

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕЙРОТРОФИНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Л.М. Рафиева, младший научный сотрудник, **Д.Р. Сафина, ассистент,
научный сотрудник, **И.В. Демидюк, доцент, старший научный сотрудник,
**С.В. Костров, профессор, директор института

* лаборатория Белковой инженерии Института молекулярной генетики РАН

** кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: duk@img.ras.ru

Клонированы гены фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и нейротрофического фактора 3 (NT-3) человека и осуществлена их экспрессия в клетках *Escherichia coli*. Разработаны схемы очистки и ренатурации соответствующих пробелков. Продемонстрировано, что рекомбинантные про-NGF, про-BDNF, про-NT-3 оказывают дифференцирующее действие на культуру спинномозговых ганглиев эмбрионов кур.

The genes of nerve growth factor (NGF), brain neurotrophic factor (BDNF) and human neurotrophic factor 3 (NT-3) were cloned and expressed in Escherichia coli. Methods of purification and renaturation of the proneurotrophins were developed. It was shown that the recombinant pro-NGF, pro-BDNF and pro-NT-3 induce a differentiation of chicken dorsal root ganglia cell culture.

Ключевые слова: экспрессия, ренатурация, рекомбинантные proneйротрофины человека, последовательность, органотипичная культура спинномозговых ганглиев эмбрионов кур.

Key words: expression, renaturation, recombinant human proneurotrophins, prosequence, chicken dorsal root ganglia.

Введение

Нейротрофины – это семейство высококонсервативных димерных полипептидных факторов роста, которые регулируют развитие и функционирование разнообразных популяций нейронов. Обнаружено влияние этих белков на выживание, миграцию и пролиферацию нейронов, рост и ветвление дендритов и аксонов, пластичность синапсов, а также на активность ионных каналов и рецепторов нейромедиаторов [1]. Концентрации нейротрофинов в тканях изменяются при различных нейродегенеративных заболеваниях и повреждениях нервной системы [2, 3].

В настоящее время описан ряд нейротрофинов различного происхождения. У человека известно четыре представителя этого семейства белков: фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофические факторы 3 (NT-3) и 4/5 (NT-4/5) [4–6], из них наиболее изучены NGF, BDNF и NT-3.

Нейротрофины синтезируются в клетке в форме препробелков, которые, кроме участка, соответствующего зрелому фактору, содержат сигнальный пептид и пропептид размером 105–120 аминокислотных остатков (а.к.о.). Последовательности зрелых нейротрофинов человека, состоящие из 119–121 а.к.о., высокомолекулярны и имеют около 55% идентичных а.к.о. [7]. Все зрелые белки выделены из природных источников в виде негликозилированных гомодимеров. По своей пространственной структуре нейротрофины относятся к семейству белков, пространственная укладка которых известна как «цистиновый узел». Основу этой укладки сос-

тавляет образованный двумя дисульфидными связями мегацикл, пронизанный еще одной дисульфидной связью [8].

Процессинг молекулы предшественника происходит в консервативном для всех членов семейства нейротрофинов сайте после последовательности Arg-Хаа-Arg/Lys-Arg. Этот процесс осуществляют субтилизин/кексин-подобные пробелок-конвертазы: фурин, PACE4 и PC5/6-B [9]. Функциональная роль пропептидов нейротрофинов до настоящего времени не установлена. Высказано предположение, что они могут выполнять функции фолдинг-ассистентов, определяя формирование пространственной структуры нейротрофических факторов [10, 11].

