



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

*«Χρήση μεθόδων μοριακής μοντελοποίησης για την
βελτιστοποίηση νέων συνθετικών νευροστεροειδών με
αγωνιστική δράση στους υποδοχείς νευροτροφινών»*



Ξανθόπουλος Κλεάνθης

Πτυχιούχος Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων, ΣΕΥΠ, ΤΕΙ Αθήνας

ΑΘΗΝΑ 2017



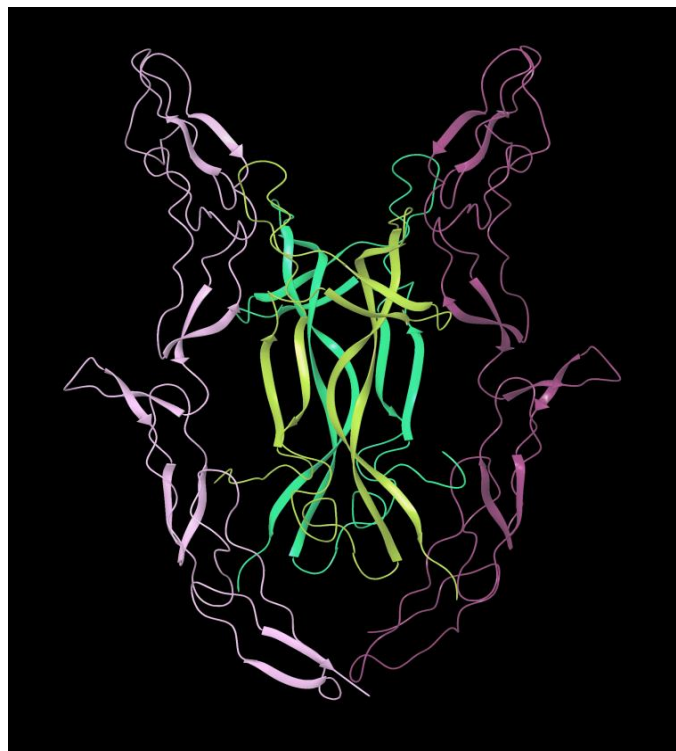
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN "BIOINFORMATICS"

Master Diploma Thesis

*«Optimization of new synthetic neurosteroids with
agonist action towards the neurotrophin receptors, with
the use of molecular modelling»*



Kleanthis Xanthopoulos

Bachelor of Science in Medical Technology, Technological Educational
Institution (TEI) of Athens

ATHENS 2017



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

*«Χρήση μεθόδων μοριακής μοντελοποίησης
για την βελτιστοποίηση νέων συνθετικών
νευροστεροειδών με αγωνιστική δράση
στους υποδοχείς νευροτροφινών»*

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Ερευνήτρια Β' Δρ. Μαρία Ζερβού (Επιβλέπουσα)
*Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης, Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Χημείας
και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)*

Ερευνήτρια Α' Δρ. Θεοδώρα Καλογεροπούλου
*Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Ινστιτούτο Φαρμακευτικής
Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)*

Καθηγητής Κωνσταντίνος Βοργιάς
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ευχαριστίες

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω δύο ανθρώπους που χωρίς αυτούς ίσως να μην είχα καν την δυνατότητα να ξεκινήσω την ακαδημαϊκή μου καριέρα. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τον αγαπητό καθηγητή μου, Καθηγητή Γεώργιο-Αλβέρτο Καρίκα, για την επιμονή και υπομονή που έδειξε κατά την διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων του ΤΕΙ Αθήνας και για το ενδιαφέρον στην φαρμακοκινητική που μου μετέδωσε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Διονύσιο Βουρλούμη, του εργαστηρίου Χημικής Βιολογίας στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, που μου άνοιξε την πόρτα του εργαστηρίου του και μου επέτρεψε να κάνω την πτυχιακή μου σε αυτό κατά την διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, που απαρτίζεται από την Δρ. Μαρία Ζερβού, την Δρ. Θεοδώρα Καλογεροπούλου και τον καθηγητή Κωνσταντίνο Βοργιά.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Δρ. Μαρία Ζερβού υπό την επίβλεψή της οποίας, στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου η παρούσα εργασία. Την ευχαριστώ θερμότατα για την ευκαιρία που μου έδωσε, την άψογη συνεργασία μας και το εξαιρετικό περιβάλλον το οποίο έχει δημιουργήσει στο εργαστήριό της, οπότε και επιτρέπει στους φοιτητές να αναπτυχθούν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου αυτού και ειδικότερα τον Δρ. Κωνσταντίνο Ποταμίτη για την άψογη και άμεση συνεργασία που είχαμε και για όλα όσα μου έμαθε κατά την διάρκειά της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Θεοδώρα Καλογεροπούλου όπως επίσης και τον Δρ. Ιωάννη Χαραλαμπόπουλο, που μαζί με την Δρ. Μαρία Ζερβού, ηγούνται των τριών ερευνητικών ομάδων που διεξάγει την έρευνα αυτή. Τους ευχαριστώ λοιπόν, για την ευκαιρία και την δυνατότητα που μου έδωσαν να είμαι στην συγγραφική ομάδα εργασίας των ομάδων τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω συγγενείς και φίλους που με στήριξαν κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Ευχαριστώ λοιπόν, τον πατέρα μου Παναγιώτη Ξανθόπουλο, την μητέρα μου Δήμητρα Ξανθοπούλου, την αδερφή μου Ερασμία Ξανθοπούλου, τους θείους μου Γιώργο Ξανθόπουλο, Νίκο Μικέ και Κυριάκο Μικέ, τα ξαδέρφια μου Σοφία Κράλλη και Νικήτα Ξανθόπουλο και τον αγαπητό φίλο Στάθη Αποστολίδη.

Σας ευχαριστώ πολύ

Η Παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι αφιερωμένη στην μνήμη της γιαγιάς μου, Ερασμίας Αρίκογλου, και του θείου μου, Παύλου Ξανθόπουλου, που και οι δύο πέθαναν από επιπλοκές της νόσου του Alzheimer.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1Ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2Ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3Ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4Ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποδοχέας των νευροτροφινών $p75^{NTR}$ είναι ένας υποδοχέας που σχετίζεται με εκ διαμέτρου αντίθετες δράσεις προάγοντας την απόπτωση ή την επιβίωση των νευρικών κυττάρων μετά την εκλεκτική ενεργοποίησή του από πρόδρομες ή ώριμες μορφές όλων των νευροτροφινών. Οι πλειοτροπικές δράσεις του εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση του με άλλες λειτουργικές πρωτεΐνες αλλά και την ταυτόχρονη έκφραση άλλων υποδοχέων όπως οι υποδοχείς κινάσης της τροπομυοσίνης (Trks) και η σορτιλίνη.

Η νευροτροφίνη NGF (Nerve Growth Factor, Νευρικός Αυξητικός Παράγοντας) δεσμεύεται εκλεκτικά στον υποδοχέα TrkA και στον υποδοχέα όλων των νευροτροφινών $p75^{NTR}$ και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση των νευρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να δρα ευεργετικά σε νευροεκφυλιστικές νόσους. Όμως, η χορήγησή της νευροτροφίνης ως θεραπευτικό μέσο είναι αποτρεπτική δεδομένης της πολυπεπτιδικής της φύσης και του γεγονότος πως συνδέεται με την πρόκληση πόνου.

Το BNN27, ένα 17-σπείρο-επόξυ ανάλογο του ενδογενούς νευροστεροειδούς DHEA, αποτελεί μια ένωση-οδηγό για την ανάπτυξη φαρμακευτικών ενώσεων με νευροπροστατευτική και αντιαποπτωτική δράση. Αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τους υποδοχείς του NGF, τον TrkA και τον $p75^{NTR}$ ECD, με IC₅₀, 1.86 και 3.9 nM αντιστοίχως, και μιμείται μερικώς τη δράση του NGF. Το BNN27 διασώζει από την απόπτωση συμπαθητικούς και αισθητήριους νευρώνες, μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δεν σχετίζεται με την πρόκληση πόνου. Πειράματα βιομοριακού NMR (1H STD-NMR) έχουν δείξει ότι το BNN27 αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο κομμάτι των υποδοχέων TrkA και $p75^{NTR}$, που αποτελούν και την περιοχή αλληλεπίδρασης του NGF με τους υποδοχείς του. Επίσης έχει δειχθεί πως το BNN27 αλληλεπιδρά και με τις συμπλοκοποιημένες μορφές των υποδοχέων αυτών με τη νευροτροφίνη NGF.

Η παρούσα ερευνητική εργασία αξιοποίησε μία σειρά υπολογιστικών μεθόδων προκειμένου:

- a) Να εντοπιστεί η πιθανή περιοχή/ες αλληλεπίδρασης (hotspots) του BNN27 με την πρωτεΐνη $p75^{NTR}$ ECD και της συμπλόκοποιημένης της μορφής με τον NGF
- b) Να διερευνηθούν διεξοδικά οι αλληλεπιδράσεις του BNN27 με τον υποδοχέα $p75^{NTR}$ ECD και του συμπλόκου $p75^{NTR}$ ECD / NGF καθώς επίσης και η σταθερότητα τους στο χρόνο.

Δια τουτο, διενεργήθηκαν μια σειρά προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής μακράς χρονικής διάρκειας που εξέτασαν τις αλληλεπιδράσεις ενός συνόλου μορίων BNN27,

με το μονομερές p75^{NTR}ECD, με το ασύμμετρο σύμπλοκο p75^{NTR}ECD/NGF 1:2 και το σύμπλοκο p75^{NTR}ECD /proNGF 2:2 τροποποιημένο ώστε να μοντελοποιηθεί η ανθρώπινη νευροτροφίνη NGF.

Αναδείχθηκε η δυνατότητα του BNN27 να εισέρχεται αυθόρμητα από το διαλύτη στις αλληλεπιδρώσεις περιοχές, στη διεπιφάνεια των πρωτεϊνικών συμπλόκων, και να σχηματίζει σταθερές αλληλεπιδράσεις με κρίσιμα αμινοξέα της διεπαφής μεταξύ του NGF και του p75^{NTR}. Έτσι λοιπόν, τα προτεινόμενα hotspots θα μπορούσαν να καθοδηγήσουν περαιτέρω τις προσπάθειες βελτιστοποίησης της ένωσης-οδηγού BNN27.

Abstract

The p75^{NTR} receptor is a pan-neurotrophin receptor which is associated with diverse and opposite actions, promoting either the survival or apoptosis of nerve cells. It is activated by all neurotrophins, as well as their precursor forms, and its pleiotropic signaling is dependent upon its interaction with other functional proteins and the co-expression of other receptors, such as the members of the Tropomyosin receptor kinase family (Trks) or sortilin.

Neurotrophin NGF (Nerve Growth Factor) interacts specifically with the TrkA receptor as well as the pan-neurotrophin receptor p75^{NTR}. NGF holds a central role in the development and maintenance of nerve cells, exerting beneficial effects in neurodegenerative diseases. Its polypeptide nature and its hyperalgesic effects though, prevent its usefulness as a therapeutic agent.

BNN27, a C17-spiroepoxy steroid derivative of the endogenous neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA), is a lead compound with strong neuroprotective and antiapoptotic activity. It interacts specifically with TrkA and p75^{NTR}, with which NGF interacts as well, with IC₅₀ 1.86 and 3.9 nM respectively, mimicking some of the neuroprotective and pro-survival effects of NGF. BNN27 effectively rescues from apoptosis NGF-dependent sympathetic and sensory neurons, penetrates the BBB and doesn't induce hyperalgesia. BioNMR assays (1H-STD NMR) revealed that BNN27 interacts with the extracellular domains (ECDs) of TrkA and p75^{NTR}, which consist the binding domain of NGF, as well as with their complexes with NGF.

In the present thesis we applied a series of computational methods in order to:

- a) Locate the hot spot(s) of the interaction between BNN27 and p75^{NTR}ECD alone as well as between BNN27 and p75^{NTR}ECD's complexed form with NGF.
- b) Investigate thoroughly the interactions of BNN27 with p75^{NTR}ECD alone as well as with the NGF:p75^{NTR}ECD complex, and study the stability of these interactions in the course of time.

Towards these aims a series of long time Molecular Dynamics simulations were performed, that studied the interactions of an ensemble of BNN27 molecules with the monomer p75^{NTR}ECD, the asymmetric complex of p75^{NTR}ECD/NGF 1:2 and a p75^{NTR}ECD /proNGF 2:2 complex modified to model human NGF.

These studies revealed the fruitful interaction of BNN27 with p75^{NTR}ECD as well as with its complexed form with NGF. Interestingly, the potential hot spots lay in the p75^{NTR}/NGF interfacial region and more importantly molecular dynamics simulations highlighted the spontaneous migration of BNN27 from the bulk water towards the proteins' interfacial region and the development of stable interactions with crucial and

important amino acids. As such, the obtained results may further guide the design of optimized ligands acting as neurotrophin mimetics.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1Ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ρόλος των νευροτροφινών

Η οικογένεια των νευροτροφινών αποτελεί μία κατηγορία λειτουργικά και δομικά συγγενών πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση κεντρικών και περιφερειακών νευρώνων^{1,2}

Στα θηλαστικά οι γνωστές νευροτροφίνες είναι ο Νευρικός Αυξητικός Παράγοντας (NGF, Nerve Growth Factor), ο Εγκεφαλικός Νευροτροφικός Παράγοντας (BDNF, Brain derived Neurotrophic Factor), η Νευροτροφίνη 3 (NT3, Neurotrophin 3) και η Νευροτροφίνη 4 (NT4, Neurotrophin 4)^{3,4,5,6,7}.

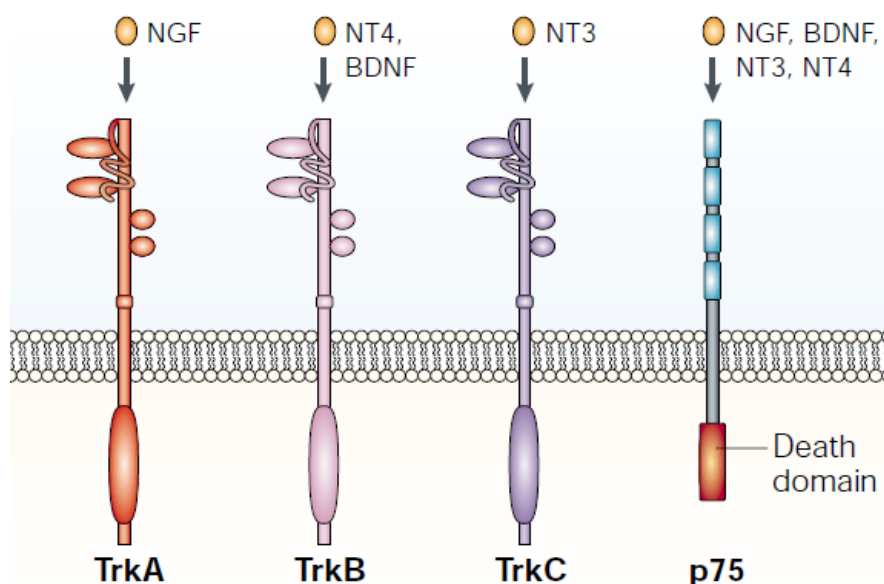
Η δράση των νευροτροφινών διαμεσολαβείται από δύο οικογένειες διαμεμβρανικών υποδοχέων. Η μία οικογένεια είναι η οικογένεια των Κινασικών Υποδοχέων της Τροπομυοσίνης (Tropomyosin receptor kinase, Trk) με τους οποίους οι νευροτροφίνες προσδένουν εκλεκτικά και με μεγάλη συγγένεια (10^{-9} M). Σε αυτή την οικογένεια ανήκουν οι TrkA, TrkB και ο TrkC. Έτσι λοιπόν ο NGF αλληλεπιδρά επιλεκτικά με τον TrkA, οι BDNF και NT4 με τον TrkB και η NT3 με τον TrkC. (εικόνα 1.1). Επίσης οι νευροτροφίνες αλληλεπιδρούν με μικρότερη συγγένεια και χωρίς ειδίκευση με τον υποδοχέα p75^{NTR}.^{4,5,6}

Η πρόσδεση των νευροτροφινών στην εξωκυττάρια περιοχή των Trk υποδοχέων διεγείρει τη δράση κίνησης της τυροσίνης, η οποία εντοπίζεται στην ενδοκυτταρική τους περιοχή με αποτέλεσμα την έναρξη της φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στους ίδιους τους υποδοχείς Trk αλλά και σε διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων (σηματοδοτικοί καταράκτες) που προάγουν την επιβίωση και την ανάπτυξη των νευρώνων και τη νευρωνική διαφοροποίηση. (εικόνα 1.2).^{8,9}

Ο p75^{NTR} δεν έχει καταλυτική δράση και ανήκει στην υπερ-οικογένεια των TNFRs (*Tumor Necrosis Factor Receptors*) και είναι γνωστός βιβλιογραφικά και ως TNFR16. Η πρόσδεση των νευροτροφινών στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα p75^{NTR} εκκινεί την στρατολόγηση διαφόρων μορίων-προσαρμογέων που ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούν αντίθετα μεταξύ τους βιολογικά αποτελέσματα προάγοντας την επιβίωση αλλά και την απόπτωση των νευρώνων. (εικόνα 1.2).^{3,4,6,7,10}

Οι νευροτροφίνες παράγονται από την πρωτεόλυση των πρόδρομων μορφών τους (proneurotrophins), οι οποίες είναι και τα προϊόντα της μετάφρασης. Οι πρόδρομες μορφές των νευροτροφινών είναι μεγέθους 30 – 35 kDa, ενώ οι ώριμες μορφές τους είναι μεγέθους 12 – 13 kDa^{3,6}. Αρχικά θεωρούνταν πως οι πρόδρομες μορφές των νευροτροφινών δεν ήταν λειτουργικά μόρια παρά μοναδικός σκοπός του pro-domain ήταν να οδηγήσει το δίπλωμα της πρωτεΐνης^{3,6}. Νεότερα δεδομένα όμως αποκάλυψαν πως κάτι τέτοιο δεν είναι σωστό. Εκτός λοιπόν από το γεγονός πως το pro-domain

οδηγεί το σωστό δίπλωμα των νευροτροφινών, πλέον τις σχετίζουμε και με τον κυτταρικό θάνατο, δηλαδή παρουσιάζουν αντίθετη δράση από τις ώριμες μορφές των νευροτροφινών^{10,11}. Η ταυτόχρονη δέσμευση της πρόδρομης νευροτροφίνης στους υποδοχείς της σορτιλίνης και p75^{NTR} (p75^{NTR} – proNeurotrophin – Sortilin), προάγει επιλεκτικά τον κυτταρικό θάνατο¹². Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και το γεγονός πως οι πρόδρομες μορφές των νευροτροφινών φαίνεται να αλληλεπιδρούν με υψηλότερη συγγένεια με τον p75^{NTR} και με μικρότερη συγγένεια με τους Trk³.

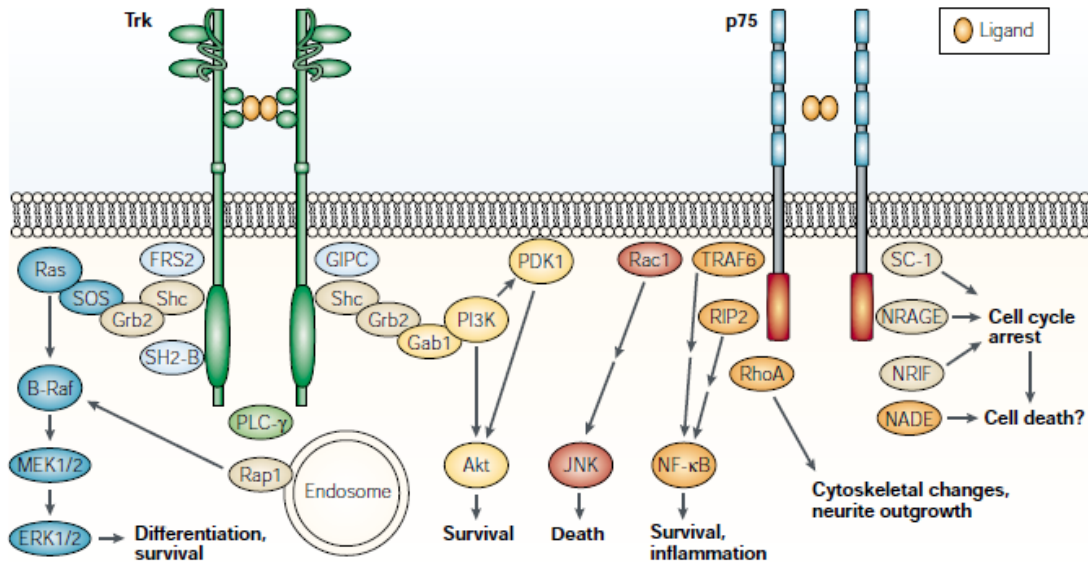


Εικόνα 1.1: Οι νευροτροφίνες παρουσιάζουν εξειδίκευση στην αλληλεπίδρασή τους με τους Trk υποδοχείς, ενώ ο p75^{NTR} αλληλεπιδρά μη εκλεκτικά με όλες τις νευροτροφίνες. Επίσης στην περίπτωση του p75^{NTR} μπορούμε να δούμε και τις τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες, γνωστές και ως CRDs, καθώς και το Death Domain (DD).

** τροποποιημένη εικόνα από “Neurotrophins and their Receptors: a Convergence Point for Many Signalling Pathways”, Moses V. Chao, Nature Reviews, Neuroscience, Vol. 4, April 2003*

Οι ώριμες νευροτροφίνες σχηματίζουν ομοδιμερή τα οποία αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους οι οποίοι επίσης διμερίζονται⁶. Παλιότερα θεωρούνταν πως οι Trk έχουν υψηλότερη συγγένεια με τις νευροτροφίνες από ό,τι ο p75^{NTR}. Πλέον ξέρουμε όμως πως αυτό δεν ισχύει. Οι Trk αυτοί καθ' αυτοί έχουν παραπλήσια συγγένεια με τις νευροτροφίνες με αυτήν που παρουσιάζει ο p75^{NTR} για αυτές, που είναι της τάξης των 10⁻⁹ M. Παρουσία όμως του p75^{NTR}, οι Trk αυξάνουν την συγγένειά τους με τις νευροτροφίνες κατά 100 φορές, φτάνοντας την τάξη των 10⁻¹¹ M. (εικόνα 1.3) Έχει προταθεί ότι αυτό οφείλεται σε ετεροδιμερισμό των p75^{NTR}:Trks με τον p75^{NTR} να δρά ως συνυποδοχέας για τους Trks.^{6,13} Ενδιαφέρον εδώ παρουσιάζει το γεγονός πως μπορεί να υπάρξει ομοδιμερισμός δύο ίδιων Trk πρωτεϊνών, ομοδιμερισμός δύο p75^{NTR} ή ετεροδιμερισμός μεταξύ μίας Trk πρωτεΐνης και του p75^{NTR}. Για παράδειγμα έχει δείχτει πως το ομοδιμερές του NGF αλληλεπιδρά είτε με δύο TrkA υποδοχείς, είτε με έναν p75^{NTR} και έναν TrkA Σε κάθε περίπτωση το ομοδιμερές του NGF θα ενεργοποιήσει διαφορετικό σηματοδοτικό μονοπάτι⁶. Ως εκ τούτου, γίνεται κατανοητό πως οι δύο υποδοχείς (Trk και p75^{NTR}) μπορούν να δράσουν συνεργατικά, ανταγωνιστικά ή ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον.¹⁴

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ενδοκυτταρική παραμεμβρανική περιοχή $p75^{ICD}$ (ακολουθία c29 αποτελούμενη από τα αμινοξέα 274-308) του $p75^{NTR}$ αλληλεπιδρά με τον TrkA και διαμορφώνει την πρόσδεση του NGF στον TrkA ενισχύοντας τη και προάγοντας τη νευροτροφική δράση του. Προτείνεται ότι το θραύσμα αυτό παράγεται κατόπιν ρυθμισμένης πρωτοεόλυσης του πλήρους μήκους υποδοχέα $p75^{NTR}$ και αλληλεπιδρά με τον TrkA διαμορφωτικές αλλαγές στο εξωκυττάριο τμήμα του TrkA^{ECD}.¹⁵

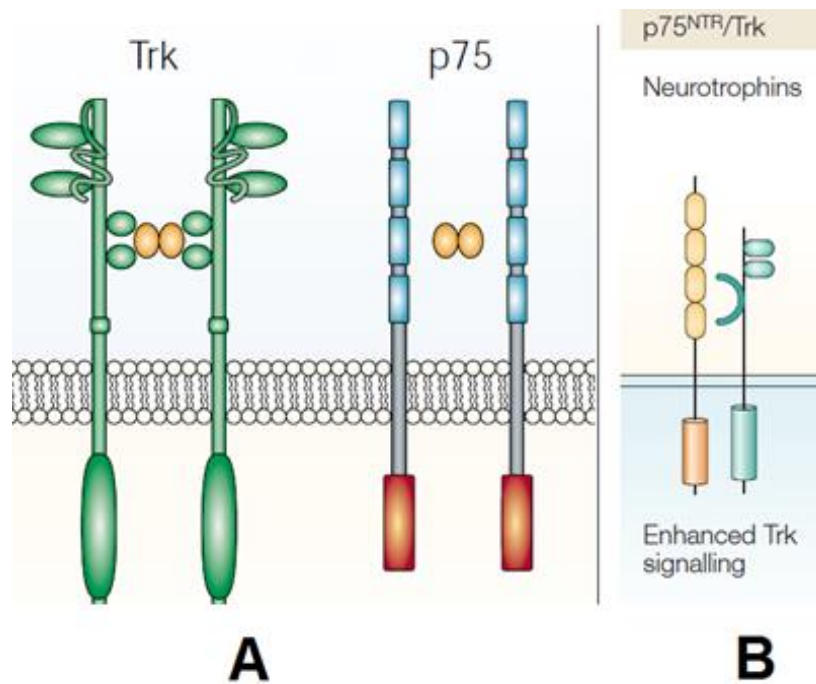


*Εικόνα 1.2**. Αλληλεπιδράσεις νευροτροφινών με τους υποδοχείς Trk και $p75^{NTR}$ και ενεργοποίηση κύριων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Κάθε υποδοχέας Trk ελέγχει τρεις κύριες οδούς σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση του Ras οδηγεί στην ενεργοποίηση του καταρράκτη κινάσης MAP που προάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης των νευριτών. Η ενεργοποίηση της PI3 κινάσης μέσω Ras ή Gab1 προάγει την επιβίωση.

Η ενεργοποίηση του PLC- γ έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μονοπατιών που προάγουν τη συναπτική πλαστικότητα. Κάθε ένα από τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια ρυθμίζει επίσης τη μεταγραφή γονιδίων.

Ο υποδοχέας $p75^{NTR}$ ρυθμίζει σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με την επιβίωση και την απόπτωση. Η ενεργοποίηση του NF- κ B οδηγεί σε μεταγραφή πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων αρκετών που προάγουν την επιβίωση των νευρώνων. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης Jun ελέγχει την ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων, μερικά από τα οποία προάγουν την νευρωνική απόπτωση. Η δέσμευση της νευροτροφίνης στον υποδοχέα $p75^{NTR}$ ρυθμίζει επίσης τη δραστηριότητα της Rho GTPασης, η οποία ελέγχει την ανάπτυξη των νευριτών.

