

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 CYS-ПЕТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

(специальность 03.01.03 – молекулярная биология)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Кашеверов И. Е.

Москва – 2016

Оглавление

Оглавление.....	2
Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	6
1.1 Рецепторы беспозвоночных и прокариот.....	7
1.1.1 Ацетилхолин-связывающий белок.....	7
1.1.2 ELIC и GLIC.....	8
1.1.3 Глутамат-активируемый хлорный канал <i>C.elegans</i>	9
1.2 Рецепторы позвоночных.....	10
1.2.1 Никотиновые рецепторы.....	10
1.2.2 Ионотропный рецептор 5-окситриптамина (серотонина) - 5-OT3 (5-НТЗ).....	11
1.2.3 Цинк-активируемый канал.....	13
1.2.4 ГАМК-А.....	13
1.2.5 Глициновый рецептор.....	14
1.3 Функциональная роль <i>Cys</i> -петельных рецепторов.....	15
1.3.1 Нервная система.....	15
1.3.2 Сетчатка глаза.....	17
1.3.3 Опорно-двигательный аппарат.....	18
1.3.4 Иммунная система.....	19
1.3.5 Кератиноциты кожи и полости рта.....	20
1.3.6 Дыхательные пути.....	20
1.4 Физиологические эффекты лигандов <i>Cys</i> -петельных рецепторов.....	21
1.5 Лиганды <i>Cys</i> -петельных рецепторов.....	21
1.5.1 Низкомолекулярные лиганды.....	21
1.5.2 Пептидные лиганды.....	23
1.5.3 Лиганды белковой природы.....	24
2 Материалы и методы.....	27
2.1 Материалы.....	27

2.2 Методы.....	27
2.2.1 Электрофизиология.....	27
2.2.2 Визуализация живых клеток с помощью флуоресцентных лигандов.....	28
2.2.3 Молекулярное моделирование.....	29
3 Результаты и обсуждение.....	31
3.1 Низкомолекулярные лиганды.....	31
3.1.1 Низкомолекулярные антагонисты nAChR из морских губок и асцидий.....	31
3.1.2 Агонист $\alpha 7$ nAChR из морского моллюска <i>Hermissenda</i> <i>carassicornis</i>	38
3.2 Пептидные лиганды.....	40
3.2.1 Фрагменты аземиопсина.....	40
3.2.2 Пептидные антагонисты ГАМК-А.....	45
3.2.3 Пептидные антагонисты nAChR на основе α - конотоксинов.....	47
3.3 Лиганды белковой природы.....	49
3.3.1 Эндогенный модулятор nAChR Lypx1.....	49
3.3.2 Трехпетельные антагонисты ГАМК-А из ядов змей.....	50
Заключение.....	61
Выводы.....	62
Список сокращений.....	63
Список литературы.....	64

Введение

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.

Сус-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-А) 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 Сус-петельных рецепторов. В 2015 году также были разрешены кристаллические структуры 5-ОТ3, ГлиР и ГАМК-А.

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.

1. Обзор литературы

Cys-петельные рецепторы, по-видимому, появились в эволюционном процессе достаточно рано, т.к. они были найдены у двух различных групп бактерий, первичноротых и у позвоночных. В настоящее время в литературе практически не описаны Cys-петельные рецепторы высших растений и простейших, однако, вероятность их обнаружения у представителей этих групп может быть достаточно высокой. Например, совсем недавно были опубликованы данные о гене, кодирующем, вероятно, Cys-петельный рецептор, который найден в геноме одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [1] и других одноклеточных и колониальных водорослей [2]. Все вместе эти факты позволяют говорить о всеобщей представленности Cys-петельных рецепторов в живой природе.

В то время как функция Cys-петельных рецепторов одноклеточных организмов остается пока неизвестной (предполагается, что рН-чувствительные каналы могут играть роль в хемотаксисе [3]), функция их гомологов у многоклеточных, по-видимому, связана в основном с быстрой синаптической передачей сигнала в нервной системе. Впрочем, все больше данных говорят о том, что и за пределами нервной системы (например, в иммунной [4]) Cys-петельные рецепторы также играют важную роль.

В данном обзоре литературы в краткой форме изложены имеющиеся сведения о Cys-петельных рецепторах различных организмов, отдельные разделы посвящены распределению Cys-петельных рецепторов млекопитающих различных подтипов в органах и системах органов, а также их низкомолекулярным, пептидным и белковым лигандам, физиологическим эффектам этих лигандов.

По влиянию на функциональную активность рецептора большинство лигандов Cys-петельных рецепторов можно отнести к одной из следующих групп: прямые агонисты (полные или частичные), обратные агонисты, конкурентные антагонисты, неконкурентные антагонисты и аллостерические модуляторы.

1.1 Рецепторы беспозвоночных и прокариот

Долгое время после открытия мышечного никотинового рецептора - первого из обнаруженных представителей Cys-петельных рецепторов - его структура оставалась загадкой. Впервые к атомистическому уровню исследования рецептора удалось подобраться с помощью криоэлектронной микроскопии [5]. И по сей день этот метод остается единственным источником информации о структуре непосредственно мышечного никотинового рецептора, давая возможность оценить связь рецептора с цитоскелетом [6] и исследовать структурные изменения, происходящие под действием агониста [7]. Устройство ионного канала активно изучалось с помощью ЯМР-спектроскопии [8–10]. Однако, с появлением первых структур ацетилхолин-связывающего белка (АхСБ) [11] произошел качественный сдвиг в понимании устройства внеклеточной части пентамерного комплекса Cys-петельных рецепторов. Относительная простота кристаллизации позволила получить структуры комплексов разнообразных лигандов никотиновых рецепторов с АхСБ [12]. В дальнейшем были открыты и закристаллизованы Cys-петельные рецепторы двух прокариот - *Erwinia chrisanthemi* и *Gloebacter violaceus* [13,14]. Существенный вклад в понимание функционирования Cys-петельных рецепторов с хлорным каналом внесла кристаллизация и установление трехмерной структуры глутамат-активируемого хлорного канала нематоды *Caenorhabditis elegans* (Glu-Cl)[15].

1.1.1 Ацетилхолин-связывающий белок

Ацетилхолин-связывающий белок - модулятор синаптической передачи в синапсах нервной системы некоторых моллюсков [16]. Он является не клеточным рецептором ацетилхолина, а секретлируемым в синаптическую щель пентамерным белком, гомологичным внеклеточной части nAChR. С момента его открытия и

получения его первой кристаллической структуры в 2001 году было опубликовано более ста структур комплексов АхСБ с различными лигандами (см. www.rcsb.org). Этим методом охарактеризовано множество лигандов от низкомолекулярных соединений (ацетил- и карбамоилхолин [17], неоникотиноиды [18], кокаин и многие другие (см. обзор [19])) до пептидов и белков (конотоксины, трехпетельные токсины [20]).

Несмотря на то, что АхСБ сами по себе являются достаточно релевантными моделями nAChR, активно разрабатываются мутантные версии этих белков, более точно имитирующие участки связывания лигандов nAChR конкретных подтипов. Использование подобных мутантных и химерных АхСБ позволяет более эффективно вести скрининг активных соединений и получать структуры комплексов перспективных лигандов nAChR, приближенные к структурам с нативным рецептором. Так, например, создан мутантный АхСБ, имитирующий участок связывания на межсубъединичном $\alpha 4$ - $\alpha 4$ интерфейсе [21], и химерный белок, близкий по структуре к $\alpha 7$ [22].

1.1.2 ELIC и GLIC

При изучении кристаллических структур высокого разрешения комплексов АхСБ с различными лигандами было получено огромное количество данных, которые позволяют интерполировать их взаимодействие с полноценными Cys-петельными рецепторами и предполагать происходящие при этом конформационные перестройки. Однако полная структура высокого разрешения ни одного из катион-проницаемых Cys-петельных рецепторов человека (и позвоночных вообще) до недавних пор не была установлена. Поэтому важным шагом стала успешная кристаллизация мембранных белков термофильных архей *Erwinia chrisanthemi* и *Gloeobacter violaceus* [13,14], что позволило изучить связывание некоторых лигандов Cys-петельных рецепторов за пределами

внутриклеточной части, в том числе н-спиртов [23], бензодиазепинов [24] и кетамина [25].

Полноценная трехмерная структура высокого разрешения открыла возможности для компьютерного эксперимента и получения атомистического представления о механизме функционирования Cys-петельных рецепторов в микросекундном временном масштабе [26].

1.1.3 Глутамат-активируемый хлорный канал *C.elegans*

Прокариотические родственники Cys-петельных рецепторов многоклеточных организмов впервые позволили изучить устройство белковых комплексов данного типа. Однако с публикацией первой кристаллической структуры анионного Cys-петельного рецептора (Glu-Cl) [15] появилась возможность изучить аллостерические механизмы и связывание лигандов ГлиР и ГАМК-А. На данный момент с помощью этой модели изучено связывание таких важных для исследования анионных Cys-петельных рецепторов лигандов, как пикротоксин и ивермектин [15], а также исследован механизм открытия ионного канала у апоформы рецептора [27]. Удалось в деталях изучить строение канала и селективного фильтра, что несомненно повлияет на дальнейшие исследования ГлиР и ГАМК-А, а также их лигандов.

Публикация кристаллической структуры Glu-Cl в базе данных www.rcsb.org расширила спектр шаблонов для получения моделей трехмерных структур гомологичных белков. Так, например, было показано, что Glu-Cl является оптимальным шаблоном для гомологичного моделирования гомопентамерного ГАМК-А ρ -типа [28].

1.2 Рецепторы позвоночных

1.2.1 Никотиновые рецепторы

Сус-петельные рецепторы, относящиеся к группе никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) и рецепторов серотонина (5-окситриптамина) третьего типа (5-ОТЗ) тесно связаны эволюционно - серотониновые рецепторы весьма близки по первичной структуре гомопентамерным $\alpha 7$ nAChR. Это родство выражается также и во многих фармакологических особенностях. Например 5-ОТЗ активируется высокими дозами ацетилхолина, а $\alpha 7$ nAChR ингибируется антагонистами 5-ОТЗ из группы сетронов (ондансетрон, трописетрон, гранисетрон и др.) [29].

Мышечный никотиновый рецептор (Рис. 2) - первый обнаруженный Сус-петельный рецептор [30], он же бесспорно является и наиболее изученным среди никотиновых рецепторов, различных субъединиц которых у позвоночных животных на данный момент обнаружено семнадцать [31]. В различных областях ЦНС человека экспрессируются девять α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) и три β субъединицы ($\beta 2$ - $\beta 4$) [32]. Выброс множества других медиаторов (γ -аминомасляная кислота, глутаминовая кислота, дофамин и серотонин) в синаптическую щель может контролироваться активацией различных никотиновых рецепторов [33]. Благодаря этому мутации генов никотиновых рецепторов и их модуляторов [34], а также изменение их экспрессии связаны с развитием разнообразных социально-значимых патологий, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, синдром дефицита внимания, депрессия, шизофрения, синдром Туретта, эпилепсия, тревожное расстройство, хроническая боль, ожирение и никотиновая зависимость. Помимо этого, интенсивно исследуется вопрос о роли никотиновых рецепторов в воспалительных процессах, диабете, респираторных и кожных заболеваниях, атеросклерозе и раке [35].

Конкурентные и неконкурентные антагонисты nAChR такие, как d-тубокурарин, α -конотоксины и трехпетельные α -нейротоксины из ядов змей, предотвращают возникновение возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) мембраны нейрона или мышечного волокна, несущего соответствующий подтип рецептора. Соответственно, в случае мышечного подтипа nAChR под действием антагонистов мышечное волокно теряет восприимчивость к стимуляции ацетилхолином. Этот эффект используется в медицине для расслабления скелетной мускулатуры во время хирургических операций [36]. Ингибирование nAChR в ганглиях висцеральной нервной системы (ВНС), например гексаметонием, приводит к снижению артериального давления. В связи с этим, данный блокатор nAChR применялся для лечения хронической гипертензии, однако его использование было прекращено из-за наличия у препарата широкого спектра побочных эффектов, также связанных с ингибированием nAChR: глаукома, ухудшение зрения, уменьшение секреции слезной и слюнных желез [37]. Агонисты nAChR, такие как никотин, вызывают выброс адреналина, благодаря активации nAChR в мозговом веществе надпочечников [38]. Сукцинилхолин, являющийся агонистом мышечного nAChR, деполяризует концевую пластинку (постсинаптическая мембрана в нервно-мышечном синапсе) и десенситизирует рецептор, приводя, в конечном итоге, к расслаблению мышц, в связи с чем используется в качестве быстродействующего миорелаксанта [39]. Положительные аллостерические модуляторы nAChR рассматриваются сейчас как перспективные препараты для устранения когнитивных расстройств у людей с болезнью Альцгеймера и шизофренией [40,41].

1.2.2 Ионотропный рецептор 5-окситриптамина (серотонина) - 5-OT₃ (5-HT₃)

Как уже было сказано выше, ионотропный серотониновый рецептор - очень близкий родственник nAChR. Например, гомология $\alpha 7$ nAChR с 5-OT₃ составляет около 29% по аминокислотной последовательности, а гомология того же подтипа

hAhP с субъединицами других подтипов колеблется от 30 до 45%. Сходство на уровне аминокислотной последовательности подкрепляется и тем, что многие лиганды hAhP являются также и лигандами 5-OT3. Среди общих лигандов - антагонист тубокурарин [42]. Первоначально названный M-рецептором, серотониновый рецептор третьего типа был открыт Gaddum и Picarelli [43]. Это Cys-петельный рецептор, образующий каналы с проводимостью 9 и 15 пикосименс [44]. Ионный канал рецептора обладает проводимостью для моно- и дивалентных катионов, однако ингибируется высокими (около 1 мМ) концентрациями ионов кальция и магния [42]. Наибольшее число участков связывания радиоактивных лигандов 5-OT3 в ЦНС наблюдается в заднем поле (*area postrema*, участок ромбовидной ямки, где проецируются ядра блуждающего нерва) и в ядре одиночного пути (*solitary nucleus*) [45]. Рецептор также экспрессируется в периферической нервной системе и кишечнике [46].

Пентамер 5-OT3 может состоять как из одинаковых субъединиц, так и из субъединиц двух разных типов (А и В) [29]. Примечательно, что гомопентамерный рецептор имеет сниженную степень десенситизации, состояния, при котором рецептор связан с агонистом, но не пропускает ионы [46].

Антагонисты ионотропного серотонинового рецептора подавляют рвотный рефлекс и применяются для устранения тошноты и рвоты у пациентов, проходящих курсы химиотерапии различных раковых заболеваний [47]. Положительный аллостерический модулятор 5-OT3 — 5-хлориндол — вызывает увеличение амплитуды и продолжительности сокращения стенок желчного пузыря [48]. Селективные агонисты данного типа рецепторов улучшают результаты модельных животных в тестах на развитие памяти [49] и увеличивают подвижность кишечника [48], в связи с чем рассматриваются в настоящее время, как перспективные терапевтические средства. Недавняя публикация структуры гомопентамерного 5-OT3, полученной методами рентгенографической кристаллографии расширяет возможности исследователей по рациональному дизайну новых лигандов 5-OT3 [50].

1.2.3 Цинк-активируемый канал

ZAC (Zinc Activated Channel) отсутствует в геномах мыши и крысы (*Mus sp.* и *Rattus sp.* соответственно), и, возможно, поэтому данный лиганд-управляемый ионный канал был обнаружен только в 2005 году [51] в геномах человека и собаки. Он имеет некоторую гомологию с 5-OTЗ, однако не может быть отнесен к данному семейству рецепторов на основании аминокислотной последовательности. Экспрессия гена, кодирующего данный Cys-петельный рецептор в клеточных линиях приводит к появлению постоянно присутствующего ионного тока, блокируемого d-тубокурарином. Аппликация на эти клетки раствора, содержащего ионы цинка вызывает увеличение ионного тока, что дало основания предполагать функционирование данного рецептора в качестве сенсора цинка [51].

1.2.4 ГАМК-А

γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) является одним из основных медиаторов торможения в нервной системе [52]. ГАМК взаимодействует с рецепторами двух типов - metabotropicными, которые относятся к G-белок сопряженным рецепторам, и ionotropicными. Ionotropicные рецепторы ГАМК типа А (ГАМК-А) относятся к Cys-петельным рецепторам с анионным каналом. ГАМК-А представлены в ЦНС в основном гетеропентамерами субъединиц $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, а также δ , ϵ , π и θ [53]. Также существует подгруппа гомо- и гетеропентамерных ГАМК-А состоящих из $\rho 1-3$ субъединиц [28]. Известно также, что $\beta 1$ и $\beta 3$ субъединицы, как правило входящие в состав гетеропентамерных ГАМК-А вместе с двумя α -субъединицами, способны формировать помимо гетеро- также и гомопентамеры. Такие гомопентамеры не активируются ГАМК и обладают высоким уровнем

конститутивной активности [54], однако именно для гомопентамера $\beta 3$ субъединиц рентгеноструктурным анализом получена трехмерная структура [55].

Так как ГАМК-А экспрессируются в ЦНС повсеместно, они так или иначе задействованы в осуществлении практически всех функций нервной системы. Следовательно, нарушение их функционирования в результате даже небольших мутаций становится причиной развития тяжелых патологий, одной из наиболее социально-значимых из которых является эпилепсия [56]. Другое патологическое состояние нервной системы - шизофрения - во многих случаях связано с недостаточностью синтеза нейромедиаторов (в том числе ГАМК). При этом в мозге наблюдается повышение уровня экспрессии ГАМК-А [57].

ГАМК-А являются мишенью множества низкомолекулярных токсинов, таких как блокатор канала пикротоксин [58], полиацетиленовое соединение энантоксин и его гомологи [59], конкурентный антагонист бикикуллин [60], а также агонисты иботеновая кислота и мусцимол. Положительные аллостерические модуляторы ГАМК-А из группы бензодиазепинов некоторое время даже были самыми используемыми лекарствами в мире [61], что косвенно подтверждает перспективность использования рецепторов данного типа в качестве терапевтической мишени.

1.2.5 Глициновый рецептор

ГлиР, участвующий в процессах торможения во многих структурах ЦНС, состоит из α и β субъединиц [62] и плотно ассоциирован с цитоплазматическим белком гиферином [63]. У позвоночных животных в данный момент обнаружено четыре гена, кодирующих α субъединицы, и один ген, кодирующий β субъединицу [64]. Стехиометрическое соотношение субъединиц в пентамере - две α и три β субъединицы [65], при этом агонист связывается на всех вариантах межсубъединичных участков [64]. Недавно методом криоэлектронной микроскопии были установлены структуры ГлиР *Danio rerio* в комплексах с

различными лигандами [66]. Вскоре после публикации крио-электронных структур ГлиР в различных состояниях вышла и статья (обе статьи вышли в одном номере Nature, но электронные версии статей появились последовательно с небольшим разрывом по времени) с рентгеноструктурным анализом человеческого ГлиР в комплексе с антагонистом - стрихнином [67]. Полученные структуры, несомненно углубят понимание механизмов функционирования Cys-петельных рецепторов и подстегнут работы по конструированию селективных лигандов ГлиР.

Наиболее значимым патологическим следствием нарушения функционирования глициновых рецепторов является наследственная гиперплексия [68]. Также прослеживаются связи нарушения функционирования ГлиР с развитием аутизма [69] и эпилепсии [70].