Эффекты нейротрофинов реализуются через связывание с тремя типами рецепторов. К первому типу относится семейство тирозинкиназных рецепторов (Trk-рецепторы), ко второму – белок p75 из семейства рецепторов фактора некроза опухоли и к третьему – сортилин. Trk-рецепторы специфично взаимодействуют только со зрелыми, процессированными нейротрофинами. В настоящее время описано три основных типа Trk-рецепторов нейротрофинов: TrkA, TrkB и TrkC. При этом NGF является предпочтительным лигандом для TrkA, BDNF и NT-4/5 – для TrkB, а NT-3 – для TrkC. При определенных условиях NT-3 способен взаимодействовать с TrkA и TrkB, но с более низкой аффинностью, чем с TrkC. Рецептор p75 связывает как зрелые, так и проформы нейротрофинов. При этом он способен связывать все типы нейротрофинов (NGF, BDNF, NT-3 и NT-4/5) с примерно равной

аффинностью. Биологические эффекты в зависимости от того или иного лиганд-рецепторного взаимодействия могут быть прямо противоположными – от повышения жизнеспособности до индуцирования клеточной смерти [12].

Процессинг нейротрофинов *in vivo*, по-видимому, является неполным, и существенные количества предшественников обнаружены в образцах различных тканей [2, 13–18]. Исследование биологической активности предшественников нейротрофинов показало, что для них более предпочтительным является активация рецептора р75, чем Ткк-рецепторов, а их действие во многих случаях альтернативно действию зрелого белка. Таким образом, удаление пропептида является не только завершающим актом в формировании зрелого лиганда, но может оказаться механизмом, регулирующим функционирование системы нейротрофинов в целом. Понимание этого явления может внести существенный вклад в изучение причин развития целого ряда тяжелых нейродегенеративных заболеваний.

Существенным препятствием на пути исследования функций предшественников нейротрофинов является их труднодоступность. С одной стороны, эти белки практически невозможно выделить из природных источников. С другой стороны, биологически активные пронеуротрофины сложно получить в гетерологических экспрессионных системах. Поэтому в настоящее время для продукции пронеуротрофинов, как правило, используются эукариотические экспрессионные системы, которые характеризуются низким выходом целевых белков [19–22].

Целью данной работы является получение функционально активных форм предшественников нейротрофинов человека NGF, BDNF, NT-3 с использованием высокоэффективной прокариотической экспрессионной системы.

Результаты и их обсуждение

Для создания рекомбинантных продуцентов участка ДНК, кодирующие препронеуротрофины NGF, BDNF, NT-3, были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя библиотеку кДНК мозжечка человека в качестве матрицы и праймеры к фланкирующим некодирующим последовательностям. Полученные амплификаты были клонированы в составе плазмидного вектора pUC19.

Экспрессионные векторы для генов пронеуротрофинов были сконструированы на основе плазмиды pET-23с. Во всех случаях на 3'-конец гена были введены дополнительные участки, кодирующие «якорные» последовательности из шести остатков гистидина (His).

Для осуществления высокоэффективной продукции пронеуротрофинов полученные экспрессионные векторы были введены в клетки штамма *Escherichia coli* BL-21 (DE3).

Уровень накопления продукта каждого из пронеуротрофинов в клетках, оцененный с помощью сочетания электрофоретического анализа и денситометрии, составлял 20–30% от общего содержания внутриклеточных белков. При этом было установлено, что целевые белки локализованы в нерастворимых фракциях, по-видимому, образуя тела включения. На рис. 1 представлены результаты анализа накопления целевого белка на примере про-NT-3.