*εικόνα από *Neurotrophins and their Receptors: A Convergence point for many signalling pathways*, Moses V. Chao, *Nature Reviews Neuroscience* 2003, vol 3



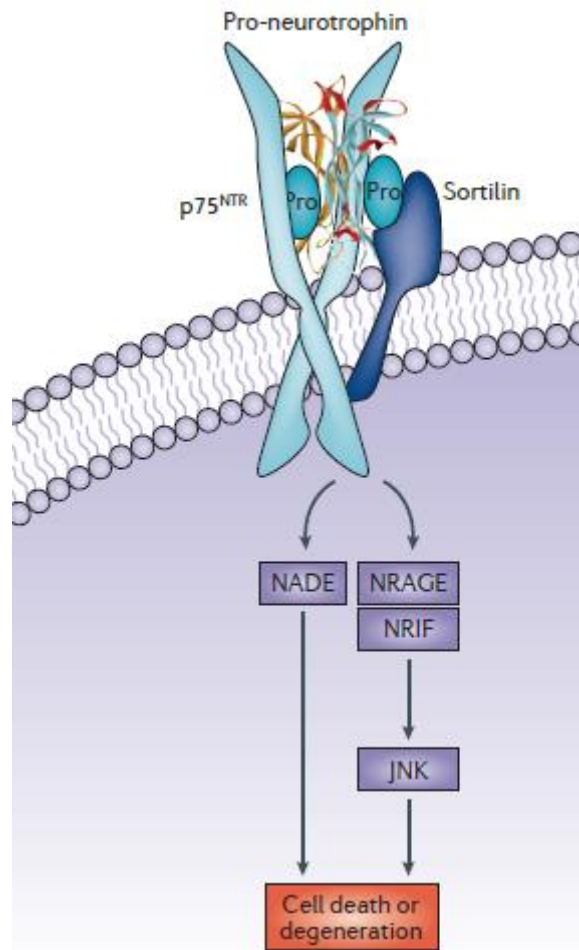
Εικόνα 1.3: (Α) Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων των νευροτροφινών με τους υποδοχείς Trk και p75^{NTR}. Η συγγένεια των νευροτροφινών προς τους υποδοχείς Trk και p75^{NTR} είναι παρόμοια (10^{-9} M). (Β) Η παρουσία του p75^{NTR} αυξάνει την συγγενεία των Trk για τις νευροτροφίνες κατά 100 φορές, φτάνοντας την τάξη των 10^{-11} M

** εικόνα από "Neurotrophins and their Receptors: A Convergence Point for Many Signalling Pathways", Moses V. Chao, Nature Reviews, Neuroscience, Vol. 4, April 2003 και "The Yin and Yang of Neurotrophin Action", Bai Lu et al, Nature Neuroscience, Vol. 6, August 2005*

Σε κύτταρα με υψηλή αναλογία έκφρασης TRK / p75^{NTR}, οι πρόδρομες νευροτροφίνες μπορούν να προάγουν ή τουλάχιστον να μην βλάπτουν, την επιβίωση. Από την άλλη, κύτταρα με μικρό λόγο TRK / p75^{NTR} υποβάλλονται σε αποπτωτικό θάνατο.¹²

Πρόσφατη μελέτη υποδεικνύει ότι ο proNGF αλλά όχι ο ώριμος NGF μεταβαίνει από νευροτροφική σε αποπτωτική δράση αντιδρώντας σε μείωση των επιπέδων του TrkA. Η μελέτη έδειξε ότι τόσο ο NGF όσο και ο proNGF μπορούν να υποστηρίξουν την κυτταρική επιβίωση σε κύτταρα που εκφράζουν TrkA. Ωστόσο, όταν μειώνεται το TrkA, το proNGF σηματοδοτεί κυτταρικό θάνατο, ενώ ο NGF δεν εμφανίζει δραστηριότητα. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν επίσης το μοντέλο ότι το proNGF είναι νευροτροφικός υπό κανονικές συνθήκες, αλλά ότι μια απώλεια στο TrkA παρουσία του p75^{NTR} και της σορτιλίνης, όπως συμβαίνει σε νευροεκφυλιστική ασθένεια ή τραυματισμό, μετατοπίζει τη σηματοδότηση του proNGF, αλλά όχι του NGF, από την κυτταρική επιβίωση στον κυτταρικό θάνατο.¹¹ (εικόνα 1.4)

Συνολικά, τα ερευνητικά δεδομένα μέχρι τώρα δείχνουν ότι υπάρχει μια λειτουργική ισορροπία της σηματοδότησης των νευροτροφινών στο κεντρικό νευρικό σύστημα που ρυθμίζεται από το λόγο TRK / p75^{NTR} και το λόγο των πρόδρομων/ώριμων νευροτροφινών. Η ισορροπία αυτή μπορεί να διαταραχθεί σε καταστάσεις ασθενειών. Αυξημένα επίπεδα πρόδρομων νευροτροφινών έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές καταστάσεις όπως με τη νόσο του Alzheimer, την επιληψία και τη γήρανση.¹²



Εικόνα 1.4*: Η σύνδεση της πρόδρομης νευροτροφίνης σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα p75^{NTR} και την σορτιλίνη ενεργοποιεί επιλεκτικά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο. Η δομή του pro-domain της πρόδρομης νευροτροφίνης δεν είναι λυμένη, *τροποποιημένη εικόνα από “Longo, F. M. & Massa, S. M. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 507–525 (2013)”

Συνοψίζοντας, το σύστημα των νευροτροφινών παρουσιάζει εκ διαμέτρου αντίθετες δράσεις, ένα πολύπλοκο φαινόμενο όμως που δεν είναι πλήρως κατανοητό ακόμα. Σε γενικές γραμμές όμως μπορούμε να πούμε πως το σύστημα των νευροτροφινών μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση του κυτταρικού θανάτου σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις λόγω της αύξησης των πρόδρομων μορφών των νευροτροφινών, της μείωσης της έκφρασης των Trk και της αύξησης της έκφρασης του p75^{NTR}. Έτσι λοιπόν γίνεται αντιληπτό πως το σύστημα των νευροτροφινών αποτελεί ελκυστικό φαρμακευτικό στόχο.

1.2 Το σύστημα των νευροτροφινών ως θεραπευτικός στόχος.

Προκλινικές μελέτες υποδεικνύουν το θεραπευτικό δυναμικό των νευροτροφινών (NTs) στην πρόληψη ή την επιβράδυνση της εξέλιξης των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Έτσι η χορήγηση των νευροτροφινών έχει προταθεί ως θεραπεία έναντι των νόσων του Alzheimer (AD), του Parkinson (PD), της Αμυοτροφικής Πλάγιας Σκλήρυνσης (ALS) και της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (MS)^{16,17,18,19,20,21}. Ωστόσο το φτωχό φαρμακοκινητικό προφίλ των νευροτροφινών, λόγω της πολυπεπτιδικής τους φύσης, συνδέεται με αυξημένη ευαισθησία στην πρωτεόλυση, με την περιορισμένη δυνατότητά τους να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) και με την περιορισμένη ικανότητα διάχυσης στους ιστούς, καθιστώντας την φαρμακευτική τους χρήση απαγορευτική¹⁹.

Η ενδοφλέβια έγχυση NGF σε ασθενείς με AD είχε θετική επίδραση, αλλά παρατηρήθηκαν σημαντικές παρενέργειες, όπως ο πόνος στην πλάτη και η απώλεια βάρους²². Παρομοίως η ενδορραχιαία χορήγηση ανασυνδυασμένου ανθρώπινου BDNF σε ασθενείς με ALS έδειξε ανεπιθύμητες ενέργειες και δεν παρουσίασε καμία συμπτωματική βελτίωση²³.

Ο υποδοχέας των νευροτροφινών p75^{NTR}, του οποίου η έκφραση έχει διακοπεί στο στάδιο της ενηλικίωσης, επιστρέφει σε επίπεδα που είχε κατά την διάρκεια της ανάπτυξης σε περιπτώσεις νευρικής βλάβης όπως ο τραυματισμός ή ο εκφυλισμός των νευρωνικών αλλά και των γλοιακών κυττάρων¹⁴.

Επίσης έχει δειχθεί πως η έκφραση του p75^{NTR} είναι αυξημένη σε ζωικό μοντέλο (ποντικών) για την ALS καθώς επίσης και στην σπονδυλική στήλη ασθενών με ALS¹⁴. Επίσης ο p75^{NTR} είναι αυξημένος σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας¹⁴ και ασθενείς με Alzheimer's¹⁴. Επιπροσθέτως σε ασθενείς με Alzheimer's έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα proNGF και μειωμένα επίπεδα NGF^{14,24}.

Μελέτες έχουν δείξει πως το Αβ αμυλοειδές πεπτιδίον, που φαίνεται να σχετίζεται με την νευροτοξικότητα της νόσου του Alzheimer, αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα του p75^{NTR} οδηγώντας τα νευρικά κύτταρα σε θάνατο.^{14,24,25} Πιο συγκεκριμένα, το Αβ πεπτιδίον αλληλεπιδρά με τον p75^{NTR} των χολινεργικών νευρώνων, που εκφράζουν στην μεμβράνη τους τον p75^{NTR} σε σημαντικό βαθμό²⁴. Οι Devarajan και Sharmila εντόπισαν την περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ του p75^{NTR} και του Αβ-42 πεπτιδίου στις περιοχές CRD1 και CRD2 του p75^{NTR}. Η εργασία τους όμως περιορίζεται από το γεγονός πως η προσομοίωση της Μοριακής Δυναμικής που έκαναν κράτησε μόνο 2 ns²⁵. Οι Areechun Sotthibundhu et al από την μεριά τους με πειράματα που έκαναν σε ποντίκια, έδειξαν πως η παρουσία του p75^{NTR} είναι απαραίτητη για την νευροτοξικότητα του Αβ-42 πεπτιδίου, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποίησαν²⁴. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να αποκλειστεί πως σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου, το πεπτιδίον δεν θα έχει νευροτοξική δράση ακόμα και απουσία του p75^{NTR}. Όμως τα αρχικά στάδια της Alzheimer's αποδίδονται στην αλληλεπίδραση p75^{NTR} και Αβ πεπτιδίου¹⁴.

Παρά την προ-αποπτωτική ροή του p75^{NTR}, τα ερευνητικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο υποδοχέας αυτός μπορεί επίσης να προωθήσει την επιβίωση ειδικών τύπων νευρώνων και άλλων κυττάρων. Η προ-επιβιωτική δράση του p75NTR εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία λειτουργικών μορίων-προσδετών και την ταυτόχρονη έκφραση άλλων υποδοχέων που αλληλεπιδρούν με το p75NTR, όπως οι Trks και η Sortilin.^{6,12,26, 27}

Όπως ήδη έχει αναφερθεί οι νευροτροφίνες δεν μπορούν να μεταφερθούν στην κλινική πράξη. Μία πιθανή προσέγγιση για την αντιμετώπιση των περιορισμών της θεραπευτικής χρήσης των νευροτροφινών είναι η ανάπτυξη συνθετικών, μικρών μορίων, μιμητών των νευροτροφινών, με ευνοϊκές φαρμακοκινητικές ιδιότητες, αποτελεσματική διείσδυση στους ιστούς και στοχοθετημένες βιολογικές δράσεις¹².

Πρόσφατα η σάρωση βιβλιοθηκών μικρών μορίων έχει αναγνωρίσει έναν μικρό αριθμό φυσικών προϊόντων και συνθετικών ενώσεων ικανών να αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο σε καλλιέργειες νευρώνων^{12,28,29,30}.

Ο πίνακας 1.1 συνοψίζει την τρέχουσα κατάσταση σχετικά με την ανάπτυξη μικρών μορίων με νευροτροφική δράση και την προηγούμενη εμπειρία με τις νευροτροφίνες στην θεραπεία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών¹⁶. Παρόλο που έχει υπάρξει σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών μορίων, χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης και η εξειδίκευση τους προς τον στόχο ενδιαφέροντος προκειμένου να επιτευχθεί η μετάβαση από μοντέλα ζώων σε κλινικές μελέτες.

Disease	Target	Outcomes		Clinical trials	
		Tested in animal models			
		Small Molecules	NTs		
Alzheimer's	TrkA	D3	NGF	NGF: intravitreal delivery failed due to pain. Successful phase 1 adenovirus delivery.	
		Gambogic acid derivatives Idebenone (indirect)			
	TrkB	Paecilomycine A derivatives Deoxygudunin	BDNF		
	p75	TK-21 (indirect) LM11A-31 LM11A-24			
Parkinson's	Ret	TrkA and TrkB	Xaliproden (indirect) Amitriptyline	GDNF	Xaliproden: increases NGF and BDNF, two phase 3 clinical trials failed to improve symptoms. GDNF: intravitreal delivery and delivery using viral vectors failed to meet clinical trial endpoints and conveyed significant side effects.
		TrkB	7,8-DHF Deoxygudunin		
Huntington's	TrkB	7,8-DHF LM22A-4 Amitriptyline	BDNF	Riluzole: increased BDNF and transforming growth factor beta-1, and improved symptoms.	
Amyotrophic Lateral Sclerosis	TrkB	7,8-DHF	BDNF	BDNF: intrathecal delivery provided no significant symptomatic or survival improvement. Xaliproden: decreased progression to respiratory failure but did not improve overall survival.	
		TrkA and TrkB	Riluzole (indirect) Xaliproden (indirect)		CNTF/Axokine
Retinitis Pigmentosa	CNTRa			CNTF: NT-501 implant showed no significant improvements in RP patients after 12 month followup, in phase 2 clinical trial.	
Glaucoma	Ret		GDNF	NGF: visual improvements with eye drops; controversial (n = 3, multiple high doses)	
	TrkA	D3	NGF NGF-30 (TrkA selective)		
	TrkB	7,8-DHF Brimonidine (indirect)	BDNF		
Dry Eye	TrkA	p75	THX-B LM11A-24	NGF-A (p75 selective)	
		Ret		GDNF	
Diabetic Retinopathy	TrkA			NGF: Ongoing trials D3: Phase 3 completed, visual and symptomatic improvements over placebo	
		p75	THX-B		NGF
		TrkB	Rutin (indirect)		BDNF

Πίνακας 1.1*: Χαρακτηριστικά παραδείγματα νόσων που έχουν γίνει προσπάθειες να στοχευθούν με την χρήση νευροτροφινών ή μόρια μικρού μοριακού βάρους.

* εικόνα από: Josephy-herandez, S., Jmaeff, S., Pirvulescu, I., Aboukassim, T. & Saragovi, H. U. *Neurobiology of Disease Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents: An evolving paradigm*. Neurobiol. Dis. **97**, 139–155 (2017)

1.3. Η δομή του p75^{NTR}

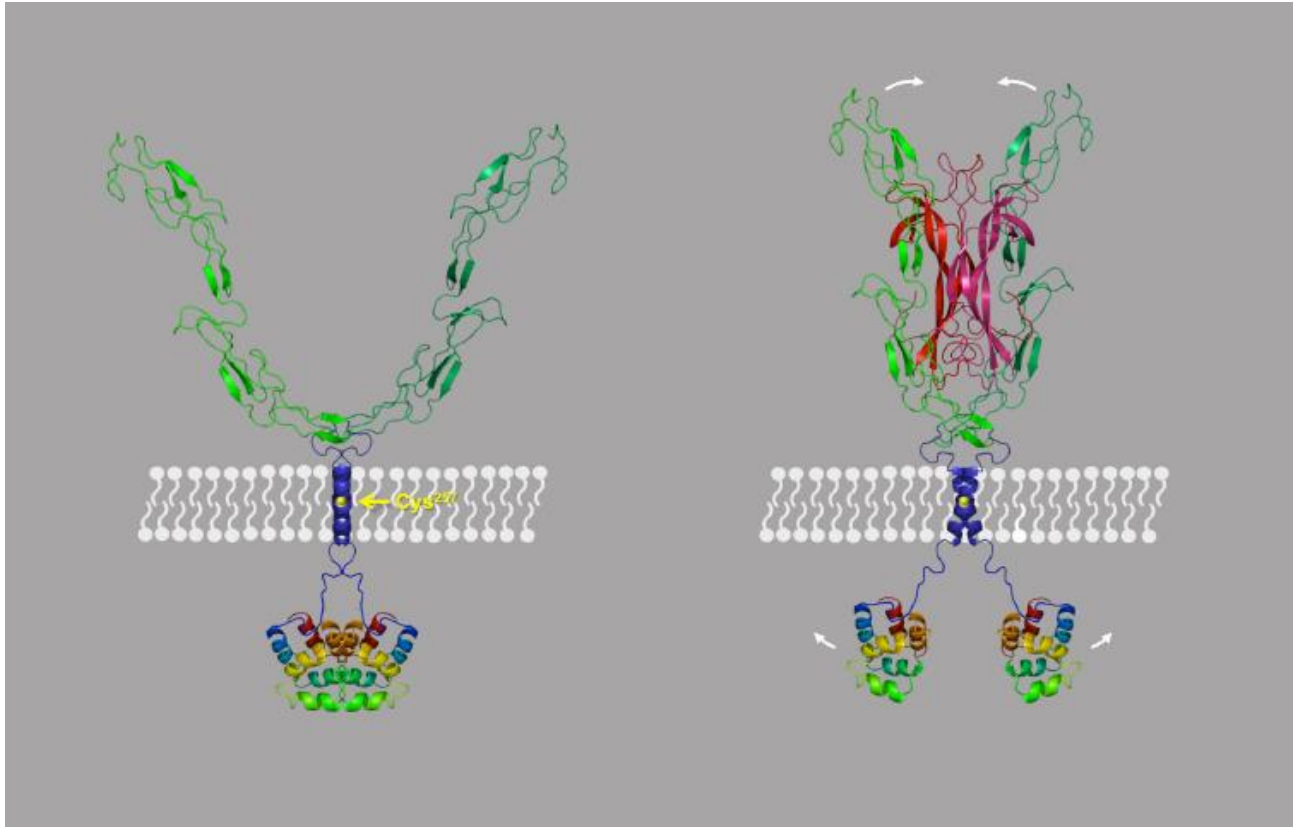
Ο p75^{NTR} είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, κάτι που σημαίνει πως διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη μία φορά, με το N-άκρο της να βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Το εξωκυττάριο τμήμα του p75^{NTR} είναι πλούσιο σε κυστεΐνες, τις οποίες και εντοπίζουμε σε τέσσερις δομικές περιοχές (εικόνα 2.1). Αυτές στην βιβλιογραφία θα τις συναντήσουμε ως Cysteine Rich Domains (CRDs)¹³. Μεταξύ τους δημιουργούν 12 ζεύγη δισουλφιδικών δεσμών που έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση της ευελιξίας της πρωτεΐνης¹³.

Στο διαμεμβρανικό τμήμα, η Gly²⁶⁶ έχει καθοριστικό ρόλο για τον σχηματισμό των ομοδιμερών p75^{NTR}, δεδομένου πως μετάλλαξη στην θέση αυτή (G266I) οδηγεί σε κατάργηση της δυνατότητας ομοδιμερισμού των υποδοχέων p75^{NTR}³¹. Επίσης σημαντικό ρόλο στον ομοδιμερισμό του p75^{NTR} έχει και η Cys²⁵⁷ μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού που σχηματίζεται^{14,31} μεταξύ των δύο p75^{NTR}. Μάλιστα έχει βρεθεί πως αυτά τα ομοδιμερή είναι προσχηματισμένα^{13,31} και δεν χρειάζονται την παρουσία των νευροτροφινών για να σχηματιστούν. Παρόλα αυτά η Cys²⁵⁷ δεν είναι απαραίτητη για τον ομοδιμερισμό των p75^{NTR}, δεδομένου πως σε περιπτώσεις που έχει γίνει μετάλλαξη της σε αλανίνη (C257A), τα ομοδιμερή p75^{NTR} εξακολουθούν να παρατηρούνται³¹. Παρόλα αυτά, μόνο τα ομοδιμερή “αγρίου τύπου”, που περιέχουν Cys²⁵⁷, φαίνεται να είναι λειτουργικά κατόπιν αλληλεπίδρασης με τον NGF³¹. Όσον αφορά την λειτουργία του ομοδιμερούς p75^{NTR}, αυτή δεν έχει μελετηθεί επαρκώς και φαίνεται να εξαρτάται από την νευροτροφίνη με την οποία θα αλληλεπιδράσει το ομοδιμερές p75^{NTR}, και φαίνεται πως αυτό καθ’ αυτό το ομοδιμερές p75^{NTR} δεν σχετίζεται με την απόπτωση^{32,31}.

Ενδοκυττάρια εντοπίζουμε μία ευέλικτη παραμεμβρανική περιοχή που ακολουθείται από το Death Domain (DD)^{13,31}. Όταν οι νευροτροφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με ομοδιμερή p75^{NTR} αγρίου τύπου”, που περιέχουν Cys²⁵⁷, προκαλείται στεροδιατακτική αλλαγή στο ενδοκυττάριο τμήμα του p75^{NTR} με πιθανότερο αποτέλεσμα τον αποχωρισμό των ενδοκυττάρια τμημάτων των p75^{NTR} προάγοντας την ενδοκυττάρια αλληλεπίδραση των p75^{NTR} με άλλες πρωτεΐνες και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών.³¹ Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο που προσομοιάζει την λειτουργία ενός ψαλιδιού κατά την αντίθετη φορά (εικόνα 1.5) σημαντικό ρόλο παίζει και μία τριάδα προλινών (Pro²⁹⁵ - Pro²⁹⁶ - Pro²⁹⁷), που βρίσκεται στην παραμεμβρανική περιοχή³¹

Συνοψίζοντας, ο p75^{NTR} σχηματίζει ομοδιμερή μέσω δισουλφιδικών δεσμών ανεξάρτητα από την παρουσία της νευροτροφίνης. Η λειτουργία του ομοδιμερούς p75^{NTR} φαίνεται να εξαρτάται από την νευροτροφίνη με την οποία θα αλληλεπιδράσει ενώ επίσης φαίνεται πως αυτό καθ’ αυτό το ομοδιμερές p75^{NTR} δεν σχετίζεται με την απόπτωση.^{31,32}

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του p75^{NTR} περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του εξωκυττάρια διμερούς τμήματος με το ομοδιμερές της νευροτροφίνης, ενώ η επαγόμενη διαμορφωτική αλλαγή προκαλεί και τη στεροδιατακτική αλλαγή στο ενδοκυττάριο τμήμα των δύο συνδεδεμένων με δισουλφιδικό δεσμό υπομονάδων (αποχωρισμός των δύο ενδοκυττάρια τμημάτων) κάτι που επιτρέπει την “στρατολόγηση” (recruitment) άλλων πρωτεϊνών.



Εικόνα 1.5*: Το προτεινόμενο μοντέλο ενεργοποίησης του ομοδιμερούς $p75^{NTR}$, από τις νευροτροφίνες, κατά τους Vilar et al.

*εικόνα από "Activation of the $p75$ neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers", Vilar et al, *Neuron*. 2009 April 16; 62(1): 72–83

1.4. Η δομή του συμπλόκου NGF/p75^{NTR}

Οι CRDs του p75^{NTR} είναι βασικές περιοχές αλληλεπίδρασης κατά την αλληλεπίδραση του p75^{NTR} με τις νευροτροφίνες¹³. Αν και αρχικά έρευνες είχαν υποδείξει πως η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται σε στοιχειομετρία 2:2¹³ (ένα ομοδιμερές νευροτροφινών αλληλεπιδρά με ένα ομοδιμερές p75^{NTR}), όταν λύθηκε η δομή του συμπλόκου NGF/p75^{NTR}ECD από τους He και Garcia το 2004³³, αυτή ήταν σε στοιχειομετρία 2:1, δηλαδή ένα ομοδιμερές NGF αλληλεπιδρούσε με μία και μόνο αλυσίδα p75^{NTR}. Αυτό το αποτέλεσμα ερχόταν σε αντίθεση με όσα ήταν ως εκείνη την στιγμή γνωστά¹³, όπως επίσης και με με πειράματα χαρακτηρισμού των αλληλεπιδράσεων του απομονωμένου p75ECD με τον NGF σε υγρή φάση³⁴ όπως επίσης και με τον κρύσταλλο του συμπλόκου NT3/p75^{NTR}, ο οποίος λύθηκε το 2008 από τους Yong Gong et al³⁵ και ο οποίος παρουσίαζε στοιχειομετρία 2:2.

Προτάθηκε λοιπόν πως τα αντίθετα αυτά ευρήματα οφείλονται στην μη γλυκοζυλίωση του p75^{NTR} κατά την διαδικασία της κρυστάλλωσης από τους He και Garcia, δεδομένου πως στο πρωτόκολλό τους χρησιμοποίησαν τουνικαμυκίνη¹³. Αυτή η πρόταση όμως δεν μπορεί να γίνει δεκτή δεδομένου πως στο ίδιο εργαστήριο και με το ίδιο πρωτόκολλο οι Dan Feng et al, το 2010, κρυστάλλωσαν το σύμπλοκο του proNGF/p75^{NTR}ECD σε στοιχειομετρία 2:2³². Επίσης έχει δειχθεί πως ο γλυκοζυλίωση δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ της νευροτροφίνης και του p75^{NTR}.

Η επικρατούσα πλέον άποψη είναι πως το ασύμμετρο σύμπλοκο πιθανώς προέκυψε από παγίδευση του συμπλόκου 2:2 NGF/p75^{NTR} κατά τη διάρκεια κρυστάλλωσης του NGF/ p75^{NTR} και ότι πρόκειται για μία αρχική κατάσταση κατά τη διάρκεια σχηματισμού του τελικού 2:1 NGF/p75^{NTR} συμπλόκου, υποδεικνύοντας την ύπαρξη μιας δυναμικής ισορροπίας των δύο στοιχειομετριών σύμφωνα και με μελέτες με την τεχνική του multi-angle light scattering³²

Όσον αφορά το γεγονός πως η πρωταρχική στοιχειομετρία είναι η 2:2 έχουμε βιοχημικές αναλύσεις που έχουν υποδείξει πως ο p75^{NTR}, όπως και πολλά άλλα μέλη της υπερ-οικογένειας των TNFRs, δημιουργούν προσχηματισμένα ομοδιμερή στην επιφάνεια του κυττάρου¹³. Πιο συγκεκριμένα για τον p75^{NTR} έχουμε τα αποτελέσματα των Vilar et al³¹ οι οποίοι παρατήρησαν προσχηματισμένα ομοδιμερή p75^{NTR}, όπως έχει ήδη εκτεθεί στο Κεφ. 1.3

Τέλος, οι A. C. Pimenta et al³⁶ μελέτησαν το σύμπλοκο proNGF/p75^{NTR} με την τεχνική της Μοριακής Δυναμικής, και ξεκινώντας από την στοιχειομετρία 2:2, σε διάστημα 100 ns κατέληξαν στην στοιχειομετρία 2:1. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να μπορεί στην συνέχεια να δημιουργηθεί το σύμπλοκο p75^{NTR} – proNGF – Sortilin (1:2:1), το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο τα νευρικά κύτταρα. Έτσι λοιπόν βλέπουμε πως το σύμπλοκο proNGF/p75^{NTR} περνά από την μία στοιχειομετρία στην άλλη, μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα.

1.5. Οι αλληλεπιδράσεις στο σύμπλοκο NGF/p75^{NTR} (στοιχειομετρίας 2:1)

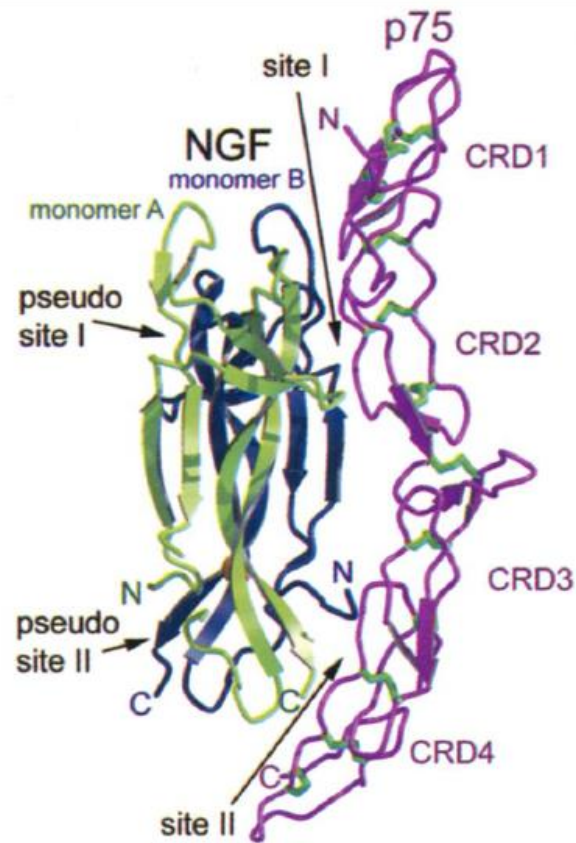
Οι λυμένες δομές των συμπλόκων Νευροτροφινών/p75^{NTR} που έχουμε στην διάθεσή μας είναι δύο. Η μία είναι ο κρύσταλλος με κωδικό pdb: 1sg1³³ και είναι σύμπλοκο NGF/p75^{NTR}ECD σε στοιχειομετρία 2:1 και ο κρύσταλλος με κωδικό pdb: 3buk³⁵, που είναι σύμπλοκο NT3/p75^{NTR}ECD σε στοιχειομετρία 2:2. Και στις δύο περιπτώσεις η αλληλεπίδραση μεταξύ νευροτροφινών και p75^{NTR} γίνεται με δεσμούς υδρογόνου, γέφυρες άλατος και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Στο σύμπλοκο NGF/p75^{NTR} σε στοιχειομετρία 2:1³³ παρατηρούμε δύο περιοχές αλληλεπιδράσεων τις οποίες οι He και Garcia ονομάζουν Site I και Site II. Το Site I περιλαμβάνει τα CRD1 και CRD2 του p75^{NTR}, ενώ το Site II περιλαμβάνει την περιοχή ενδιάμεσα στα CRD3 και CRD4³³ (εικόνες 1.6 και 1.7). Το Site I διακρίνεται σε δύο υποπεριοχές, στο Patch 1 και Patch 2. Από την άλλη μεριά του ομοδιμερούς του NGF, τις κατροπτικές περιοχές των Site I και Site II, οι He και Garcia τις ονομάζουν Pseudosite I και Pseudosite II, αντίστοιχως³³. Αυτές αν και θα περιμέναμε να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ένα δεύτερο μόριο p75^{NTR}, δεν το κάνουν. Αυτό γιατί, παρουσιάζουν στεροδιατακτικές μετατοπίσεις με αποτέλεσμα να μην έχουν την κατάλληλη τοπολογία³³ ώστε να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μόριο p75^{NTR}.

Ως επί το πλείστον η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι εντροπικής φύσεως³³, κάτι που σημαίνει πως η περιοχή αλληλεπίδρασης αποτελείται από μεγάλες υδρόφοβες περιοχές των δύο πρωτεϊνών, συνολικού όγκου 2300 Å², που διαιρείται σε 1360 Å² για το Site I και 940 Å² για το Site II³³. Επιπροσθέτως δημιουργούνται γέφυρες άλατος και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ αμινοξέων των δύο πρωτεϊνών.

