

УДК 577.112.6:615.214.31

ДИПЕПТИДНЫЕ МИМЕТИКИ ОТДЕЛЬНЫХ ПЕТЕЛЬ NGF И BDNF АКТИВИРУЮТ PLC- γ 1

© 2020 г. член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева^{1,*}, И. О. Логвинов¹, С. В. Николаев¹, Т. А. Антипова¹, П. Ю. Поварнина¹, академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 20.04.2020 г.
После доработки 23.04.2020 г.
Принято к публикации 23.04.2020 г.

Ранее нами были сконструированы и синтезированы дипептидные миметики отдельных петель фактора роста нервов (NGF) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF). Было установлено, что они активируют соответствующие тирозинкиназные (Trk) рецепторы и имеют разную картину активации пострецепторных сигнальных путей PI3K/AKT и MAPK/ERK в экспериментах *in vitro*. В настоящем исследовании на клетках HT-22 показано, что все эти соединения активируют каскад фосфолипазы C- γ 1 (PLC- γ 1).

Ключевые слова: BDNF, NGF, дипептидные миметики, PI3K/AKT, MAPK/ERK, PLC- γ 1

DOI: 10.31857/S2686738920050133

Нейротрофины это группа близкородственных белков из семейства ростовых факторов, которые регулируют формирование и важнейшие функции центральной нервной системы, включая клеточную миграцию, рост нейритов, синаптогенез, выживаемость и гибель клеток, нейрональную трансмиссию и синаптическую пластичность [1–3].

Связываясь с тирозинкиназными (Trk) рецепторами, нейротрофины вызывают последовательно их гомодимеризацию, аутофосфорилирование и запуск пострецепторных сигнальных путей – PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC- γ 1 [4, 5]. Имеются данные в пользу ключевой роли в активации MAPK/ERK и PI3K/AKT фосфорилирования Tug490 (нумерация по hTrkA) и последующего рекрутирования адаптерных белков Shc и Frs 2 [4]. Активация пути PLC- γ 1 инициируется непосредственным связыванием самой фосфолипазы с фосфорилированным Tug783.

Нейротрофины представляют собой гомодимерные белки, каждый мономер которых имеет 4 выступающие наружу петли [6, 7]. В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова была высказана гипотеза о том, что разные петлеобразные структуры нейротрофинов отвечают за их разные биологические функции, по-разному активируя пострецепторные сигнальные пути [8]. Для провер-

ки этой гипотезы были получены миметики отдельных петель нейротрофинов, фактора роста нервов (NGF) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF): для 1-й и 4-й петель NGF ГК-6 и ГК-2 [8]; для 1, 2 и 4-й петель BDNF ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 [9] соответственно (см. табл. 1). [Патент РФ №2410392, 2010; Патент США US 9,683,014 B2, 2017; Патент Европейского патентного ведомства EP 2397488, 2019; Патент КНР CN 102365294 B, 2016]. При конструировании сохраняли наиболее экспонированный дипептидный фрагмент бета-изгибов петель, предшествующий аминокислотный остаток заменяли его биоизостером. Для воспроизводства димерной структуры нейротрофина проводили димеризацию по С-концу с помощью олигометиленадиамидного спейсера.

С использованием Вестерн-блот анализа на культуре immortalized клеток гиппокампа мыши HT-22 было показано, что все полученные нами дипептидные миметики NGF и BDNF активируют соответственно TrkA и TrkB рецепторы [10, 11]. При этом дипептиды, в соответствии с выдвинутой гипотезой, обладали разными паттернами активации пострецепторных путей трансдукции сигнала, PI3K/AKT и MAPK/ERK (табл. 1) и разной фармакологической активностью. Миметик 4-й петли NGF (ГК-2) и миметик 1-й петли BDNF (ГСБ-214) активировали только AKT, а миметик 2-й петли BDNF (ГТС-201) – ERK. Миметики 1-й петли NGF (ГК-6) и 4-й петли BDNF (ГСБ-106) активировали оба пути. Все миметики, активирующие AKT, обладали нейропротектор-

