



УДК 577.25

ПРЕДШЕСТВЕННИКИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И ИХ ПРОПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КАК МОДУЛЯТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЗРЕЛЫХ ФОРМ

© 2012 г. Л. М. Рафиева[#], А. В. Шубин, Е. В. Гасанов

Институт молекулярной генетики РАН, 123186 Москва, пл. академика Курчатова, 2

Поступила в редакцию 27.09.2011 г. Принята к печати 21.11.2011 г.

В обзоре рассмотрены проблемы созревания нейротрофических факторов, роль их предшественников (пронейротрофинов) и вклад удаляемых при созревании элементов (пропоследовательностей) в биологические функции данных факторов роста.

Ключевые слова: нейротрофины, пронейротрофины, нейротрофические факторы, пропоследовательность, фолдинг.

ВВЕДЕНИЕ. НЕЙРОТРОФИНЫ

Нейротрофины – семейство факторов роста, играющих ключевую роль в регуляции развития и функционирования центральной и периферической нервной системы. Они влияют на пролиферацию и дифференцировку нейрональных и глиальных клеток, необходимы для поддержания жизнеспособности и функционирования нейронов, обладают нейропротекторным действием, а также влияют на передачу и изменение синаптического сигнала (синаптическая пластичность).

До недавнего времени нейротрофины были описаны только для позвоночных [1]. Четыре нейротрофических фактора – NGF, BDNF, NT-3 и NT-4/5 – встречаются у млекопитающих, птиц и земноводных, а факторы NT-6 и NT-7 – у рыб. Но недавно появились данные об обнаружении первых нейротрофических факторов беспозвоночных [2–4]. Белки DNT1, Spatzle (spz) и DNT2/spz5, имеющие схожие с нейротрофинами функциональные и структурные признаки, были найдены у дрозофилы, а позднее и у других насекомых [4]. Также подобные нейротрофинам белки были обнаружены у моллюска *Lymnaea stagnalis* и морского ежа [2, 3, 5]. Таким образом, семейство нейротрофинов на сегодняшний день включает в себя более десяти белков и постоянно пополняется. Наиболее изученными из них являются нейротрофины позвоночных NGF, BDNF и NT-3.

В большинстве экспериментов по исследованию нейротрофических факторов были исполь-

зованы нейротрофины человека, мыши и крысы, уровень гомологии которых составляет более 90%. Поэтому большинство существующих в настоящее время данных о функционировании нейротрофинов представляет собой совокупность результатов, полученных при работе с этими тремя представителями класса млекопитающих, а все наблюдаемые на каждой из моделей эффекты автоматически подразумеваются у остальных.

Общей чертой всех нейротрофинов является то, что они синтезируются в клетке в виде протяженных предшественников – препронейротрофинов, имеющих в своем составе *N*-концевой сигнальный пептид, необходимый для внутриклеточного транспорта и последующей секреции нейротрофического фактора [6], пропоследовательность и последовательность зрелого нейротрофина, которая, как полагали долгое время, определяет весь спектр биологической активности данных факторов роста (рис. 1). Данные об активности предшественников нейротрофинов появились сравнительно недавно. Большинство существующих на сегодня данных по экспрессии и секреции факторов роста не учитывают форму секретируемого нейротрофина, поскольку оценка проводилась либо по уровню мРНК, в случае оценки экспрессии, либо с использованием антител к зрелому белку, при оценке экспрессии и секреции [7–12]. Часто такие антитела способны взаимодействовать как со зрелой, процессированной формой, так и с предшественником. Лишь в последние годы стали появляться данные, позволяющие судить об активности той или иной формы нейротрофических факторов по отдельности [13].

По современным представлениям, эффекты нейротрофических факторов реализуются через связывание с тремя типами клеточных рецепторов. К первому типу относятся высокоспецифичные

Сокращения: BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; NGF – фактор роста нервов; NT – нейротрофический фактор.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (499) 196-18-53; факс: +7 (499) 196-02-21; эл. почта: rafievalm@gmail.com).

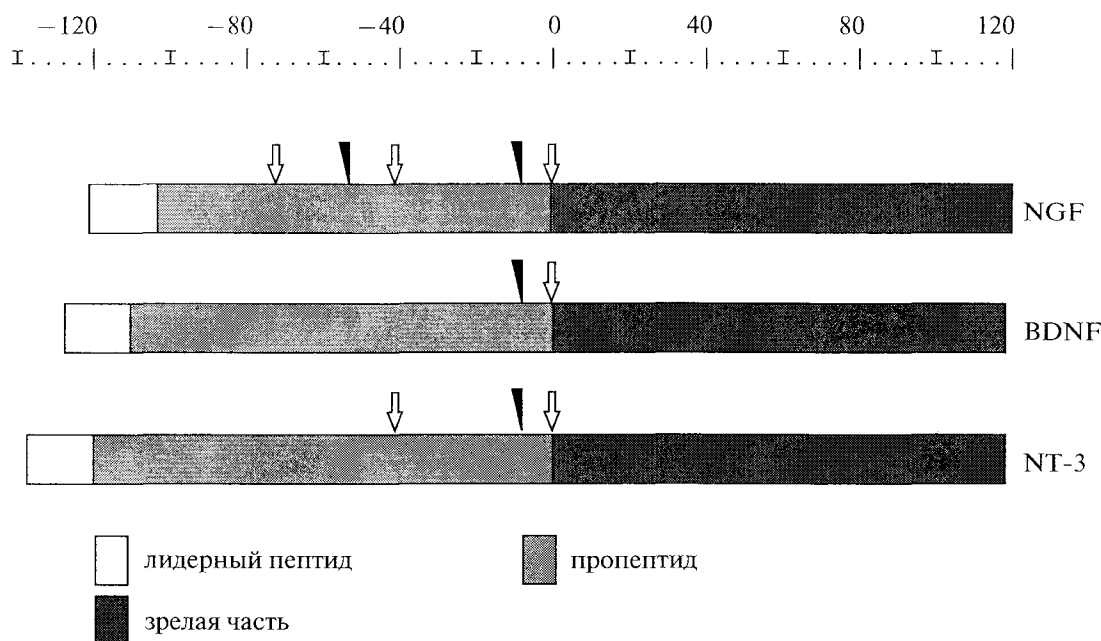


Рис. 1. Структурная организация предшественников нейротрофинов NGF, BDNF, NT-3: стрелками указаны сайты процессинга, черными треугольниками – сайты гликозилирования. За точку начала нумерации (+1) принят N-концевой остаток зрелого белка.