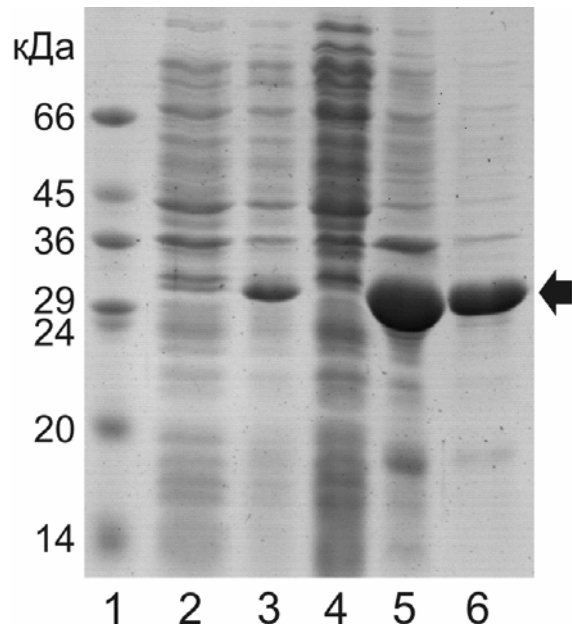


Рис. 1. Электрофоретический анализ накопления нейротрофина про-NT-3. Дорожка 1 – маркеры молекулярных весов. Дорожка 2 – лизат клеток *E. coli* BL-21 (DE3) [pET-23с]. Дорожка 3 – лизат клеток штамма *E. coli* BL-21 (DE3), несущих плазмиду с геном про-NT-3. Дорожка 4 – растворимая фракция после обработки ультразвуком культуры клеток, продуцирующих про-NT-3. Дорожка 5 – нерастворимая фракция после обработки ультразвуком культуры клеток, продуцирующих про-NT-3. Дорожка 6 – экстракт нерастворимой фракции. Стрелкой указано положение целевого белка.

Пронеуротрофины, содержащиеся в полученной нерастворимой фракции, были переведены в раствор с использованием 8 М мочевины и очищены при помощи металлохелат-аффинной хроматографии на Ni-содержащем сорбенте. Введенная нами C-концевая шестигистидиновая последовательность позволила получить высокоочищенные препараты про-NGF, про-BDNF и про-NT-3 в одну стадию, при этом выход каждого из белков составлял около 25% (на рис. 2 представлены данные на примере про-NT-3).

Ренатурация предшественников нейротрофинов была осуществлена путем стократного

понижения концентрации денатурирующего агента – мочевины, однократным разведением, после чего до 80% целевого белка оставалось в растворе.

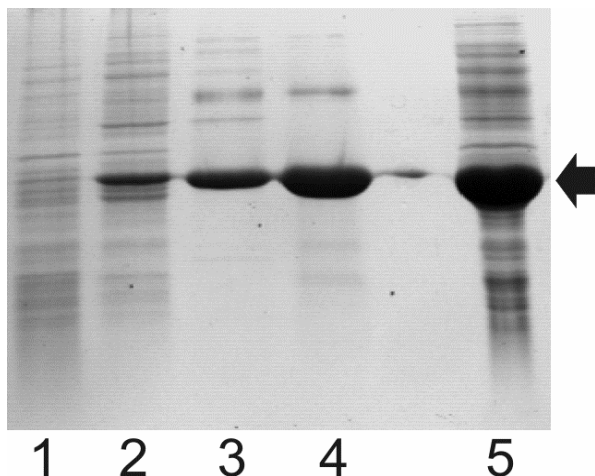
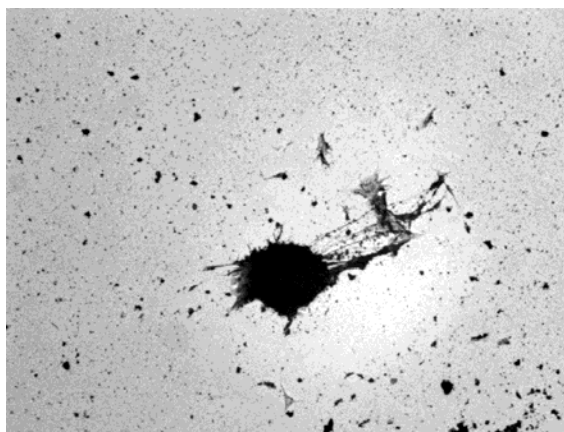
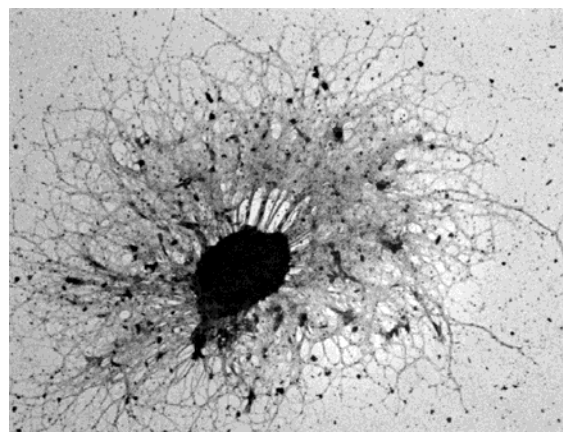


Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций, полученных в ходе очистки про-NT-3 с использованием металлохелат-аффинной хроматографии. Дорожка 1 – белки, не связавшиеся с сорбентом. Дорожка 2 – промывка сорбента буфером, рН 8.0. Дорожка 3 – элюция буфером, рН 6.3. Дорожка 4 – элюция буфером, рН 4.5. Дорожка 5 – образец белка до очистки.

Для тестирования биологической активности пронеуротрофинов были использованы органотипичные культуры эмбриональных куриных спинномозговых ганглиев (СМГ), которые являются классическими объектами для исследования нейрональной дифференцировки.



А



Б

Рис. 3. Дифференцирующее действие про-NT-3 на органотипичную культуру спинномозговых ганглиев эмбрионов кур (возраст эмбрионов – 10 сут). А – спинномозговой ганглий, контроль; Б – спинномозговой ганглий при инкубации с про-NT-3 (100 нг/мл культуральной среды). Культура в обоих вариантах зафиксирована параформом и окрашена метиленовым синим.

Таким образом, нами сконструированы рекомбинантные продуценты предшественников фактора роста нервов, нейротрофического фактора головного мозга и нейротрофического фактора 3 человека на основе клеток *E. coli*. Демонстрировано, что полученные с использованием созданных продуцентов пронеуротро-

СМГ содержат субпопуляцию относительно небольшого количества нейронов с характерными функциональными, биохимическими и морфологическими признаками. Известно, что NGF, BDNF и NT-3, а также их предшественники способны вызывать рост нейритов в органотипичной культуре СМГ, что обусловлено наличием рецепторов TrkA, TrkB, TrkC [23]. Действие каждого из нейротрофинов на развитие чувствительных нейронов СМГ ограничено определенным периодом эмбриогенеза. Например, выживаемость и дифференцировка клеток как органотипичной, так и диссоциированной культур СМГ зависит от NGF в период с 8-го по 12-ый день развития эмбриона, от BDNF – в период с 3-го по 14-ый день, от NT-3 – на 10-ый день. Таким образом, культура клеток СМГ может быть использована для тестирования биологической активности всех нейротрофических факторов и их предшественников [24–26].

С использованием органотипичной культуры клеток спинномозговых ганглиев куриных эмбрионов (10-ый день развития эмбриона) нами проведена оценка способности про-NGF, про-BDNF и про-NT-3 оказывать дифференцирующее действие. Показано, что все полученные предшественники обладают биологической активностью и способны вызывать дифференцировку нейронов ганглиев. Рис. 3 иллюстрирует дифференцирующее действие рекомбинантных пронеуротрофинов на примере про-NT-3.

фины обладают биологической активностью.

Экспериментальная часть

Штаммы микроорганизмов и векторы. В работе использовали штаммы *E. coli* XL-1 (Blue), *E. coli* BL-21 (DE3), вектор pUC19 и экспрессионный вектор pET-23c (Invitrogene, США).