Ионный канал глицинового рецептора проницаем для хлора и подвержен ингибированию многими блокаторами хлорных каналов: пикротоксином, гингколидом Б, трифенилцианоборатом и др. [71]. Глициновый рецептор крайне восприимчив к стрихнину [72] и является основным сайтом связывания этого растительного алкалоида в мозге. Однако, на данный момент актуальна задача создания селективных лигандов глициновых рецепторов, т. к. лиганды известные на данный момент связываются со множеством других мишеней в ЦНС, что затрудняет интерпретацию результатов поведенческих и нейрофизиологических опытов [73].

1.3 Функциональная роль cys-петельных рецепторов

1.3.1 Нервная система

Функционирование нервной системы зависит от особенностей синаптической передачи сигнала и представители суперсемейства Cys-петельных рецепторов участвуют в этом процессе [32,45,46,62,74]. Никотиновые рецепторы, например,

участвуют в пресинаптической (Рис. 1) регуляции выброса нейромедиаторов [33], выполняя при этом функцию “переключателя”, повышающего вероятность прохождения сигнала через данный синапс.

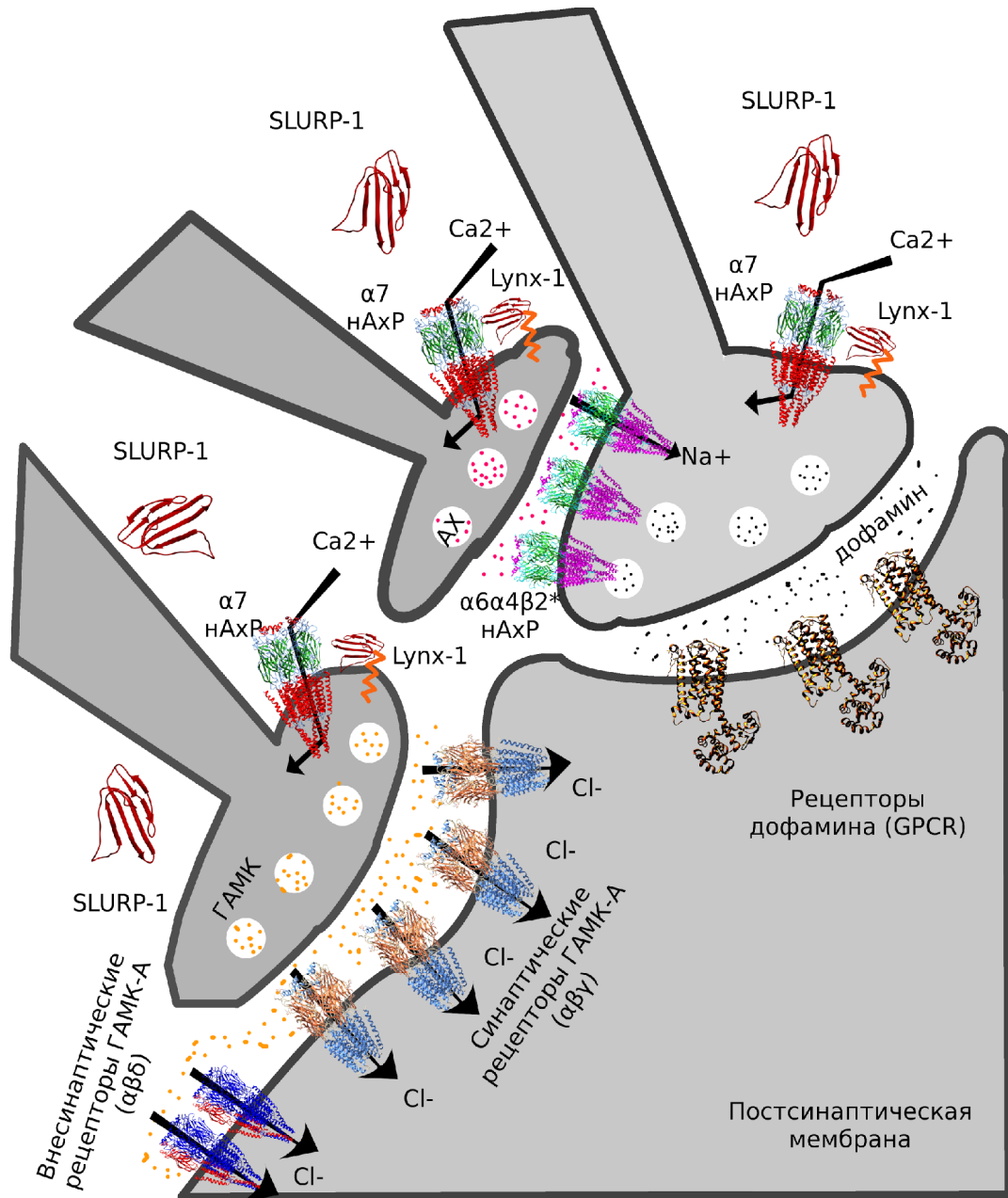


Рисунок 1. Схема расположения и функции некоторых представителей Сустепельных рецепторов и их эндогенных трехпетельных модуляторов в ЦНС.

Ионотропные рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-А) ответственны за тоническое (т. е. внесинаптическое) ингибирование функциональной

активности нейронов, нарушения которой могут приводить к шизофрении и эпилепсии [57], а также за быструю синаптическую передачу торможения [75].

1.3.2 Сетчатка глаза

Сетчатка глаза позвоночных (Рис. 2) состоит из десяти слоев, образованных клетками различных типов: базальная мембрана пигментного эпителия (1), пигментный эпителий (2), наружный сегмент фоторецепторов (3), внутренний сегмент фоторецепторов (4), внешний ядерный слой (5), внешний сплетениевидный слой (6), внутренний сплетениевидный слой (7), внутренний ядерный слой (8), слой ганглионарных клеток (9) и слой аксонов ганглионарных клеток (10).

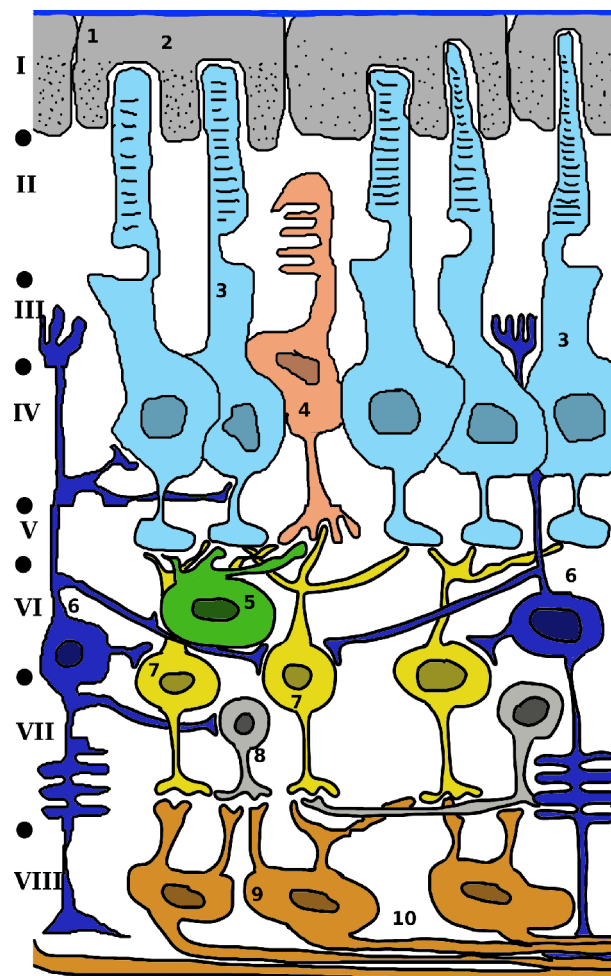


Рисунок 2. Схема строения сетчатки глаза человека на поперечном срезе.

Никотиновая холинергическая система передачи [76] существует между фоторецепторами (3) и пигментным эпителием (2), основная функция которого - поддержание гомеостаза фоторецепторов, поглощение (утилизация) “отработанных” фоторецепторных дисков и повышение четкости зрительного восприятия за счет поглощения избыточного света [77]. В осуществлении этого контакта участвуют $\alpha 7$ субъединица nAChR, а также модулятор SLURP-1 (Soluble Ly6 Urokinase Protein 1, растворимый белок 1 семейства Ly6 — см. главу, посвященную белковым лигандам nAChR) [78].

Клетки ганглионарного слоя реагируют на лиганды nAChR [79], и в последнее время показана экспрессия $\alpha 7$ и $\beta 2$ субъединиц nAChR клетками ганглионарного слоя [80].

Помимо nAChR, различные слои сетчатки экспрессируют и ГАМК-А [81], функция которых в настоящий момент выясняется. ГлиР экспрессируется амакриновыми клетками - интернейронами внутреннего ядерного слоя, ответственными за регуляцию синаптической передачи ганглионарных клеток и, у низших позвоночных, за распознавание направления и скорости движения объектов [82]. Экспрессия 5-OT3 в сетчатке изучена слабо, однако есть косвенные доказательства экспрессии данного типа рецепторов на основании иммунореактивности и детекции мРНК с помощью обратной транскрипции и ПЦР [83].

1.3.3 Опорно-двигательный аппарат

Так как первым из Cys-петельных рецепторов был открыт nAChR мышечного типа [30], его функция в организации работы мышечной ткани подробно исследована. Основная его функция - генерация потенциала концевой пластинки, обеспечивающая синхронизацию нервного импульса мотонейрона и сокращения

мышечного волокна. Нарушение функционирования данного рецептора приводит к развитию патологий движения. Например, аутоиммунный процесс, заключающийся в выработке антител против мышечного nAChR является причиной некоторых случаев заболевания *myasthenia gravis* [84], а мутации последовательности полипептидной цепи субъединиц рецептора могут приводить к развитию таких состояний, как наследственные миастении [85].

1.3.4 Иммунная система

Клетки иммунной системы зачастую экспрессируют белки, родственные белкам, экспрессируемым нейронами [86]. Cys-петельные рецепторы клеток иммунной системы - активно исследуемый вопрос. Наиболее убедительно, с помощью не только иммунофлуоресцентного окрашивания и ОТ-ПЦР, но и электрофизиологических измерений с применением специфических лигандов, была показана экспрессия моноцитами рецепторов ГАМК-А [87]. Это дает основания полагать ГАМК-А важными модуляторами иммунного ответа, т.к. их активация общими анестетиками ведет к уменьшению миграции моноцитов *in vitro*, а ингибирование селективными лигандами восстанавливает миграцию даже на фоне аппликации анестетиков [87].

Экспрессия никотиновых рецепторов клетками иммунной системы не была подтверждена электрофизиологическими данными, однако, существует множество косвенных доказательств экспрессии рецепторов данного типа различными лимфоцитами [88]. Поэтому была выдвинута гипотеза, что $\alpha 7$ nAChR не формирует ионных каналов, а действует посредством ферментативных каскадов, как метаботропный рецептор [89], однако непосредственных доказательств данная гипотеза пока на наш взгляд не нашла.

1.3.5 Кератиноциты кожи и полости рта

Экспрессия функционально-активных nA_xP культурой кератиноцитов была подтверждена электрофизиологическим методом “пэтч-кламп”, *in situ* гибридизацией и иммуно-гистохимическими методами [90]. В дальнейшем тема “нечейронных nA_xP” кератиноцитов получила развитие в основном под руководством Сергея Грандо - автора упомянутой статьи. На данный момент считается, что nA_xP экспрессируются в коже, кератиноцитах полости рта [91], и что нарушения их экспрессии ведут к широкому спектру кожных заболеваний [92]. Однако, стоит подчеркнуть, что помимо оригинальной статьи 1995 года, нигде более не была показана именно функциональная экспрессия рецепторов, зафиксированная с привлечением электрофизиологических методов. Наиболее часто в подобных работах используются специфические лиганды nA_xP и стандартные тесты на активацию различных транскрипционных факторов и ферментативных каскадов (см. например [93]), что может считаться лишь косвенным показателем вовлеченности nA_xP в изучаемый процесс.

Еще одним косвенным доказательством присутствия nA_xP кератиноцитах кожи и полости рта может считаться экспрессия клетками данного типа белков семейства Lуб, считающихся эндогенными модуляторами nA_xP [94,95], однако, хотелось бы подчеркнуть, что окончательный вывод о присутствии тех или иных типов nA_xP и их предполагаемых модуляторов еще предстоит сделать.

1.3.6 Дыхательные пути

Эпителий дыхательных путей экспрессирует гомопентамерные $\alpha 7$ nA_xP, где данный рецептор по-видимому участвует в регуляции биения ресничек эпителиальных клеток и процессов, связанных с воспалением [96]. Помимо самого nA_xP данного типа эпителий бронхов экспрессирует белки, считающиеся

природными модуляторами nAChR [97], что является аргументом в пользу существования полноценной не-нейрональной холинергической системы.

Так как в результате курения дыхательные пути оказываются непосредственно подверженными влиянию агониста nAChR никотина, активно исследуется роль nAChR в формировании патологических реакций, вызванных употреблением табака [98].

1.4 Физиологические эффекты лигандов Cys-петельных рецепторов

Благодаря широкой представленности тех или иных подтипов Cys-петельных рецепторов в различных системах организма человека и животных, воздействие разнообразных лигандов (как внутренних, так и внешних по отношению к данному организму) рецепторов этого суперсемейства зачастую оказывает большое влияние на протекание физиологических процессов.

Таким образом, существует задача целенаправленного поиска и исследования механизмов действия и специфичности различных лигандов Cys-петельных рецепторов. В качестве отправных точек для поиска и конструирования новых лигандов Cys-петельных рецепторов могут быть использованы представители различных групп веществ — от низкомолекулярных до пептидов и белков.

1.5 Лиганды Cys-петельных рецепторов

1.5.1 Низкомолекулярные лиганды

Из-за важности функционирования Cys-петельных рецепторов их активность изменяется посредством не только низкомолекулярных эндогенных лигандов,

являющихся их агонистами, но и с помощью различных аллостерических модуляторов, таких как нейроактивные стероиды и производные ненасыщенных жирных кислот - эндоканнабиноидов.

К нейроактивным стероидам, оказывающим влияние на активность Cys-петельных рецепторов, принято относить стероидные гормоны и их производные, однако даже такой “базовый” стероид, как холестерин, оказывает значительное влияние на мышечный nA_{Ch}R [99] и другие Cys-петельные рецепторы [100]. Тем не менее, основной фокус работ по изучению взаимодействия стероидов с Cys-петельными рецепторами лежит в области стероидных гормонов. Показана модуляция nA_{Ch}R прогестероном [101], эстрадиолом и производными андростана [102]. Модуляция ГАМК-А 3 α ,21-диокси-5 α -прегнан-20-оном и аллопрегнаноном лежит, по-видимому, в основе возникновения разнообразных депрессивных и тревожных расстройств [103]. Ионотропные рецепторы серотонина также способны реагировать на относительно высокие (десятки микромолей на литр) концентрации стероидов [104], однако физиологическая значимость подобной чувствительности к стероидам показана не была.

Липидные соединения нестероидной природы также проявляют активность в отношении Cys-петельных рецепторов [105]. Производные арахидоновой кислоты - эндоканнабиноиды анандамид (арахидоноилэтаноламид) и арахидоноилглицерин являются модуляторами глицинового рецептора [106] и других Cys-петельных рецепторов [107].

Помимо эндогенных низкомолекулярных лигандов существует огромный массив природных биологически-активных соединений, влияющих на функции живых организмов посредством взаимодействия с Cys-петельными рецепторами. При этом данные низкомолекулярные соединения являются экзогенными по отношению к организмам, на которые они оказывают свое действие. Среди них не только социально значимый никотин, но и такие инструменты исследования Cys-петельных рецепторов, как пикртоксин (блокатор хлорных каналов ГлиР и ГАМК-А), блокатор nA_{Ch}R анабазин [108], агонист nA_{Ch}R эпibatидин [109] и др.

1.5.2 Пептидные лиганды

Яды змей - богатый источник полипептидных лигандов никотиновых рецепторов [20]. Так как нервная система является одной из основных мишеней полипептидных компонентов ядов змей [110], а Cys-петельные рецепторы исключительно важны для ее функционирования, то неудивительно, что яды змей содержат лиганды Cys-петельных рецепторов. Среди пептидов из ядов змей стоит в первую очередь отметить ваглерины [111] и аземиопсин из яда бирманской гадюки [112], являющиеся блокаторами nAChR (Рис. 3 Б).

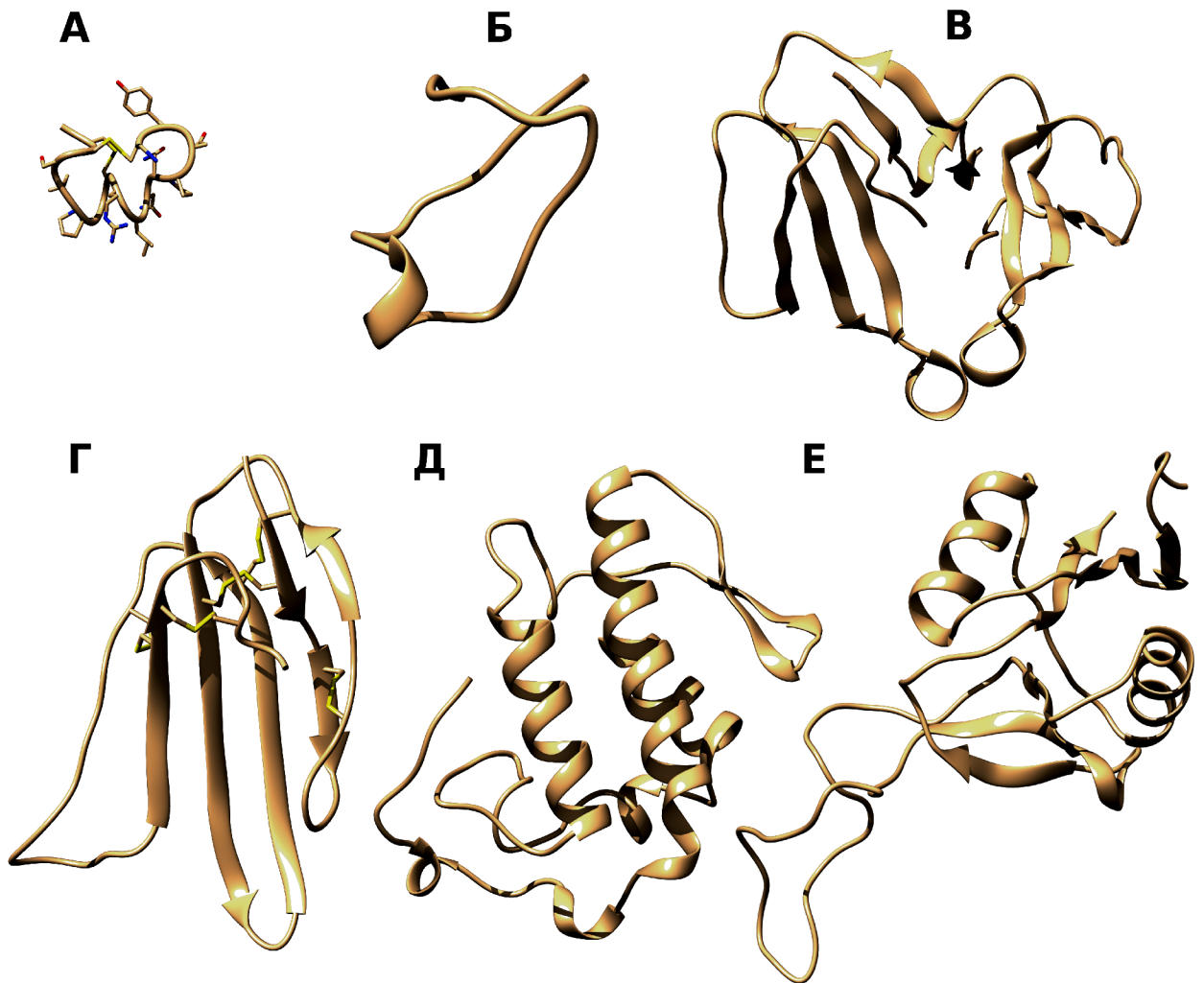


Рисунок 3. Пептидные и белковые лиганды nAChR: А - конотоксин PnIa, Б - аземиопсин, В - димерный α -кобротоксин, Г - эндогенный модулятор Lypx1, Д - фосфолипаза вуртоксин, Е - лектин-подобный белок битанарин.

