

Сравнительный анализ активации пострецепторных сигнальных путей димерными дипептидными миметиками разных петель NGF

Антипова Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В., Круглов С.В., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.

*Лаборатория фармакологии нейропротекции отдела фармакогенетики
ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», г. Москва*

Резюме. На культуре гиппокампальных клеток линии HT-22 показано, что димерные дипептидные миметики разных петель NGF осуществляют своё действие через специфический нейротрофиновый TrkA-рецептор и относительно избирательно активируют пострецепторные сигнальные пути. Миметики 1-й (ГК-6 (10-6M)) и 3-й петли ГТС-115 ((10-6M)) вызывают активацию двух основных сигнальных каскадов – PI3/Akt и MAP/Erk, в то время как миметик 4-й петли NGF ГК-2 (10-8M) только одного – PI3/Akt-пути.

Ключевые слова: NGF, Trk-A, внутриклеточный сигналинг, димерные дипептидные миметики

Comparative analysis activation of post-receptor signal ways by dimeric dipeptide mimetiks of different loops of NGF

Antipova T.A., Logvinov I.O., Nikolaev S.V., Kruglov S.V., Tarasiuk A.V., Antipov P.I.,
Gudasheva T.A., Seredenin S.B.

Laboratory of Neuroprotective pharmacology Department of Pharmacogenetics
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. On culture of hippocampal HT-22 cells line it is shown that dimeric dipeptide mimetiks of different loops of NGF realize their action via specific neurotrophic TrkA-receptor and selective activate post-receptor intracellular signal ways. Mimetiks of 1th (GK-6 (10-6M)) and the 3rd loops (GTS-115 ((10-6M)) evoke activation of two main signal cascades – PI3/Akt and MAP/Erk, while mimetic the 4th loop of NGF (GK-2 (10-8M)) only one – a PI3/Akt-way.

Keywords: NGF, Trk-A, intracellular signaling, dimeric dipeptide mimetiks

Автор, ответственный за переписку:

Логвинов Илья Олегович — научный сотрудник, ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (916) 799-55-33; e-mail: logvinov_ilya@mail.ru

Введение

Фактор роста нервов (NGF), один из представителей семейства нейротрофинов, со времени открытия в начале 50-х годов XX века привлекает внимание как возможное средство лечения нейродегенеративных заболеваний [1]. Однако применение NGF в клинике осложнено его малой устойчивостью в биологических жидкостях и низкой способностью проникновения через гемато-энцефалический барьер, а также серьёзными побочными эффектами, такими как существенная потеря массы тела и гипералгезия [2]. В связи с этим актуальным является поиск низкомолекулярных соединений, обладающих необходимыми для фармакотерапии эффектами NGF, но свободных от недостатков полноразмерного белка.

NGF представляет собой гомодимер, каждый протомер которого состоит из 118 аминокислотных остатков, организованных в 7 бета-тяжей, связанных между собой 4 неупорядоченными регионами, называемыми петлями. При взаимодействии NGF со специфическим TrkA рецептором происходит его димеризация, автофосфорилирование и активация ряда сигнальных путей, включая фосфатидилинози-

тол-3 киназный (PI3K/Akt) и митоген-активируемый протеинкиназный (MAP/Erk) пути. При этом первый путь связывают в основном с нейропротекцией [3], а второй — с дифференцировкой клеток и гипералгезией [4].

В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова сформулирована гипотеза, что разные функции нейротрофина контролируются взаимодействием разных петель с одним и тем же Trk-рецептором [5]. В рамках этой гипотезы были сконструированы димерные дипептидные миметики 4-й петли NGF — ГК-2 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)), 1-й петли — ГК-6 (гексаметилендиамид бис-(N-аминокапроил-глицил-L-лизина)) и 3-й петли ГТС-115 (гексаметилендиамид бис-(N-гамма-оксибутирил-L-лизил-L-гистидина)), для которых в экспериментах *in vitro* было показано наличие нейропротекторного эффекта [6, 7].