Ферменты и реактивы. В работе исполь-

зованы *Taq*-ДНК-полимераза (НПФ «Литех», Россия), *Pfu*-ДНК-полимераза, эндонуклеазы рестрикции, T4-ДНК-лигаза, T4-полинуклеотидкиназа и дезоксинуклеозидтрифосфаты (Promega, США). Маркеры молекулярных масс белков для электрофореза (*M*, кДа): бычий сывороточный альбумин (66), яичный альбумин (45), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (36), карбоксиангидраза (29), трипсиноген (24), соевый ингибитор трипсина (20.1), молочный α -альбумин (14.2) (Sigma, США); олигонуклеотиды (Синтол, Россия), трис(гидроксиметил)аминометан, трисгидрохлорид, хлорид магния, минеральное масло, краситель бромистый этидий (Sigma, США), агароза-LE (USB, США), бромфеноловый синий (Reanal, Венгрия), Кумасси бриллиантовый синий G-250 (Loba, Австрия), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (Helicon, Россия), 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (Fluka, США), культу-

ральная среда F-14, сыворотка лошади, гентамицин, фосфатно-солевой буфер (Биолот, Россия), а также антибиотики отечественного производства. Остальные реагенты категории «х. ч.» отечественного производства.

Клонирование генов нейротрофинов. В работе использовали кДНК, полученную с помощью обратной транскрипции с тотальной РНК мозжечка человека. Препарат кДНК был любезно предоставлен И.П. Владыченской и Н.М. Раевской (Институт молекулярной генетики РАН). Методом ПЦР были получены три амплификата, последовательность которых включает полную открытую рамку считывания генов *NGF*, *BDNF* и *NTF3* человека. Для получения амплификата, кодирующего полно-размерный нейротрофин человека *NGF*, использовали пары праймеров *NGF*-99 и *NGF*-920; в случае *BDNF* – *BDNF*-51 и *BDNF*-1067; а в случае *NT*-3 – *NT*-3-33 и *NT*-3-1097 (табл. 1).

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Обозначение	Последовательность*
NGF-99	CGTCCGGACCCAATAACAGT
NGF-920	GCCCAGGAGAGTGTAGAAGG
BDNF-51	TTTCGGGGAGTGGTTGGG
BDNF-1067	ACTGTTTCCCTTCTGGTCAT
NT-3-33	TGCCAGAATAACACAGACTCAGC
NT-3-1097	GAGGGGAAGGCAAGCACACTGA
NGF-f3	GGCATA <u>CATATG</u> GGAACCACACTCAGAGAG
NGF-r2	TTTT <u>AGATCT</u> TTA(GTGATG) ₃ GGCTCTTCTCACAGC
BDNF-f3	AAAAAA <u>CATATG</u> GCCCCCATGAAAGAAGCAAACATC
BDNF-r2	ATATA <u>GAATTCT</u> TTA(ATGGTG) ₃ TCTTCCCCTTTTAATGGTCAATG
NT-3-f3	GGCATCC <u>CATATG</u> AACAACATGGATCAAAGG
NT-3-r2	AATAAT <u>GAATTCT</u> TTA(ATGGTG) ₃ TGTTCTTCCGATTTTCTCG

* Сайты рестрикции *Nde* I (CATATG), *Eco* R I (AGATCT) и *Bgl* II (GAATTC) подчеркнуты, последовательности, соответствующие стоп-кодонам, выделены курсивом, участки, соответствующие полигистидиновым последовательностям – жирным шрифтом.

После обработки ПЦР-продуктов полинуклеотидкиназой (фосфорилирование осуществляли по стандартной методике) их клонировали в плазмидный вектор pUC19, линейнизированный по сайту расщепления эндонуклеазой рестрикции *Hind*III. Клоны, полученные после трансформации штамма *E. coli* XL-1 лигазными смесями, высевали на твердую селективную питательную среду (L-агар), содержащую ампициллин (100 мкг/мл), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (200 мкг/мл) и 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (20 мкг/мл). Первичный отбор клонов, несущих целевые гены, осуществляли по их неспо-

собности расщеплять хромогенный субстрат. Далее наличие вставок в составе рекомбинантных плазмид подтверждали с помощью ПЦР, применяя те пары праймеров, которые использовали при получении амплификатов. Нуклеотидные последовательности генов были подтверждены секвенированием. Полученные плазмиды, несущие целевые гены *NGF*, *BDNF*, *NTF3* были обозначены как pUC_*NGF*, pUC_*BDNF*, pUC_*NT*-3, соответственно.