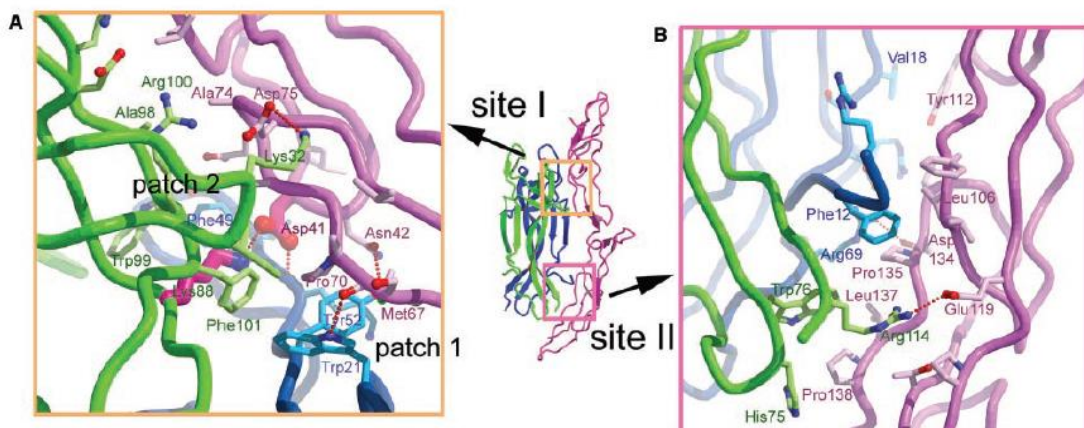
Πιο λεπτομερώς³³, το Patch 1 (του Site I), είναι μία υδρόφοβη περιοχή, που αποτελείται από τα αμινοξέα των δύο αλυσίδων του NGF, Phe¹⁰¹A, Ile³¹A, Trp²¹B, Tyr⁵²B, τα οποία και σχηματίζουν έναν υδρόφοβο θώκο, μέσα στον οποίο “θάβονται” οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Pro⁷⁰, Met⁶⁷ και Ala⁶⁹ του p75^{NTR}. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται ενισχύονται από δύο δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ της Asn⁴² του p75^{NTR} και της Tyr⁵²B του NGF, ο πρώτος, και μεταξύ της Ser⁶⁸ του p75^{NTR} και της Trp²¹B, ο δεύτερος.

Το Patch 2 (του Site I)³³, περιλαμβάνει την περιοχή μεταξύ του CRD1 και CRD2 και χαρακτηρίζεται από μία γέφυρα άλατος που είναι θαμμένη σε έναν υδρόφοβο θώκο. Ο υδρόφοβος αυτός θώκος αποτελείται από τα αμινοξέα Trp⁹⁹A, Phe⁴⁹B, Phe¹⁰¹A, Tyr⁵²B, του ομοδιμερούς του NGF. Η θαμμένη γέφυρα άλατος σχηματίζεται μεταξύ της Asp⁴¹ του p75^{NTR} και της Lys⁸⁸A του ομοδιμερούς του NGF.



*Εικόνα 1.6**: Η δομή του συμπλόκου NGF/p75^{NTR} σε στοιχειομετρία 2:1. Παρατηρούμε τις CRDs του p75^{NTR}, τις δύο περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ ομοδιμερούς NGF και μονομερούς p75^{NTR} (Sites I και II), και τα δύο pseudosites, στην άλλη μεριά του NGF.

*εικόνα από τους He, X. & Garcia, K. C. Structure of Nerve Growth Factor Complexed with the Shared Neurotrophin Receptor p75. *Science* (80-.). **304**, 870–875 (2004)



*Εικόνα 1.7**: Μοριακή απεικόνιση των δύο περιοχών αλληλεπίδρασης, με τα αλληλεπιδρόντα αμινοξέα να απεικονίζονται με ατομική λεπτομέρεια.

*εικόνα από τους He, X. & Garcia, K. C. Structure of Nerve Growth Factor Complexed with the Shared Neurotrophin Receptor p75. *Science* (80-.). **304**, 870–875 (2004)

Το Site II³³ αποτελείται από την περιοχή ενδιάμεσα του CRD3 και CRD4 του p75^{NTR} και δύο βρόχους του ομοδιμερούς του NGF γνωστές στην βιβλιογραφία και ως L3 loops³⁶. Από εντροπικής φύσεως έχουμε τις εξής αλληλεπιδράσεις. Η Phe^{12B} του ομοδιμερούς του NGF εδράζεται ανάμεσα στις Leu¹⁰⁶ και Pro¹³⁵ του p75^{NTR}, η Trp^{76A} του ομοδιμερούς εδράζεται ανάμεσα στις Pro¹³⁵, Leu¹³⁷ και Pro¹³⁸ του p75^{NTR}. Τέλος, οι His^{75A} και Trp^{76A} του ομοδιμερούς NGF, αλληλεπιδρούν με την Pro¹³⁸ του p75^{NTR}. Επιπροσθέτως έχουμε δύο γέφυρες άλατος, μεταξύ, της Arg^{114A} του ομοδιμερούς NGF και του Glu¹¹⁹ του p75^{NTR}, η πρώτη, καθώς επίσης και μεταξύ της Arg^{69B} του ομοδιμερούς και της Asp¹³⁴ του p75^{NTR}, η δεύτερη. (πίνακας 1.2)

<u>NGF</u>	<u>p75^{NTR}</u>	<u>Site</u>
Ile ^{31A}	Met ⁶⁷	Site I – Patch I
Phe ^{101A}	Ala ⁶⁹	
Trp ^{21B}	Pro ⁷⁰	
Tyr ^{52B}	-	Site I – Patch II
Lys ^{88A}	Asp ⁴¹	
Trp ^{99A}		
Phe ^{101A}		
Phe ^{49B}		Site II
Tyr ^{52B}		
His ^{75A}	Leu ¹⁰⁶	
Trp ^{76A}	Glu ¹¹⁹	
Arg ^{114A}	Asp ¹³⁴	
Phe ^{12B}	Pro ¹³⁵	Site II
Arg ^{69B}	Leu ¹³⁷	
-	Pro ¹³⁸	

Πίνακας 1.2: Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ομοδιμερούς του NGF και του μονομερούς του p75^{NTR}. Τα αμινοξέα είναι καταναμημένα σύμφωνα με το Site και Patch στα οποία ανήκουν και η σειρά τους δεν υποδυκνύει κάποιες συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις.

1.6. Οι αλληλεπιδράσεις στο σύμπλοκο proNGF/p75^{NTR} (στοιχειομετρίας 2:2)

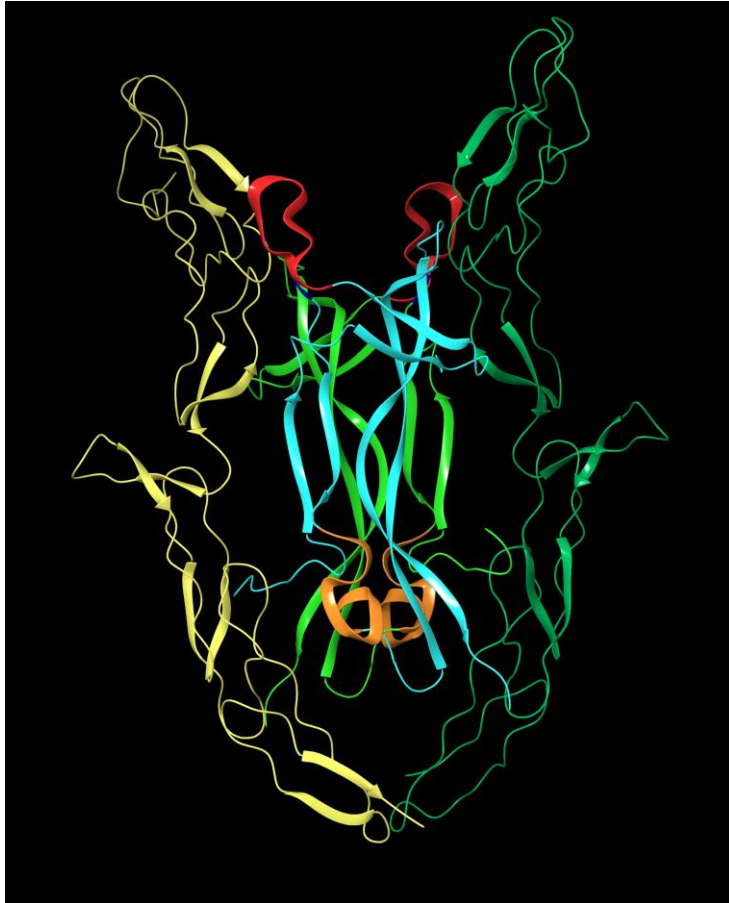
Εκτός από τους δύο κρυστάλλους Νευροτροφινών/p75^{NTR}, για τα σύμπλοκα NGF/p75^{NTR} και NT3/p75^{NTR}, είναι διαθέσιμη και η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της πρόδρομης μορφής του NGF (proNGF) με τον p75^{NTR}, σε στοιχειομετρία 2:2 (pdb: 3ij2³²). Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου αναδεικνύει ένα συμπαγές πακετάρισμα του ομοδιμερούς στην περιοχή της καρβόξυ-τελικής περιοχής του πρόδρομου NGF (που αντιστοιχεί στον ώριμο NGF) με το διμερές p75^{NTR}ECD, ενώ η απουσία σημαντικής ηλεκτρονικής πυκνότητας για το pro-domain, έχει ως αποτέλεσμα έναν μεγάλο κενό χώρο στο κρυσταλλικό πλέγμα, κάτι που αποδίδεται στην αυξημένη ευελιξία αυτής της περιοχής, που αποτελεί ένα εγγενώς μη δομημένο κομμάτι, γνωστό στην βιβλιογραφία και ως Intrinsically Unfolded Region (IUR)^{32,36}.

Μία πολύ σημαντική διαφορά μεταξύ του συμπλόκου NGF/p75^{NTR} 2:1 και του συμπλόκου proNGF/p75^{NTR} 2:2, εντοπίζεται στους εύκαπτους βρόχους L2 (βιβλιογραφικά γνωστοί ως L2 loops) που αποτελούνται από τα αμινοξέα 40-50 που βρίσκονται στο πάνω μέρος της ώριμης περιοχής του διμερούς του proNGF (εικόνα 1.8)^{32,36}.

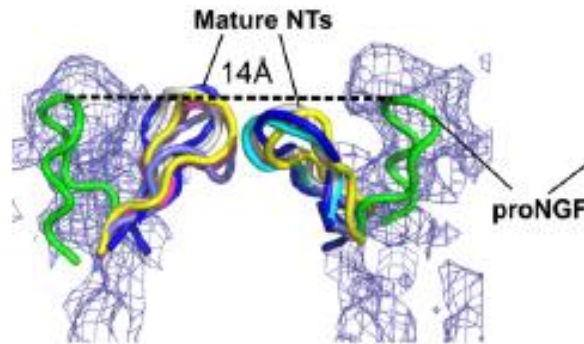
Στην κρυσταλλική δομή της ώριμης νευροτροφίνης (σύμπλοκο NGF/p75^{NTR} 2:1) οι βρόχοι L2 στρέφονται προς το κέντρο του διμερούς NGF υιοθετώντας μία «κλειστή» διαμόρφωση, ενώ στο σύμπλοκο proNGF/p75^{NTR} 2:2 οι βρόχοι L2 προσανατολίζονται προς τα κάτω απομακρυνόμενοι από την διεπαφή του διμερούς NGF, μία διαμόρφωση που αναφέρεται ως «ανοικτή» διαμόρφωση των βρόχων L2³².

Επίσης σύγκριση των L2 βρόχων σε κρυσταλλικά σύμπλοκα NGF και άλλων ώριμων νευροτροφινών με τους υποδοχείς p75^{NTR} και Trks, καταδεικνύει πως παρά την ευελιξία τους υιοθετούν «κλειστή» διαμόρφωση σε κάθε περίπτωση. Έτσι προτείνεται πως η «ανοικτή» κατάσταση των βρόχων L2 στο σύμπλοκο NGF/p75^{NTR} είναι συνέπεια στερεοχημικής παρεμπόδισης. Τα pro-domains αλληλεπιδρούν με την άνω περιοχή του ομοδιμερούς του NGF και οι βρόχοι L2 μετακινούνται για να αποφευχθούν συγκρούσεις (εικόνα 1.9).

Όμως ανάλογες αλλαγές παρατηρούμε και στις γνωστές στην βιβλιογραφία L3 loops και L4 loops (εικόνα 1.5)³⁶. Οι A. C. Pimenta et al³⁶ πρότειναν πως υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση (anti-correlation) μεταξύ των βρόχων L2 και των βρόχων L3. Με άλλα λόγια, όταν οι βρόχοι L2 βρίσκονται εγγύτερα μεταξύ τους («κλειστοί») οι βρόχοι L3 είναι απομακρυσμένοι («ανοικτοί»), ενώ όταν οι βρόχοι L2 είναι απομακρυσμένοι μεταξύ τους («ανοικτοί»), οι βρόχοι L3 είναι πιο κοντά μεταξύ τους («κλειστοί»). Οι βρόχοι L3 βρίσκονται κοντά στο Site II της αλληλεπίδρασης του ομοδιμερούς του NGF με τον p75^{NTR} και αποτελούνται από τα αμινοξέα 60-70 των δύο αλυσίδων του ομοδιμερούς του NGF (εικόνα 1.8).

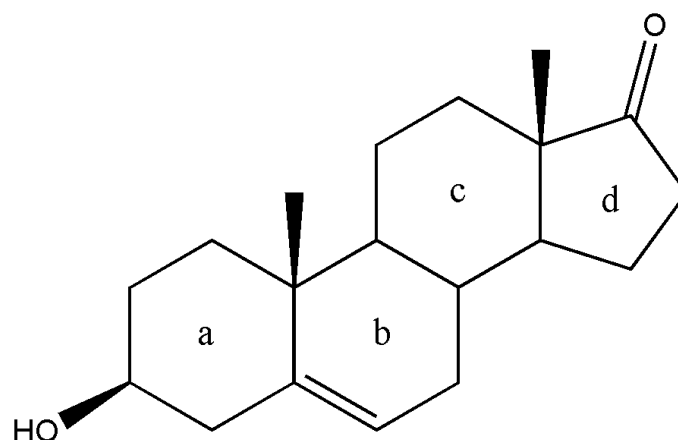


Εικόνα 1.8: Το σύμπλοκο NGF/p75^{NTR} στοιχειομετρίας 2:2 (κωδικός pdb: 3ij2). Οι L2 loops φαίνονται με κόκκινο ενώ οι L3 loops φαίνονται με πορτοκαλί.



Εικόνα 1.9: Αλλαγές στην διαμόρφωση των βρόχων L2 στις ώριμες νευροτροφίνες σε σχέση με τον proNGF. Η τοπολογία των βρόχων L2 στο σύμπλοκο proNGF/p75^{NTR} 2:2 (pdb: 3ij2) εμφανίζεται σε πράσινο χρώμα, στο ομοδιμερές NGF (pdb: 1BET) σε γκρι χρώμα, στο σύμπλοκο NGF :p75^{NTR} 2:1 (pdb: 1SG1) σε κίτρινο χρώμα, στο σύμπλοκο NGF:TrkA-D5 2:2 (1WWW) σε μωβ χρώμα, στο σύμπλοκο NGF:TrkA 2:2 (D1-D5) (pdb: 2IFG) σε γαλάζιο χρώμα, στο ομοδιμερές NT-4 (pdb:1B98) στο χρώμα του σχιστόλιθου και στο σύμπλοκο NT-3:p75^{NTR} 2:2 σε μπλε χρώμα (pdb: 3BUK). Η απόσταση μεταξύ των δύο μονομερών proNGF μετρήθηκε ίση με 14 Å.³² Για λόγους σύγκρισης υπολογίσαμε την απόσταση μεταξύ των L2 loops (απόσταση μεταξύ Asn⁴⁵A με την Asn⁴⁵B στην κορυφή της αντίστοιχης L2 loop των αλυσίδων των δύο μονομερών NGF) στο σύμπλοκο 2:1 NGF :p75^{NTR} και βρέθηκε ίση με 6.25 Å

1.7. Η DHEA ως νευροτροφικός παράγοντας



Εικόνα 1.10: Η δομή της Δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA).

Η ενδογενής νευροστεροειδής ορμόνη δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), που παράγεται από νευρώνες και γλοία, επηρεάζει πολλαπλές διεργασίες στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένης της νευρωνικής επιβίωσης και της νευρογένεσης κατά την ανάπτυξη και τη γήρανση. Η απότομη μείωση των επιπέδων της στον εγκέφαλο και στην κυκλοφορία καθώς αυξάνει η ηλικία με την έχει έχει συσχετιστεί με νευρωνική δυσλειτουργία και εκφυλισμό. Επιπλέον, έρευνες σχετικά με τη φυσιοπαθολογική σημασία των νευροστεροειδών στη νόσο του Alzheimer (AD) έχουν καταδείξει τη σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων νευροστεροειδών σε περιοχές του εγκεφάλου των ασθενών με AD σε σύγκριση με άτομα της ίδιας ηλικίας που δεν νοσούν^{37,38,39}.

Η ερευνητική ομάδα των Δρ. Γραβάνη και Δρ. Χαραλαμπίδου ανακάλυψε πρόσφατα ότι η DHEA ασκεί τη νευροτροφική δράση της και προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από απόπτωση μέσω της αλληλεπίδρασής της με τους υποδοχείς της νευροτροφίνης NGF, TrkA και p75^{NTR} (K_D: 7.4 nM and 5.6 nM αντίστοιχα) ενεργοποιώντας τη σηματοδότηση ίδιων ενδοκυτταρικών μονοπατιών⁴⁰.

Περαιτέρω, πρόσφατη μελέτη ανέδειξε πως η DHEA αλληλεπιδρά με όλους τους υποδοχείς των νευροτροφινών, συμπεριλαμβανομένων όλων των μελών της οικογένειας των Κινασικών Υποδοχέων της Τροπομοσίνης, καθώς επίσης και με τον p75^{NTR}. Επίσης η DHEA αλληλεπιδρά με τις ορθόλογες πρωτεΐνες των Κινασικών Υποδοχέων της Τροπομοσίνης, στα ασπώνδουλα. Η μη επιλεκτικότητα της DHEA μαζί με το γεγονός πως ενεργοποιεί και τους υποδοχείς των νευροτροφινών στα ασπώνδουλα οδήγησε στο συμπέρασμα πως η DHEA είναι «προγονική νευροτροφίνη», κάτι που σημαίνει πως σε προηγούμενα εξελικτικά στάδια, και σε απλούστερους οργανισμούς, η DHEA είχε παρόμοια δράση με αυτή των νευροτροφινών.^{41,40}

1.8. Η βελτιστοποίηση του φαρμακοφόρου της DHEA και η δημιουργία του βιοδραστικού αναλόγου BNN27.

Το DHEA παρά τις όποιες θετικές του δράσεις, έχει ένα πολύ μεγάλο μειονέκτημα που περιορίζει σημαντικά την μεταφορά του στην κλινική πράξη. Όπως όλα τα φυσικά νευροστεροειδή, έτσι και το DHEA μεταβολίζεται σε οιστρογόνα και ανδρογόνα με αποτέλεσμα να σχετίζεται με ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους⁴².

Έτσι λοιπόν από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Καλογεροπούλου ξεκίνησε μία προσπάθεια βελτιστοποίησης του DHEA, ώστε τα νέα μόρια να διατηρήσουν την δραστικότητά τους, χωρίς όμως να μεταβολίζονται σε οιστρογόνα ή ανδρογόνα, ούτε φυσικά να έχουν απ' ευθείας δράση στους υποδοχείς των οιστρογόνων⁴².

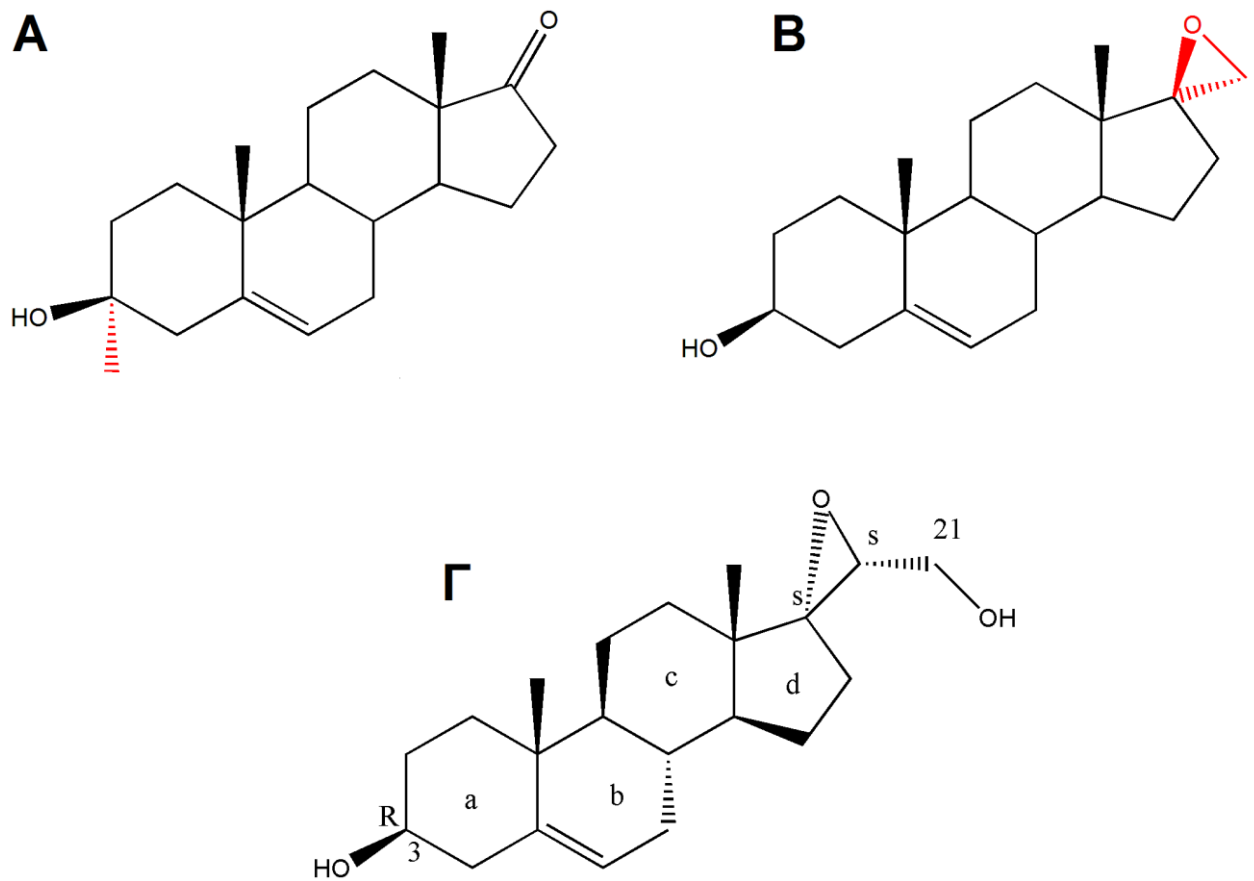
Δημιουργήθηκε μια βιβλιοθήκη ενώσεων σε μια προσπάθεια συσχέτισης δομής-δράσης (SAR). Η στρατηγική που ακολουθήθηκε σχετικά με το σχεδιασμό και σύνθεση των αναλόγων της DHEA βασίστηκε:

i) στην εισαγωγή μίας σειράς υποκαταστατών στη θέση C3 του DHEA προκειμένου να ανασταλεί η ενζυματική οξείδωση της 3β-υδροξυλομάδας σε κετόνη ή η αρωματοποίηση του δακτυλίου A και τα προκύπτοντα μόρια να διαφύγουν της πιθανότητας μεταβολισμού σε ανδρογόνα ή οιστρογόνα (DHEA → ανδροστενεδιόνη → τεστοστερόνη → οιστραδιόλη) και

ii) σε μία σειρά τροποποιήσεων στη θέση C17, η οποία είναι επίσης μια σημαντική θέση για το μεταβολικό μετασχηματισμό της DHEA σε ανδρογόνα ή οιστρογόνα. Η εποξειδική ομάδα επελέγη ως υποκαταστάτης στο C17 δεδομένου του σχετικά μικρού μεγέθους της και της χαμηλής αντιδραστικότητάς της (reactivity) ενώ επιπλέον εισήχθη η ομάδα C21-υδροξυλίου προκειμένου να δωθεί η δυνατότητα δημιουργίας δεσμού υδρογόνου με πιθανή βελτίωση της συγγένειας δέσμευσης⁴².

Η αντιαποπτωτική δράση των ενώσεων αξιολογήθηκε με χρήση της κυτταρικής σειράς PC12 που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την μελέτη της απόπτωσης και της κυτταρικής επιβίωσης νευρικών κυττάρων. Ωστόσο, ανεξάρτητα της φύσης του 3α-υποκαταστάτη (αλειφατικού ή πολικού), όλα τα ανάλογα στερούνταν αντιαποπτωτικής δράσης, τουλάχιστον σε συγκέντρωση 100 nM. Αντιθέτως η εισαγωγή της εποξειδικής ομάδας στην θέση 17 (C17) οδήγησε σε ενώσεις με αυξημένη αντιαποπτωτική δράση, με το BNN27 να ανδεικνύεται σε ένωση-οδηγό⁴².

Περαιτέρω το σπειρο-νευροστεροειδές ανάλογο BNN27 βρέθηκε πως δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ, ενώ επιπλέον, διαπιστώθηκε πως δεν ήταν σε θέση να προάγει σε οποιοδήποτε σημαντικό βαθμό την κυτταρική ανάπτυξη στις κυτταρικές σειρές Ishikawa, MCF-7 και LNCaP που αντιπροσωπεύουν πρώιμα στάδια καρκίνου της μήτρας, του μαστού και του προστάτη αντίστοιχα⁴².



Εικόνα 1.11: Η πορεία προς την βελτιστοποίηση του φαρμακοφόρου της DHEA συμπεριλάμβανε την εισαγωγή μίας σειρά υποκαταστατών στην θέση C3 (A) και τροποποιήσεις στην θέση C17 με την εισαγωγή της εποξειδικής ομάδας και της ομάδας C21-υδροξυλίου (B).

Η δομή της πλέον βιοδραστικής ένωσης, το BNN27 (Γ). Το BNN27 έχει νευροπροστατευτική και αντιαποπτωτική δράση ($IC_{50}=0.19$ nM σε κυτταρική σειρά PC12), ενώ στερείται της ικανότητας να αλληλεπιδράσει με τους υποδοχείς των οιστρογόνων. Η αντιαποπτωτική δράση της DHEA εκτιμήθηκε στην ίδια κυτταρική σειρά σε $IC_{50}=1$ nM.

1.9. Η πρόσδεση του BNN27 με τον TrkA και τον p75^{NTR}

Πειράματα ελέγχου πρόσδεσης με χρήση βιομοριακού NMR (¹H STD-NMR) από την ερευνητική ομάδα της Δρ Ζερβού ανέδειξαν ότι το BNN27 αλληλεπιδρά με τα εξωκυττάρια τμήματα του υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF, TrkA:D5⁴³ και του υποδοχέα όλων των νευροτροφινών p75^{NTR}ECD⁴⁴ ενώ δεν αλληλεπιδρά με τη νευροτροφίνη NGF.

Δεδομένου ότι το NGF αλληλεπιδρά με τις συγκεκριμένες εξωκυττάρειες περιοχές των δύο υποδοχέων ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί αν η προσθήκη NGF στα διαλύματα TrkA/BNN27 και p75^{NTR}/BNN27 θα παρεμπόδιζε την πρόσδεση του BNN27 στους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR} δίνοντας επιπλέον πληροφορία σχετικά με την τοπολογία του κέντρου πρόσδεσης. Αν το κέντρο πρόσδεσης ταυτιζόταν με την περιοχή πρόσδεσης του NGF θα αναμενόταν κατάργηση των κορυφών του BNN27 στο ¹H STD-NMR δεδομένης της υψηλότερης συγγένειας πρόσδεσης του NGF στους υποδοχείς. Εντελώς απρόσμενα, τα πειράματα προσθήκης NGF έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση του BNN27 και με τους δύο υποδοχείς ενισχύεται με την παρουσία του NGF και μάλιστα κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση του NGF.