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение влияния этих дипептидных миметиков NGF на активацию TrkA-рецептора и пострецепторных внутриклеточных сигнальных путей в культуре гиппокампальных клеток линии HT-22.

Материалы и методы

1. Культура гиппокампальных клеток линии HT-22

Иммортализованные клетки гиппокампа мыши линии HT-22 рассеивали на чашки Петри диаметром 4 см, обработанные поли-D-лизинном (BD Biosciences, San Jose, USA; 5 мкг/см²) с плотностью 20 тыс/см² в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), содержащей 5% телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco Life Technologies, New York, USA) и 2 mM L-глутамин (ICN, Eschwege, Germany), и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ до образования монослоя.

2. Внесение исследуемых соединений

ГК-2 (10⁻⁸M), ГК-6 (10⁻⁶M) и ГТС-115 (10⁻⁶M) вносили в культуральную среду в виде стерильного раствора в эффективных концентрациях, установленных в экспериментах по нейропротекторному действию этих соединений на культуре гиппокампальных клеток линии HT-22. В качестве положительного контроля использовали NGF (10⁻⁹M). Клетки лизировали через 15, 30, 60 и 180 мин после внесения пептидов. Временные точки были выбраны, исходя из данных литературы по фосфорилированию Akt и Erk-киназ под действием NGF [8].

3. Исследование активации Trk-A-рецептора, PI3K/AKT и MAP/Erk-киназ пострецепторных путей

Содержание p-TrkA, TrkA, p-Akt1/2/3, Akt1/2/3, p-ERK1/2, ERK1/2 определяли с использованием метода Вестерн-блот анализа. Клетки соединяли с лизирующим буфером (Bio-Rad, Hercules, USA; 50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1mM DTT, 1% Triton X-100) при pH = 7,5 и температуре 4 °C их лизировали в течение 5 мин на льду, затем соскребали, помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 мин при 13000 об/с и 4 °C. Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Фолина-Лоури [9]. Белки разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле (ПААГ; Bio-Rad, Hercules, USA) в присутствии додецилсульфата натрия [10]. Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF (Bio-Rad, Hercules, USA) осуществляли электроэлюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в буфере TBS-T с 1% Tween-20 и 5% (масса/объем) обезжиренным молоком (Bio-Rad, Hercules, USA) в течение ночи. Затем мембраны инкубировали в присутствии мышиных моноклональных антител против фосфорилированной и нефосфорилированной формы тирозинкиназы A — p-TrkA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) в разведении 1:1000, против кроличьих поликлональных антител к фосфорилированной и нефосфорилированной формы Akt1/2/3-киназ — p-Akt1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), против фосфорилированной (кроличьи поликлональные антитела) и нефосфорилированной (мы-

шинные моноклональные антитела) формы Erk1/2 — p-Erk1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) в разведении 1:1000 в течение 1 ч. Затем после отмывки в буфере TBS-T с 1% Tween-20 и 0,5% (масса/объем) обезжиренным молоком мембраны инкубировали в присутствии вторых козьих антител (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:2000), в течение 1 ч. Детектирование белков осуществляли после отмывки от вторых антител в буфере TBS-T с 1% Tween-20 и 0,5% (масса/объем) обезжиренным молоком в реакции с ECL-реагентами (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), используя гель-документирующую систему Alliance UVITEC (UK). Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы GIMP2.

4. Статистический анализ

Для оценки межгрупповых различий при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Данные указаны в $m \pm s. d.$

Результаты и их обсуждение

Хорошо известно, что основные биологические функции NGF — нейропротекция и дифференцирующая активность — реализуются при его взаимодействии с TrkA рецепторами и опосредованы, главным образом, PI3/Akt и MAP/Erk пострецепторными сигнальными каскадами. Изучение возможного влияния миметиков 1-й, 3-й и 4-й петель NGF ГК-6, ГК-2 и ГТС-115 на фосфорилирование TrkA, Akt и Erk-киназ проводили на гиппокампальных клетках линии HT-22 с помощью Вестерн-блот анализа с использованием антител к фосфорилированным и нефосфорилированным формам этих киназ