Ваглерины, помимо ингибирования никотиновых рецепторов, способны быть модуляторами некоторых подтипов ГАМК-А [113].

Таким образом, яды являются природными библиотеками активных компонентов, среди которых часто встречаются лиганды Cys-петельных рецепторов. Если говорить о ядах, содержащих преимущественно пептидные компоненты, то наиболее значимым открытием в токсинологии стали моллюски рода *Conus*. Их яд содержит активные компоненты, представляющие собой пептиды длиной 10-30 аминокислотных остатков, состоящие из коротких петель в 3-6 остатков, формируемыми дисульфидными связями между остатками цистеинов [114]. Особенно активную роль конотоксины сыграли в изучении nAChR [115]. При этом очень быстро развивается направление, связанное с получением синтетических аналогов конотоксинов, специфичных к определенному набору субъединиц. В настоящий момент известны конотоксины, проявляющие более или менее высокую специфичность практически к любому подтипу nAChR, который считается клинически значимым (см. [116–118]).

Т.к. пептиды выполняют самые разнообразные функции в живых организмах [119], и принимая во внимание большое разнообразие пептидных лигандов Cys-петельных рецепторов, используемых змеями и моллюсками в качестве “биологического оружия”, становится очевидной целесообразность поиска эндогенных пептидных лигандов Cys-петельных рецепторов. Одним из таких лигандов, по-видимому, является β -амилоидный пептид, взаимодействие которого с нейрональными никотиновыми рецепторами играет важную роль в развитии некоторых патологий нервной системы [120].

1.5.3 Лиганды белковой природы

Как уже упоминалось ранее, Cys-петельные рецепторы вовлечены в поддержание нормальной работы ЦНС и других систем. Нормальная работа этих

систем, в свою очередь, требует существования баланса между активацией и ингибированием рецепторов данного типа. В случае с некоторыми подтипами nAChR это осуществляется с помощью особых модуляторных лигандов Lypx1 и SLURP-1. Оба этих белка имеют трехпетельную укладку, характерную для разнообразных по своей функциональности компонентов ядов змей (Рис. 3).

Lypx1 является мембранно-заякоренным через гликозилинозитолфосфатидовую кислоту белком, экспрессируется в мозге и участвует в регуляции функционирования зрительной коры [121]. Он действует как аллостерический модулятор, ускоряя десенситизацию nAChR [122] и ограничивая активность рецептора в случае чрезмерной активации [123]. SLURP-1 – еще один трехпетельный “прототоксин” человека и млекопитающих. Это секретируемый белок, присутствующий во внеклеточном веществе разнообразных эпителиальных тканей. Для рекомбинантного SLURP-1, содержащего дополнительные модификации, ранее было показано позитивное аллостерическое модулирование $\alpha 7$ nAChR [124]. Обнаружены и другие гомологичные “прототоксинам” белки, влияние которых на Cys-петельные рецепторы еще предстоит установить [125].

У насекомых также обнаружены трехпетельные модуляторы никотиновых рецепторов. Показано, что коэкспрессия pr-lypx1 (аналог lypx1 млекопитающих) с никотиновыми рецепторами повышает чувствительность последних к агонистам [126]. Другой белок из этого семейства - SSS - обнаруживает свойства регулятора нормального цикла сон/бодрствование у *Drosophila melanogaster*. Причем показано его взаимодействие как с никотиновыми рецепторами, так и с калиевыми каналами shaker-типа [127].

Большой вклад в изучение никотиновых рецепторов внесли трехпетельные нейротоксины из ядов змей (см. обзор [128]). Такие трехпетельные антагонисты nAChR как α -бунгаротоксин и α -кобротоксин позволили произвести выделение и очистку мышечного nAChR [129] и открыть гомопентамерный $\alpha 7$ nAChR в мозге [130]. А такие лиганды как κ -бунгаротоксин позволяют при необходимости исследовать ткани, экспрессирующие гетеромерные nAChR [131].

В заключение стоит отметить, что представленные в настоящем обзоре данные показывают важность семейств Gys-петельных рецепторов, принимающих участие во многих физиологических функциях организма, что делает многие из них 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, Gys-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 препаратов. 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 Gys-петельных рецепторов, а именно с ГАМК-А рецепторами.

2 Материалы и методы

2.1 Материалы

В работе были использованы различные коммерчески доступные реактивы высокой степени чистоты, соответствующей сложившейся лабораторной практике.

Трехпетельные токсины. В работе был использован LsIII фирмы Latoxan (Валанс, Франция). WTX, α -Ctx, OWT и NT II были ранее получены в отделе молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН. NT I получен в лаборатории молекулярной токсинологии ИБХ РАН. α -Vgt был выделен из яда *B. multicinctus* с помощью гель-фильтрации, ионообменной обратно-фазовой ВЭЖХ в той же лаборатории. Химерный токсин NT II/I с фрагментом центральной петли NT I, пересаженным в структуру NT II, был ранее получен в отделе биоинженерии ИБХ РАН.

Синтез пептидных лигандов. Пептид WCDAFCSIRGKR, представляющий собой фрагмент центральной петли α -Ctx, а также α -конотоксины были синтезированы в лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий.

Плазмиды и смеси плазмид были получены из различных источников и наработаны до необходимого количества с помощью стандартных наборов для выделения плазмид (Quiagen, США; Евроген, Россия).

2.2 Методы

2.2.1 Электрофизиология

а) *Двухэлектродная фиксация потенциала.* Ооциты были хирургически извлечены у здоровых взрослых самок *Xenopus laevis*. После механического разделения отдельные ооциты были перенесены в буфер ND96 (5 мМ

HEPES/NaOH pH 7.6 , 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂ , 2 mM MgCl₂). В ооциты были инъецированы смеси плазмид, кодирующих субъединицы ГАМК-А мыши, либо субъединицы мышечного и $\alpha 7$ nAChR мыши и человека соответственно. Ооциты инкубировали при 18 ° C в растворе ND96 с добавлением ампициллина и канамицина. Записи проводились через 36-72 часа после инъекции с использованием усилителя турбо-ТЕС 03X (pri electronic GmbH., Германия). В типичном эксперименте для получения ответа рецептора агонист (γ -аминомасляная кислота, ацетилхолин, никотин) апплицировался на 20 с после чего производилась отмывка ооцита буфером ND96 в течение 5 минут. Для оценки активности тестируемых лигандов, они предварительно апплицировались на ооцит до аппликации агониста.

б) *Локальная фиксация потенциала (whole cell patch-clamp)*. Клетки Neuro 2a трансфицировали плазмидами lab-PCI, кодирующими субъединицы ГАМК-А в соответствии с протоколом трансфекции липофектаминоном (Invitrogen, США). Трансфицированные клетки выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) при 37 ° C в CO₂-инкубаторе в течение 24-48 часов.

2.2.2 Визуализация живых клеток с помощью флуоресцентных лигандов

Клетки культивировали методом аналогичным описанному в предыдущем разделе. Питательную среду удаляли, клетки промывали буфером и инкубировали с 200 нМ Alexa Fluor 555 меченым α -бунгаротоксином (Invitrogen, США) или Alexa Fluor 546 меченым α -кобратоксином в течение 20 мин при комнатной температуре. В контрольных экспериментах к инкубационной среде был добавлен 50-кратный молярный избыток немеченого α -кобратоксина. Клетки промывали дважды буфером и визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа (Olympus, Япония) с помощью соответствующей комбинации фильтров. В экспериментах по конкуренции с низкомолекулярными лигандами в реакционную среду были добавлены 1-4000 мкМ мусцимола или 400 мкМ

диазепама. Данные были проанализированы с помощью программы ImageJ со стандартным набором плагинов следующим образом: поле зрения фотографировалось в двух каналах. Один канал использовался для обнаружения флуоресцентного сигнала от меченого лиганда, а другой для обнаружения GFP. Фон изображений вычитали, на изображениях, полученных в канале GFP находили точки максимумов флуоресценции, затем области вокруг найденных максимумов выделялись так, чтобы приблизительно соответствовать среднему размеру клетки на изображении, выделенные области проецировались на изображение, полученное в канале флуоресцентного лиганда. Затем производилось измерение интенсивности в выделенных областях.

2.2.3 Молекулярное моделирование

а) *Молекулярный докинг.* Процедуры докинга были проведены с помощью программ Autogrid и Autodock 4.2. Для получения и анализа возможных структур использовались параметры программ, установленные по умолчанию.

б) *Молекулярная динамика.* Интерфейс внеклеточных доменов β - и α -субъединиц ГАМК-А был смоделирован с помощью недавно опубликованной структуры $\beta 3$ -гомопентамерного ГАМК-А [55]. Субъединица $\beta 3$, представляющая “принципальную” сторону ортостерического участка ГАМК-А была взята без изменений, а субъединица $\alpha 1$, находящаяся с “комплиментарной” стороны ортостерического участка была смоделирована с помощью сервиса SWISS-MODEL. Для моделирования комплекса ГАМК-А с α -кобратоксином в ортостерическом участке внеклеточные домены субъединиц рецептора были расположены вокруг молекулы α -кобратоксина аналогично тому, как располагаются субъединицы АхСБ в комплексе с данным токсином (PDB 1YI5). Выравнивание внеклеточных доменов субъединиц ГАМК-А и α -кобратоксина было произведено с помощью UCSF Chimera [132]. Полученные структуры подверглись процедуре минимизации внутренней энергии с помощью инструментов программного пакета GROMACS 5.0 [133], а затем подверглись 100

нс процедуре молекулярной динамики с использованием библиотеки OpenMM [134] с помощью параметров силового поля AMBER и неявной модели растворителя GBSA. Полученные координаты были проанализированы с VMD [135] и программного обеспечения UCSF Chimera.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Низкомолекулярные лиганды

3.1.1 Низкомолекулярные антагонисты nA_{Ch}R из морских губок и асцидий

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 и асцидий. Стоит отметить структурное разнообразие соединений, предоставленных для анализа (Рис. 4): 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 диметил пиперидин (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).

Нами был проведен докинг полученных соединений к структуре A_{Ch}SB *Lymnaea stagnalis*, при этом были использованы три различных структуры A_{Ch}SB: с молекулой NEPES (буферная соль) в кармане связывания (не является ни агонистом, ни антагонистом nA_{Ch}R), с конкурентным низкомолекулярным антагонистом дигидро-β-эритроидином (DhβE) и α-кобратоксином. Три выбранные структуры A_{Ch}SB 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.

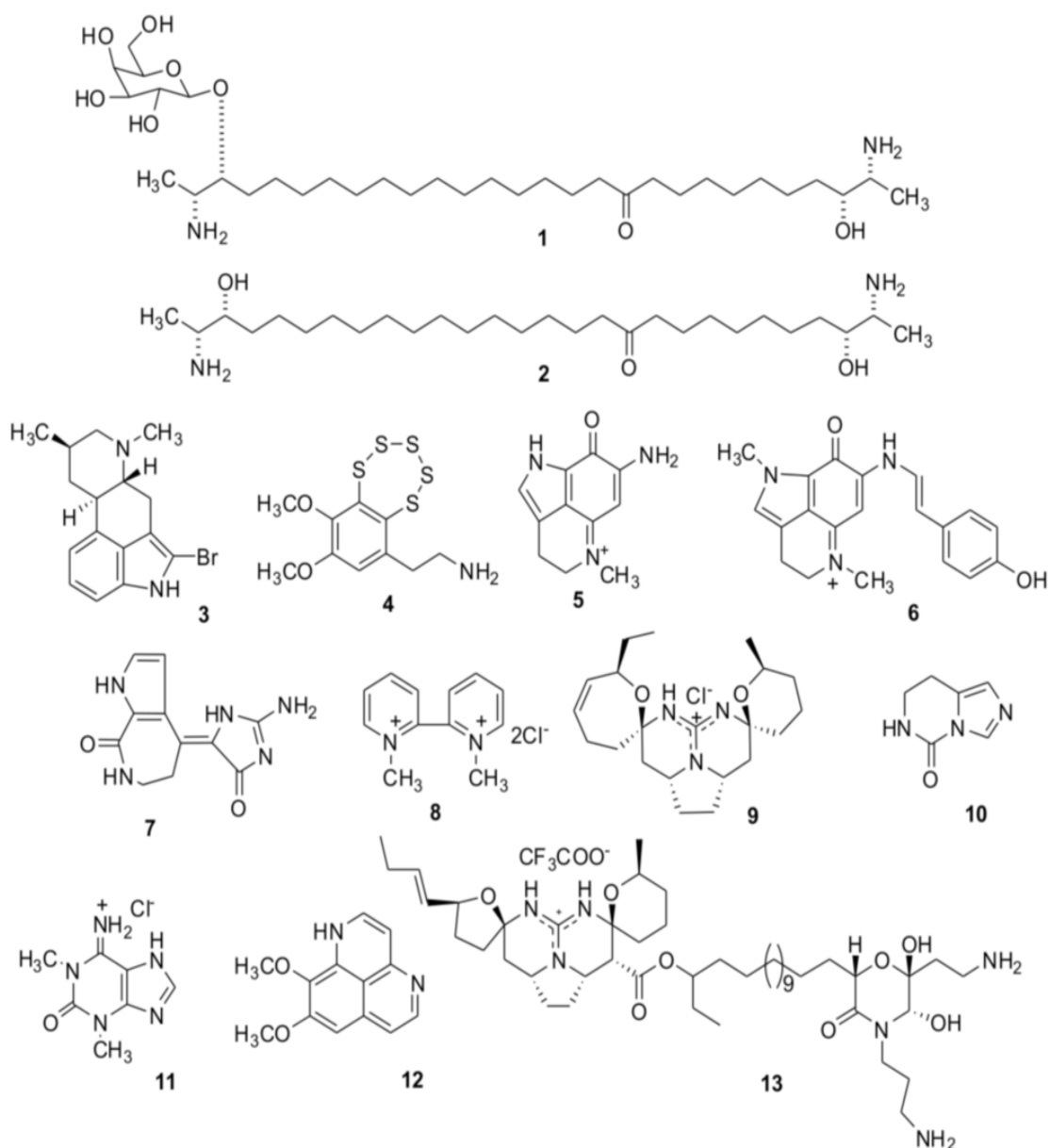


Рисунок 4. Структуры соединений из морских губок и асцидий, холинергическая активность которых была исследована *in silico* и экспериментальными методами.

Результаты в форме теоретически предсказанных значений константы ингибирования представлены в Табл. 1. Для большинства соединений наиболее предпочтительный участок связывания находился в гидрофобном кармане под петель 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).

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 μM . 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}I]- αVgt , участок связывания которого также в значительной степени находится под петлей С. Кривые ингибирования связывания [^{125}I]- αVgt представлены на Рис. 5.

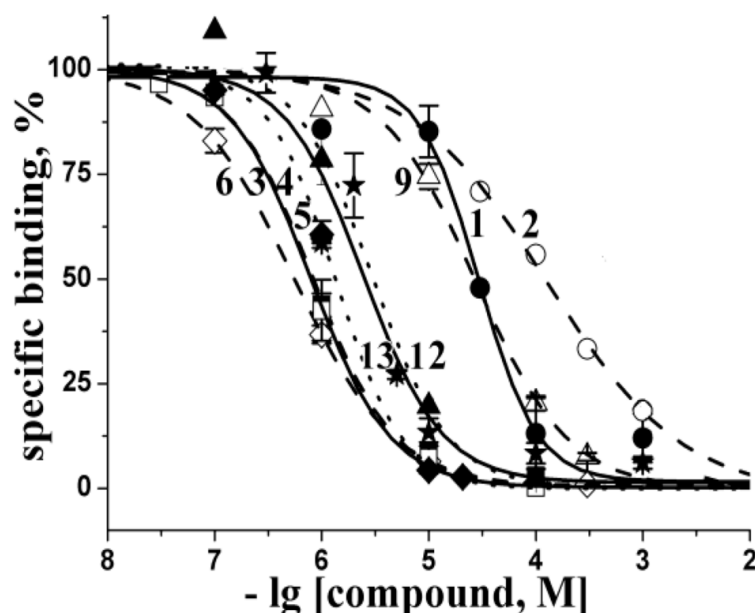


Рисунок 5. Ингибирование связывания [^{125}I]- αBgt с АхСБ *L. stagnalis* наиболее активными из протестированных соединений. Нумерация соединений соответствует нумерации на предыдущем рисунке. Соответствующие кривые отмечены следующими символами: 1—заполненные круги; 2—пустые круги; 3—заполненные квадраты; 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 ($n=3$).

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 $10 \mu\text{M}$ подавались на ооцит, экспрессирующий соответствующий рецептор.

Соединения с наихудшими предсказанными параметрами связывания показали в радиолигандном тесте слабое ингибирование связывания [^{125}I]- αBgt (№ № 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).

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**—ДНβЕ-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 K_i (μМ) для взаимодействия с АхСБ <i>L. stagnalis</i>			Экспериментально полученные значения K_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

Соединения 1, 2, 4, 6, 9 и 13 ингибировали активность мышечного нАхР практически полностью, при этом соединения 4 и 6 ингибировали α7 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. 6).