В последовательности гена *NTF3* было выявлено наличие единственной точечной замены в кодоне Pro-84 (нумерация по последовательности препробелка), не приводящей к замене

аминокислотного остатка.

Конструирование рекомбинантных продуцентов нейротрофинов на основе экспрессионного вектора pET-23c. Векторы pUC_NGF, pUC_BDNF, pUC_NT-3 были использованы в качестве матрицы для получения участков ДНК, кодирующих пронеуротрофины с дополнительной шестигистидиновой последовательностью на С-конце. Для получения амплификатов использовали пары праймеров: NGF_f3 и NGF_r2 для про-NGF, BDNF_f3 и BDNF_r2 для про-BDNF, NT-3_f3 и NT-3_r2 для про-NT-3. Праймеры содержали необходимые дополнительные последовательности, соответствующие терминирующим кодоном, шестигистидиновым последовательностям и сайтам рестрикции (см. табл. 1).

Продукт расщепления после обработки амплификатов соответствующими рестриктазами клонировали в состав экспрессионного вектора pET-23c, предварительно обработанного теми же ферментами. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* XL-1. Клоны растили на среде L-агар, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Наличие целевых генов в составе рекомбинантных плазмид определяли ПЦР-анализом. Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов генов нейротрофинов подтверждали секвенированием.

Сконструированные плазмиды, несущие гены пронеуротрофинов NGF, BDNF, NT-3, были введены в клетки штамма *E. coli* BL-21 (DE3).

Для анализа динамики роста полученных штаммов-продуцентов и анализа накопления соответствующих чужеродных белков клетки растили при 37°C в жидкой питательной среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при постоянном перемешивании (220 об/мин) до оптического поглощения 0.4–0.6 ОЕ₆₀₀. После чего индуцировали синтез чужеродных белков в клетках, добавляя в среду изопропил-β-D-тио-галактопиранозид до конечной концентрации 0.5 mM. Далее продолжали растить культуры клеток в течение 4–5 ч, отбирая каждый час аликвоты для анализа оптического поглощения клеток (при 600 нм) и уровня накопления целевых белков. Для определения уровня накопления нейротрофических факторов клетки отделяли центрифугированием и анализ белкового состава проводили с помощью электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS).

Подготовку образцов и электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [27]. К 50 мкл клеточной суспензии добавляли равный объем буфера для приготовления образцов, содержащего SDS и β-меркаптоэтанол. Смесью прогревали при 95°C в течение 5 мин. Аликвоты

(10 мкл) наносили на 12.5% ПААГ.

Выделение и очистка пронеуротрофинов.

Определение локализации целевых белков для всех сконструированных вариантов нейротрофинов осуществляли, обрабатывая клеточную биомассу ультразвуком во льду в течение 20 мин по 5 с с интервалом 2 с (Ultrasonic Homogenizer 4710 «Cole Parmer», США). Клетки предварительно ресуспендировали в буфере, pH 7.4, содержащем 20 mM трис-гидрохлорид, 5 mM EDTA, 1 mM фенолметансульфонил-фторид. После обработки клеток ультразвуком супернатант отделяли центрифугированием при 10000 g. Результат разделения клеточных фракций после ультразвуковой дезинтеграции анализировали электрофоретически в 12.5% ПААГ.

Нейротрофины из мембранной фракции клеток *E. coli* BL-21 (DE3) экстрагировали раствором, содержащим 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM трисгидрохлорид, 8 M мочевины и 30 mM β-меркаптоэтанол, pH 8.0. Отделение пронеуротрофинов от примесных белков осуществляли с использованием в качестве основной стадии очистки металлохелат-аффинную хроматографию на Ni-НТК (никель-нитрилотриуксусная кислота) агарозе (Qiagen, США). Хроматографию проводили в денатурирующих условиях. Образец, содержащий белки, инкубировали с сорбентом 1 ч при комнатной температуре (10 мг тотального белка на 1 мл сорбента). Смесью переносили в колонку и промывали сорбент буфером (10 объемов по отношению к объему сорбента), содержащим 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM трис-HCl, 8 M мочевины и 30 mM β-меркаптоэтанол, 1% глицерин, 0.1% тритон X-100, pH 8.0. Элюцию целевых белков осуществляли последовательно рабочими буферами, содержащими 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM трисгидрохлорид, 8 M мочевины и 30 mM β-меркаптоэтанол, pH 6.3 и pH 4.5. Результат хроматографии анализировали с помощью электрофореза.

