

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Кудрявцев Денис Сергеевич

**НОВЫЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ПЕПТИДНО-БЕЛКОВЫЕ
ЛИГАНДЫ GYS-ПЕТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

Кашеверов Игорь Евгеньевич

Официальные оппоненты:

член-корр. РАН, доктор химических наук **Сергей Николаевич Кочетков**, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

доктор биологических наук, **Елена Валентиновна Казначеева**, заведующий лабораторией ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Защита состоится « 12 » октября 2016 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте www.ibch.ru/about/disser/theses.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

Актуальность проблемы

Одним из наиболее важных способов передачи сигнала от одного нейрона к другому или от нейрона к мышечному волокну является химический синапс. Синапс представляет собой контакт двух клеток, при котором электрическое возбуждение на “входящем” элементе - пресинаптической мембране - вызывает выброс сигнального вещества (нейромедиатора) в синаптическую щель. Выходной элемент - постсинаптическая мембрана - воспринимает этот химический сигнал посредством мембранных рецепторов. Одним из классов мембранных рецепторов являются лиганд-управляемые ионные каналы. Рецепторы этого класса непосредственно преобразуют химический сигнал в ток ионов через катионный или анионный канал, находящийся в пределах одного белкового мультимера с участком связывания лиганда. Это является основным отличием рецепторов данного класса от метаболитических мембранных рецепторов, эффект которых всегда опосредован ферментативной активностью.

Cys-петельные рецепторы - это группа лиганд-управляемых ионных каналов, объединяющая никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), рецептор серотонина третьего типа (5OT-3), ионотропные рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-A) и глициновый рецептор (ГлиР). Первые два являются катионными каналами, их активация приводит к деполяризации постсинаптической мембраны, последние два - анионные каналы, опосредующие появление тормозного постсинаптического потенциала (гиперполяризации). Также к этой группе относят катионные каналы прокариотического происхождения - ELIC и GLIC, и глутамат-активируемый хлорный канал нематоды *Caenorhabditis elegans*. Пространственные структуры трех последних каналов одними из первых были получены методом рентгеноструктурного анализа, что значительно увеличило количество информации о структуре и функционировании всего класса Cys-петельных рецепторов. В 2015 году также были разрешены кристаллические структуры 5-OT3, ГлиР и ГАМК-A.

Cys-петельные рецепторы участвуют в регуляции множества функций человеческого организма. Нарушение их экспрессии и точечные мутации, изменяющие их активность, а также взаимодействие с эндогенными модуляторами, являются причиной развития самых разнообразных патологий нервной системы (эпилепсия, шизофрения, слабоумие), опорно-двигательного аппарата (миастения) и кожных заболеваний (пальмоплантарная кератодермия). Таким образом, изучение структурно-функциональных взаимоотношений Cys-петельных рецепторов и их лигандов, а также механизмов их ингибирования и активации представляет собой актуальные задачи, решение которых позволит создавать не только новые удобные инструменты исследования этих рецепторов, но и лекарственные препараты или терапевтические подходы.

Цели и задачи работы

Целью данной диссертационной работы являлся поиск новых низкомолекулярных соединений, способных взаимодействовать с различными подтипами nAChR, а также проверка способности α -конотоксинов и α -нейротоксинов из ядов змей (пептидных и белковых инструментов исследования nAChR) взаимодействовать и с другими представителями Cys-петельных рецепторов, а именно с ГАМК-А рецепторами.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) Проанализировать способность взаимодействовать с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами для 15 природных низкомолекулярных соединений из морских губок, моллюсков и асцидий.
- 2) Исследовать взаимодействие с мышечным nAChR серии синтетических укороченных фрагментов аземиопсина, пептида из яда бирманской гадюки, блокирующего мышечные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы.
- 3) Исследовать активность сконструированных аналогов α -конотоксина PnIA в отношении $\alpha 7$ nAChR.

- 4) Исследовать взаимодействие серии белковых нейротоксинов из ядов змей с ионотропными рецепторами γ -аминомасляной кислоты.
- 5) Исследовать взаимодействие мутанта $\alpha 7$ nAChR Y168A с водорастворимым аналогом эндогенного трехпетельного «прототоксина» - белка Lynx1.

Научная новизна и практическая значимость работы

Работа представляет собой поиск и исследование лигандов Cys-петельных рецепторов, принимающих участие во многих физиологических функциях организма, что делает многие из этих рецепторов перспективными терапевтическими мишенями. Следует упомянуть, что эти мультисубъединичные рецепторы существуют в виде различных подтипов, отличающихся по локализации в организме и по выполняемым ими функциям. Наряду с природными эндогенными лигандами, Cys-петельные рецепторы способны взаимодействовать с самыми разнообразными лигандами - низкомолекулярными соединениями, пептидами и белками. Такие соединения играют важную роль в выяснении механизмов действия рецепторов, а также способствуют поиску и конструированию новых лекарственных препаратов.

Представленные в работе результаты свидетельствуют о выполнении поставленных задач: поиска новых низкомолекулярных лигандов никотиновых рецепторов и получения новой информации о взаимодействии Cys-петельных рецепторов с пептидными и белковыми нейротоксинами. В обоих случаях решающей оказалась возможность комбинации различных методов: компьютерного моделирования лиганд-рецепторных взаимодействий, химического синтеза природных пептидов и их сконструированных аналогов с последующим анализом предполагаемых взаимодействий, исследования взаимодействия природных и синтезированных соединений с мутантными формами Cys-петельных рецепторов, радиолигандного анализа, флуоресцентной микроскопии и электрофизиологии. Среди наиболее важных результатов следует отметить открытие свойств агониста $\alpha 7$ nAChR у 6-бромогипафорина, заметное повышение сродства к $\alpha 7$ nAChR у синтезированных мутантных

аналогов α -коботоксина PnIA, а также открытие полного ингибирования функциональных подтипов ГАМК-А трехпетельным лигандом α -коботоксином.

Апробация работы

Основные материалы диссертации были представлены на следующих конференциях и симпозиумах: 4ом международном симпозиуме по не-нейрональному ацетилхолину в Гиссене (ФРГ) в 2014 г., VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» в Новосибирске в 2015 г., XXVIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в Москве в 2016 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 75 страницах, содержит 23 рисунка и 3 таблицы, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 136 источников.

Содержание работы

Низкомолекулярные лиганды

Совместно с лабораториями Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТиБОХ ДВО РАН) нами была проанализирована активность четырнадцати произвольно выбранных соединений из морских губок, асцидий и моллюсков. Стоит отметить структурное разнообразие соединений, предоставленных для анализа (Рис. 1): ризохалин (1) и его агликон (2) представляют собой

бифункциональные сфинголипиды, пибоцин (3) является алкалоидом эрголинового ряда, варацин (4) - производное дофамина, пигменты макалувамины С и G (5 и 6) содержат в своих структурах пирролиминохиноновое ядро, тетрагидропирролазепиноновый алкалоид дебромгименальдизин (7), имеющий некоторое сходство с никотином диметилпиперидин (8), пентациклические гуанидиновые алкалоиды крамбесцидин 359 (9) и монанхоцидин (13), производные пиридина и гуаниина 7,8-дигидроимидазо[1,5-с]-пиридин и 1,3-диметилизогуаниин (10 и 11 соответственно) и ааптамин - трициклический алкалоид (12).

