

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

На правах рукописи



Люкманова Екатерина Назымовна

**СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО МНОГООБРАЗИЯ
ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА И НЕЙРОТОКСИНОВ ЗМЕЙ**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Отделе биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный консультант:

академик РАН, д.б.н. Кирпичников Михаил Петрович, заведующий Отделом биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН)

Официальные оппоненты:

чл.-корр. РАН, д.х.н. Костров Сергей Викторович, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики РАН

чл.-корр. РАН, д.х.н. Кочетков Сергей Николаевич, профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

проф. РАН, д.б.н. Шидловский Юлий Валерьевич, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Защита состоится «20» ноября 2019 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук

Олейников В. А.



ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Понимание механизмов функционирования мембранных белков является одной из ключевых проблем науки о живом. Эти белки вовлечены в работу нервной, иммунной и эндокринной систем организма, в том числе в качестве рецепторов и ионных каналов, передающих сигналы через клеточную мембрану. Дисфункции мембранных белков ответственны за развитие большинства неинфекционных заболеваний, и именно мембранные белки служат мишенями для около 50 % современных лекарственных препаратов. Одними из самых широко распространенных типов мембранных белков, участвующих в проведении межклеточных сигналов, являются лигандозависимые ионные каналы, встречающиеся во многих клетках животных и растений. Одним из представителей лигандозависимых каналов является никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), играющий важную роль в межклеточной сигнализации. Этот рецептор состоит из пяти гомологичных субъединиц, гидрофобные части которых образуют ионопроводящую трансмембранную пору, а внеклеточные N-концевые домены ответственны за взаимодействие с лигандами. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор может активироваться не только ацетилхолином, но и никотином, что является определяющим в возникновении никотиновой зависимости при табакокурении. Многообразие рецепторов nAChR обусловлено наличием большого числа гомологичных субъединиц, образующих в различных комбинациях разные подтипы рецептора. В последнее время появились данные о локализации nAChR не только в центральной нервной системе, но и в клетках эпителия и других тканей. Эти рецепторы вовлечены в функционирование иммунной и эндокринной систем организма. С дисфункциями nAChR разных подтипов связаны возникновение и развитие множества заболеваний нервной и мышечной систем, таких как болезнь Альцгеймера, паркинсонизм, мышечная дистрофия, эпилепсия, депрессия, никотиновая и алкогольная зависимости, а также, видимо, развитие ряда онкологических заболеваний и болезней иммунной и эндокринной систем.

В качестве одного из путей в лечении заболеваний, связанных с дисфункцией отдельных типов рецепторов, может быть предложено создание искусственных модуляторов направленного действия. В случае nAChR человека прообразом для создания подобных лекарственных средств могут выступать природные трехпетельные белки (ТПБ) семейства Lu-6/uPAR, модулирующие работу рецепторов этого семейства. Однако, для рационального дизайна новых лекарственных препаратов необходимы дополнительные знания о функции ТПБ в мозге и других тканях человека, детальное понимание механизмов взаимодействия лиганд-рецептор на молекулярном уровне и установление взаимосвязи между структурой и функцией этих молекул. Таким образом, задача исследования структуры, функции и механизмов действия ТПБ обладает высокой степенью актуальности, а также научной и практической значимостью.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью работы является изучение структурных основ функционального многообразия трехпетельных белков человека и трехпетельных нейротоксинов змей, а также молекулярных механизмов их действия. Для достижения заявленной цели были поставлены и решены следующие экспериментальные задачи:

1. Разработка эффективных систем рекомбинантной продукции трехпетельных белков человека и трехпетельных нейротоксинов змей;
2. Исследование фармакологических свойств и пространственной структуры ряда трехпетельных белков, определение структурных детерминант, важных для их активности;
3. Определение молекулярных механизмов действия и роли трехпетельных белков человека в функционировании мозга и эпителия.

В качестве объектов исследования использовали трехпетельные токсины яда змей: нейротоксин II (NTII), нейротоксин I (NTI), цитотоксин I (CTX1) из яда кобры *Naja oxiana*, а также токсин WTX из яда кобры *Naja kaouthia* и нейромодуляторы из мозга человека Lynx1 и Lypd6, а также секретируемые белки эпителия человека SLURP-1 и SLURP-2.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе выполнения диссертационной работы впервые разработаны системы бактериальной продукции трехпетельных белков NTII, CTX1, WTX, Lynx1, Lypd6, SLURP-1 и SLURP-2, а также их мутантных и изотопно-меченых вариантов. В работе впервые изучены пространственные структуры WTX, Lynx1, Lypd6, SLURP-1 и SLURP-2, исследована внутримолекулярная динамика ТПБ и раскрыта ее роль во взаимодействии с рецепторами-мишенями. Предложен механизм, согласно которому мембранное окружение nAChR играет важную роль в ориентации трехпетельных нейротоксинов яда змей для последующего взаимодействия с рецептором. Полученные в работе данные дают новую информацию о фармакологических свойствах ТПБ человека. Выявлены новые мишени действия белков Lynx1, Lypd6 и SLURP-2, и показана избирательная активность SLURP-1 по отношению к nAChR $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR). Методами сайт-направленного мутагенеза выявлены структурные детерминанты, важные для взаимодействия NTII, NTI, WTX и Lynx1 с их мишенями. Методами компьютерного моделирования предсказаны участки, важные для взаимодействия Lypd6 и SLURP-2 с nAChR. Впервые показано, что Lynx1 конкурирует с β -амилоидным пептидом A β (1-42) за взаимодействие с nAChR и может купировать токсичное действие амилоидного пептида. Показано, что водорастворимый домен Lynx1 (ws-Lynx1) потенцирует $\alpha 7$ -nAChR и стимулирует синаптическую пластичность *ex vivo*, а также способен компенсировать нарушения работы холинергической системы *in vivo*. На модели болезни Альцгеймера показана перспективность препарата Lynx1 для компенсации нарушений когнитивной функции. Напротив, Lypd6 ингибирует $\alpha 7$ -nAChR и синаптическую пластичность *ex vivo*. Возможно, Lynx1 и Lypd6 принимают участие в тонкой настройке работы холинергической системы мозга. Впервые показано, что белки ws-Lynx1, SLURP-1 и SLURP-2 подавляют рост клеток

карцином. В ходе выполнения диссертации получена детальная информация о механизмах, лежащих в основе антипролиферативного действия эндогенных трехпетельных белков.

Разработанные технологии получения ТПБ, а также препараты пептидов, избирательно действующих на определенные подтипы ацетилхолиновых рецепторов, обладают широкими перспективами дальнейшего практического использования. Разработанные в работе методы продукции и ренатурации рекомбинантных ТПБ *in vitro* могут применяться для их высокоэффективной продукции в различных сферах фармакологии и биотехнологии. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы для разработки технологической платформы для последующего рационального дизайна и производства нового класса инновационных лекарственных препаратов, направленных на улучшение качества жизни людей, страдающих нейродегенеративными, кожными и онкологическими заболеваниями.

Публикация и апробация работы

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 30 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций, из них – 4 обзора, имеется 3 патента. Результаты работы докладывались на престижных российских и международных научных конференциях, включая приглашенные и пленарные доклады на Международной конференции Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017 (Хания, Греция, 2017), 15м Международном симпозиуме по холинергическим механизмам ISCM (Марсель, Франция, 2016) и других съездах.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 288 страницах и содержит 117 рисунков, 11 таблиц и 394 источника литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

I. РЕКОМБИНАНТНАЯ ПРОДУКЦИЯ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Получение белков из природных источников в количествах, необходимых для структурно-функциональных исследований, – трудная задача. Это определяет необходимость разработки эффективных систем рекомбинантной продукции, позволяющих получать целевые белки в миллиграммовых количествах, а также их меченые и мутантные варианты. Трехпетельные белки (ТПБ) семейства L γ 6/uPAR, объекты настоящей диссертационной работы, представляют собой небольшие β -структурные молекулы, состоящие из 60-90 аминокислотных остатков. ТПБ стабилизированы четырьмя консервативными дисульфидными связями, что придает им устойчивость в условиях сильных кислот и высоких температур. Наиболее экономичным способом получения белков является бактериальная продукция, но так как в цитоплазме бактерий не образуются дисульфидные связи, молекулы ТПБ подвергаются

протеолитической деградации или формируют тельца включения. В связи с этим, бактериальная продукция Lуб/uPAR белков представляет собой сложную задачу и требует применения нестандартных подходов.

Для достижения поставленных в работе задач были опробованы различные подходы к продукции рекомбинантных аналогов трехпетельных токсинов змей и Lуб/uPAR белков человека: экспрессия в виде слитных конструкций с тиоредоксином, секреция в периплазматическое пространство и «прямая» экспрессия в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией. В последнем случае полученные белки имели дополнительный N-концевой остаток Met, возникающий из-за трансляции стартового кодона *atg*.

Наибольший выход функционального нейротоксина II кобры *Naja oxiana*, содержащего четыре дисульфидные связи в «ядре» молекулы, обеспечила секреторная конструкция. Для ТПБ, содержащих дополнительную дисульфидную связь в первой петле (белки человека Lynx1, Lypd6, SLURP-1, SLURP-2 и токсин WTX кобры *Naja kaouthia*), а также для цитотоксина I кобры *Naja oxiana*, наиболее эффективной оказалась система продукции в виде телец включения. Анализ эффективности процесса ренатурации полученных ТПБ в индивидуально подобранных оптимальных условиях показал, что выход ренатурированного белка зависит от особенностей его структуры (например, от наличия остатков Pro в петле III) и возрастает с увеличением площади поверхности гидрофобных остатков, недоступных растворителю в свернутом белке.

II. СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ, ВАЖНЫЕ ДЛЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ С МИШЕНЯМИ

Исследование роли центральной петли нейротоксинов

Центральная петля (II) длинных нейротоксинов змей содержит псевдоспиральную структуру, стабилизированную дополнительной (пятой) дисульфидной связью (Рис. 1). Ранее предполагали, что этот структурный элемент важен для взаимодействия α - и κ -нейротоксинов с нейрональными nAChR $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ типов, соответственно (Bourne et al., 2005). Для проверки этой гипотезы на основе короткого α -нейротоксина NTII, селективно ингибирующего мышечные nAChR ($IC_{50} \sim 6$ нМ, на $\alpha 7$ -nAChR $IC_{50} > 1$ мкМ), было сконструировано два химерных длинных α -нейротоксина. Первая химера NTII/I была получена путем замены фрагмента центральной петли NTII на аналогичный фрагмент длинного α -нейротоксина NTI (*N. oxiana*). Вторую химеру NTII/I[A29K] получили для проверки гипотезы о том, что остаток Lys29 является основным фактором, отвечающим за специфичность κ -нейротоксинов к $\alpha 3\beta 2$ -nAChR (Рис. 2).

Электрофизиологическое исследование химерных токсинов на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, показало, что химера NTII/I приобрела способность ингибировать $\alpha 7$ -nAChR ($IC_{50} \sim 6$ нМ) даже с большей активностью, чем молекула-донор NTI ($IC_{50} \sim 34$ нМ)¹. Это подтвердило ключевую роль петли II длинных α -нейротоксинов

¹Активность ТПБ на ооцитах методами электрофизиологии исследована совместно с Отделом молекулярной нейромимунной сигнализации ИБХ РАН (руководитель чл.-корр. РАН В.И. Цетлин) и проф. Д. Бертраном, Женева.

во взаимодействии с нейрональным $\alpha 7$ -nAChR. Еще одним отличием длинных и коротких α -нейротоксинов является наличие у первых удлиненной C-концевой последовательности. Полученные результаты показали, что этот структурный элемент не требуется для эффективного взаимодействия (по крайней мере, в случае NTI) с $\alpha 7$ -nAChR. Введение остатка Lys в молекулу NTII/I не привело к возникновению активности по отношению к $\alpha 3\beta 2$ -nAChR и значительно снизило активность химеры по отношению к $\alpha 7$ -nAChR ($IC_{50} \sim 126$ нМ). Таким образом, за эффективное взаимодействие к-нейротоксинов с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR отвечают другие структурные детерминанты, локализованные не на конце петли II.

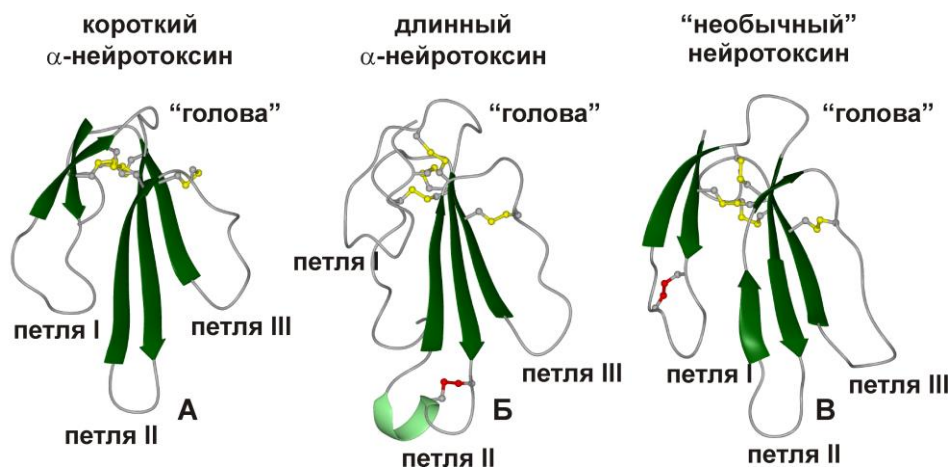


Рис. 1. Пространственные структуры трехпетельных нейротоксинов. (А). Короткий нейротоксин II из *Naja oxiana*. (Б). Длинный α -кобратоксин из *Naja siamensis*. (В). “Необычный” токсин кандоксин из *Bungarus candidus*. Желтым цветом показаны консервативные S-S связи, красным – дополнительные дисульфидные связи длинных и “необычных” нейротоксинов.

Ранее было показано, что α -бунгаротоксин (α -Bgtx), селективный ингибитор $\alpha 7$ -nAChR, является также антагонистом $\alpha x\beta 2\gamma 2$ GABA_A-рецептора (Hannan et al., 2015). Для проверки предположения о том, что концевой участок петли II длинных нейротоксинов, как и в случае с $\alpha 7$ -nAChR, важен для взаимодействия с GABA_A-рецепторами, активность токсинов NTII, NTI и химеры NTII/I тестировали на $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ рецепторе. Как оказалось, NTII не ингибирует рецептор вплоть до концентрации 10 мкМ, а NTI и химера NTII/I при этой же концентрации демонстрируют достоверное ингибирование тока, индуцированного GABA (на 19 ± 3 % и 16 ± 3 %, соответственно).



Рис. 2. Сравнение структуры участков центральных петель нейротоксина II, нейротоксина I и α -бунгаротоксина.

Взаимодействие рекомбинантного аналога «слабого» токсина WTX с mAChR

«Необычные» токсины (Рис. 1) одновременно действуют на мышечные и нейрональные $\alpha 7$ -nAChR (Nirthanan et al, 2003). Кроме того, для «слабого» токсина (WTX, *N. kaouthia*), описано взаимодействие с мускариновыми рецепторами ацетилхолина (mAChR) (Mordvintsev et al, 2009). Механизм взаимодействия WTX с рецепторами ранее не изучался, но было отмечено, что остаток Trp36 в центральной петле уникален для WTX и не встречается в других «необычных» токсинах.

Трехпетельные мускариновые токсины из яда мамб (MT, четыре дисульфидные связи) являются аллостерическими лигандами различных подтипов mAChR. Последовательность WTX на ~59 % идентична токсину MT7 из *Dendroaspis angusticeps*, для которого показана ключевая роль остатка Arg34 центральной петли для взаимодействия с mAChR M1 типа человека (Marquer et al, 2011). Для проверки предположения о том, что концевой участок петли II WTX важен для взаимодействия с mAChR, были получены рекомбинантный аналог rWTX и его мутанты: R31A, R32A, R31A/R32A, W36A и R37A. Для изучения влияния возможной *цис-транс* изомерии пептидных связей Xxx-Pro в петлях I и II WTX были получены мутанты P7A и P33A.