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова, Москва, Россия

*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Таблица 1. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF обладают разными паттернами активации PI3K/АКТ и MAPK/ERK [10, 11]

| Активация сигнальных каскадов Trk рецепторов | Миметики | | | | |
|--|----------|---------|---------|---------|---------|
| | NGF | | BDNF | | |
| | 1 петля | 4 петля | 1 петля | 2 петля | 4 петля |
| | ГК-6 | ГК-2 | ГСБ-214 | ГТС-201 | ГСБ-106 |
| PI3K/АКТ | + | + | + | – | + |
| MAPK/ERK | + | – | – | + | + |

ГК-6, гексаметилендиамид бис(N-аминогексаноил-глицил-L-лизина);
 ГК-2, гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина);
 ГСБ-214, гептаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-метионил-L-серина);
 ГТС-201, гексаметилендиамид бис(N-гексаноил-L-серил-L-лизина);
 ГСБ-106, гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)

ной и антидиабетической активностью. Миметики, активирующие ERK, модулировали болевую чувствительность. Миметики, активирующие оба пути, обладали антидепрессивной активностью [12].

Для дальнейшего изучения влияния петлеобразных структур нейротрофинов на пострецепторные сигнальные пути в настоящей работе нами исследовано влияние дипептидных миметиков отдельных петель NGF и BDNF на

