

Методом Вестерн-блот-анализа на клетках HT-22 с использованием антител к фосфорилированной форме рецептора была показана активация TrkB рецептора при инкубации с ГСБ-106 в концентрации 10^{-8} М [6].

ГСБ-106 в концентрациях 10^{-6} – 10^{-8} М проявлял нейротрофическую активность, защищая гиппокампальные нейроны линии HT-22 от окислительного стресса, с максимальным эффектом ~50 % от эффекта BDNF в его оптимальной концентрации 10^{-9} М [6–8]. Нейротрофический эффект был также выявлен на клетках HT-22 в условиях глутаматной токсичности и на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y в условиях 6-OHDA – индуцированной токсичности [8], при этом в обоих случаях дипептид в концентрации 10^{-7} М проявлял такую же по выраженности активность, как и BDNF в концентрации 10^{-9} М.

Нейротрофическая активность ГСБ-106 была подтверждена *in vivo* на модели ишемического инсульта у крыс [6]. Кроме того, дипептид ГСБ-106 при системном введении проявлял выраженную антидепрессивную активность в батарее тестов и моделей на грызунах [9–12]. Эта активность полностью блокировалась специфическим антагонистом TrkB рецепторов [13].

Таким образом, результаты *in vitro* и *in vivo* исследований косвенно свидетельствуют о взаимодействии ГСБ-106 с TrkB рецептором, которое однако может быть и опосредованным.

Целью данной работы явилось подтверждение прямого взаимодействия ГСБ-106 с TrkB рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса.

Материалы и методы / Materials and methods

Взаимодействие миметика BDNF ГСБ-106 с TrkB рецептором определялось с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (Cytiva, США) с использованием чипа NTA (Cytiva, США). Регенерационный раствор (0,01 М HEPES, 0,15 М NaCl, 0,35 М ЭДТА, 0,005 % сурфактант P20, pH 8,3) и рабочий буфер (0,01 М HEPES, 0,15 М NaCl, 50 мкМ ЭДТА, 0,005 % сурфактант P20, pH 7,4) были получены от Cytiva. Экстраклеточный домен TrkB-ECD (Met1-His430), модифицированный по N-концу 6-ю остатками гистидина (HisTAG) был фирмы Sino Biological, КНР (каталожный номер 10047-N08H). Нейротрофин BDNF был фирмы Abscam, Великобритания (каталожный номер ab276774).

Соединение ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(N-моноукцинил-L-серил-L-лизина) был синтезирован в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» как описано в [5].

Эксперимент проводили по частично модифицированной методике [14]. Перед иммобилизацией рецептора TrkB на чипе его раствор (183 нМ) либо один (Контроль 1, K1), либо вместе с аналитами BDNF (360 нМ) (Контроль 2, K2) или ГСБ-106 (1 мМ) (Опыт,

ГСБ-106), инкубировали в течение 1 ч при температуре 4 °С в темноте (см. Схему эксперимента, рис. 2).

Иммобилизация TrkB рецептора. Перед каждой иммобилизацией TrkB поверхность чипа отмывалась инъекцией регенерационного раствора в течение 1 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Активация поверхности рабочего канала осуществлялась инъекцией 0,5 мМ NiCl₂ в рабочем буфере в течение 1 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Далее проводили инъекцию предварительно инкубированных растворов, содержащих TrkB, в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

Выявление взаимодействия BDNF с иммобилизованным лигандом (TrkB) выполнялось при скорости потока 10 мкл/мин в рабочем буфере в течение 5 мин. Регистрировали сигнал биосенсора в единицах RU (Resonance Unit) на этапе иммобилизации рецептора и после инъекции BDNF. По изменению уровня сигнала биосенсора делали вывод о взаимодействии BDNF с рецептором.

После каждого анализа поверхность чипа обрабатывалась инъекцией регенерационного раствора в течение 3 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Отмывка удаляет с поверхности чипа иммобилизованный TrkB и ионы никеля. Эксперимент повторяли дважды. Достоверность результатов оценивали по среднеквадратичному отклонению по выборке методом парного сравнения.