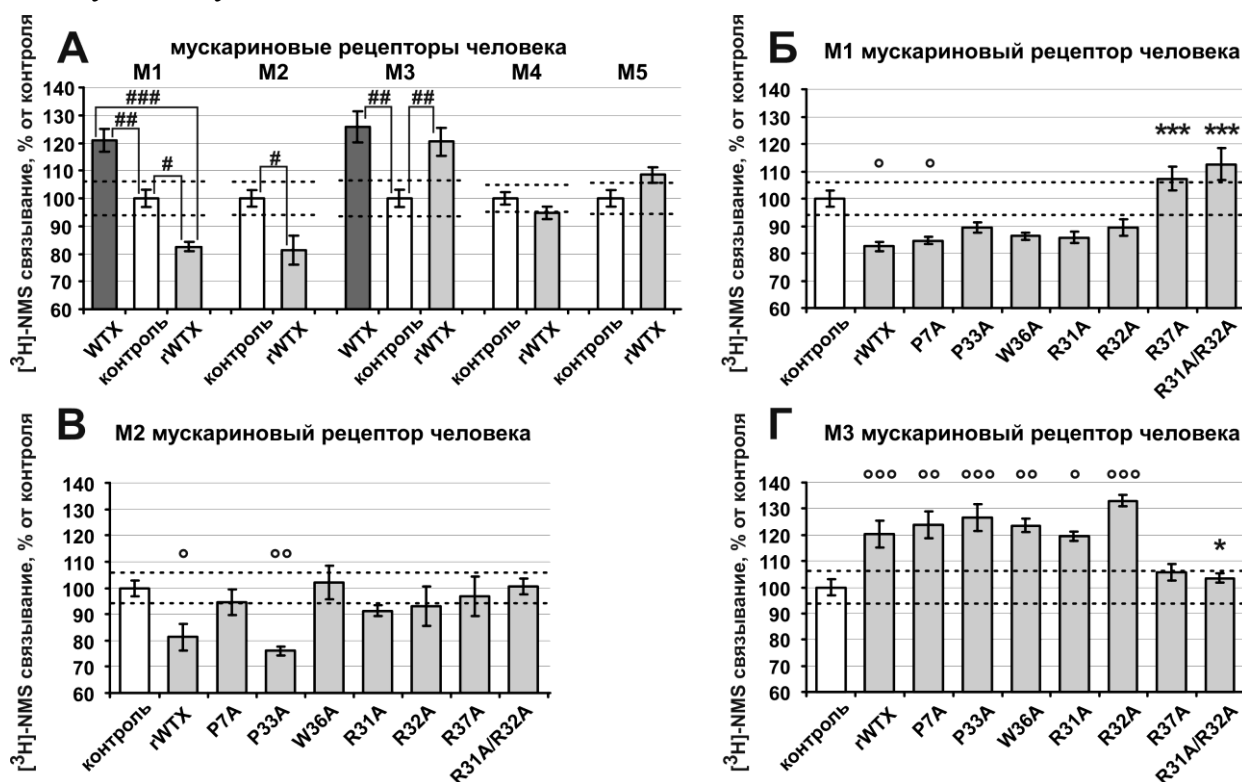


Рис. 3. Влияние WTX и rWTX (А) и мутантов rWTX (Б-Г) в концентрации 10 мкМ на связывание [³H]-NMS с различными типами mAChR, экспрессированных в CHO клетках (n=9-12). 95 % Доверительный интервал контроля (100 % связывание [³H]-NMS в отсутствие токсина) показан пунктиром. Символы * и ° показывают достоверные отличия групп от rWTX и контроля. Здесь и далее данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка. *, **, *** (или другие символы) соответствуют p < 0.05, 0.01, 0.001. Парные сравнения проводили с помощью тестов Стьюдента или Манна-Уитни. Для множественных сравнений использовали ANOVA с *post hoc* тестом Тьюки или Даннета.

Взаимодействие rWTX и его мутантов с различными типами mAChR исследовали в эксперименте по псевдоконкуренции с ортостерическим антагонистом ³H-N-метилскополамином (³H-NMS, Рис. 3)¹. В этой системе природный WTX увеличивал связывание ³H-NMS с M1 и M3 mAChR и не влиял на взаимодействие с M2, M4 и M5 рецепторами (Mordvintsev et al., 2009). Оказалось, что дополнительный N-концевой Met существенно влияет на фармакологический профиль WTX. Подобно природному токсину, rWTX усиливал связывание ³H-NMS с M3 рецептором, но на M1 и M2 mAChR наблюдалось ослабление связывания на 20 % (Рис. 3А). Снижение скорости диссоциации ³H-NMS, наблюдаемое на M1, M2 и M3 рецепторах в присутствии rWTX, подтвердило аллостерический тип взаимодействия. Среди мутантов rWTX только два (R37A и R31A/R32A) полно-

¹Взаимодействие ТПБ с mAChR исследовано совместно с проф. В. Долежалем, Институт физиологии, Прага

стью потеряли активность на М1 и М3 mAChR (Рис. 3БГ). В случае М2-mAChR, все мутации, кроме Р33А, ослабляли эффект токсина (Рис. 3В). Таким образом, петля II и положительно заряженные остатки, располагающиеся на ней, критически важны для взаимодействия WTX с mAChR.

Пространственная структура и конформационная гетерогенность WTX

Так же, как и для природного WTX (Елецкий и др, 2001), в ЯМР-спектрах rWTX наблюдали два набора сигналов, соответствующих двум структурным формам белка (заселенность состояний 1:1, время обменных переходов >100 мс)¹. Наибольшие различия в химических сдвигах между двумя состояниями наблюдались для остатков, расположенных вблизи Pro7 и Pro33, однако анализ ЯМР-спектров мутантов rWTX показал, что конформационная гетерогенность связана именно с *цис-транс* изомерией пептидной связи Arg32-Pro33. Для дальнейших структурных исследований был выбран мутант rWTX[P33A], имеющий только одну структурную форму в растворе.

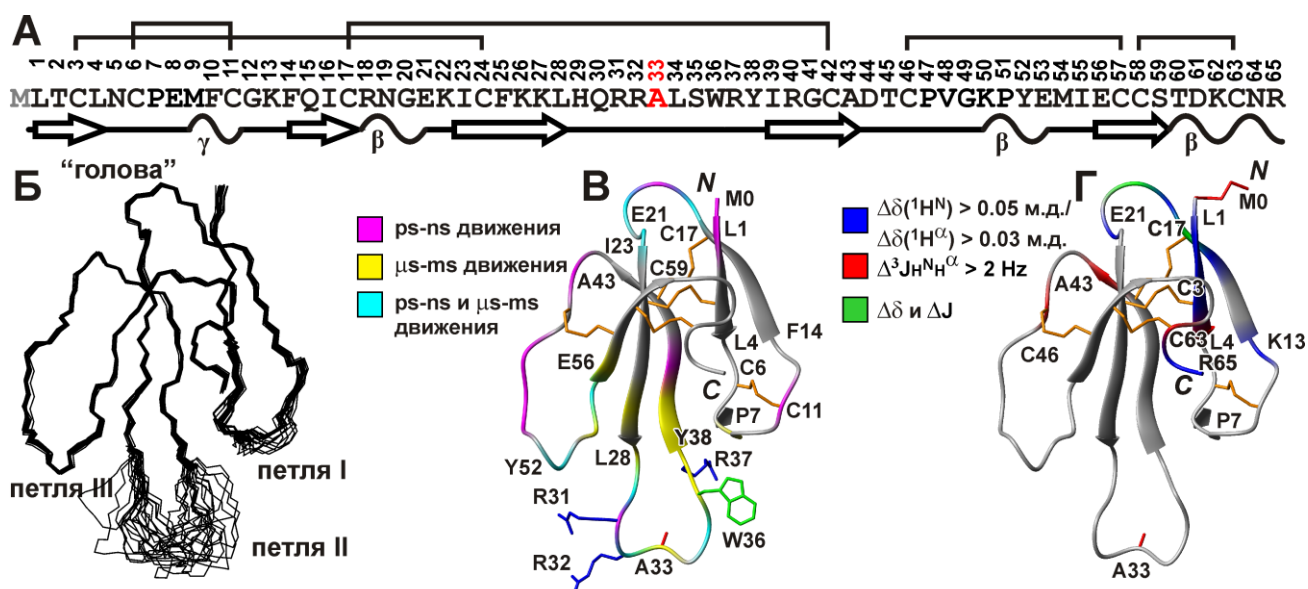


Рис. 4. (А). Вторичная структура rWTX[P33A], β -тяжи обозначены стрелками, β - и γ -повороты – волнистыми линиями. (Б). 20 лучших структур rWTX[P33A]. (В). Данные о динамике, полученные из скоростей релаксации ядер ^{15}N . (Г). Регионы конформационных изменений в WTX, возникающих при введении N-концевого Met, по изменению в химических сдвигах ядер ^{15}N и $^{15}\text{N}^\alpha$ и КССВ $^3\text{J}_{\text{NH}^\alpha}$.

Согласно данным ^1H , ^{15}N -ЯМР-спектроскопии, структура rWTX[P33A] включает два β -листа (Рис. 4). Первый лист содержит два β -тяжа и образован остатками петли I (Leu1-Leu4 и Phe14-Cys17). Второй лист состоит из трех тяжей и включает фрагменты петли II (Phe23-Leu28, Tyr38-Ala43) и петли III (Glu56-Cys58). Центральный участок петли II слабо упорядочен в растворе и согласно данным о релаксации ядер ^{15}N участвует в движениях на двух диапазонах времен (пс-нс и мкс-мс). Высокоамплитудная подвижность в этих диапазонах также наблюдалась в пространственно сближенных фрагментах петель I и III (Рис. 4Г). Сравнение химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия WTX и rWTX показало, что дополнительный N-концевой Met вызывает небольшие изменения конформации C-концевой последовательности и участков из «головы» токсина, простран-

¹Исследование пространственной структуры ТПБ и построение моделей комплексов с mAChR выполнено совместно с сотрудниками Отдела структурной биологии ИБХ РАН (руководитель проф. А.С. Арсеньев).

ственно сближенных с тяжом $\beta 1$ (Рис. 4Г).

Компьютерное моделирование комплексов rWTX[P33A] с M1 и M3 mAChR

Для понимания механизмов аллостерического действия rWTX на M1 и M3 mAChR, моделировали структуры комплексов rWTX[P33A]/рецептор. Для учета конформационной подвижности взаимодействующих молекул были выполнены расчеты молекулярной динамики (МД): для токсина в воде (100 нс) и рецепторов в гидратированной липидной мембране (POPC/POPE/Chol 2:1:1, 50 нс). Кластеризация МД траекторий позволила выделить по пять-шесть различающихся структур рецепторов и токсина, которые были использованы для белок-белкового докинга. Полученные ансамбли комплексов «фильтровали» с учетом данных мутагенеза.

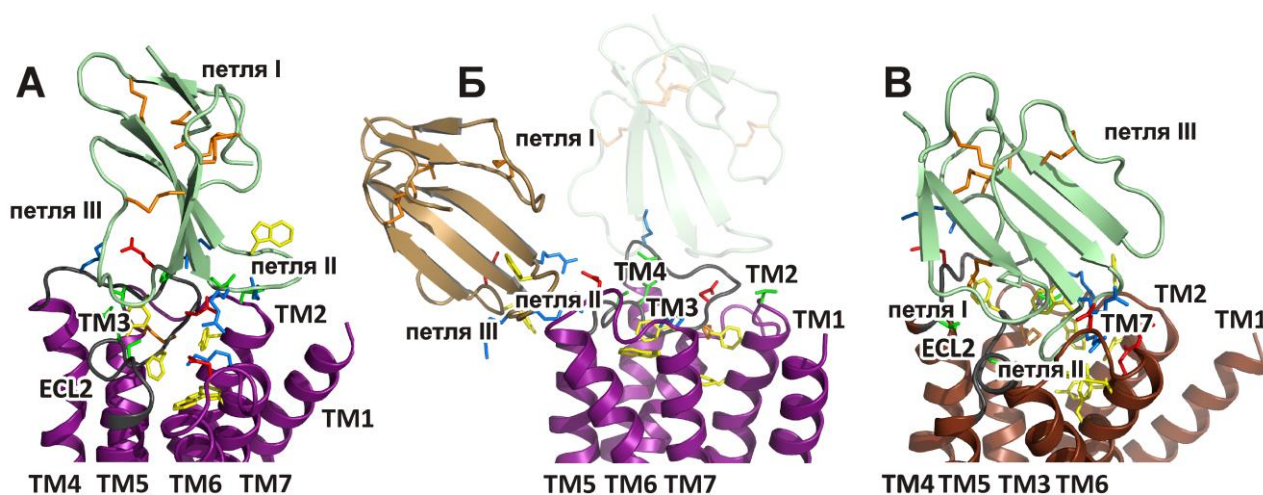


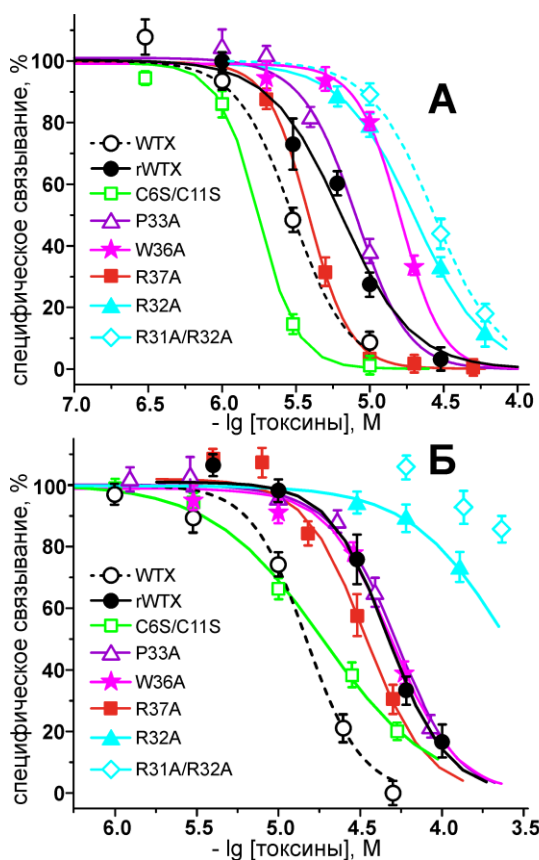
Рис. 5. Модели комплексов rWTX[P33A] с M3 (А, Б) и M1 (В) mAChR. На модели Б токсин показан пшеничным цветом, а положение токсина из модели А показано тенью.

Два решения комплекса rWTX[P33A]/M3 показаны на Рис. 5АБ. В модели А токсин неглубоко проникает в аллостерический лиганд-связывающий сайт рецептора, не достигая входа в ортостерический сайт. Комплекс стабилизирован ионными взаимодействиями между остатками петли II (Arg37 и Arg31/Arg32) и анионными группами внеклеточных петель ECL2 и ECL3 рецептора. МД расчеты в липидном бислое (200 нс) показали низкую стабильность этого комплекса. В модели Б заряженные остатки петли II также взаимодействуют с ECL2 и ECL3, однако токсин подходит к рецептору со стороны окружающей его мембраны. Напротив, в комплексе с M1-mAChR (Рис. 5В) петля II токсина глубоко проникает в аллостерический сайт, закрывая вход в ортостерический сайт. При этом Arg32 и Arg37 взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками ECL3 и внешней части спирали TM7 рецептора. Кроме того, C-концевой участок и петля I токсина взаимодействуют с ECL2. МД расчеты в липидном бислое (200 нс) выявили значительное уменьшение подвижности ECL2 и петель I, II токсина при образовании комплекса. Вероятно, ингибирование связывания NMS с M1-mAChR является следствием прямой блокировки входа в ортостерический сайт молекулой rWTX. Напротив, усиление связывания с M3 рецептором, может объясняться тем, что токсин фиксирует петли рецептора в конформации, облегчающей доступ лиганда в ортостерический сайт. Схожая активность WTX и rWTX на M3 mAChR (Рис. 3А) свидетельствует о том, что природный и рекомбинантный токсины одинаково взаимодействуют с этим рецептором. Однако, тип взаимодействия WTX с рецепто-

ром M1 по-видимому отличается от предложенной модели rWTX[P33A]/M1. Вероятно, изменение конформации петли I и C-концевой последовательности, вызванные введением N-концевого Met, приводит к перестройке комплекса токсин-рецептор и стабилизирует молекулу rWTX в вестибюле лиганд-связывающего сайта.

Взаимодействие WTX с nAChR

Пластичность петли II WTX (Рис. 4) делает теоретически возможным участие этого региона молекулы токсина во взаимодействии со структурно-различными рецепторами. Мы предположили, что эта петля также играет важную роль во взаимодействии WTX с nAChR. Для проверки этой гипотезы, активность десяти мутантных вариантов rWTX изучали в экспериментах по конкуренции с ^{125}I -меченым α -Bgtx¹ за связывание с мышечным nAChR и нейрональным рецептором $\alpha 7$ типа (Рис. 6).



токсин	IC ₅₀ μM	
	<i>T. californica</i>	$\alpha 7$ nAChR
WTX	3.0 \pm 0.5	14.8 \pm 1.3
rWTX	6.4 \pm 0.8	47.0 \pm 2.0
C6S/C11S	1.8 \pm 0.1	18.0 \pm 1.0
P7A	7.3 \pm 0.6	48.0 \pm 1.0
P33A	7.9 \pm 0.3	53.0 \pm 2.0
R31A	21.0 \pm 0.1	190.0 \pm 10.0
R32A	20.0 \pm 0.3	250.0 \pm 15.0
R31A/R32A	27.0 \pm 0.3	>> 220
R31E/R32A	22.0 \pm 0.2	>> 220
R31A/R32E	27.0 \pm 0.6	>> 220
W36A	16.0 \pm 1.0	49.0 \pm 2.0
R37A	3.9 \pm 0.2	34.0 \pm 2.0

Рис. 6. Конкуренция природного (WTX) и рекомбинантного (rWTX) токсинов и его мутантов с ^{125}I - α -Bgtx за связывание с мышечным nAChR из *T. californica* (А) и с $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированными в клетках линии GH₄C₁ (Б), n=3. Нормализованные данные аппроксимированы уравнением Хилла. (В). Значения IC₅₀, отличающиеся в 2 и более раз от значений для rWTX, показаны жирным шрифтом.

rWTX демонстрировал 2-3х-кратное уменьшение сродства к мышечному и $\alpha 7$ -nAChR по сравнению с WTX, а разрушение дисульфидной связи Cys6-Cys11 в петле I (мутант C6S/C11S) приводило к восстановлению активности rWTX до уровня природного токсина. Вероятно, участки молекулы токсина, на структуру которых влияет N-концевой Met («голова», петля I или C-концевая последовательность), участвуют в формировании комплекса WTX/nAChR, а разрушение связи Cys6-Cys11 компенсирует эти изменения конформации токсина. Замена положительно заряженных остатков, локализованных на конце петли II (R31A и R32A), уменьшала сродство токсина к обоим типам рецептора (Рис. 6). Одновременная нейтрализация двух положительных зарядов или введение отрицательного заряда в эту область (R31A/R32A, R31E/R32A и R31A/R32E) еще больше снижала активность

¹ Исследование активности ТПБ в тестах на конкуренцию с α -Bgtx выполнено совместно с д.х.н. И.Е. Кашеверовым (Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН, руководитель чл.-корр. РАН В.И. Цетлин).

rWTX, при этом эффект был более выражен на $\alpha 7$ -nAChR. Таким образом, заряженные остатки Arg31 и Arg32 петли II являются ключевым элементом, необходимым для взаимодействия WTX не только с mAChR, но и с nAChR. В отличие от ситуации с mAChR, замена остатка Arg37 в петле II не влияла на активность rWTX по отношению к nAChR, в то время как замена W36A снижала сродство токсина к nAChR мышечного типа и не влияла на связывание с $\alpha 7$ -nAChR. Как и в случае с mAChR, замена остатка Pro33 не приводила к изменению активности rWTX на nAChR. Таким образом, конформационная гетерогенность WTX в растворе не влияет на его фармакологические свойства.