Было показано, что все миметики взаимодействуют с TrkA-рецептором, но при этом имеют разную картину пострецепторного сигналинга: ГК-6 и ГТС-115, подобно NGF, активируют MAP/Erk- и PI3/Akt, в то время как ГК-2 — только PI3/Akt-сигнальный путь. Как видно из рис. 1–3, достоверное увеличение фосфорилирования TrkA рецептора и Akt-киназ наблюдалось через 15, 30, 60 и 180 мин после внесения ГК-2, через 15, 30, 60 мин после внесения ГК-6, через 30, 60, 180 мин после внесения ГТС-115, а Erk-киназ под действием NGF, ГК-6 и ГТС-115 через 30 и 60 мин.

Известно, что основным сигнальным путём TrkA-рецептора обеспечивающим выживаемость нейронов является фосфатидилинозитол-3 / Akt киназный путь. Одной из мишеней, активированного NGF фосфатидилинозитол-3-киназного пути является серин/треониновая киназа Akt или протеинкиназа Б. С использованием ингибирования Akt-киназы было показано, что 80% NGF-индуцированной выживаемости симпатических нейронов обусловлено активацией этой киназы [11–13]. В нейронах Akt-киназа регулирует

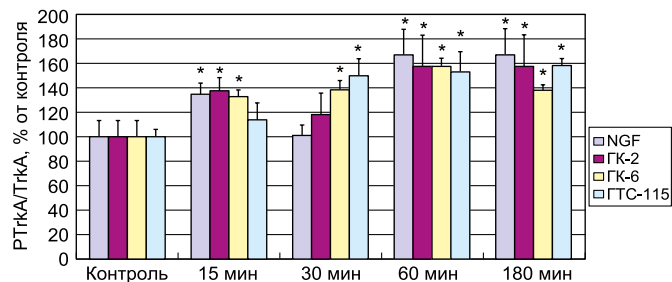
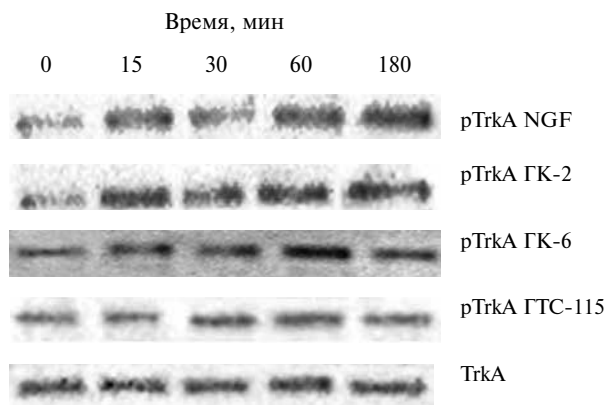


Рис. 1. Фосфорилирование TrkA после внесения NGF, GK-2, GK-6 и ГТС-115 в культуру клеток гиппокампа мыши линии HT-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии) * – $p < 0,05$, достоверность отличий от контроля по U-критерию Манна-Уитни

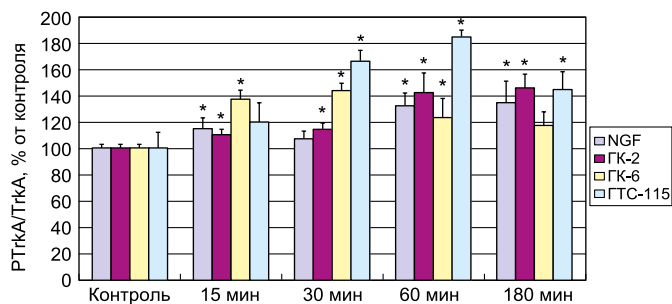
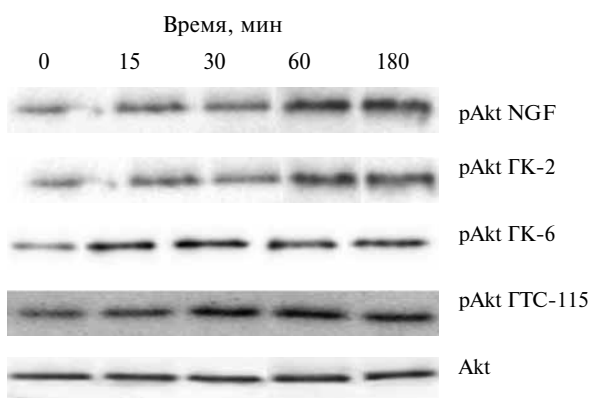