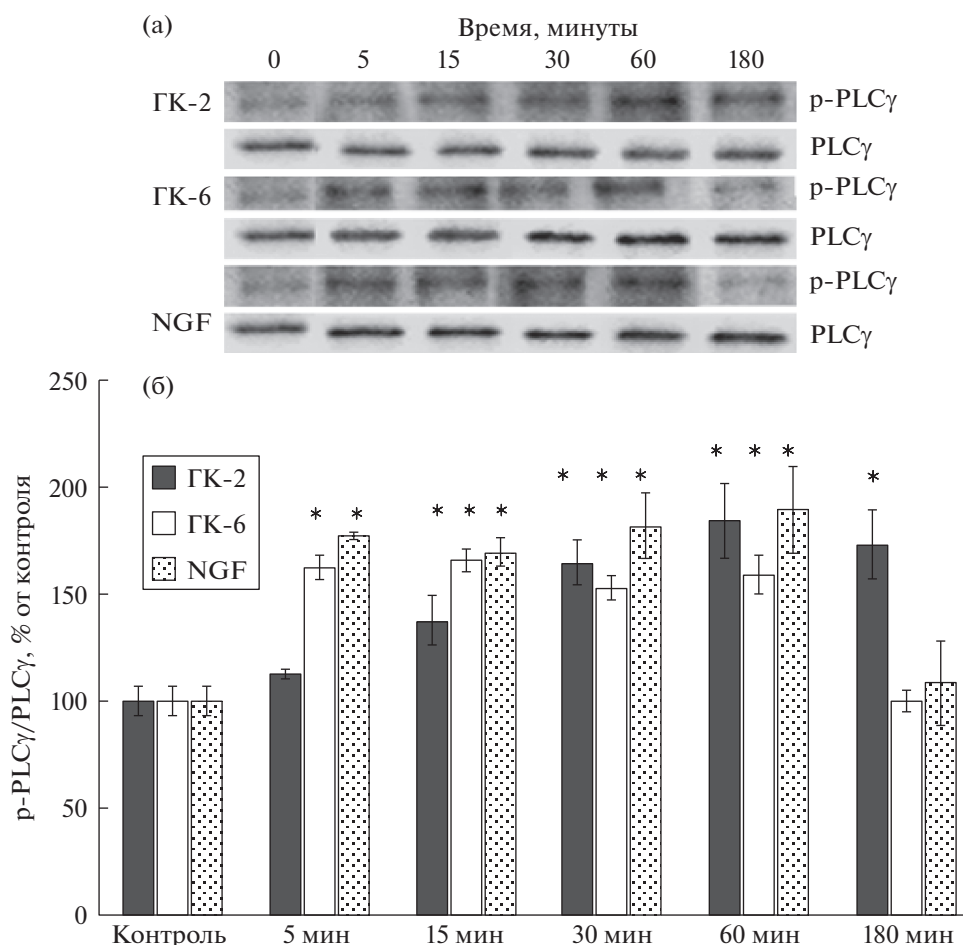


Рис. 1. Влияние NGF (100 нг/мл), ГК-6 (10^{-6} М) и ГК-2 (10^{-8} М) на фосфорилирование PLC- γ 1 в культуре гиппокампальных нейронов НТ-22. (а) Репрезентативные Вестерн-блоты белка p-PLC γ (Tyr783) и PLC γ . (б) Результаты денситометрического анализа в % от контроля (\pm стандартное отклонение). PLC γ = общая PLC γ . Представленные данные являются средними значениями из трех независимых экспериментов. * – $p \leq 0.05$ относительно контроля (критерий Манна–Уитни).

