

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ NGF ГК-2 СВЯЗАНО С АКТИВАЦИЕЙ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP32 И HSP70 И УВЕЛИЧЕНИЕМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ TrkA

Т. А. Антипова¹

В экспериментах *in vitro* показано, что новый миметик фактора роста нервов (NGF) димерный замещенный дипептид ГК-2 в концентрации 10^{-5} М и 10^{-8} М в иммортализованных клетках гиппокампа мыши линии HT-22 увеличивает синтез белков эндогенной системы защиты клетки из семейства белков теплового шока HSP32 и HSP70, а также вызывает увеличение фосфорилирования тирозинкиназы А-специфического нейротрофинового рецептора.

Ключевые слова: нейротрофины, NGF, ГК-2, HSP32, HSP70, p-TrkA

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе нейродегенеративных заболеваний выявлено изменение ряда биохимических процессов, в том числе снижение содержания нейротрофинов, таких как NGF и BDNF, являющихся эндогенными нейропротекторами [2, 3, 9, 16]. Заместительная терапия нейротрофинами трудно выполнима, поскольку при системном введении они практически не проникают через гематоэнцефалический барьер. Попытки использовать интравентрикулярную, субарахноидальную доставку сопровождались иммунными реакциями [13]. Поэтому актуальным является поиск низкомолекулярных аналогов нейротрофинов. В НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН был синтезирован новый низкомолекулярный миметик 4-й петли NGF — ГК-2, представляющий замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис-(N-сукцинил-глутамил-лизина) [Середенин С. Б., Гудашева Т. А. Заявка на изобретение рег. №2009105176, приоритет от 16.02.2009]. Ранее нами показано, что в экспериментах *in vitro* ГК-2 обладает способностью защищать нейроны от действия различных повреждающих агентов. Исследование молекулярных механизмов нейропротекторного действия данного пептида являлось задачей данной работы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на культуре нейронов линии HT-22 (иммортализованные клетки гиппокампа мыши). Пептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 синтезирован в отделе химии НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. ГК-2 вносили в конечных концентрациях 10^{-5} М и 10^{-8} М для оценки содержания белков HSP70 и HSP32 за 24 ч до лизиса клеток. Влияние на процесс фосфорилирования TrkA оценивали через 1 и 2 мин после добавления пептида в

культуральную среду. В качестве положительного контроля использовали NGF в концентрации 100 нг/мл.

Влияние ГК-2 на процесс фосфорилирования тирозинкиназы А (TrkA) и содержание HSP32 и HSP70 в клетках HT-22 определяли методом Вестерн-блот анализа [10] с использованием первых моноклональных антител против фосфорилированной формы тирозинкиназы А — p-TrkA (Santa Cruz Biotechnology) в разведении 1:1000, поликлональных антител к белку HSP32 (Stressgen) при разведении 1:1000 и моноклональных антител к HSP70 (Santa Cruz Biotechnology) в таком же разведении через 24 ч после внесения пептида в течение 1 ч. Затем после отмывки блоты инкубировали в присутствии вторых антител (Santa Cruz Biotechnology), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:2000) в течение 1 ч. Детектирование p-TrkA, HSP70 и HSP32 осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Santa Cruz Biotechnology) на пленку фирмы Kodak. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические эффекты NGF реализуются через два различных рецептора: Trk A с тирозинкиназной активностью [14] и нейротрофинового p75 рецептора [7]. Тирозинкиназные рецепторы, обладающие высоким сродством к нейротрофинам, играют ведущую роль в процессах роста, развития и дифференцировки клеток, а также реализации нейропротекторных свойств нейротрофинов через основные биохимические пути, активация которых приводит к синтезу различных белков, а также к их последующим модификациям и транслокациям, обуславливающим нейропротекторный эффект нейротрофинов [14].