Компьютерное моделирование комплексов rWTX[P33A] с nAChR

Конкуренция WTX и α -Bgtx за связывание с nAChR (Рис. 6) указывает на перекрытие сайта связывания WTX с ортостерическим лиганд-связывающим сайтом рецептора, расположенным на границе двух субъединиц и включающим в себя С-петлю основной субъединицы. Для моделирования комплекса rWTX[P33A] с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR (Li X, et al., 2011) использовали подход, описанный выше. Кластеризация МД траекторий рецептора (2×200 нс) дала 11 и 9 различных структур лиганд-связывающего участка, отличающихся положением С-петли (сайт связывания «открыт»/«закрит»). По аналогии с известной структурой комплекса домена $\alpha 7$ -nAChR с α -Bgtx (Huang et al., 2013) для докинга использовали структуры с «открытым» сайтом. В результате, были выбраны две модели, в которых rWTX[P33A] связывается с $\alpha 7$ -nAChR петлями I и II, и при этом петля II взаимодействует с внутренней стороной С-петли (Рис. 7А,Б). Участие петли I в образовании комплекса объясняет понижение активности rWTX по сравнению с WTX.

В модели А токсин взаимодействует с ортостерическим сайтом со стороны водной фазы, а в модели Б подходит со стороны липидного бислоя, окружающего рецептор, и заряженные остатки «головы» токсина (Arg18, Glu21, Lys22, Asp44) контактируют с полярными головками липидов. Способность WTX взаимодействовать с модельными мембранами (липидные везикулы, липид-белковые нанодиски) была подтверждена методами ЯМР-спектроскопии. Несмотря на невысокую аффинность, взаимодействие токсин/мембрана может играть определенную роль при образовании комплексов трехпетельных токсинов змей с nAChR (см. ниже).

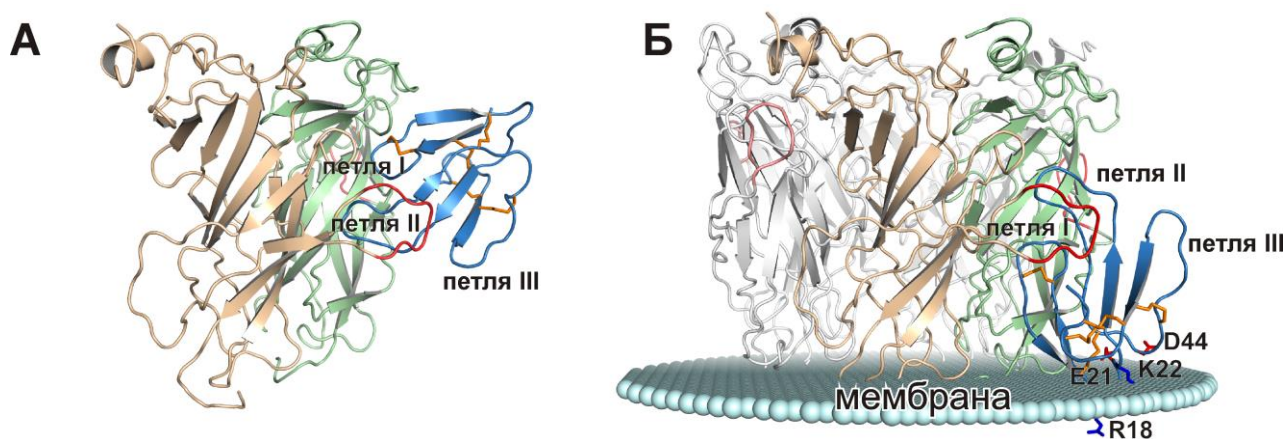


Рис. 7. Модели комплексов rWTX[P33A] с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR. Основная и комплементарная субъединицы показаны пшеничным и светло-зеленым, С-петля –красным цветом. На модели Б примерная граница липидного бислоя показана светло-голубыми сферами.

Мембранотропный сайт нейротоксина II из яда *Naja oxiana*

Для мембранных рецепторов, включая nAChR, показано, что мембранное окружение может влиять на локальную концентрацию, диффузию, конформацию и ориентацию лигандов. Предварительное взаимодействие лиганда с мембраной может значительно облегчить поиск рецептора-мишени и взаимодействие с ним за счет более эффективной двумерной диффузии и «предориентации» лиганда. В работе исследовали взаимодействие α -нейротоксина NTII с липидными везикулами состава DOPC/DOPS/Chol = 3:1:1, имитирующими мембранное окружение мышечного nAChR.

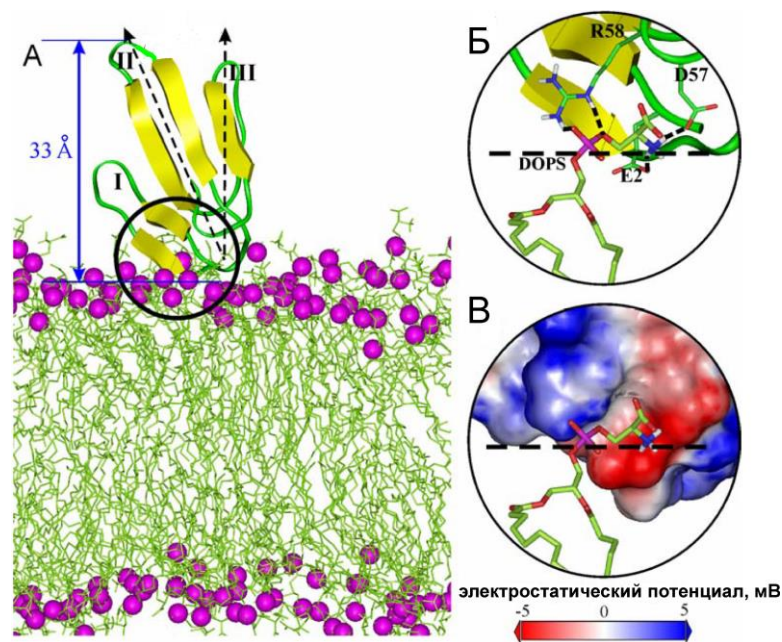


Рис. 8. (А). Топология NTII на поверхности мембраны DOPS. Фосфатные группы липидов показаны пурпурными сферами. (Б,В). “Захват” полярной головки DOPS боковыми цепями остатков Glu2, Asp57 и Arg58 NTII. Водородные связи показаны пунктиром.

Были получены три мутантных варианта NTII: E2Q/D57N, D57N/R58A и E2Q/D57N/R58A, однако только E2Q/D57N сохранил природную пространственную структуру. Этот вариант NTII не взаимодействовал с мембраной, что позволило подтвердить мембранотропный сайт в молекуле токсина. Полученные результаты показывают, что NTII способен взаимодействовать с поверхностью липидного бислоя, окружающего nAChR, в ориентации, не препятствующей ингибированию рецептора. Возможно, нейротоксин сначала связывается с мембраной, что значительно ускоряет поиск мишени, а затем из мембраносвязанного положения происходит образование комплекса токсин-рецептор с участием центральной петли NTII.

III. ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ LYNX1 И LYPD6

Экспрессия Lynx1 в мозге крыс

В мозге млекопитающих обнаружен ряд белков семейства Lуб/uPAR, способных модулировать функцию nAChR. Одним из объектов диссертационной работы является ТПБ человека Lynx1, который прикреплен к мембране с помощью GPI-якоря и

Изменения, наблюдаемые в ^1H - ^{15}N спектрах, показали, что остатки «головы» токсина (Glu2, Cys3, Gln6, Cys17, Asn22, Gly41 и Arg58) принимают участие во взаимодействии с мембраной. Значительное пространственное разделение мембранотропного сайта и сайта связывания с рецептором (петля II) подразумевает их независимость. Моделирование взаимодействия NTII с липидным бислоем, состоящим из DOPS, показало, что токсин образует устойчивые контакты с одной молекулой липида, полярная головка которого взаимодействует с заряженными боковыми цепями остатков Glu2, Asp57 и Arg58 (Рис. 8).

солокализован в мозге с некоторыми типами nAChR (Ibañez-Tallon et al., 2002). Структурно-функциональные исследования GPI-заякоренного Lynx1 практически невозможны. Поэтому в качестве модели в работе использовали рекомбинантный растворимый аналог Lynx1, не содержащий GPI-якорь (ws-Lynx1).

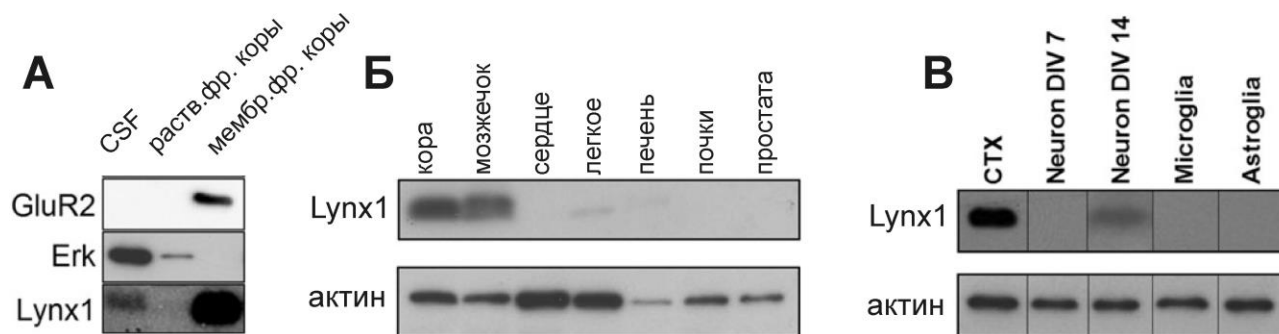


Рис. 9. (А, Б). Анализ экспрессии Lynx1 в коре головного мозга, спинномозговой жидкости (CSF) и других органах взрослого самца крысы. (В). Экспрессия Lynx1 в коре взрослого самца крысы (CTX), в первичной культуре нейронов коры, культивированных 7 и 14 дней (Neuron DIV 7 и 14), и в первичной культуре микроглии и астроглии, культивированных 15 и 18 дней, соответственно.

В работе показано, что Lynx1 экспрессируется в больших количествах в коре головного мозга и в мозжечке, а также в небольших количествах в легочной ткани (Рис. 9Б)¹. Белок Lynx1 не обнаруживался в первичной культуре микроглии и астроглии, а в культуре нейронов обнаруживался только на 14 день (Рис. 9В). Некоторые Lu6/uPAR белки существуют в организме как в мембраносвязанной, так и в растворимой форме (Fletcher et al., 1994). Аналогично этому, в спинномозговой жидкости был обнаружен водорастворимый Lynx1 (Рис. 9А). Используя ws-Lynx1 в качестве белка сравнения, была оценена концентрация Lynx1 в коре и спинномозговой жидкости (~1 и ~0.5 мкМ), что указывает на экспрессию Lynx1 в головном и спинном мозге в концентрациях, достаточных для модуляции nAChR (см. ниже). Ранее абсолютные количества Lu6/uPAR белков в мозге не определяли.

Анализ уровня экспрессии Lynx1 в ходе онтогенеза показал, что в лобной коре и гиппокампе крысы при рождении Lynx1 не экспрессируется, однако с 7 по 14 день происходит значительное увеличение экспрессии, достигая в коре уровня, соответствующего взрослому животному, а в гиппокампе превышающего таковой. Напротив, уровень экспрессии nAChR ($\beta 2$ субъединица) увеличивается лишь в коре, а в гиппокампе с самого рождения примерно соответствует уровню экспрессии взрослого животного. Разные профили экспрессии Lynx1 и nAChR указывают на отличия в возможной взаимной регуляции этих белков в разных областях мозга.

Пространственная структура водорастворимого домена белка Lynx1

Согласно данным ¹H,¹⁵N-ЯМР-спектроскопии ws-Lynx1 имеет трехпетельную структуру, схожую со структурой токсинов змей и других Lu6/uPAR белков, и включает в себя два антипараллельных β -листа (Рис. 10Б). Первый из них образован двумя β -тяжами: Asp3-His5 и Pro17-Arg19 (петля I), а второй состоит из четырех тяжей: Cys7-Tyr9 (петля I), Tyr26-Thr35, Arg38-Val46 (петля II) и Ser62-Cys67 (петля III). Система дисульфидных связей в молекуле соответствует таковой у нейротоксинов за исключением

¹Совместно с проф. М. Томсеном, Университет Копенгагена

дополнительной связи (Cys7-Cys14) в петле I, которая характерна только для «необычных» токсинов и *Ly6/uPAR* белков млекопитающих. Уникальной особенностью *ws-Lynx1* является длинная и неупорядоченная петля III, подвижная в пс-нс диапазоне. В других *Ly6/uPAR* белках человека петля III может быть хорошо структурирована, например, в *CD59* она имеет α -спиральную конформацию (Fletcher et al., 1994).

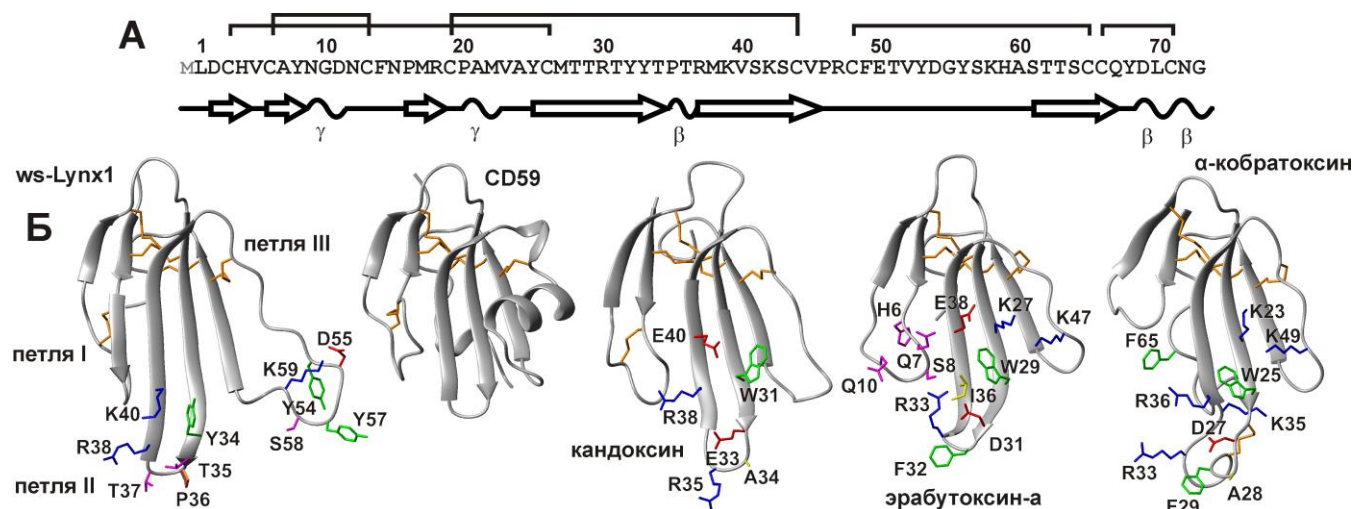


Рис. 10. (А). Вторичная структура *ws-Lynx1*. (Б). Сравнение пространственных структур *ws-Lynx1* и других ТПБ. Показаны остатки α -кобратоксина и эрабутоксина-а, важные для взаимодействия с nAChR, а также гомологичные остатки в кандоксине и петле II *ws-Lynx1*.

Взаимодействие *ws-Lynx1* с ACh-связывающими белками, nAChR и mAChR.

Определение активного сайта в молекуле *ws-Lynx1*

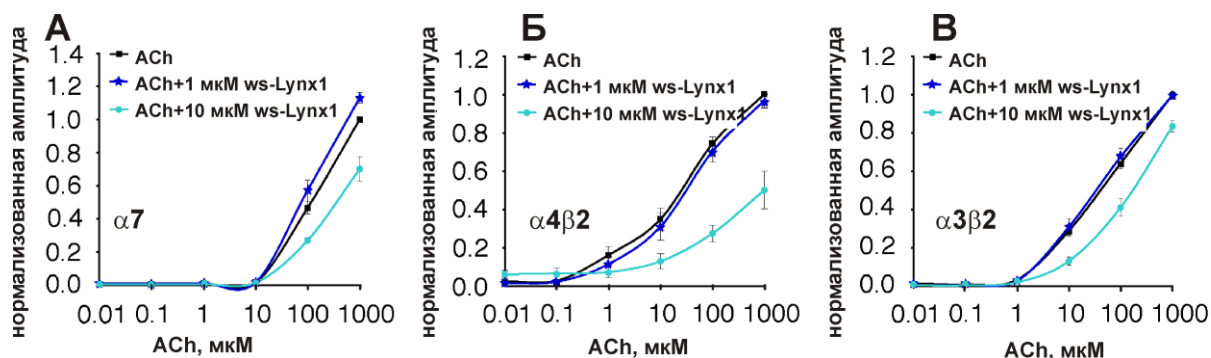


Рис. 11. Действие 1 и 10 мкМ *ws-Lynx1* на nAChR человека, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*.

