

Димерный дипептидный миметик 1-й петли фактора роста нервов ГК-6, активирующий PI3K/АКТ и MEK/MAPK/ERK, вызывает дифференцировку клеток PC12 по нейрональному типу

Антипова Т.А.¹, Николаев С.В.¹, Ревущин А.В.², Савченко Е.А.², Павлова Г.В.², Гудашева Т.А.¹

¹ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Резюме. Димерный дипептидный миметик 1-й петли NGF ГК-6 (10^{-6} М), активирующий как фосфатидилинозитол-3/Акт-киназный, так и митоген-активируемый протеинкиназный (MEK/MAPK/ERK) сигнальные каскады, вызывает дифференцировку клеток PC12 по нейрональному типу. В то же время димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF ГК-2 (10^{-6} М), активирующий только фосфатидилинозитол-3/Акт-киназный путь, не обладает дифференцирующим действием.

Ключевые слова: NGF, димерные дипептидные миметики, ГК-2, ГК-6, дифференцировка, PC12, бета-тубулин 3

Dimeric dipeptide mimetic the 1st loop of nerve growth factor of GK-6, which activates PI3K/AKT and MEK/MAPK/ERK, causes a neuronal type differentiation of PC12 cells
Antipova T.A.¹, Nikolaev S.V.¹, Revishchin A.V.², Savchenko E.A.², Pavlova G.V.², Gudasheva T.A.¹

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Resume. Dimeric dipeptide mimetic 1st loop of NGF GK-6 (10^{-6} М) activating as phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase MEK/MAPK/ERK signaling cascades causes PC12 cell differentiation into neuron-like cells. At the same time dimeric dipeptide mimetic the 4th loop of NGF GK-2 (10^{-6} М), which activates only phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, does not possess the differentiating effect.

Keywords: NGF, dimeric dipeptide mimetics of NGF, differentiation, PC12, beta-tubulin III

Автор, ответственный за переписку:

Антипова Татьяна Алексеевна – заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495) 601-22-43; e-mail: zenina_tatyana@mail.ru

Введение

Развивающиеся нейроны для своего выживания и дифференцировки нуждаются в нейротрофинах, наиболее изученным из которых является фактор роста нервов (NGF). Известно, что эффекты этого нейротрофина на выживаемость и рост отростков нейронов обусловлены взаимодействием с TrkA рецептором. Связывание с NGF ведёт к димеризации и активации TrkA путём аутофосфорилирования внутриклеточных тирозиновых остатков [13]. Это инициирует запуск сигнального трансдукционного каскада, включающего фосфатидилинозитол-3 киназный (PI3K/АКТ) и митоген-активируемый протеинкиназный (MEK/MAPK/ERK) пути. Активация PI3K/АКТ способствует выживанию нейронов. MEK/MAPK/Erk-киназный путь контролирует в основном деление и дифференцировку клеток [10, 12].

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова была сформулирована гипотеза, что разные функции NGF контролируются взаимодействием разных петель с

одним и тем же TrkA-рецептором [7]. В рамках этой гипотезы были получены ГК-2 (гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина)), димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF, и ГК-6 (гексаметилендиамид *бис*-(*N*-аминокапроил-глицил-*L*-лизина)), миметик 1-й петли NGF. Оба миметика активировали TrkA-рецептор, PI3K/АКТ, и обладали нейропротекторным эффектом [2]. ГК-6, кроме того, активировал ещё и MEK/MAPK/Erk-киназный путь [1].

Цель исследования

Целью настоящего исследования было показать, что миметик 1-й петли ГК-6, но не миметик 4-й петли NGF ГК-2, обладает дифференцирующей активностью.

Материалы и методы

Все манипуляции с клетками выполнялись в строго стерильных условиях. Клетки культивировали при

температуре 37 °С, 5 % CO₂ в среде ДМЕМ (Dulbecco's modified Eagle's medium, HyClone, США), содержащей 5 % FBS (фетальной бычьей сыворотки, Gibco, США) для клеток линий NT-22 и PC12 и 10 % FBS для нейробластомы человека линии SH-SY5Y, 2мМ L-глутамин (ICN Pharmaceuticals, США). Смену культуральной среды производили через 24 ч после посева и каждые последующие 3 дня. Рассев на культуральные флаконы общей площадью 75 см² (Corning-Costar, США) осуществляли каждую неделю.