Δεδομένου ότι το BNN27 δεν αλληλεπιδρά με το NGF, η ενίσχυση της αλληλεπίδρασης μπορεί να ερμηνευθεί ως εξής: Η προσθήκη του NGF επάγει την συμπλοκοποίησή του με τους υποδοχείς του TrkA και p75^{NTR} και το BNN27 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τις συμπλοκοποιημένες δομές των υποδοχέων. Η ενίσχυση του STD σήματος πιθανά συνδέεται με τη δημιουργία νέων κέντρων πρόσδεσης στα σύμπλοκα. Η ενίσχυση του STD σήματος με την αυξανόμενη συγκέντρωση του NGF στο διάλυμα υποδεικνύει συνεργατικότητα στις αλληλεπιδράσεις του BNN27 και NGF με τους υποδοχείς απομακρύνοντας το ενδεχόμενο μη εκλεκτικής (non specific) πρόσδεσης.^{43,44}

1.10. Αντι-αποπτωτική και νευροπροστατευτική δράση του BNN27 σε βιολογικά μοντέλα

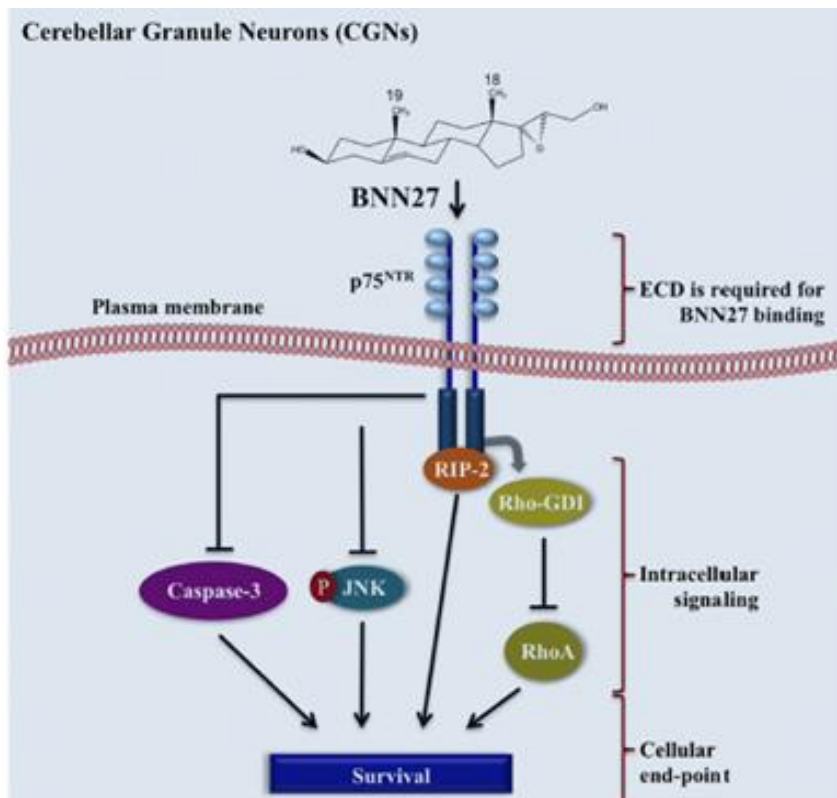
Σε αντίθεση με το DHEA, που αλληλεπιδρά με όλα τα μέλη της οικογενείας των Trk, το BNN27 αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τον υποδοχέα του NGF TrkA^{42,43}. και τον υποδοχέα όλων των νευροτροφινών p75^{NTR}^{42,44} ενώ δεν έχει καμία συγγένεια προς τους υποδοχείς TrkB και TrkC⁴²..

Το BNN27 μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον TrkA μπορεί επιτυχώς να επάγει τη φωσφορύλιωση του TrkA ενεργοποιώντας ενδοκυτταρικές οδούς επιβίωσης μιμούμενο κάποιες από τα νευροπροστατευτικές δράσεις του NGF⁴³. Επιπλέον, το BNN27 εμφανίζει συνεργατική δράση με το NGF προάγοντας την νευροαξονική ανάπτυξη, και διασώζει αποτελεσματικά από την απόπτωση διάφορες NGF-εξαρτώμενες κυτταρικές σειρές νευρώνων με διαμεσολάβηση των υποδοχέων TrkA αλλά και νωτιαία αισθητικά γάγγλια από ποντικούς που στερούνται NGF. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι το BNN27 σε αντίθεση από το NGF δεν συνοδεύεται από υπεραλγεσία⁴³.

Το BNN27 αλληλεπιδρά απ' ευθείας και με το εξωκυττάριο τμήμα του p75^{NTR}⁴⁴. Σε νευρώνες από την παρεγκεφαλίδα ποντικών που εκφράζουν υποδοχείς p75^{NTR} αλλά όχι TrkA το BNN27 προωθεί την αλληλεπίδραση του p75^{NTR} με τις πρωτεΐνες RhoGDI και RIP2 που συνδέονται με την κυτταρική επιβίωση ενώ παράλληλα εξασθενεί την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών παραγόντων κινάσης Jun και κασπάσης-3⁴⁴.

Το BNN27 παρουσιάζει ευεργετικά αποτελέσματα στο νευροεκφυλιστικό και το φλεγμονώδη παράγοντα της διαβητικής ρετινοπάθειας⁴⁵ και δρα θετικά στην διατήρηση της μνήμης και της γνωστικής λειτουργίας⁴⁶. Τέλος πάρα πολύ μεγάλο ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα των Kelly E. Glajch et al⁴⁷, οι οποίοι μελέτησαν την δράση του BNN27 σε in vitro κυτταρικό μοντέλο της ALS αλλά και σε ζωικό μοντέλο (το μοντέλο ποντικού G93A SOD1). Ενώ το BNN27 εξασθένησε την απώλεια των κινητικών νευρώνων στα in vitro πειράματα, τα οφέλη στα πειραματόζωα ήταν περιορισμένα. Μετά από έλεγχο για την παρουσία του BNN27 στον εγκέφαλο των ζώων, αυτό δεν εντοπίστηκε παρόλο που το BNN27 διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό πιθανά λόγω γρήγορου μεταβολισμού του από τα ηπατοκύτταρα.

Συνοψίζοντας, το BNN27 αποτελεί μια ένωση-οδηγό για την ανάπτυξη νευροπροστατευτικών ενώσεων, εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF TrkA, με ικανότητα αλληλεπίδρασης επίσης με τον υποδοχέα όλων των νευροτροφινών p75^{NTR}, διαμεσολαβώντας την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης που σχετίζονται με την επιβίωση.



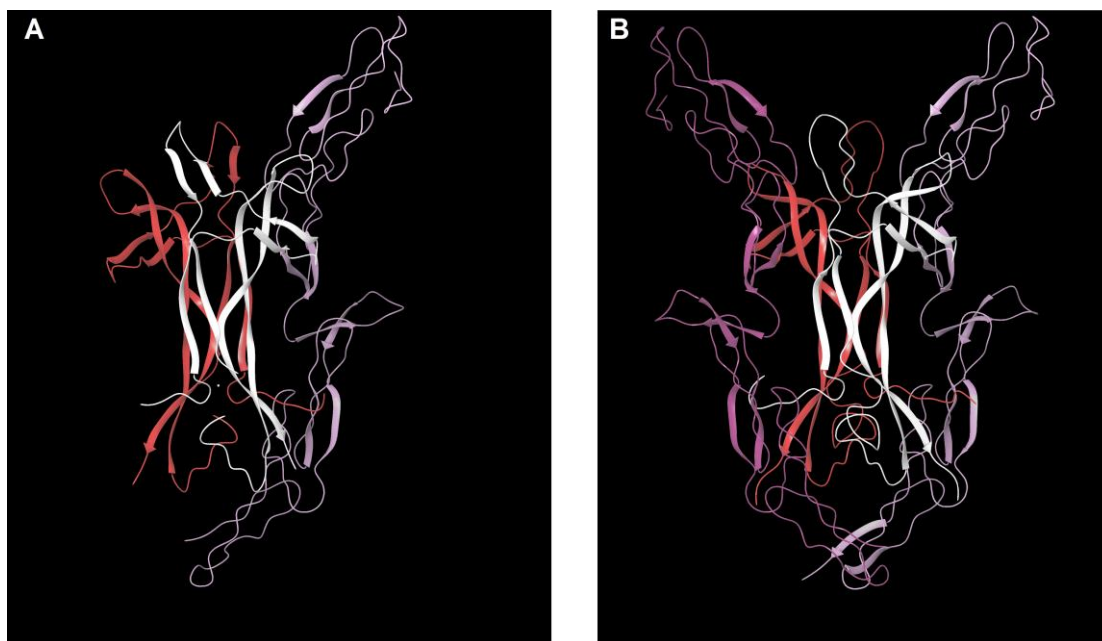
Εικόνα 1.12:* Σχηματική απεικόνιση της δράσης προ-επιβίωσης του BNN27 διαμεσολαβούμενης από την αλληλεπίδρασή του με τον p75^{NTR} σε καλλιέργεια νευρώνων από την παρεγκεφαλίδα ποντικών.

* Iosif Peditakis, Alexandra Kourgiantaki, Kyriakos C. Prousis, Constantinos Potamitis, **Kleanthis P. Xanthopoulos**, Maria Zervou, Theodora Calogeropoulou, I. C. and A. G. BNN27 , a 17-Spiroepoxy Steroid Derivative , Interacts With and Activates p75 Neurotrophin Receptor , Rescuing Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis. *Front. Pharmacol* **7**, 1–14 (2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2Ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι υπολογιστικές μελέτες έγιναν σε server του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης, του Ινστιτούτου Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, ο οποίος έχει 24 πυρήνες. Έγινε χρήση του λογισμικού πακέτου της Schrodinger, Small Molecule Drug Discovery Suite, το οποία κάνει χρήση του γραφικού περιβάλλοντος Maestro και πιο συγκεκριμένα της έκδοσης 2015-3. Για την πρόβλεψη των πιθανών περιοχών αλληλεπίδρασης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος SiteMap, ενώ για τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής και την ανάλυση αυτών, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Desmond⁴⁸.

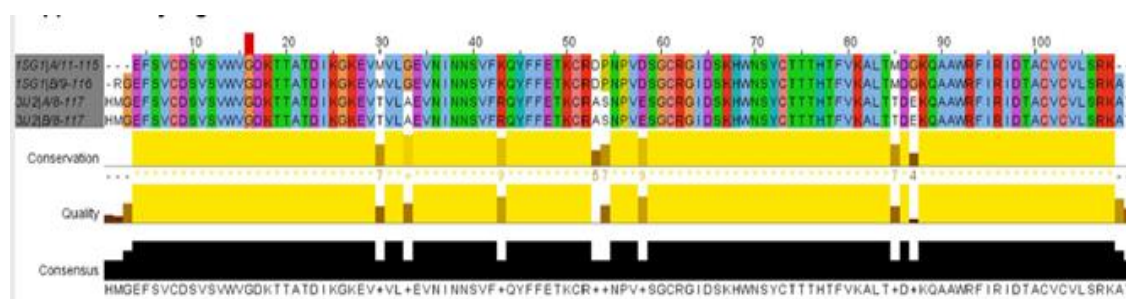
Χρησιμοποιήθηκαν δύο κρύσταλλοι της pdb, ο κρύσταλλος με κωδικό 1sg1³³ του συμπλόκου p75^{NTR}/NGF 1:2 και ο κρύσταλλος με κωδικό 3ij2³² του συμπλόκου p75^{NTR}/NGF 2:2 (εικόνα 2.1A και εικόνα 2.1B αντίστοιχα). Για τις μελέτες του συμπλόκου p75^{NTR}/NGF σε στοιχειομετρία 1:2 και των αλληλεπιδράσεων του p75^{NTR} σε μορφή μονομερούς χρησιμοποιήθηκε ο κρύσταλλος με κωδικό 1sg1. Στην περίπτωση της μελέτης του p75^{NTR} ως μονομερούς έγινε αφαίρεση του ομοδιμερούς του NGF. Για την μελέτη του συμπλόκου p75^{NTR}/NGF σε στοιχειομετρία 2:2, χρησιμοποιήθηκε ο κρύσταλλος 3ij2.



Εικόνα 2.1: (A) Το σύμπλοκο p75^{NTR}ECD-NGF 1:2 (κωδικός pdb: 1sg1) (B) Το σύμπλοκο p75^{NTR}ECD-proNGF 2:2 (κωδικός pdb: 3ij2)

Ο κρύσταλλος 3ij2 του ετεροδιμερούς p75^{NTR}/pro-NGF έχει λυμένη την δομή του καρβόξυ-τελικού άκρου του ομοδιμερούς pro-NGF που αντιστοιχεί στον ώριμο NGF, ενώ η δομή του pro-domain δεν είναι λυμένη γιατί είναι ένα εγγενώς μη δομημένο κομμάτι, γνωστό στην βιβλιογραφία και ως Intrinsically Unfolded Region (IUR)³².

Στον κρύσταλλο 3ij2 του ετεροδιμερούς p75^{NTR}/pro-NGF, ο proNGF προέρχεται από το ποντίκι (*Mus musculus*). Στον κρύσταλλο 1sg1 του συμπλόκου p75^{NTR}/NGF 1:2 ο NGF προέρχεται από τον άνθρωπο (*Homo sapiens*). Ο p75^{NTR} και στους δύο κρυστάλλους προέρχεται από τον κοινό αρουραίο (*Ratus norvegicus*). Με την χρήση του λογισμικού Jalview ευθυγραμμίστηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες μεταξύ του ανθρώπινου ομοδιμερούς του NGF και της ώριμης περιοχής του ομοδιμερούς proNGF ποντικού αναδεικνύοντας εννέα σημεία διαφοροποίησης (εικόνα 2.2). Με βάση τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης έγιναν οι ακόλουθες μεταλλάξεις στην ώριμη περιοχή του ομοδιμερούς proNGF της κρυσταλλικής δομής p75^{NTR}/pro-NGF 2:2 (pdb:3ij2) ώστε να μοντελοποιηθεί ο ανθρώπινος NGF (πίνακας 2.1).



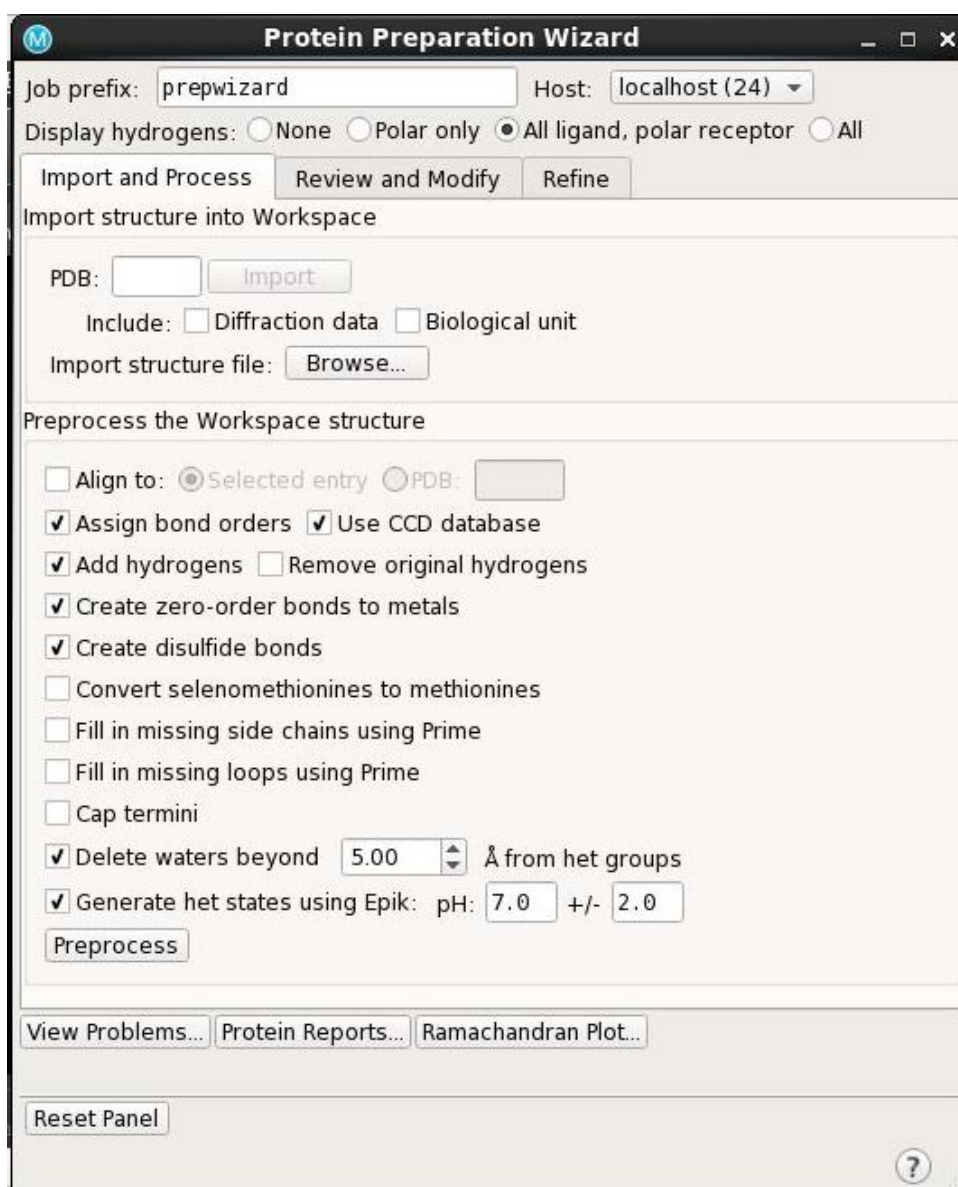
Εικόνα 2.2: Ευθυγράμμιση αμινοξικών αλληλουχιών του ανθρώπινου ομοδιμερούς του NGF (pdb: 1sg1) και της ώριμης περιοχής του ομοδιμερούς proNGF ποντικού (pdb: 3ij2)

Αμινοξύ κρυστάλλου 3ij2 (αρχικά)	Αμινοξύ κρυστάλλου 3ij2 (τελικά)
Met ⁹	Arg ⁹
Thr ³⁷	Met ³⁷
Ala ⁴⁰	Gly ⁴⁰
Arg ⁵⁰	Lys ⁵⁰
Ala ⁶⁰	Asp ⁶⁰
Ser ⁶¹	Pro ⁶¹
Glu ⁶⁵	Asp ⁶⁵
Thr ⁹²	Met ⁹²
Glu ⁹⁴	Gly ⁹⁴

Πίνακας 2.1

Προετοιμασία των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Οι κρυσταλλικές δομές υποβλήθηκαν σε διαδικασία προετοιμασίας με την χρήση του προγράμματος Protein Preparation Wizard της σουίτας της Schrodinger. Η διαδικασία προετοιμασίας περιλάμβανε την προσθήκη ατόμων υδρογόνου, τον έλεγχο για απουσία των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, την απομάκρυνση περιττών μορίων νερού, τον καθορισμό των καταστάσεων πρωτονίωσης σε φυσιολογικό pH (7.0 +/- 2.0) και την ελάχιστοποίηση της ενέργειας (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Ο πίνακας ελέγχου (panel) του αλγόριθμου του protein preparation, όπου φαίνονται όλες οι δυνατότητες επεξεργασίας μίας πρωτεΐνης.

Προσδιορισμός των πιθανών περιοχών πρόσδεσης

Επόμενο στάδιο του πρωτοκόλλου μας ήταν ο προσδιορισμός των πιθανών περιοχών αλληλεπίδρασης. Αυτό έγινε με την χρήση του αλγορίθμου SiteMap⁴⁹ της σουΐτας της Schrodinger. Οι συνθήκες του SiteMap περιλάμβαναν α) “less restrictive definition of hydrophobicity” και β) “detect swallow binding sites”, ώστε να εντοπιστούν όλες οι πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης, ανεξάρτητα του πόσο μικρές, “ρηχές” ή αλλιώς μη βέλτιστες ήταν. Οι υπόλοιπες ρυθμίσεις παρέμειναν όπως ήταν αρχικά (εικόνα 2.4).

Το SiteMap χρησιμοποιεί δύο διαφορετικές συναρτήσεις βαθμονόμησης για να κατατάξει τις πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης, το SiteScore και το Dscore.

Το SiteScore ορίζεται⁴⁹ ως

$$\text{SiteScore} = 0.0733 \sqrt{n} + 0.6688e - 0.20p$$

όπου,

n, ο αριθμός των site points, με ανώτατο όριο το 100, που εκτιμά το μέγεθος της πιθανής περιοχής πρόσδεσης
e, το enclosure score, που αποτελεί εκτίμηση του πόσου εκτεθειμένη στον διαλύτη είναι η πιθανή περιοχή πρόσδεσης
p, το σκορ υδροφιλικότητας, με ανώτατο όριο το 1.

SiteScore μεγαλύτερα του 0.80 έχει βρεθεί πως είναι ικανά να ξεχωρίσουν τις περιοχές της πρωτεΐνης που μπορούν να δεσμεύσουν ένα μόριο με εν δυνάμει φαρμακευτική δράση από μία περιοχή που δεν μπορεί. Επίσης, SiteScore μεγαλύτερα ή ίσα του 1 υποδεικνύουν μία περιοχή με μεγάλη πιθανότητα πρόσδεσης¹.

Το Dscore (druggability score) χρησιμοποιεί λίγο διαφορετικά βάρη στις εκάστοτε μεταβλητές, ενώ πολύ σημαντικό είναι πως δεν υπάρχει ανώτατο όριο στο σκορ υδροφιλικότητας.

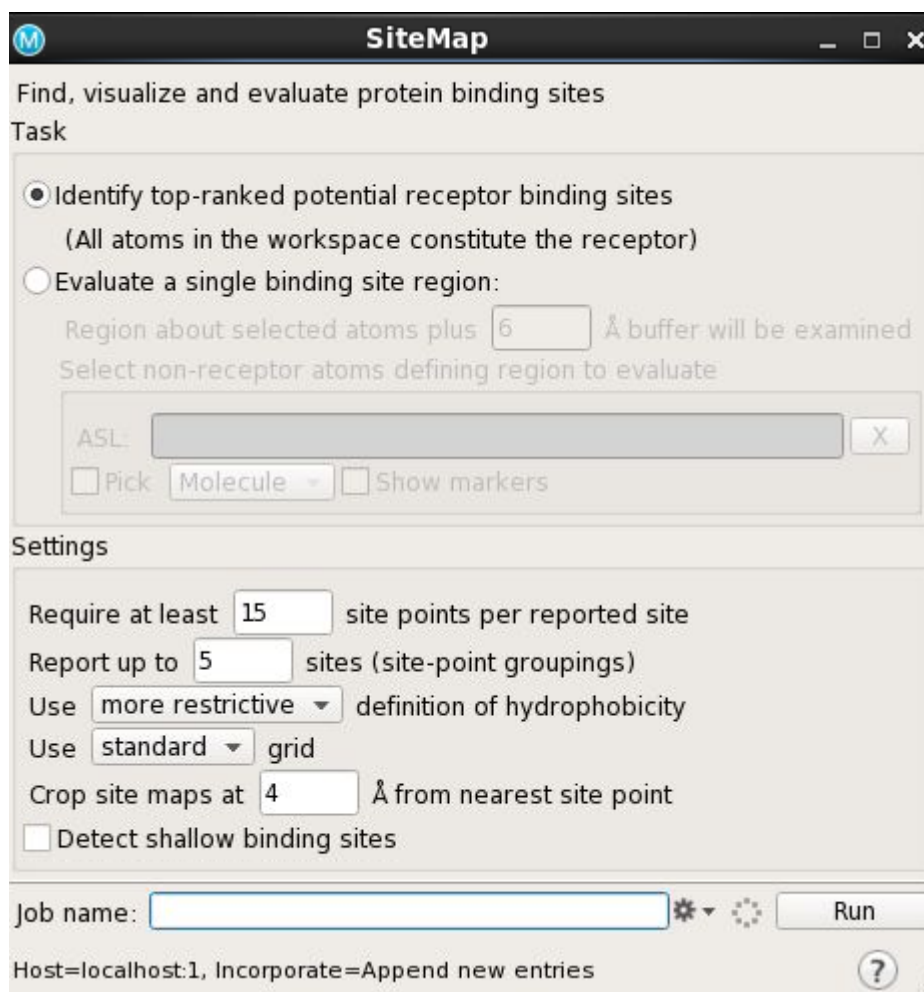
Η εξίσωση του Dscore είναι η κάτωθι⁴⁹:

$$\text{Dscore} = 0.094 \sqrt{n} + 0.60e - 0.324p$$

όπου,

n, ο αριθμός των site points, με ανώτατο όριο το 100
e, το enclosure score
p, το σκορ υδροφιλικότητας, χωρίς ανώτατο όριο.

Μία περιοχή που μπορεί να δεσμεύσει ένα μόριο με εν δυνάμει φαρμακευτική δράση έχει βρεθεί πως είναι κατ' εξοχήν πιο υδρόφοβη από μία αντίστοιχη περιοχή που δεν μπορεί να δεσμεύσει το εν λόγω μόριο. Έτσι λοιπόν γίνεται αντιληπτό το πόσο σημαντικό ρόλο παίζει ο ρόλος της υδροφοβικότητας (ή στην συγκεκριμένη περίπτωση στο αντίθετο μέγεθος, αυτό της υδροφιλικότητας), στην εκτίμηση αν μία περιοχή της πρωτεΐνης μπορεί να αποτελέσει στόχο εν δυνάμει φαρμακευτικού μορίου.



Εικόνα 2.4: Ο πίνακας ελέγχου (panel) του αλγόριθμου του Site Map

Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του αλγόριθμου Desmond⁴⁸ της σουΐτας της Schrodinger.

Για την προετοιμασία του κάθε συστήματος, ώστε να γίνουν οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, τοποθετήθηκε διαλύτης (H₂O) ο οποίος μοντελοποιήθηκε με το σύστημα TIP4 και τοποθετήθηκε στις ελάχιστες δυνατές διαστάσεις, σύμφωνα με υπολογισμούς του προγράμματος. Έγινε αυτομάτως εξουδετέρωση του συστήματος με την προσθήκη κατάλληλου αριθμού ιόντων Na⁺.

Για την προσομοίωση της Μοριακής Δυναμικής, χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS3⁵⁰, και η NPT Ensemble Class, με θερμοκρασία στους 300 K, και πίεση στα 1.01325 bar. Ο RESPA integrator είχε βήμα 2 fs για τους δεσμούς και των μικρής απόστασης αλληλεπιδράσεων. Για τις μεγάλης απόστασης αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιήθηκε βήμα των 6 fs. Ο θερμοστάτης που εφαρμόστηκε ήταν προγραμματισμένος για χρόνους των 100 ps, ενώ ο βαροστάτης ήταν προγραμματισμένος στα 1000 ps. Σαν όριο των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων Coulomb τέθηκαν τα 9 Å. Για τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής των 200 ns τα recording intervals ήταν 20 ps στην περίπτωση της ενέργειας και 80 ps στην περίπτωση των διανυσμάτων. Στις περιπτώσεις των προσομοιώσεων για άλλη διάρκεια χρόνου έγιναν ανάλογες μετατροπές. Τέλος επιλέχθηκε να γίνει “χαλάρωση” (relaxation) του συστήματος πριν ξεκινήσει η προσομοίωση μέσω μίας σειράς ελαχιστοποιήσεων ενέργειας και ταχέων προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, σύμφωνα με τις default παραμέτρους του Desmond.

Οι αλληλεπιδράσεις ενός συνόλου μορίων BNN27 ερευνήθηκαν μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής σε μία σειρά από διαφορετικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Συνολικά έγιναν τέσσερις προσομοιώσεις οι οποίες συνοπτικά παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.

<u>Σύμπλοκο/Στοιχειομετρία</u>	<u>Προσδέτης</u>	<u>Χρόνος (ns)</u>
p75 (μονομερές)	BNN27	30
p75 (μονομερές)	BNN27	50
p75/NGF 1:2	BNN27	200
(τροποποιημένο) p75/proNGF 2:2	BNN27	110

Πίνακας 2.2

Σε κάθε περίπτωση, τα μόρια μικρού μοριακού βάρους (το BNN7 και η DHEA) τοποθετούνταν πάντα κοντά σε θέσεις που υποδείκνυαν τα αποτελέσματα του SiteMap ως τις πιο πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης, και σε απόσταση περίπου 6 Å από το εκάστοτε πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Έτσι εξασφαλίσαμε πως στην αρχική αυτή θέση δεν υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ του μορίου μικρού μοριακού βάρους και του πρωτεϊνικού συμπλόκου, όμως παράλληλα, δίνονταν η δυνατότητα στο μόριο μικρού μοριακού βάρους να πλησιάσει και να αλληλεπιδράσει με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο, κατά την διάρκεια της προσομοίωσης.

Για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν τα Simulation Interaction Diagrams (SIDs) και Ligand Interaction Diagrams (LIDs)⁴⁸. Τα SIDs επιτρέπουν την λεπτομερή ανάλυση του τρόπου αλληλεπίδρασης μεταξύ των εξεταζόμενων μορίων μετά το πέρας της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής.

Αναλυτικότερα, τα SIDs δίνουν πληροφορίες για τα κάτωθι: α) την διαμορφωτική ευκινησία και την σταθερότητα του πρωτεϊνικού στόχου κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, όπως επίσης και την σταθερότητα του μορίου μικρού μοριακού βάρους-προσδέτη σε σχέση με την πρωτεΐνη, β) για τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά το μόριο μικρού μοριακού βάρους με την πρωτεϊνική δομή, υποδεικνύοντας ποια αμινοξέα της πρωτεϊνικής δομής αλληλεπιδρούν με ποιες χαρακτηριστικές ομάδες του προσδέτη, δίνοντας μάλιστα και την διάσταση του χρόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχει προταθεί πως η λειτουργικότητα του $p75^{NTR}$ σχετίζεται με το διμερισμό του υποδοχέα^{35,31}. Η στρατηγική μας προκειμένου να μελετήσουμε *in silico* τις αλληλεπιδράσεις του BNN27 με τον υποδοχέα $p75^{NTR}$ καθοδηγήθηκε από την απουσία κρυσταλλογραφικής δομής της διμερούς δομής του $p75^{NTR}$ συμπλοκοποιημένης με την νευροτροφίνη NGF. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε τις δύο πιο σχετικές κρυσταλλικές δομές, το ασύμμετρο σύμπλοκο του $p75^{NTR}$ ECD με την νευροτροφίνη NGF (pdb: 1SG1) και το συμμετρικό ετεροδιμερές σύμπλοκο του $p75^{NTR}$ ECD με την πρόδρομη νευροτροφίνη proNGF (pdb: 3IJ2) τροποποιημένο ώστε να μοντελοποιηθεί η ανθρώπινη NGF (εικόνες 2.1 και 2.2).