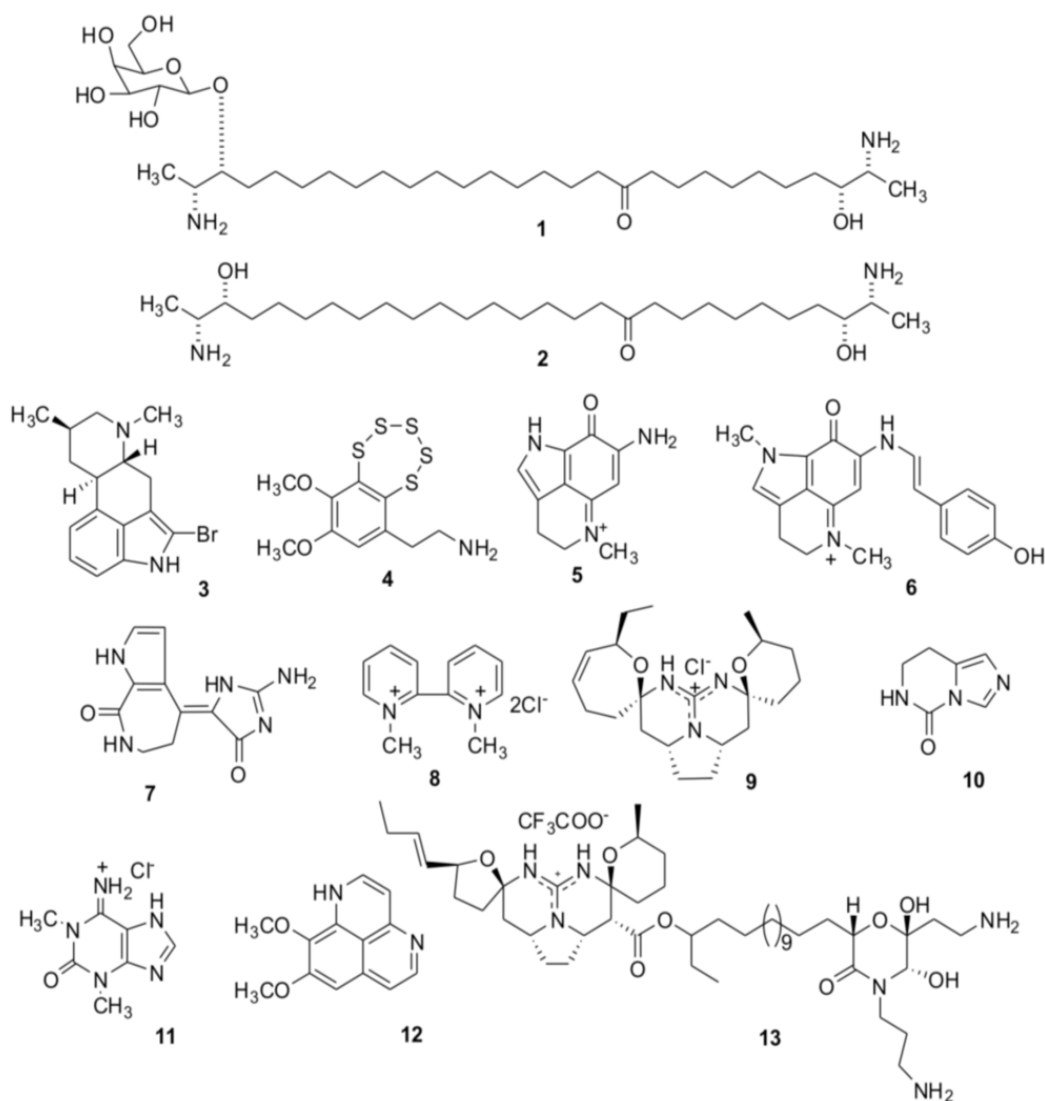


Рисунок 1. Структуры соединений из морских губок и асцидий, холинергическая активность которых была исследована *in silico* и экспериментальными методами.

Компьютерный докинг к структуре АхСБ и анализ параметров связывания в конкуренции [¹²⁵I]- α Bgt

Нами был проведен докинг полученных соединений к структуре АхСБ *Lymnaea stagnalis*, при этом были использованы три различных структуры АхСБ: с молекулой НЕРЕС (буферная соль) в кармане связывания (не является ни агонистом, ни антагонистом нАхР), с конкурентным низкомолекулярным антагонистом дигидро- β -эритроидином (Dh β E) и α -кобратоксином. Три выбранные структуры АхСБ отличаются положением петли С в участке связывания агонистов и конкурентных антагонистов, что может повлиять на результаты докинга. Выбирая три различных варианта положения петли С, мы расширяем пространство возможных результатов докинга.

Результаты в форме теоретически предсказанных значений константы ингибирования представлены в Табл. 1. Для большинства соединений наиболее предпочтительный участок связывания находился в гидрофобном кармане под петлей С, частично или полностью перекрываясь с участком связывания агонистов и конкурентных антагонистов. Однако, в некоторых случаях наиболее предпочтительные предсказанные сайты связывания (те, для которых предсказанная константа ингибирования меньше) находились за пределами «классического» участка связывания под петлей С. Наиболее сильно отличающиеся значения предсказанных констант ингибирования получены для 1,3-диметилизогуанидина (№11), для которого теоретические константы ингибирования в «классическом» участке и за его пределами отличались в восемь раз (см. Табл. 1).

Таблица 1. Сравнение теоретически предсказанных значений константы ингибирования и констант ингибирования, полученных при обработке данных радиолигандного теста. Предсказанные и измеренные аффинности исследованных соединений (см. Рис. 1) к трем различным состояниям АхСБ из *L. stagnalis*. **А**—НЕРЕС-связанная форма; **В**—DНβЕ-связанная и **С**—α-кобратоксин-связанная формы АхСБ соответственно. *- в докинге участвовала только часть молекулы, **- предсказано связывание за пределами “классического” участка связывания агонистов и конкурентных антагонистов, n.d. - не определено (нет положительных результатов).

Номер соединения	Теоретические значения К _i (μМ) для взаимодействия с АхСБ <i>L. stagnalis</i>			Экспериментально полученные значения К _i (μМ) для взаимодействия с АхСБ <i>L. stagnalis</i> , полученные в радиолигандном тесте
	А	В	С	
1 *	n.d.	n.d.	39	28 ± 4
2 *	n.d.	n.d.	39	130 ± 10
3	0.98	1.7 0.64 **	2.0	0.83 ± 0.04
4	1.6	0.97	0.75	0.79 ± 0.03
5	2.2	0.46	5.8	1.3 ± 0.1
6	0.05	0.04	0.97	0.55 ± 0.01
7	8.2	0.79 0.50 **	1.7	>1000
8	33	12	310	540 ± 60
9	0.08	0.47	0.40	27 ± 2
10	170	120	n.d. 320 **	>1000
11	150	83 11 **	350	>1000
12	1.5	5.3	19	3.0 ± 0.4
13 *	0.53	0.43	0.11	2.5 ± 0.4

Согласно данным компьютерного докинга, для некоторых соединений можно ожидать высокоаффинное связывание (№№ 3–7, 9, 12, 13). Для соединений №№ 1, 2, 8, 10, 11 молекулярный докинг предсказывает низкоаффинное взаимодействие. Следует заметить, что согласно компьютерному докингу практически всех активных соединений (№№ 3, 4, 5, 6, 9, 13) предсказанные константы ингибирования для структур АхСБ с различным положением петли С различались не более чем на 5 μМ. Только в

случае умеренно активного ааптамина (№12) и слабоактивного 1,1'-диметил-[2,2']-бипиридина (№8) предсказанные константы ингибирования различались более, чем на 5 μM , что может объясняться тем, что для результатов докинга этих соединений большое значение играет положение петли С.

Т.к. Для большинства соединений компьютерный докинг показал возможность связывания в «классическом» участке, мы получили возможность проверить данные моделирования в опытах по конкуренции с $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Vgt}$, участок связывания которого также в значительной степени находится под петлей С. Кривые ингибирования связывания $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Vgt}$ представлены на Рис. 2.