Недифференцированные клетки PC12 рассеивали с плотностью 3,5 тыс на лунку в среде ДМЕМ с 1 % сывороткой FBS. В момент посева в среду культивирования добавляли NGF в качестве положительного контроля в конечной концентрации 100 нг/мл (BD Bioscience, Великобритания), пептиды ГК-2 и ГК-6 в конечных концентрациях 10⁻⁵–10⁻⁸М. Концентрация NGF (≈10⁻⁹ М) используется в экспериментах по выявлению нейропротекторной и дифференцирующей активности на клетках PC12 [6] и не является токсичной для клеток [16].

В дальнейшем исследуемые пептиды и NGF вносили в среду каждые 48 ч в течение 6 сут. О степени дифференцировки клеток судили по форме и размерам клеток, количеству и длине отростков. Дифференцированными считались клетки, имевшие отростки размером более, чем величина диаметра тела клетки.

Для окраски клеток PC12 на нейрональный маркер бета-тубулин 3 (Abcam, Великобритания) пептиды вносили по той же схеме. После этого клеточную среду отбирали, клетки промывали 2 раза холодным PBS и фиксировали 4 % формальдегидом в PBS. Окрашивание клеток антителами на бета-тубулин 3 в разведении 1:100 проводили в течение ночи при 4 °С в PBS, содержащем 1 % BSA и 0,1 % Tween. В качестве вторичных использовали антитела козы против иммуноглобулина кролика конъюгированные флуоресцентным красителем DyLight 488 (Abcam, США) в разведении 1:250 в течение 1 ч. Фотографирование клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Япония) при увеличении 100.

Результаты и обсуждение

Для определения дифференцирующей активности пептидных миметиков фактора роста нервов использовали клетки феохромоцитомы крысы линии PC12. Известно, что эти клетки содержат TrkA рецепторы и при добавлении NGF дифференцируются по нейрональному типу [5].

Дипептидный миметик ГК-2 в отличие от NGF не вызывал дифференцировку клеток линии PC12 ни в одной из исследуемых концентраций от 10⁻⁵ до 10⁻⁸М. Внешний вид клеток PC12 после обработки ГК-2 не отличался от контроля, образование отростков не наблюдалось (рис. 1).

В то же время на 6-й день после внесения в среду культивирования ГК-6 в конечной концентрации 10⁻⁶ М недифференцированные клетки PC12 образовывали цитоплазматические отростки, величина которых превышала диаметр клетки (см. рис. 1).

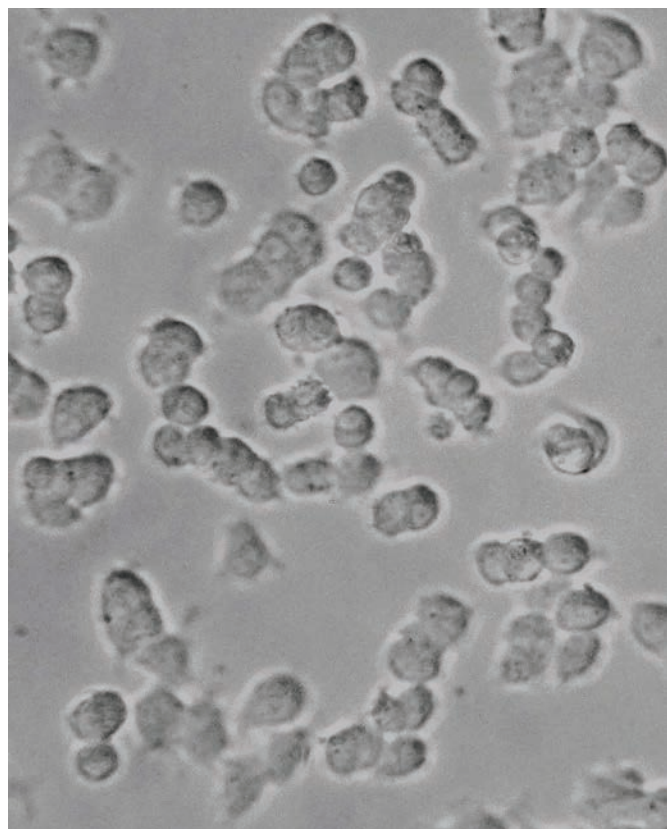
Для подтверждения дифференцировки клеток PC12 по нейрональному типу было использовано окрашивание на нейрональный маркер бета-тубулин III, поскольку последний экспрессируется в дендритах, аксонах и окончаниях аксонов нейронов исключительно при дифференцировке клеток по нейрональному типу [4, 11]. Как видно на рис. 2, в терминалях дифференцированных клеток PC12 как под действием ГК-6 (10⁻⁶ М), так и NGF (≈10⁻⁹ М) действительно обнаруживается бета-тубулин III.