Связывание NGF с экстраклеточным доменом его Trk A рецептора вызывает изменение конформации рецептора. Далее сигнал передается на C-концевой цитоплазматический домен по трансмембранному домену с активацией цитоплазматического домена. Протеинкиназа переносит гаммафосфат от АТФ на бе-

¹ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

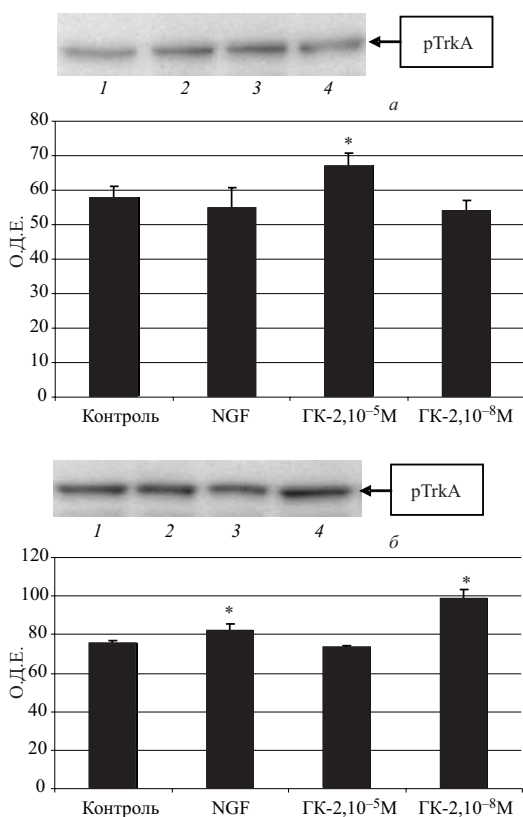


Рис. 1. Влияние ГК-2 на фосфорилирование TrkA в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22, 1 мин (а) и 2 мин (б) экспозиции (оригинальный Вестерн-блот и результаты его денситометрии). Дорожки: 1 — контроль, 2 — NGF (100 нг/мл), 3 — ГК-2 (10⁻⁵ М), 4 — ГК-2 (10⁻⁸ М). Отличия от контроля достоверны: * — $p \leq 0,05$. О.Д.Е. — относительные денситометрические единицы.

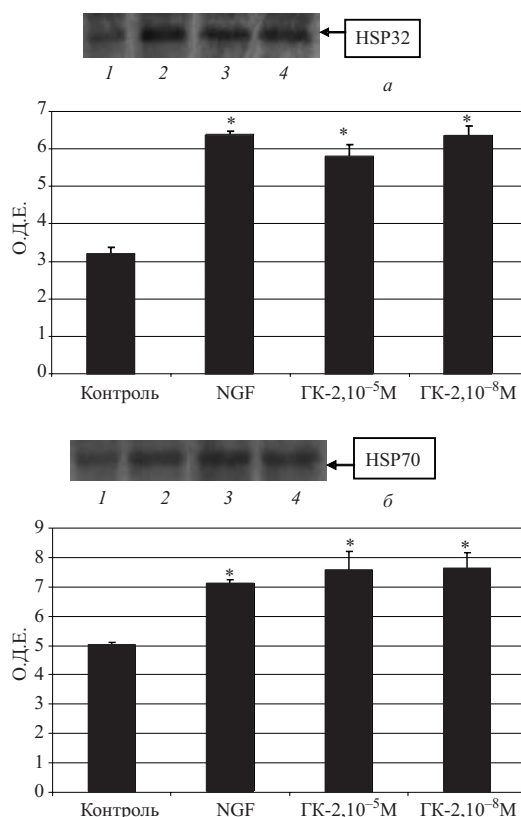


Рис. 2. Влияние ГК-2 на накопление HSP32 (а) и HSP70 (б) в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 (оригинальный Вестерн-блот и результаты его денситометрии). Дорожки: 1 — контроль, 2 — NGF (100 нг/мл), 3 — ГК-2 (10⁻⁵ М), 4 — ГК-2 (10⁻⁸ М). Отличия от контроля достоверны: * — $p \leq 0,05$. О.Д.Е. — относительные денситометрические единицы.