Обработка результатов / Processing of results

Рассчитывали средние значения уровня сигнала биосенсора по двум измерениям в контроле 1, контроле 1 и опыте. Рассчитывали изменение сигнала биосенсора после внесения BDNF. Для удобства межгрупповых сравнений это изменение нормализовали по отношению к уровню сигнала до внесения BDNF с использованием следующей формулы:

$$\frac{(\text{уровень сигнала 2} - \text{уровень сигнала 1}) * 1000}{\text{уровень сигнала 1}},$$

где: уровень сигнала 1 – до внесения BDNF, а уровень сигнала 2 – после внесения BDNF.

Достоверность результатов оценивали с использованием среднеквадратичного отклонения нормализованного изменения уровня сигнала в группах, а именно, если среднеквадратичные отклонения двух выборок не перекрывались, то различия считали статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение / Results and their discussion

В настоящее время в литературе представлены данные по связыванию BDNF и его миметиков Betrofina 3, Betrofina 4 и 7,8-дигидроксифлавона (7,8-DHF) с TrkB [14, 15]. В публикации датских учёных из университета

Копенгагена [15] методом плазмонного резонанса на приборе Biacore 2000 (Biacore AB, Швеция) с чипом CM4, на котором ковалентно был иммобилизован TrkB, определены константы связывания BDNF, Betrofina 3 и Betrofina 4 с рецептором TrkB – $5,4 \cdot 10^{-10}$ М, $1,8 \cdot 10^{-6}$ М и $1,3 \cdot 10^{-6}$ М, соответственно. Научной группой из Университета Атланты (Джорджия, США) [14] методом плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 (Biacore AB, Швеция) с чипом NTA, который использовался и в нашем исследовании, были получены следующие значения констант связывания соединений с TrkB – $K_d(\text{BDNF}) = 1,7 \cdot 10^{-6}$ М и $K_d(7,8\text{-DHF}) = 1,54 \cdot 10^{-5}$ М. Стоит отметить, что полученные меньшие значения констант K_d могут быть связаны с использованием исследователями [14] в качестве рабочего раствора фосфатного буфера, который за счёт осаждения на чип нерастворимого фосфата никеля приводит к завышению сигнала оптического биосенсора. В нашем же исследовании в рабочем растворе содержался ЭДТА, который способен переводить ионы никеля в раствор за счёт хелатирования, тем самым занижая итоговый сигнал биосенсора.

В нашем исследовании TrkB рецептор был ориентированно иммобилизован на поверхности NTA-чипа. Были проведены 3 эксперимента по связыванию BDNF с TrkB (рис. 2). В первом контрольном эксперименте (K1) рецептор был иммобилизован после инкубации и далее инжестировали раствор 360 нМ BDNF в рабочем буфере. В этих условиях сигнал биосенсора увеличился в среднем на 1330 RU по отношению к уровню сигнала до внесения BDNF (табл. 1, рис. 3), что свидетельствует о связывании нейротрофина с рецептором. Во втором контрольном эксперименте

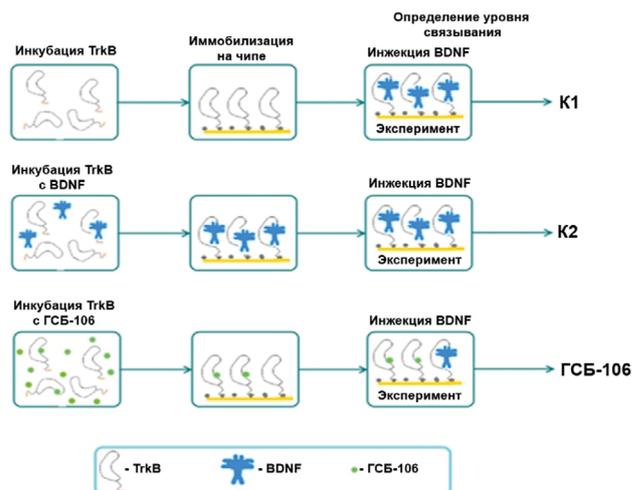


Рис. 2. Схема эксперимента по связыванию аналитов с TrkB

Примечания: K1 (Контроль 1) – инъекция BDNF после инкубации рецептора без аналита; K2 (Контроль 2) – инъекция BDNF после инкубации рецептора с BDNF; ГСБ-106 (Опыт) – инъекция BDNF после инкубации рецептора с ГСБ-106.