Таким образом, дипептидный миметик 1-й петли фактора роста нервов ГК-6 вызывает дифференцировку клеток PC-12 по нейрональному типу.

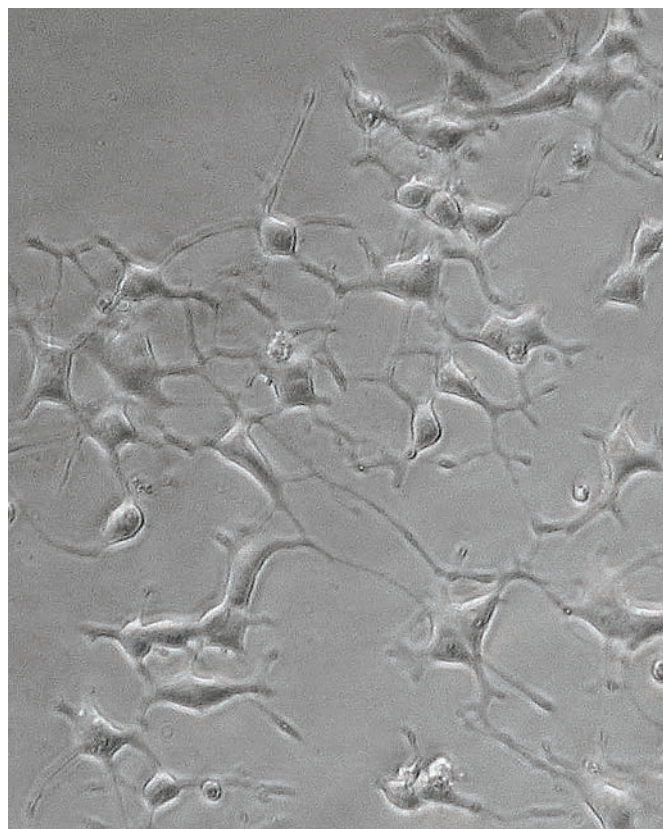
Полученные нами данные об отсутствии дифференцирующего действия у ГК-2, который активирует Akt-путь и не активирует Erk и наличия дифференцирующей активности у ГК-6, который активирует оба сигнальных пути, согласуются с данными литературы [3, 8] о необходимости активации MEK/MAPK/Erk-киназного пути для дифференцировки клеток по нейрональному типу.

Таким образом, выявленная нами способность у исследованных пептидов вызывать дифференцировку (ГК-6) либо отсутствие таковой (ГК-2) свидетельствует в пользу того, что разные петли NGF могут быть ответственны за разные функции этого белка.