Рис. 2. Фосфорилирование Akt после внесения NGF, GK-2, GK-6 и ГТС-115 в культуру клеток гиппокампа мыши линии HT-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии) * – $p < 0,05$, достоверность отличий от контроля по U-критерию Манна-Уитни

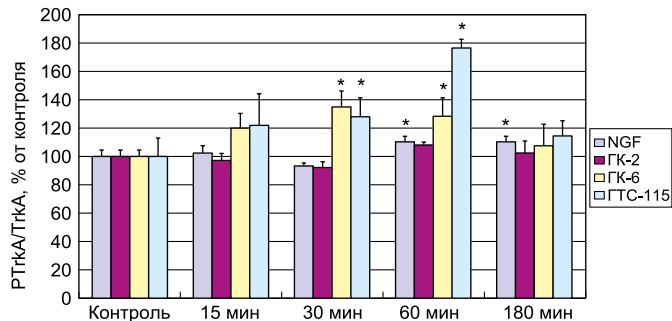
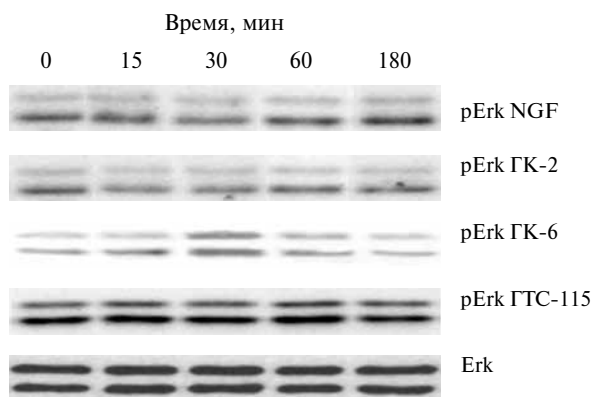


Рис. 3. Фосфорилирование Erk после внесения NGF, GK-2, GK-6 и ГТС-115 в культуру клеток гиппокампа мыши линии HT-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии) * – $p < 0,05$, достоверность отличий от контроля по U-критерию Манна-Уитни

только их выживаемость, но не влияет ни на образование нейритов, ни на дифференцировку [3].

Второй сигнальный путь, участвующим в выживании нейронов является MAP-Erk-киназный. Известно, что активация этого сигнального пути в основном вовлечена в такие эффекты NGF, как дифференцировка, синаптическая пластичность, долговременная потенция и в один из побочных эффектов применения NGF — гипералгезию [14].

Ранее на культуре гиппокампальных клеток линии HT-22 нами было показано наличие у пептидных

миметиков разных петель NGF нейротрофического эффекта [5, 7]. При этом миметики 1-й (GK-6) и 3-й (ГТС-115) петель обладали дифференцирующим действием на культуре феохромоцитомы крысы линии PC12, а миметик 4-й петли GK-2 — нет. Такие разные эффекты соединений могли быть связаны с разной активацией пострецепторных путей специфического нейротрофинового TrkA-рецептора. Полученные результаты подтверждают имеющиеся данные литературы, свидетельствующие о возможности дивергенции эффектов NGF. В работе *S. Mahapatra et al.* [15] было