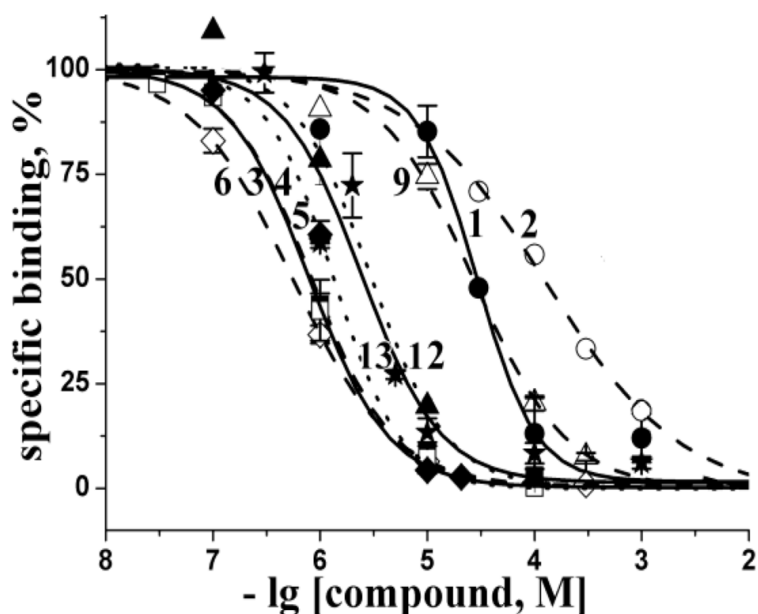


Рисунок 2. Ингибирование связывания $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Vgt}$ с АхСБ *L. stagnalis* наиболее активными из протестированных соединений. Нумерация соединений соответствует нумерации на предыдущем рисунке. Соответствующие кривые отмечены следующими символами: 1—заполненные круги; 2—пустые круги; 3—заполненные квадраты; 4—пустые квадраты; 5—заполненные ромбы; 6—пустые ромбы; 9—пустые треугольники; 12—заполненные треугольники; 13—звезды. Каждая точка отмечает среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($n=3$).

Соединения с наихудшими предсказанными параметрами связывания показали в радиолигандном тесте слабое ингибирование связывания $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Vgt}$ (№№ 1, 2, 8) либо не показали никакого ингибирования (№№ 10, 11). Для соединений с наименьшими экспериментально установленными константами

ингибирования (с наибольшей аффинностью) результаты компьютерного докинга показали хорошую согласованность с данными конкуренции с радиолигандом (см. Табл. 1).

АхСБ является модельным объектом для изучения нАхР. Исходя из того, что некоторые соединения в данной небольшой библиотеке из тринадцати соединений показали связывание в гидрофобном кармане под петлей С АхСБ, было решено проверить влияние веществ из данной небольшой библиотеки на функциональную активность нАхР двух подтипов — $\alpha 7$ и мышечного ($\alpha 1\beta 1\delta \epsilon$). Для тестирования вещества в концентрации 10 μM подавались на ооцит, экспрессирующий соответствующий рецептор.

Соединения **1, 2, 4, 6, 9** и **13** ингибировали активность мышечного нАхР практически полностью, при этом соединения **4** и **6** ингибировали $\alpha 7$ нАхР не более, чем наполовину. Соединения **3** и **12** показали умеренное (более 40%) ингибирование обоих подтипов нАхР. Соединение **5** проявило слабую ингибирующую активность, а соединения **7, 8, 10** и **11** не показали таковой (Рис. 3).

Стоит заметить, что ингибирующий эффект соединений, включающих в себя длинные углеводородные цепи (**1, 2** и **13**) был слабообратимым. В то же время, макалувамин G, также являющийся достаточно мощным антагонистом нАхР, но не имеющий в своей структуре подобных особенностей, достаточно быстро переходил в раствор из комплекса с рецептором, насколько об этом можно судить на основании данных электрофизиологии.

Для наиболее активных соединений нами были получены концентрационные зависимости ингибирования мышечного нАхР. Наибольшим сродством к мышечному нАхР обладают соединения агликоризохалин (**№2**) и макалувамин G (**№6**).

Таким образом, соединения из морских губок и асцидий могут обладать (и, в случае с некоторыми из протестированных соединений, обладают) ингибирующей активностью по отношению к нейрональному нАхР $\alpha 7$ подтипа и нАхР мышечного подтипа. Однако, помимо ингибиторов данного типа рецепторов большой медицинский интерес представляют его агонисты. Одно из

таких соединений – энцениклин – на данный момент (первая половина 2016 года) находится в третьей фазе клинических испытаний как препарат для уменьшения когнитивного дефицита у людей с болезнью Альцгеймера и шизофренией.

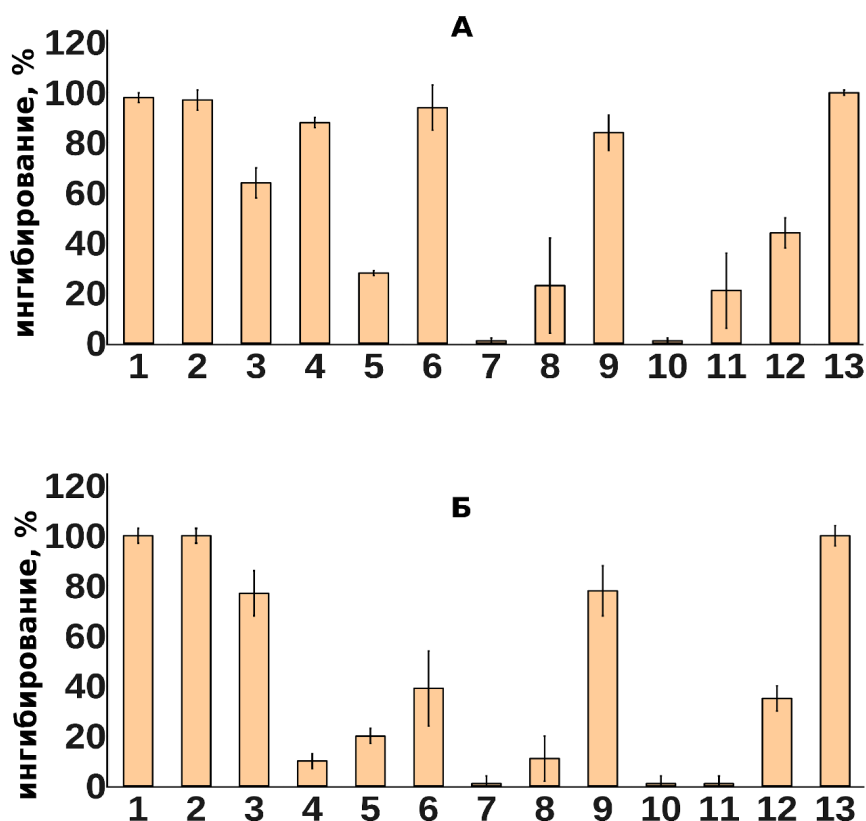


Рисунок 3. Относительное ингибирование токов через ионный канал мышечного nAChR мышцы (А) и $\alpha 7$ nAChR человека (Б) в ответ на аппликацию агониста (ацетилхолина или никотина) тестируемыми веществами в концентрации 10 μ M. Нумерация соответствует приведенной на Рис. 4.

Коллективом ТиБоХ ДВО РАН из морского голожаберного моллюска *Hermisenda crassicornis* было получено соединение 6-бромогипафорин (Рис. 4). Ранее данное соединение уже было выделено из морских губок *Pachymatisma johnstoni*, *Aplysina* sp. и туникаты *Aplidium conicum*. Наш коллектив показал, что 6-бромогипафорин ингибирует связывание [125 I]- α Vgt с $\alpha 7$ nAChR, но не с мышечным nAChR и при этом является агонистом $\alpha 7$ nAChR в присутствии положительного аллостерического модулятора этого рецептора - PNU 120596. Для выяснения селективности действия 6-бромогипафорина нами было проведено исследование его действия на $\alpha 4\beta 2$ nAChR и $\alpha 7$ /GlyR (модельный объект, представляющий собой химерный рецептор, состоящий из

внутриклеточного домена $\alpha 7$ nAChR курицы и трансмембранной и внеклеточной части человеческого $\alpha 1$ ГлиР).

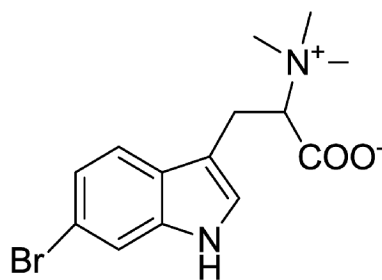


Рисунок 4. Структура 6-бромогипафорина.

Данные, полученные в ходе опытов по двухэлектродной фиксации потенциала мембраны ооцитов *Xenopus laevis*, свидетельствуют о том, что 6-бромогипафорин из морского моллюска *Hermisenda carassicornis* не является агонистом $\alpha 4\beta 2$ nAChR и химерного рецептора $\alpha 7$ /GlyR, что говорит об определенной степени селективности данного соединения в отношении некоторых подтипов nAChR.