Προτεινόμενες περιοχές αλληλεπίδρασης (HotSpots) του μονομερούς του $p75^{NTR}$ ECD

Για την εξαγωγή των πιθανών περιοχών αλληλεπίδρασης στην περίπτωση του μονομερούς του $p75^{NTR}$ χρησιμοποιήθηκε ο κρύσταλλος με κωδικό pdb: 1sg1³³, αφού πρώτα αφαιρέθηκε το ομοδιμερές του NGF.

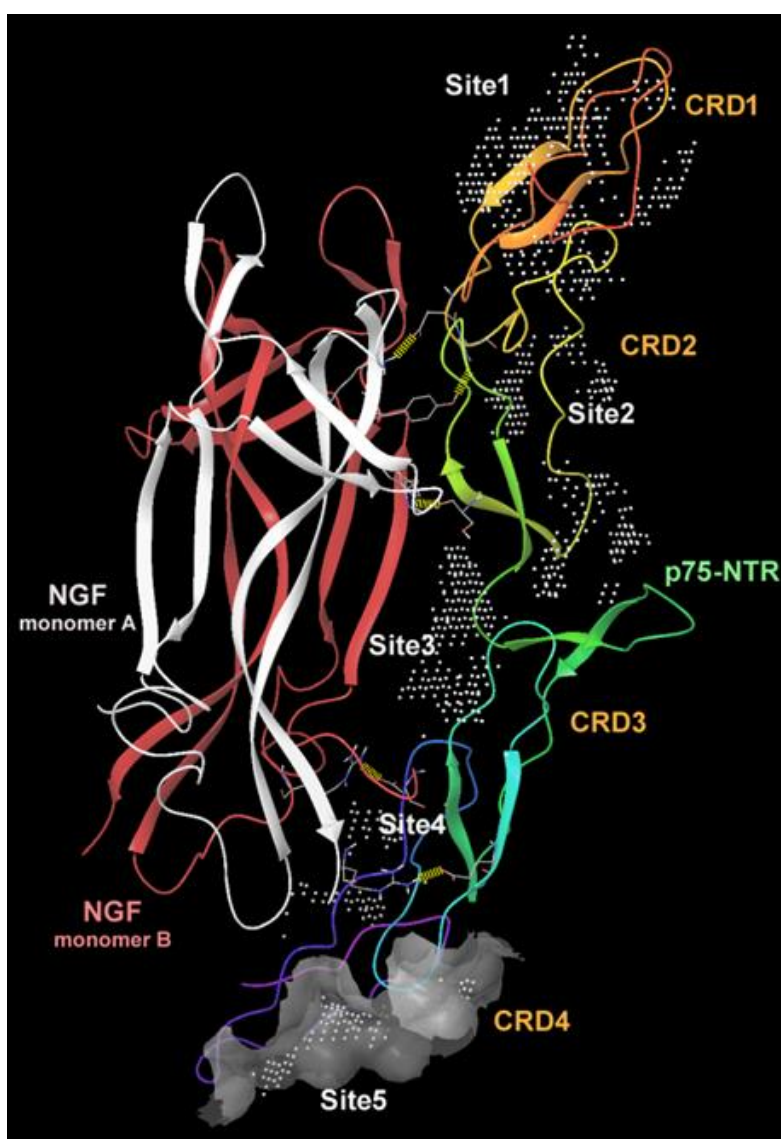
Βρέθηκαν πέντε (5) πιθανές περιοχές που θα μπορούσαν να αποτελούν την περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ του BNN27 και του μονομερούς $p75^{NTR}$. Το Dscore αυτών κυμαινόταν μεταξύ 0,655 και 0,996, ενώ ο όγκος τους κυμαινόταν μεταξύ 12,4 A³ και 217,5 A³ (πίνακας 3.1).

	SiteScore	Dscore	Όγκος (A ³)
Προτεινόμενο HotSpot 1	0,843	0,962	217,5
Προτεινόμενο HotSpot 2	0,873	0,996	52,1
Προτεινόμενο HotSpot 3	0,864	0,977	102,2
Προτεινόμενο HotSpot 4	0,611	0,655	12,4
Προτεινόμενο HotSpot 5	0,852	0,971	57,6

Πίνακας 3.1: Πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης για το μονομερές του $p75^{NTR}$

Το HotSpot 1 περιλαμβάνει το N-άκρο της πρωτεΐνης που συμπίπτει με το CRD1 και έχει προταθεί πως με αυτό αλληλεπιδρά το Αβ πεπτιδίο²⁵. Το HotSpot 2 βρίσκεται στην περιοχή CRD2 στην έξω πλευρά σε σχέση με τη διεπιφάνεια του ομοδιμερούς

NGF με τον $p75^{NTR}$, το HotSpot 3 τοποθετείται στην περιοχή CRD3, στη διεπιφάνεια μεταξύ των Site I και Site II που αποτελούν τις θέσεις αλληλεπίδρασης του NGF σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $p75^{NTR}ECD:NGF$ 1:2,³³ το HotSpot 4 που εντοπίζεται στη διεπιφάνεια του ομοδιμερούς NGF με το $p75^{NT}$ και ταυτίζεται με το Site II της θέσης αλληλεπίδρασης του NGF με τον $p75^{NTR}ECD$ ³³ και τέλος και το HotSpot 5 (παριστάνεται ως επιφάνεια στην εικόνα 3.1) που βρίσκεται στην C-τερματική περιοχή, περιλαμβάνει αμινοξέα της περιοχής CRD4, και διευθετείται στη εκτεινόμενη προς το διαλύτη πλευρά του εξωτερική πλευρά $p75^{NTR}$ στην αντίθετη πλευρά της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης των $p75^{NTR}$ και NGF (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Οι πέντε προτεινόμενες περιοχές αλληλεπίδρασης (HotSpots) για το μονομέρες του $p75^{NTR}$. Για να διευκολυνθεί η κατανόηση της τοπολογίας των hot spots εικονίζεται και το ομοδιμέρες του NGF όπως ελήφθη από την κρυσταλλική δομή (pdb: 1sg1)

Αλληλεπιδράσεις BNN27 με το μονομερές p75^{NTR}

Οι αλληλεπιδράσεις του BNN27 με το μονομερές p75^{NTR} διερευνήθηκαν μέσα από δύο ανεξάρτητες προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής διάρκειας 30 και 50 ns.

1) Προσομοίωση μοριακής δυναμικής p75^{NTR} – (10 μορίων) BNN27 για 30 ns

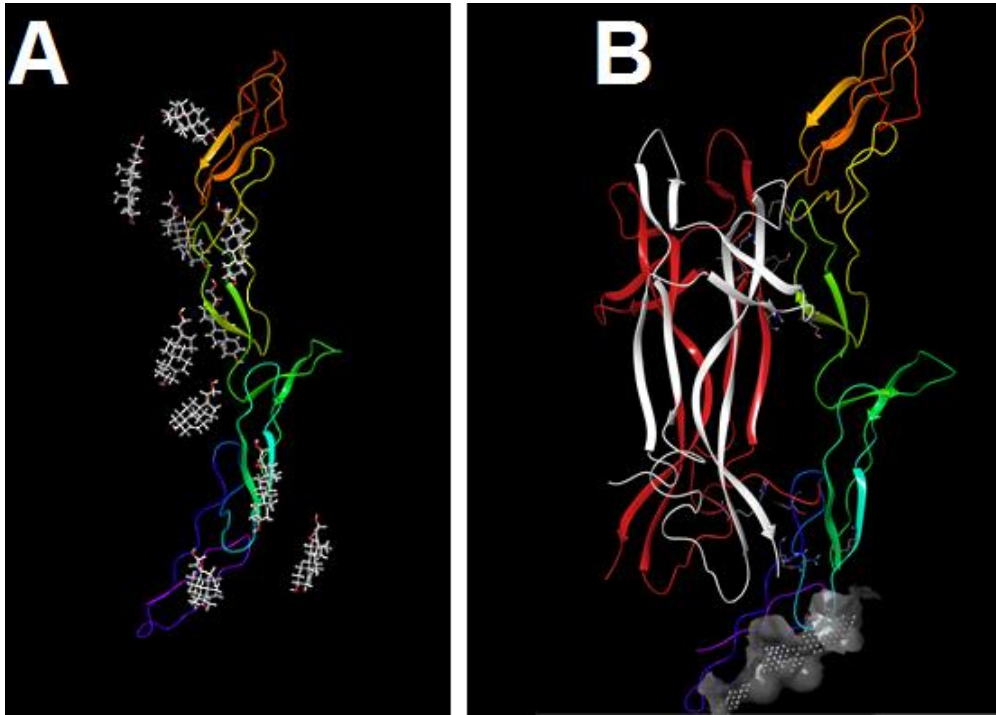
Κοντά σε κάθεμία από τις πέντε προτεινόμενες περιοχές αλληλεπίδρασης και σε αποστάσεις περίπου 6 Å τοποθετήθηκαν μόρια BNN27. Τοποθετήθηκαν 10 μόρια BNN27 με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτονται όλες οι περιοχές όσο το δυνατόν καλύτερα. Τα μόρια τοποθετήθηκαν κατά τρόπο ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε πιθανή ευνοϊκή αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη στην αρχική αυτή θέση τους που θα μπορούσε να επηρεάσει το αποτέλεσμα της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής (εικόνα 3.2A). Η προσομοίωση αυτή διήρκησε 30 ns.

Από τα 10 μόρια BNN27, τα 2 απομακρύνθηκαν από την πρωτεΐνη, ενώ τα 8 συγκεντρώθηκαν σε τρεις από τις πέντε περιοχές που πρότεινε το SiteMap. Για να διερευνηθούν καλύτερα οι αλληλεπιδράσεις αυτές παρήχθησαν Simulation Interaction Diagrams (SIDs). Βάση αυτών, τα 7 από τα 8 μόρια BNN27 που παρέμειναν κοντά στην πρωτεΐνη δεν παρουσίασαν ιδιαίτερα σταθερές αλληλεπιδράσεις. Μόνο ένα (1) μόριο BNN27 παρουσίασε σταθερές αλληλεπιδράσεις κατά την διάρκεια του χρόνου. Η περιοχή της ευνοϊκότερης αλληλεπίδρασης ταυτίζεται με το HotSpot 5 και φαίνεται στην εικόνα 3.2B, ενώ οι αλληλεπιδράσεις φαίνονται με λεπτομέρειες στις εικόνες 3.3, 3.4 και 3.5.

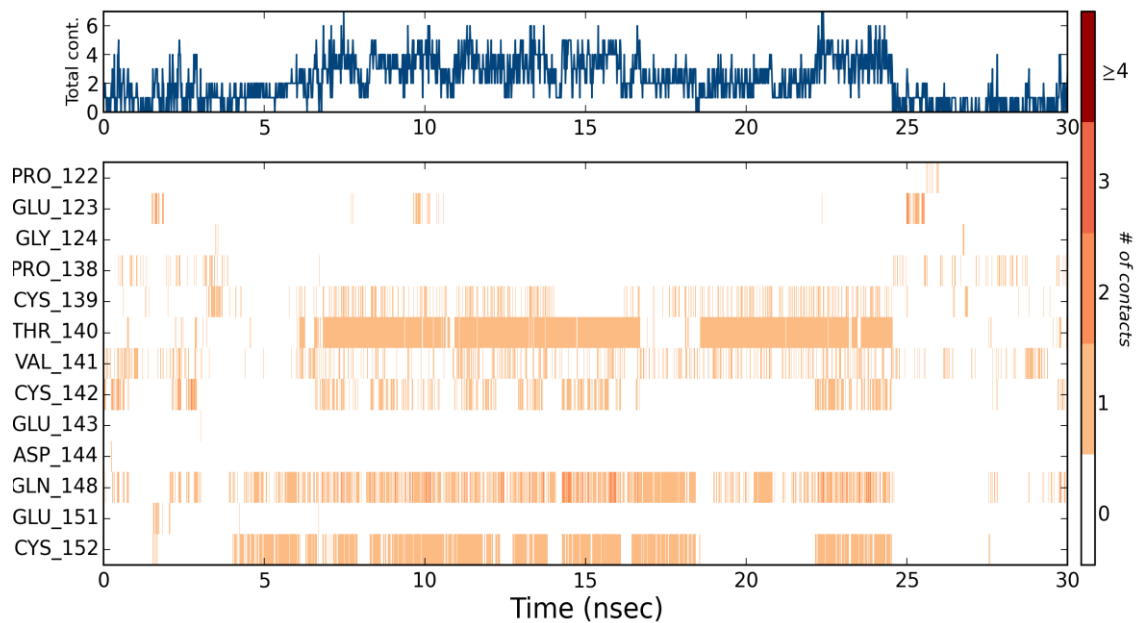
Στην εικόνα 3.3 βλέπουμε το διάγραμμα “Protein - ligand contacts” που μας παρέχει το SID. Κάτι ιδιαίτερα σημαντικό που παρατηρούμε αμέσως είναι πως το μόριο ξεκίνησε την αλληλεπίδρασή του με τον p75^{NTR} σχεδόν αμέσως (μέσα στο πρώτα 5 ns). Τα αμινοξέα του p75^{NTR} με τα οποία αλληλεπιδρά το BNN27 είναι η THR_140, η GLN_148 και η CYS_152.

Το ιστόγραμμα της εικόνας 3.4 πληροφορεί για τη φύση αυτών των αλληλεπιδράσεων. Έτσι λοιπόν βλέπουμε πως όλες οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται είναι δεσμοί υδρογόνου είτε απ’ ευθείας είτε διαμεσολαβούμενοι από μόρια ύδατος. Στην περίπτωση της THR_140, η αλληλεπίδραση μέσω δεσμού υδρογόνου είναι απ’ ευθείας για σχεδόν όλη την διάρκεια του χρόνου, ενώ οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα GLN_148 και CYS_152, δύνανται να γίνονται και μέσω μορίων νερού.

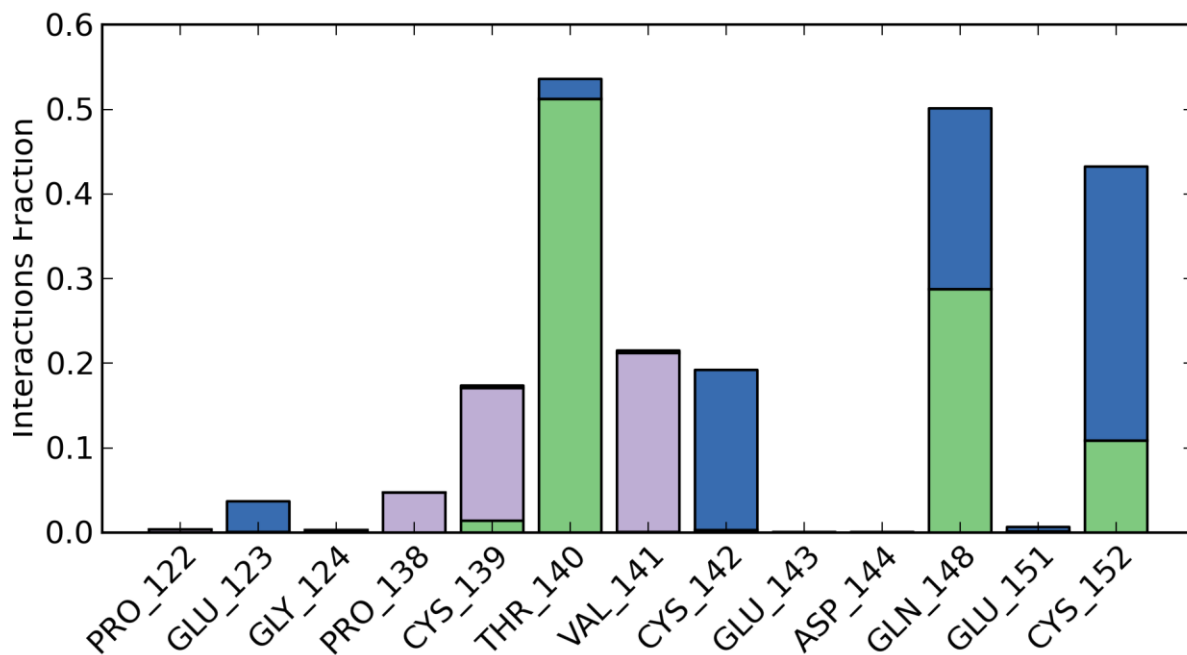
Το διάγραμμα “ligand - protein contacts”, που παρέχει το SID μας δίνει πληροφορία για τις χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη (εικόνα 3.5). Παρατηρούμε λοιπόν πως το BNN27 αλληλεπιδρά με το p75^{NTR} μέσω της ομάδας υδροξυλίου στη θέση 3 (3-OH).



Εικόνα 3.2: (A) Το σύστημα $p75^{NTR}$ – (10 μορίων) BNN27 που ερευνήθηκε με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για 30 ns. Εικονίζονται οι αρχικές θέσεις των μορίων όπως τοποθετήθηκαν χειροκίνητα. (B) Η πλέον ευνοϊκή θέση αλληλεπίδρασης (εικονίζεται ως επιφάνεια) όπου το BNN27 αναπτύσσει σταθερές αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα του $p75^{NTR}$ κατά το μεγαλύτερο διάστημα της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής. Για να διευκολυνθεί η κατανόηση της τοπολογίας των hot spots εικονίζεται και το ομοδιμερές του NGF όπως ελήφθη από την κρυσταλλική δομή (pdb: 1sg1)

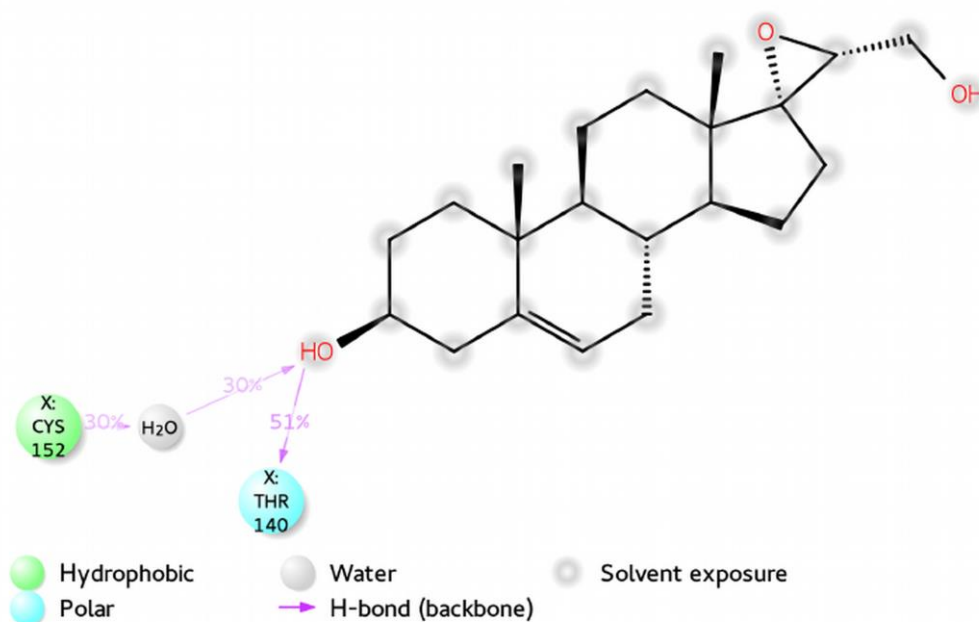


Εικόνα 3.3: Το διάγραμμα “Protein-ligand contacts” παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις του $p75^{NTR}$ με το BNN27, καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, διάρκειας 30 ns..



Εικόνα 3.4: Στο ιστόγραμμα, φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου της προσομοίωσης. Με πράσινο χρώμα φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης και του ligand ενώ με μπλε χρώμα φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου στους οποίους μεσολαβεί μόριο νερού. Με μωβ χρώμα φαίνονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

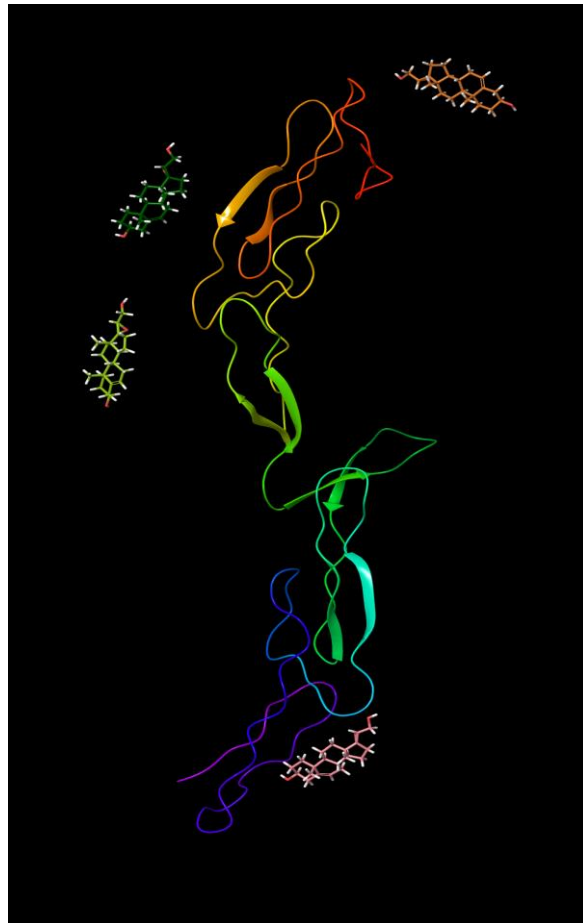
Ligand-Protein Contacts



Εικόνα 3.5: Αλληλεπιδράσεις του BNN27 με αμινοξέα του p75NTR στο hot spot 5 που σταθεροποιούνται για χρονικό διάστημα πάνω από 30% του συνολικού χρόνου προσομοίωσης

2) Προσομοίωση μοριακής δυναμικής p75^{NTR} – (4 μορίων)BNN27 για 50 ns

Στην νέα αυτή προσομοίωση τοποθετήθηκαν 4 μόρια BNN27, κοντά στις περιοχές της πρωτεΐνης που αναδείχθηκαν πιο ευνοϊκές για την ανάπτυξη και σταθεροποίηση αλληλεπιδράσεων με το BNN27 από την προηγούμενη προσομοίωση (π.χ. HotSpot 5), είτε σε περιοχές ιδιαίτερου ενδιαφέροντος (π.χ. περιοχές αλληλεπίδρασης p75^{NTR}:NGF) ενώ επιπρόσθετα επιλέχθηκε και μία περιοχή (στο N-τελικό άκρο του υποδοχέα στην ευρύτερη περιοχή του HotSpot 1) που αν και στην προηγούμενη προσομοίωση δεν προσέλκυσε μόριο BNN27, παρόλα αυτά θεωρήθηκε σημαντική γιατί έχει υποδειχθεί από τους Devarajan και Sharmila²⁵ ως περιοχή αλληλεπίδρασης του p75^{NTR} με το Αβ πεπτίδιο, οπότε θεωρήθηκε σημαντικό να ερευνηθεί για άλλη μία φορά. (εικόνα 3.6). Η προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής αυτή την φορά διήρκησε 50 ns.

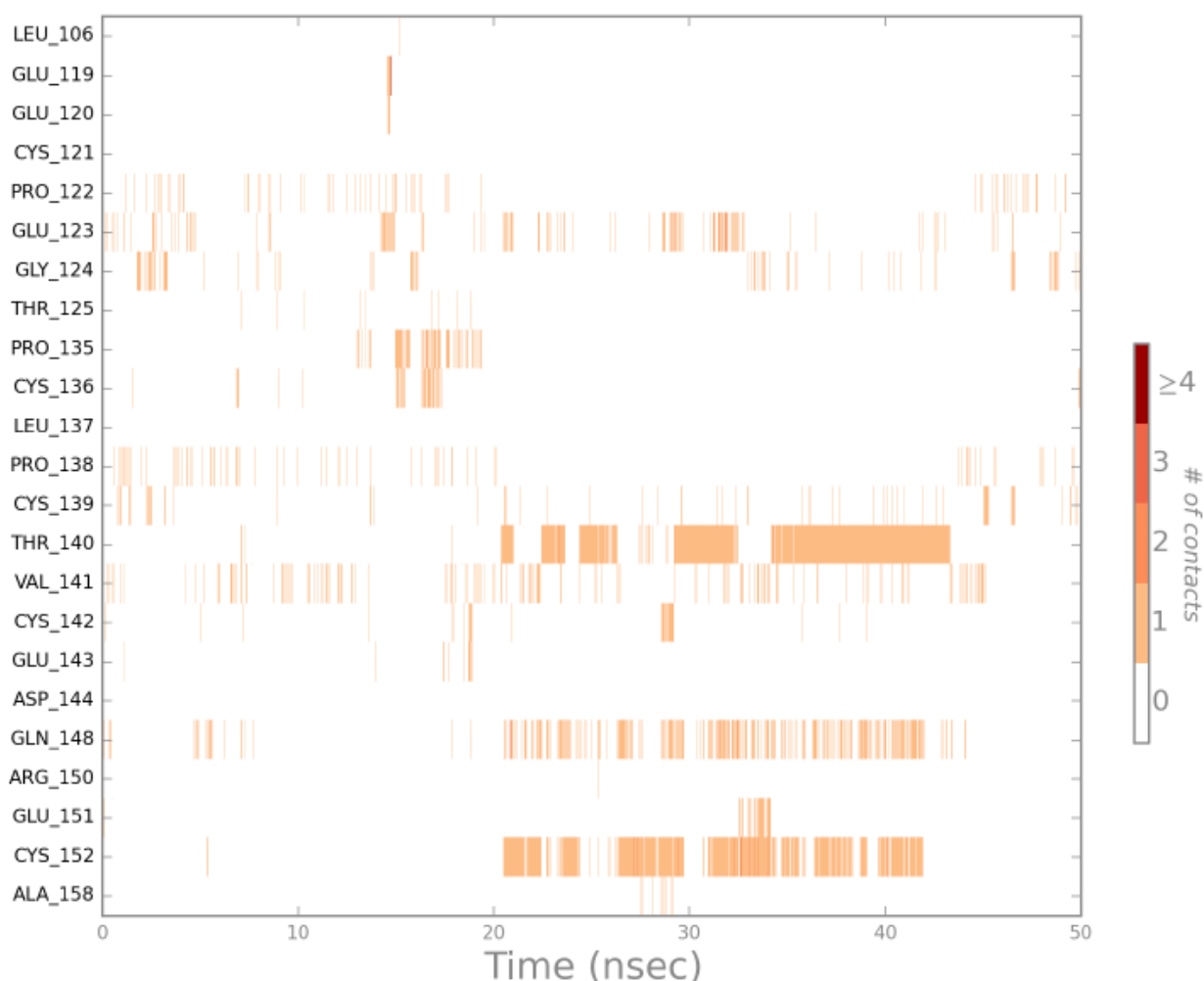


Εικόνα 3.6: Σύστημα p75^{NTR} – (4 μορίων)BNN27 που ερευνήθηκε με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για 50 ns. Εικονίζονται οι αρχικές θέσεις των μορίων όπως τοποθετήθηκαν χειροκίνητα.

Η δεύτερη προσομοίωση ανέδειξε εκ νέου ως μοναδική ευνοϊκή περιοχή αλληλεπίδρασης αυτή του CRD4 (εικόνα 3.2B). Αξιοσημείωτο είναι ότι τα τρία από τα τέσσερα μόρια BNN27 προσέγγισαν την περιοχή του CRD4, ενώ το τέταρτο απομακρύνθηκε από την πρωτεΐνη. Από τα τρία μόρια κοντά στην περιοχή CRD4, το ένα ανέπτυξε σταθερές αλληλεπιδράσεις κατά την μεγαλύτερη χρονική διάρκεια της προσομοίωσης (εικόνα 3.7).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως και στις δύο προσομοιώσεις που έγιναν στα συστήματα των BNN27 με το μονομερές $p75^{NTR}$, το στεροειδές αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με τα ίδια τρία αμινοξέα, THR_140, GLN_148 και CYS_152 του $p75^{NTR}$ (εικόνας 3.4 και 3.8).