GPI-заякоренный *Lynx1* влияет на ACh-индуцированные токи через $\alpha 4\beta 2$ nAChR (Ibañez-Tallon et al., 2002), однако, количественно оценить активность GPI-формы *Lynx1* невозможно. В диссертационной работе исследовали взаимодействие *ws-Lynx1* с различными типами nAChR и mAChR, а также с ACh-связывающими белками Ac-AChBP и Ls-AChBP, являющимися моделями лиганд-связывающего домена nAChR (Brejc et al., 2001). *Ws-Lynx1* конкурировал с ^{125}I - α -Bgtx за связывание с AChBP и мышечным nAChR ($\text{IC}_{50} \sim 10$ и ~ 30 мкМ). Однако, конкуренция с ^{125}I - α -Bgtx и с ^3H -эпибатином за взаимодействие с нейрональными $\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR не наблюдалась вплоть до концентрации 30 мкМ. Электрофизиологические эксперименты на ооцитах *X. laevis* показали, что 10 мкМ *ws-Lynx1* ингибирует токи через $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR. Этот эффект был более выраженным на $\alpha 4\beta 2$ -nAChR и увеличивался при повышении концентрации ACh (Рис. 11). Апликация 1 мкМ *ws-Lynx1* приводила к небольшому увеличению амплитуды токов через

$\alpha 7$ -nAChR, не влияя на $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3\beta 2$ рецепторы. Этот эффект был подтвержден в дополнительных экспериментах. Таким образом, ws-Lynx1 модулирует функцию nAChR, вероятно, связываясь с рецептором вне ортостерического сайта. На $\alpha 7$ -nAChR модулирующее действие ws-Lynx1 в зависимости от концентрации выражается в потенцировании или ингибировании рецептора. Тестирование активности 10 мкМ ws-Lynx1 на различных типах mAChR, выявило небольшое (15 %) увеличение связывания $^3\text{H-NMS}$ на M3 рецепторе. Хотя сродство ws-Lynx1 к рецептору было ниже, чем у WTX ($K_d \sim 3$ и ~ 0.3 мкМ), полученные данные указывают на существование отличных от nAChR мишеней действия Lynx1.

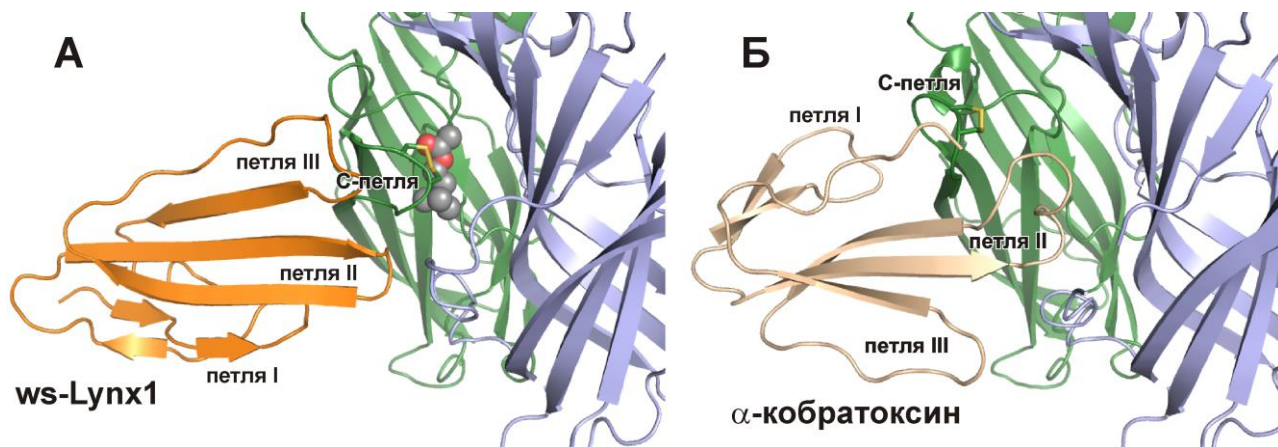


Рис. 12. Модель комплекса ws-Lynx1/Ls-AChBP (А) в сравнении со структурой комплекса α -кобратокина/Ls-AChBP (Б). Основная субъединица показана зеленым, комплементарная – синим, дисульфидная связь в С-петле – желтым. На панели (А) показана молекула АСh в ортостерическом сайте.

Для моделирования комплекса ws-Lynx1/рецептор в качестве модели использовали Ls-AChBP, для которого нейромодулятор демонстрировал наибольшее сродство. Докинг проводили как с «закрытым», так и с «открытым» ортостерическим сайтом, наблюдаемым в комплексах AChBP с агонистами и антагонистами, соответственно. Расчеты МД показали, что более стабильным является комплекс с «закрытым» сайтом (Рис. 12А), в котором петли II и III ws-Lynx1 взаимодействуют с внешней стороной С-петли, не проникая в ортостерический сайт и не мешая взаимодействию рецептора с АСh. В отличие от ws-Lynx1 α -нейротоксины змей взаимодействуют с «открытым» сайтом, проникая под С-петлю рецептора (Рис. 12Б).

Для проверки предложенной модели был получен ряд мутантов ws-Lynx1 с заменами остатков в II и III петлях на остаток Ala (Рис. 13А). Активность мутантов изучали методом patch-clamp на клетках СНО-К1, экспрессирующих химерный рецептор $\alpha 7$ /GlyR, включающий внеклеточный домен $\alpha 7$ -nAChR и трансмембранный домен глицинового рецептора¹. Инкубация с 10 мкМ ws-Lynx1 в течение 90 сек приводила к обратимому уменьшению амплитуды токов, вызванных никотином, на ~ 24 % (Рис. 13БВ). Большинство мутаций в петле II отменяли ингибирующий эффект (Рис. 13ГЕЖ), за исключением мутанта Р36А, который проявлял более высокую активность (~ 32 %, Рис. 13Д). Мутация Y57A в петле III приводила к усилению тока, в то время как при замене Tyr54 и Lys59 сохранялось слабое ингибирование. Вероятно, сайт взаимодействия ws-Lynx1 с рецептором локализован на петле II. Это предположение было подтверждено при исследовании синтетического пептида, со-

¹Совместно с проф. П. Брежестовским, Университет Aix-Marseille

державшего фрагмент петли II, стабилизированный дисульфидной связью между введенными остатками Cys (Рис. 133)¹. Полученный пептид ингибировал $\alpha 7$ -nAChR в ооцитах *X. laevis* с эффективностью, сравнимой с ws-Lynx1. Таким образом, был идентифицирован основной элемент молекулы Lynx1, ответственный за взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR.

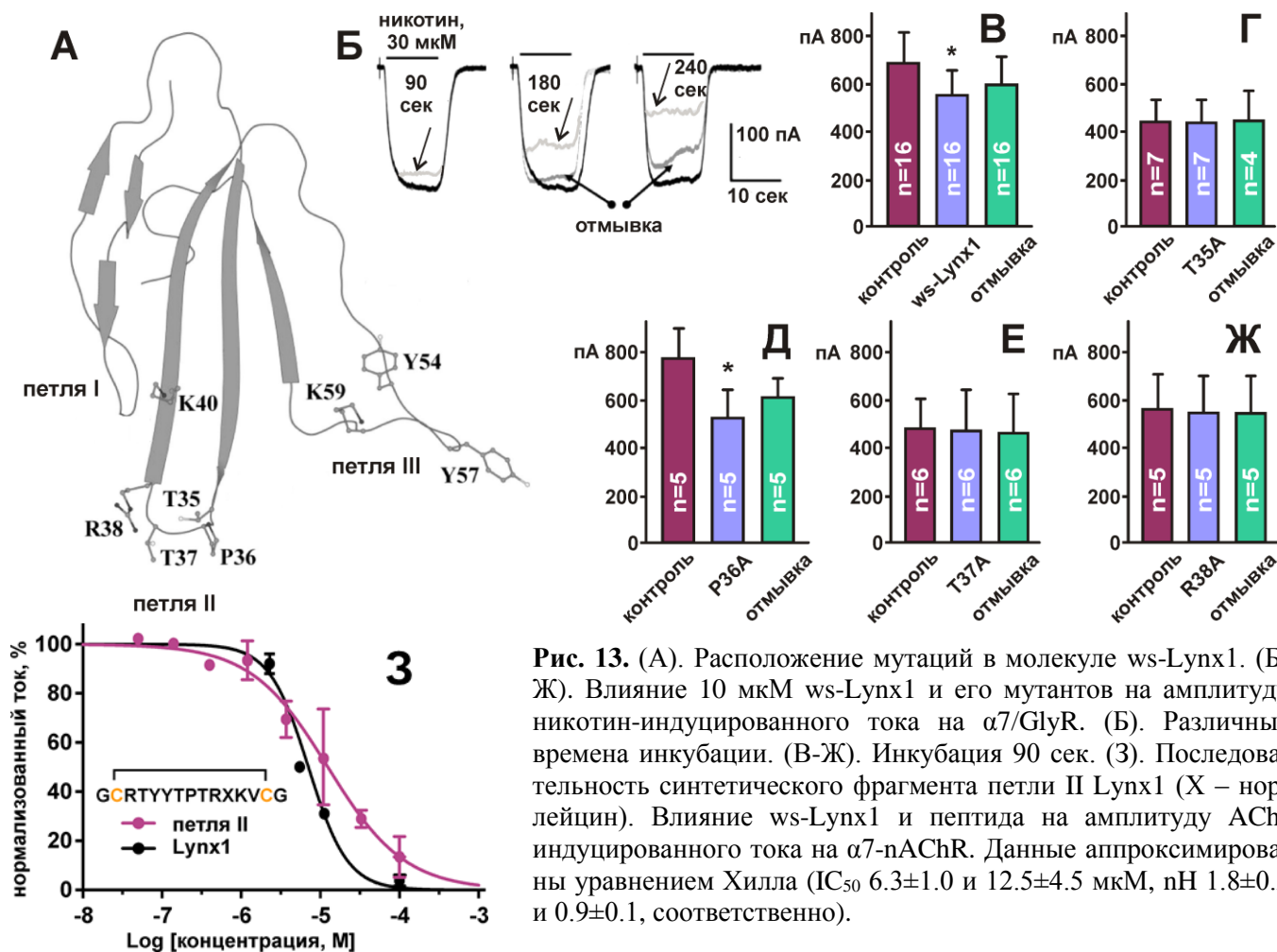


Рис. 13. (А). Расположение мутаций в молекуле ws-Lynx1. (Б-Ж). Влияние 10 мкМ ws-Lynx1 и его мутантов на амплитуду никотин-индуцированного тока на $\alpha 7$ /GlyR. (Б). Различные времена инкубации. (В-Ж). Инкубация 90 сек. (З). Последовательность синтетического фрагмента петли II Lynx1 (X – норлейцин). Влияние ws-Lynx1 и пептида на амплитуду ACh-индуцированного тока на $\alpha 7$ -nAChR. Данные аппроксимированы уравнением Хилла (IC_{50} 6.3±1.0 и 12.5±4.5 мкМ, nH 1.8±0.2 и 0.9±0.1, соответственно).

Ws-Lynx1 снижает никотин-индуцированное фосфорилирование киназ ERK1/2

Для изучения влияния ws-Lynx1 на nAChR-опосредованную внутриклеточную сигнализацию исследовали никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 MAP киназ². Активация сигнальных путей, опосредованных ERK, важна для формирования долговременной потенциации (ДВП) и памяти (Adams, Sweatt, 2002). В качестве модели использовали клетки PC12, в которых экспрессируются $\alpha 2-7$, $\alpha 9$ и $\beta 2-4$ субъединицы nAChR, а также срезы мозга крысы. Инкубация PC12 клеток с ws-Lynx1 снижала никотин-индуцированное фосфорилирование ERK, достигая максимального эффекта при концентрации 10 мкМ (Рис. 14А). Эффект никотина отменялся неспецифическим блокатором nAChR мекамиламином (Мес) и снижался в присутствии селективного ингибитора $\alpha 3\beta 4$ -nAChR, – α -конотоксина AuIB. Инкубация клеток с ингибиторами других подтипов рецептора DhbE ($\alpha 4\beta 2$), MLA ($\alpha 7$) и α -конотоксинами P1A и MII ($\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 6$ -содержащие nAChR) не влияла на эффект никотина. По-видимому, никотин-индуцированное фосфорилирование ERK связано с активацией $\alpha 3\beta 4$ -nAChR, а не с рецепторами $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$ типов, и $\alpha 3\beta 4$ -

¹Совместно с группой химии пептидов ИБХ РАН (руководитель к.х.н. В.Н. Азев)

²Совместно с проф. М. Томсенем, Университет Копенгагена

nAChR является еще одной мишенью ws-Lynx1. Ws-Lynx1 значительно снижал фосфорилирование ERK в срезах полосатого тела, не влияя на эффект никотина в лобной коре (Рис. 14Б,В). В полосатом теле представлен широкий спектр рецепторов, а в лобной коре преимущественно $\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (Gotti et al, 2006). Вероятно, мишенью действия ws-Lynx1 в полосатом теле служат nAChR других подтипов.

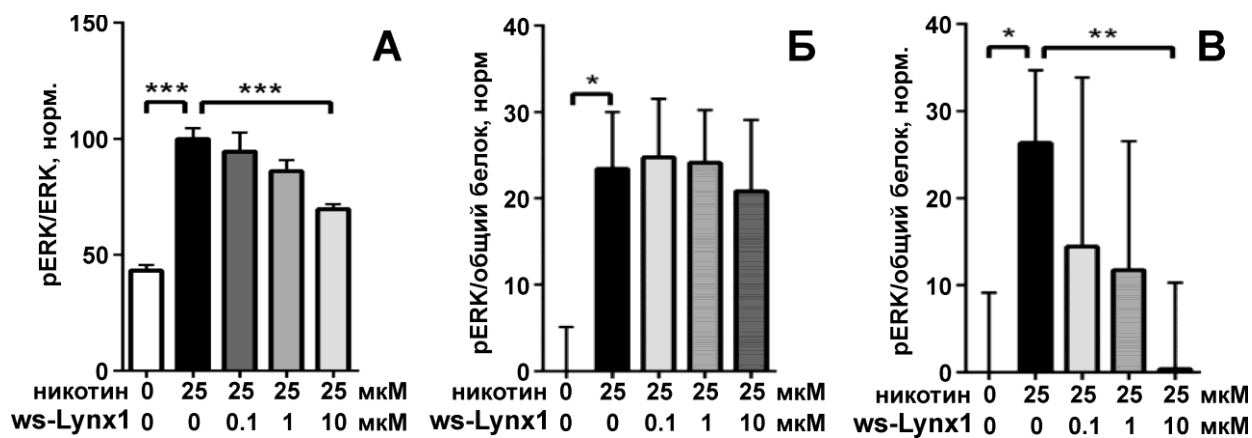


Рис. 14. Ws-Lynx1 ингибирует никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 в PC12 клетках (А) и полосатом теле (В), но не в лобной коре (Б). Анализировали отношение фосфорилированных ERK1/2 киназ (pERK) к общему количеству ERK1/2 или к общему белку, n=4-8.

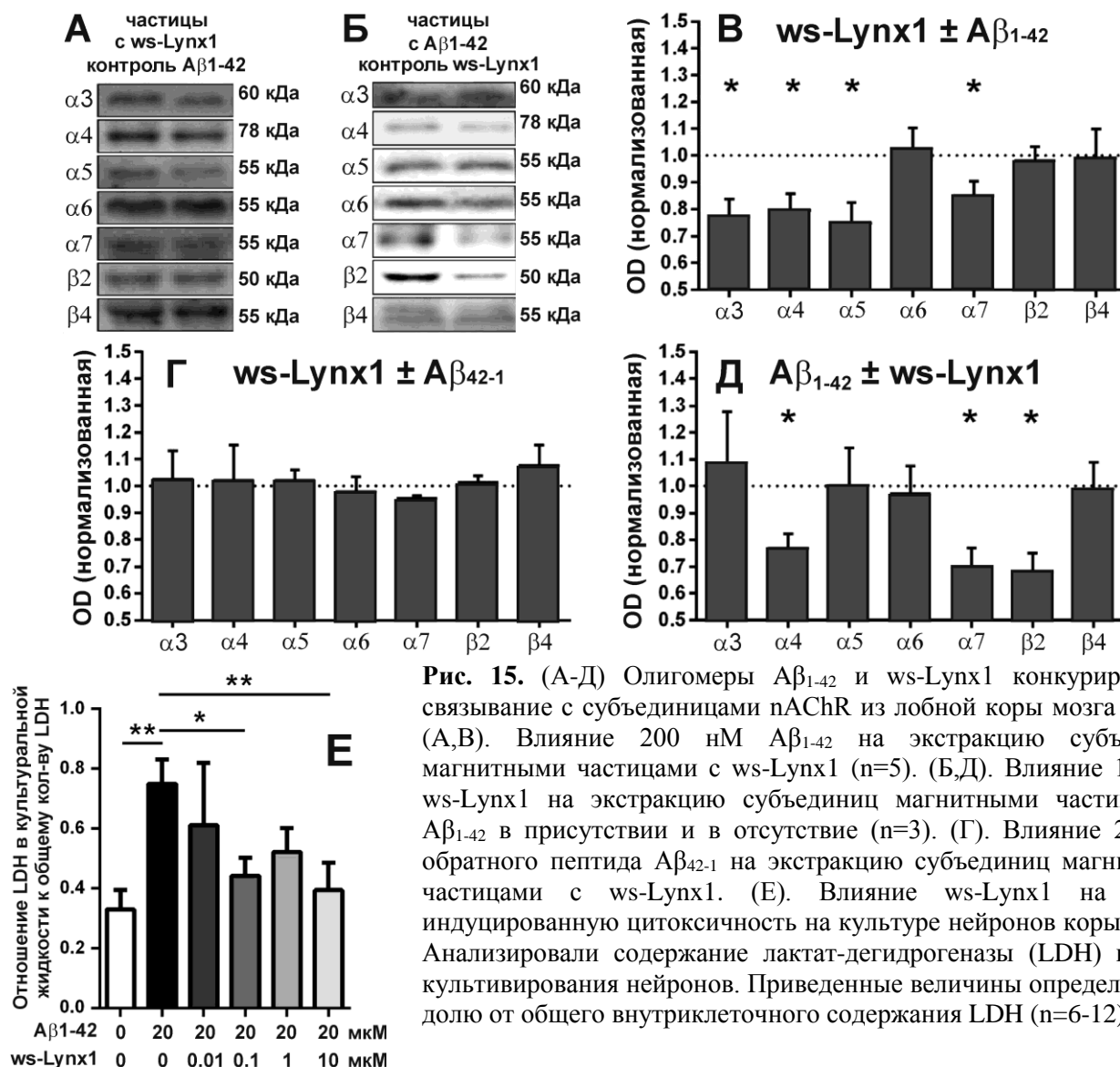
Ws-Lynx1 взаимодействует с различными субъединицами nAChR в мозге, конкурирует с амилоидным пептидом $A\beta_{1-42}$ за связывание с рецептором и предотвращает $A\beta_{1-42}$ -индуцированную цитотоксичность *in vitro*

Для определения репертуара nAChR, с которыми может взаимодействовать Lynx1 были использованы магнитные частицы с конъюгированным ws-Lynx1. Аффинная экстракция из гомогената коры головного мозга крысы выявила взаимодействие ws-Lynx1 с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ субъединицами (Рис. 15А). При этом взаимодействия с субъединицей гомологичного 5-НТ₃ рецептора не наблюдалось. Возможно, Lynx1 может взаимодействовать практически со всем репертуаром nAChR, представленном в мозге, и регулировать широкий спектр nAChR-зависимой сигнализации.