тирозинкиназные рецепторы Trk, ко второму – рецептор p75 и к третьему – рецептор сортилин. Биологические эффекты, в зависимости от того или иного лиганд-рецепторного взаимодействия, могут быть прямо противоположными – от повышения жизнеспособности клеток нервной ткани (взаимодействие зрелых нейротрофинов с рецепторами Trk или p75) [13–18] до индукции клеточной смерти (взаимодействие пронеуротрофинов одновременно с рецепторами сортилином и p75) [13, 19–21]. Таким образом, пронеуротрофины и зрелые белки способны оказывать противоположные эффекты на клетки, а процессинг в таком случае может служить своего рода механизмом регуляции функциональной активности нейротрофических факторов. Такой спектр активности нейротрофических факторов на клетки нервной системы делает их изучение интересным как с точки зрения молекулярной биологии, так и медицины.

В данном обзоре будет рассмотрен вклад пропептидов нейротрофических факторов в модификацию структуры и свойств данных факторов роста.

СТРУКТУРА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НЕЙРОТРОФИНОВ

На сегодняшний день для большого количества секреторных белков показано наличие пропоследовательности (чаще N-концевой) в составе изначально синтезирующегося предшественника. Пропептиды могут выполнять множество функций, которые так или иначе модулируют ак-

тивность зрелого белка: например, участвуя в фолдинге “зрелой” части предшественника, пропоследовательность несет шапероноподобные функции [22]. Чаще всего пропептиды проявляют ингибиторные свойства, а также принимают участие в секреции белка [23, 24]. Подобные свойства можно предполагать и в случае про-частей нейротрофических факторов.

Ген, кодирующий фактор роста нервов (NGF) человека, расположен на 1-й хромосоме и кодирует единственную изоформу данного белка [25]. Ген, кодирующий нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) человека, расположен на 11-й хромосоме и дает начало 18-ти альтернативно сплайсированным мРНК, отличающимся областью, кодирующей сигнальный пептид, и 5'-нетранслируемой частью [26]. Ген фактора NT-3 человека расположен на 12-й хромосоме и кодирует 2 изоформы нейротрофина, также отличающихся размером сигнальной последовательности. Таким образом, при экспрессии нейротрофических факторов всегда формируется единственная комбинация пропептида и зрелой части.

Аминокислотные последовательности зрелых, процессированных нейротрофинов NGF, BDNF и NT-3 характеризуются высокой гомологией – более 55%, тогда как уровень гомологии пропептидов соответствующих факторов значительно ниже: 20–25%. На основе большей дивергенции структуры можно предполагать и большие функциональные различия между про-частями различных нейротрофинов. Например, пропептиды содержат различное количество сайтов гликози-

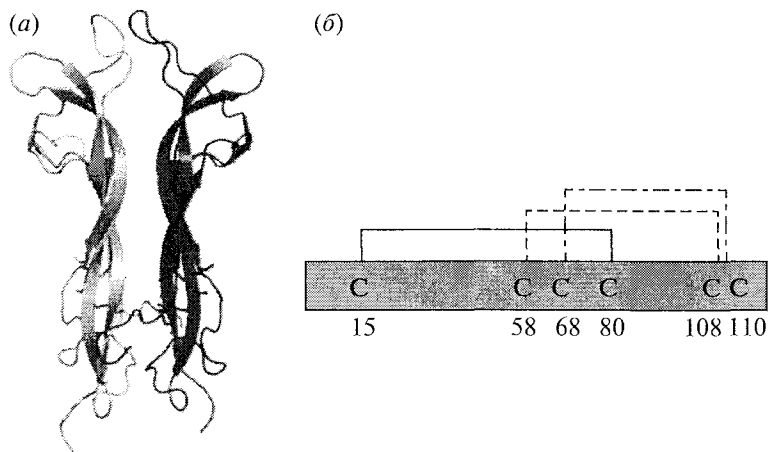


Рис. 2. Особенности пространственной структуры нейротрофических факторов: (а) Структура биологически активного NGF мыши: разными оттенками серого показаны два протомера в составе димера. (б) Порядок замыкания дисульфидных связей в молекуле зрелого нейротрофина NGF (протомера): буквами “С” обозначены остатки цистеина и указаны их номера в аминокислотной последовательности зрелого белка.

лирования: два — в составе пропоследовательности NGF, и по одному — у про-частей BDNF и NT-3 (рис. 1). Помимо этого, различия касаются содержания основных аминокислот и, следовательно, зарядов пропептидов. Пропептид NGF — самый основной по своему составу. Про-часть BDNF — единственная из всех, изоэлектрическая точка которой лежит в кислой области. Насыщение основными остатками определяет и различное количество возможных сайтов распознавания для воздействия специфических пропротеинконвертаз, или, как их еще называют, сайтов процессинга. Предшественник NGF содержит три таких сайта, про-NT-3 — два, а про-BDNF всего один, расположенный между пропептидом и зрелой частью (рис. 1).

Рентгеноструктурный анализ зрелых нейротрофинов показал, что эти белки имеют сходную пространственную организацию. Имеются также данные рентгеноструктурного анализа, позволяющие расшифровать структуры комплексов некоторых нейротрофинов с рецепторами [27–30]. Функционально активной формой нейротрофина является нековалентно связанный димер, который образован двумя протомерами, ориентированными “голова к голове” (рис. 2) [31, 32].