Επιπλέον, όπως και στην προηγούμενη προσομοίωση η αλληλεπίδραση του BNN27 με το αμινοξύ THR_140 είναι απ' ευθείας δεσμός υδρογόνου ενώ οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα GLN_148 και CYS_152, δύνανται να γίνονται και μέσω μορίων νερού. (εικόνα 3.8 και εικόνα 3.9)

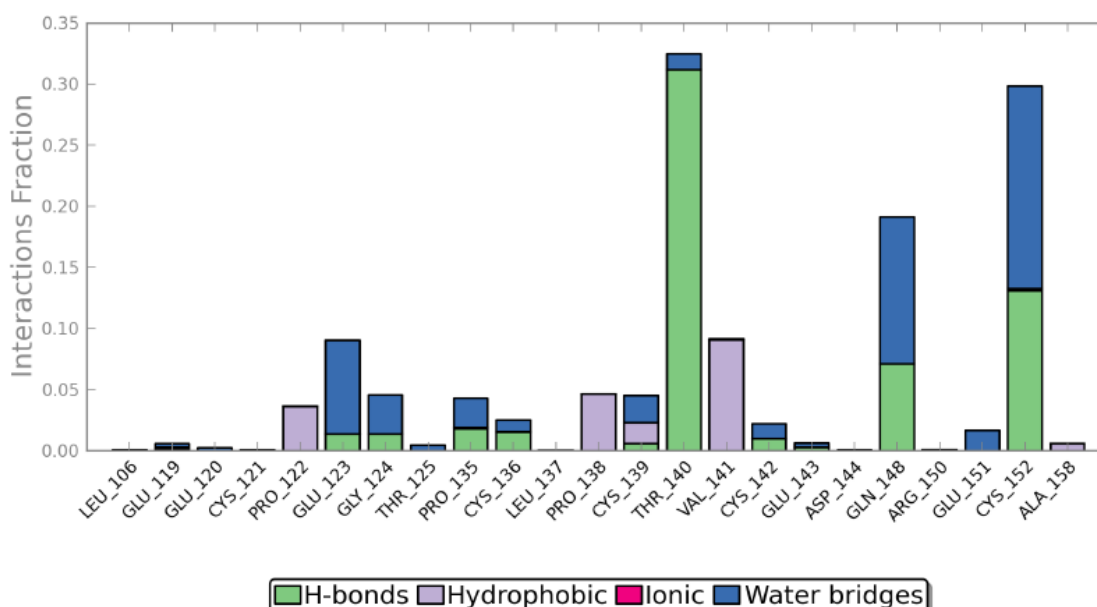


Εικόνα 3.7: Το διάγραμμα “Protein-ligand contacts” παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις του $p75^{NTR}$ με το BNN27, καθ’ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, διάρκειας 50 ns.

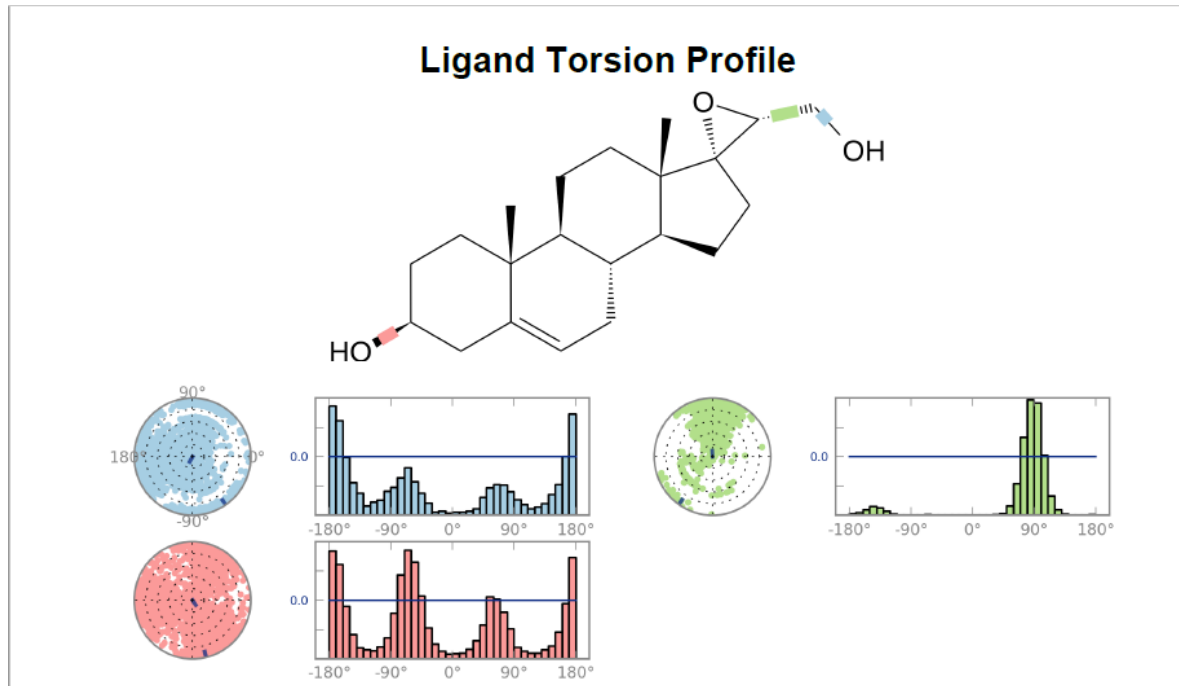
Σε αυτή την προσομοίωση το BNN27 αλληλεπιδρά με το p75^{NTR} μέσω της ομάδας υδροξυλίου της θέσης 21 (21-OH). Αυτή η διαφορετική προσέγγιση του BNN27 όμως είχε σαν αποτέλεσμα οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίστηκαν να διαρκέσουν για μικρότερο χρονικό διάστημα. Η λιγότερο ισχυρή αλληλεπίδραση (με κριτήριο τον χρόνο), εξηγείται λόγω της αλληλεπίδρασης του BNN27 μέσω του υδροξυλίου στην θέση 21 (21-OH). Το υδροξύλιο στην θέση 21 είναι αναμενόμενο να περιστρέφεται ελεύθερα, ο περιστρεφόμενος δεσμός όμως, μεταξύ των ανθράκων 20 και 21 (C20 – C21) (δοσμένος με πράσινο χρώμα στην εικόνα 3.10), αυξάνει την περιστροφή του υδροξυλίου στην θέση 21 (21-OH), με αποτέλεσμα οι αλληλεπιδράσεις αυτού να είναι λιγότερο σταθερές.

Συνοψίζοντας, οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής ανέδειξαν το HotSpot 5 ως την πλέον ευνοϊκή περιοχή αλληλεπίδρασης με το BNN27. Το HotSpot 5 βρίσκεται στην περιοχή του C-τελικού άκρου της παραμεμβρανικής εξωκυτταρικής περιοχής του p75^{NTR} στη γειτνίαση των αμινοξέων Cys152, Gln148, Thr140 και Val141, και προσανατολίζεται στην αντίθετη πλευρά σε σχέση με τη διεπιφάνεια του συμπλόκου p75^{NTR}:NGF 1:2. Το BNN27 αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική επιφάνεια του p75^{NTR} χρησιμοποιώντας μόνο ένα από τα πολικά άκρα του είτε το 3-OH είτε το 21-OH εικόνα 3.11.

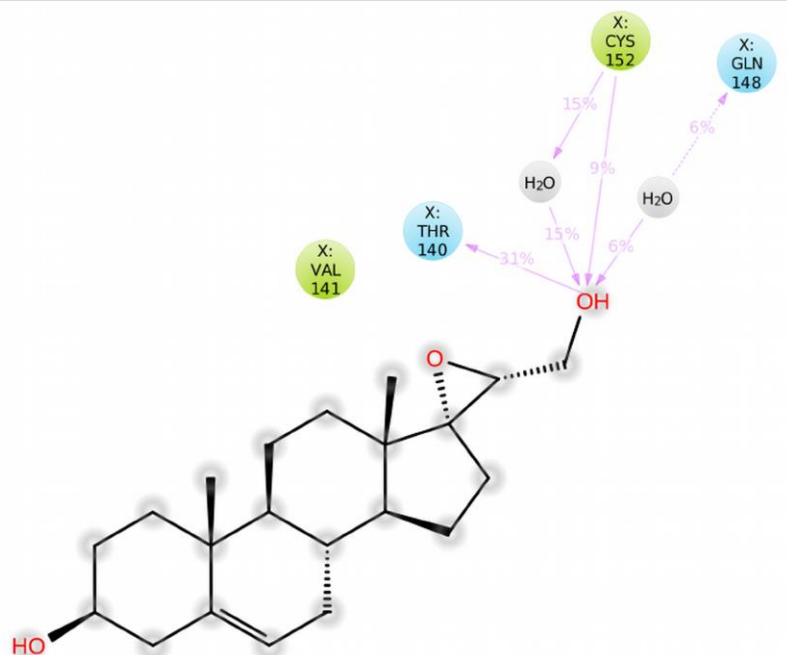
Protein-Ligand Contacts



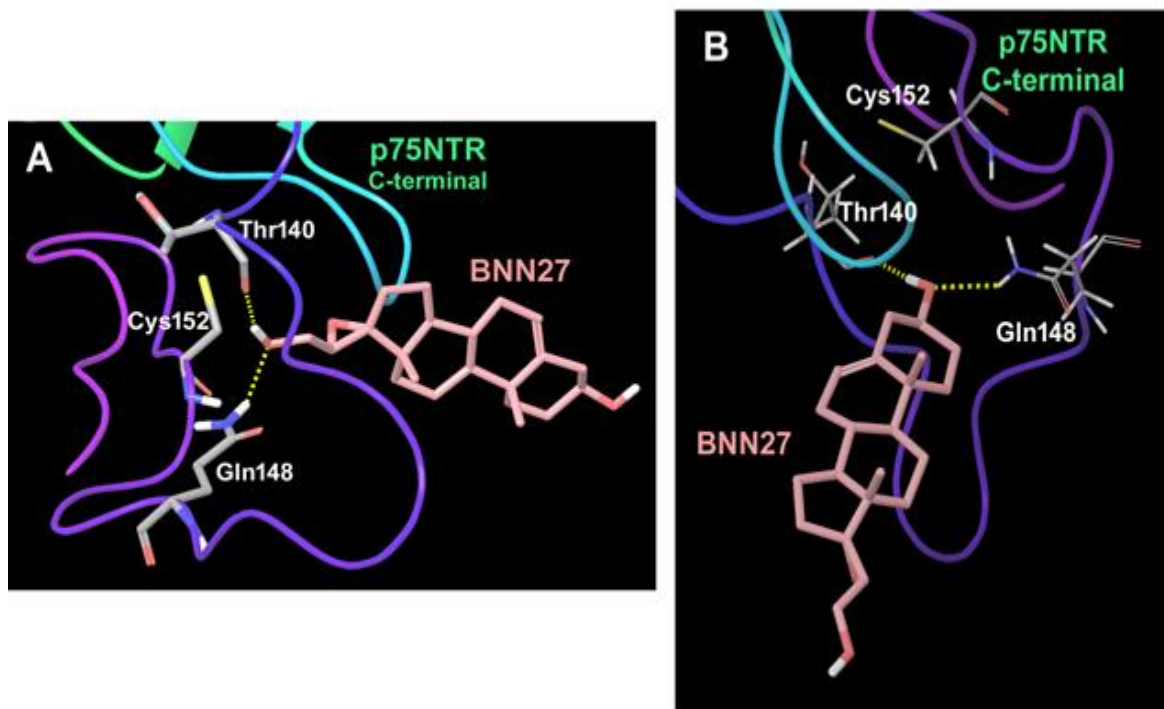
Εικόνα 3.8: Στο ιστόγραμμα, φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου (50 ns) στην περίπτωση της δεύτερης προσομοίωσης. Να επισημανθεί η μικρότερη διάρκεια χρόνου για όλες τις αλληλεπιδράσεις



Εικόνα 3.9: Οι “Ligand - protein contacts” μας παρέχουν πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις του p75NTR με το BNN27, που παράγεται μέσω της μεθοδολογίας των SID



Εικόνα 3.10: Το Ligand Torsion Profile μας δίνει πληροφορίες για την δυνατότητα του μικρού μορίου να λαμβάνει διαφορετικές διαμορφώσεις λόγω περιστρεφόμενων δεσμών. Στην συγκεκριμένη περίπτωση βλέπουμε πως του υδροξυλίου στην θέση 21 (21-OH) προηγείται περιστρεφόμενος δεσμός μεταξύ των ανθράκων 20 και 21 (C20-C21) με αποτέλεσμα το υδροξύλιο να μπορεί να λάβει πολλές διαφορετικές διαμορφώσεις στον χώρο, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα οι αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ αυτού και της πρωτεΐνης να είναι λιγότερο σταθεροί στην διάρκεια του χρόνου



Εικόνα 3.11: Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα από τις δύο προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής του συστήματος των μορίων BNN27 με το μονομερές p75^{NTR}ECD. Και στις δύο προσομοιώσεις το μόριο αναπτύσσει σταθερές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Thr140 και Gln148 της περιοχής CRD4 της πρωτεΐνης είτε μέσω του 21-OH (A) είτε του 3-OH (B)

Προτεινόμενες περιοχές αλληλεπίδρασης (HotSpots) για το σύμπλοκο p75^{NTR} – NGF στοιχειομετρίας 1:2

Για την εξαγωγή των πιθανών περιοχών αλληλεπίδρασης στην περίπτωση του συμπλόκου p75^{NTR} – NGF στοιχειομετρίας 1:2, χρησιμοποιήθηκε ο κρύσταλλος με κωδικό [pdb: 1sg1](#).

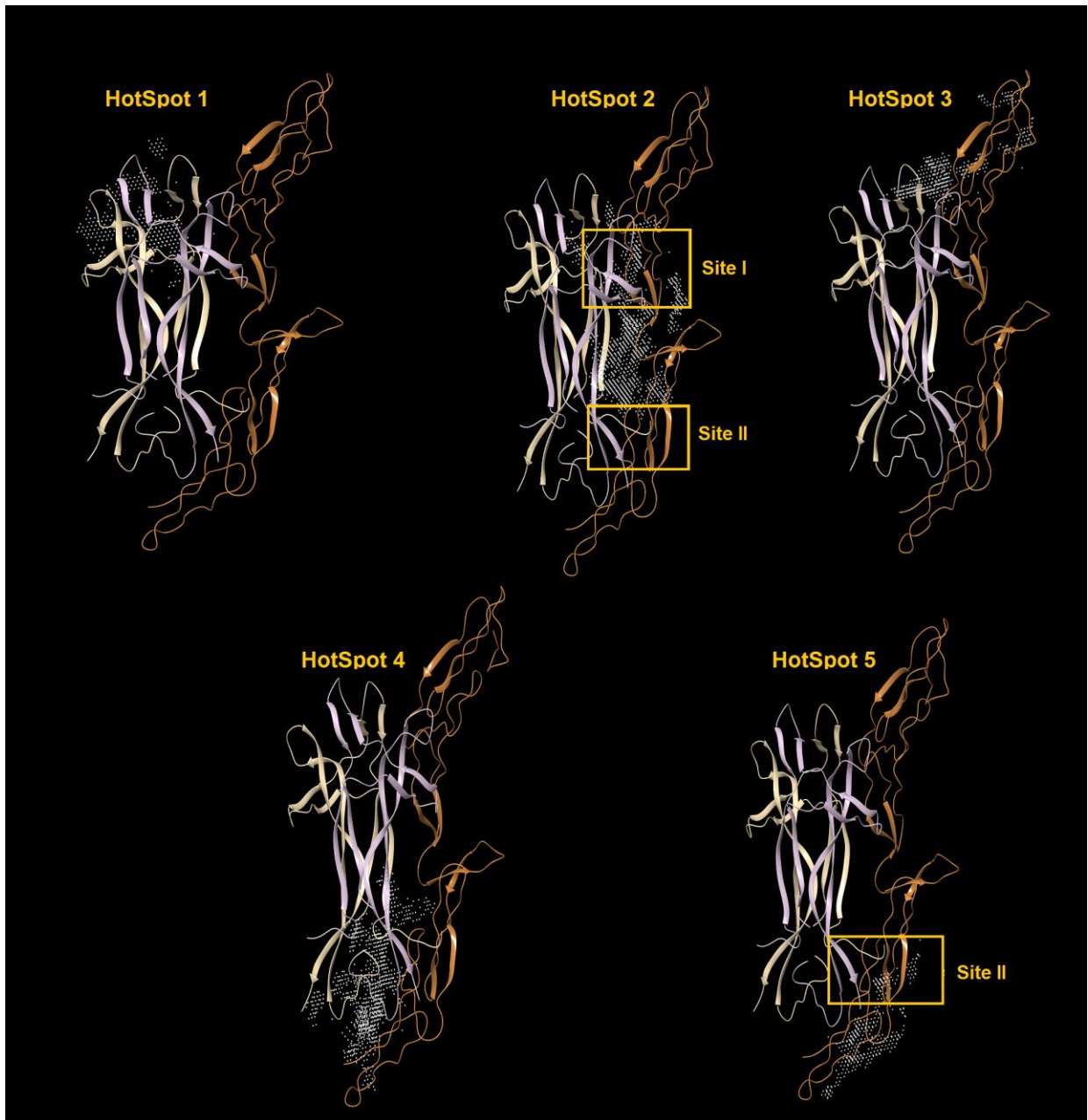
Βρέθηκαν πέντε (5) πιθανές περιοχές που θα μπορούσαν να αποτελούν την περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός εν δυνάμει φαρμακευτικού μορίου (όπως το BNN27) και του συμπλόκου (πίνακας 3.2). Το Dscore αυτών κυμαινόταν μεταξύ 0,987 και 1,030, ενώ ο όγκος τους κυμαινόταν μεταξύ 153,3 Å³ και 953,5 Å³. Η μεγαλύτερη σε όγκο περιοχή είχε Dscore 1,009.

	SiteScore	Dscore	Όγκος (Å ³)
Προτεινόμενο HotSpot 1	0,926	1,030	386,56
Προτεινόμενο HotSpot 2	0,916	1,009	953,54
Προτεινόμενο HotSpot 3	0,884	0,997	284,69
Προτεινόμενο HotSpot 4	0,878	0,987	153,32
Προτεινόμενο HotSpot 5	0,869	0,982	442,81

Πίνακας 3.2: Πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης για το σύμπλοκο p75^{NTR} – NGF, στοιχειομετρίας 1:2

Το HotSpot 1 περιλαμβάνει μόνο το διμερές του NGF, ενώ το HotSpot 2 περιλαμβάνει μέρος των CRD2 και CRD3 του p75^{NTR} και βρίσκεται μεταξύ του Site I και Site II, που είναι οι περιοχές αλληλεπίδρασης του p75^{NTR} με το διμερές του NGF. Το HotSpot 3 εκτείνεται στην περιοχή CRD1 του p75^{NTR} και περιλαμβάνει περιοχές και των δύο πρωτεϊνών. Το HotSpot 4 είναι ένα μεγάλο HotSpot το οποίο περιλαμβάνει περιοχές του διμερούς του NGF καθώς επίσης και του p75 και βρίσκεται στην “έξω επιφάνεια” του συμπλόκου. Τέλος το HotSpot 5 περιλαμβάνει την περιοχή CRD4 του p75^{NTR}, και εκτείνεται στην αντίθετη πλευρά της διεπαφής του διμερούς του NGF με τον p75^{NTR} (Site II) (εικόνα 3.12).

Από τα πέντε αυτά HotSpots το HotSpot 2 παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον δεδομένου πως περιλαμβάνει τις δύο περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ του διμερούς του NGF και του μονομερούς του p75^{NTR}, το HotSpot 3 παρουσιάζει ένα μικρό ενδιαφέρον γιατί φαίνεται να είναι αυτό στο οποίο έρχεται και αλληλεπιδρά το Αβ αμυλοειδές πεπτίδιο²⁵, καθώς επίσης και το HotSpot 5 παρουσιάζει ένα μικρό ενδιαφέρον δεδομένου πως αυτό περιλαμβάνει μέρος του Site II της αλληλεπίδρασης μεταξύ ομοδιμερούς NGF και p75^{NTR} καθώς επίσης και γιατί αυτή η περιοχή υποδείχθηκε ως η περιοχή αλληλεπίδρασης από τις προσομοιώσεις μόνο με τον p75^{NTR}.



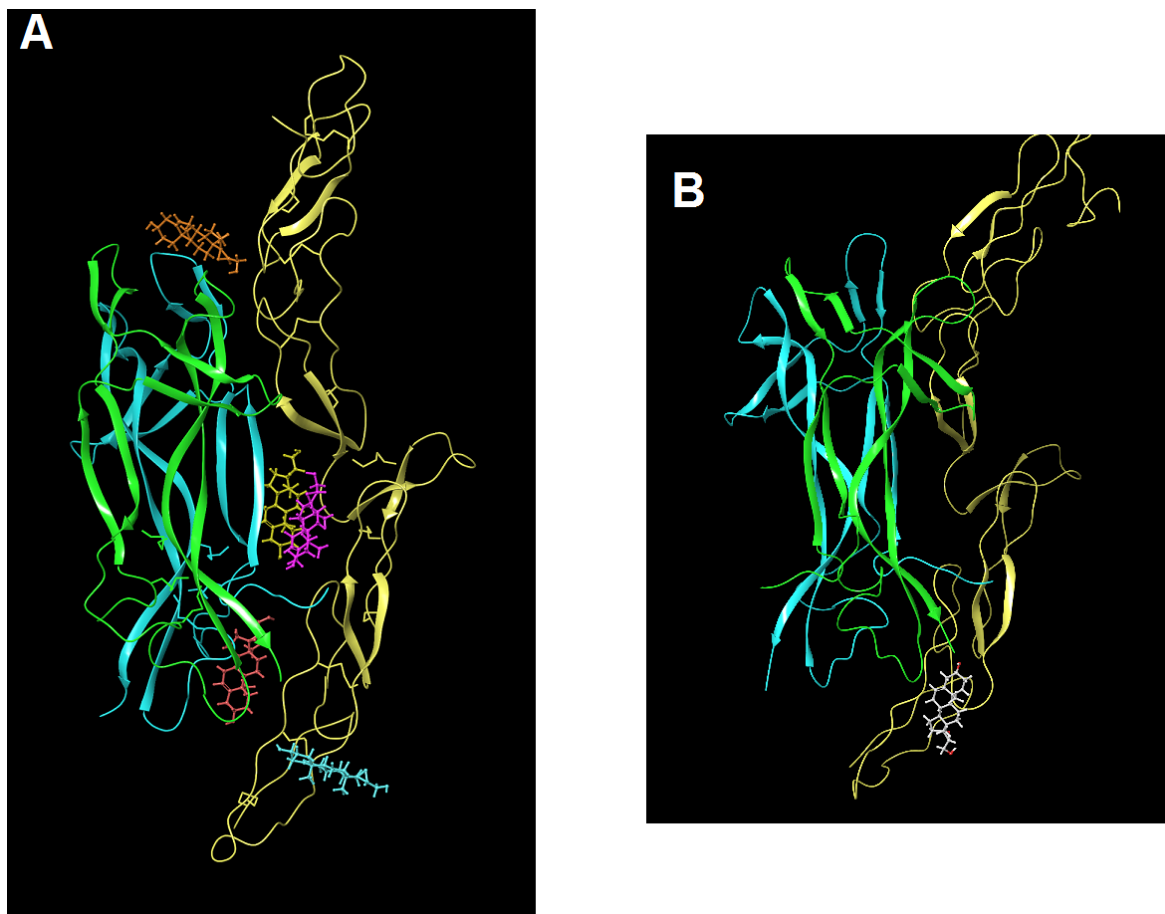
Εικόνα 3.12: Οι πέντε προτεινόμενες περιοχές αλληλεπίδρασης (HotSpots) για το σύμπλοκο $p75^{NTR} - NGF$ στοιχειομετρίας 1:2

Οι αλληλεπιδράσεις του BNN27 με το σύμπλοκο p75^{NTR}/NGF σε στοιχειομετρία 1:2

Η αλληλεπίδραση του BNN27 με το ασύμετρο σύμπλοκο p75^{NTR}/NGF 1:2 διερευνήθηκε με μακράς χρονικής διάρκειας προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής (200 ns).

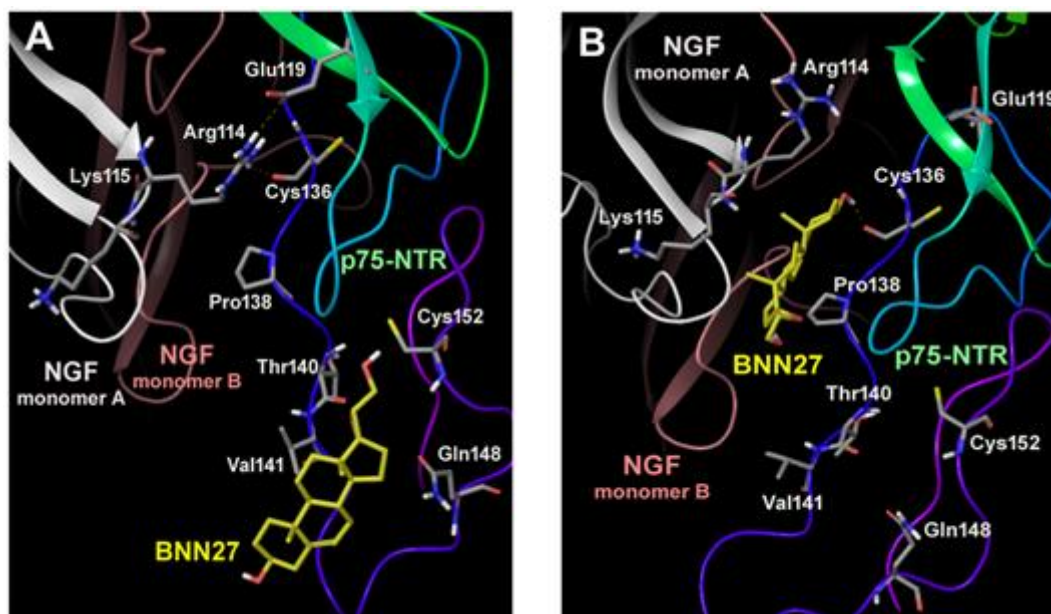
Οι περιοχές που επιλέχθηκαν για διερεύνηση, και που κοντά σε αυτές τοποθετήθηκαν μόρια BNN27, ήταν η ευρύτερη περιοχή του CRD4, δεδομένου πως αναδείχθηκε ως η πλέον ευνοϊκή στις προσομοιώσεις του BNN27 με το μονομερές p75^{NTR}, καθώς επίσης και σε θέσεις που γειτνιάζουν με περιοχές αλληλεπίδρασης του ομοδιμερούς NGF με τον p75^{NTR}, πλησίον δηλαδή των HotSpot 2 και HotSpot 3.

Τοποθετήθηκαν 5 μόρια BNN27, πάντα σε απόσταση 6 Å από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο (εικόνα 3.13A), και έγινε προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής, διάρκειας 200 ns.



Εικόνα 3.13: (A) Το σύστημα p75^{NTR}:NGF 1:2 - (5 μορίων) BNN27 που ερευνήθηκε με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για 200 ns. Εικονίζονται οι αρχικές θέσεις των μορίων όπως τοποθετήθηκαν χειροκίνητα. (B) Χαρακτηριστικό στιγμιότυπο της μοριακής προσομοίωσης υποδεικνύοντας την προσέγγιση του BNN27 προς την περιοχή διεπιφάνειας μεταξύ του ομοδιμερούς NGF και του p75^{NTR}.

Κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, ένα μόριο BNN27 εισήλθε αυθόρμητα από τον διαλύτη στην περιοχή διεπιφάνειας μεταξύ του ομοδιμερούς NGF και του p75^{NTR} σταθεροποιώντας αλληλεπιδράσεις μέσω του υδροξυλίου στην θέση 3 (3-OH) με τα αμινοξέα ARG_114 και LYS_115 της A αλυσίδας του NGF και το αμινοξύ CYS_136 του p75^{NTR} (εικόνες 3.13B, και 3.14). Τα υπόλοιπα 4 μόρια ανέπτυξαν τυχαίες αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια του συμπλόκου.