Fig. 2. Scheme of the experiment on the binding of analytes with TrkB

Notes: K1 (Control 1) – injection of BDNF after incubation of the receptor without analyte; K2 (Control 2) – injection of BDNF after incubation of the receptor with BDNF; GSB-106 (Опыт) – injection of BDNF after incubation of the receptor with GSB-106.

(K2) рецептор был предварительно проинкубирован с BDNF и далее иммобилизован на чипе. Инъекция раствора 360 нМ BDNF не приводила к изменению сигнала биосенсора, что указывает на то, что места связывания на рецепторе заняты (в предварительной инкубации). В третьем эксперименте (Опыт, ГСБ-106)

Таблица 1

Предварительная инкубация TrkB рецепторов с дипептидным миметиком BDNF ГСБ-106 ухудшает взаимодействие BDNF с TrkB

Table 1

Pre-incubation of TrkB receptors with the dipeptide mimetic BDNF GSB-106 worsens the interaction of BDNF with TrkB

Группа	Условия эксперимента	Уровень сигнала до инъекции BDNF, RU	Изменение уровня сигнала после инъекции BDNF, RU	Нормализованное изменение уровня сигнала после инъекции BDNF ¹ , RU
Контроль 1	Инкубация TrkB + инъекция BDNF	1010±20	+1350±40	+1330±60
Контроль 2	Инкубация TrkB с BDNF + инъекция BDNF	4700±200	0	0*
Опыт	Инкубация TrkB с ГСБ-106 + инъекция BDNF	1240±20	+1170±90	+940±70*

Примечания: Данные поверхностного плазмонного резонанса. Уровень взаимодействия BDNF с TrkB определяли по изменению сигнала биосенсора до и после инъекции нейротрофина.

Данные представлены в виде средних по двум измерениям и среднеквадратичных отклонений.

¹ – Для удобства межгрупповых сравнений изменение уровня сигнала после инъекции BDNF нормализовали с использованием следующей формулы: (уровень сигнала 2 – уровень сигнала 1)*1000/уровень сигнала 1, где: уровень сигнала 1 – до внесения BDNF, а уровень сигнала 2 – после внесения BDNF; * – статистическая значимость различий по отношению к контролю (среднеквадратичные отклонения выборок не перекрываются).

Notes: Surface plasmon resonance data. The level of interaction between BDNF and TrkB was determined by changing the biosensor signal before and after neurotrophin injection. The data are presented in the form of two-dimensional averages and standard deviations.

¹ – For the convenience of intergroup comparisons, the change in signal level after injection of BDNF was normalized using the following formula: (signal level 2 – signal level 1)*1000/signal level 1, where signal level 1 is before the introduction of BDNF, and signal level 2 is after the introduction of BDNF; * – the statistical significance of the differences in relation to the control (the standard deviations of the samples do not overlap).

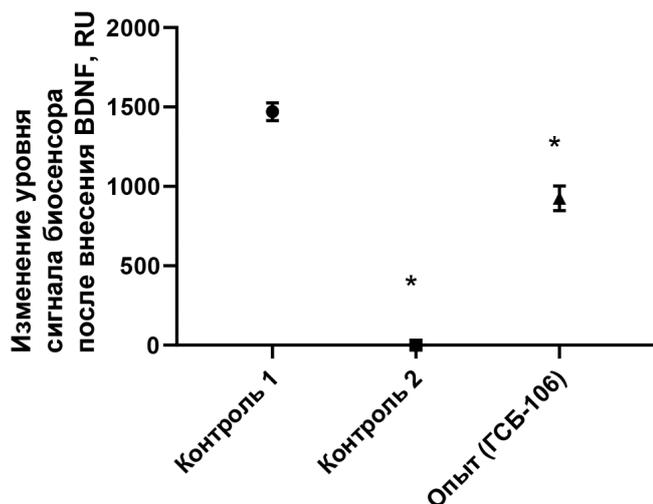


Рис. 3. Предварительная инкубация TrkB рецепторов с дипептидным миметиком BDNF ГСБ-106 ухудшает взаимодействие BDNF с TrkB

Примечания: Данные поверхностного плазмонного резонанса. Уровень взаимодействия BDNF с TrkB определяли по изменению сигнала биосенсора до и после инъекции нейротрофина.