лок-субстрат. Таким образом фосфорилируются тирозиновые остатки белка-субстрата, который взаимодействует с, или лежит вблизи, цитоплазматического домена Trk рецептора. Если соединение (в данном случае пептид) является лигандом рецептора, содержание фосфорилированной формы Trk A увеличивается. В связи с этим первым этапом работы стало исследование влияния пептида ГК-2 на процесс фосфорилирования тирозинкиназы А (TrkA) в культуре нейронов линии HT-22 с использованием метода Вестерн-блот анализа. Пептид добавляли в среду культивирования в конечных концентрациях 10⁻⁵ М и 10⁻⁸ М. Клетки лизировали через 1 и 2 мин после внесения ГК-2. Время экспозиции клеток пептидом было подобрано экспериментальным способом, учитывая данные о достаточно быстром (от нескольких секунд) взаимодействии нейротрофинов с их рецепторами [12]. В качестве положительного контроля использовали фактор роста нервов NGF в конечной концентрации 100 нг/мл [4].

На первой минуте экспозиции фосфорилирование тирозинкиназы наблюдается только при внесении пептида ГК-2 (10⁻⁵ М), тогда как уровень фосфорилирования под действием NGF не отличается от контрольного

(рис. 1, а). Через 2 мин экспозиции происходит увеличение фосфорилирования тирозинкиназы А при внесении пептида ГК-2 в конечной концентрации 10⁻⁸ М и NGF. Уровень фосфорилирования под действием ГК-2 в конечной концентрации 10⁻⁵ М не отличается от контрольного (рис. 1, б). Таким образом, результаты этого эксперимента показывают, что пептид ГК-2 является так же, как и NGF, лигандом тирозинкиназного рецептора.

Из литературных данных известно, что фактор роста нервов NGF стимулирует синтез цитопротекторного белка Hsp32, или гемоксигеназы-1 и Hsp70, которые защищают нейроны от гибели, обусловленной окислительным стрессом, и обеспечивают его нейропротекторное действие [8, 15]. Проверка гипотезы о том, что в механизм нейропротекторного действия ГК-2 включена активация синтеза нейропротекторных белков Hsp32 и Hsp70, явилась следующим этапом исследований.

На рис. 2, а и б представлены результаты Вестерн-блот анализа влияния ГК-2 в конечных концентрациях 10⁻⁵ М и 10⁻⁸ М на накопление HSP32 и HSP70 в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 (данные 3 независимых экспериментов). Пробы

анализировали через 24 ч после внесения пептидов. NGF достоверно увеличивал синтез данных белков. Пептид ГК-2 в обоих исследуемых конечных концентрациях вызывает накопление белков HSP70 и HSP32. Таким образом, нейропротекторное действие пептида ГК-2 может быть обусловлено активацией синтеза данных эндогенных нейропротекторных белков.

HSP70 является молекулярным шапероном, участвующим в ренатурации поврежденных белков [11]. Недавно было показано, что, благодаря своим шаперонным функциям, HSP70 может ингибировать образование фибрилл альфа-синуклеина при болезни Паркинсона и бета-амилоида при болезни Альцгеймера [5, 6], которые, наряду со снижением содержания нейротрофинов, являются важным звеном патогенеза данных нейродегенеративных заболеваний.

Система гемоксигеназы-1, или HSP32 является важной составляющей в защитном механизме клетки от стрессовых состояний. Нейропротекторный эффект данного белка обусловлен следующими механизмами: регуляцией уровня цГМФ и антиапоптотического белка bcl-2 в нейронах, ингибированием ядерной локализации апоптотического белка p53, увеличением антиоксидантного потенциала клетки путем снижения интенсивности перекисного окисления липидов, увеличением уровня белка ферритина, содержащего железо и обладающего антиоксидантными свойствами [17]. Роль гемоксигеназы-1 в развитии нейродегенеративных процессов является двоякой: с одной стороны она участвует во внутриклеточном катаболизме прооксидантной молекулы гема в антиоксидантные желчные пигменты и помогает сохранить окислительно-восстановительный потенциал нейронов, с другой — ее гиперэкспрессия вызывает накопление двухвалентного железа внутри клетки и повреждение митохондрий. Эти данные свидетельствуют о том, что HSP32 является потенциальным биологическим маркером нейродегенеративных процессов. Регуляция экспрессии этого белка является одним из подходов в лечении различных патологических состояний мозга [1, 18].