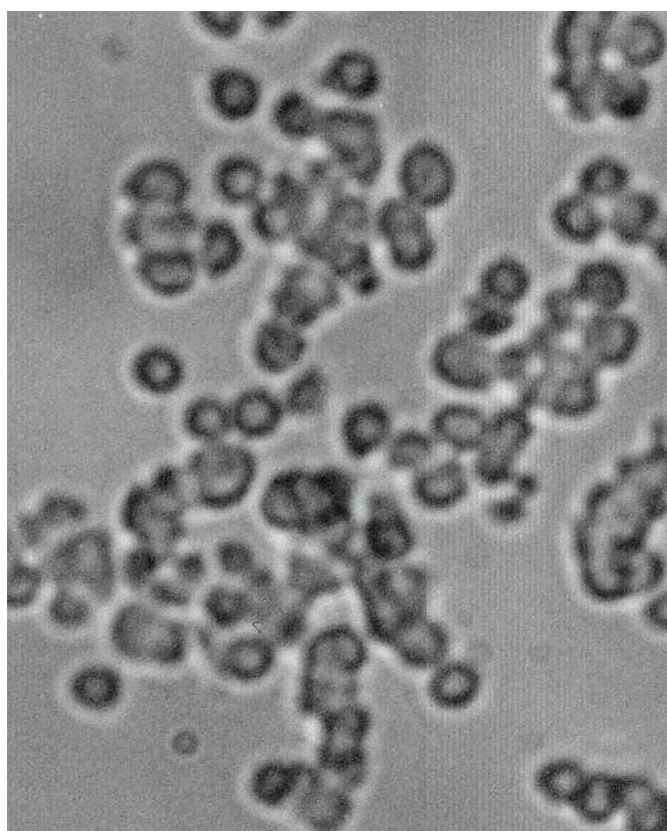
При изучении активации TrkA рецептора после внесения ГК-2 и ГК-6 нами были использованы антитела на TrkA, содержащий фосфорилированный тирозин Y490. Было показано, что оба этих дипептида вызывали фосфорилирование TrkA рецептора по этому тирозину. При этом ГК-2 и ГК-6 имели разный паттерн активации пострецепторных сигнальных киназ. Можно предположить, что фосфорилирование других тирозиновых последовательностей вовлечено в активацию разных пострецепторных сигнальных путей под действием димерных миметиков разных петель фактора роста нервов и, в конечном итоге, в дивергенцию функций NGF. Согласно данным литературы, существует несколько тирозиновых остатков, фосфорилирование которых приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей. Три из них, Y670, Y674 и Y675, представлены в активирующей петле киназного домена и регулируют киназную активность рецептора. Фосфорилирование этих остатков необходимо для конформационных изменений, обеспечивающих взаимодействие каталитического центра и С-концевых последовательностей тирозина. Фосфорилирование Y785 связано с активацией фосфолипазы PLC-γ, ответственной за процесс клеточной дифференцировки и активацию Erk1/2 [8]. Мутация хотя бы одного из трёх остатков Y670, Y674 и Y675 активирующей петли



