.
- Clewes, Oliver et al. 2008. “Human ProNGF: Biological Effects and Binding Profiles at TrkA, P75NTR and Sortilin.” *Journal of Neurochemistry*.
- Compagnone, Nathalie A., and Synthia H. Mellon. 2000. “Neurosteroids:

Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators.” *Frontiers in Neuroendocrinology*.

Cosgaya, José M., Jonah R. Chan, and Eric M. Shooter. 2002. “The Neurotrophin Receptor P75NTR as a Positive Modulator of Myelination.” *Science*.

Crowley, Craig et al. 1994. “Mice Lacking Nerve Growth Factor Display Perinatal Loss of Sensory and Sympathetic Neurons yet Develop Basal Forebrain Cholinergic Neurons.” *Cell* 76(6): 1001–11.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867494903786>.

Dubois, Bruno et al. 2016. “Preclinical Alzheimer’s Disease: Definition, Natural History, and Diagnostic Criteria.” *Alzheimer’s & Dementia* 12(3): 292–323.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526016000509>.

Heumann, R, S Korsching, C Bandtlow, and H Thoenen. 1987. “Changes of Nerve Growth Factor Synthesis in Nonneuronal Cells in Response to Sciatic Nerve Transection.” *The Journal of Cell Biology* 104(6): 1623 LP-1631. <http://jcb.rupress.org/content/104/6/1623.abstract>.

Howells, D W et al. 2000. “Reduced BDNF mRNA Expression in the Parkinson’s Disease Substantia Nigra.” *Experimental neurology* 166(1): 127–35.

Huang, Eric J., and Louis F. Reichardt. 2003. “Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction.” *Annual Review of Biochemistry*.

Kaplan, D R et al. 1991. “The Trk Proto-Oncogene Product: A Signal Transducing Receptor for Nerve Growth Factor.” *Science* 252(5005): 554 LP-558. <http://science.sciencemag.org/content/252/5005/554.abstract>.

Klein, R L et al. 1999. “Long-Term Actions of Vector-Derived Nerve Growth Factor or Brain-Derived Neurotrophic Factor on Choline Acetyltransferase and Trk Receptor Levels in the Adult Rat Basal Forebrain.” *Neuroscience* 90(3): 815–21.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452298005375>.

Lazaridis, Iakovos et al. 2011. “Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors, Preventing Neuronal Apoptosis.” *PLoS Biology*.

Levi-Montalcini, Rita, and Pietro U. Angeletti. 1963. “Essential Role of the Nerve Growth Factor in the Survival and Maintenance of Dissociated Sensory and Sympathetic Embryonic Nerve Cells in Vitro.” *Developmental Biology* 7: 653–59.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160663901490?via%3Dihub> (June 9, 2018).

McKay, S E et al. 1996. “The Expression of TrkB and P75 and the Role of BDNF in the Developing Neuromuscular System of the Chick Embryo.” *Development (Cambridge, England)*.

- Nikoletopoulou, Vassiliki et al. 2017. "Modulation of Autophagy by BDNF Underlies Synaptic Plasticity." *Cell Metabolism* 26(1): 230–242.e5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.005>.
- Nykjaer, Anders et al. 2004. "Sortilin Is Essential for ProNGF-Induced Neuronal Cell Death." *Nature*.
- Patapoutian, A, and L F Reichardt. 2001. "Trk Receptors: Mediators of Neurotrophin Action." *Current opinion in neurobiology* 11(3): 272–80.
- Pediaditakis, Iosif et al. 2015. "Dehydroepiandrosterone: An Ancestral Ligand of Neurotrophin Receptors." *Endocrinology*.
- Reichardt, Louis F. 2006. "Neurotrophin-Regulated Signalling Pathways." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361(1473): 1545–64.
- Roux, Philippe P., and Philip A. Barker. 2002. "Neurotrophin Signaling through the P75 Neurotrophin Receptor." *Progress in Neurobiology*.
- Schwartz, P M et al. 1997. "Abnormal Cerebellar Development and Foliation in BDNF-/- Mice Reveals a Role for Neurotrophins in CNS Patterning." *Neuron* 19(2): 269–81.
- Snider, William D. 1988. "Nerve Growth Factor Enhances Arborization of Sympathetic Ganglion Cells in Developing Mammals." *Journal of Neuroscience* 8(July): 2628–34.
<http://www.jneurosci.org/content/8/7/2628.short>.
- Vicario, A. et al. 2015. "Neuron-Type-Specific Signaling by the P75NTR Death Receptor Is Regulated by Differential Proteolytic Cleavage." *Journal of Cell Science* 128(8): 1507–17.
<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.161745>.
- Wang, J.M., R.W. Irwin, and R.D. Brinton. 2006. "Activation of Estrogen Receptor ? Increases and Estrogen Receptor ? Decreases Apolipoprotein E Expression in Hippocampus in Vitro and in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Yang, Jianmin et al. 2014. "ProBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus." *Cell Reports* 7(3): 796–806.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221112471400237X>.
- Zagrebel'sky, Marta, and Martin Korte. 2014. "Form Follows Function: BDNF and Its Involvement in Sculpting the Function and Structure of Synapses." *Neuropharmacology* 76 Pt C: 628–38.
- Zhang, Xuming, Jiehong Huang, and Peter A McNaughton. 2005. "NGF Rapidly Increases Membrane Expression of TRPV1 Heat - gated Ion Channels." *The EMBO Journal* 24(24): 4211 LP-4223.
<http://emboj.embopress.org/content/24/24/4211.abstract>.