Пептидные лиганды

Еще одна группа лигандов Cys-петельных рецепторов - различные пептиды. Наибольшее количество пептидных лигандов Cys-петельных рецепторов представлены группой α -конотоксинов - ингибиторов различных подтипов nAChR. В отделе молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН был открыт первый пептидный ингибитор nAChR, не содержащий дисульфидов - аземиопсин. Аземиопсин представляет собой 21-членный пептид с последовательностью DNWWPKPPHQGPRPPRPRPKP (Рис. 5). Проведенный ранее в отделе молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН аланиновый скрининг показал особую важность ароматических остатков на N-конце пептида, а также единственного гистидина в девятом положении. Нами было предположено, что фрагменты аземиопсина, содержащие данные аминокислотные остатки, могут проявлять ингибирующую активность по отношению к мышечному nAChR. Для проверки этой гипотезы нами было

принято решение синтезировать набор последовательных пятичленных фрагментов аземиопсина, полностью перекрывающих исходную последовательность токсина.

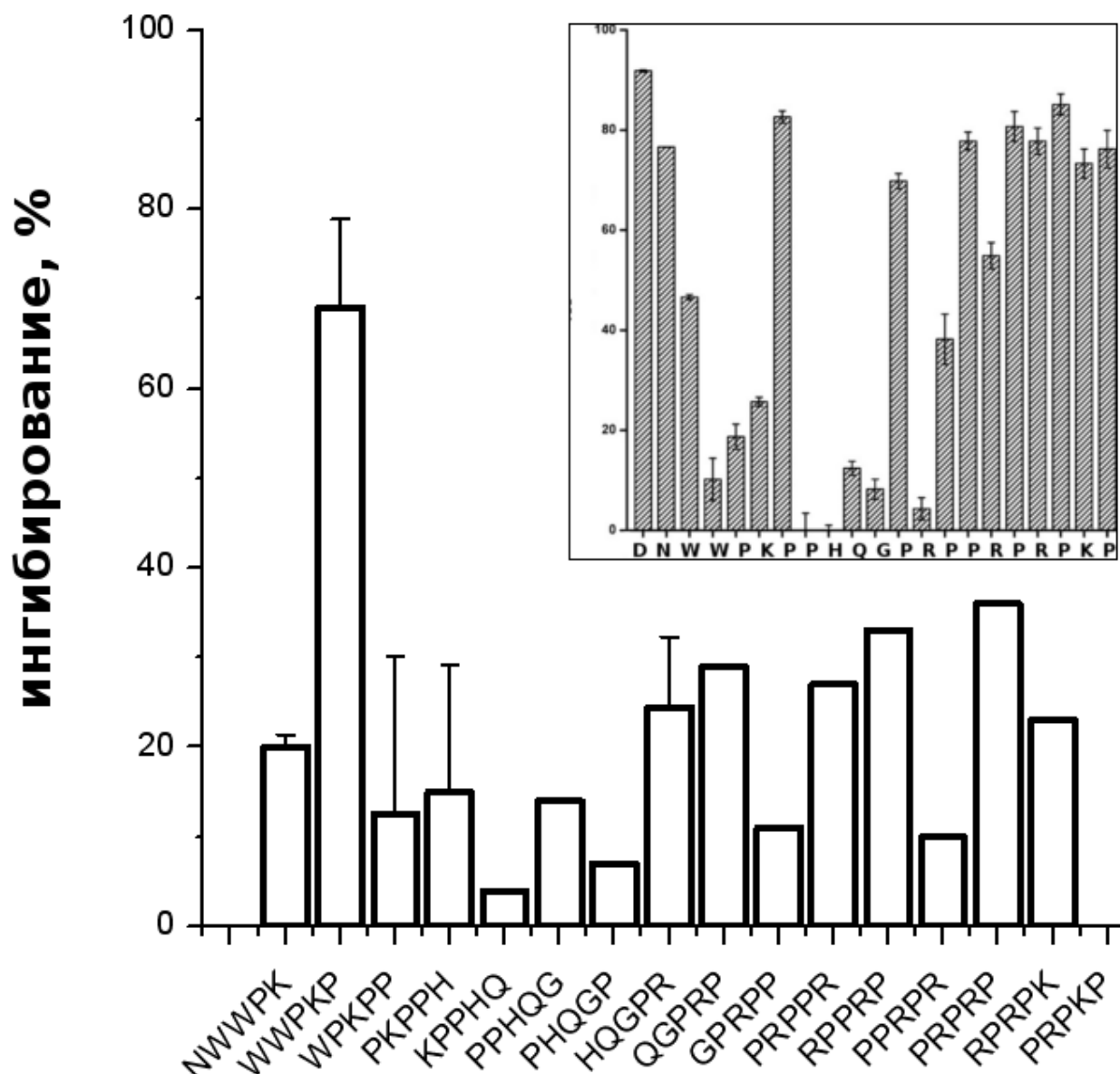


Рисунок 5. Панель пятичленных фрагментов аземиопсина, протестированных на мышечном nAChR. Наибольшую ингибирующую активность показал пептид WWPKP. Врез иллюстрирует результаты аланинового скрининга аземиопсина, полученные ранее в лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН.

Для пептида WWPKP, проявившего максимальную активность, было вычислено значение IC_{50} , составившее 138 ± 24 мкМ. Таким образом, данный пентапептид является довольно низкоаффинным ингибитором мышечного nAChR, а потеря активности в сравнении с полноразмерным аземиопсином составила три порядка. С другой стороны, короткий пятичленный пептид, не

содержащий дисульфидных связей, может быть легко и с высоким выходом синтезирован, как в лаборатории, так и в промышленном производстве. Следовательно, данный пептид представляет интерес как основа для конструирования нового более аффинного ингибитора мышечного nAChP.

Другим важным направлением создания пептидных лигандов Cys-петельных рецепторов является конструирование лигандов ГАМК-А. Ранее зарубежным коллективом авторов были опубликованы данные о взаимодействии α -бунгаротоксина с некоторыми подтипами ГАМК-А. Мы предположили, что другие полипептидные лиганды nAChP также могут оказаться активными в отношении ГАМК-А. Для тестирования мы выбрали α -кобротоксин (результаты тестирования которого обсуждаются далее в разделе «Белковые лиганды»), α -конотоксины ImI и RgIa (селективные в отношении $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAChP), SIA (селективный в отношении мышечного nAChP) и MII (селективный в отношении нейрональных гетеромерных nAChP). Конотоксины SIA и MII показали неспособность ингибировать функциональную активность ГАМК-А с субъединичным составом $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ в концентрации до $100 \mu\text{M}$. В то же время ImI в концентрации $100 \mu\text{M}$ ингибировал данный тип рецептора на $45 \pm 5\%$ (Рис. 6).