Несмотря на активные попытки, кристаллизовать предшественник нейротрофина на сегодняшний день так и не удалось, как предполагают, ввиду высокой подвижности структуры его пропоследовательности [33]. Известны данные биофизических исследований (КД-спектроскопия, метод протон-дейтериевого обмена) изолированного пропептида NGF человека, а также предшественника этого нейротрофина [33–35], показывающие неупорядоченность структуры пропептида в отсутствие зрелой части. Однако во всех этих экспериментах в качестве экспрессион-

ной системы использовалась культура клеток *E. coli*, из чего следует, что область пропоследовательности во всех случаях не была гликозилирована, что не полностью соответствует структуре, существующей в природе.

Исследования, направленные на изучение олигомерной организации пропептида нейротрофина человека (аналитическое ультрацентрифугирование, кросс-сшивка глутаровым альдегидом), показали, что этот пептид в условиях экспериментов существует в форме мономера [34, 35]. В то же время, имеющиеся на сегодняшний день данные, полученные сходными методами, позволяют утверждать, что нативный про-NGF, также как и зрелый фактор, существует в растворе в димерной форме [36, 37].

Хотя пространственная организация ни одного из предшественников нейротрофинов сегодня не известна, имеются результаты исследований раствора предшественника нейротрофина NGF мыши методом малого углового рассеяния рентгеновских лучей [33]. С использованием двух алгоритмов молекулярного моделирования были получены две предположительные структуры про-NGF — крабовидная и стержневидная. В крабовидной модели пропептиды двух полипептидных цепей предшественника направлены в разные стороны и не взаимодействуют между собой. Стержневидная же модель, напротив, предполагает контакт двух пропоследовательностей [33]. Несмотря на неоднозначность полученных результатов, косвенно подтверждающих высокую подвижность про-части в составе предшественника, обе структуры вполне соотносятся с известными на сегодняшний день структурными данными по взаимодействию нейротрофических факторов с рецепторами Trk и p75 [33].

ПРОЦЕССИНГ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НЕЙРОТРОФИНОВ

Говоря об экспрессии нейротрофинов, нельзя не учитывать тот факт, что в нормальном состоянии клетка продуцирует лишь незначительные количества этих белков, поэтому процессинг и секреция нейротрофинов нейрональными и другими типами клеток *in vivo* в литературе освещены мало. Основная часть экспериментов выполнена на перевиваемых линиях клеток, трансфицированных генами нейротрофинов и, соответственно, экспрессирующих данные факторы роста в количествах, значительно превышающих природные [38].

Данные о том, что предшественники нейротрофинов могут секретироваться и обладать свойствами, альтернативными свойствам зрелым белков [19, 20], стали толчком к исследованию функций проформ нейротрофических факторов и их индивидуальных пропептидов. На сегодняшний день для трех предшественников основных нейротрофических факторов – про-NGF, про-BDNF и про-NT-3, достоверно показана собственная, отличная от зрелых белков, биологическая активность [19–21, 39]. Для про-NT-4/5 данные по активности отсутствуют.

Процессинг предшественника приводит к формированию зрелого нейротрофина и может протекать как внутри клетки, так и внеклеточно [26]. Биологическая роль и условия внеклеточного процессинга изучены недостаточно. Отметим лишь, что пронеуротрофины в данном случае могут процессироваться до зрелых форм плазмином или матриксными металлопротеиназами, например, протеиназой MMP9, широко экспрессирующейся в центральной нервной системе [40].

Внутриклеточный процессинг нейротрофических факторов, напротив, достаточно хорошо исследован и описан [26]. Новосинтезированный нейротрофический фактор попадает в первую очередь в эндоплазматический ретикулум, где происходит отщепление сигнальной последовательности. Это является необходимой стадией для дальнейшего внутриклеточного транспорта белка [26]. Котрансляционно происходит *N*-гликозилирование про-части белка по соответствующим сайтам (рис. 1). Вероятно, уже в этот момент белок имеет димерную структуру [26]. Из эндоплазматического ретикула нейротрофические факторы транспортируются в аппарат Гольджи, где могут накапливаться. Считается, что уже на этой стадии пронеуротрофины могут подвергаться процессингу [26]. Тут же происходит сортировка белка в везикулы регулируемой или конститутивной секреции, что определяется типом экспрессирующей клетки, а также самим нейротрофическим фактором [26, 41].

Экспериментально показано, что протеолитическое отщепление продомена нейротрофинов может осуществляться следующими пропротеинконвертазами – PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7,

PC64, а также фурином [26, 42, 43], однако заметим, что экспрессия некоторых из перечисленных протеиназ для клеток, секретирующих нейротрофины *in vivo*, не описана. В пропептидах нейротрофических факторов присутствуют последовательности близкорасположенных основных аминокислот, которые являются характерными мотивами распознавания для представителей данной группы ферментов – RXKR. Доминантными пропротеинконвертазами в клетках нервной ткани являются PC1/3 и PC2. Наряду с ними отмечают также фурин и PC64, экспрессирующиеся практически во всех типах клеток [26]. Вероятно, именно эти ферменты и играют ключевую роль в процессинге нейротрофических факторов. Наиболее изученным является процессинг пронеуротрофинов фурином.