Ренатурация очищенных пронеуротрофинов. Ренатурацию всех пронеуротрофинов проводили по единой схеме, разбавляя в 100 раз раствор денатурированного белка буфером, pH 8.7-9.0, содержащим 100 mM трисгидрохлорид, 750 mM L-аргинин, 5 mM EDTA, 5 mM восстановленный и 0.5 mM окисленный глутатион. Конечная концентрация целевого белка в случае про-NGF и про-BDNF составляла 35-45 мкг/мл, а в случае про-NT-3 – 100-120 мкг/мл.

Получение органотипичной культуры спинномозговых ганглиев куриных эмбрионов. Для выделения СМГ из эмбрионов использовали инструменты для микрохирургии глаза («Компания Киль», Россия). Выделение проводили в соответствии с методикой [28, 29].

Спинномозговые ганглии 8-13-ти-дневных

куриных эмбрионов, выделенных из инкубационных яиц, – эксплантаты – помещали в чашку Петри, покрытую раствором фосфатно-солевого буфера, pH 7.4, содержащим 0.5% желатина. СМГ культивировали в 3 мл питательной среды F14, содержащей гентамицин (80 мкг/мл) и 10% сыворотки крови лошади. В опытной группе в чашки Петри дополнительно добавляли 15 мкл раствора тестируемых веществ с различной концентрацией в буфере, содержащем 100 мМ трисгидрохлорид, 750 мМ L-аргинин, 5 мМ EDTA, 5 мМ восстановленный и 0.5 мМ окисленный глутатион, pH 8.7–9.0. В контрольной группе в чашки добавляли 15 мкл того же буфера. Эксплантаты культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в среде с 5% содержанием CO₂ в течение 3 сут.