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что пептид ГК-2, обладающий нейропротекторными свойствами, имитирующий эффекты фактора роста нервов NGF, являющийся малой молекулой, способной преодолевать гематоэнцефалический барьер — перспективное соединение для фармакологиче-

ской разработки средства лечения нейродегенеративных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Установлены лигандные свойства ГК-2 к тирозинкиназному рецептору.
2. В механизм нейропротекторного действия ГК-2 вовлечена активация синтеза белков теплового шока HSP32 и HSP70.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Cuadrado and A. I. Rojo, *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 429 – 442 (2008).
2. D. Dawbarn and S. J. Allen, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **29**, 211 – 230 (2003).
3. G. Dechant, H. Neumann, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **513**, 1101 – 1014 (2002).
4. F. El-Ghissassi, S. Valsesia-Wittmann, N. Falette, et al., *Oncogene*, **21**(44), 6772 – 6778 (2002).
5. C. G. Evans, S. Wisen, J. E. Gestwicki, *J. Biol. Chem.*, **281**(44), 33182 – 33191 (2006).
6. C. Huang, H. Cheng, H. Zhou, et al., *J. Mol. Biol.*, **364**(3), 323 – 336 (2006).
7. F. S. Lee, A. H. Kim, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 281 – 286 (2001). Ира53
8. H. Liu, R. Nowak, W. Chao, K. D. Bloch, *J. Neurochem.*, **86**, 1553 – 1563 (2003).
9. P. L. Lorigados, F. N. Pavon, G. L. Alvarez, et al., *Brain Res.*, **952**, 122 – 127 (2002).
10. I. Yu. Malyshev, A. V. Malugin, L. Yu. Golubeva, T. A. Zenina, et al., *FEBS Lett.*, **391**, 21 – 23 (1996).
11. T. R. Morimoto, A. Tissieres, G. Georgopoulos, *Plainview*, N. Y. (1994).
12. T. Numakawa, H. Nakayama, S. Suzuki, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**(45), 41259 – 41269 (2003).
13. W. M. Pardridge, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **3**(12), 1753 – 1757 (2002).
14. S. J. Pollack, S. J. Harper, *Current Drug Targets-CNS and Neurological Disorder's*, **1**, 59 – 80 (2002). Ира 70
15. M. Salinas, R. Diaz, N. G. Abraham, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 13898 – 13904 (2003).
16. G. J. Siegel and N. B. Chauhan, *Brain Res. Rev.*, **33**, 199 – 227 (2000).
17. A. B. Vaandrager and H. R. deJonge, *Mol. Cell. Biochem.*, **157**, 23 – 30 (1996).
18. Y. Yuan, J. Z. Guo, Q. X. Zou, *Eur. J. Pharmacol.*, **586**, 100 – 105 (2008).

Поступила 22.06.10

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF LOW-MOLECULAR PEPTIDE MIMETIC (GK-2) OF NERVE GROWTH FACTOR IS RELATED TO ACTIVATED SYNTHESIS OF HEAT SHOCK PROTEINS (HSP32 AND HSP70) AND INCREASED PHOSPHORYLATION OF TRKA RECEPTOR

T. A. Antipova

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

Experiments *in vitro* showed that dimeric linear substituted dipeptide GK-2—a new mimetic of the nerve growth factor (NGF) — introduced in a concentration of 10^{-5} M and 10^{-8} M in the culture of immortalized murine hippocampal cell line HT-22 increases the synthesis of heat shock proteins HSP32 and HSP70 (neuroprotectors belonging to the endogenous system of cell protection) and stimulates tyrosine phosphorylation of TrkA receptor, which is specific for neurotrophins.

Key words: neurotrophins, NGF, GK-2, HSP32, HSP70, TrkA