Исследования, направленные на изучение процессинга различных нейротрофинов, показали, что протеолиз пронеуротрофина BDNF фурином менее эффективен, чем предшественников NGF и NT-3 [26, 42–45]. В связи с этим для нейротрофических факторов NGF и BDNF был проведен сравнительный мутационный анализ их пропептидов и области сайтов процессинга с целью выявления аминокислотных остатков, вносящих наибольший вклад в устойчивость про-BDNF к действию пропротеинконвертаз. Было показано, что замена His₁/Ser (нумерация от начала зрелой части) очень незначительно влияет на процессинг предшественника [46]. В то же время, полная перекрестная замена про-частей между нейротрофинами NGF и BDNF привела к тому, что NGF с пропептидом BDNF начал секретироваться в форме предшественника, т.е. с нарушением процессинга. В то же время форма секретлируемого BDNF, даже в присутствии пропептида NGF, осталась прежней [46]. Для объяснения ингибирования протеолиза пропептида BDNF было выдвинуто предположение, что некоторые основные внутриклеточные белки затрудняют процессинг за счет взаимодействия с пропоследовательностью BDNF, которая при физиологических условиях заряжена отрицательно [46]. Однако последние экспериментальные данные не подтвердили этой гипотезы [46].

Известно, что в продоме NGF, помимо основного сайта действия пропротеинконвертаз, протеолиз по которому приводит к образованию зрелой формы, существует еще два подобных сайта (рис. 1) [47, 48]. Было показано, что для получения про-NGF, устойчивого к действию различных пропротеинконвертаз (фурин, PC2, PC64), необходимо введение мутаций по всем трем сайтам. Полученный именно таким образом предшественник, устойчивый к действию пропротеинконвертаз, проявил высокую проапоптотическую активность на нескольких клеточных линиях [48]. Замены только по основному сайту процессинга (правый сайт на рисунке 1) приводят к секреции

как полноразмерной проформы, так и частично или полностью процессированных форм NGF [48, 49]. Мутации же по второстепенным сайтам (сайты 2 и 3, рис. 1) никак не повлияли на продукцию зрелого NGF в клетках PC12 или COS-7 [49]. В то же время было показано, что мутагенез по сайту процессинга 2 вносит некоторый вклад в образование устойчивого к действию протеиназ белка [49]. Для про-NT-3 подобного анализа не проводилось, хотя и было показано, что в пропептиде этого пронеуротрофина также существует вероятный дополнительный сайт процессинга (рис. 1).

Интересно, что в природе встречается сопряженный динуклеотидный полиморфизм гена BDNF — двойная G/T-замена (373/379) [50], затрагивающая сайт процессинга про-BDNF. Теоретически, это должно приводить к образованию устойчивого к действию пропротеинконвертаз предшественника, обладающего на моделях *ex vivo* проапоптотическим эффектом [51]. Однако, хотя изучение этого полиморфизма ведется уже много лет, до сих пор не найдено корреляции между вышеупомянутыми заменами и каким-либо неврологическим заболеванием.

Таким образом, аминокислотный состав пропептидов нейротрофинов влияет на процессинг проформ данных факторов роста, по крайней мере за счет различного количества сайтов процессинга, однако более детально этот факт остается неизученным. Есть основания полагать, что на процессинг влияет и зрелая часть, поскольку замена про-части у про-BDNF на пропептид NGF не изменила секретуемой формы этого нейротрофина [46].

Обнаружение дополнительных сайтов процессинга в пропептидах предшественников нейротрофинов привело к поиску иных биологически активных продуктов процессинга, отличающихся от зрелых нейротрофинов. Для этого синтетическим путем были получены короткие пептиды LIP1, LIP2, соответствующие продуктам специфического протеолиза про-части NGF (сайты 1, 2 и 3, рис. 1), и ELNN — возможный продукт расщепления пропептида NT-3 (сайты 1 и 2, рис. 1) [52]. Было продемонстрировано, что все три приведенных коротких пептида проявляли биологическую активность в разных процессах. Наиболее подробно изучались LIP1 и LIP2. Методом иммуноферментного анализа (ELISA) показано их высокое содержание в кишечнике крысы. Также в небольшом количестве они присутствуют в печени, селезенке и поджелудочной железе [52]. Обнаружены следующие эффекты пептидов LIP1 и LIP2: 1) индукция перестройки F-актина; 2) индукция фосфорилирования специфического для NGF рецептора TrkA; 3) увеличение активности холинергических нейронов *in vivo*; 4) ингибирование пролиферативного эффекта эстрогена, IGF (insulin-like growth factor, инсулиноподобного фактора роста) или EGF (epidermal growth factor, эпидермального фактора роста) в культуре клеток

MCF-7; 5) нейропротективное действие (подавление активности NMDA-рецептора); 6) индукция Akt-фосфорилирования (ключевая киназа сигнального каскада, который считается наиболее значимым из каскадов, обеспечивающих повышение жизнеспособности различных нейрональных популяций под действием нейротрофических факторов). Эти пептиды в условиях эксперимента оказались очень стабильными. Они сохраняли свою активность даже при нагревании экстракта кишечника до 100°C в течение часа и при pH 2 [52].

Таким образом, данные, полученные для коротких пептидов LIP1, LIP2 и ELNN, позволяют предположить, что процессинг пронеуротрофина может приводить не только к образованию биологически активного зрелого нейротрофина, но также сопровождаться образованием других, более коротких активных молекул, способных модулировать действие трофических факторов.

Как уже говорилось, пропептиды нейротрофинов отличаются друг от друга разным количеством сайтов гликозилирования (рис. 1). Анализ влияния этих сайтов на процессинг нейротрофинов был проведен для факторов NGF и BDNF. На различных типах клеток для них было показано, что наличие полисахаридной цепи является необходимым условием для выхода пронеуротрофинов из эндоплазматического ретикула и для предотвращения внутриклеточной деградации [42, 47, 53]. Это подтверждается экспериментами по неспецифическому ингибированию N-гликозилирования нейротрофических факторов (использование антибиотика туникамицина) [43, 53]. В то же время генноинженерная замена остатков, подвергающихся N-гликозилированию, не влияла на процессинг проформы до зрелого белка [47, 54]. Такие противоречия говорят, видимо, о несовершенстве используемых модельных систем.