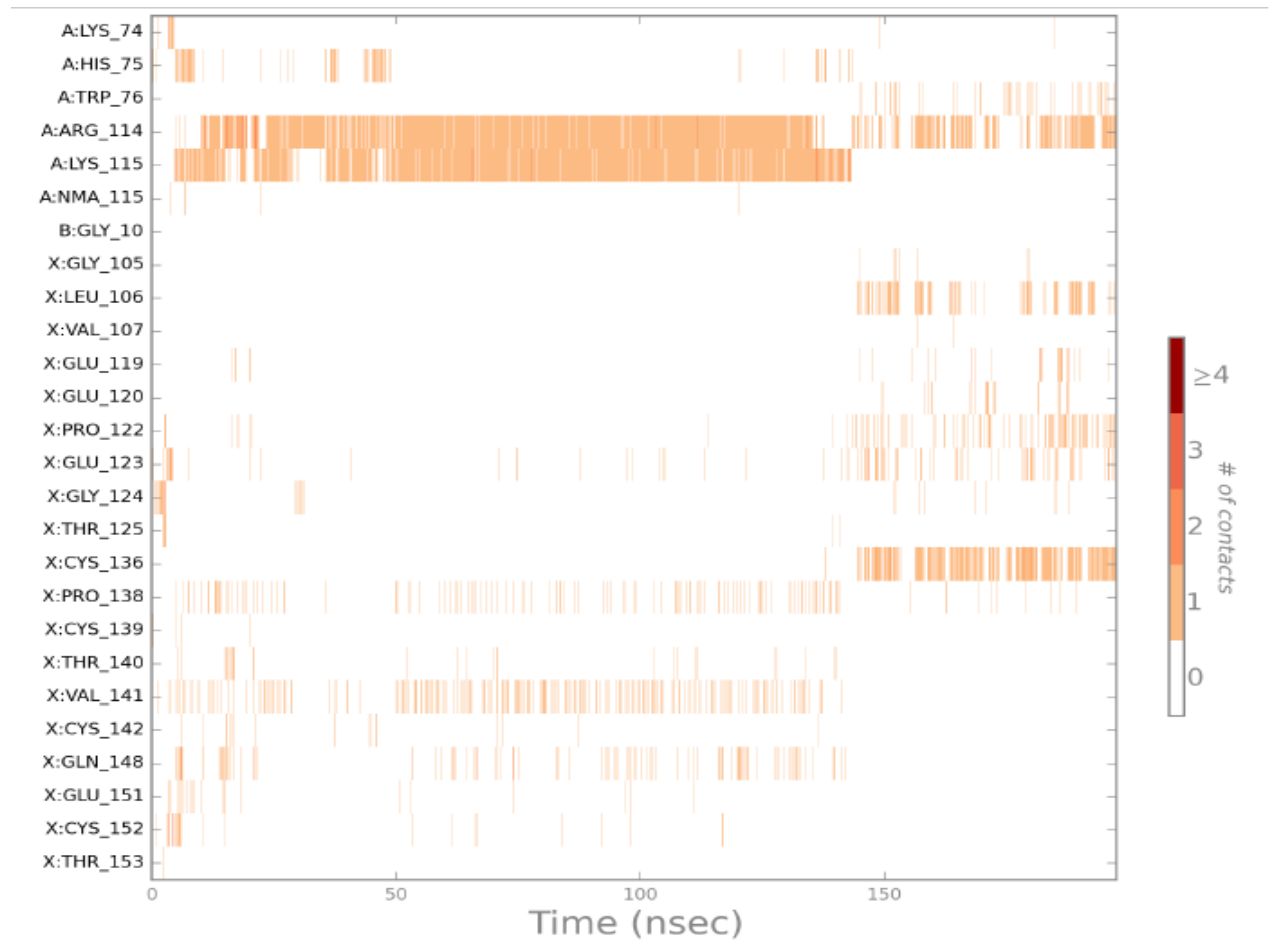


Εικόνα 3.14: Αλληλεπίδραση του BNN27 με το σύμπλοκο p75NTR:NGF 1:2 όπως καταγράφηκε στην προσομοίωση μοριακής δυναμικής του συστήματος (200 ns). (A) Αρχική κατάσταση με την τοποθέτηση του μορίου κοντά στην περιοχή CRD4 του p75NTR σε αντίθετη πλευρά από την διεπιφάνεια p75^{NTR}:NGF 1:2. (B) Αντιπροσωπευτικό στιγμιότυπο της προσομοίωσης (154 ns) δείχνοντας τη μετανάστευση του BNN27 προς τη διεπιφάνεια p75NTR:NGF 1:2 και τη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων με κρίσιμα αμινοξέα του συμπλόκου.

Το είδος των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει το BNN27 με τα αμινοξέα του συμπλόκου φαίνεται στην (εικόνα 3.16) και η σταθερότητά τους κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης προκύπτει από το διάγραμμα της εικόνας 3.15.

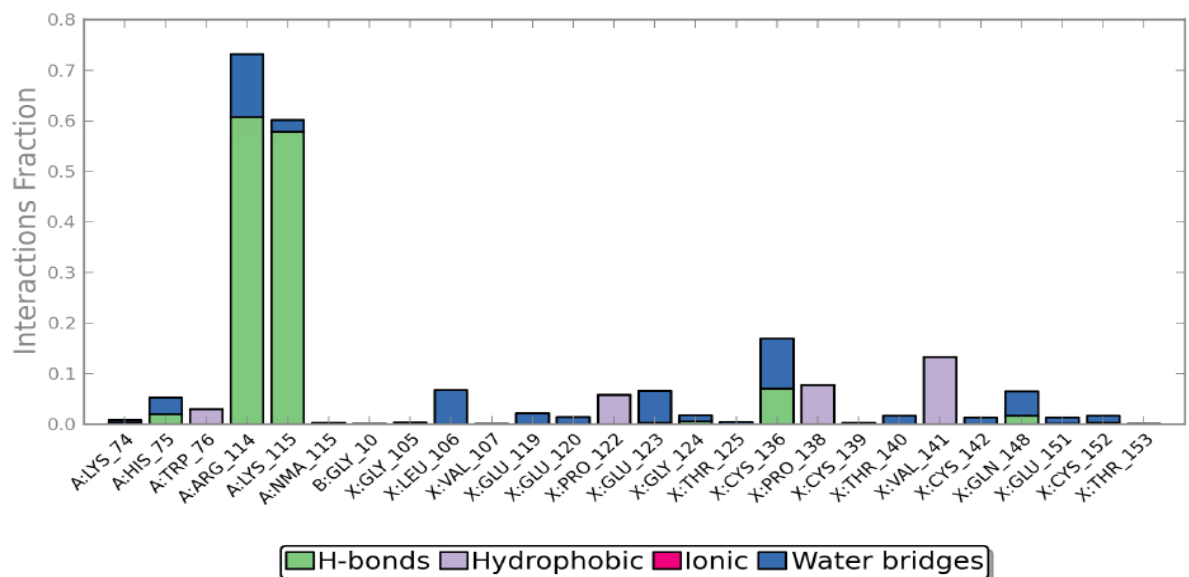
Το BNN27 σχηματίζει απ' ευθείας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα ARG_114 και την LYS_115 της A αλυσίδας του ομοδιμερούς του NGF ενώ σχηματίζει και δεσμό υδρογόνου είτε απ' ευθείας είτε μέσω ύδατος με την CYS_136 του p75^{NTR} με την τελευταία να αναπτύσσεται μετά τα 150 ns. Επίσης σημαντική είναι και η υδρόφοβη αλληλεπίδραση με την VAL_141 του p75^{NTR} (εικόνες 3.15 και 3.16).

Παρά την επαρκή εξισορρόπηση του συμπλόκου όπως αναδεικνύεται από τη μικρή διακύμανση του RMSD στο διάστημα 1-80 ns, στο χρονικό διάστημα 80-120 ns παρατηρήθηκε μία αρκετά μεγάλη διακύμανση του RMSD οφειλόμενη στη διαμορφωτική ευελιξία των αμινοξέων 60-70 της A έλικας του NGF εικόνα 3.18. Μετά το πέρας αυτής της διακύμανσης, και αφού το σύμπλοκο επανήλθε σε ισορροπία το BNN27 ξεκίνησε να αναπτύσσει σταθερές αλληλεπιδράσεις με την CYS_136 του p75^{NTR} (εικόνα 3.15).



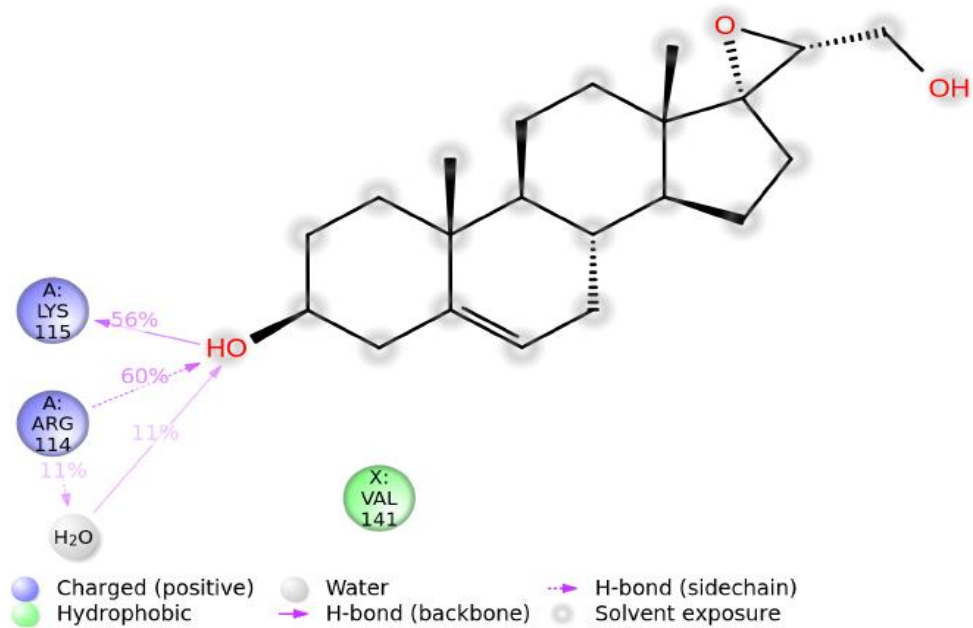
Εικόνα 3.15: Το διάγραμμα “Protein-ligand contacts” παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις του του BBN27 με το σύμπλοκο p75^{NTR}/NGF στοιχειομετρίας 1:2, καθ’ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, διάρκειας 200 ns

Protein-Ligand Contacts

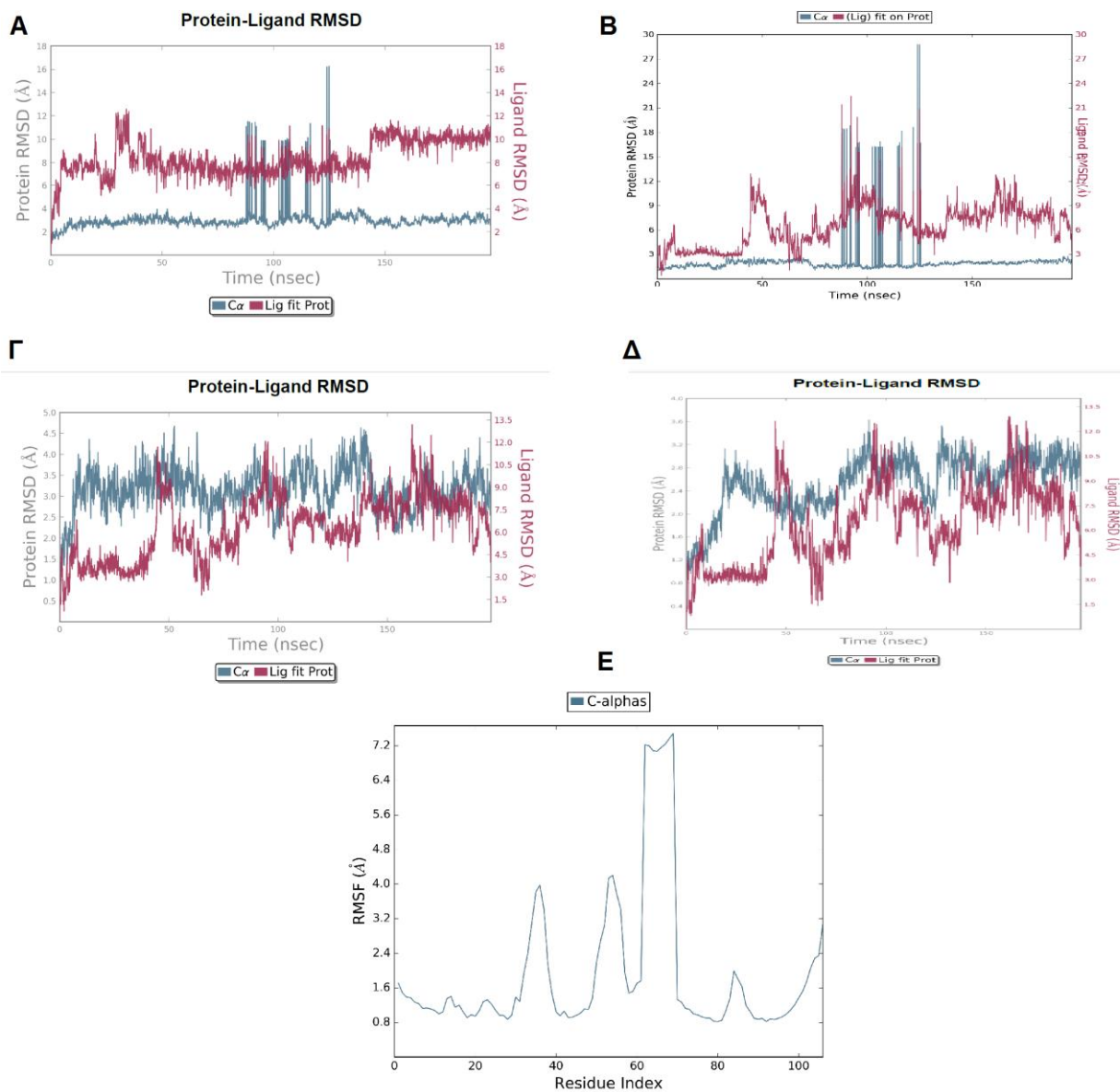


Εικόνα 3.16: Στο ιστόγραμμα, φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ του BBN27 και του συμπλόκου p75^{NTR}/NGF σε στοιχειομετρία 1:2 καθ’ όλη την διάρκεια του χρόνου της προσομοίωσης (200 ns).

Ligand-Protein Contacts



Εικόνα 3.17: Το διάγραμμα των “Ligand - protein contacts” στην περίπτωση της προσομοίωσης για το σύμπλοκο p75^{NTR}/NGF σε στοιχειομετρία 1:2 και για το σύνολο του χρόνου μας παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις του p75^{NTR} με το BNN27, δοσμένες από την πλευρά του BNN27.



Εικόνα 3.18: Το protein-ligand RMSD του συμπλόκου υπέδειξε μία αυξημένη διαμορφωτική αστάθεια κατά το χρονικό διάστημα 80-120 ns (A). Οπως ανέδειξαν τα αντίστοιχα διαγράμματα για την αλυσίδα A του NGF (B), την αλυσίδα B του NGF (Γ) και την αλυσίδα του p75^{NTR} (Δ), η αστάθεια οφείλεται σε αυξημένη κινητικότητα των αμινοξέων 60-70 της αλυσίδα A του NGF (E)

Προτεινόμενες περιοχές αλληλεπίδρασης (HotSpots) για το τροποποιημένο σύμπλοκο p75^{NTR} – NGF στοιχειομετρίας 2:2

Για την εξαγωγή των πιθανών περιοχών αλληλεπίδρασης στην περίπτωση του συμπλόκου p75^{NTR} – NGF στοιχειομετρίας 2:2, χρησιμοποιήθηκε ο κρύσταλλος με κωδικό pdb: [3ij2](#) τροποποιημένος όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων, ώστε να μοντελοποιηθεί ο ανθρώπινος NGF.

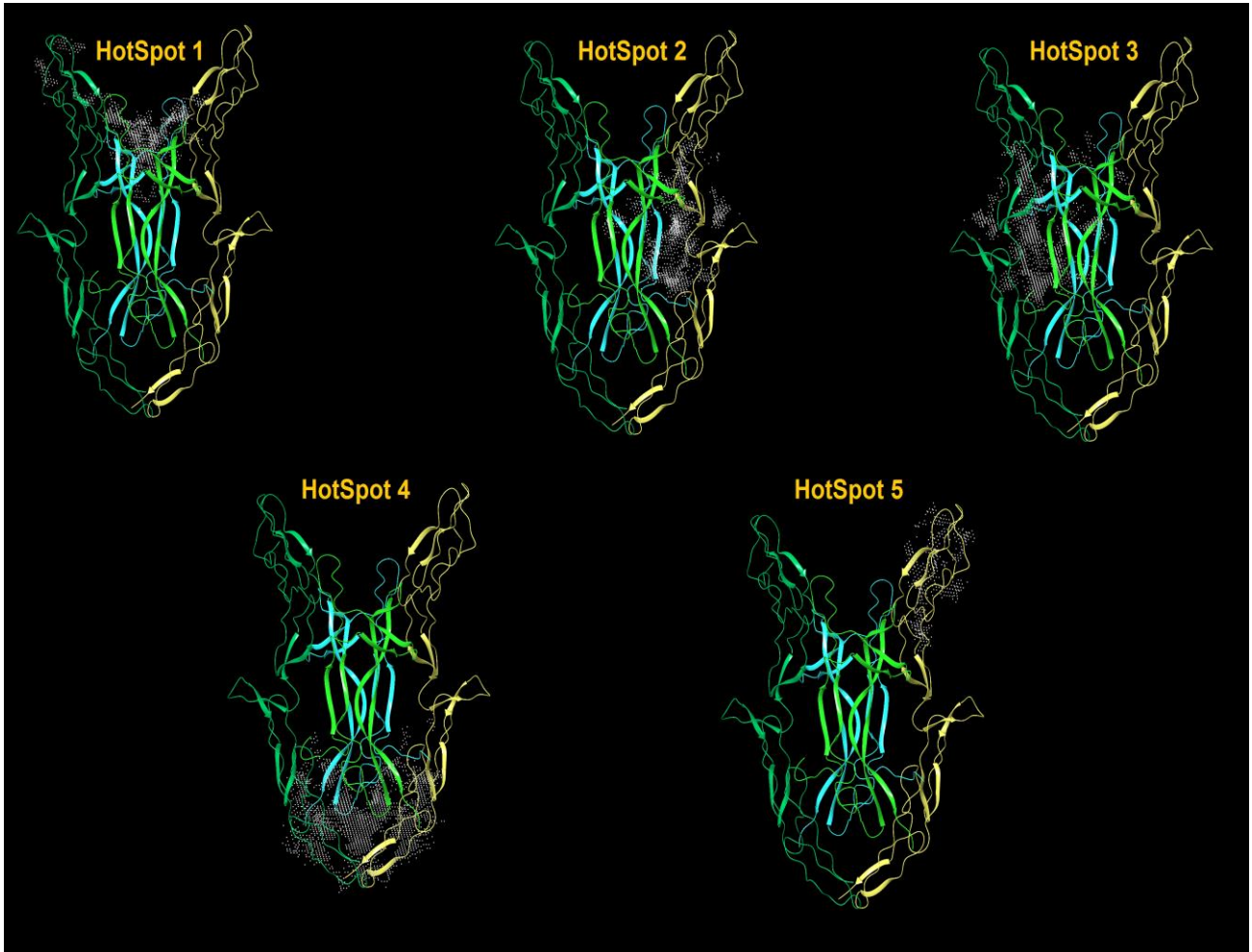
Στο τροποποιημένο σύμπλοκο του 3ij2, εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος SiteMap και βρέθηκαν πέντε (5) πιθανές περιοχές που θα μπορούσαν να αποτελούν την περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός εν δυνάμει φαρμακευτικού μορίου (όπως το BNN27) και του συμπλόκου (πίνακας 3.3). Το Dscore αυτών κυμαίνονται μεταξύ 0,979 και 1,033, ενώ ο όγκος τους κυμαίνονται μεταξύ 161,6 A³ και 1323,9 A³.

	SiteScore	Dscore	Όγκος (A ³)
Προτεινόμενο HotSpot 1	0,924	1,033	757,94
Προτεινόμενο HotSpot 2	0,925	1,025	946,68
Προτεινόμενο HotSpot 3	0,914	1,020	1082,51
Προτεινόμενο HotSpot 4	0,892	0,988	1323,98
Προτεινόμενο HotSpot 5	0,859	0,987	161,55

Πίνακας 3.3: Πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης για το τροποποιημένο σύμπλοκο p75^{NTR} – proNGF, στοιχειομετρίας 2:2

Το HotSpot 1, περιλαμβάνει το CRD1 μόνο του ενός μορίου p75^{NTR} και εκτείνεται στην περιοχή των βρόχων L2 του ομοδιμερούς του NGF^{32,36}, μεταξύ των δύο CRD1 των δύο p75^{NTR} μορίων. Το HotSpot 2 περιλαμβάνει μέρος των CRD2 και CRD3 του p75^{NTR} και ως επί το πλείστον βρίσκεται μεταξύ του Site I και Site II, που είναι οι περιοχές αλληλεπίδρασης του p75^{NTR} με το διμερές του NGF. Το HotSpot 3 θα μπορούσαμε να πούμε πως είναι κατοπτρικό του HotSpot 2, περιλαμβάνοντας μέρος των CRD2 και CRD3 του δεύτερου μονομερούς του p75^{NTR}. Το ευρύ HotSpot 4 περιλαμβάνει τα CRD4 των δύο p75^{NTR} μορίων και την περιοχή των βρόχων L3^{32,36} του ομοδιμερούς του NGF που βρίσκεται μεταξύ αυτών των δύο CRD4. Το HotSpot 5 περιλαμβάνει μόνο το CRD1 του ενός μονομερούς του p75^{NTR} (εικόνα 3.19).

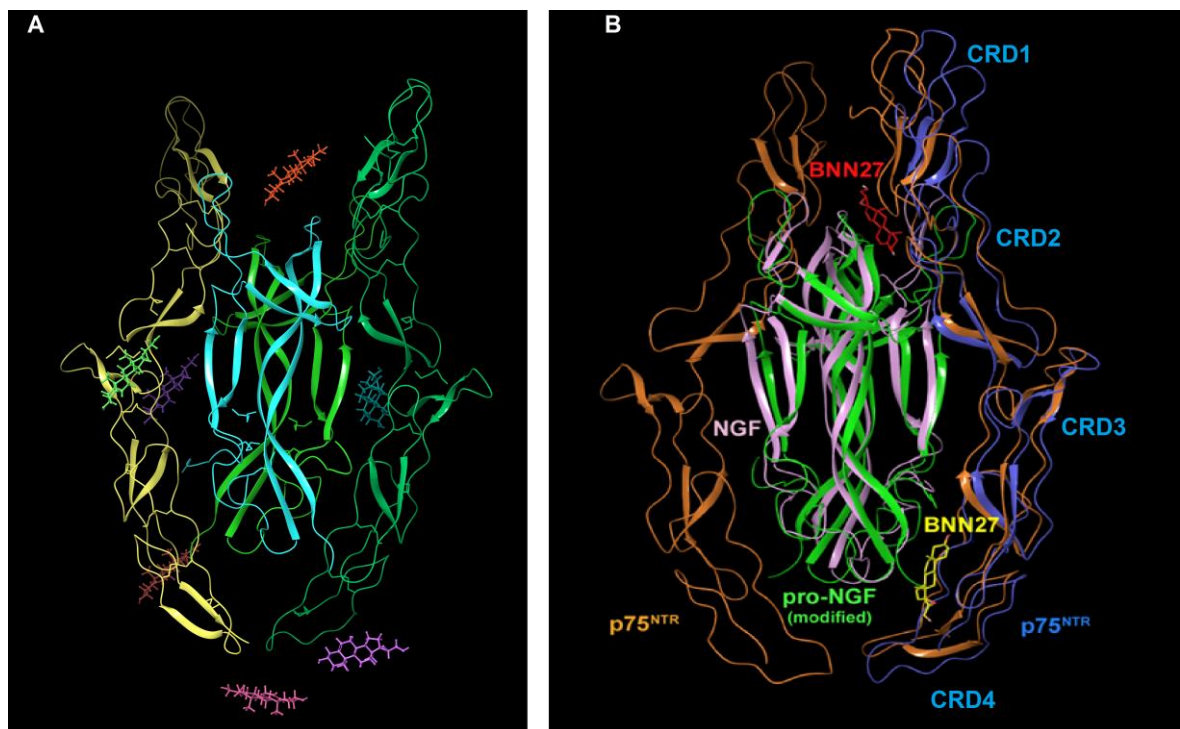
Από τα πέντε αυτά HotSpots μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα δύο HotSpots τα οποία περιλαμβάνουν τις περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ του ομοδιμερούς του NGF και των δύο μορίων p75^{NTR}, δηλαδή τα HotSpots 2 και 3. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει και το HotSpot 4 που περιλαμβάνει και την περιοχή αλληλεπίδρασης του BNN27 με το σύμπλοκο p75^{NTR}/NGF 1:2, η οποία έχει προταθεί από προηγούμενη προσομοίωσή μας. Παρόλα αυτά το HotSpot 1 δεν περνά απαρατήρητο δεδομένου του πολύ καλού Dscore που παρουσιάζει.



Εικόνα 3.19: Οι πέντε προτεινόμενες περιοχές αλληλεπίδρασης (HotSpots) για το τροποποιημένο σύμπλοκο p75^{NTR} – proNGF 2:2

Αλληλεπιδράσεις του BNN27 με το σύμπλοκο p75^{NTR}/proNGF 2:2 τροποποιημένο ώστε να μοντελλοποιηθεί ο ανθρώπινος NGF

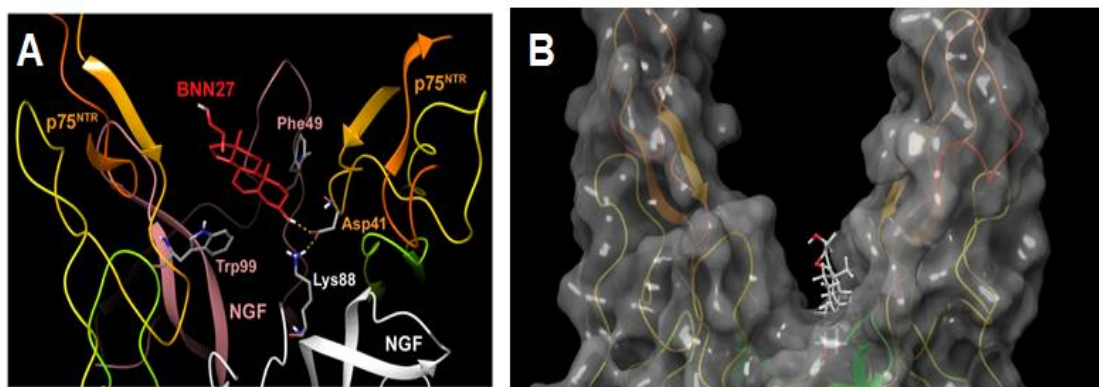
Σε αυτή την προσομοίωση τοποθετήθηκαν 7 μόρια BNN27 όπως φαίνονται στην εικόνα 3.28. Όπως πάντα τα μόρια τοποθετήθηκαν σε απόσταση τουλάχιστον 6 Å από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο, προσέχοντας να μην υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων BNN27 και του πρωτεϊνικού συμπλόκου στην αρχική αυτή θέση. Ένα μόριο τοποθετήθηκε πάνω από το HotSpot 1, δύο μόρια τοποθετήθηκαν σε θέσεις κατάλληλες ώστε να εξεταστεί η δυνατότητα αυθόρμητης εισόδου τους στα HotSpots 2 και 3 και τρία μόρια τοποθετήθηκαν σε κατάλληλες θέσεις για την διερεύνηση του HotSpot 4. (εικόνα 3.20). Η προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής διήρκεσε 110 ns.



Εικόνα 3.20: (A) Τροποποιημένο σύστημα p75^{NTR}:proNGF 2:2 - (7 μορίων) BNN27 που διερευνήθηκε με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής για 110 ns. Εικονίζονται οι αρχικές θέσεις των μορίων όπως τοποθετήθηκαν χειροκίνητα. (B) Υπέρθυση χαρακτηριστικών στιγμιότυπων από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής του BNN27 με τα σύμπλοκα 1:2 p75^{NTR}/NGF (σε μπλέ και πράσινο χρώμα αντίστοιχα) και το τροποποιημένο σύμπλοκο 2:2 p75^{NTR}/proNGF (σε χρυσό και πράσινο χρώμα αντίστοιχα). Το BNN27 (σε κόκκινο χρώμα) εισέρχεται αυθόρμητα και προσδένει στη διεπιφάνεια του ετεροδιμερούς που τοποθετείται ανάμεσα στις περιοχές CRD1 και CRD2 του p75^{NTR} και ταυτίζεται με την περιοχή αλληλεπίδρασης site I του ομοδιμερούς NGF με το p75^{NTR}. Όπως δείχθηκε σε προηγούμενη προσομοίωση του BNN27 με το σύμπλοκο 1:2 p75^{NTR}/NGF, το BNN27 (σε κίτρινο χρώμα) εισέρχεται αυθόρμητα στην περιοχή CRD4 του p75^{NTR} και προσδένει στη διεπιφάνεια του p75^{NTR}/NGF.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι η προσομοίωση ανέδειξε την αυθόρμητη είσοδο του BNN27 στην υδρόφοβη θήκη του HotSpot 1 (εικόνα 3.19) ήδη από τα πρώτα 40 ns και την πρόσδεσή του καθ' όλη τη υπόλοιπη διάρκεια της προσομοίωσης. Αυτή η υδρόφοβη περιοχή βρίσκεται στη διεπιφάνεια του NGF με το p75^{NTR}, ανάμεσα στα τμήματα CRD1 και CRD2 του p75^{NTR} και της περιοχής του NGF που αλληλεπιδρά με το p75^{NTR} (Site I/patch 2)³³ (εικόνα 3.20B)

Το BNN27 “πακετάρεται” ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Phe49 και Trp99 της B αλυσίδας του NGF και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μέσω του υδροξυλίου της θέσης 3 (3-OH) με το αμινοξύ Asp41 του p75^{NTP} το οποίο επιπλέον σχηματίζει γέφυρα άλατος με την Lys88 της A αλυσίδας του NGF, μία συντηρημένη αλληλεπίδραση και στη συμμετρική και στην ασύμμετρη κρυσταλλική δομή του p75^{NTR} (εικόνες 3.21 και 3.25).