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется образованием агрегатов β -амилоидного пептида ($A\beta$). Растворимые формы $A\beta$, особенно олигомеры пептида $A\beta_{1-42}$, обладают нейротоксичностью и связаны с когнитивными нарушениями, наблюдаемыми при БА (Walsh et al., 2007). $A\beta_{1-42}$ в концентрации 200 нМ ингибирует наиболее распространенный в мозге nAChR $\alpha 7$ типа, что приводит к интернализации рецептора (Buckingham et al., 2009). Напротив, активация $\alpha 7$ -nAChR блокирует $A\beta$ -опосредованную нейротоксичность *in vitro* (Kihara et al., 2001). Таким образом, взаимодействие nAChR с $A\beta_{1-42}$ может влиять на когнитивную функцию при БА.

Так как ws-Lynx1 взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 11), было выдвинуто предположение, что он может конкурировать с $A\beta_{1-42}$ за связывание с рецептором. Действительно, преинкубация гомогената лобной коры мозга крысы с 200 нМ $A\beta_{1-42}$ значительно уменьшала количество $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$ субъединиц nAChR, экстрагированных магнитными частицами с ws-Lynx1 (Рис. 15А,В). При этом обратный пептид $A\beta_{42-1}$ не оказывал подобного эффекта (Рис. 15Г). Частицы с иммобилизованным амилоидным пептидом $A\beta_{1-42}$ изолиро-

вали из гомогената $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединицы, а инкубация гомогената с 10 мкМ ws-Lynx1 значительно снижала количество экстрагированных $\alpha 4$, $\alpha 7$ и $\beta 2$ субъединиц (Рис. 15Б,Д). Таким образом, ws-Lynx1 и $A\beta_{1-42}$ могут конкурировать за связывание с nAChR, содержащими $\alpha 4$, $\alpha 7$ и $\beta 2$ субъединицы.



Конкуренция с ws-Lynx1 за связывание с nAChR может приводить к ослаблению $A\beta_{1-42}$ -индуцированной нейрональной цитотоксичности. Инкубация в течение суток первичной культуры нейронов коры мыши с 20 мкМ олигомера $A\beta_{1-42}$ значительно увеличивала количество лактат-дегидрогеназы (LHD) в среде культивирования, что свидетельствовало о нарушении целостности нейронов (Рис. 15Е). Этот эффект значительно снижался после двухчасовой преинкубации с ws-Lynx1 (Рис. 15Е). Возможно, эндогенный Lynx1 также способен ослаблять цитотоксическое воздействие $A\beta_{1-42}$, наблюдаемое при БА, за счет «экранирования» сайта связывания с nAChR.

$A\beta_{1-42}$ снижает экспрессию Lynx1 в нейронах коры активируя JNK

В коре 3хTg-AD мышей с повышенным уровнем экспрессии $A\beta$ и гиперфосфорилирования белка Tau, моделирующих БА (Oddo et al., 2003), уровень экспрессии Lynx1 был

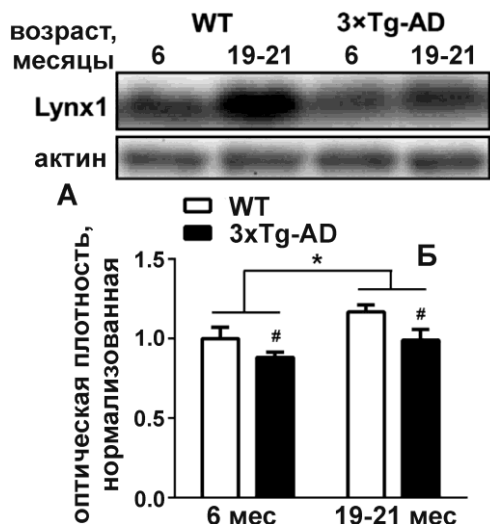


Рис. 16. (А). Экспрессия *Lynx1* в лобной коре мышей дикого типа (WT) и 3xTg-AD. (Б). Уровень экспрессии *Lynx1*, нормализованный на уровень актина (n=7-8).

снижен по сравнению с нетрансгенными одноплетными животными (Рис. 16). Сочетание избытка $A\beta_{1-42}$ и снижения уровня *Lynx1* может увеличивать $A\beta_{1-42}$ -индуцированную токсичность в нейронах. С другой стороны, возможно, именно накопление $A\beta_{1-42}$ приводит к снижению уровня *Lynx1*, вызывая нарушение работы $\alpha 7$ -nAChR при БА. Действительно, в работе показано, что инкубация первичной культуры нейронов коры мыши с 1 мкМ олигомерного $A\beta_{1-42}$ приводила к значительному снижению уровня мРНК *Lynx1* (до $78,4 \pm 4,4\%$ от контроля), а увеличение концентрации $A\beta_{1-42}$ до 5 мкМ снижало экспрессию еще больше (до $65,8 \pm 4,9\%$).

Активация $\alpha 7$ -nAChR никотином регулирует транскрипцию генов посредством фосфорилирования транскрипционного фактора CREB, активации сигнальных путей MAP/ERK и увеличения экспрессии транскрипционного фактора раннего ответа c-Fos (Klein, 2002). Напротив, взаимодействие $A\beta_{1-42}$ с $\alpha 7$ -nAChR активирует JNK киназу, что приводит к ингибированию фосфорилирования CREB и снижению уровня экспрессии c-Fos (Yenki et al., 2013). Промотор гена *Lynx1* содержит сайт связывания c-Fos. Для подтверждения участия JNK в контроле экспрессии *Lynx1* первичную культуру нейронов коры мыши инкубировали с $A\beta_{1-42}$ и SP600125 (ингибитором JNK-1, -2 и -3). В этом случае снижения экспрессии *Lynx1* не наблюдалось. Блокирование экспрессии JNK-1 и JNK-2 в нейронах с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) также приводило к отмене влияния $A\beta_{1-42}$ на экспрессию *Lynx1*. Одновременная инкубация нейронов с ws-*Lynx1* и $A\beta_{1-42}$ приводила к восстановлению уровня экспрессии эндогенного *Lynx1*. Таким образом, $A\beta_{1-42}$ контролирует экспрессию *Lynx1*, используя сигнальный путь, связанный с nAChR и JNK.

Ws-*Lynx1* предотвращает нарушение ДВП, вызванное $A\beta_{1-42}$

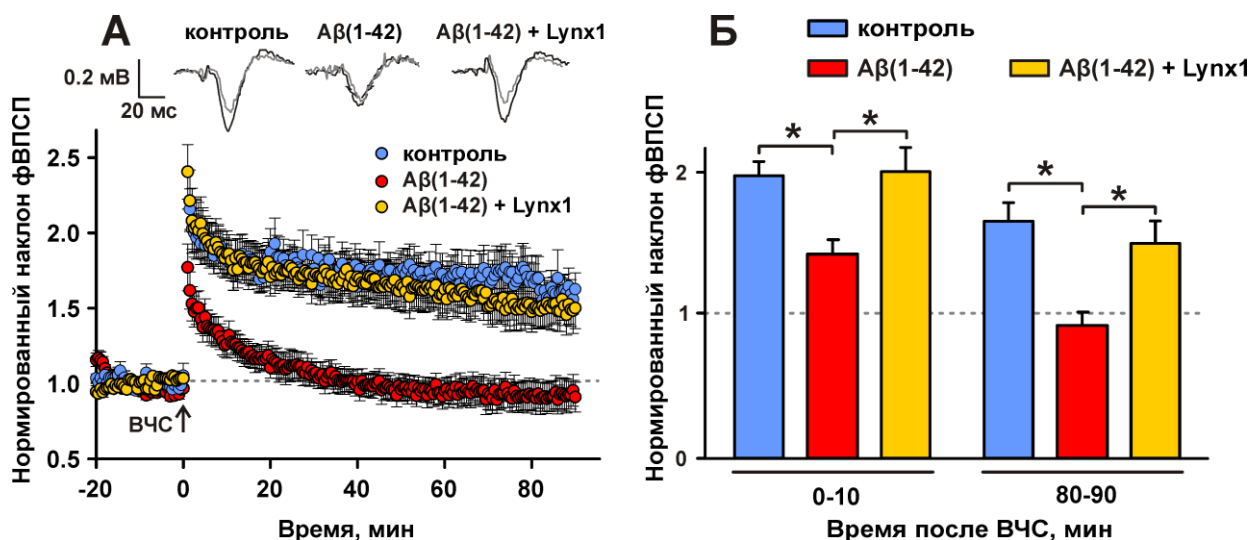


Рис. 17. (А). Усредненные записи ДВП после инкубации и перфузии срезов гиппокампа мыши растворами, содержащими и не содержащими 200 нМ $A\beta_{1-42}$ и 2 мкМ ws-*Lynx1* (n=5-8). (Б). Нормализованные наклоны фВПСП, усредненные по периодам 0-10 и 80-90 минут после ВЧС.

$A\beta_{1-42}$ блокирует долговременную потенциацию (ДВП), лежащую в основе памяти и обучения, и этот эффект опосредован активацией JNK (Wang et al., 2004). В работе исследовали влияние $A\beta_{1-42}$ и ws-Lynx1 на ДВП в переживающих срезах гиппокампа мыши¹. Одночасовая инкубация срезов с 200 нМ $A\beta_{1-42}$ приводила к значительному снижению фокального возбуждающего постсинаптического потенциала (фВПСП) после высокочастотной стимуляции (ВЧС). Снижение наклона фВПСП детектировалось в течение всего времени записи, приближаясь к значениям непотенцированных фВПСП (Рис. 17). Инкубация срезов в среде, содержащей 200 нМ $A\beta_{1-42}$ и 2 мкМ ws-Lynx1, восстанавливала ДВП практически до контрольного уровня (Рис. 17). Таким образом, ws-Lynx1 полностью нивелирует нарушение ДВП, вызванное $A\beta_{1-42}$.

Ws-Lynx1 проникает через гематоэнцефалический барьер при интраназальном введении и компенсирует нарушение памяти, вызванное MLA

Данные, полученные в работе, позволили предположить, что препараты на основе ws-Lynx1 можно использовать для компенсации нарушения когнитивной функции и предотвращения нейротоксичных эффектов $A\beta$ *in vivo*. Используя флуоресцентно-меченый CF647/ws-Lynx1, на модельных животных (мышях) были протестированы два подхода доставки пептида в мозг: внутривентрикулярная инъекция через имплантированную канюлю и интраназальная аппликация. В обоих случаях наблюдалось накопление препарата в коре, гиппокампе и мозжечке, в то же время флуоресценция в миндалине и полосатом теле оставалась на уровне контроля (Рис. 18). Таким образом, ws-Lynx1 преодолевает гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) при интраназальном введении мышам, и этот неинвазивный способ был выбран для дальнейших исследований.

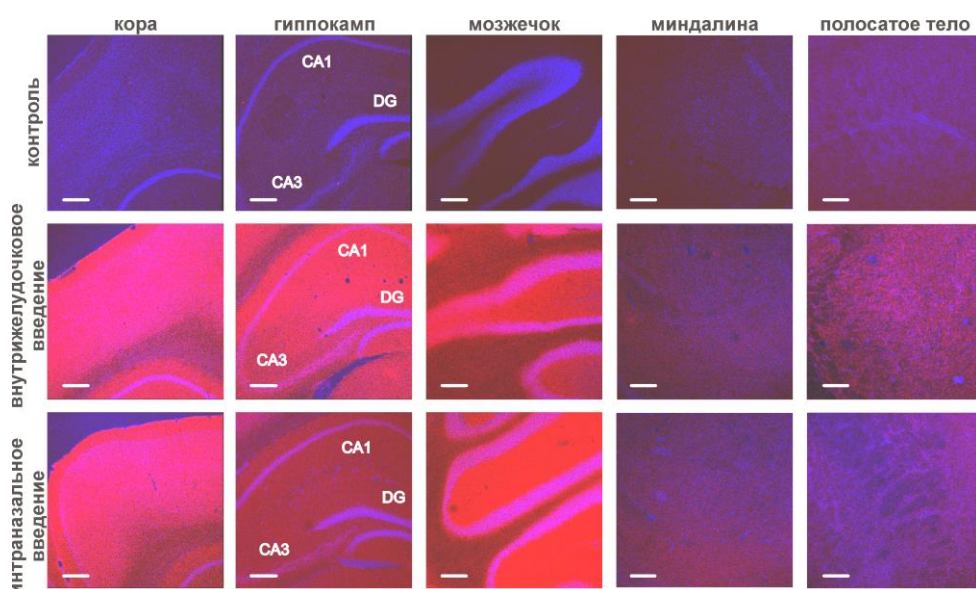


Рис. 18. Ws-Lynx1 проникает через ГЭБ при интраназальном введении. Изображения срезов мозга мыши после интраназального и внутривентрикулярного введения CF647-Lynx1. Флуоресценция CF647-Lynx1 показана красным, клеточные ядра окрашены синим с помощью Hoechst 33342. Шкала 125 мкм.

Когнитивные нарушения, связанные с дисфункцией nAChR, моделировали с помощью специфического ингибитора $\alpha 7$ -nAChR, – метилликаконитина (MLA), часто используемого для этой цели (Andriambelosen et al., 2014). Мышей C57BL/6 разделяли на четыре группы: «контроль», «ws-Lynx1», «MLA» и «ws-Lynx1+MLA». Ws-Lynx1 вводили интраназально, начиная за девять дней до поведенческих тестов, MLA вводили внутривентрикулярно.

¹Исследование ws-Lynx1 на срезах мозга выполнено совместно с к.б.н. Н.А. Васильевой, ИВНД и НФ РАН

но за день до тестов, введение препаратов продолжали в течение всех поведенческих экспериментов. Для оценки двигательной и исследовательской активности, а также тревожности использовали тесты «приподнятый крестообразный лабиринт» (КПЛ) и «открытое поле» (ОП)¹. Эти тесты не выявили значительных отличий между группами животных. Однако в тесте Ротарод, характеризующем моторную память и обучение, мыши, получавшие MLA, обучались заметно медленнее контрольной группы (Рис. 19А). При этом, введение ws-Lynx1 практически полностью восстанавливало способность животных к обучению.

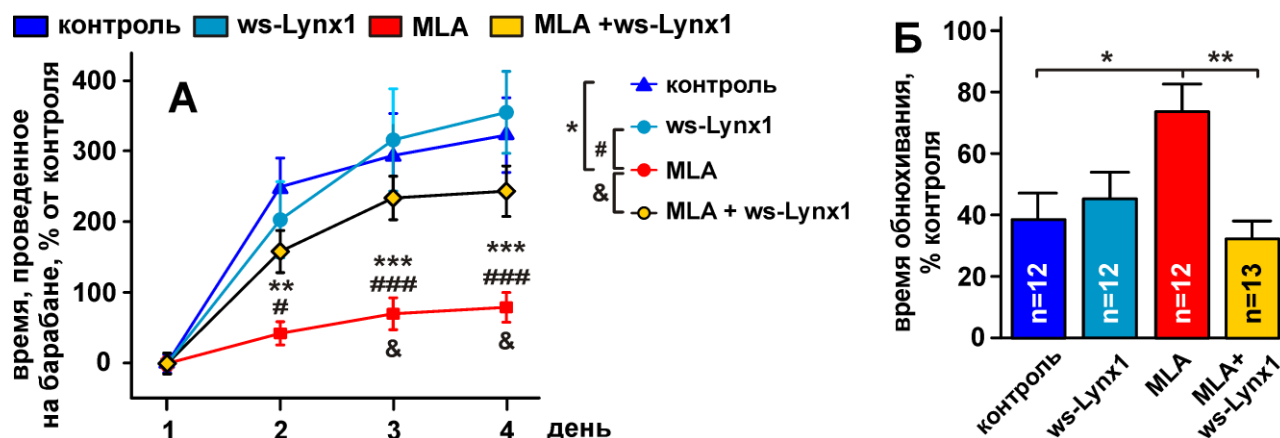


Рис. 19. (А). Динамика обучения мышей в тесте Ротарод в процентах от базовых значений в 1й день. (Б). Время обнюхивания на 2й день, нормированное на время обнюхивания в 1й день.

Для исследования обонятельной памяти использовали тест, в котором мышам предъявляли незнакомый запах во время обучающей сессии, и память об этом запахе проверяли спустя 24 часа во время тестовой сессии. Мыши контрольной группы тратили значительно меньше времени на повторное обнюхивание (~ 40 % по сравнению с обучающей сессией, Рис. 19Б). Напротив, животные, получавшие MLA, плохо запоминали незнакомый запах (время повторного обнюхивания ~ 74 %). Совместное введение MLA и ws-Lynx1 возвращало время повторного обнюхивания до контрольного уровня, что указывает на восстановление обонятельной памяти.