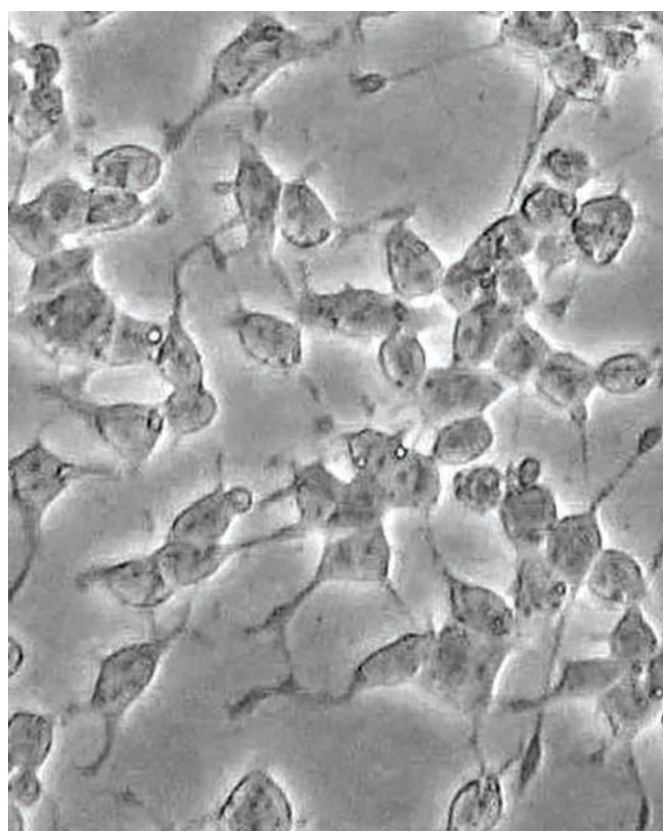
Контроль



NGF 10^{-9} M

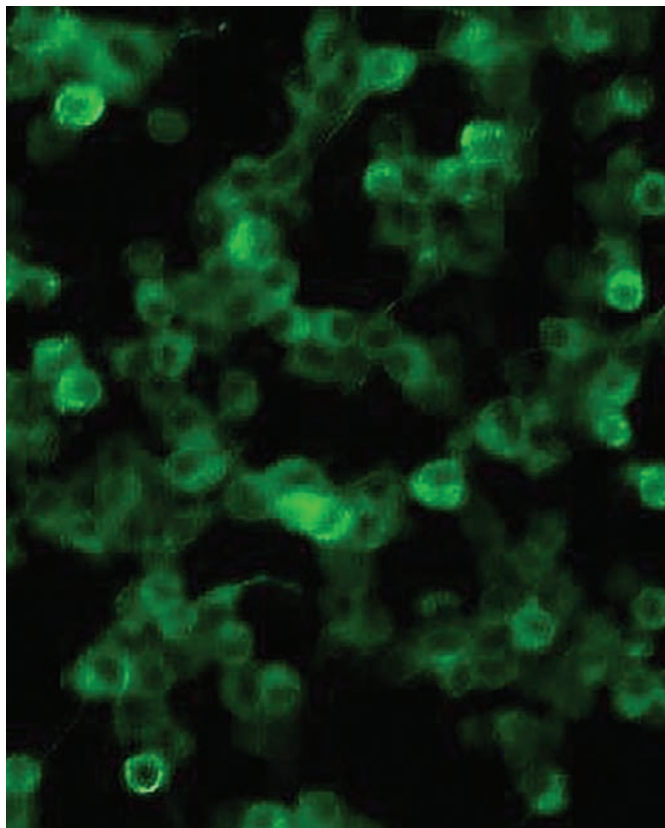


ГК-2 10^{-6} M

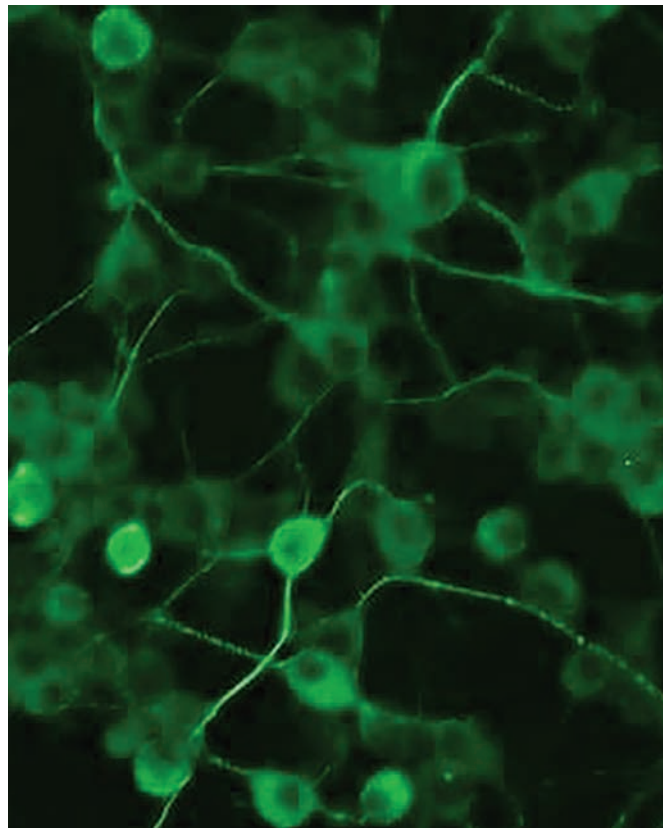


ГК-6 10^{-6} M

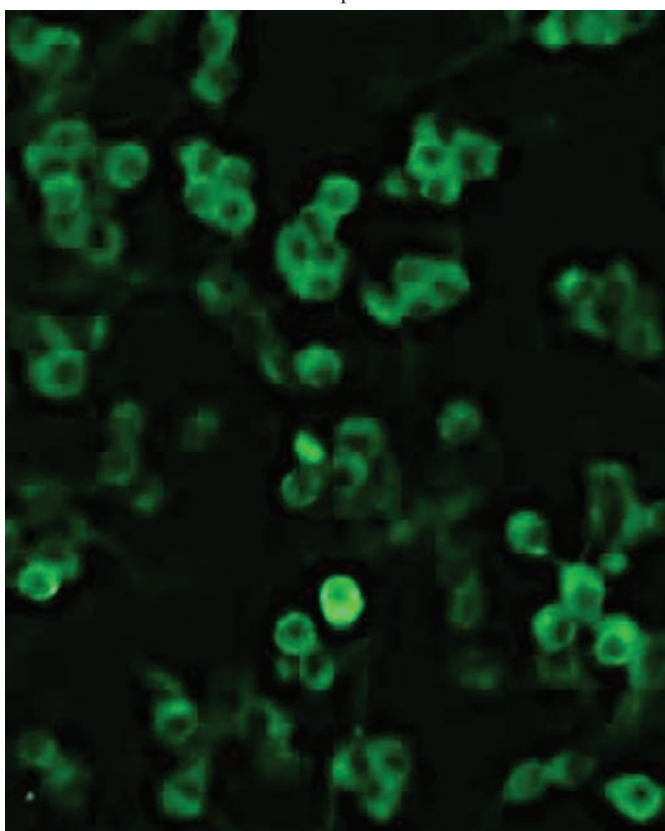
Рис. 1. Дифференцировка клеток РС-12 после внесения NGF, ГК-2 и ГК-6. Фазовый контраст. Увеличение $\times 200$



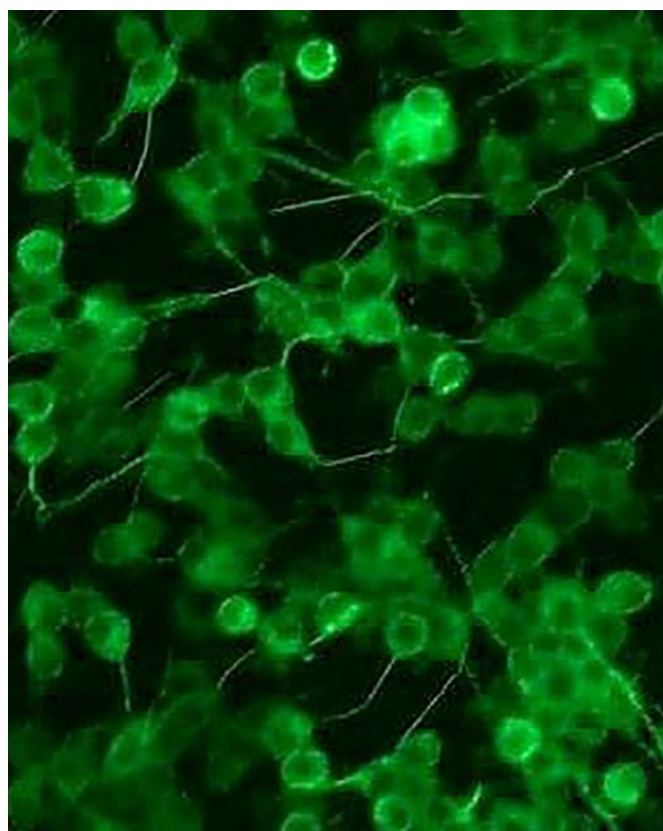
Контроль



NGF 10^{-9} М



ГК-2 10^{-6} М



ГК-6 10^{-6} М

Рис. 2. Обнаружение нейронального маркера β -тубулина III после внесения NGF, ГК-2 и ГК-6 в культуру клеток феохромоцитомы крысы PC-12. Увеличение $\times 200$. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к β -тубулину III

полностью предотвращают фосфорилирование Y785 и последующую активацию Erk1/2 и PLC- γ . Фосфорилирование Y499 приводит к активации адапторного белка Shc, фосфорилирование Y760 – к активации PI3 киназы, Y794 – к активации PLC- γ [15]. Отдельные мутации этих трёх остатков тирозина ингибируют рост нейритов в культуре клеток PC12 [9].