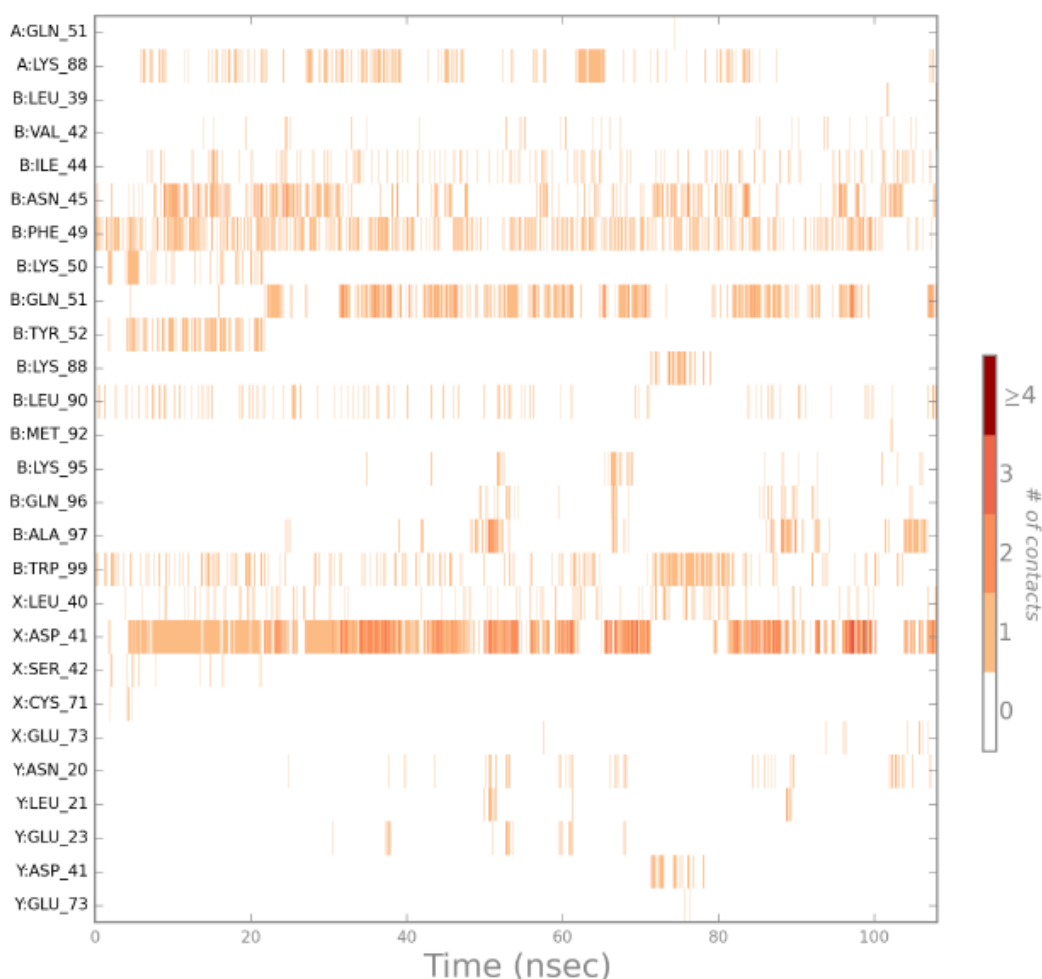
Εικόνα 3.21: (A) Στιγμιότυπο από την προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής του BNN27 με το τροποποιημένο σύμπλοκο p75^{NTR}/proNGF 2:2. Το BNN27 εισέρχεται αυθόρμητα στη διεπιφάνεια του συμπλόκου και “πακετάρεται” ανάμεσα στα υδρόφοβα αμινοξέα Phe49 και Trp99 της B αλυσίδας του NGF και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μέσω του υδροξυλίου της θέσης 3 (3-OH) με το αμινοξύ Asp41 του p75^{NTP}. Η συντηρημένη γέφυρα άλατος του Asp41 του p75^{NTP} με την Lys88 της A αλυσίδας του NGF διατηρείται. Εικονίζονται ο p75^{NTR} σε χρωματισμό ουράνιου τόξου, η A αλυσίδα του NGF σε λευκό χρώμα και η B αλυσίδα σε ροζ. (B) Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποδίδεται με την μέθοδο της επιφάνειας (surface) έτσι ώστε να φανεί πως το BNN27 έχει εισέλθει εντός της υδρόφοβης θήκης.

Από τα 7 αυτά μόρια μόνο ένα αλληλεπίδρασε σε σημαντικό βαθμό με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο και στην θέση με τα αμινοξέα που φαίνονται στις εικόνες 3.20B, 3.21 και 3.22.

Από την ανάλυση της αλληλεπίδρασης αυτής εντοπίζονται τα εξής πάρα πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Πρώτον, παρουσιάζεται ως περιοχή αλληλεπίδρασης μία εντελώς νέα περιοχή, δεύτερον, το BNN27 δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με την προηγούμενη περιοχή αλληλεπίδρασης αυτή την φορά και τρίτον το σύμπλοκο φαίνεται να είναι σταθερό καθ' όλη την διάρκεια της προσομοίωσης (εικόνα 3.23). Οι αλληλεπιδράσεις του BNN27 με αμινοξέα του συμπλόκου ξεκινούν σχεδόν αμέσως και διαρκούν ως το τέλος χωρίς να μεταβάλλονται ιδιαίτερα (εικόνες 3.22).

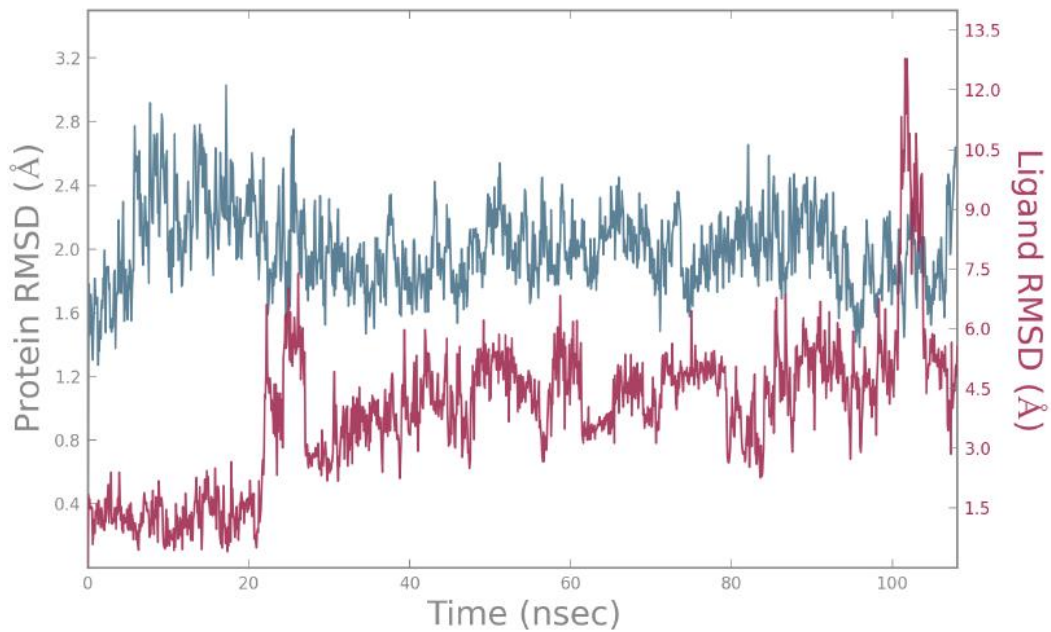
Το BNN27 αλληλεπίδρασε με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο p75^{NTR} – proNGF 2:2 σε μία εντελώς διαφορετική περιοχή, το Hotspot 1, που βρίσκεται στην συμβολή των περιοχών CRD1/CRD2, αντί με την περιοχή CRD4 με την οποία αλληλεπίδρασε σε

προηγούμενη προσομοίωση με το σύμπλοκο p75^{NTR} –NGF 1:2. Το HotSpot 1 εντοπίζεται στην περιοχή των βρόχων L2 (αμινοξέα 40-50) ενώ το HotSpot 4 εντοπίζεται στην περιοχή των βρόχων L3 (αμινοξέα 60-70). Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος, οι εύκαμπτοι βρόχοι L2 υιοθετούν μια «ανοικτή» διαμόρφωση στο σύμπλοκο του p75^{NTR} με τον proNGF, η οποία και διατηρήθηκε μετά την εισαγωγή των μεταλλάξεων που έγιναν ώστε να μοντελοποιηθεί ο ανθρώπινος NGF. Η διαμόρφωση αυτή πιθανά να ευνοεί την αυθόρμητη είσοδο του BNN27 στο άνω μέρος του συμπλόκου στη διεπιφάνεια του ετεροδιμερούς που τοποθετείται ανάμεσα στις περιοχές CRD1 και CRD2 του p75^{NTR} και ταυτίζεται με την περιοχή αλληλεπίδρασης site I του ομοδιμερούς NGF με τον p75^{NTR}. Επιπλέον, σύμφωνα με το μοντέλο της αντίστροφης συσχέτισης³⁶ όταν οι βρόχοι L2 είναι απομακρυσμένοι μεταξύ τους («ανοιχτές»), οι βρόχοι L3 είναι πιο κοντά μεταξύ τους («κλειστές») και αυτό πιθανά συμβάλλει στην αδυναμία του BNN27 να προσεγγίσει και να εισέλθει στην περιοχή CRD4 στο κάτω μέρος του συμπλόκου. Από την άλλη, στο σύμπλοκο p75^{NTR} –NGF 1:2, οι βρόχοι L2 βρίσκονται εγγύτερα μεταξύ τους («κλειστοί») αποτρέποντας την εισδοχή του BNN27 στο άνω μέρος του συμπλόκου ενώ οι βρόχοι L3 είναι απομακρυσμένοι («ανοιχτοί») διευκολύνοντας την πρόσδεση του BNN27 στην περιοχή CRD4.



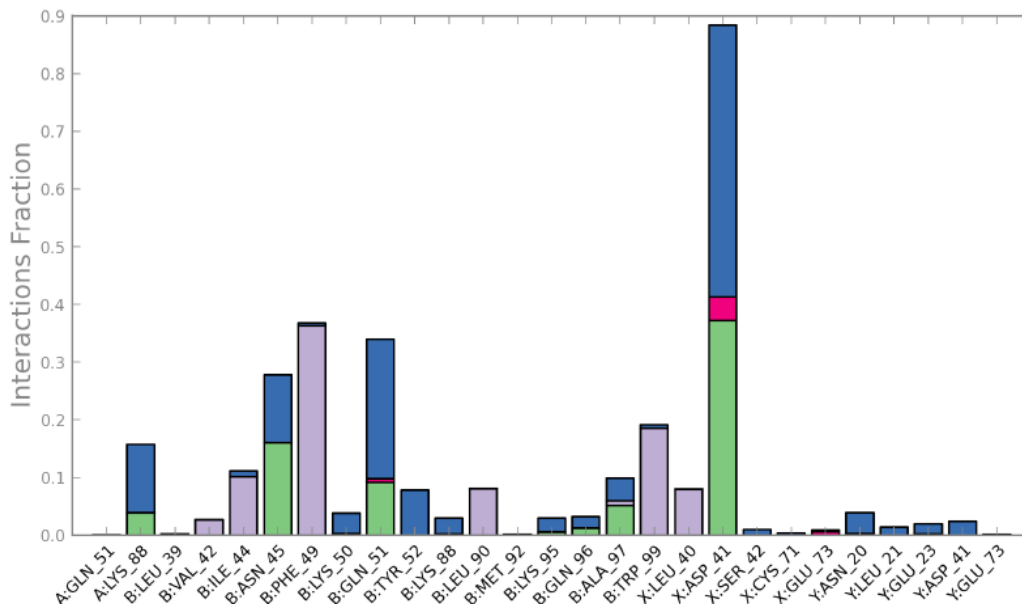
Εικόνα 3.22: Το διάγραμμα “Protein-ligand contacts”, που παρέχει το SID, μας παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου p75^{NTR}/NGF στοιχειομετρίας 2:2, με το BNN27, για το σύνολο της προσομοίωσης.

Protein-Ligand RMSD



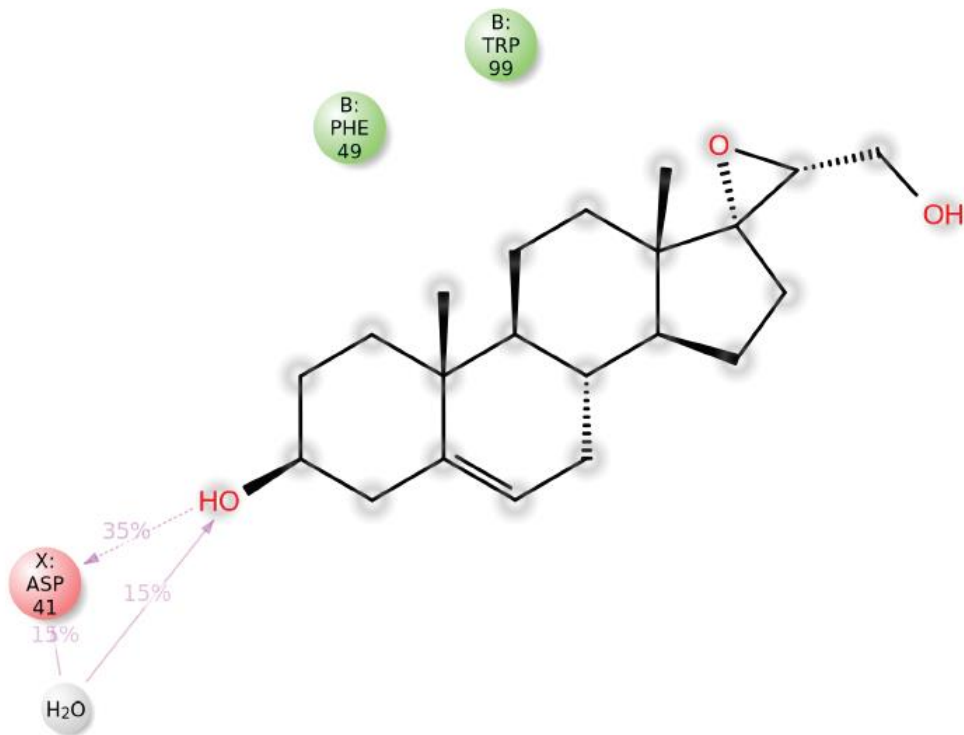
Εικόνα 3.23: Το protein-ligand RMSD στην περίπτωση για το BNN27 και το σύμπλοκο p75^{NTR}/NGF στοιχειομετρίας 2:2. Παρατηρούμε πως δεν υπάρχει κάποια ιδιαίτερη διακύμανση στην πρωτεΐνη πέραν μία φυσιολογικής και αναμενόμενης μικρής διακύμανσης της τάξεως των 1,5 με 3 Å.

Protein-Ligand Contacts



Εικόνα 3.24: Στο ιστόγραμμα protein-ligand contacts, φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται καθ' όλη την διάρκεια της προσομοίωσης. Όπως πάντα οι απ' ευθείας δεσμοί υδρογόνου φαίνονται με πράσινο χρώμα, οι μεταγόμενοι δεσμοί υδρογόνου (water bridges) φαίνονται με μπλε χρώμα, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις φαίνονται με μωβ χρώμα, ενώ για πρώτη φορά παρατηρούμε και μία ιοντική αλληλεπίδραση που διαρκεί όμως ελάχιστο χρόνο.

Ligand-Protein Contacts



Εικόνα 3.25: 2D διάγραμμα με τις αλληλεπιδράσεις του BNN27 που σταθεροποιούνται για διάστημα περισσότερο από το 15% του συνολικού χρόνου προσομοίωσης. Παρατηρούμε πως το BNN27 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο μέσω του υδροξυλίου της θέσης 3 (3-OH) με την ASP41 της X αλυσίδας του p75^{NTR}. Η υδρόφοβη θήκη στο διάγραμμα εκπροσωπείται από τα αμινοξέα PHE_49 και TRP_99 της B αλυσίδας του NGF.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4Ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, διερευνήθηκε η περιοχή αλληλεπίδρασης του βιοδραστικού σπειρο-αναλόγου της DHEA, BNN27, με ισχυρή νευροπροστατευτική και αντιαποπτωτική δράση, η οποία βρίσκεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα των νευροτροφινών p75^{NTR}.

Μέσω μιάς σειράς προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, μακράς χρονικής διάρκειας, αναδείχθηκε η ευνοϊκή αλληλεπίδραση του BNN27 με τα σύμπλοκα p75^{NTR}ECD/NGF 1:2 και p75^{NTR}ECD/proNGF 2:2 με μεταλλαγμένο το ώριμο τμήμα του proNGF ώστε να μοντελοποιηθεί το ανθρώπινο ομοδιμερές NGF.

Τα ληφθέντα αποτελέσματα ανέδειξαν και για τα δύο σύμπλοκα, την αυθόρμητη είσοδο του BNN27 σε περιοχές της διεπιφάνειας του ομοδιμερούς του NGF με τον υποδοχέα p75^{NTR}ECD και την ανάπτυξη σταθερών αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια όλης της προσομοίωσης. Η περιοχή αλληλεπίδρασης διαφέρει στις δύο περιπτώσεις, όπου στο ασύμμετρο σύμπλοκο (p75^{NTR}ECD/NGF 1:2) διευθετείται κοντά στην παραμεμβρανική περιοχή CRD4 του p75^{NTR}ECD ενώ στην περίπτωση του συμμετρικού συμπλόκου (p75^{NTR}ECD/proNGF 2:2) βρίσκεται στο άνω τμήμα του ετεροδιμερούς στη συμβολή των περιοχών CRD1 και CRD2.

Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι και στις δύο περιπτώσεις το BNN27 δεσμεύεται σε περιοχές που αποτελούν τις διεπιφάνειες αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ετσι στο σύμπλοκο p75^{NTR}ECD/proNGF 2:2 δεσμεύεται και αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα του Site I patch II (Trp99 και Phe49 της B αλυσίδας του NGF και Asp41 του p75^{NTR}ECD), ενώ στο σύμπλοκο p75^{NTR}ECD/NGF 1:2 αλληλεπιδρά με αμινοξέα του Site II (ARG_114 και την LYS_115 της A αλυσίδας του NGF και CYS_136 του p75^{NTR}).

Η ευελιξία των βρόχων L2 (στο άνω τμήμα του NGF ομοδιμερούς) και L3 (στο κάτω τμήμα του NGF ομοδιμερούς) και το προτεινόμενο μοντέλο της αντίστροφης συσχέτισης³⁶ πιθανά σχετίζονται με την διαφορετική περιοχή πρόσδεσης του BNN27 στα δύο μελετούμενα σύμπλοκα (εικόνα 1.8).

Το BNN27 και στα δύο πρωτεϊνικά σύμπλοκα χρησιμοποιεί την υδροξυλομάδα στη θέση 3 (3-OH) για να αλληλεπιδράσει με αμινοξέα είτε του p75^{NTR} είτε του NGF, κάτι που συνάδει και με τις εκτεταμένες SAR μελέτες που έχουν υποδείξει την κρισιμότητα της ομάδας αυτής για βιολογική δράση.

Σε κάθε περίπτωση, τα προτεινόμενα HotSpots, δεδομένης της απουσίας επιπλέον κρυσταλλικών δομών, θα μπορούσαν να καθοδηγήσουν περαιτέρω τις προσπάθειες βελτιστοποίησης του BNN27.

Βασικός και πρωταρχικός στόχος για την βελτιστοποίηση του BNN27 σε αυτή την φάση είναι η βελτίωση του μεταβολικού προφίλ του. Δια τούτο προσανατολιζόμαστε στην αντικατάσταση του υδροξυλίου στην θέση 21 (21-OH) με άλλη χαρακτηριστική ομάδα που θα κάνει τα νέα μόρια μεταβολικά σταθερότερα. Σύμφωνα με τους Agur K. Ghose et al⁵¹, οι οποίοι μελέτησαν τις φυσικοχημικές ιδιότητες φαρμάκων που δρουν στο ΚΝΣ έναντι των φαρμάκων που δεν στοχεύουν στο ΚΝΣ, προτείνεται πως η παρουσία ενός ή δύο ατόμων αζώτου (συμπεριλαμβανομένης μιας αλειφατικής αμίνης) θα πρέπει να συνυπολογίζεται προκειμένου για την επιλογή της ένωσης-οδηγού καθώς επίσης και για τις προσπάθειες βελτιστοποίησης ενώσεων-οδηγών. Έτσι λοιπόν, πιθανά η αντικατάσταση της υδροξυλομάδας στη θέση 21 (21-OH) με μία αμινομάδα να μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολικά σταθερότερα μόρια, διατηρώντας ταυτόχρονα την ικανότητα του μορίου να αναπτύξει δεσμούς υδρογόνου.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής που συμπεριελήφθησαν σε πρόσφατη δημοσίευση⁴⁴ επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα του βιομοριακού NMR και των βιολογικών πειραμάτων σε σχέση με τη δυνατότητα του BNN27 να αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα του p75^{NTR} εμφανίζοντας συνεργατική δράση ως προς τον NGF με αποτέλεσμα την ενίσχυση σηματοδοτικών οδών που σχετίζονται με την επιβίωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil. Trans. R. Soc. B* 1545–1564 (2006). doi:10.1098/rstb.2006.1894
2. Skaper, S. D. The Biology of Neurotrophins , Signalling Pathways , and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 46–62 (2008).
3. Lu, B., Pang, P. T. & Woo, N. H. The Yin and Yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 603–614 (2005).
4. Gary, R. & Barde, Y. Physiology of the neurotrophins. *ANU Rev. Neumsciem* **19**, 289–317 (1996).
5. Huang EJ, R. L. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* **24**, 677–736 (2001).
6. Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, (2003).
7. Dechant, G. & Barde, Y. The neurotrophin receptor p75 NTR : novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.* **5**, 1131–1136 (2002).
8. Saragovi, H. U. & Gehring, K. Development of pharmacological agents for targeting neurotrophins and their receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **21**, 93–98 (2000).
9. Miller, F. D. & Kaplan, D. R. On Trk for Retrograde Signaling Minireview. *Neuron* **32**, 767–770 (2001).
10. Meeker, R. B. & Williams, K. S. The p75 neurotrophin receptor : at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res* **10**, 721–725 (2015).
11. Ioannou, M. S. & Fahnstock, M. ProNGF , but Not NGF , Switches from Neurotrophic to Apoptotic Activity in Response to Reductions in TrkA Receptor Levels. *Int. J. Mol. Sci* **18**, (2017).
12. Longo, F. M. & Massa, S. M. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 507–525 (2013).
13. Vilar, M. *Structural Characterization of the p75 Neurotrophin Receptor : A Stranger in the TNFR Superfamily.* *Vitam Horm.* **104**, (Elsevier Inc., 2017).
14. Simi, A. & Iba, C. F. p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration : paradox and opportunity. *Trends Neurosci.* **35**, 431–440 (2012).

15. Matusica, D. *et al.* An Intracellular Domain Fragment of the p75 Neurotrophin Receptor (p75 NTR) Enhances Tropomyosin Receptor Kinase A (TrkA) Receptor Function * □. *J. Biol. Chem.* **288**, 11144–11154 (2013).
16. Josephy-hernandez, S., Jmaeff, S., Pirvulescu, I., Aboukassim, T. & Saragovi, H. U. Neurobiology of Disease Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents : An evolving paradigm. *Neurobiol. Dis.* **97**, 139–155 (2017).
17. Cai, J. *et al.* Potential Therapeutic Effects of Neurotrophins for Acute and Chronic Neurological Diseases. *Biomed Res Int.* **2014:60108**, (2014).
18. Quarta, S. *et al.* Peripheral Nerve Regeneration and NGF-Dependent Neurite Outgrowth of Adult Sensory Neurons Converge on STAT3 Phosphorylation Downstream of Neurotrophic Cytokine Receptor gp130. *J Neurosci.* **34**, 13222–13233 (2014).
19. Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U. & Patel, N. K. GDNF , NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* **138**, 155–175 (2013).
20. Sullivan, A. M. Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson ' s disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **Jun; 22**, 157–165 (2011).
21. V, B. Imbalance of p75 NTR / TrkB protein expression in Huntington ' s disease : implication for neuroprotective therapies. *Cell Death Dis* **Apr;18**, 1–15 (2013).
22. Nordberg, A. Intracerebroventricular Infusion of Nerve Growth Factor in Three Patients with Alzheimer ' s Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **9**, 246–257 (1998).
23. III), T. B. S. G. (Phase. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS. *Neurology* **52**, 1427–1434 (1999).
24. Sotthibundhu, A. *et al.* β -Amyloid 1 – 42 Induces Neuronal Death through the p75 Neurotrophin Receptor. *J. Neurosci.* **28**, 3941–3946 (2008).
25. Devarajan, S. & Sharmila, J. S. Computational Studies of Beta Amyloid (A 42) with p75NTR Receptor : A Novel Therapeutic Target in Alzheimer ' s Disease. *Adv. Bioinformatics* **2014**, (2014).
26. Defreitas, M. F., Mcquillen, P. S. & Shatz, C. J. A Novel p75NTR Signaling Pathway Promotes Survival , Not Death , of Immunopurified Neocortical Subplate Neurons. *J Neurosci.* **21**, 5121–5129 (2001).
27. Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K. & Jansen, P. Sortilin is essential for proNGF- induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 15–20 (2004).

28. Scarpi, D. *et al.* Low molecular weight , non-peptidic agonists of TrkA receptor with NGF-mimetic activity. *Cell Death Dis.* **3**, e339-13 (2012).
29. Al, X. J. *et.* Neurotrophic natural products: chemistry and biology. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**, 956–987 (2014).
30. Steiner, J. P. & Nath, A. Neurotrophin Strategies for Neuroprotection : Are They Sufficient? *J Neuroimmune Pharmacol.* **9**, 182–194 (2014).
31. Vilar, M. *et al.* Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron.* **62**, 72–83 (2010).
32. Feng, D. *et al.* Molecular and Structural Insight into proNGF Engagement of p75NTR and Sortilin. *J Mol Biol* **396**, 967–984 (2010).
33. He, X. & Garcia, K. C. Structure of Nerve Growth Factor Complexed with the Shared Neurotrophin Receptor p75. *Science (80-.).* **304**, 870–875 (2004).
34. Jukka P. Aurikko, B. T. R. *et al.* Characterization of Symmetric Complexes of Nerve Growth Factor and the Ectodomain of the Pan-neurotrophin Receptor, p75NTR. *J Biol Chem* **280**, 33453–33460 (2005).
35. Gong, Y., Cao, P., Yu, H. & Jiang, T. Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75 NTR. *Nature* **454**, 789–794 (2008).
36. Pimenta, A. C. *et al.* Dynamic Structure of NGF and proNGF Complexed with p75NTR: Pro-Peptide E ffect. *J. Chem. Inf. Model* **7**, 2051–2067 (2014).
37. Baulieu, E. & Robel, P. Commentary Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *PNAS* **95**, 4089–4091 (1998).
38. Imonides, V. G. K., Hatibi, N. H. K., Vendsen, C. N. S. & Ofroniew, M. V. S. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1852–1857 (1998).
39. Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N. & Gravanis, A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 300–307 (2008).
40. Lazaridis, I. *et al.* Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors, Preventing Neuronal Apoptosis. *PLoS Biol* **9**, (2011).

41. Pediaditakis, I., Iliopoulos, I., Theologidis, I. & Delivanoglou, N. Dehydroepiandrosterone : An Ancestral Ligand of. *Endocrinology* **156**, 16–23 (2015).
42. Calogeropoulou, T. *et al.* Novel Dehydroepiandrosterone Derivatives with Antiapoptotic , Neuroprotective Activity. *J. Med. Chem.* **52**, 6569–6587 (2009).
43. Pediaditakis I, Efstathopoulos P, Prousis KC, Zervou M, Arévalo JC, Alexaki VI, Nikoletopoulou V, Karagianni E, Potamitis C, Tavernarakis N, Chavakis T, Margioris AN, Venihaki M, Calogeropoulou T, Charalampopoulos I, G. A. Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation. *Neuropharmacology.* **111**, 266–282 (2016).
44. Iosif Pediaditakis, Alexandra Kourgiantaki, Kyriakos C. Prousis, Constantinos Potamitis, **Kleanthis P. Xanthopoulos**, Maria Zervou, Theodora Calogeropoulou, I. C. and A. G. BNN27 , a 17-Spiroepoxy Steroid Derivative , Interacts With and Activates p75 Neurotrophin Receptor , Rescuing Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis. *Front. Pharmacol* **7**, 1–14 (2016).
45. Iordanidou, P., Kouvarakis, A. & Fothiadaki, M. The Synthetic Microneurotrophin BNN27 affects retinal function in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes* **67**, 321–33 (2018).
46. Pitsikas, N. & Gravanis, A. Neurobiology of Learning and Memory The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts delay-dependent and scopolamine-induced recognition memory deficits in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **140**, 145–153 (2017).
47. Glajch, K. E. *et al.* MicroNeurotrophins Improve Survival in Motor Neuron-Astrocyte Co-Cultures but Do Not Improve Disease Phenotypes in a Mutant SOD1 Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* **27**, 1–24 (2016).
48. Desmond Molecular Dynamics System, version 4.3, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2015.
49. SiteMap, version 3.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
50. Harder, E. *et al.* OPLS3 : A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *J Chem Theory Comput.* **12**, 281–296 (2016).

51. Ghose, A. K., Herbertz, T., Hudkins, R. L., Dorsey, B. D. & Mallamo, J. P. Knowledge-Based, Central Nervous System (CNS) Lead Selection and Lead Optimization for CNS Drug Discovery. *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 50–68 (2012).