Таким образом, анализируя влияние пропептидов на процессинг нейротрофических факторов, можно подвести некоторые итоги: 1) показана различная устойчивость пропептидов разных нейротрофинов к действию пропротеинконвертаз: в частности, проформа BDNF наиболее устойчива к действию специфических протеаз, расщепляющих предшественники нейротрофинов. Полный набор аминокислотных остатков, обладающих влиянием на эффективность процессинга, до настоящего времени не выявлен. 2) В результате процессинга предшественников нейротрофических факторов NGF и NT-3 возможно образование, помимо зрелого нейротрофина, иных биологически активных пептидов. 3) N-гликозилирование, по-видимому, оказывает определенное влияние на процессинг пронеуротрофинов, хотя оценить его степень пока затруднительно. В целом, влияние пропептидов нейротрофинов на эффективность процессинга очевидно и ожидаемо, однако молекулярные механизмы этого влияния не всегда до конца объяснимы.

СЕКРЕЦИЯ НЕЙРОТРОФИНОВ

Клеточная секреция делится на два типа – конститутивная и регулируемая. Известно, что нейротрофины NGF и NT-3 секретируются различными типами клеток, за исключением нейрональных, в основном конститутивно. В то же время секреция всех трех основных нейротрофинов – NGF, BDNF и NT-3 нейрональными клетками, в частности, клетками головного мозга взрослого организма, протекает преимущественно по регулируемому пути [44, 45, 53]. Для нейротрофического фактора BDNF показано, что в нейроэндокринных и в гиппокампальных клетках для него также характерен регулируемый путь секреции [45].

Сортировка белков в везикулы регулируемого пути зависит от многих факторов, таких как аминокислотная последовательность, посттрансляционные модификации (процессинг, гликозилирование и др.), олигомерная организация белка и др. [55].

Делеционный анализ области пропептида NGF показал, что для успешной секреции биологически активного зрелого NGF необходимо и достаточно двух консервативных областей, причем обе из них содержат сайты гликозилирования. Первый регион относительно протяженный и состоит из 27 а.о. – Asn(–53)–Pro(–27) (нумерация от стартового метионина). Высказывается предположение, что он играет основную роль в защите синтезируемого белка от деградации протеазами в ЭПР [47]. Второй регион представляет собой 8 C-концевых остатков пропептида NGF и, вероятно, определяет эффективность процессинга предшественника. Таким образом, для успешной секреции нейротрофического фактора NGF важны регионы, вовлеченные в посттрансляционную модификацию данного белка. Поскольку эти области консервативны для трех нейротрофинов – NGF, BDNF и NT-3, было высказано предположение, что в проформах всех нейротрофинов эти два участка играют аналогичную роль [47]. Однако мутационный анализ влияния N-гликозилирования пропептида pro-NGF по положениям (–8) и (–53) (как индивидуально, так и совместно) на секрецию этого нейротрофина показал, что отсутствие полисахаридной цепи не влияет на секрецию этого фактора роста [54].

Изучение влияния процессинга проформ показало, что в некоторых случаях он является существенным для распределения нейротрофина в везикулы регулируемого пути секреции [56]. В то же время в других случаях показано, что регулируемая секреция возможна только при полном ингибировании пропротеинконвертазы фурина и, соответственно, при наличии пропептида в составе нейротрофического фактора [26]. Такие противоречия в данных, видимо, также связаны с различиями выбранных модельных систем.

На сегодняшний день известно, что клетками нервной системы, в особенности нейронами цен-

тральной нервной системы, секретируются, помимо зрелых нейротрофинов, и их предшественники, т.е. внутриклеточный процессинг происходит не всегда. Причем доля проформ от общего количества секретируемых нейротрофических факторов может составлять 40–60% [44, 45, 53, 54, 57, 58]. Однако тип секреции проформ пока остается малоизученным, также непонятно, как коррелирует тип секреции предшественника с таковым для зрелого фактора.

Регулируемая секреция зависит от внешних сигналов. Зрелые нейротрофины зачастую могут сами регулировать собственную секрецию [59]. Например, регулируемая секреция является кальций-зависимой, а один из сигнальных путей, запускаемых взаимодействием нейротрофинов с тирозинкиназными рецепторами, в свою очередь, изменяет уровень внутриклеточного кальция [18].

На регуляцию также может влиять нейрональная активность, заметно меняющаяся, в частности, при различных повреждениях нервной системы. Так, было показано, что при многих повреждениях головного мозга увеличивается секреция NGF и BDNF [59–63]. Что касается влияния нейрональной активности при повреждении различных отделов головного мозга на экспрессию NT-3, то существуют различные данные, показывающие как повышение уровня секретируемого белка, так и понижение, наряду с данными, описывающими уровень секреции как неизменный [59, 61, 62]. При этом о соотношении форм, в которых нейротрофины секретируются при повреждении нервной ткани, и об его изменении пока ничего не известно.

Прямое подтверждение участия пропептида в секреции нейротрофического фактора было обнаружено при анализе полиморфизма гена BDNF. Характерной для гена BDNF является замена, кодирующая мутацию Val66/Met в пропептиде (нумерация с 1 аминокислоты сигнального пептида изоформы *a*) [64]. Изучение этого полиморфизма ведется уже достаточно долго, однако четкой корреляции между данной заменой и каким-либо патологическим процессом у человека не обнаружено. В то же время показано, что замена валина в положении 66 на метионин изменяет механизм секреции нейротрофического фактора BDNF в клетках гиппокампа или коры головного мозга крысы с регулируемого на конститутивный [65, 66]. Есть также результаты, показывающие, что гомозиготные по такой замене мыши ($BDNF^{Met/Met}$) проявляют повышенное беспокойство по сравнению с контрольной группой в тестах, создающих стрессовую ситуацию; при этом беспокойное поведение не менялось даже при введении антидепрессантов [67]. Таким образом, полиморфизм в гене BDNF, затрагивающий последовательность, влияет на функциональность данного фактора роста.