показано, что точечные мутации в структуре NGF приводят к изменению соотношения активации Akt и MAP-киназного путей. Так, мутантная форма NGF 7–84–103 (SS-1) при внесении в культуру клеток PC12 характеризовалась снижением активации MAP-киназного пути и усилением активации PI3/Akt-киназного (соотношение Akt/MAP 0,75/0,25). Этими авторами было выдвинуто предположение о том, что строение сигнального трансдукционного комплекса, состоящего, по меньшей мере, из 6 адапторных белков, связанных с Trk⁴⁹⁰ зависит как от взаимодействий внутри самого внутриклеточного домена, так и от связывания NGF с экстраклеточным доменом. Причём тип строения этого комплекса может приводить к разделению внутриклеточных сигнальных путей. В работах *H. U. Saragovi et al.* [16] в экспериментах *in vitro* было показано, что комплекс NGF с антителами против С-конца этого белка активирует TrkA рецептор и обладает нейропротекторными свойствами, но в отличие от фактора роста нервов не вызывает дифференцировку. *S. Capsoni et al.* [17]

приводит данные о том, что у пациентов с наследственной сенсорной автономной нейропатией V типа, имеющих мутацию в гене NGFB (экзон 3) с заменой аргинина в положении R100 на триптофан, полностью отсутствует болевая чувствительность без нарушения большинства неврологических функций.

Выводы

Полученные данные позволяют заключить, что вновь синтезированные низкомолекулярные миметки разных петель NGF проявляют свои эффекты через тирозинкиназные рецепторы и относительно избирательны в отношении активации внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за биологические эффекты этого нейротрофина. Исследование биохимических свойств дипептидных миметиков 1-й, 4-й и 3-й петель NGF показывает, что картины активации пострецепторных путей сходны у пространственно сближенных 3-й и 1-й петли нейротрофина.

Литература

1. *Levi-Montalcini R.* The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987; 237: 1154–1162.
2. *Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L.* Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use beta beta. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 11: 239–252.
3. *Kaplan D.R., Miller F.D.* Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10: 3: 381–391.
4. *Obata K., Noguchi K.* MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.* 2004; 74: 21: 2643–2653.
5. *Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. Доклады Академии Наук 2010; 434: 4: 549–552.
6. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А.* Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF: Патент РФ № 2410392. Б.И. 2011, № 3.
7. *Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Помогайбо С.В., Шумский А.Н., Логвинов И.О., Николаев С.В., Поварнина П.Ю., Константинопольский М.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Дизайн, синтез и нейропротекторные эффекты димерного дипептидного миметика 3-й петли фактора роста нервов. *Биоорганическая химия* 2016, в печати.
8. *Senger D.L., Campenot R.B.* Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J. Cell Biol.* 1997; 138 (2): 411–421.
9. *Alam A.* A model for formulation of protein assay. *Anal Biochem.* 1992; 203: 1: 121–126.
10. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76: 9: 4350–4354.
11. *Crowder R.J., Freeman R.S.* Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 1998; 18: 8: 2933–2934.
12. *Virdee K., Tolkovsky A.M.* Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor-induced survival sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 1996; 67: 5: 1801–1805.
13. *Virdee K., Hemmings B.A., Goemans C., Heumann R., Tolkovsky A.M.* Nerve growth factor-induced PKB/Akt activity is sustained by phosphoinositide 3-kinase dependent and independent signals in sympathetic neurons. *Brain Res.* 1999; 837: 1–2: 127–142.
14. *Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L.* Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use beta beta. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 239: 239–252.
15. *Mahapatra S., Mehta H., Woo S.B., Neet K.E.* Identification of critical residues within the conserved and specificity patches of nerve growth factor leading to survival or differentiation. *J. Biol. Chem.* 2009; 284 (48): 33600–33613.
16. *Saragovi H.U., Zheng W., Maliartchouk S., DiGuglielmo G.M., Mawal Y.R., Kamen A. et al.* A TrkA-selective, fast internalizing nerve growth factor-antibody complex induces trophic but not neuritogenic signals. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 34933–34940.
17. *Capsoni S., Covaceuszach S., Marinelli S., Ceci M., Bernardo A., Minghetti L. et al.* Taking pain out of NGF: a «painless» NGF mutant, linked to hereditary sensory autonomic neuropathy type V, with full neurotrophic activity. *PLoS One.* 2011; 6: 2: e17321.