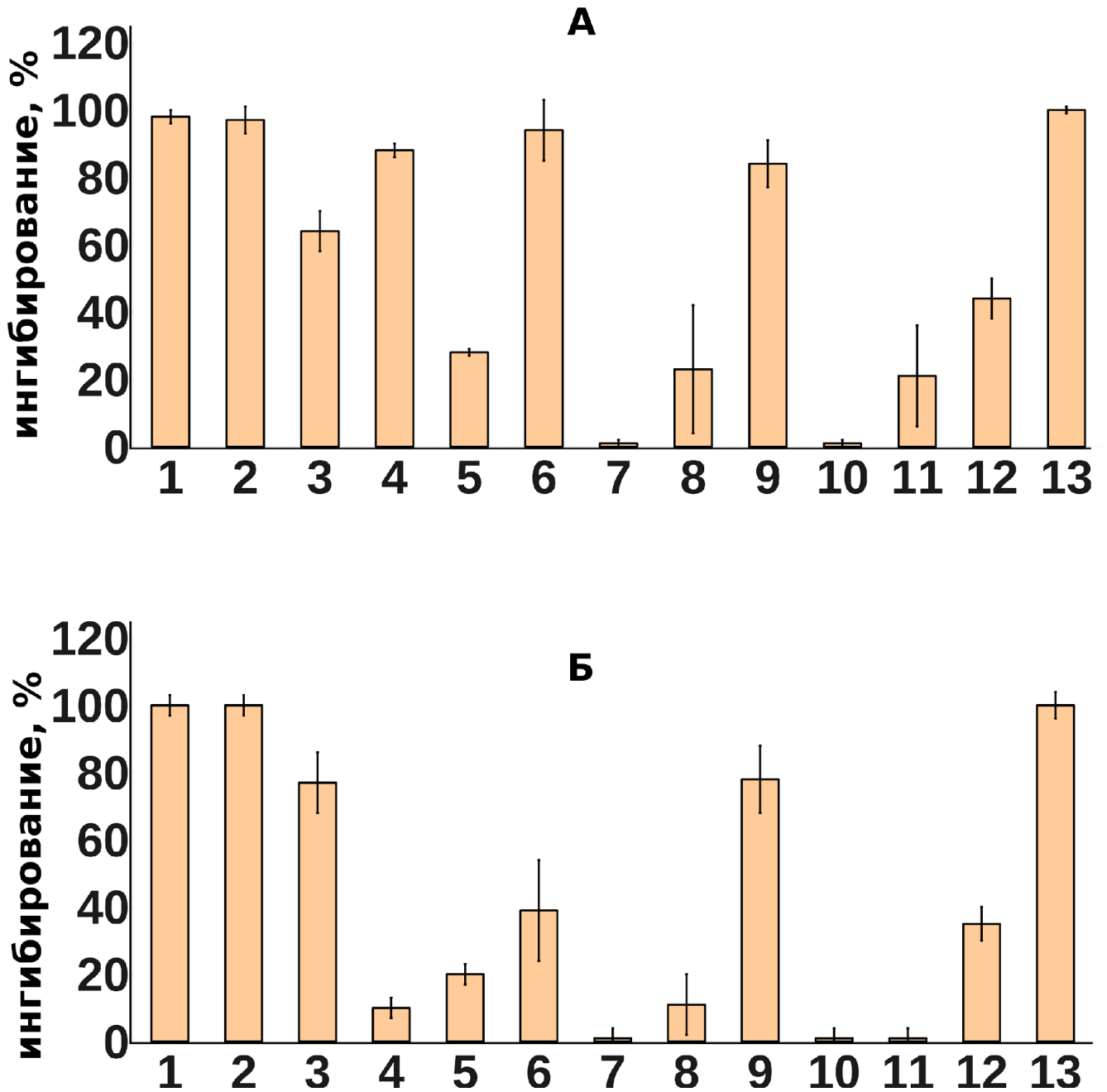


Рисунок 6. Относительное ингибирование токов через ионный канал мышечного nAChR (А) и $\alpha 7$ nAChR человека (Б) в ответ на аппликацию агониста (ацетилхолина или никотина) тестируемыми веществами в концентрации 10 μ M. Нумерация соответствует приведенной на Рис. 4.

Стоит заметить, что ингибирующий эффект соединений, включающих в себя длинные углеводородные цепи (**1, 2** и **13**) был слабообратимым (Рис. 7А). 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 (Рис. 7Б).

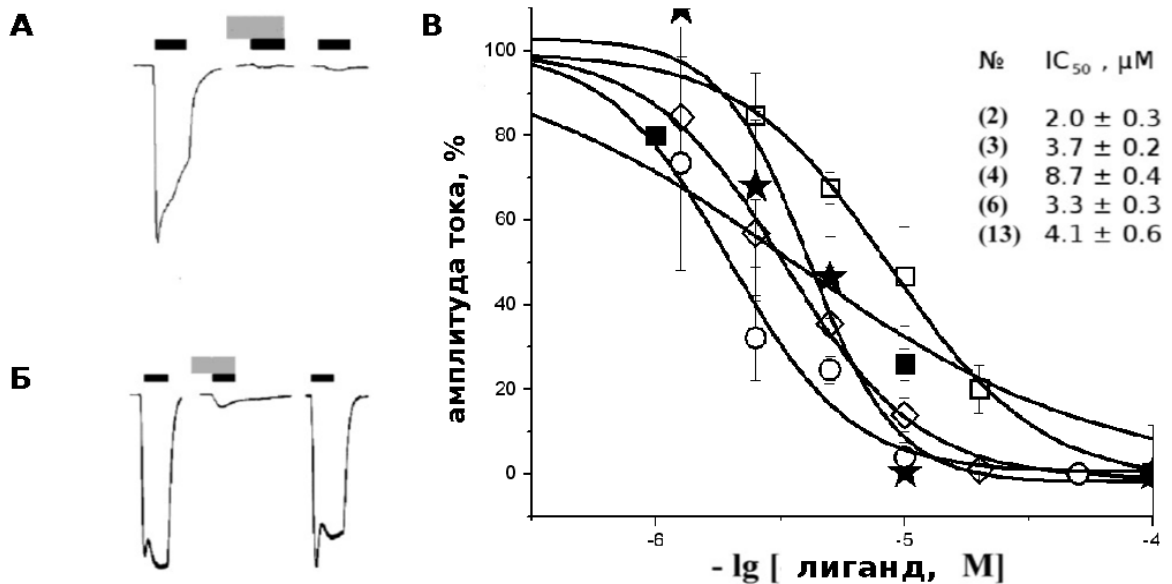


Рисунок 7. (А) Электрофизиологические измерения активности мышечного нАхР мышцы в присутствии **1** (ризохалин) и (Б) Электрофизиологические измерения активности мышечного нАхР мышцы в присутствии **6** (макалувамин G). Черные прямоугольники отмечают время аппликации ацетилхолина, серые прямоугольники отмечают время аппликации тестируемого вещества. Слева направо: контрольный ток в ответ на ацетилхолин, ток в ответ на ацетилхолин в присутствии тестируемого вещества, ток в ответ на аппликацию ацетилхолина после отмывки ооцита буфером, не содержащим тестируемого вещества в течение пятнадцати минут; (В) Концентрационные зависимости ингибирования мышечного нАхР наиболее активными из протестированных соединений и их константы ингибирования.

Для наиболее активных соединений нами были получены концентрационные зависимости ингибирования мышечного нАхР (Рис. 7В). Наибольшим сродством к мышечному нАхР обладают соединения агликориохолин (№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.

3.1.2 Агонист $\alpha 7$ нАхР из морского моллюска *Hermisenda carassicornis*

Коллективом ТиБоХ ДВО РАН из морского голожаберного моллюска *Hermisenda crassicornis* было получено соединение 6-бромогипафорин (Рис. 8). 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 Bgt с $\alpha 7$ нАхР, но не с мышечным нАхР и при этом является агонистом $\alpha 7$ нАхР в присутствии положительного аллостерического модулятора этого рецептора - PNU 120596. Для выяснения селективности действия 6-бромогипафорина нами было проведено исследование его действия на $\alpha 4\beta 2$ нАхР и $\alpha 7$ /GlyR (модельный объект, представляющий собой химерный рецептор, состоящий из внеклеточного домена $\alpha 7$ нАхР курицы и трансмембранной и внеклеточной части человеческого $\alpha 1$ ГлиР).

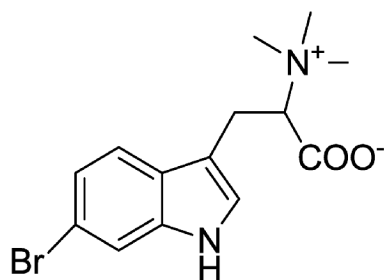


Рисунок 8. Структура 6-бромогипафорина.

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 (Рис. 9).

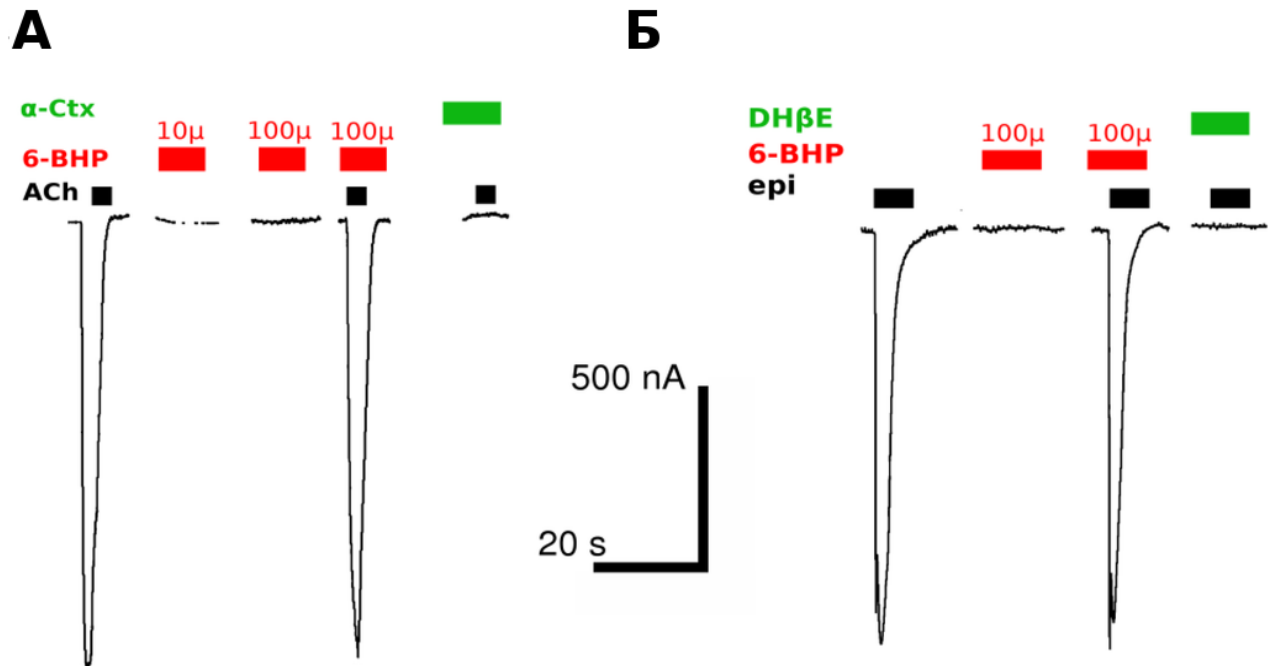


Рисунок 9. (А) Ооциты, экспрессирующие $\alpha 7$ /GlyR отвечают на аппликацию 100 μ M ацетилхолина (АХ, черные прямоугольники), но не на аппликацию 10 μ M и 100 μ M 6-бромогипафорина (красные прямоугольники). 6-Бромогипафорин в концентрации 100 μ M не ингибирует ток, вызванный аппликацией ацетилхолина, в то время как α -кобратоксин в концентрации 1 μ M полностью ингибирует данный рецептор (α -СТХ, зеленый прямоугольник); (Б) Ооциты, экспрессирующие $\alpha 4\beta 2$ nAChR крысы отвечают на аппликацию 10 μ M эпibatидина (epi, черные прямоугольники), но не на аппликацию 100 μ M 6-бромогипафорина (красный прямоугольник). 6-Бромогипафорин в концентрации 100 μ M не ингибирует ток, вызванный аппликацией эпibatидина, в то время как DNBE в концентрации 1 μ M полностью ингибирует данный рецептор (зеленый прямоугольник)

3.2 Пептидные лиганды

3.2.1 Фрагменты аземиопсина

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 DNWWPKRRHQGPRPPRRPKR (Рис. 10). Проведенный ранее в отделе молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН аланиновый скрининг (последовательная замена аминокислотных остатков на остаток аланина и тестирование полученных мутантных пептидов показал особую важность ароматических остатков на N-конце пептида, а также единственного гистидина в девятом положении (см. врез на Рис. 11). 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.

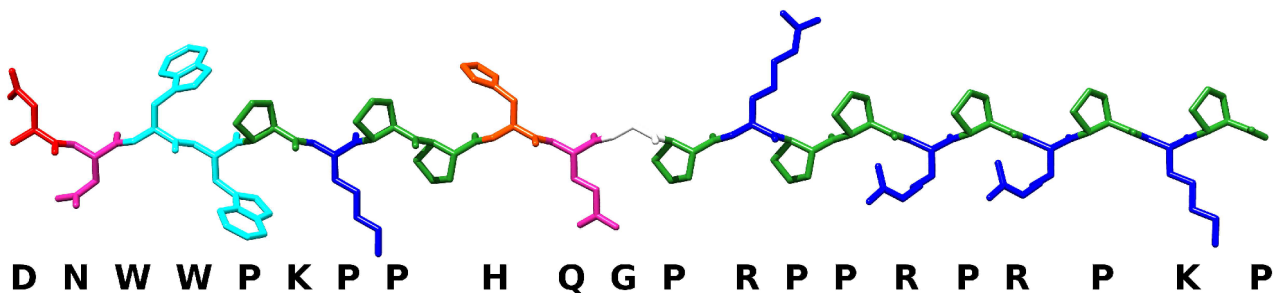


Рисунок 10. Первичная структура аземиопсина.

Так как любой из пятичленных фрагментов представляет собой лишь ~20% структуры исходного пептида, мы ожидали зафиксировать значительное ухудшение их активности в сравнении с самим аземиопсином. Активность полученных пептидов была протестирована в концентрации 1 мМ. Большая часть фрагментов оказалась малоактивной даже в такой большой концентрации, однако пептид WWPKP показал заметное ингибирование рецептора (Рис. 11).

Активность данного фрагмента в целом согласуется с данными аланинового скрининга, который также показал важность двух присутствующих в пептидном фрагменте триптофанов, пролина и лизина. Однако, пептидный фрагмент RHQGP, содержащий наиболее важные для связывания аземиопсина с рецептором (по данным аланинового скрининга) остатки, был практически лишен функциональной активности (Рис.11). Одним из возможных объяснений кажущегося расхождения между данными двух этих опытов может быть важность приобретения фрагментом RHQGP именно той структуры, которая существует в составе полноразмерной молекулы аземиопсина, в то время как для фрагмента WWPKP данное обстоятельство менее важно.

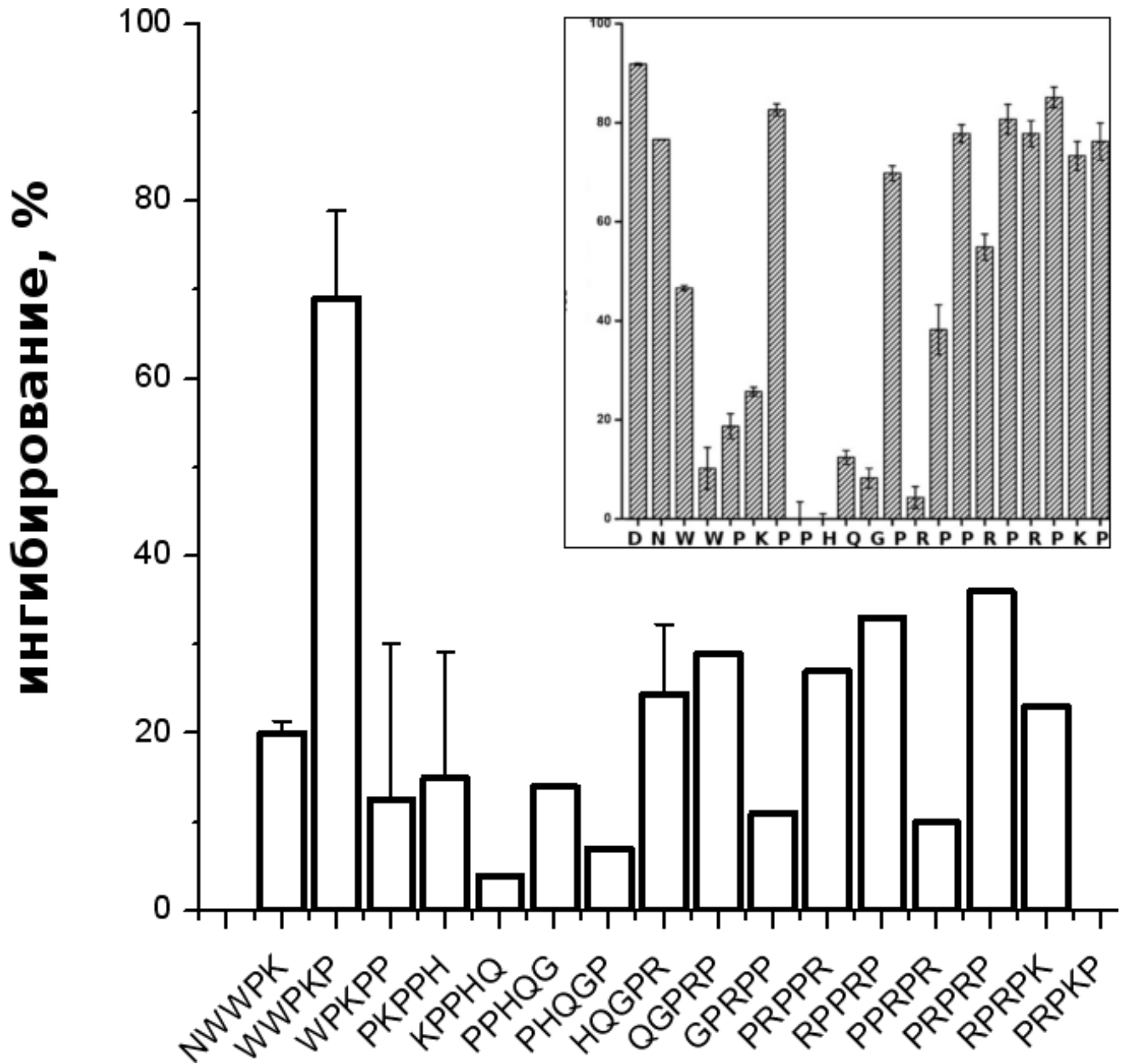


Рисунок 11. Панель пятичленных фрагментов аземиопсина, протестированных на мышечном nAChR. Наибольшую ингибирующую активность показал пептид WWPKP. Врез иллюстрирует результаты аланинового скрининга аземиопсина, полученные ранее в лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН.

Для пептида WWPKP было вычислено значение IC_{50} (Рис. 12), 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 нАхР.

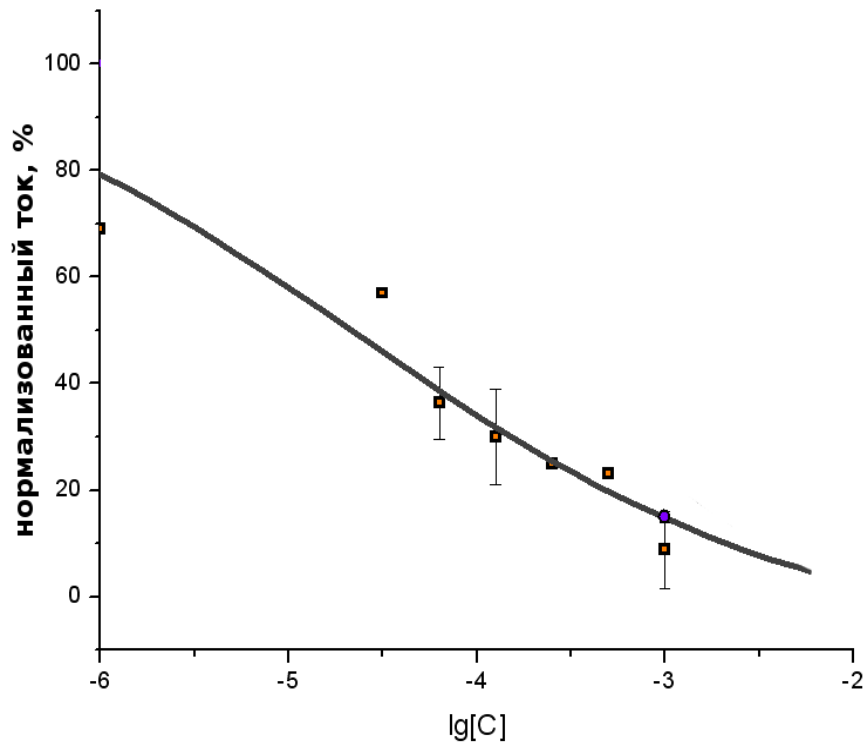


Рисунок 12. Концентрационная зависимость ингибирования мышечного нАхР пептидом WWPKP.