Итак, относительно влияния пропептидов на секрецию соответствующих нейротрофинов можно

отметить следующие моменты: 1) на примере про-NGF обнаружено два домена в про-части, существенные для секреции, оба эти домена участвуют в посттрансляционной модификации белка. Таким образом, секреция тесно связана с *N*-гликозилированием и процессингом предшественников нейротрофинов. 2) Структурные особенности пропептида влияют на тип клеточной секреции соответствующего нейротрофического фактора.

ФОЛДИНГ НЕЙРОТРОФИНОВ

Как уже было отмечено, для многих белков продемонстрирована шапероноподобная функция пропептидов, т.е. наличие собственной пропоследовательности, часто даже не связанной ковалентно со “зрелой частью” (в системе *in trans*), значительно облегчало формирование корректной пространственной структуры (фолдинг) белковой молекулы.

Для анализа роли про-частей в фолдинге белковых молекул были использованы различные экспериментальные системы. Один из подходов заключается в исследовании *in vitro* фолдинга рекомбинантных белков, полученных при экспрессии в гетерологичной системе *E. coli*. Было показано, что фолдинг зрелого нейротрофина NT-3, полученного подобным образом, протекал чрезвычайно медленно (до 4 недель) и неэффективно [68]. Рекомбинантный зрелый NGF, предварительно подвергшийся денатурации, при ренатурации в значительной степени агрегировал и не был способен восстанавливать активную форму. Выдерживание такого денатурированного NGF в присутствии 15-кратного молярного избытка ковалентно несвязанного собственного пропептида (фолдинг в системе *in trans*) в течение двух суток эффекта также не дало [36]. Наличие ковалентно связанной про-части (фолдинг в системе *in cis*) в составе рекомбинантного про-NGF, экспрессированного в клетках *E. coli*, позволяло получить выход биологически активного фактора около 35% [36, 37]. Это позволило выдвинуть предположение, что пропоследовательность нейротрофинов участвует в фолдинге этих белков и, таким образом, сворачивание нейротрофинов протекает по про-зависимому механизму [36, 37]. Однако следует обратить внимание, что сравнение ренатурации искусственно денатурированного активного фактора и полученного в результате экспрессии в *E. coli* предшественника, на наш взгляд, не совсем корректно. С учетом этого обстоятельства, отсутствие эффекта пропептида, добавленного *in trans*, ставит под сомнение способность предварительно денатурированного NGF восстанавливать корректную структуру.

Интересно, что ковалентно связанная пропоследовательность нейротрофина NT-3 также способна направлять фолдинг зрелого NGF [69]. По данным обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии сворачивание химерного белка,

содержащего про-часть NT-3 и зрелую часть NGF, происходило примерно с такой же эффективностью, как и сворачивание про-NGF [69]. Однако данные по биологической активности полученных из про-NGF и химерного про-NGF препаратов нейротрофических факторов отсутствуют.

Хотя эксперименты *in vitro* позволяют предположить про-зависимый механизм фолдинга предшественника NGF, эксперименты по котрансфекции культуры клеток НЕК 293 векторами, кодирующими рекомбинантные пропептид и зрелый NGF, не обнаружили влияния пропоследовательности данного нейротрофина на его активность [47].

Данные по сворачиванию рекомбинантного BDNF на сегодняшний день практически отсутствуют. Описаны эксперименты по получению активного зрелого белка в клетках *E. coli*, при выделении из растворимой цитоплазматической фракции после разрушения клеток (выход составил ~0.05% от первоначально синтезированного внутриклеточного BDNF). Попытки получить активный BDNF при сворачивании белка, экстрагированного из телец включения, повысили выход до 2.5%. При этом удельная биологическая активность такого BDNF оказалась примерно в 70 раз ниже активности BDNF, очищенного из растворимой фракции [70]. Возможно, это негативное влияние отсутствия про-части, а возможно, авторам просто не удалось подобрать эффективные условия фолдинга, поскольку процесс ренатурации эукариотических белков из телец включения довольно сложен.

Характерной особенностью структуры всех нейротрофических факторов является сложная комбинация дисульфидных связей, две из которых образуют кольцо, через которое проходит третья связь (рис. 2). В результате образуется так называемый “цистиновый узел”, который сегодня обнаружен у многих факторов роста [71]. Анализ процесса образования дисульфидных связей в ходе созревания предшественника NGF показал, что помимо основного пути, приводящего к образованию правильной структуры, существуют тупиковые, при которых образуются структуры с неправильно замкнутыми или только частично сформированными дисульфидными связями. Было показано, что выход про-NGF со всеми тремя дисульфидными связями, замкнутыми корректно (рис. 2), составил 75% от того количества белка, который по данным обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии был определен как нативный [36, 37].

Интересно, что пропоследовательность ни одного из предшественников нейротрофинов не содержит остатков цистеина, поэтому она не может способствовать поддержанию окислительно-восстановительного потенциала при замыкании дисульфидных связей. Предполагается, что из-за высокого содержания гидрофильных остатков про-часть может экранировать гидрофобные об-

ласти зрелой части в промежуточных состояниях при фолдинге и, таким образом, повышать эффективность образования корректной пространственной структуры [36, 37].

Итак, неоспоримых доказательств про-зависимого характера фолдинга нейротрофинов пока не представлено, хотя такое предположение является господствующим [36, 37, 68, 69]. При этом, приняв во внимание различия в структуре пропептидов различных факторов, можно ожидать и различий в шапероноподобной активности про-частей, хотя данные о созревании химерного предшественника NGF с пропептидом NT-3 такое предположение не подтверждают [69].