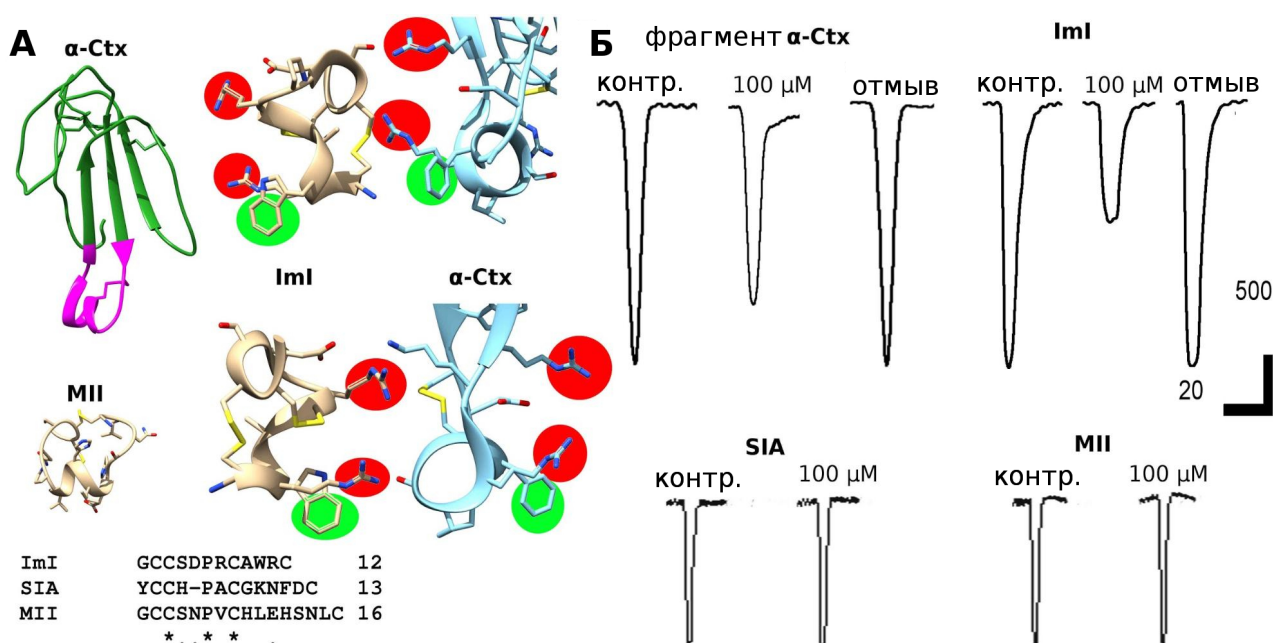


Рисунок 6. Ингибирование ГАМК-А пептидными лигандами: фрагментом α -кобротоксина и α -конотоксином ImI.

Т.к. в ходе нашей работы было показано, что α -кобратороксин эффективно ингибирует ГАМК-А в субмикромольном диапазоне концентраций, было принято решение сконструировать синтетический пептид, имитирующий центральную петлю данного нейротоксина и проверить ее активность по ингибированию ГАМК-А.

Как и ожидалось, пептид NH₂-WCDAFCSIRGKR-OH (дисульфид замкнут) в концентрации 100 μ M ингибировал ГАМК-А с субъединичным составом $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, однако даже в такой высокой концентрации ингибирование составило только 28 ± 10 % .

Таким образом, результаты этих экспериментов показали возможность ингибирования ГАМК-А короткими пептидными токсинами, а также принципиальную возможность создания новых синтетических пептидных лигандов на основе природных полипептидных токсинов.

Однако, классической мишенью коротких пептидных лигандов - α -коботоксинов - являются nAChR различных подтипов. Несмотря на то, что уже существует достаточно широкое разнообразие лигандов данной группы, стоит отметить, что создание новых α -коботоксинов, обладающих улучшенными свойствами по сравнению с исходными молекулами, по-прежнему является актуальной задачей. Ранее в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН с помощью метода поверхностной белковой топографии были предложены замены аминокислотных остатков α -коботоксина PnIA, направленные на улучшение сродства к $\alpha 7$ nAChR: PnIA[R9], PnIa[R9, L10], PnIa[R5, R9, L10, R14]. Для проведения тестирования биологической активности данные пептиды были синтезированы в лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН. Нами было проведено тестирование биологической активности данных трех пептидов в опытах по двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов шпорцевой лягушки, гетерологически экспрессирующих $\alpha 7$ nAChR человека. Все три пептида показали ингибирующую активность по отношению к данному рецептору.

Для оценки аффинности синтезированных аналогов была исследована концентрационная зависимость активности рецептора в присутствии указанных

лигандов (Рис. 7). Несмотря на различия в скорости отмыва лигандов, наблюдаемого в электрофизиологическом тесте, лиганды показали практически идентичные константы ингибирования (27 ± 10 нМ, 27 ± 11 нМ и 17 ± 2 нМ для пептидов PnIA[R9], PnIa[R9, L10] и PnIa[R5, R9, L10, R14] соответственно). Стоит отметить десятикратное улучшение сродства мутированных вариантов конотоксина в сравнении с исходным «базовым» мутантом PnIa[L10], ранее известным по литературе.

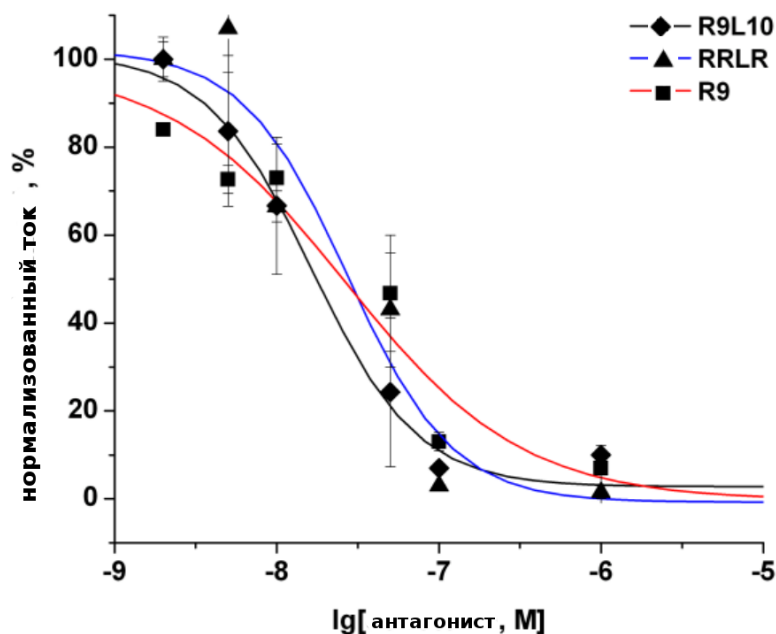


Рисунок 7. Концентрационная зависимость активности рецептора в присутствии синтетических аналогов α -конотоксина PnIA[R9], PnIa[R9, L10] и PnIa[R5, R9, L10, R14].

Лиганды белковой природы

Эндогенные модуляторы nAChR из семейства трехпетельных белков Luvb считаются регуляторами нейрональной пластичности в ЦНС и сетчатке. Однако на данный момент очень немногое известно об их взаимодействии с nAChR на молекулярном уровне. В ходе работы по установлению функционально важных аминокислотных остатков модулятора nAChR Luvx1, были получены данные о молекулярных детерминантах взаимодействия данного модулятора nAChR с никотиновыми рецепторами. Однако аминокислотные остатки самого рецептора, ответственные за взаимодействие с Luvx1, не были установлены.

Для проверки возможности влияния аминокислотной замены Y168A в химерном рецепторе $\alpha 7$ /GlyR нами было проведено электрофизиологическое исследование функциональной активности данного рецептора и мутанта Y168A в присутствии Lynx1.