Для установления возможности дальнейшего уменьшения размера пептидного фрагмента аземиопсина мы синтезировали и протестировали более короткие фрагменты наиболее активного пептида: WWPK и WPK. В обоих случаях активность уменьшилась (Рис. 13). Таким образом, уменьшение длины пептидной цепи до трех аминокислотных остатков ведет к практически полной потере активности.

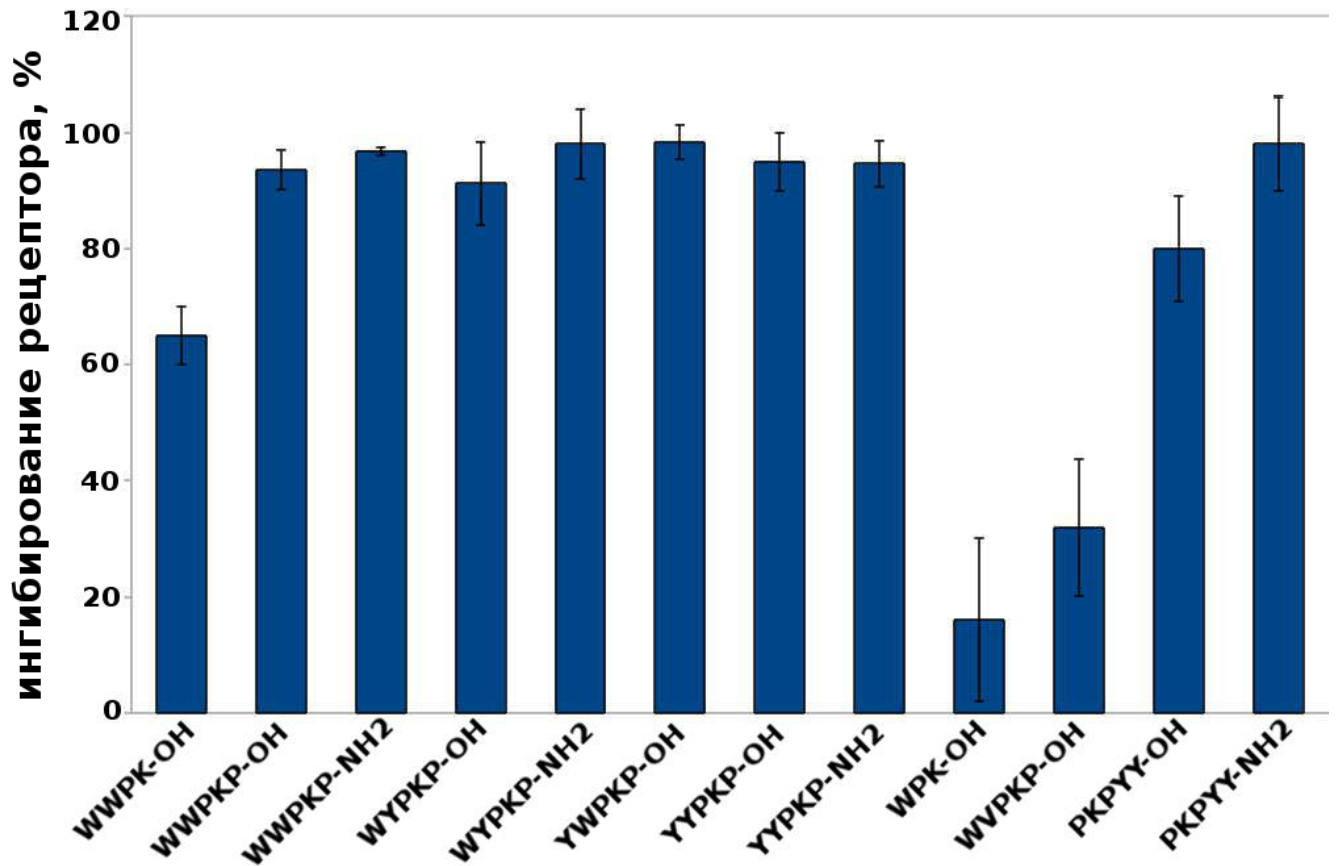


Рисунок 13. Сравнение активности 1 мМ пептидных фрагментов аземиопсина и их модификаций.

Для структурно-функциональных исследования нами были получены пятичленные пептиды. При замене второго остатка в коротком пептиде на гидрофобный, но неароматический валин активность существенно уменьшилась (Рис. 13). В то же время, замена на тирозин не повлияла на активность, замена первого триптофана на тирозин на активность также не повлияла (Рис. 13). Таким образом, была доказана необходимость присутствия в структуре пептидного лиганда двух ароматических остатков для ингибирования мышечного nAChR.

Визуально проанализировав структуру пентапептида WWPKR, мы обнаружили, что при инверсии аминокислотной последовательности не происходит значительного изменения расположения радикалов наиболее важных для ингибирования мышечного nAChR ароматических остатков относительно остатка лизина (Рис. 14).

Было предположено, что ретропептиды РКРWW, РКРYW и РКРYY могут обладать ингибирующей активностью в отношении мышечного nAхР. Данное предположение было подтверждено в электрофизиологических тестах (Рис. 13).

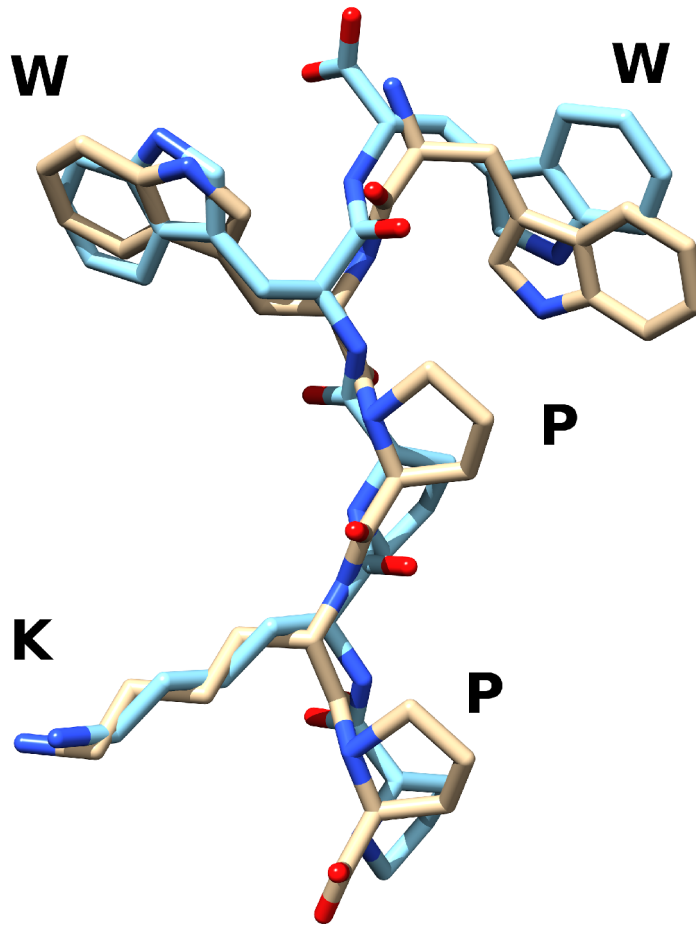


Рисунок 14. Сравнение структур пептида WWPKP и соответствующего ему ретропептида РКРWW.

3.2.2 Пептидные антагонисты ГАМК-А

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 [136]. Мы предположили, что другие полипептидные лиганды nAхР 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. 15).

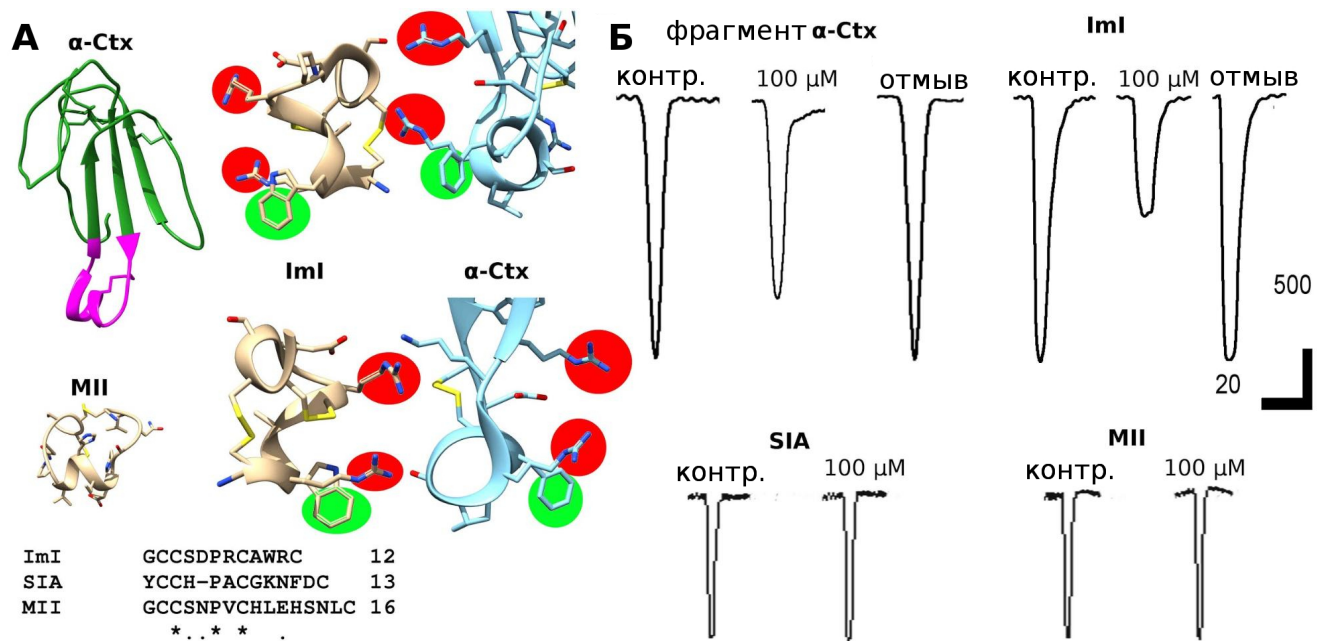


Рисунок 15. Сравнение структуры α -конотоксина ImI и центральной петли α -кобротоксина (А). Ингибирование ГАМК-А пептидными лигандами: фрагментом α -кобротоксина и α -конотоксином ImI (Б).

Ранее в литературе обсуждалось сходство структуры конотоксина ImI с центральной петлей α -кобротоксина. Т.к. в ходе нашей работы было показано, что α -кобротоксин 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 $100 \mu\text{M}$ ингибировал ГАМК-А с субъединичным составом $\alpha 1\beta 3\gamma 2$,

однако даже в такой высокой концентрации ингибирование составило только $28 \pm 10\%$.

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.

3.2.3 Пептидные антагонисты nAChR на основе α -конотоксинов

Однако, классической мишенью коротких пептидных лигандов - α -конотоксинов - являются nAChR различных подтипов. Несмотря на то, что уже существует достаточно широкое разнообразие лигандов данной группы, стоит отметить, что создание новых α -конотоксинов, 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 -конотоксина 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, при этом пептид PnIa[R5, R9, L10, R14] показал существенно более медленную кинетику отмыва, что может свидетельствовать об измененном, по сравнению с исходным пептидом, механизмом действия (Рис. 16).

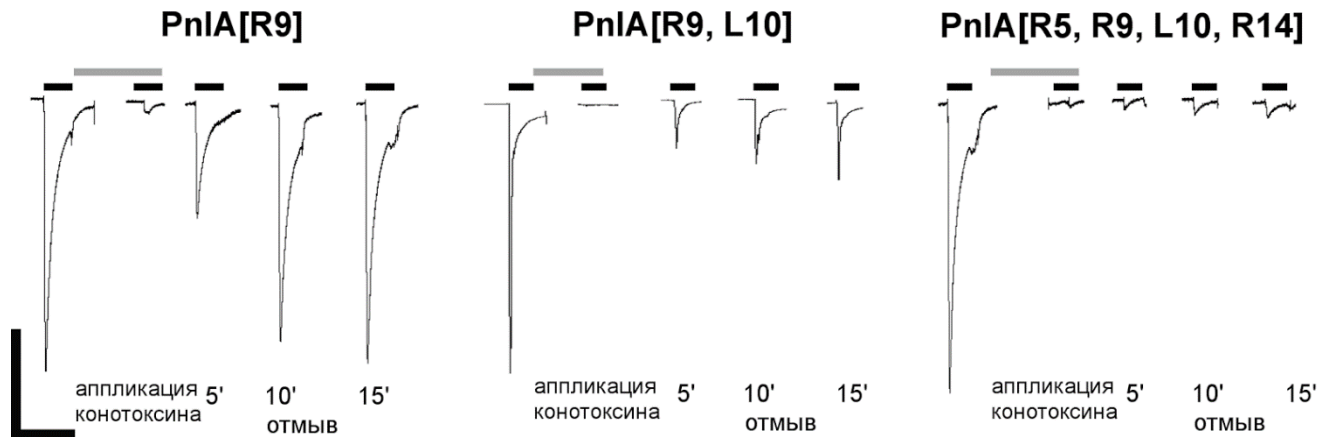


Рисунок 16. Ингибирование $\alpha 7$ nAChR аналогами α -конотоксина PnIA: PnIA[R9], PnIA[R9, L10] и PnIA[R5, R9, L10, R14].

Для оценки аффинности синтезированных аналогов была исследована концентрационная зависимость активности рецептора в присутствии указанных лигандов (Рис. 17).

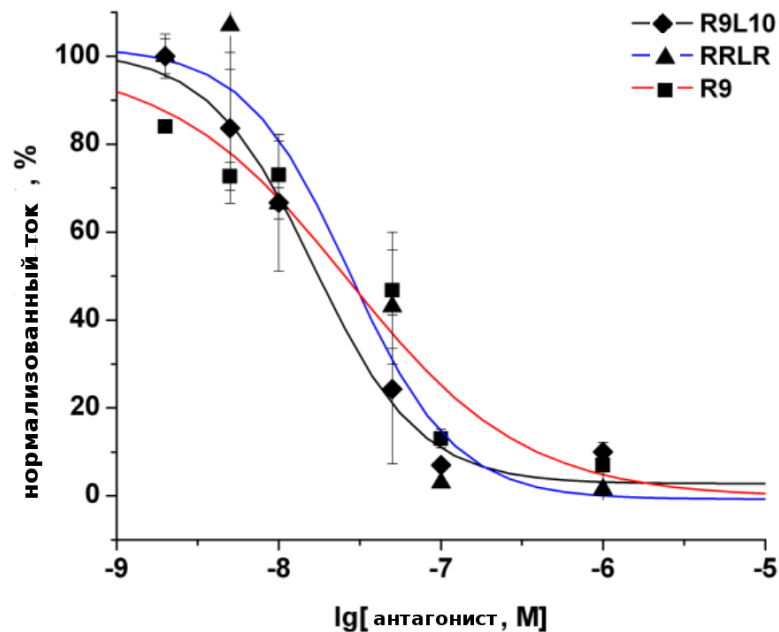


Рисунок 17. Концентрационная зависимость активности рецептора в присутствии синтетических аналогов α -конотоксина PnIA[R9], PnIA[R9, L10] и PnIA[R5, R9, L10, R14].

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.

3.3 Лиганды белковой природы

3.3.1 Эндогенный модулятор nAChR Lynx1

Эндогенные модуляторы nAChR из семейства трехпетельных белков Lуб считаются регуляторами нейрональной пластичности в ЦНС и сетчатке. Однако на данный момент очень немного известно об их взаимодействии с nAChR на молекулярном уровне.

В ходе работы по установлению функционально важных аминокислотных остатков модулятора nAChR Lynx1, были получены данные о молекулярных детерминантах взаимодействия данного модулятора nAChR с никотиновыми рецепторами. Однако аминокислотные остатки самого рецептора, ответственные за взаимодействие с Lynx1, 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.

Введение замены тирозина в 168 положении на аланин в некоторой степени улучшило сродство $\alpha 7$ /GlyR к ацетилхолину (Рис. 18А), при этом рецептор сохранил сродство к α -бунгаротоксину (Рис. 18Б). Однако эффект ингибирования мутантного рецептора водорастворимым аналогом Lynx1 перестал быть детектируемым в данной концентрации лиганда (20 μ М, Рис. 18В), что может говорить о том, что данный участок рецептора является важным либо для взаимодействия Lynx1 с $\alpha 7$ /GlyR, либо для проявления его ингибирующей активности в отношении данного рецептора.

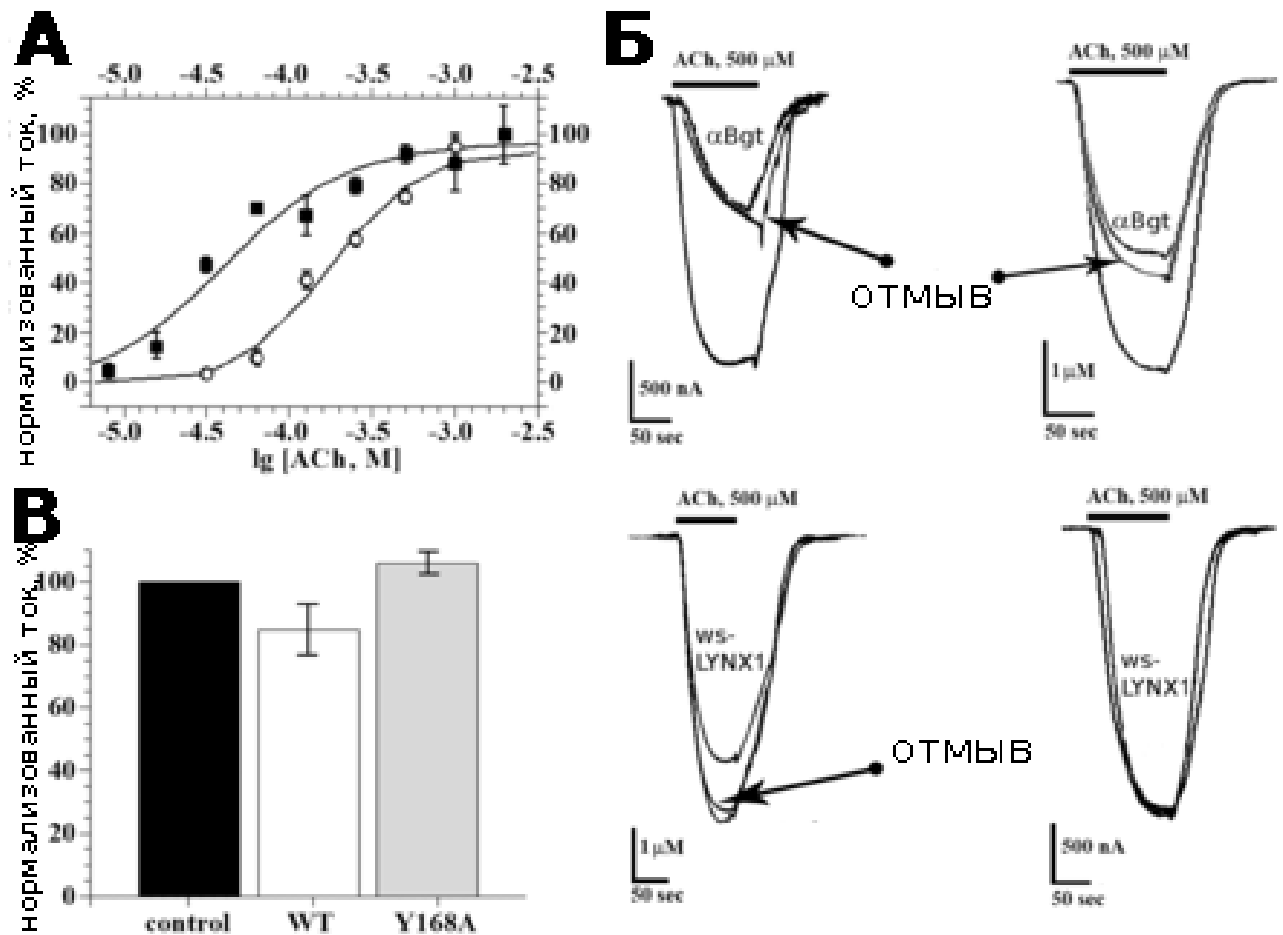


Рисунок 18. Анализ взаимодействия ws-LYNX1 с химерным $\alpha 7$ /GlyR рецептором и его вариантом с точечной заменой Y168A, экспрессированными в ооцитах шпорцевой лягушки. (А) Кривые концентрационной зависимости тока через рецептор в ответ на аппликацию ацетилхолина (круги отмечают нормализованный ответ рецептора дикого типа, квадраты - мутанта Y168A). По приведенным данным были рассчитаны константы EC_{50} : для исходного рецептора $170 \pm 20 \mu M$, для мутанта - $40 \pm 7 \mu M$. (Б) Примеры записи токов через исходный (слева) и мутантный (справа) рецептор $\alpha 7$ /GlyR. Показаны контрольные ответы на $500 \mu M$ ацетилхолин, ответы на $500 \mu M$ ацетилхолин в присутствии $20 nM$ αBgt или $20 \mu M$ ws-LYNX1, а также ответы на ту же концентрацию ацетилхолина после пяти минут отмывки ооцита буфером, не содержащим лигандов. (В) $20 \mu M$ ws-LYNX1 ингибировал рецептор, не содержащий точечных замен, на $15 \pm 8\%$, однако не ингибировал рецептор с заменой Y168A.