Ws-Lynx1 усиливает ACh-индуцированные токи через $\alpha 7$ -nAChR в коре головного мозга

Для исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе влияния ws-Lynx1 на когнитивную функцию, активность белка изучали на срезах коры головного мозга крысы. Для исключения влияния эндогенного Lynx1 были выбраны интернейроны 1-го слоя первичной зрительной коры, не экспрессирующие Lynx1 (Demars, Morishita, 2014), но экспрессирующие

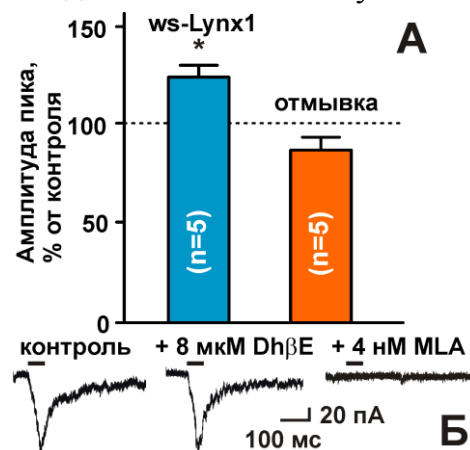


Рис. 20. (А). Амплитуда тока, вызванного ACh, в присутствии 2 мкМ ws-Lynx1 на интернейронах 1-го слоя первичной зрительной коры крысы. Данные нормализованы к амплитуде тока, зарегистрированной без ws-Lynx1. (Б). Ответы на импульсы 1 мМ ACh в присутствии 8 мкМ DhβE (ингибитор $\alpha 4\beta 2$ -nAChR) или 4 нМ MLA (ингибитор $\alpha 7$ -nAChR).

¹ Поведенческие тесты выполнены совместно с к.б.н. А.А. Андреевым-Андриевским, к.б.н. А.С. Поповой, Е.А. Лагеревой, ИМБП РАН

$\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (Christophe et al., 2002). Аппликация 1 mM ACh вызвала токи через $\alpha 7$ -nAChR, но не через $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (Рис. 20Б). Короткая (20 мин) инкубация срезов в среде, содержащей 2 мкМ ws-Lynx1, значительно увеличивала амплитуду ACh-индуцированных токов до 124 % от контроля (Рис. 20А). Отмывка срезов в течение 20 мин возвращала амплитуду токов к контрольному уровню, указывая на обратимое связывание ws-Lynx1.

Ws-Lynx1 усиливает ДВП и предотвращает его блокаду, вызванную MLA

Влияние ws-Lynx1 на синаптическую пластичность исследовали в экспериментах по регистрации ДВП в переживающих срезах гиппокампа мыши. Одночасовая инкубация срезов в среде, содержащей 2 мкМ ws-Lynx1, значительно усиливала ДВП в течение первых 10 мин после ВЧС по сравнению с контрольной группой (рис. 21А,Б). Соотношение парной фасилитации (PPF), – величины, связанной с вероятностью высвобождения нейромедиатора, также увеличивалось при инкубации срезов с ws-Lynx1 (Рис. 21В).

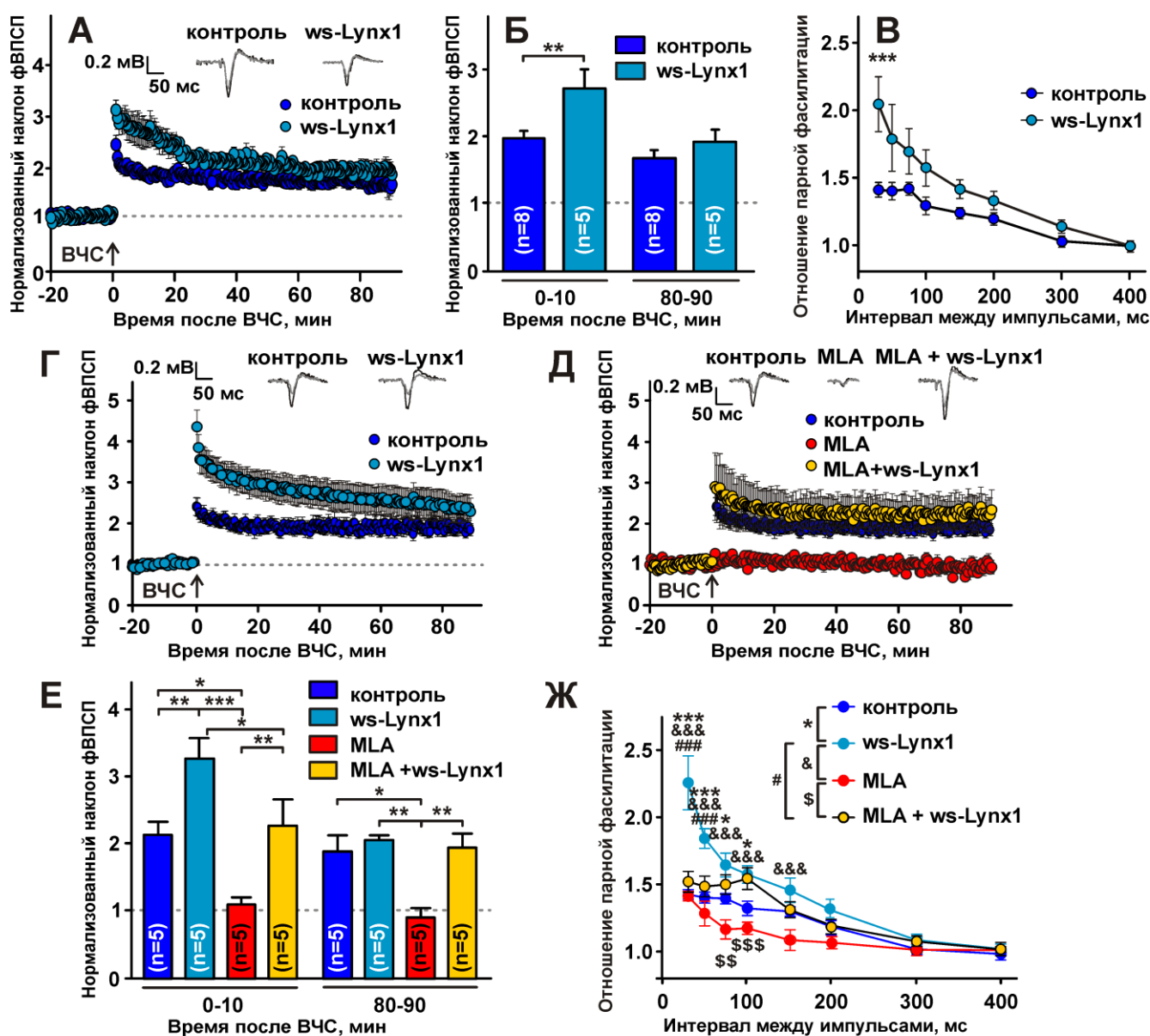


Рис. 21. Усредненные записи ДВП при инкубации срезов гиппокампа в среде, содержащей 2 мкМ ws-Lynx1 и без ws-Lynx1 (n=5-8). (Б). Усредненные наклоны фВПСП. (В). Отношение парной фасилитации (PPF). (Г,Д). Записи ДВП на срезах гиппокампа мышей, получавших физ.раствор, ws-Lynx1, MLA и MLA + ws-Lynx1 (n=5). (Е,Ж). Усредненные наклоны фВПСП и соотношение PPF в тех же группах.

В срезах гиппокампа мышей, получавших *ws-Lynx1* в течение 14-15 дней, также наблюдалось усиление ДВП в течение первых 10 минут после ВЧС (Рис. 21Г,Е). Напротив, регулярное введение MLA в течение 6 дней значительно ингибировало ДВП по сравнению с контролем (Рис. 21Д,Е). Совместное введение MLA и *ws-Lynx1* восстанавливало ДВП до контрольного уровня (Рис. 21Д,Е). Соотношение PPF было значительно увеличено по сравнению с контрольной группой только у мышей, получавших *ws-Lynx1* (Рис. 21Ж). Повышение ДВП в течение первых десяти минут после ВЧС вместе с изменением PPF указывает на пресинаптический механизм увеличения ДВП (Schulz et al., 1994). Участие пресинаптических $\alpha 7$ -nAChR в модуляции ДВП было описано ранее (Koukoulis, Maskos, 2015). Можно предложить, что *ws-Lynx1* активирует пресинаптические $\alpha 7$ -nAChR в присутствии эндогенного ACh, способствуя тем самым высвобождению глутамата в синаптическую щель. В свою очередь, это приводит к усилению ответа глутаматных рецепторов, увеличению постсинаптического тока Ca^{2+} и индукции ДВП.

Ws-Lynx1 компенсирует нарушения когнитивной функции и увеличивает синаптическую плотность в гиппокампе 2xTg-AD мышей

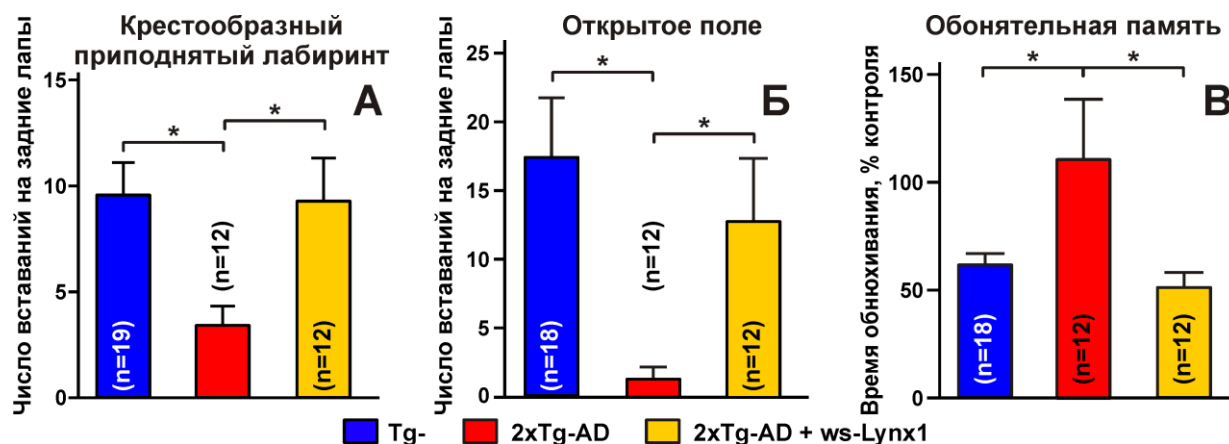


Рис. 22. Число вставаний на задние лапы за 5 и 10 мин тестов КПЛ (А) и ОП (Б), соответственно. (В). Время обнюхивания на второй день, нормированное на время обнюхивания в первый день.

Во второй серии экспериментов исследовали трансгенных мышей 2xTg-AD, экспрессирующих химерный белок-предшественник амилоида мыши/человека (Mo/HuAPP695swe) и мутантный пресенилин 1 человека (PS1-dE9) и являющихся общепризнанной моделью БА. В эксперименте участвовало три группы животных: 2xTg-AD мыши, регулярно получавшие интраназально физиологический раствор или *ws-Lynx1* (в течение девяти дней до начала эксперимента и далее в течение 15-16 дней на протяжении поведенческих тестов), и нетрансгенные однопометники (Tg-), получавшие физиологический раствор. Введение *ws-Lynx1* не влияло на двигательную активность мышей 2xTg-AD в тестах КПЛ и ОП. В то же время у мышей 2xTg-AD наблюдалось значительное снижение исследовательской активности, выразившееся в уменьшении частоты вставаний на задние лапы, по сравнению с Tg- мышами. Введение *ws-Lynx1* возвращало исследовательскую активность мышей 2xTg-AD к уровню, близкому к контрольному (Рис. 22А,Б). В тесте на обонятельную память мыши Tg- тратили на 30 % меньше времени на повторное обнюхивание по сравнению с обучающей сессией, а мыши 2xTg-AD не запоминали запах. Введение *ws-Lynx1* снижало время обнюхивания на второй день до контрольного уровня (Рис. 22В). Следует отметить,

что у людей с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА, также наблюдается нарушение обонятельной памяти, приводящее к потере способности различать запахи (Lafaille-Magnan et al., 2017). Аналогично мышам, получавшим MLA, в срезах гиппокампа мышей 2xTg-AD наблюдалось значительное подавление ДВП. Прием ws-Lynx1 в течение 24-25 дней восстанавливало ДВП до уровня, наблюдаемого у мышей Tg- (Рис. 23).

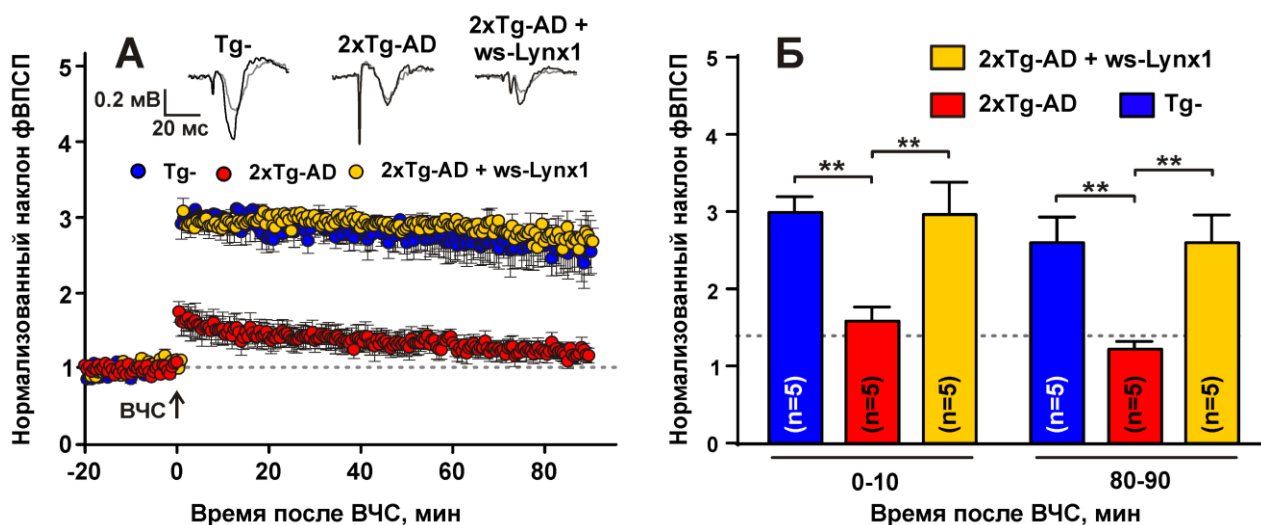


Рис. 23. (А). Усредненные записи ДВП для мышей Tg- и 2xTg-AD, получавших физиологический раствор или ws-Lynx1. (Б). Наклоны фВПСП, усредненные по периодам 0-10 и 80-90 минут после ВЧС.

Нарушение когнитивной функции БА коррелирует с потерей синапсов в гиппокампе и коре (Buttini et al., 2005). Для оценки синаптической плотности в мозге мышей после проведения поведенческих тестов измеряли уровень иммунореактивности синаптофизина в срезах энторинальной коры и гиппокампа (области CA1, CA3 и DG)¹. У 2xTg-AD животных уровень синаптофизина в коре и гиппокампе был снижен на ~ 30-40 % по сравнению с мышами Tg- (Рис. 24Б). Продолжительное введение ws-Lynx1 значительно уменьшало потерю синаптофизина в области CA3 (Рис. 24Б). При этом среднее количество амилоидных бляшек в коре и гиппокампе не менялось при введении ws-Lynx1 (Рис. 24В).

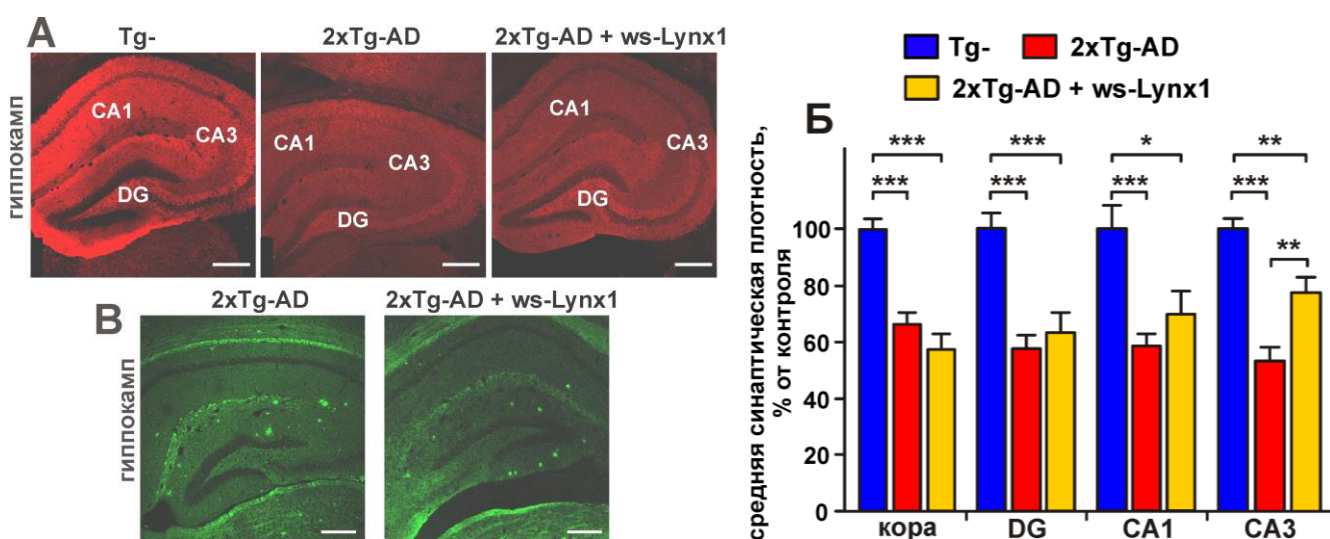


Рис. 24. (А). Срезы мозга мыши, окрашенные антителом к синаптофизину (Б). Уровень синаптофизина в зубчатой фасции (DG), CA1 и CA3 областях гиппокампа и энторинальной коре (n=4 мыши в каждой группе, 8 срезов от каждого животного). (В). Срезы мозга, окрашенные тиофлавином S для визуализации амилоидных бляшек. Шкала 250 мкм.