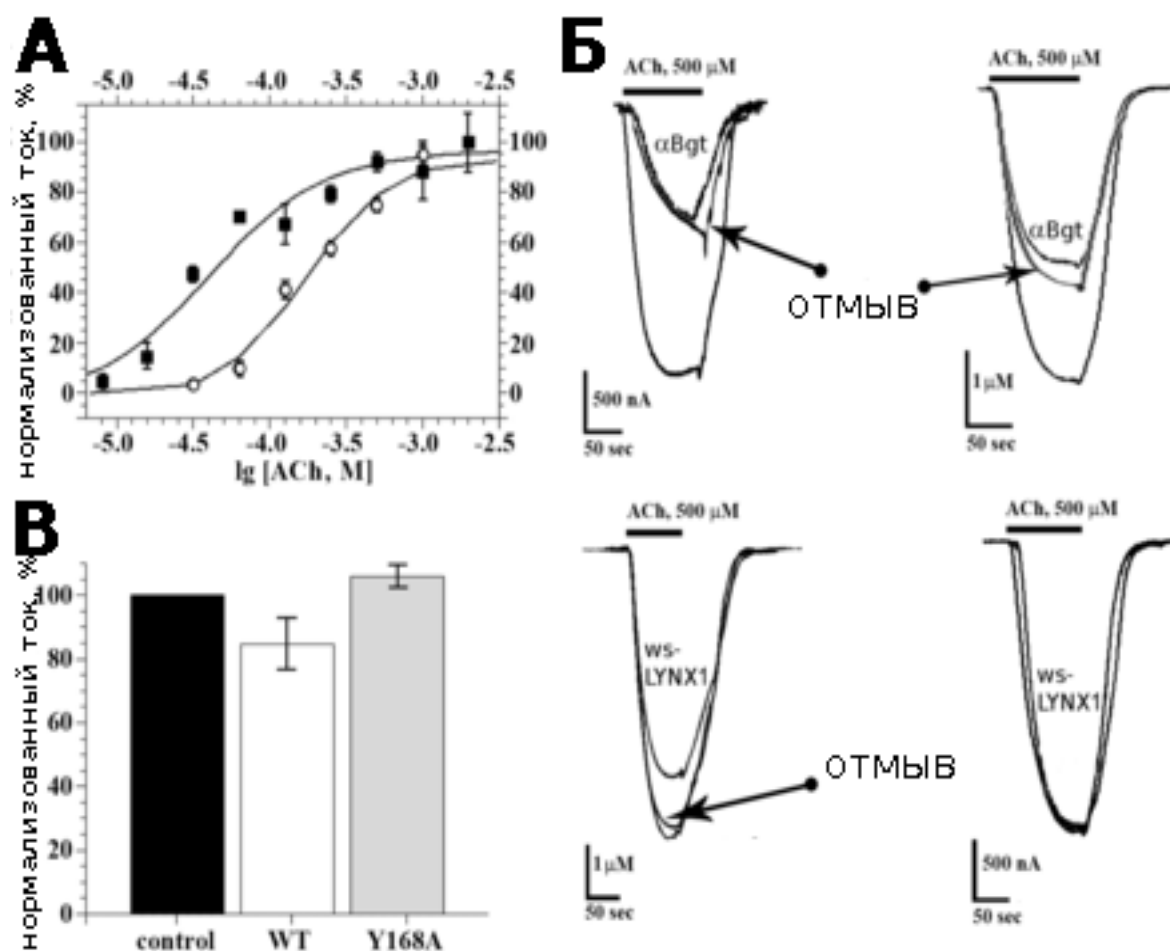


Рисунок 8. Анализ взаимодействия ws-LYNX1 с химерным $\alpha 7$ /GlyR рецептором и его вариантом с точечной заменой Y168A, экспрессированными в ооцитах шпорцевой лягушки. (А) Кривые концентрационной зависимости тока через рецептор в ответ на аппликацию ацетилхолина (круги отмечают нормализованный ответ рецептора дикого типа, квадраты - мутанта Y168A). По приведенным данным были рассчитаны константы EC50: для исходного рецептора $170 \pm 20 \mu\text{M}$, для мутанта - $40 \pm 7 \mu\text{M}$. (Б) Примеры записи токов через исходный (слева) и мутантный (справа) рецептор $\alpha 7$ /GlyR. Показаны контрольные ответы на $500 \mu\text{M}$ ацетилхолин, ответы на $500 \mu\text{M}$ ацетилхолин в присутствии 20 nM αBgt или $20 \mu\text{M}$ ws-LYNX1, а также ответы на ту же концентрацию ацетилхолина после пяти минут отмывки ооцита буфером, не содержащим лигандов. (В) $20 \mu\text{M}$ ws-LYNX1 ингибировал рецептор, не содержащий точечных замен, на $15 \pm 8\%$, однако не ингибировал рецептор с заменой Y168A.

Введение замены тирозина в 168 положении на аланин в некоторой степени улучшило сродство $\alpha 7$ /GlyR к ацетилхолину (Рис. 8А), при этом рецептор сохранил сродство к α -бунгаротоксину (Рис. 8Б).

Однако эффект ингибирования мутантного рецептора водорастворимым аналогом Lypx1 перестал быть детектируемым в данной концентрации лиганда (20 μ М, Рис. 8В), что может говорить о том, что данный участок рецептора является важным либо для взаимодействия Lypx1 с $\alpha 7$ /GlyR, либо для проявления его ингибирующей активности в отношении данного рецептора.

Классическими лигандами nAChR белковой природы являются трехпетельные нейротоксины из ядов змей. Однако, до недавнего времени не было известно белков из этой группы, взаимодействующих с другими представителями Cys-петельных рецепторов. Ранее, однако было показано что α -бунгаротоксин способен связываться с наномольным сродством с ГАМК-А, содержащими минимум две контактирующие друг с другом $\beta 3$ -субъединицы. Тем не менее, существование подобных рецепторов *in vivo* довольно сложно доказать непосредственно, и данное взаимодействие α -бунгаротоксина с ГАМК-А считалось малозначительной деталью.

В Отделе молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН ранее были получены флуоресцентные производные α -кобратоксина. Для оценки прямого связывания данного трехпетельного лиганда было проведено цитохимическое исследование клеток Neuro 2a и НЕК 273, трансфицированных ГАМК-А с субъединичными составами $\alpha 1\beta 3$ и $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (при этом экспрессия $\gamma 2$ -субъединицы и ее включение в состав рецептора было подтверждено электрофизиологическими экспериментами методом локальной фиксации потенциала в конфигурации whole cell, см. далее). Оба подтипа ГАМК-А ярко окрашивались 50 нМ флуоресцентными α -кобратоксином и α -бунгаротоксином, причем специфичность окрашивания была подтверждена вытеснением флуоресцентных лигандов немечеными токсинами, взятыми в концентрации 5 μ М.

Мы исследовали концентрационную зависимость ингибирования α -кобратоксином функционального ответа $\alpha 1\beta 3$ и $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК-А. Экспрессия $\gamma 2$ -субъединицы была подтверждена аппликацией 1 μM диазепама: в соответствии с литературными данными, диазепам, сайт связывания которого находится между субъединицами α и γ , потенцировал функциональный ответ рецептора (Рис. 9А).