3.3.2 Трехпетельные антагонисты ГАМК-А из ядов змей

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 [136] 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 нашем распоряжении имеются трехпетельные токсины из ядов различных змей, многие из которых высокоомологичны α -бунгаротоксину. Таким образом, представлялось целесообразным проверить влияние небольшой библиотеки трехпетельных токсинов на функциональную активность ГАМК-А различных субъединичных составов. На первом этапе мы воспроизвели опыт по связыванию флуоресцентного производного α -бунгаротоксина с клетками, гетерологически экспрессирующими $\alpha 1\beta 3$ ГАМК-А. Флуоресцентный α -бунгаротоксин не только специфически связывался с данными клетками, но и эффективно вытеснялся 5 μM трехпетельными токсинами из яда кобр α -кобротоксином и NT I, следовательно, данные трехпетельные токсины связываются с ГАМК-А аналогично α -бунгаротоксину (Рис. 19).

В Отделе молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН ранее были получены флуоресцентные производные α -кобротоксина. 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 выразительно окрашивались 50 нМ флуоресцентными α -кобротоксином и α -бунгаротоксином, причем специфичность окрашивания была подтверждена вытеснением флуоресцентных лигандов немечеными токсинами, взятыми в концентрации 5 μM (Рис. 19). При анализе окрашивания клеток, экспрессирующих $\alpha 1\beta 3$ ГАМК-А флуоресцентным α -бунгаротоксином мы не детектировали различия в эффективности вытеснения

окрашивания α -бунгаротоксином и α -кобротоксином (Рис. 19 Д). Однако, немеченный α -кобротоксин более эффективно вытеснял окраску флуоресцентным α -кобротоксином с клеток, экспрессирующих $\alpha 1\beta 3$ ГАМК-А, чем α -бунгаротоксин (Рис. 19 Е). Специфическое окрашивание клеток, экспрессирующих $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК-А, флуоресцентными α -кобротоксином или α -бунгаротоксином также более эффективно вытеснялось немеченым α -кобротоксином (Рис. 19 Ж-З)*.

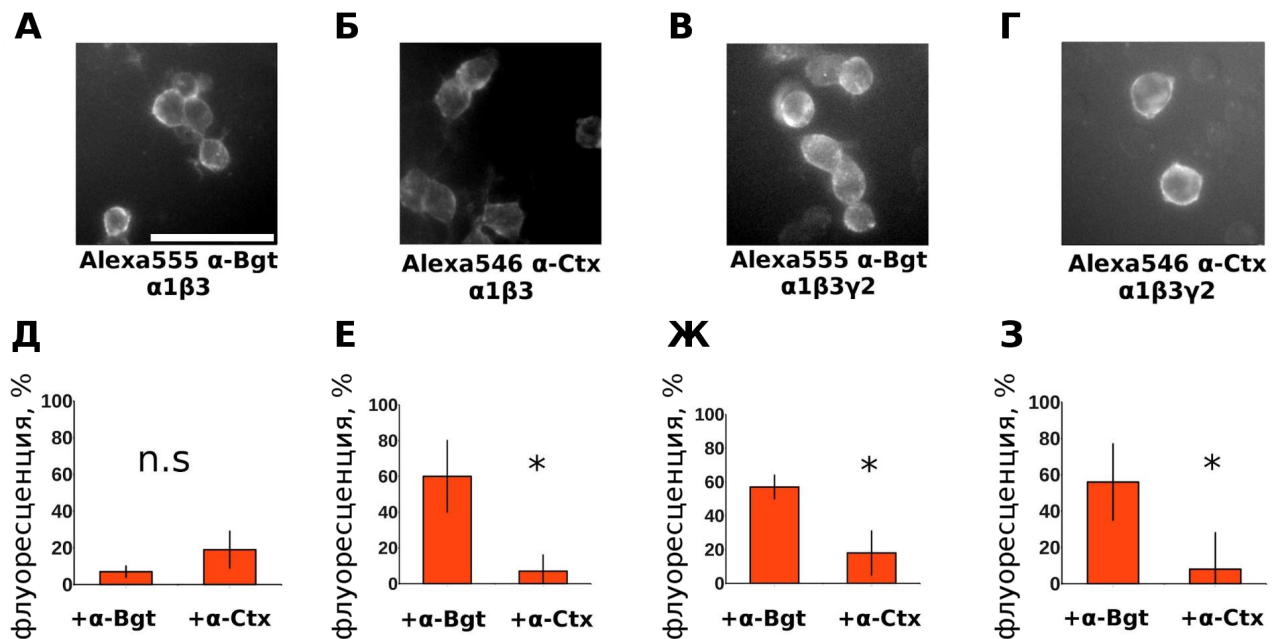


Рисунок 19. Вытеснение флуоресцентно-меченых токсинов с клеток, гетерологически экспрессирующих ГАМК-А. При перекрывании 95%-х доверительных интервалов (три независимых опыта) различия в флуоресценции считались незначительными (n.s.), в ином случае различия принимались достоверными (астериск).

Для того чтобы охарактеризовать аффинность α -кобротоксина и его селективность в отношении различных подтипов ГАМК-А, нами были проведены электрофизиологические исследования его активности методом двухэлектродной фиксации потенциала мембраны ооцитов шпорцевой лягушки. В первую очередь мы исследовали концентрационную зависимость ингибирования α -кобротоксином функционального ответа $\alpha 1\beta 3$ и $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК-А. Экспрессия $\gamma 2$ -субъединицы

* Данная часть экспериментальной работы выполнена автором совместно с научным сотрудником отдела молекулярных основ нейросигнализации ИБХ РАН Ириной Валериевной Шелухиной.

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. 20А).

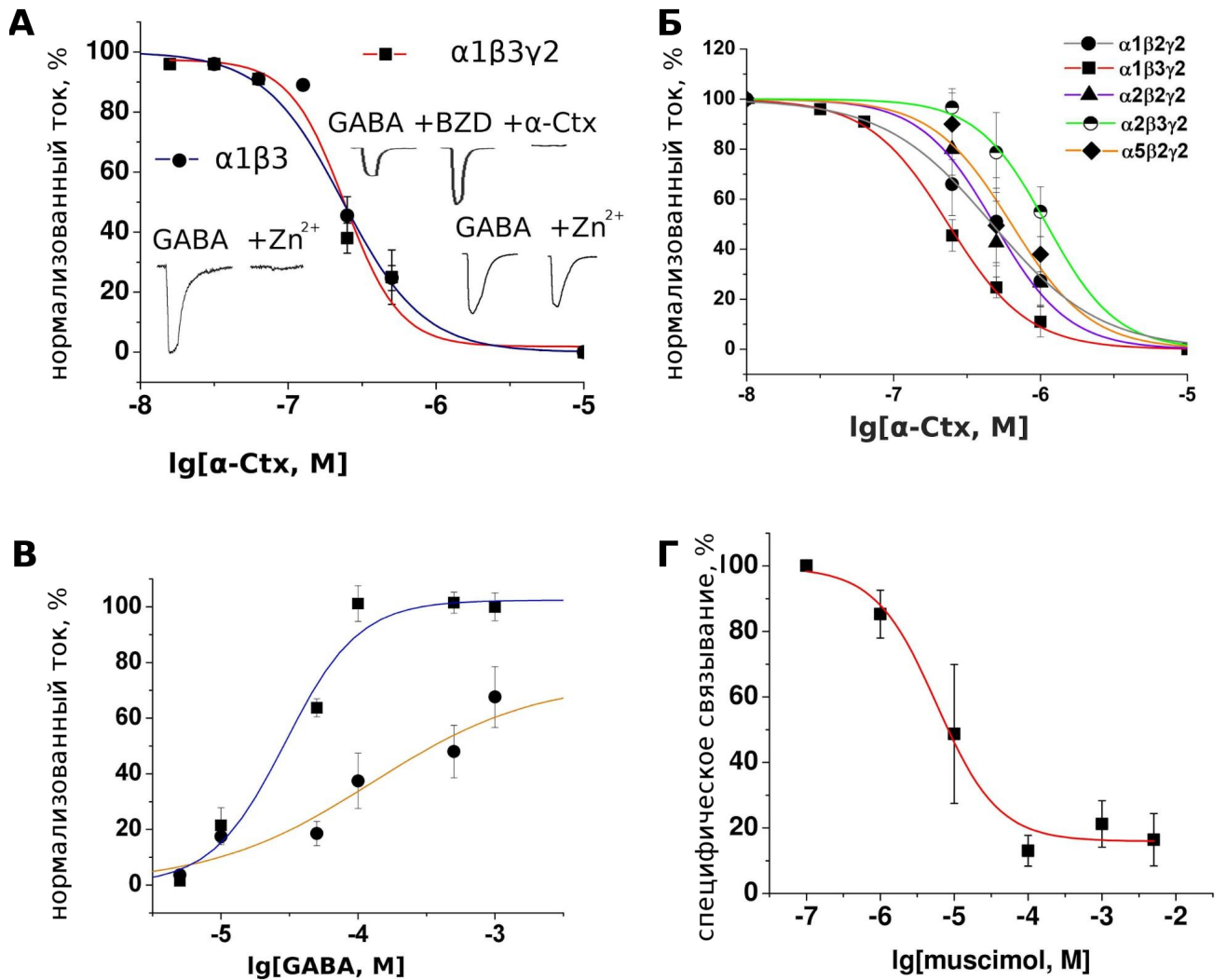


Рисунок 20. Описание взаимодействия α -кобратоксина с ГАМК-А.

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. 20 А, 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. 20 Б), значения IC_{50} приведены в таблице 2.

Таблица 2. Значения EC_{50} ГАМК и IC_{50} α -кобратоксина для различных подтипов ГАМК-А.

Комбинация субъединиц	$EC_{50} \pm S.E.M$ (95% доверительный интервал), μM	$IC_{50} \pm S.E.M$ (95% доверительный интервал), μM
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	35 ± 1 (33, 36)	469 ± 23 (427, 515)
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	29 ± 7 (19, 44)	236 ± 7 (223, 250)
$\alpha 2\beta 2\gamma 2$	45 ± 1 (43, 47)	485 ± 39 (417, 564)
$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	12 ± 1 (11, 13)	1099 ± 57 (1016, 1088)
$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	20 ± 2 (17, 24)	635 ± 91 (489, 825)

В ходе электрофизиологического тестирования действия α -кобратоксина на ГАМК-А нами было проведено сравнение концентрационных зависимостей ответа рецептора на аппликацию ГАМК в контроле и при аппликации 250 нМ токсина. В присутствии α -кобратоксина значение EC_{50} ГАМК-А сместилось с $29 \pm 7 \mu M$ до $128 \pm 25 \mu M$ (Рис. 20 В). 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 мусцимолем, 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 мусцимолем, могут, как мы считаем, свидетельствовать о наличии дополнительного неконкурентного участка связывания (Рис. 20 Г).

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 μM , α -кобратоксин не ингибирует $\alpha 1$ гомопентамерный ГлиР человека, что говорит об определенной селективности действия данного токсина.

На основании полученных нами экспериментальных и литературных данных мы предложили модель (Рис. 21 А и Б) возможного строения комплекса α -кобратоксина с ортостерическим сайтом ГАМК-А.

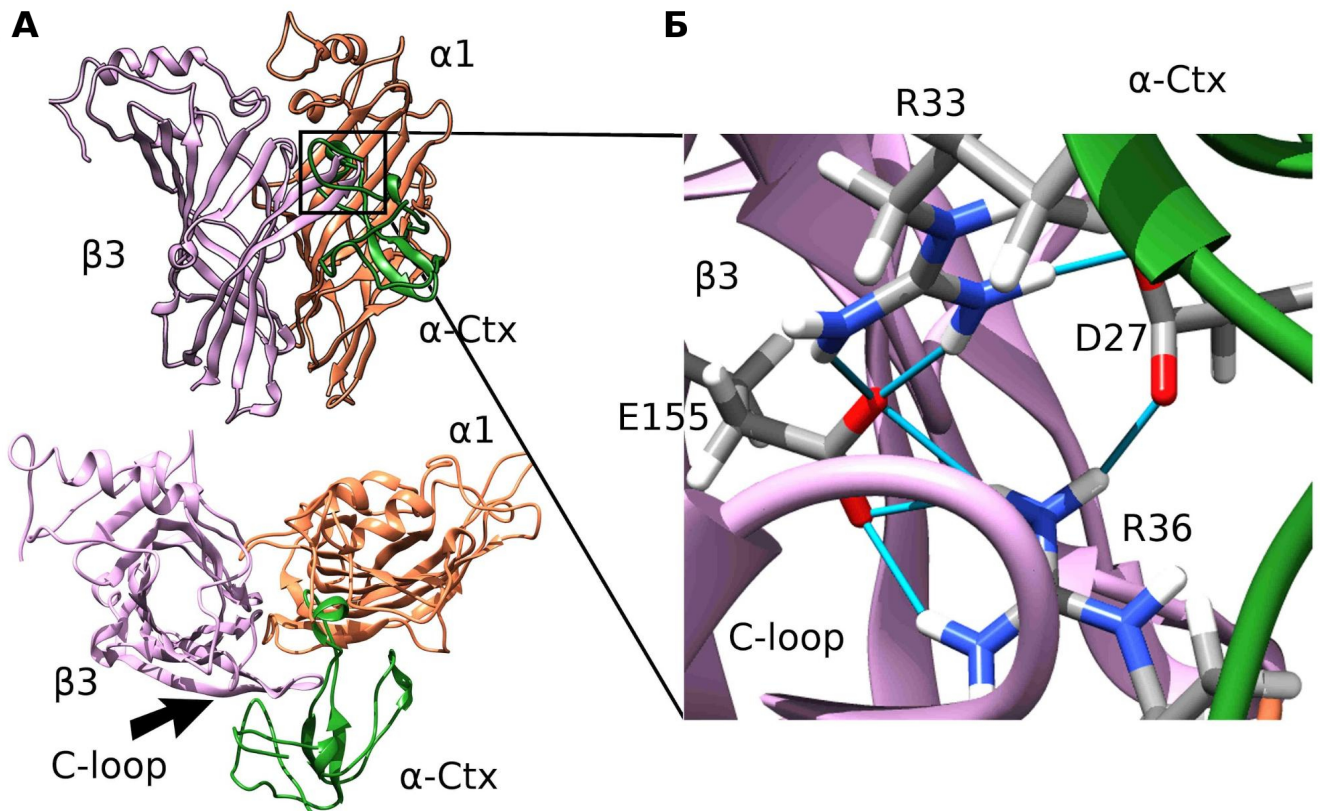


Рисунок 21. Модель комплекса α -кобротоксина с ГАМК-А.

Мы предположили, что структура комплекса α -кобротоксина 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%, см. табл. 3) гомология между ГАМК-А и АхСБ наблюдается, если брать в рассмотрение только остатки АхСБ, непосредственно контактирующие с α -кобротоксином, таким образом “с точки зрения токсина” два этих рецептора отличаются не слишком сильно.

Таблица 3. Сравнение остатков АхСБ, контактирующих с α -кобратоксином, с аналогичными остатками субъединиц ГАМК-А и двух типов нАхР (мышечного и $\alpha 7$).

“+”- сторона				“-”- сторона			
АхСБ	ГАМК-А	$\alpha 7$ нАхР	мышечный нАхР	АхСБ	ГАМК-А	$\alpha 7$ нАхР	мышечный нАхР
T144	G	S	T	W53	Y	W	R
V183	V	R	V	Q55	Q	Q	K
T184	V	F	F	L112	L	Q	T
Y185	F	Y	Y	M114	G	L	T
S186	T	E	S	T155	G	-	S
C187	-	C	C	S159	K	A	L
C188	G	C	C	E163	E	G	S
P189	-	K	P	Y164	-	Y	N
E190	-	E	T				
A191	A	P	P				
Y192	Y	Y	Y				

3) Исходя из полученных нами данных, связывание α -кобратоксина с ГАМК-А происходит в районе гидрофобного кармана под петлей С $\beta 3$ субъединицы, что подтверждается конкуренцией токсина с мусцимолем; 4) в связывании α -кобратоксина с ГАМК-А, также как и с АхСБ (а также нАхР) важную роль играет центральная петля, что было показано нами на примере синтетического фрагмента центральной петли α -кобратоксина.

Таким образом, при конструировании модели комплекса α -кобратоксина с ГАМК-А нами был использован наблюдаемый в экспериментально полученной структуре комплекса α -кобратоксина с АхСБ мотив взаимодействия, при котором

центральная петля токсина погружена в гидрофобный карман под петлей С $\beta 3$ субъединицы (Рис. 21).

Данная модель комплекса была подвергнута 100 нс молекулярной динамике и в течение последних 40 нс была весьма стабильна (среднеквадратичное отклонение основной цепи белка не превысило 0,1 нм). Комплекс α -кобрatokсина с центральной петлей, помещенной под петлю С $\beta 3$ субъединицы ГАМК-А на границе $\beta 3$ и $\alpha 1$ субъединиц подтвердил свою стабильность на данном временном масштабе. Также нами была сконструирована модель комплекса α -кобрatokсина с ГАМК-А, в которой токсин размещался под петлей С субъединицы $\alpha 1$ на границе $\alpha 1$ и $\beta 3$ субъединиц. Однако, α -кобрatokсин теряет свое характерное положение относительно субъединиц уже в течение первых 10 нс молекулярной динамики (Рис. 21). Таким образом, косвенно, данные молекулярной динамики подтверждают возможность существования комплекса α -кобрatokсина с ГАМК-А подобного по структуре комплексу α -кобрatokсина с АхСБ и характеризующегося положением центральной петли токсина под петлей С $\beta 3$ субъединицы ГАМК-А.