¹Совместно с к.б.н. К.А. Петровым и И.В. Зуевой, Казанский научный центр РАН

Таким образом, положительное влияние *ws-Lynx1* на когнитивную функцию может быть обусловлено как быстрой потенциацией $\alpha 7$ -nAChR и усилением ДВП, так и медленным изменением плотности синапсов (продолжительный прием *ws-Lynx1* в течение 25 дней). Последний эффект скорее всего является результатом изменений в экспрессии генов, участвующих в регуляции синаптической пластичности.

rLypd6 ингибирует токи через $\alpha 7$ -nAChR и подавляет ДВП в гиппокампе

Lypd6 – Ly6/uPAR белок, содержащий GPI-якорь и экспрессирующийся в мозге. Lypd6 усиливает передачу сигналов через Wnt-каскад, взаимодействуя с комплексом LRP6/Frizzled (Zhao et al., 2018). Lypd6 также экстрагирует различные субъединицы nAChR ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$) из гомогената мозга человека (Arvaniti et al., 2016). Методами иммуноцитохимии в работе впервые показана солокализация Lypd6 с $\alpha 7$ -nAChR в первичной культуре нейронов коры и гиппокампа крыс. Экспрессия белка наблюдалась как в соме, так и в дендритах нейронов (Рис. 25).

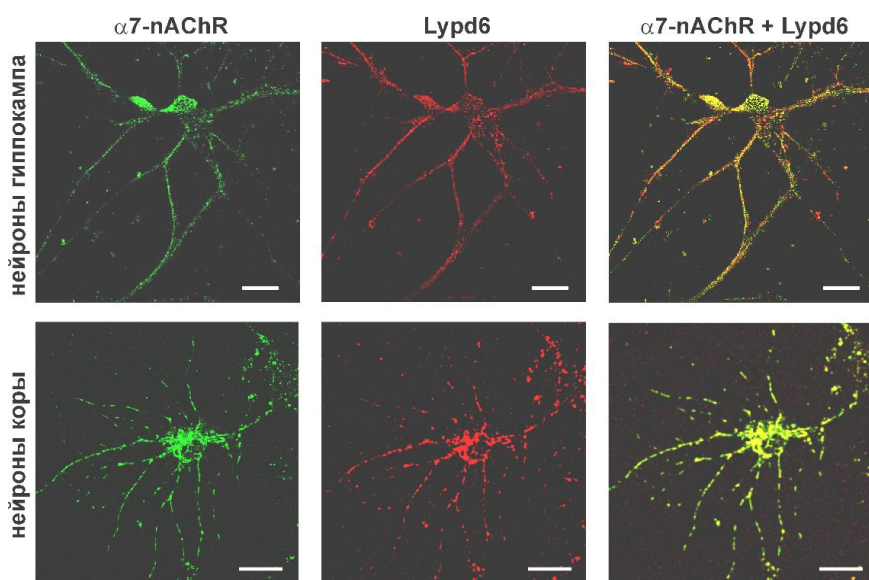
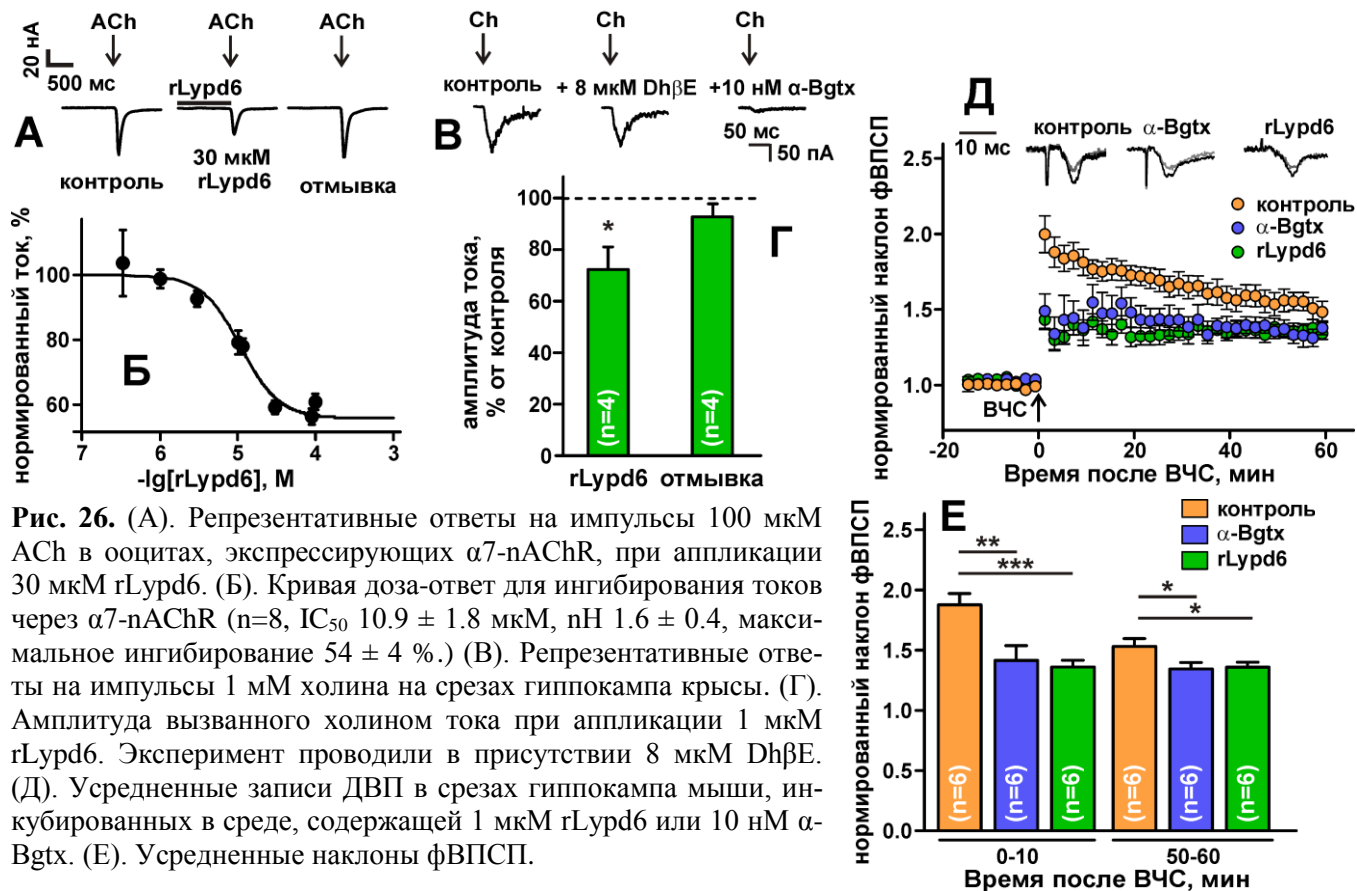


Рис. 25. Солокализация эндогенного Lypd6 (красный) и $\alpha 7$ -nAChR (зеленый) в первичной культуре нейронов коры и гиппокампа. Шкала 10 мкм.

Для изучения действия Lypd6 на nAChR¹, исследовали влияние водорастворимого аналога Lypd6 человека без GPI-якоря (rLypd6) на рецепторы $\alpha \beta 1 \delta \epsilon$, $\alpha \beta 1 \delta \gamma$, $\alpha 4 \beta 2$, $\alpha 3 \beta 4$, $\alpha 3 \beta 2$ и $\alpha 7$ типа, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*. Только на $\alpha 3 \beta 4$ - и $\alpha 7$ -nAChR наблюдалось ингибирование ACh-индуцированного тока. Способность модулировать работу $\alpha 3 \beta 4$ -nAChR недавно была показана для близкого гомолога (~ 54 %) Lypd6, -белка Lypd6b (Ochoa et al., 2016). В настоящей работе показано, что rLypd6 обратимо ингибирует $\alpha 7$ -nAChR с IC₅₀ ~ 11 мкМ и максимальным эффектом ~ 54 % (Рис. 26А,Б). Это указывает на модулирующую активность rLypd6. Для изучения функции Lypd6 в ЦНС исследовали действие rLypd6 на природные nAChR в переживающих срезах гиппокампа крыс. Аппликация холина приводила к устойчивому возникновению токов, связанных с $\alpha 7$ -nAChR, в интернейронах CA1 *str. Radiatum* (Рис. 26В). Одновременная аппликация с 1 мкМ rLypd6 обратимо уменьшала амплитуду тока до ~ 72 % (Рис. 26Г). Влияние rLypd6 на синаптическую пластичность исследовали в срезах гиппокампа мыши. Инкубация срезов с 1 мкМ

¹Совместно с д.х.н. С.А. Козловым, к.б.н. Г.С. Кошелевым и к.т.н. А.В. Поповым, Отдел молекулярной нейробиологии ИБХ РАН (руководитель член-корр. РАН А.В. Семьянов), и к.б.н. И.С. Поваровым, Научный центр неврологии РАН

Lypd6 значительно подавляла ДВП в течение всего времени записи после ВЧС (Рис. 26Д, Е). Аналогичный эффект наблюдали при инкубации срезов с 10 нМ α -Bgtx. Это позволяет предположить, что наблюдаемое в присутствии rLypd6 подавление ДВП связано с негативной модуляцией α 7-nAChR.



Пространственная структура и динамика rLypd6 в растворе, моделирование комплекса rLypd6 с α 7-nAChR

В ЯМР-спектрах rLypd6 наблюдали конформационную гетерогенность C-концевого фрагмента, связанную с *цис-транс* изомерией пептидной связи Leu85-Pro86 (заселенность состояний 1:1, время обменных переходов >0.2 с). Методом ¹H, ¹³C, ¹⁵N-ЯМР-спектроскопии была определена пространственная структура *транс*-изомера (Рис. 27). Белок имеет характерную трехпетельную структуру, однако наблюдается ряд уникальных особенностей: (1) дополнительная дисульфидная связь в петле III (Cys61-Cys72); (2) наличие только одного β -листа, включающего пять тяжей, сформированных участками всех трех петель; (3) наличие α -спиралей в петлях I и III. Ранее спиральные структурные элементы наблюдались в Ly-6/uPAR белках только по отдельности: либо в I-й, либо в III-й петле. Отдельные участки петель I и III, «головы» и C-концевого фрагмента rLypd6 были слабо упорядочены, что согласно данным ¹⁵N-релаксации связано с высокоамплитудными движениями в пс-нс диапазоне (Рис. 27БВ). Кроме того, в тяжях β 2 и β 3, формирующих петлю II, наблюдались конформационные флуктуации с характерными временами мкс-мс. Наибольшая пластичность наблюдалась в C-концевом фрагменте и на концах петель II и III.

Ранее в работе (Arvaniti et al, 2016) наблюдали конкуренцию гибридного белка GST-

Lypd6 и α -Bgtx за связывание с субъединицей $\alpha 7$ -nAChR из гомогената мозга, что указывает на возможное связывание Lypd6 в области ортостерического сайта. Для построения модели rLypd6/ $\alpha 7$ -nAChR использовали структуры рецептора с «открытым» и «закрытым» положением C-петли, полученные ранее. Для учета конформационной подвижности rLypd6 проводили кластеризацию МД траекторий белка (3×200 нс), которая дала 23 отличающиеся структуры для фрагмента Met1-Asn82, не включающего C-концевую последовательность. При фильтрации решений докинга выбирали ориентацию rLypd6 относительно предполагаемой поверхности клеточной мембраны, допускающую прикрепление с помощью C-концевого GPI-якоря. Репрезентативное решение, в котором петля I rLypd6 взаимодействует с внутренней стороной C-петли основной субъединицы рецептора, показано на Рис. 27Г.

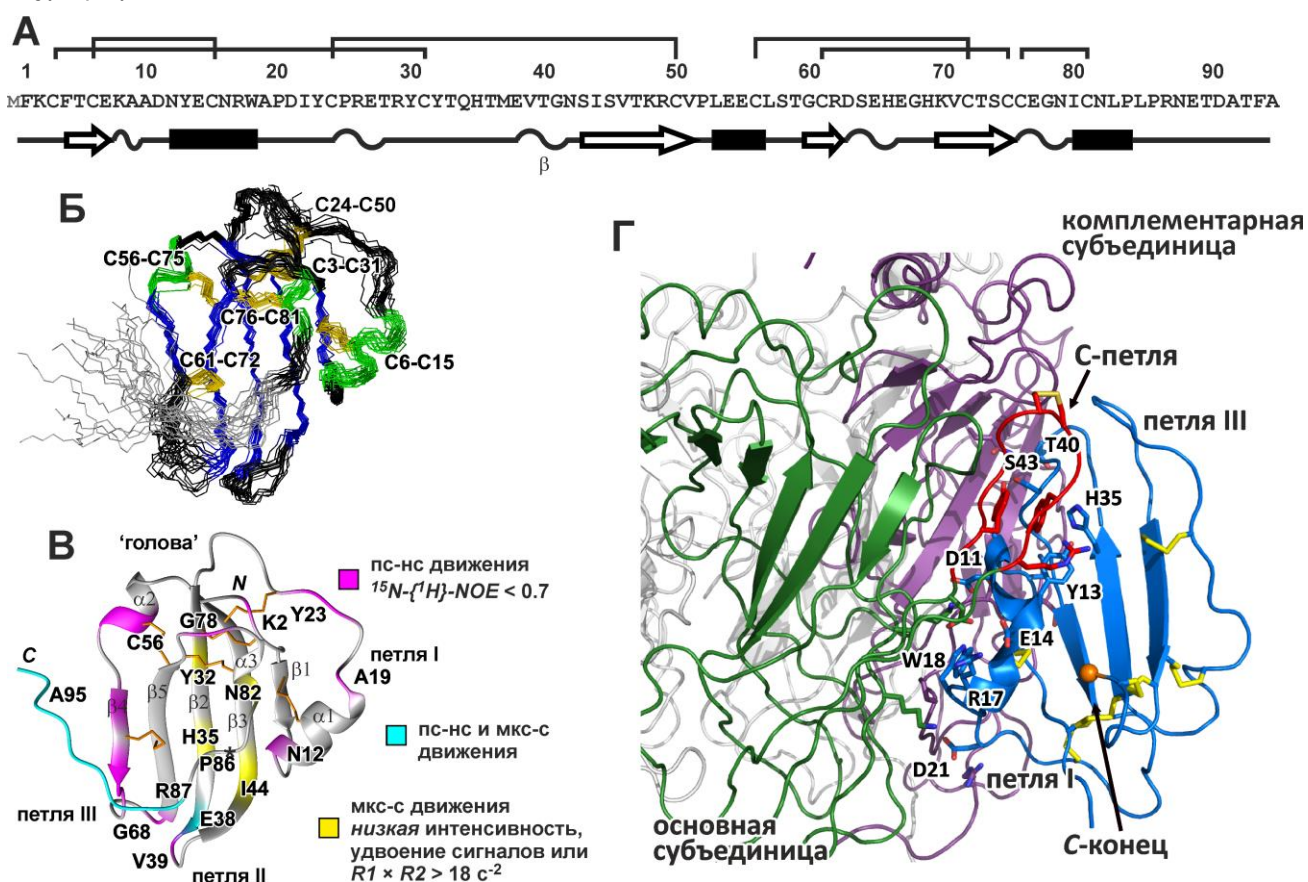


Рис. 27. (А). Вторичная структура rLypd6. (Б). 20 лучших структур rLypd6. Дисульфидные связи, β -тяжи, α -спирали и C-концевой фрагмент показаны желтым, синим, зеленым и серым цветом. (В). Данные о динамике основной цепи, полученные из скоростей релаксации ядер ^{15}N . (Г). Модель комплекса rLypd6/ $\alpha 7$ -nAChR. С-петля основной субъединицы показана красным. Показаны остатки Lypd6, образующие контакты с рецептором. Остаток Asn82 показан оранжевой сферой.

IV. НЕ-НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

SLURP-1, SLURP-2 И LYNX1

SLURP-1 снижает пролиферацию кератиноцитов, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR

Не-нейрональные nAChR, обнаруженные в невозбудимых клетках, таких как иммунные и эпителиальные клетки, участвуют в пролиферации, дифференцировке, миграции и апоптозе, а также в регуляции воспаления и транскрипции генов. Секретируемый ТПБ человека SLURP-1 регулирует пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов (Arredondo et al., 2005) и задействован в патогенезе некоторых кожных заболеваний. Предполагалось,

что мишенью SLURP-1 являются nAChR, однако механизм действия и спектр фармакологической активности не были изучены.

В качестве модели SLURP-1 человека использовали рекомбинантный аналог (rSLURP-1), содержащий N-концевой Met. Инкубация клеток Het-1A (иммортилизованная линия кератиноцитов ротовой полости человека) с rSLURP-1 в течение 48 ч снижала количество жизнеспособных клеток на ~40 % (EC_{50} ~4 нМ; Рис. 28А,Б). Микроскопический анализ и исследование активности rSLURP-1 в присутствии неспецифического ингибитора каспаз z-VAD-fmk, блокирующего апоптоз, показали, что наблюдаемый эффект связан именно со снижением пролиферации клеток.