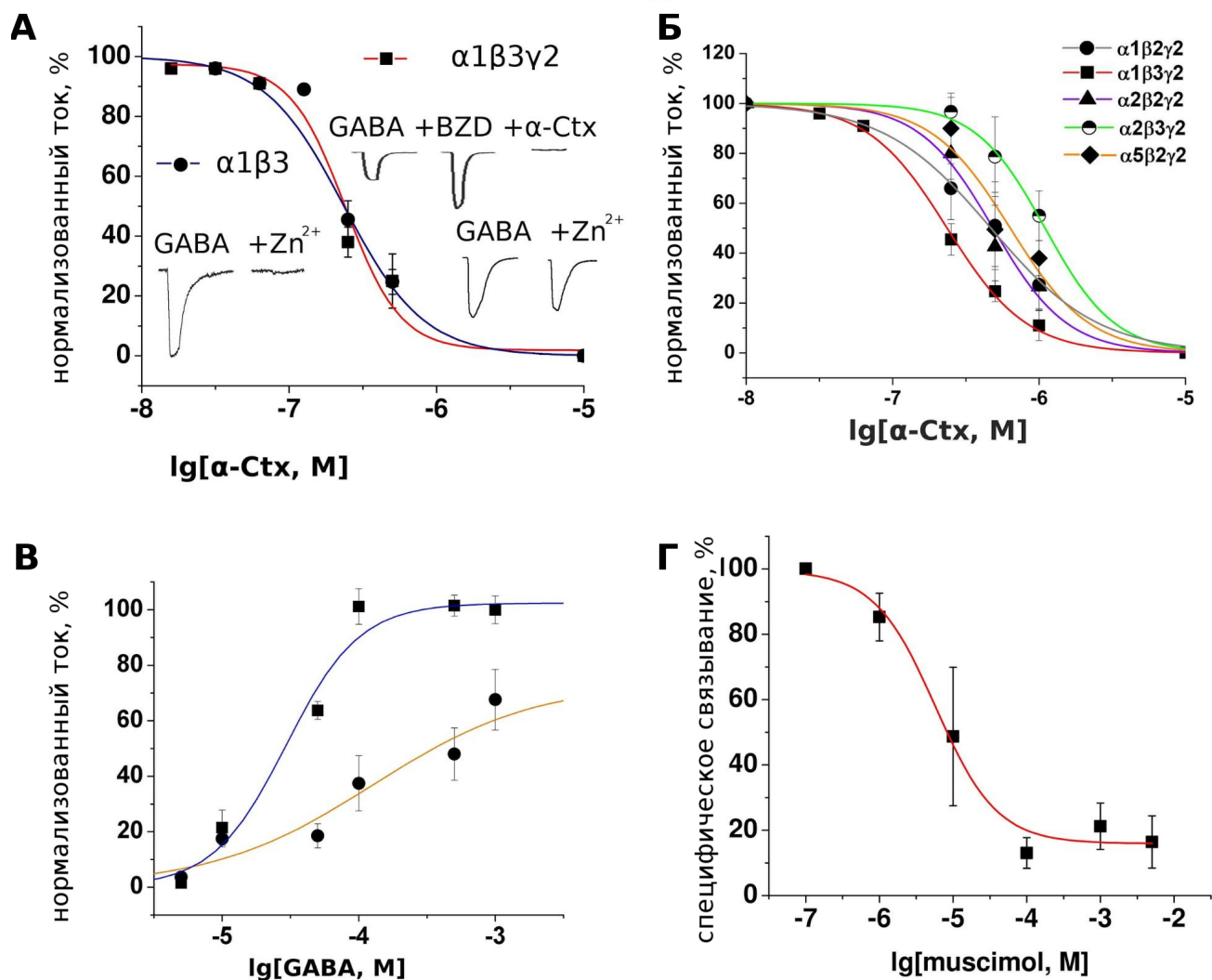


Рисунок 9. Описание взаимодействия α -кобратоксина с ГАМК-А.

Интересно, что α -кобратоксин полностью подавлял токи, стимулированные диазепамом, что говорит о том, что ингибирование осуществляется за счет взаимодействия именно с $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК-А, а не только с, неизбежно возникающими в данной экспрессионной системе, $\alpha 1\beta 3$ ГАМК-А.

Как можно видеть на Рис. 9А, α -кобратоксин имеет весьма близкие аффинности к обоим подтипам рецептора, что свидетельствует об отсутствии влияния на его связывание с рецептором $\gamma 2$ -субъединицы.

Нами было проведено сравнение концентрационных зависимостей ингибирования α -кобратоксином подтипов ГАМК-А с субъединичными составами $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, $\alpha 2\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ и $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ (Рис. 9Б).

В присутствии α -кобратоксина значение EC_{50} ГАМК-А сместилось с 29 ± 7 μM до 128 ± 25 μM (Рис. 9В). Стоит отметить, что даже в присутствии достаточно высоких концентраций ГАМК (1-3 мМ) кривая EC_{50} не выходит на насыщение. Данное наблюдение можно объяснить тем, что связывание α -кобратоксина с одним из двух ортостерических участков приводит к аллостерическим изменениям в пентамере рецептора и уменьшению сродства ГАМК к другому ортостерическому участку. Электрофизиологические данные не позволяют сделать однозначный вывод об участках связывания токсина (это связано скорее с принципиальными ограничениями метода, чем с недостатком полученных данных), однако можно предположить и существование дополнительного неконкурентного ингибирования ГАМК-А α -кобратоксином.

Для проверки предположения о взаимодействии α -кобратоксина с ортостерическим участком связывания мы провели опыты по вытеснению флуоресцентно-меченного α -кобратоксина (флуорофор Alexa Fluor 546) агонистом ГАМК-А мусцимол, сайт связывания которого находится в ортостерическом участке на границе β и α субъединиц, с клеток, экспрессирующих ГАМК-А. Действительно, мусцимол в концентрации 200 μM уменьшил окрашивание клеток флуоресцентным производным α -кобратоксина на 80%. В то же время, положительный аллостерический модулятор диазепам, сайт связывания которого, как считается, находится на границе α и γ субъединиц, не влиял на окрашивание клеток в концентрациях вплоть до 400 μM . Значение IC_{50} для ингибирования мусцимолем связывания меченного кобратоксина с клетками, экспрессирующими ГАМК-А - 15 μM - достаточно хорошо согласуется с литературными данными по взаимодействию мусцимола

с ГАМК-А. Оставшиеся 20% окрашивания, не вытесняемые мусцимолом, могут, как мы считаем, свидетельствовать о наличии дополнительного неконкурентного участка связывания (Рис. 9Г).

Мы также проверили, не ингибирует ли α -кобратоксин ГлиР - другой хлорный лиганд-управляемый канал из семейства Cys-петельных рецепторов. Оказалось, что в концентрациях до 40 μ M, α -кобратоксин не ингибирует α 1 гомопентамерный ГлиР человека, что говорит об определенной селективности действия данного токсина.

На основании полученных нами экспериментальных и литературных данных мы предложили модель (Рис. 10 А и Б) возможного строения комплекса α -кобратоксина с ортостерическим сайтом ГАМК-А.

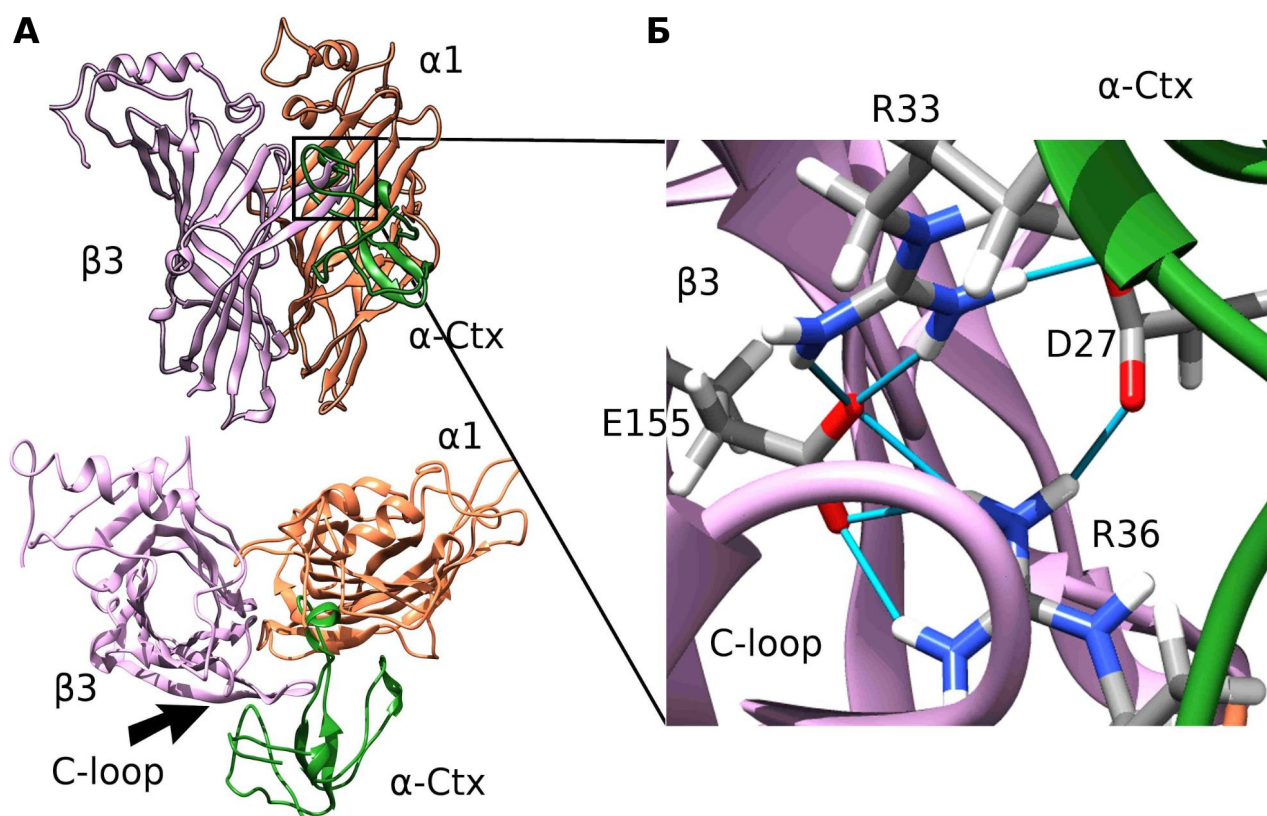


Рисунок 10. Модель комплекса α -кобратоксина с ортостерическим сайтом ГАМК-А.