В ходе электрофизиологического тестирования различных трехпетельных токсинов на ГАМК-А нами было обнаружено, что токсин NT I из яда кобры *Naja oxiana* ингибирует ГАМК-А, а NT II из того же яда на функциональную активность рецептора не влияет. Молекулярная динамика модели комплекса NT II с ГАМК-А, полученного аналогично комплексу ГАМК-А с α -кобрatokсином, показала нестабильность данного комплекса в области центральной петли, погруженной в гидрофобный карман под петлей С $\beta 3$ субъединицы (Рис. 21). В то же время, модель комплекса NT I с ГАМК-А проявляет свойства сходные с моделью комплекса с α -кобрatokсином (Рис. 21). Ранее в отделе биоинженерии ИБХ РАН был получен химерный токсин NT II с центральной петлей, содержащей вставку фрагмента центральной петли NT I (т.н. химера NT II/I, см. Рис. 22 А).

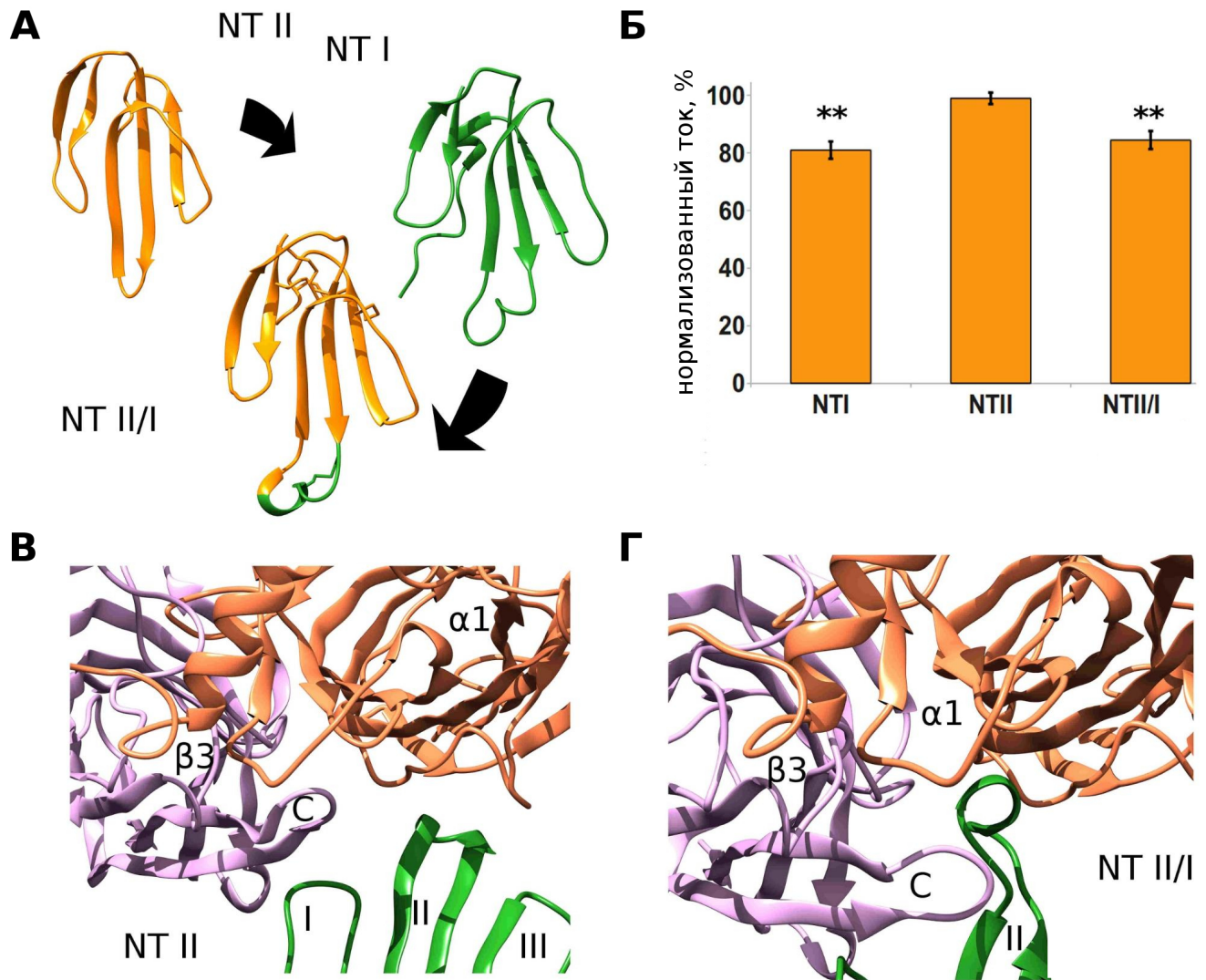


Рисунок 22. Взаимодействие химерного нейротоксина с ГАМК-А. Астериск отмечает достоверное ($p < 0,01$; t-тест, три независимых эксперимента).

Мы предположили, что данный химерный белок способен ингибировать ГАМК-А и проверили его активность в электрофизиологическом тесте. Действительно, NT II/I проявлял свойства слабого ингибитора ГАМК-А (Рис. 22 Б). Таким образом, принцип построения модели комплекса α -кобратоксина (и родственных ему NT I и α -бунгаротоксина) путем помещения центральной петли лиганда под петлю “С” $\beta 3$ субъединицы ГАМК-А (Рис. 22 В и Г), косвенно подтверждается экспериментальными данными.

Центральная петля α -кобратоксина несет значительный положительный заряд. В то же время, в электрофизиологических тестах нами была зафиксирована некоторая селективность действия α -кобратоксина по отношению к $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ в

сравнении с $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ ГАМК-А. 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 $\alpha 1$ и $\alpha 2$ субъединиц обращает на себя внимание прежде всего остаток в положении 67: S67 в $\alpha 1$ и K67 в $\alpha 2$ субъединице. Для проверки гипотезы о возможном влиянии данных аминокислотных остатков на сродство к α -кобратоксину нами были протестированы мутантные формы субъединиц ГАМК-А $\alpha 1(S67K)$ и $\alpha 2(K67S)$. 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: $\alpha 1 > \alpha 2(K67S) > \alpha 1(S67K) > \alpha 2$ (Рис. 23), что косвенно подтверждает правомерность построенной нами модели комплекса токсина с рецептором.

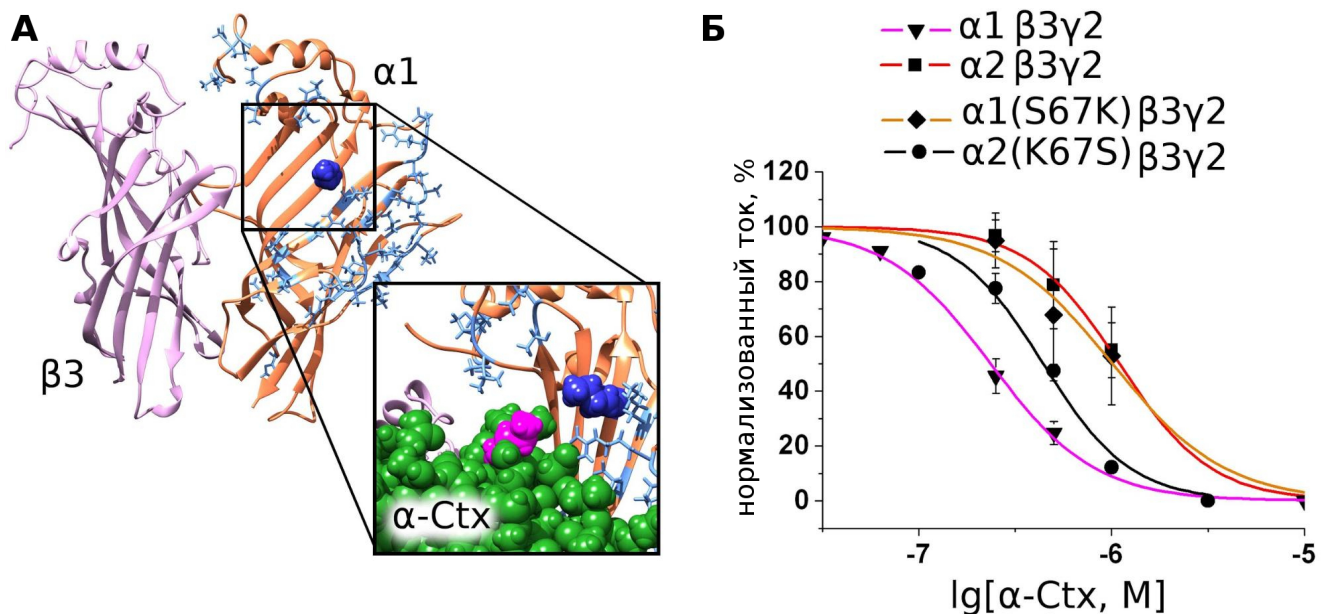


Рисунок 23. Точечные мутации в ортостерическом участке ГАМК-А влияют на параметры ингибирования данного рецептора α -кобратоксином.

Заключение

Таким образом, представленные 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 -конотоксина PnIA, а также открытие полного ингибирования функциональных подтипов ГАМК-А трехпетельным лигандом α -кобратоксином.

Выводы

- 1) Сочетанием компьютерного моделирования, радиолигандного анализа и электрофизиологии исследовано взаимодействие ряда низкомолекулярных, пептидных и белковых соединений с никотиновыми и другими Суспетельными 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 со сродством 138 мкМ.
- 4) Показано, что сконструированные новые аналоги α -конотоксина PnIA имеют значительно более высокое сродство к $\alpha 7$ nAChR (IC_{50} 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 -кобротоксин 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 сокращений

nAChR - Никотиновый ацетилхолиновый рецептор

5OT-3 - ионотропный рецептор 5-окситриптамина (серотонина)

ГАМК-А - ионотропный рецептор гамма-аминомасляной кислоты

ГлиР - рецептор глицина

AхСБ - ацетилхолин-связывающий белок

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

ЦНС - центральная нервная система

ВНС - висцеральная нервная система

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция, сопряженная с обратной транскрипцией

LsIII - нейротоксин 3 из яда морской змеи *Laticauda semifasciata*

WТХ - слабый нейротоксин (**W**eak **T**oxin) из яда кобры *Naja kaouthia*

α-Сtx - длинный нейротоксин из яда кобры *Naja kaouthia*, α-кобротоксин

OWT - слабый нейротоксин из яда кобры *Naja oxiana*

NT I и **NT II** - длинный и короткий нейротоксин из яда кобры *Naja oxiana*

HEPES - цвиттерионный буферный агент, 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота

DMEM – модифицированная среда Игла

Список литературы

1. Mukherjee, A. Computational analysis of a cys-loop ligand gated ion channel from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol.* **2015**, *49*, 742–754.
2. Jaiteh, M.; Taly, A.; Hénin, J. Evolution of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels: Pro-Loop Receptors. *PLoS One* **2016**, *11*, e0151934.
3. Corringer, P.-J.; Baaden, M.; Bocquet, N.; Delarue, M.; Dufresne, V.; Nury, H.; Prevost, M.; Van Renterghem, C. Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues. *J. Physiol.* **2010**, *588*, 565–72.
4. Dionisio, L.; Arias, V.; Bouzat, C.; Esandi, M. del C. GABAA receptor plasticity in Jurkat T cells. *Biochimie* **2013**, *95*, 2376–84.
5. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967–89.
6. Zuber, B.; Unwin, N. Structure and superorganization of acetylcholine receptor-rapsyn complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 10622–7.
7. Unwin, N.; Fujiyoshi, Y. Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *J. Mol. Biol.* **2012**, *422*, 617–34.
8. Lugovskoy, A. A.; Maslennikov, I. V.; Utkin, Y. N.; Tsetlin, V. I.; Cohen, J. B.; Arseniev, A. S. Spatial structure of the M3 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *255*, 455–461.
9. Bondarenko, V.; Tillman, T.; Xu, Y.; Tang, P. NMR structure of the transmembrane domain of the n-acetylcholine receptor beta2 subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1608–14.
10. Pashkov, V. S.; Maslennikov, I. V.; Tchikin, L. D.; Efremov, R. G.; Ivanov, V. T.; Arseniev, A. S. Spatial structure of the M2 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor α -subunit. *FEBS Lett.* **1999**, *457*, 117–121.
11. Brejc, K.; van Dijk, W. J.; Klaassen, R. V.; Schuurmans, M.; van Der Oost, J.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **2001**, *411*, 269–76.
12. Celie, P. H. N.; Kasheverov, I. E.; Mordvintsev, D. Y.; Hogg, R. C.; van Nierop, P.; van Elk, R.; van Rossum-Fikkert, S. E.; Zhmak, M. N.; Bertrand, D.; Tsetlin, V.; Sixma, T. K.; Smit, A. B. Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog

AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 582–8.

13. Hilf, R. J. C.; Dutzler, R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **2008**, *452*, 375–9.

14. Hilf, R. J. C.; Dutzler, R. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **2009**, *457*, 115–8.

15. Hibbs, R. E.; Gouaux, E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* **2011**, *474*, 54–60.

16. Smit, A. B.; Syed, N. I.; Schaap, D.; van Minnen, J.; Klumperman, J.; Kits, K. S.; Lodder, H.; van der Schors, R. C.; van Elk, R.; Sorgedrager, B.; Brejc, K.; Sixma, T. K.; Geraerts, W. P. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* **2001**, *411*, 261–8.

17. Olsen, J. A.; Balle, T.; Gajhede, M.; Ahring, P. K.; Kastrup, J. S. Molecular recognition of the neurotransmitter acetylcholine by an acetylcholine binding protein reveals determinants of binding to nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* **2014**, *9*, e91232.

18. Ihara, M.; Okajima, T.; Yamashita, A.; Oda, T.; Hirata, K.; Nishiwaki, H.; Morimoto, T.; Akamatsu, M.; Ashikawa, Y.; Kuroda, S.; Mega, R.; Kuramitsu, S.; Sattelle, D. B.; Matsuda, K. Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invert. Neurosci.* **2008**, *8*, 71–81.

19. Grutter, T.; Le Novere, N.; Changeux, J.-P. Rational Understanding of Nicotinic Receptors Drug Binding. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 645–651.

20. Tsetlin, V.; Utkin, Y.; Kasheverov, I. Polypeptide and peptide toxins, magnifying lenses for binding sites in nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 720–31.

21. Shahsavari, A.; Ahring, P. K.; Olsen, J. A.; Krintel, C.; Kastrup, J. S.; Balle, T.; Gajhede, M. Acetylcholine-Binding Protein Engineered to Mimic the $\alpha 4$ - $\alpha 4$ Binding Pocket in $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Reveals Interface Specific Interactions Important for Binding and Activity. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88*, 697–707.

22. Li, S.-X.; Huang, S.; Bren, N.; Noridomi, K.; Dellisanti, C. D.; Sine, S. M.; Chen, L. Ligand-binding domain of an $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1253–1259.

23. Sauguet, L.; Howard, R. J.; Malherbe, L.; Lee, U. S.; Corringer, P.-J.; Harris, R. A.; Delarue, M. Structural basis for potentiation by alcohols and anaesthetics in a ligand-gated ion channel. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1697.
24. Spurny, R.; Ramerstorfer, J.; Price, K.; Brams, M.; Ernst, M.; Nury, H.; Verheij, M.; Legrand, P.; Bertrand, D.; Bertrand, S.; Dougherty, D. A.; de Esch, I. J. P.; Corringer, P.-J.; Sieghart, W.; Lummis, S. C. R.; Ulens, C. Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, E3028–E3034.
25. Pan, J.; Chen, Q.; Willenbring, D.; Mowrey, D.; Kong, X.-P.; Cohen, A.; Divito, C. B.; Xu, Y.; Tang, P. Structure of the pentameric ligand-gated ion channel GLIC bound with anesthetic ketamine. *Structure* **2012**, *20*, 1463–9.
26. Nury, H.; Poitevin, F.; Van Renterghem, C.; Changeux, J.-P.; Corringer, P.-J.; Delarue, M.; Baaden, M. One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 6275–80.
27. Althoff, T.; Hibbs, R. E.; Banerjee, S.; Gouaux, E. X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature* **2014**, *512*, 333–7.
28. Naffaa, M. M.; Chebib, M.; Hibbs, D. E.; Hanrahan, J. R. Comparison of templates for homology model of $\rho 1$ GABAC receptors: More insights to the orthosteric binding site's structure and functionality. *J. Mol. Graph. Model.* **2015**, *62*, 43–55.
29. Lummis, S. C. R. 5-HT(3) receptors. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40239–45.
30. Changeux, J. P. The nicotinic acetylcholine receptor: The founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40207–40215.
31. Wu, J.; Lukas, R. J. Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 800–7.
32. Gotti, C.; Riganti, L.; Vailati, S.; Clementi, F. Brain Neuronal Nicotinic Receptors as New Targets for Drug Discovery. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 407–428.
33. Dani, J. A.; Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 699–729.
34. Zhao, L.; Vahlquist, A.; Virtanen, M.; Wennerstrand, L.; Lind, L. K.; Lundström, A.; Hellström Pigg, M. Palmoplantar keratoderma of the Gamborg-Nielsen type is

- caused by mutations in the SLURP1 gene and represents a variant of Mal de Meleda. *Acta Derm. Venereol.* **2014**, *94*, 707–10.
35. Gündisch, D.; Eibl, C. Nicotinic acetylcholine receptor ligands, a patent review (2006-2011). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 1867–96.
36. Flood, P. The importance of myorelaxants in anesthesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 322–7.
37. Freis, E. D.; Rose, J. C.; Partenope, E. A.; Higgins, T. F.; Kelley, R. T.; Schnaper, H. W.; Johnson, R. L. The hemodynamic effects of hypotensive drugs in man. III. Hexamethonium. *J. Clin. Invest.* **1953**, *32*, 1285–98.
38. Mousavi, M.; Hellström-Lindhahl, E.; Guan, Z.-Z.; Bednar, I.; Nordberg, A. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci.* **2001**, *70*, 577–590.
39. Magorian, T.; Flannery, K. B.; Miller, R. D. Comparison of rocuronium, succinylcholine, and vecuronium for rapid-sequence induction of anesthesia in adult patients. *Anesthesiology* **1993**, *79*, 913–8.
40. Deardorff, W. J.; Shobassy, A.; Grossberg, G. T. Safety and clinical effects of EVP-6124 in subjects with Alzheimer's disease currently or previously receiving an acetylcholinesterase inhibitor medication. *Expert Rev. Neurother.* **2015**, *15*, 7–17.
41. Barbier, A. J.; Hilhorst, M.; Vliet, A. Van; Snyder, P.; Palfreyman, M. G.; Gawryl, M.; Dgetluck, N.; Massaro, M.; Tiessen, R.; Timmerman, W.; Hilt, D. C. Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Encenicline, a Selective $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Partial Agonist, in Single Ascending-dose and Bioavailability Studies. *Clin. Ther.* **2015**, *37*, 311–24.
42. Maricq, A.; Peterson, A.; Brake, A.; Myers, R.; Julius, D. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* (80-.). **1991**, *254*, 432–437.
43. GADDUM, J. H.; PICARELLI, Z. P. TWO KINDS OF TRYPTAMINE RECEPTOR. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 134–139.
44. Derkach, V.; Surprenant, A.; North, R. A. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* **1989**, *339*, 706–9.
45. Gehlert, D. R.; Gackenheimer, S. L.; Wong, D. T.; Robertson, D. W. Localization of 5-HT₃ receptors in the rat brain using [3H]LY278584. *Brain Res.* **1991**, *553*, 149–154.
46. Machu, T. K. Therapeutics of 5-HT₃ receptor antagonists: current uses and future directions. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *130*, 338–47.