Таким образом, можно утверждать, что пропептиды нейротрофинов являются модуляторами их активности. В отличие от сигнального пептида, выполняющего строго определенную, секреторную, функцию, и только таким путем влияющего на биологическую активность ростового фактора, про-часть меняет или дополняет спектр активности зрелого нейротрофина. Так, некоторые участки пропептида определяют тип секреции фактора роста [65, 66], пропоследовательность в составе предшественников нейротрофинов позволяет им взаимодействовать с клеточными рецепторами, не связывающимися зрелые факторы, что вызывает иной клеточный ответ [19–21]. Структура про-частей определяет эффективность процессинга предшественников [26, 42, 44, 45], а продукты гидролиза пропептида могут обладать собственным действием, дополняющим активность зрелого нейротрофического фактора [52]. При этом пропоследовательность нейротрофических факторов, видимо, играет и вспомогательную роль, характерную для пропептидов вообще: секреторную [47], ингибиторную (предотвращение взаимодействия со специфическими тирозинкиназными рецепторами) [19–21] и шапероноподобную [36, 37, 68, 69].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 09-04-00870-а и 11-08-01046, Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lanave C., Colangelo A.M., Saccone C., Alberghina L. // *Gene*. 2007. V. 394. P. 1–12.
2. van Kesteren R.E., Fainzilber M., Hauser G., van Minnen J., Vreugdenhil E., Smit A.B., Ibáñez C.F., Geraerts W.P., Bulloch A.G. // *EMBO J*. 1998. V. 17. P. 2534–2542.
3. Bothwell M. // *Brain Behav. Evol.* 2006. V. 68. P. 124–132.
4. Zhu B., Pennack J.A., McQuilton P., Forero M.G., Mizuguchi K., Sutcliffe B., Gu C.J., Fenton J.C., Hidalgo A. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. 2476–2495.
5. Fainzilber M., Smit A.B., Syed N.I., Wildering W.C., Hermann, van der Schors R.C., Jiménez C., Li K.W., van Minnen J., Bulloch A.G., Ibáñez C.F., Geraerts W.P. // *Science*. 1996. V. 274(5292). P. 1540–1543.
6. Halban P.A., Irminger J.C. // *Biochem. J*. 1994. V. 299. P. 1–18.
7. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D. // *Neuron*. 1990. V. 5. P. 501–509.
8. Hamel W., Westphal M., Szönyi E., Escandón E., Nikolics K. // *J. Neurosci. Res.* 1993. V. 34. P. 147–157.
9. Kolbeck R., Bartke J., Eberle W., Barde Y.A. // *J. Neurochem.* 1999. V. 72. P. 1930–1938.
10. Chien C.C., Fu W.M., Huang H.I., Lai Y.H., Tsai Y.F., Guo S.L., Wu T.J., Ling Q.D. // *J. Pain*. 2007. V. 8. P. 161–167.
11. Canossa M., Griesbeck O., Berninger B., Campana G., Kolbeck R., Thoenen H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94(24). P. 13279–13286.
12. Nakajima K., Honda S., Tohyama Y., Imai Y., Kohsaka S., Kurihara T. // *J. Neurosci. Res.* 2001. V. 65. P. 322–331.
13. Schweigreiter R. // *BioEssays*. 2006. V. 28. P. 583–594.
14. Bibel M., Hoppe E., Barde Y.A. // *EMBO J*. 1999. V. 18. P. 616–622.
15. Yano H., Chao M.V. // *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 2000. V. 74. P. 253–260.
16. Roux P.P., Bhakar A.L., Kennedy T.E., Barker P.A. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 23097–23104.
17. Huang E.J., Reichardt L.F. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 609–642.
18. Ng Y.P., Lo K.Y., Cheung Z.H., Ip N.Y. // *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neuroactive Proteins and Peptides*. Berlin: Springer, 2006. P. 11–41.
19. Nykjaer A., Lee R., Teng K.K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M.S., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T.E., Hempstead B.L., Petersen C.M. // *Nature*. 2004. V. 427(6977). P. 843–848.
20. Teng H.K., Teng K.K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R.D., Kermani P., Torkin R., Chen Z.Y., Lee F.S., Kraemer R.T., Nykjaer A., Hempstead B.L. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25(22). P. 5455–5463.
21. Friedman W.J. // *Neuroscientist*. 2010. V. 16. P. 244–252.
22. Shinde U., Inouye M. // *Trends Biochem. Sci.* 1993. V. 18. P. 442–446.
23. Gullberg U., Bengtsson N., Bülow E., Garwicz D., Lindmark A., Olsson I. // *J. Immunol. Method.* 1999. V. 232. P. 201–210.
24. Westergaard U.B., Sorensen E.S., Hermey G., Nielsen M.S., Nykjaer A., Kirkegaard K., Jacobsen C., Gliemann J., Madsen P., Petersen C.M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279(48). P. 50221–50229.
25. Zabel B.U., Eddy R.L., Lalley P.A., Scott J., Bell G.J., Shows T.B. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. P. 469–473.
26. Lessmann V., Gottmann K., Malcangio M. // *Prog. Neurobiol.* 2003. V. 69. P. 341–374.
27. Wiesmann C., Ultsch M.H., Bass S.H., de Vos A.M. // *Nature*. 1999. V. 401. P. 184–188.
28. Wehrman T., He X., Raab B., Dukipatti A., Blau H., Garcia K.C. // *Neuron*. 2007. V. 53. P. 25–38.
29. He X.L., Garcia K.C. // *Science*. 2004. V. 304(5672). P. 870–875.
30. Gong Y., Cao P., Yu H.J., Jiang T. // *Nature*. 2008. V. 454. P. 789–793.
31. Wiesmann C., de Vos A.M. // *Cell Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. P. 748–759.