Мы предположили, что структура комплекса α -кобратоксина с ГАМК-А может иметь общие черты со структурой комплекса того же токсина с АхСБ (PDB 1YI5). Для этого предположения есть несколько оснований: 1) достаточно

высокая (24%) гомология внеклеточных доменов β и α субъединиц ГАМК-А и мономеров АхСБ; 2) еще большая (47%) гомология между ГАМК-А и АхСБ наблюдается, если брать в рассмотрение только остатки АхСБ, непосредственно контактирующие с α -кобратоксином, таким образом “с точки зрения токсина” два этих рецептора отличаются не слишком сильно; 3) исходя из полученных нами данных, связывание α -кобратоксина с ГАМК-А происходит в районе гидрофобного кармана под петлей С β 3 субъединицы, что подтверждается конкуренцией токсина с мусцимолом; 4) в связывании α -кобратоксина с ГАМК-А, также как и с АхСБ (а также nАхР) важную роль играет центральная петля, что было показано нами на примере синтетического фрагмента центральной петли α -кобратоксина.

Основываясь на предложенной нами модели комплекса α -кобратоксина с ГАМК-А мы предположили, что селективность α -кобратоксина, по крайней мере частично, может быть обусловлена, например, аминокислотными остатками, несущими положительный заряд. При анализе аминокислотных последовательностей и гомологичных моделей структур α 1 и α 2 субъединиц обращает на себя внимание прежде всего остаток в положении 67: S67 в α 1 и K67 в α 2 субъединице. Для проверки гипотезы о возможном влиянии данных аминокислотных остатков на сродство к α -кобратоксину нами были протестированы мутантные формы субъединиц ГАМК-А α 1(S67K) и α 2(K67S). В соответствии с нашими предположениями, значения IC_{50} для ингибирования α -кобратоксином данных мутантных рецепторов составили 703 ± 39 нМ и 442 ± 54 нМ соответственно. Таким образом сродство α -кобратоксина к мутантным вариантам субъединиц ГАМК-А подчиняется следующим закономерностям: α 1 > α 2(K67S) > α 1(S67K) > α 2, что косвенно подтверждает правомерность построенной нами модели комплекса токсина с рецептором.

Выводы

- 1) Сочетанием компьютерного моделирования, радиолигандного анализа и электрофизиологии исследовано взаимодействие ряда низкомолекулярных, пептидных и белковых соединений с никотиновыми и другими Cys-петельными рецепторами.
- 2) Впервые проанализирована способность взаимодействовать с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами для 15 природных низкомолекулярных соединений из морских губок, моллюсков и асцидий. Для ряда соединений обнаружено сродство в микромолярном диапазоне к мышечному и/или $\alpha 7$ нейрональному типу рецептора.
- 3) В серии синтетических укороченных фрагментов аземиопсина, пептида из яда бирманской гадюки, блокирующего мышечные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, найден пентапептид WWPKP - лиганд мышечного nAChR с сродством 138 мкМ.
- 4) Показано, что сконструированные новые аналоги α -конотоксина PnIA имеют значительно более высокое сродство к $\alpha 7$ nAChR (IC₅₀ 10-30 нМ), чем исходный конотоксин.
- 5) Исследовано взаимодействие серии белковых нейротоксинов из ядов змей с ионотропными рецепторами γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-А) и показано, что α -кобратоксин и α -бунгаротоксин различаются по специфичности в отношении различных подтипов этого рецептора. Впервые обнаружено ингибирование ГАМК-А некоторыми α -конотоксинами, признанными блокаторами nAChR.
- 6) При исследовании взаимодействия мутанта $\alpha 7$ nAChR Y168A с водорастворимым аналогом эндогенного трехпетельного «прототоксина» - белка Lypx1 - получена первая информация о расположении его аллостерического участка связывания.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи:

1. **Kudryavtsev D**, Makarieva T, Utkina N, Santalova E, Kryukova E, Methfessel C, Tsetlin V, Stonik V, Kasheverov I. Marine natural products acting on the acetylcholine-binding protein and nicotinic receptors: From computer modeling to binding studies and electrophysiology. *Marine drugs*. 2014 Mar 28;12(4):1859-75.
2. Kasheverov IE, Shelukhina IV, **Kudryavtsev DS**, Makarieva TN, Spirova EN, Guzii AG, Stonik VA, Tsetlin VI. 6-Bromohypaphorine from Marine Nudibranch Mollusk *Hermissenda crassicornis* is an Agonist of Human $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Marine drugs*. 2015 Mar 12;13(3):1255-66.
3. Кашеверов И.Е., **Кудрявцев Д.С.**, Иванов И.А., Жмак М.Н., Чугунов А.О., Табакмахер В.М., Зелепуга Е.А., Ефремов Р.Г., Цетлин В.И.. Рациональное конструирование новых лигандов никотиновых рецепторов на основе альфа-конотоксина PnIa. Доклады Академии наук. 2015. Т. 461. № 4. С. 476.
4. **Kudryavtsev DS**, Shelukhina IV, Son LV, Ojomoko LO, Kryukova EV, Lyukmanova EN, Zhmak MN, Dolgikh DA, Ivanov IA, Kasheverov IE, Starkov VG. Neurotoxins from Snake Venoms and α -Conotoxin ImI Inhibit Functionally Active Ionotropic γ -Aminobutyric Acid (GABA) Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Sep 11;290(37):22747-58.
5. Lyukmanova EN, Shulepko MA, Buldakova SL, Kasheverov IE, Shenkarev ZO, Reshetnikov RV, Filkin SY, **Kudryavtsev DS**, Ojomoko LO, Kryukova EV, Dolgikh DA. Water-soluble LYNX1 residues important for interaction with muscle-type and/or neuronal nicotinic receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 May 31;288(22):15888-99.
6. **Kudryavtsev D**, Shelukhina I, Vulfius C, Makarieva T, Stonik V, Zhmak M, Ivanov I, Kasheverov I, Utkin Y, Tsetlin V. Natural Compounds Interacting with Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Low-Molecular Weight Ones to Peptides and Proteins. *Toxins*. 2015 May 14;7(5):1683-701.

Тезисы:

1. Tsetlin, V.I., Kasheverov, I.E., **Kudryavtsev, D.S.**, Shelukhina, I.V., Spirova, E.N., Vulfius, E.A., Utkin, Y.N., Makarieva, T.N., Stonik, V.A., Zhmak, M.N. and Hollmann, M., 2015, July. Novel compounds acting on nicotinic acetylcholine receptors: from low molecular ones to peptides and proteins. In FEBS JOURNAL (Vol. 282, pp. 14-14). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL
2. **Кудрявцев Д. С.**, Сон Л. В., Шелухина И. В., Цетлин В. И., Уткин Ю. Н. Новые белковые и пептидные лиганды ионотропных рецепторов гамма-аминомасляной кислоты. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» Новосибирск 2015 г.ООО «Офсет-ТМ».
3. **Кудрявцев Д.С.**, Кашеверов И. Е., Цетлин В. И. Смешанное ингибирование никотиновых и ГАМК-А рецепторов некоторыми низкомолекулярными, пептидными и белковыми лигандами. XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 2016 г., Полиграфический участок ИБХ РАН.
4. **Kudryavtsev DS**,Buldakova SL, Shulepko MA, Paramonov AS, Shenkarev ZO, Mineev KS, Kasheverov IE, Arseniev AS, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP, Bregestovski PD, Lyukmanova EN, Tsetlin VI. Binding sites for Lynx1 and SLURP1, endogenous modulators of neuronal and non-neuronal nicotinic receptors. 4th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, Giessen 2014.

Выражаю благодарность всем сотрудникам лабораторий отдела молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН за помощь в работе и создание благоприятного трудового климата; Люкмановой Екатерине Назымовне (лаборатория инженерии белка ИБХ РАН) за сотрудничество в рамках работы по исследованию взаимодействия трехпетельных токсинов с ионотропными рецепторами гамма-аминомасляной кислоты, а также полезную критику.

Особую благодарность за помощь в работе над той же статьей выражаю старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН Шелухиной Ирине Валерьевне, а также Сон Лине Викторовне (МФТИ), выполнявшей в нашей лаборатории дипломную работу бакалавра.