Кроме того, существует также независимый от фосфорилирования остатка 490 путь, приводящий к дифференцировке и повышению выживаемости клеток через другие адаптеры. Например, имеются два дополнительных адаптера, α APS и SH2-B, фосфорилирующиеся при активации Trk-рецептора. Они могут образовывать гомо- и гетеродимеры и образовывать комплекс с адаптерным белком Grb2, обеспечивающий проведение сигнала через белок SOS к Ras/MAPK/ERK и через комплекс белков Ras/Gab к фосфоинозитол-3-киназе. Показано, что использование антител к SH2-B препятствует NGF-зависимой выживаемости, активации Erk и аксональному росту симпатических нейронов [14].

Arevalo J. et al. указывают на наличие ещё одного сигнального комплекса, ответственного за селектив-

ную активацию Erk-киназ [3]. Этот комплекс образуется после взаимодействия трансмембранных доменов TrkA и ARMS. Тирозин Y1096 ARMS фосфорилируется после связывания нейротрофинов с рецепторами и обеспечивает образование докиннг сайтов для CrkL, приводящее к Rap1-зависимой долговременной активации Erk-киназ. Нарушения взаимодействия Trk с ARMS или ARMS с CrkL (белком, содержащим домен SH2 и два домена SH3 (src-гомологичные домены)) с помощью мутаций тирозина Y1096 ARMS существенно снижает пролонгированный нейротрофиновый сигналинг Erk, но не влияет на Ras или Akt активацию [3].

Таким образом, конечный ответ клетки на разные сигналы бывает различным, в зависимости от первого участника проведения сигнала от TrkA-рецептора. Активация под действием ГК-2 или ГК-6 одного или двух сигнальных каскадов, а также наличие или отсутствие дифференцирующего действия может быть связано, в частности, с фосфорилированием тирозиновых остатков, отличных от Y490 и далее различных вариантов образующихся комплексов адаптерных белков, участвующих в трансдукции сигнала, что требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Антипова Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В., Круглов С.В., Тара-сюк А.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Сравнительный анализ активации пострецепторных сигнальных путей димерными дипептидными миметиками разных петель NGF. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 2: 14–17.
2. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. ДАН. 2010; 434:4: 549–552.
3. Arevalo J.C., Pereira D.B., Yano H., Teng K.K., Chao M.V. Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. J Biol Chem. 2006; 281:2:1001–1007.
4. Ceres A., Banker G.A., Binder L. Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. J Neurosci. 1986; 6:3: 714–722.
5. Chang J.H., Mellon E., Schanen N.C., Twiss J.L. Persistent TrkA activity is necessary to maintain transcription in neuronally differentiated PC12 cells. J. Biol. Chem. 2003; 278:44: 42877–42885.
6. Gong Y., Wu J., Qiang H., Liu B., Chi Z., Chen T., Yin B., Peng X., Yuan J. BRI3 associates with SCG10 and attenuates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. BMB Rep. 2008; 41:4:287–293.
7. Gudasheva T.A., P.Yu. Povarnina, T.A. Antipova, Yu.N. Firsova, M.A. Konstantinopolsky, S.B. Seredenin. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. Journal of Biomedical Science (2015) 22:106. DOI 10.1186/s12929-015-0198-z.
8. Huang E.J., Reichardt L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. Annu Rev Biochem. 2003; 72: 609–642.
9. Inagaki N., Thoenen H., Lindholm D. TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. Eur J Neurosci. 1995; 7: 6:1125–1133.
10. Kaplan D.R., Miller F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr. Opin. Neurobiol. 2000; 10: 3: 381–391.
11. Lee M., Tuttle J., Rebhun L., Cleveland D., Frankfurter A. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. Cell Motil. Cytoskeleton. 1990; 17: 118–132.
12. Obata K., Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci. 2004; 74: 21: 2643–5263.
13. Pollack S.J., Harper S.J. Small molecule Trk receptor agonists and other neurotrophic factor mimetics. Cur. Drug Targets-CNS and Neurol. Disorders. 2002; 1:1: 59–80.
14. Qian X., Riccio A., Zhang Y., Ginty D.D. Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. Neuron. 1998; 21:5:1017–1029.
15. Rozakis-Adcock M., McGlade J., Mbamalu G., Pelicci G. et al. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. Nature. 1992; 360: 6405: 689–692.
16. 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: 411–412.