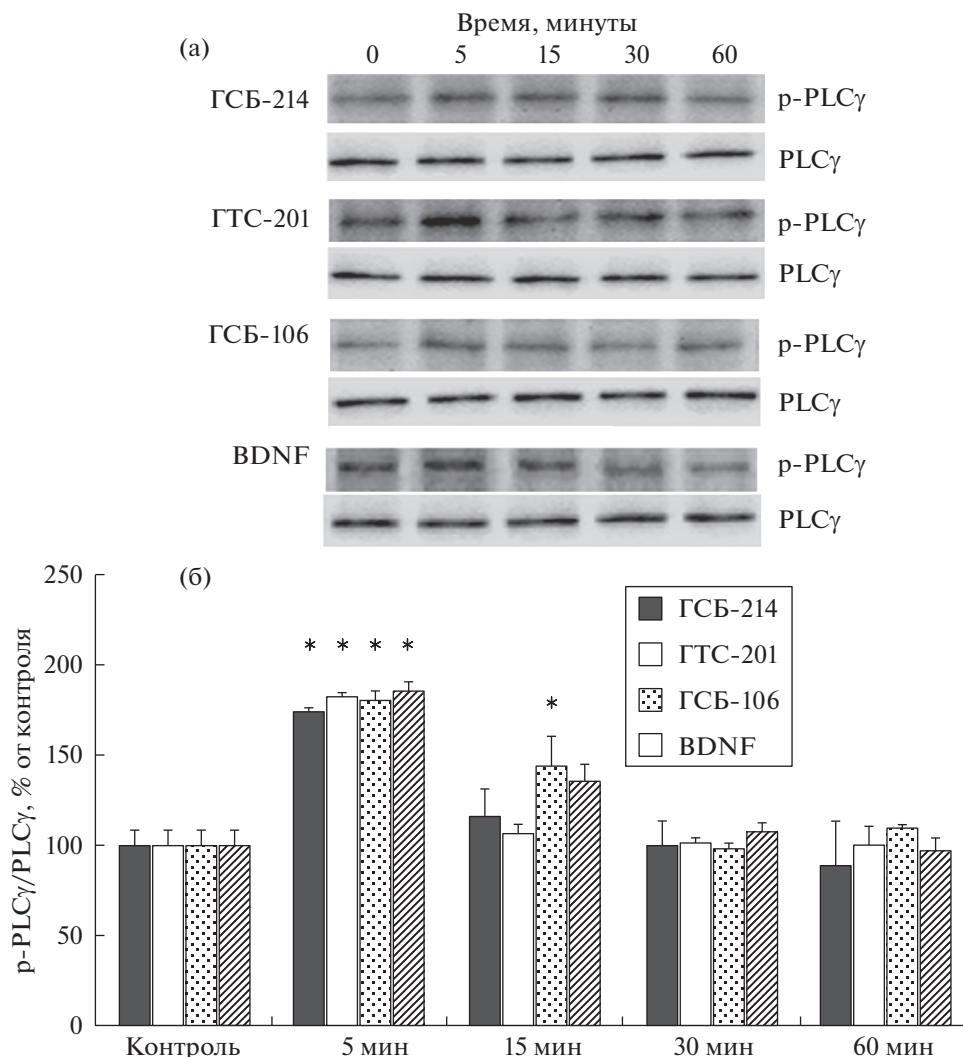


Рис. 2. Влияние BDNF, ГСБ-214 (10^{-6} М), ГТС-201 (10^{-7} М) и ГСБ-106 (10^{-6} М) на фосфорилирование PLC-γ1 в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22. (а) Репрезентативные Вестерн-блоты белка p-PLCγ (Tyr783) и PLCγ. (б) Результаты денситометрического анализа в % от контроля (\pm стандартное отклонение). PLCγ = общая PLCγ. Представленные данные являются средними значениями из трех независимых экспериментов. * – $p \leq 0.05$ относительно контроля (критерий Манна–Уитни).

активацию третьего пострецепторного сигнального пути Trk рецепторов, PLC-γ1.

Методом Вестерн-блоттинга определено фосфорилирование PLC-γ1 после внесения миметиков NGF дипептидов ГК-6 (10^{-6} М) и ГК-2 (10^{-8} М) и миметиков BDNF дипептидов ГСБ-214 (10^{-6} М), ГТС-201 (10^{-7} М), ГСБ-106 (10^{-6} М) в культуру гиппокампальных клеток линии НТ-22. Использованы моноклональные антитела к фосфорилированной по Tyr783 PLC-γ1 и поликлональные – к общей фосфолипазе PLC-γ1. Пробы отбирались через 5, 15, 30, 60, 180 мин. Временные интервалы выбраны на основании данных по фосфорилированию Trk, АКТ и ERK в присутствии дипептидных миметиков [10, 11]. Концентрации дипепти-

дов соответствовали наиболее активным при изучении нейропротективных эффектов *in vitro*. В качестве положительных контролей использовали NGF и BDNF в концентрации 10^{-9} М.

Оба миметика NGF, подобно полноразмерному нейротрофину, активировали PLC-γ1 (рис. 1). Статистически значимое увеличение фосфорилирования PLC-γ1 наблюдалось через 5, 15, 30, 60 мин, а для ГК-2 от 15 до 180 мин после внесения в культуральную среду. Иммунореактивность к фосфорилированной PLC-γ1 была повышена в обработанных нейронах по сравнению с контролем через 5 мин после внесения NGF ($177 \pm 2\%$, $p = 0.03$), ГК-6 ($163 \pm 5\%$, $p = 0.02$); через 15 мин после внесения NGF ($170 \pm 7\%$, $p = 0.03$), ГК-2

($138 \pm 11\%$, $p = 0.03$), ГК-6 ($166 \pm 5\%$, $p = 0.02$); через 30 мин после внесения NGF ($182 \pm 15\%$, $p = 0.03$), ГК-2 ($165 \pm 11\%$, $p = 0.02$), ГК-6 ($153 \pm 6\%$, $p = 0.03$); через 60 мин после внесения NGF ($190 \pm 20\%$, $p = 0.03$), ГК-2 ($185 \pm 17\%$, $p = 0.03$), ГК-6 ($159 \pm 9\%$, $p = 0.03$); через 180 мин после внесения ГК-2 ($173 \pm 16\%$, $p = 0.03$) в культуральную среду.

Исследованные миметики BDNF, как и нейротрофин, статистически значимо увеличивали фосфорилирование PLC- γ 1 (рис. 2).

Уровень фосфорилированной PLC- γ 1 по сравнению с контролем значительно увеличивался через 5 мин после добавления в инкубационную среду BDNF ($185.5 \pm 5.3\%$, $p = 0.03$), ГСБ-214 ($174.3 \pm 1.6\%$, $p = 0.03$), ГТС-201 ($183.1 \pm 1.2\%$, $p = 0.03$), ГСБ-106 ($180.4 \pm 5.2\%$, $p = 0.03$). Через 15 мин достоверное увеличение фосфорилирования PLC- γ 1 наблюдалось только у ГСБ-106 ($144.2 \pm 16.7\%$, $p = 0.03$). В остальных временных точках статистически значимых различий фосфорилирования PLC- γ 1 по сравнению с контролем не обнаружено.