47. Pinkerton, C. R.; Williams, D.; Wootton, C.; Meller, S. T.; McElwain, T. J. 5-HT₃ antagonist ondansetron--an effective outpatient antiemetic in cancer treatment. *Arch. Dis. Child.* **1990**, *65*, 822–825.
48. Newman, A. S.; Batis, N.; Grafton, G.; Caputo, F.; Brady, C. A.; Lambert, J. J.; Peters, J. A.; Gordon, J.; Brain, K. L.; Powell, A. D.; Barnes, N. M. 5-Chloroindole: a potent allosteric modulator of the 5-HT₃ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 1228–38.
49. Staubli, U.; Xu, F. Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 2445–2452.
50. Hassaine, G.; Deluz, C.; Grasso, L.; Wyss, R.; Tol, M. B.; Hovius, R.; Graff, A.; Stahlberg, H.; Tomizaki, T.; Desmyter, A.; Moreau, C.; Li, X.-D.; Poitevin, F.; Vogel, H.; Nury, H. X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* **2014**, *512*, 276–81.
51. Davies, P. A.; Wang, W.; Hales, T. G.; Kirkness, E. F. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn²⁺. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 712–7.
52. Macdonald, R. L.; Olsen, R. W. GABA A Receptor Channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **1994**, *17*, 569–602.
53. Wisden, W.; Laurie, D.; Monyer, H.; Seeburg, P. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 1040–1062.
54. Krishek, B. J.; Moss, S. J.; Smart, T. G. Homomeric beta 1 gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 494–504.
55. Miller, P. S.; Aricescu, A. R. Crystal structure of a human GABA_A receptor. *Nature* **2014**, *512*, 270–275.
56. Chang, W.-P.; Shyu, B.-C. Anterior Cingulate epilepsy: mechanisms and modulation. *Front. Integr. Neurosci.* **2014**, *7*, 104.
57. Stan, A. D.; Lewis, D. A. Altered cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: insights into novel therapeutic strategies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13*, 1557–62.
58. Olsen, R. W. Picrotoxin-like channel blockers of GABA_A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 6081–2.

59. Wyrembek, P.; Negri, R.; Appendino, G.; Mozrzymas, J. W. Inhibitory effects of oenanthotoxin analogues on GABAergic currents in cultured rat hippocampal neurons depend on the polyacetylenes' polarity. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *683*, 35–42.
60. Razet, R.; Thomet, U.; Furtmüller, R.; Jursky, F.; Sigel, E.; Sieghart, W.; Dodd, R. H. Use of bicuculline, a GABA antagonist, as a template for the development of a new class of ligands showing positive allosteric modulation of the GABAA receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2579–2583.
61. Ashton, H. The diagnosis and management of benzodiazepine dependence. *Curr. Opin. Psychiatry* **2005**, *18*, 249–255.
62. Pfeiffer, F.; Graham, D.; Betz, H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 9389–9393.
63. Prior, P.; Schmitt, B.; Grenningloh, G.; Pribilla, I.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Maulet, Y.; Werner, P.; Langosch, D.; Kirsch, J.; Betz, H. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* **1992**, *8*, 1161–1170.
64. Dutertre, S.; Becker, C.-M.; Betz, H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40216–23.
65. Yang, Z.; Taran, E.; Webb, T. I.; Lynch, J. W. Stoichiometry and subunit arrangement of $\alpha 1\beta$ glycine receptors as determined by atomic force microscopy. *Biochemistry* **2012**, *51*, 5229–31.
66. Du, J.; Lü, W.; Wu, S.; Cheng, Y.; Gouaux, E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature* **2015**, *526*, 224–229.
67. Huang, X.; Chen, H.; Michelsen, K.; Schneider, S.; Shaffer, P. L. Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine. *Nature* **2015**, *526*, 277–80.
68. Rajendra, S.; Lynch, J. W.; Pierce, K. D.; French, C. R.; Barry, P. H.; Schofield, P. R. Startle disease mutations reduce the agonist sensitivity of the human inhibitory glycine receptor. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18739–42.
69. Ramanathan, S.; Woodroffe, A.; Flodman, P. L.; Mays, L. Z.; Hanouni, M.; Modahl, C. B.; Steinberg-Epstein, R.; Bocian, M. E.; Spence, M. A.; Smith, M. A case of autism with an interstitial deletion on 4q leading to hemizygoty for genes encoding for glutamine and glycine neurotransmitter receptor sub-units (AMPA 2, GLRA3, GLRB) and neuropeptide receptors NPY1R, NPY5R. *BMC Med. Genet.* **2004**, *5*, 10.

70. Wuerfel, E.; Bien, C. G.; Vincent, A.; Woodhall, M.; Brockmann, K. Glycine receptor antibodies in a boy with focal epilepsy and episodic behavioral disorder. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *343*, 180–2.
71. Betz, H.; Laube, B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 1600–10.
72. GRAHAM, D.; PFEIFFER, F.; BETZ, H. Photoaffinity-Labeling of the Glycine Receptor of Rat Spinal Cord. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *131*, 519–525.
73. Webb, T. I.; Lynch, J. W. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 2350–67.
74. Sieghart, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* **1995**, *47*, 181–234.
75. Bogdanov, Y.; Michels, G.; Armstrong-Gold, C.; Haydon, P. G.; Lindstrom, J.; Pangalos, M.; Moss, S. J. Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4381–4389.
76. Matsumoto, H.; Shibasaki, K.; Uchigashima, M.; Koizumi, A.; Kurachi, M.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Kawashima, K.; Watanabe, M.; Kishi, S.; Ishizaki, Y. Localization of acetylcholine-related molecules in the retina: implication of the communication from photoreceptor to retinal pigment epithelium. *PLoS One* **2012**, *7*, e42841.
77. John, S.; Natarajan, S.; Parikumar, P.; Shanmugam P, M.; Senthilkumar, R.; Green, D. W.; Abraham, S. J. K. Choice of Cell Source in Cell-Based Therapies for Retinal Damage due to Age-Related Macular Degeneration: A Review. *J. Ophthalmol.* **2013**, *2013*, 465169.
78. Maneu, V.; Gerona, G.; Fernández, L.; Cuenca, N.; Lax, P. Evidence of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor expression in retinal pigment epithelial cells. *Vis. Neurosci.* **2010**, *27*, 139–47.
79. Ariel, M.; Daw, N. W. Effects of cholinergic drugs on receptive field properties of rabbit retinal ganglion cells. *J. Physiol.* **1982**, *324*, 135–60.
80. Kim, H. J.; Jeon, C. J. Synaptic pattern of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits on the direction-selective retinal ganglion cells in the postnatal mouse retina. *Exp. Eye Res.* **2014**, *122*, 54–64.
81. Cheng, Z.-Y.; Wang, X.-P.; Schmid, K. L.; Liu, L. Identification of GABA receptors in chick retinal pigment epithelium. *Neurosci. Lett.* **2013**, *539*, 43–7.
82. Haverkamp, S. Glycine Receptor Diversity in the Mammalian Retina 2012.

83. Pootanakit, K.; Brunken, W. J. Identification of 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} receptor subunits in mammalian retinae: potential pre-synaptic modulators of photoreceptors. *Brain Res.* **2001**, *896*, 77–85.
84. Conti-Fine, B. M.; Milani, M.; Kaminski, H. J. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2843–54.
85. Harper, C. M. Congenital myasthenic syndromes. *Semin. Neurol.* **2004**, *24*, 111–23.
86. Syken, J.; Shatz, C. J. Expression of T cell receptor beta locus in central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13048–53.
87. Wheeler, D. W.; Thompson, A. J.; Corletto, F.; Reckless, J.; Loke, J. C. T.; Lapaque, N.; Grant, A. J.; Mastroeni, P.; Grainger, D. J.; Padgett, C. L.; O'Brien, J. A.; Miller, N. G. A.; Trowsdale, J.; Lummis, S. C. R.; Menon, D. K.; Beech, J. S. Anaesthetic impairment of immune function is mediated via GABA(A) receptors. *PLoS One* **2011**, *6*, e17152.
88. Nordman, J. C.; Muldoon, P.; Clark, S.; Damaj, M. I.; Kabbani, N. The α 4 nicotinic receptor promotes CD4⁺ T-cell proliferation and a helper T-cell immune response. *Mol. Pharmacol.* **2014**, *85*, 50–61.
89. Razani-Boroujerdi, S.; Boyd, R. T.; Davila-Garcia, M. I.; Nandi, J. S.; Mishra, N. C.; Singh, S. P.; Pena-Philippides, J. C.; Langley, R.; Sopor, M. L. T Cells Express α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits That Require a Functional TCR and Leukocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase for Nicotine-Induced Ca²⁺ Response. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 2889–2898.
90. Grando, S. A.; Horton, R. M.; Pereira, E. F. R.; Diethelm-Okita, B. M.; George, P. M.; Albuquerque, E. X.; Conti-Fine, B. M. A Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulating Cell Adhesion and Motility Is Expressed in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *105*, 774–781.
91. Arredondo, J.; Chernyavsky, A. I.; Jolkovsky, D. L.; Pinkerton, K. E.; Grando, S. A. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of α 5 and α 7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *FASEB J.* **2008**, *22*, 1356–68.
92. Hagforsen, E.; Edvinsson, M.; Nordlind, K.; Michaelsson, G. Expression of nicotinic receptors in the skin of patients with palmoplantar pustulosis. *Br. J. Dermatol.* **2002**, *146*, 383–391.
93. Arredondo, J.; Nguyen, V. T.; Chernyavsky, A. I.; Bercovich, D.; Orr-Urtreger, A.; Vetter, D. E.; Grando, S. A. Functional role of α 7 nicotinic receptor in physiological control of cutaneous homeostasis. *Life Sci.* **2003**, *72*, 2063–2067.

94. Arredondo, J.; Chernyavsky, A. I.; Jolkovsky, D. L.; Webber, R. J.; Grando, S. A. SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium. *J. Cell. Physiol.* **2006**, *208*, 238–45.
95. Chernyavsky, A. I.; Kalantari-Dehaghi, M.; Phillips, C.; Marchenko, S.; Grando, S. A. Novel cholinergic peptides SLURP-1 and -2 regulate epithelialization of cutaneous and oral wounds. *Wound Repair Regen.* *20*, 103–13.
96. Maouche, K.; Medjber, K.; Zahm, J.-M.; Delavoie, F.; Terryn, C.; Coraux, C.; Pons, S.; Cloëz-Tayarani, I.; Maskos, U.; Birembaut, P.; Tournier, J.-M. Contribution of $\alpha 7$ nicotinic receptor to airway epithelium dysfunction under nicotine exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 4099–104.
97. Narumoto, O.; Niikura, Y.; Ishii, S.; Morihara, H.; Okashiro, S.; Nakahari, T.; Nakano, T.; Matsumura, H.; Shimamoto, C.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Yamashita, N.; Nagase, T.; Kawashima, K.; Yamashita, N. Effect of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *438*, 175–9.
98. Jiang, Y.; Dai, A.; Zhou, Y.; Peng, G.; Hu, G.; Li, B.; Sham, J. S. K.; Ran, P. Nicotine elevated intracellular Ca^{2+} in rat airway smooth muscle cells via activating and up-regulating $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 389–401.
99. Brannigan, G.; Hénin, J.; Law, R.; Eckenhoff, R.; Klein, M. L. Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 14418–23.
100. Levitan, I.; Singh, D. K.; Rosenhouse-Dantsker, A. Cholesterol binding to ion channels. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 65.
101. Valera, S.; Ballivet, M.; Bertrand, D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 9949–9953.
102. Paradiso, K.; Sabey, K.; Evers, A. S.; Zorumski, C. F.; Covey, D. F.; Steinbach, J. H. Steroid Inhibition of Rat Neuronal Nicotinic $\alpha 4\beta 2$ Receptors Expressed in HEK 293 Cells. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 341–351.
103. Stell, B. M.; Brickley, S. G.; Tang, C. Y.; Farrant, M.; Mody, I. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14439–44.

104. Wu, F.-S.; Lai, C.-P.; Liu, B.-C. Non-competitive inhibition of 5-HT₃ receptor-mediated currents by progesterone in rat nodose ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* **2000**, *278*, 37–40.
105. Baenziger, J. E.; Ryan, S. E.; Goodreid, M. M.; Vuong, N. Q.; Sturgeon, R. M.; daCosta, C. J. B. Lipid composition alters drug action at the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 880–90.
106. Yévenes, G. E.; Zeilhofer, H. U. Molecular sites for the positive allosteric modulation of glycine receptors by endocannabinoids. *PLoS One* **2011**, *6*, e23886.
107. Zhang, L.; Xiong, W. Modulation of the Cys-loop ligand-gated ion channels by fatty acid and cannabinoids. *Vitam. Horm.* **2009**, *81*, 315–35.
108. Jacob, P.; Yu, L.; Shulgin, A. T.; Benowitz, N. L. Minor tobacco alkaloids as biomarkers for tobacco use: comparison of users of cigarettes, smokeless tobacco, cigars, and pipes. *Am. J. Public Health* **1999**, *89*, 731–736.
109. Prince, R. J.; Sine, S. M. Epibatidine activates muscle acetylcholine receptors with unique site selectivity. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1817–27.
110. Osipov, A.; Utkin, Y. Effects of Snake Venom Polypeptides on Central Nervous System. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 315–328.
111. Schmidt, J. J.; Weinstein, S. A.; Smith, L. A. Molecular properties and structure-function relationships of lethal peptides from venom of Wagler's pit viper, *Trimeresurus wagleri*. *Toxicon* **1992**, *30*, 1027–1036.
112. Utkin, Y. N.; Weise, C.; Kasheverov, I. E.; Andreeva, T. V.; Kryukova, E. V.; Zhmak, M. N.; Starkov, V. G.; Hoang, N. A.; Bertrand, D.; Ramerstorfer, J.; Sieghart, W.; Thompson, A. J.; Lummis, S. C. R.; Tsetlin, V. I. Azemiopsin from *Azemiops feae* viper venom, a novel polypeptide ligand of nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27079–86.
113. Ye, J.-H.; Ren, J.; McArdle, J. J. Waglerin-1 inhibits GABA_A current of neurons in the nucleus accumbens of neonatal rats. *Brain Res.* **1999**, *837*, 29–37.
114. Norton, R. S.; Olivera, B. M. Conotoxins down under. *Toxicon* **2006**, *48*, 780–798.
115. Kasheverov, I. I. E.; Utkin, Y. N.; Tsetlin, V. I. Naturally occurring and synthetic peptides acting on nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 2430–52.
116. Chang, Y.-P.; Banerjee, J.; Dowell, C.; Wu, J.; Gyanda, R.; Houghten, R. A.; Toll, L.; McIntosh, J. M.; Armishaw, C. J. Discovery of a potent and selective $\alpha 3\beta 4$ nicotinic

- acetylcholine receptor antagonist from an α -conotoxin synthetic combinatorial library. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3511–21.
117. Luo, S.; Zhangsun, D.; Schroeder, C. I.; Zhu, X.; Hu, Y.; Wu, Y.; Weltzin, M. M.; Eberhard, S.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; McIntosh, J. M.; Whiteaker, P. A novel α 4/7-conotoxin LvIA from *Conus lividus* that selectively blocks α 3 β 2 vs. α 6/ α 3 β 2 β 3 nicotinic acetylcholine receptors. *FASEB J.* **2014**, *28*, 1842–53.
118. Banerjee, J.; Yongye, A. B.; Chang, Y.-P.; Gyanda, R.; Medina-Franco, J. L.; Armishaw, C. J. Design and synthesis of α -conotoxin GID analogues as selective α 4 β 2 nicotinic acetylcholine receptor antagonists. *Biopolymers* **2014**, *102*, 78–87.
119. Говорун, В. М.; Иванов, В. Т. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях. *Биоорганическая химия* **2011**, *2*, 199–215.
120. Pettit, D. L.; Shao, Z.; Yakel, J. L. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, RC120.
121. Miwa, J. M.; Ibañez-Tallon, I.; Crabtree, G. W.; Sánchez, R.; Šali, A.; Role, L. W.; Heintz, N. lynx1, an Endogenous Toxin-like Modulator of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Mammalian CNS. *Neuron* **1999**, *23*, 105–114.
122. Miwa, J. M.; Stevens, T. R.; King, S. L.; Caldarone, B. J.; Ibanez-Tallon, I.; Xiao, C.; Fitzsimonds, R. M.; Pavlides, C.; Lester, H. A.; Picciotto, M. R.; Heintz, N. The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron* **2006**, *51*, 587–600.
123. Lyukmanova, E. N.; Shenkarev, Z. O.; Shulepko, M. A.; Mineev, K. S.; D’Hoedt, D.; Kasheverov, I. E.; Filkin, S. Y.; Krivolapova, A. P.; Janickova, H.; Dolezal, V.; Dolgikh, D. A.; Arseniev, A. S.; Bertrand, D.; Tsetlin, V. I.; Kirpichnikov, M. P. NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human LYNX1. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 10618–27.
124. Chimienti, F.; Hogg, R. C.; Plantard, L.; Lehmann, C.; Brakch, N.; Fischer, J.; Huber, M.; Bertrand, D.; Hohl, D. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 3017–24.
125. Tsuji, H.; Okamoto, K.; Matsuzaka, Y.; Iizuka, H.; Tamiya, G.; Inoko, H. SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris ☆ ☆ Sequence data from this article have been deposited with the DDBJ/EMBL/GenBank Data Libraries under Accession No. AB081838. *Genomics* **2003**, *81*, 26–33.

126. Choo, Y. M.; Lee, B. H.; Lee, K. S.; Kim, B. Y.; Li, J.; Kim, J. G.; Lee, J. H.; Sohn, H. D.; Nah, S. Y.; Jin, B. R. Pr-lynx1, a modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the insect. *Mol. Cell. Neurosci.* **2008**, *38*, 224–35.
127. Wu, M.; Robinson, J. E.; Joiner, W. J. SLEEPLESS is a bifunctional regulator of excitability and cholinergic synaptic transmission. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, 621–9.
128. Utkin, Y. N. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom--milestones of discovery. *Toxicon* **2013**, *62*, 50–5.
129. Raftery, M. A. Isolation of acetylcholine receptor— α -Bungarotoxin complexes from *Torpedo californica* electroplax. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *154*, 270–276.
130. Oswald, R. E.; Freeman, J. A. Alpha-bungarotoxin binding and central nervous system nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* **1981**, *6*, 1–14.
131. Chiappinelli, V.; Hue, B.; Mony, L.; Sattelle, D. Kappa-bungarotoxin blocks nicotinic transmission at an identified invertebrate central synapse. *J. Exp. Biol.* **1989**, *141*, 61–71.
132. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
133. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43–56.
134. Eastman, P.; Pande, V. OpenMM: A Hardware-Independent Framework for Molecular Simulations. *Comput. Sci. Eng.* **2010**, *12*, 34–39.
135. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
136. McCann, C. M.; Bracamontes, J.; Steinbach, J. H.; Sanes, J. R. The cholinergic antagonist alpha-bungarotoxin also binds and blocks a subset of GABA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 5149–5154.