Данные представлены в виде средних по двум измерениям и среднеквадратичных отклонений.

1 – Для удобства межгрупповых сравнений изменение уровня сигнала после инъекции BDNF нормализовали с использованием следующей формулы: $(\text{уровень сигнала 2} - \text{уровень сигнала 1}) \cdot 1000 / \text{уровень сигнала 1}$, где уровень сигнала 1 – до внесения BDNF, а уровень сигнала 2 – после внесения BDNF; * – статистическая значимость различий по отношению к контролю (среднеквадратичные отклонения выборок не перекрываются).

Fig. 3. Preincubation of TrkB receptors with the dipeptide mimetic BDNF GSB-106 worsens the interaction of BDNF with TrkB

Notes: Surface plasmon resonance data. The level of interaction between BDNF and TrkB was determined by changing the biosensor signal before and after neurotrophin injection.

The data are presented in the form of two-dimensional averages and standard deviations.

1 – For the convenience of intergroup comparisons, the change in signal level after injection of BDNF was normalized using the following formula: $(\text{signal level 2} - \text{signal level 1}) \cdot 1000 / \text{signal level 1}$, where signal level 1 is before the introduction of BDNF, and signal level 2 is after the introduction of BDNF; * – the statistical significance of the differences in relation to the control (the standard deviations of the samples do not overlap).

TrkB рецептор был предварительно проинкубирован с ГСБ-106, в этом случае увеличение уровня сигнала биосенсора при инъекции раствора 360 нМ BDNF (940 RU) было статистически значимо ниже, чем в контроле 1 (1330 RU) (см. табл. 1, рис. 3). Таким образом, предварительная инкубация рецептора с ГСБ-106 приводила к статистически значимому снижению на 30 % уровня взаимодействия между BDNF и TrkB, что указывает на возможность непосредственного взаимодействия миметика BDNF ГСБ-106 с рецептором.

Заключение / Conclusion

В результате исследования методом поверхностного плазмонного резонанса установлено, что предварительная инкубация TrkB с ГСБ-106 приводит к статистически значимому снижению сигнала оптического биосенсора при взаимодействии BDNF с TrkB, что свидетельствует о возможности прямого взаимодействия ГСБ-106 с TrkB.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ/ ADDITIONAL INFORMATION

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

Acknowledgements. The work was performed using the equipment of the CCP «Human Proteome» of the V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Проект № 18-15-00381).

Financing. The work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 18-15-00381).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Тарасюк Алексей Валерьевич

e-mail: tarasiuk86@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>

SPIN-код: 9670-2415

с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Мезентцев Юрий Владимирович

e-mail: yu.mezentsev@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9932-515X>

SPIN-код: 1917-3269

к. б. н., с. н. с. лаборатории межмолекулярных взаимодействий ИБМХ, Москва, Российская Федерация

Tarasiuk Aleksey V.

e-mail: tarasiuk86@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>

SPIN code: 9670-2415

Senior Researcher of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Mezentsev Yuri V.

e-mail: yu.mezentsev@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9932-515X>

SPIN code: 1917-3269

PhD, Cand. Sci. Biology, Senior Researcher of the laboratory of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russian Federation

Гнеденко Оксана Валентиновна

e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7426-9235>

к. б. н., с. н. с. лаборатории межмолекулярных взаимодействий ИБМХ, Москва, Российская Федерация

Поварнина Полина Юрьевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN-код: 5498-6724

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Иванов Алексей Сергеевич

e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7022-6748>

SPIN-код: 6456-4643

д. б. н., заведующий лабораторией межмолекулярных взаимодействий ИБМХ, Москва, Российская Федерация

Gnedenko Oksana V.

e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7426-9235>

PhD, Cand. Sci. Biology, Senior Researcher of the laboratory of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russian Federation

Povarnina Polina Yu.