Следует отметить, что активация PLC- γ 1 как дипептидными миметиками, так и полноразмерными белками наступает быстро, за 5 мин и менее (не показано), при этом активированное под действием NGF состояние сохраняется дольше, чем под действием BDNF (см. рис. 1 и 2), что соответствует литературным данным [13–15].

Таким образом, дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC- γ 1 независимо от паттерна активации АКТ и МАРК. Это предположительно можно объяснить тем, что PLC- γ 1 – сигналинг инициируется благодаря непосредственному связыванию самого энзима с фосфорилированным Туг783 (нумерация по hTrkA) тирозинкиназного рецептора, и эта инициация не зависит от других белков. В то же время активация АКТ и МАРК идет через ряд стадий, начиная с набора активированным Туг490 адаптерных белков. Последнее допускает формирование различий пострецепторных эффектов соединений, имитирующих различные участки нейротрофинов, на этапе сопряжения фосфорилирования тирозина рецептора и связывания адаптерных белков. Подтверждение этой гипотезы требует дополнительных экспериментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *LeWin G.R., Barde Y.-A.* Physiology of neurotrophins // *Annu Rev Neurosci.* 1996. V. 19. P. 289–317.
2. *Kaplan D.R., Miller F.D.* Neurotrophin Signal Transduction in the Nervous System // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. P. 381–391.
3. *Segal R.A.* Selectivity in Neurotrophin Signaling: Theme and Variations // *Annu. Rev. Neurosci.* 2003. V. 26. P. 299–330.
4. *Huang E.J., Reichardt L.F.* Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 609–642.
5. *Reichardt L.F.* Neurotrophin-regulated signalling pathways // *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* 2006. V. 361. № 1473. P. 1545–1564.
6. *McDonald N.Q., Lapatto R., Murray-Rust J., et al.* New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor // *Nature.* 1991. V. 354. P. 411–414.
7. *Robinson R.C., Radziejewski C., Spraggon G., et al.* The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site // *Protein Sci.* 1999 V. 8. P. 2589–2597.
8. *Gudasheva T.A., Antipova T.A., Seredenin S.B.* Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2010. V. 434. P. 262–265.
9. *Gudasheva T.A., Tarasyuk A.V., Pomogaibo S.V., et al.* Design and synthesis of dipeptide mimetics of the brain-derived neurotrophic factor // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2012. V. 38. № 3. P. 243–252.
10. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A. et al.* Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction // *J. Biomed. Sci.* 2015. V. 22. № 5. P. 106.
11. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Logvinov I.O. 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. V. 10. P. 3545–3553.
12. *Gudasheva T.A., Logvinov I.O., Povarnina P.Y., et al.* Analysis of dependence of antidepressant properties of TrkB receptor ligands on MAP-kinase pathway activation // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015. V. 460. P. 20–22.
13. *Widmer H.R., Kaplan D.R., Rabin S.J., et al.* Rapid phosphorylation of phospholipase C γ 1 by brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons // *J. Neurochem.* 1993. V. 60. P. 2111–2123.
14. *Vetter M.L., Martin-Zanga D., Parada L.F., et al.* Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 5650–5654.
15. *York R.D., Molliver D.C., Grewal S.S., et al.* Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1 // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P.8069–8083.

DIPEPTIDE MIMETICS OF DIFFERENT NGF AND BDNF LOOPS ACTIVATE PLC- γ 1

Corresponding Member of the RAS T. A. Gudasheva^{a,#}, I. O. Logvinov^a, S. V. Nikolaev^a, T. A. Antipova^a,
P. Yu. Povarnina^a, and Academician of the RAS S. B. Seredenin^a

^a Federal State Budgetary Institution "Research Zakusov Institute of Pharmacology" Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Previously, we designed and synthesized dipeptide mimetics of NGF and BDNF individual loops. It has been shown that these mimetics activate the corresponding Trk receptors and have a different patterns of the PI3K/AKT and MAPK/ERK post-receptor signaling pathways activation *in vitro*. In the present study it was shown on HT-22 cells that all of these compounds activate the PLC- γ 1 cascade.

Keywords: BDNF, NGF, dipeptide mimetics, PI3K/AKT, MAPK/ERK, PLC- γ 1