Окрашивание клеток метиленовым

синим. Спинномозговые ганглии эмбрионов кур промывали раствором фосфатно-солевого буфера, pH 7.4, прогретым до 37°C, фиксировали 2% раствором параформа в течение 10 мин, затем промывали водой и высушивали. Далее вносили 1% раствор метиленового синего и инкубировали 10 мин. По окончании окрашивания удаляли раствор красителя, промывали водой и высушивали. Препараты изучали при помощи световой микроскопии.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 09-04-00734 и 09-04-00870, Программ Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине», федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, госконтракт № 14.740.11.0120.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Segal R.A. Selectivity in neurotrophin signaling: Theme and variations // *Annu. Rev. Neurosci.* 2003. V. 26. P. 299–330.
2. Pedraza S.E., Podlesniy P., Vidal N., Arévalo J.C., Lee R., Hempstead B., Ferrer I., Iglesias M., Espinet C. Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR // *Am. J. Pathol.* 2005. V. 166. № 2. P. 533–543.
3. Nordell V.L., Lewis D.K., Bake S., Sohrabji F. The neurotrophin receptor p75NTR mediates early anti-inflammatory effects of estrogen in the forebrain of young adult rats // *BMC Neurosci.* 2005. V. 6. P. 58. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/6/58>
4. McDonald N.Q., Chao M.V. Structural determinants of neurotrophin action // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 19669–19672.
5. Reichardt L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2006. V. 361. № 1473. P. 1545–1564.
6. Arévalo J.C., Wu S.H. Neurotrophin signaling: Many exciting surprises! // *Cell Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. № 13. P. 1523–1537.
7. Jones K.R. Reichardt L.F. Molecular cloning of human gene that is member of nerve growth factor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 20. P. 8060–8064.
8. McDonald, N.Q., Hendrickson W.A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif // *Cell.* 1993. V. 73. № 3. P. 421–424.
9. Lessmann V., Gottmann K., Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects // *Prog. Neurobiol.* 2003. Vol. 69. № 5. P. 341–374.
10. Rattenholl A., Lilie H., Grossmann A., Stern A., Schwarz E., Rudolph R. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 11. P. 3296–3303.
11. Rattenholl A., Ruoppolo M., Flagiello A., Monti M., Vinci F., Marino G., Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. № 3. P. 523–533.
12. Schweigreiter R. The dual nature of neurotrophins // *Bioessays.* 2006. V. 28. № 6. P. 583–594.
13. Paoletti F., Konarev P.V., Covaceuszach S., Schwarz E., Cattaneo A., Lamba D., Svergun D.I. Structural and functional properties of mouse proNGF // *Biochem. Soc. Trans.* 2006. V. 34. № 4. P. 605–606.
14. Fahnstock M., Michalski B., Xu B., Coughlin M.D. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease // *Mol. Cell. Neurosci.* 2001. V. 18. № 2. P. 210–220.
15. Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins // *Science.* 2001. V. 294. № 5548. P. 1945–1948.
16. Teng H.K., Teng K.K., Lee R. [et al.]. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. № 22. P. 5455–5463.
17. Pagadala P.C., Dvorak L.A., Neet K.E. Construction of a mutated pro-nerve growth factor, resistant to degradation and suitable for biophysical and cellular utilization // *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 2006. V. 103. № 47. P. 17939–17943.

18. Kliemannel M., Rattenholl A., Golbik R., Balbach J., Lilie H., Rudolph R., Schwarz E. The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide // *FEBS Lett.* 2004. V. 566. № 1-3. P. 207–212.

19. Volosin M., Trotter C., Cragolini A., Kenchappa R.S., Light M., Hempstead B.L., Carter B.D., Friedman W.J. Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via Neurotrophin Receptor Interacting Factor (NRIF) in hippocampal neurons after seizures / *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 39. P. 9870–9879.

20. Edwards R.H., Selby M.J., Garcia P.D., Rutter W.J. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 14. P. 6810–6815.

21. Yano H., Torkin R., Martin L.A., Chao M.V., Teng K.K. Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: Evidence for retrograde-directed cell killing // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 47. P. 14790–14802.

22. Koshimizu H., Kiyosue K., Hara T. [et al.]. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival // *Mol. Brain.* 2009. V. 2. P. 27. URL: <http://www.molecularbrain.com/content/2/1/27>

23. Zhang D., Bernd P. Bernd expression of TRK and neurotrophin mRNA in dorsal root and sympathetic of the quail during development // *J. Neurobiol.* 1994. V. 25. № 12. P. 1517–1532.

24. Young L., Bisland J., Harper S. A rapid method for determination of cell survival in primary neuronal DRG cultures // *J. Neurosci. Methods.* 1999. V. 93. № 1. P. 81–89.

25. Greene L.A. Quantitative *in vitro* studies on the nerve growth factor (NGF) requirement of neurons. II. Sensory neurons // *Dev. Biol.* 1977. V. 58. № 1. P. 106–113.

26. Rosenthal A., Goeddel D., Winslow W. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor // *Neuron.* 1990. V. 4. № 5. P. 767–773.

27. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.

28. McCarthy K., Partlow L. Preparation of pure neuronal and non-neuronal cultures from embryonic chick sympathetic ganglia a new method based on both differential cell adhesiveness and the formation of homotypic neuronal aggregates // *Brain Res.* 1976. V. 114. № 3. P. 391–414.

29. Davies A. Neurotrophic factor bioassay using dissociated neurons // In: *Nerve growth factors* / Ed. R.A. Rush. – New York: John Wiley and Sons, 1989. Chapt. 5. P. 95–109.