Corresponding author

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN code: 5498-6724

PhD, Cand. Sci. Biology, Senior research scientist of the of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Ivanov Alexey S.

e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7022-6748>

SPIN code: 6456-4643

PhD, Cand. Sci. Biology, Head of the laboratory of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russia of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Skaper SD. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2018;1727:1–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-7571-6_1.

2. Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, Micera A. Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(3):294–303. DOI: 10.2174/1570159x13666150403231920.

3. Cai J, Hua F, Yuan L, et al. Potential therapeutic effects of neurotrophins for acute and chronic neurological diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014:601084. DOI: 10.1155/2014/601084.

4. Castrén E. Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;220:461–479. DOI: 10.1007/978-3-642-45106-5_17.

5. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В. и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия.* 2012;38(3):280–290. [Gudasheva TA, Tarasiuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2012;38(3):280–290. (In Russ).] DOI: 10.1134/s1068162012030053.

6. Gudasheva TA, Povarnina P, Logvinov IO, et al. Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:3545–3553. DOI: 10.2147/DDDT.S118768.

7. Gudasheva TA, Povarnina P, Tarasiuk AV, Seredenin SB. The Low Molecular Weight Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetics with Antidepressant-like Activity. *Curr Pharm Des.* 2019;25(6):729–737. DOI: 10.2174/1381612825666190329122852.

8. Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. и др. Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013;155(3):319–322. [Logvinov IO, Antipova TA, Gudasheva TA, et al. Neuroprotective effects of dipeptide analogue of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 *in vitro* experiments. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2013;155(3):319–322. (In Russ).]

9. Gudasheva TA, Povarnina PY, Tarasiuk AV, Seredenin SB. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties. *Med Res Rev.* 2021;41(5):2746–2774. DOI: 10.1002/med.21721.

10. Поварнина П.Ю., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Середин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении. *Acta Naturae.* 2018;10(3(38)):88–92. [Povarnina PYu, Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. Antidepressant Effect of an Orally Administered Dipeptide Mimetic of the Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Acta Naturae.* 2018;10(3(38)):88–92. (In Russ).]

11. Межлумян А.Г., Таллерова А.В., Поварнина П.Ю., Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Гудашева Т.А. Скрининговое изучение эффектов миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора на экспериментальной модели депрессии. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2020;(1):11–17. [Mezhlumyan AG, Tallerova AV, Povarnina PYu, Sazonova NM, Tarasiuk AV, Gudasheva TA. Screening study of nerve growth factor's and brain-derived neurotrophic factor's mimetics effects at the experimental depression model. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2020;(1):11–17. (In Russ).] DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-11-17.

12. Поварнина П.Ю., Таллерова А.В., Межлумян А.Г. и др. Антидепрессивная активность димерного дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 при однократном пероральном введении на модели социального стресса у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2020;83(4):3–7. [Povarnina PYu, Tallerova AV, Mezhlumyan AG, et al. Dimeric dipeptide bdnf mimetic GSB-106 exhibits antidepressant-like activity upon single oral administration in mice under social stress model conditions. *Éksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya.* 2020;83(4):3–7. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-4-3-7.

13. Gudasheva TA, Tallerova AV, Mezhlumyan AG, et al. Low-molecular weight bdnf mimetic, dimeric dipeptide GSB-106, reverses depressive symptoms in mouse chronic social defeat stress. *Biomolecules.* 2021;11(2):252. DOI: 10.3390/biom11020252.

14. Liu X, Obianyo O, Chan CB, et al. Biochemical and biophysical investigation of the brain-derived neurotrophic factor mimetic 7,8-dihydroxyflavone in the binding and activation of the TrkB receptor. *J Biol Chem.* 2014;289(40):27571–27584. DOI: 10.1074/jbc.M114.562561.

15. Fobian K, Owczarek S, Budtz C, et al. Peptides derived from the solvent-exposed loops 3 and 4 of BDNF bind TrkB and p75(NTR) receptors and stimulate neurite outgrowth and survival. *J Neurosci Res.* 2010;88(6):1170–1181. DOI: 10.1002/JNR.22285.