32. Butte M.J., Hwang P.K., Mobley W.C., Fletterick R.J. // *Biochemistry*. 1997. V. 37. P. 16846–16852.
33. Paoletti F., Konarev P.V., Covaceuszach S., Schwarz E., Cattaneo A., Lamba D., Svergun D.I. // *Biochem. Soc. Trans.* 2006. V. 34. P. 605–606.
34. Kliemann M., Rattenholl A., Golbik R., Balbach J., Lilie H., Rudolph R., Schwarz E. // *FEBS Lett.* 2004. V. 566. P. 207–212.
35. Kliemann M., Golbik R., Rudolph R., Schwarz E., Lilie H. // *Protein Sci.* 2007. V. 16. P. 411–419.
36. Rattenholl A., Ruoppolo M., Flagiello A., Monti M., Vinci F., Marino G., Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 523–533.
37. Rattenholl A., Lilie H., Grossmann A., Stern A., Schwarz E., Rudolph R. // *FEBS*. 2001. V. 268(11). P. 3296–3303.
38. Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. // *Science*. 2001. V. 294. P. 1945–1948.
39. Yano H., Torkin R., Martin L.A., Chao M.V., Teng K.K. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29(47). P. 14790–14802.
40. Bruno M.A., Cuello A.C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103(17). P. 6735–6740.
41. Lim K.C., Lim S.T., Federoff H.J. // *Neurobiol Aging*. 2003. V. 24(8). P. 1135–1145.
42. Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Savaria D., Hamelin J., Goulet B., Laliberte J., Lazure C., Chretien M., Murphy R.A. // *Biochem. J.* 1996. V. 314. P. 951–960.
43. Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Chretien M., Murphy R.A. // *FEBS Lett.* 1996. V. 379. P. 247–250.
44. Mowla S.J., Pareek S., Farhadi H.F., Petrecca K., Fawcett J.P., Seidah N.G., Morris S.J., Sossin W.S., Murphy R.A. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 2069–2080.
45. Farhadi H.F., Mowla S.J., Petrecca K., Morris S.J., Seidah N.G., Murphy R.A. // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 4059–4068.
46. Nomoto H., Takaiwa M., Mouri A., Furukawa S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 356. P. 919–924.
47. Suter U., Heymach J.V. Jr., Shooter E.M. // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 2395–2400.
48. Pagadala P.C., Dvorak L.A., Neet K.E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103(47). P. 17939–17943.
49. Mouri A., Nomoto H., Furukawa S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 353. P. 1056–1062.
50. Pröschel M., Saunders A., Roses A.D., Müller C.R. // *Hum. Mol. Genet.* 1992. V. 1. P. 353.
51. Koshimizu H., Kiyosue K., Hara T., Hazama S., Suzuki S., Uegaki K., Nagappan G., Zaitsev E., Hirokawa T., Tatsu Y., Ogura A., Lu B., Kojima M. // *Mol. Brain*. 2009. V. 2. P. 27.
52. Dicou E. // *Arch. Physiol. Biochem.* 2007. V. 113. P. 228–233.
53. Mowla S.J., Farhadi H.F., Pareek S., Atwal J.K., Morris S.J., Seidah N.G., Murphy R.A. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276(16). P. 12660–12666.
54. Heymach J.V., Krüttgen A., Suter U., Shooter E.M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271(41). P. 25430–25437.
55. Burgess T.L., Kelly R.B. // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1987. V. 3. P. 243–293.
56. Lim K.C., Tyler C.M., Lim S.T., Giuliano R., Federoff H.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 361. P. 599–604.
57. Hasan W., Pedchenko T., Krizsan-Agbas D., Baum L., Smith P.G. // *J. Neurobiol.* 2003. V. 57. P. 38–53.
58. Bierl M.A., Jones E.E., Crutcher K.A., Isaacson L.G. // *Neurosci. Lett.* 2005. V. 380. P. 133–137.
59. Ullal G.R., Michalski B., Xu B., Racine R.J., Fahnestock M. // *Neurochem. Int.* 2007. V. 50. P. 866–871.
60. Gall C., Lauterborn J., Bundman M., Murray K., Isackson P. // *Epilepsy Res.* 1991. V. 4. P. 225–245.
61. Gall C.M. // *Exp. Neurol.* 1993. V. 124. P. 150–166.
62. Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Persson H., Lindvall O. // *Neuron*. 1991. V. 7. P. 165–176.
63. Katoh-Semba R., Takeuchi I.K., Inaguma Y., Ito H., Kato K. // *J. Neurosci. Res.* 1999. V. 35. P. 19–29.
64. Kunugi H., Ueki A., Otsuka M., Isse K., Hirasawa H., Kato N., Nabika T., Kobayashi S., Nanko S. // *Mol. Psychiatr.* 2001. V. 6. P. 83–86.
65. Chen Z.Y., Patel P.D., Sant G., Meng C.X., Teng K.K., Hempstead B.L., Lee F.S. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24(18). P. 4401–4411.
66. Egan M., Kojima M., Callicott J., Goldberg T., Kolachana B., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D. // *Cell*. 2003. V. 112. P. 257–269.
67. Chen Z.Y., Jing D., Bath K.G., Ieraci A., Khan T., Siao C.J., Herrera D.G., Toth M., Yang C., McEwen B.S., Hempstead B.L., Lee F.S. // *Science*. 2006. V. 314(5796). P. 140–143.
68. Suenaga M., Ohmae H., Tsuji S., Itoh T., Nishimura O. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998. V. 28. P. 119–124.
69. Hauburger A., Kliemann M., Madsen P., Rudolph R., Schwarz E. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 4159–4164.
70. Fukuzono S., Fujimori K., Shimizu N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995. V. 59. P. 1727–1731.
71. McDonald N.Q., Lapatto R., Rust J.M., Gunning J., Wlodawer A., Blundell T.L. // *Nature*. 1991. V. 354. P. 411–414.

Precursors and Propeptides of Neurotrophic Factors as the Modulators of Biological Activity of Its Mature Forms

L. M. Rafieva[#], A. V. Shubin, and E. V. Gasanov

[#]Phone: +7 (499) 196-18-53; fax: +7 (499) 196-02-21; e-mail: rafievalm@gmail.com

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 2 Kurchatov sq., 123186 Moscow

Here, we review the problems of neurotrophic factors' folding, the role of its precursors (proneurotrophins) and the contribution of elements deleted during its maturation (propeptides) in biological functioning of these growth factors.

Keywords: neurotrophins, proneurotrophins, neurotrophic factors, propeptide, folding.