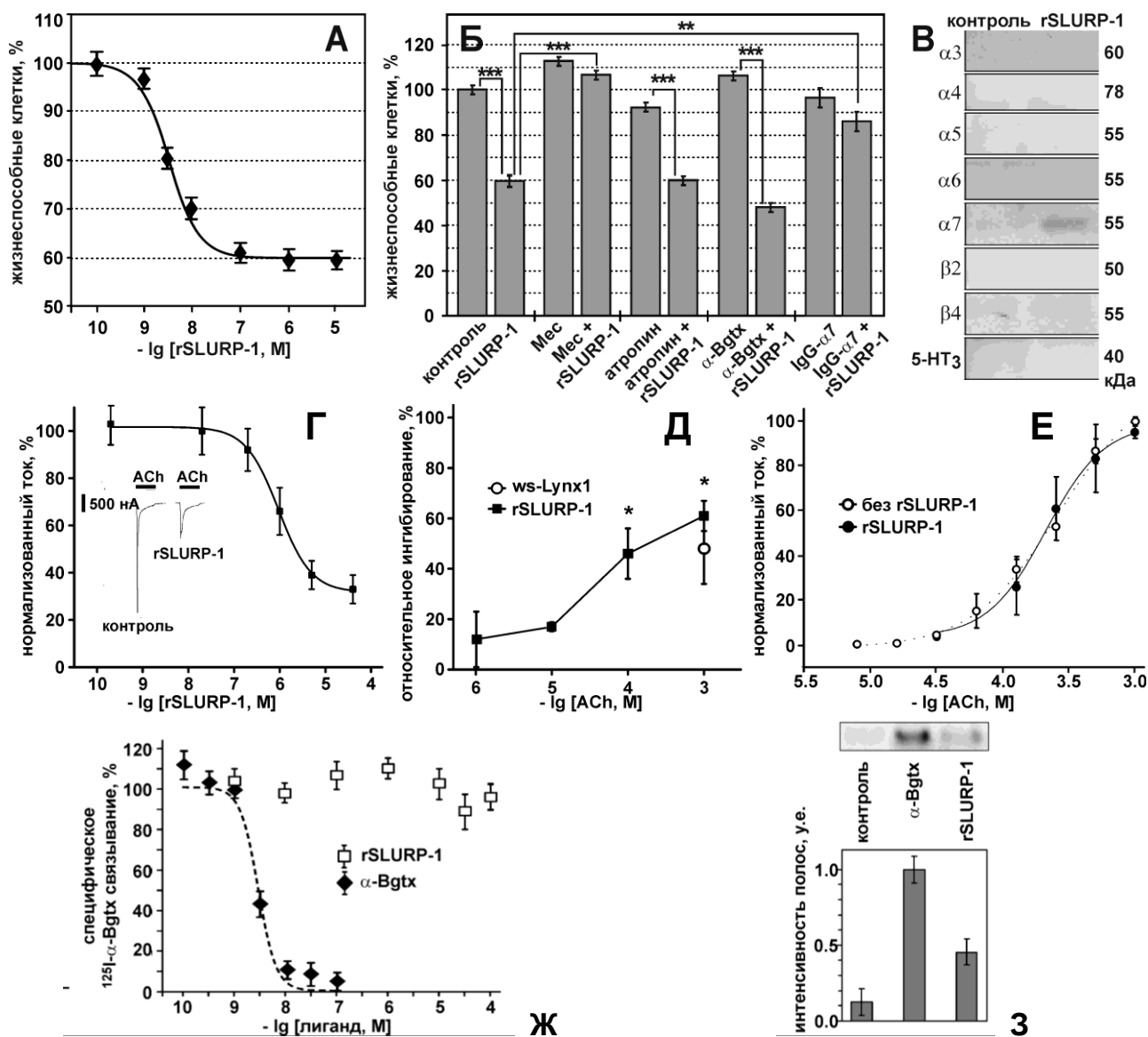


Рис. 28. (А). Влияние rSLURP-1 на рост клеток Het-1A. Данные аппроксимированы уравнением Хилла (EC_{50} 4.3 ± 0.6 нМ, nH 1.4 ± 0.2 , максимальный эффект 59.5 ± 1.3 %, $n=6$). (Б). Эффекты 1 мкМ rSLURP-1, 1 мкМ атропина, 10 мкМ Mec, 1 мкМ α -Bgtx и поликлональных антител против α 7 (1 мкг на 50 мкл), ($n=4-6$). (В). Аффинная экстракция субъединиц nAChR из гомогената коры человека магнитными частицами с rSLURP-1, или «пустыми» частицами (контроль). (Г). Влияние rSLURP-1 на токи, вызванные 1 мМ ACh, в ооцитах, экспрессирующих α 7-nAChR (IC_{50} 1.1 ± 0.5 мкМ, nH 1.4 ± 0.3 , максимальный эффект 31 ± 3 %). (Д). Зависимость ингибирования α 7-nAChR 5 мкМ rSLURP-1 и ws-Lynx1 от концентрации ACh. * обозначает значимое отличие от величины ингибирования при 1 мкМ ACh. (Е). Влияние 1 мкМ rSLURP-1 на кривую доза-эффект для ACh (EC_{50} ~220 мкМ, nH ~2). (Ж). Конкуренция ^{125}I - α -Bgtx с α -Bgtx и rSLURP-1 за связывание с α 7-nAChR в клетках GH₄C₁. (З). Экстракция α 7 субъединицы nAChR с помощью rSLURP-1 и α -Bgtx из клеток GH₄C₁.

Кератиноциты экспрессируют как nAChR, так и mAChR (Grando, 1997). Для определения мишени действия активность rSLURP-1 исследовали в присутствии мекамиламина (Мес) и атропина, – неселективных ингибиторов nAChR и mAChR. Сами ингибиторы не влияли на рост клеток, но при этом Мес полностью блокировал эффект rSLURP-1 (Рис. 28Б). Кроме того, эффект rSLURP-1 блокировала преинкубация клеток с антителами против внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR, но не с α -Bgtx (Рис 28Б). Вероятно, $\alpha 7$ -nAChR является мишенью rSLURP-1, но белок взаимодействует с рецептором за пределами ортостерического сайта. Аффинная экстракция субъединиц nAChR из препаратов височной коры человека (Рис. 28В) выявила, что rSLURP-1, в отличие от ws-Lynx1, взаимодействует только с $\alpha 7$, но не $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$, или $\beta 4$ субъединицами. Таким образом, $\alpha 7$ -nAChR является селективной мишенью SLURP-1.

rSLURP-1 взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR вне ортостерического сайта связывания

На ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR, rSLURP-1 ингибировал токи индуцированные 1 мМ ACh на ~70 % (IC_{50} ~1.1 мкМ), при этом ингибирование значительно увеличивалось с ростом концентрации ACh (Рис. 28Г,Д). Аппликация rSLURP-1 не влияла на дозозависимую кривую ACh, что указывает на отсутствие конкуренции между этими лигандами (Рис. 28Е). На клетках GH₄C₁, экспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR, конкуренцию между rSLURP-1 и α -Bgtx также не наблюдали, однако аффинная экстракция подтвердила способность rSLURP-1 взаимодействовать с $\alpha 7$ субъединицей в этих клетках, хотя и с меньшей аффинностью, чем α -Bgtx (Рис. 28Ж,З).

Таким образом, rSLURP-1 не конкурирует с ACh и α -Bgtx за связывание с $\alpha 7$ -nAChR, и, по-видимому, взаимодействует с рецептором вне ортостерического сайта, являясь негативным аллостерическим модулятором. Тот факт, что замедление пролиферации кератиноцитов, блокируемое антителами против $\alpha 7$ -nAChR, наблюдается при значительно меньших концентрациях rSLURP-1 (~4 нМ), позволяет предположить, что rSLURP-1 активирует неканонический (метаботропный) путь передачи сигналов через $\alpha 7$ -nAChR, не связанный с прохождением ионов через канал рецептора (см. ниже).

SLURP-2 взаимодействует с различными подтипами nAChR и mAChR

Ранее было показано, что секретлируемый ТПБ человека SLURP-2 стимулирует рост кератиноцитов предположительно за счет взаимодействия с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, но не $\alpha 7$ -nAChR (Arredondo et al., 2006). Для исследования мишеней и механизма действия SLURP-2 человека в работе использовали рекомбинантный аналог rSLURP-2. Аффинная экстракция субъединиц nAChR из препаратов височной коры мозга человека показала, что rSLURP-2, как и ws-Lynx1, может взаимодействовать с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединицами. Электрофизиологическое исследование rSLURP-2 выявило ингибирование токов, вызванных ACh, на $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR (IC_{50} ~ 1.7, > 3 и ~ 3 мкМ, Рис. 29А-В). Подобно ws-Lynx1, rSLURP-2 при низких концентрациях (< 1 мкМ) усиливал ток через $\alpha 7$ -nAChR. Значительное усиление тока наблюдалось даже при концентрации 30 нМ (Рис. 29Г). Схожий эффект усиления токов низкими концентрациями антагонистов ранее был

описан для тубокурарина на $\alpha\beta4$ -nAChR (Wallace et al., 2011). Вероятно, при низкой концентрации SLURP-2 в присутствии агониста (ACh) возникает доля рецепторов, занятых одновременно молекулой ACh и молекулой SLURP-2. Эти рецепторы активируются (обозначены оранжевым фоном на Рис. 29Д), что, вдобавок к рецепторам, активированным двумя молекулами ACh, приводит к увеличению тока по сравнению с контролем. Ингибирование $\alpha7$ -nAChR, наблюдаемое при высоких концентрациях rSLURP-2, можно объяснить либо блокированием рецептора при связывании двух или более молекул rSLURP-2, либо десенситизацией $\alpha7$ -nAChR при длительном воздействии rSLURP-2.

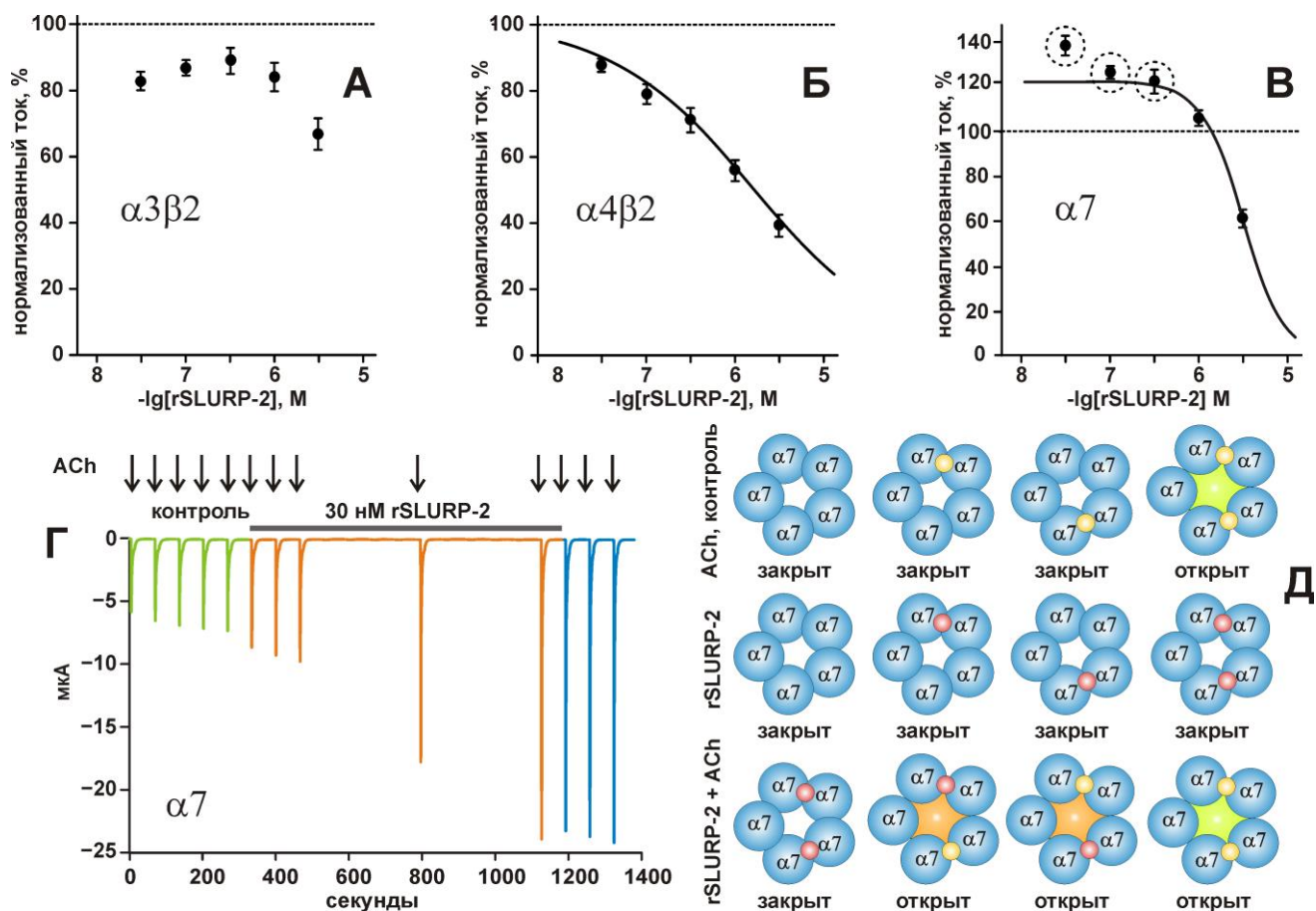


Рис. 29. (А-В). Влияние rSLURP-2 на вызванные ACh токи в ооцитах, экспрессирующих $\alpha3\beta2$ -, $\alpha4\beta2$ - и $\alpha7$ -nAChR (IC_{50} : 1.7 ± 0.4 и 3.0 ± 0.2 мкМ; pH : 0.54 ± 0.03 , и 1.90 ± 0.14 для $\alpha4\beta2$ и $\alpha7$, соответственно). (Г). 30 нМ rSLURP-2 усиливает токи через $\alpha7$ -nAChR, вызванные 40 мкМ ACh. (Д). Возможный механизм усиления токов. ACh и SLURP-2 обозначены желтыми и красными сферами.

Аналогично ws-Lynx1, преинкубация клеток PC12 с 10 мкМ rSLURP-2 (но не с rSLURP-1) значительно ингибировала (до ~ 60 %) фосфорилирование ERK1/2 киназ, индуцированное 25 мкМ никотина. Это указывает на $\alpha\beta4$ -nAChR как на еще одну потенциальную мишень rSLURP-2. Кроме того, наблюдалась слабая положительная кооперативность связывания между rSLURP-2 и 3H -NMS на M1 и M3 mAChR ($K_d \sim 0.1$ -0.2 мкМ). rSLURP-2 увеличивал скорость диссоциации 3H -NMS на M1-mAChR и снижал на M3-mAChR, что указывает на аллостерический характер взаимодействия.

Эффекты rSLURP-2 на кератиноцитах зависят от взаимодействия с различными типами ацетилхолиновых рецепторов

Инкубация кератиноцитов Het-1A с rSLURP-2 приводила к статистически значимому увеличению числа жизнеспособных клеток до ~116 % ($EC_{50} \sim 8$ нМ, Рис. 30А). Для изуче-

ния роли mAChR и nAChR в пролиферативном действии rSLURP-2 использовали неспецифические ингибиторы mAChR и nAChR (атропин и Мес) и селективные ингибиторы $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR (α -Bgtx и α -колотоксин МII). Преинкубация кератиноцитов с α -Bgtx приводила к ~ 2-кратному увеличению числа клеток в присутствии rSLURP-2, а преинкубация с МII и Мес снижала количество клеток до ~34 % и ~54 % (Рис. 30Б). Таким образом, взаимодействие rSLURP-2 с $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR ингибирует и стимулирует пролиферацию клеток, соответственно. Атропин сам по себе приводил к снижению количества клеток до ~91 %. Это не позволило сделать однозначный вывод относительно вклада mAChR в действие rSLURP-2. Кроме того, 24-часовая инкубация клеток Het-1A с rSLURP-2 ускоряла их миграцию в ~2 раза (Рис. 30А, вставка). Так как репертуар рецепторов ацетилхолина, представленный в клетках эпителия, меняется на разных этапах клеточного развития, можно предположить, что SLURP-2 участвует в регуляции гомеостаза эпителия на всем протяжении жизненного цикла.

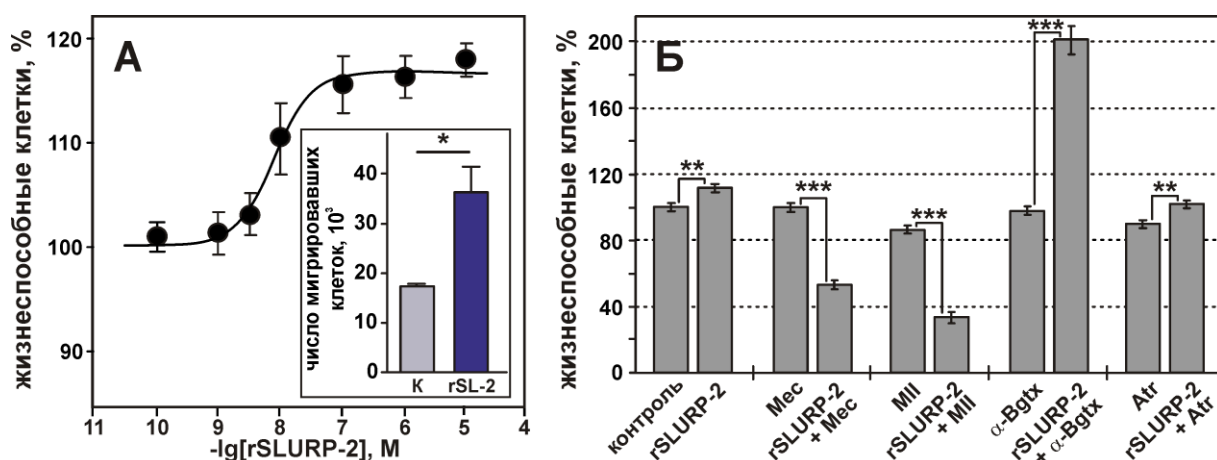


Рис. 30. (А). Влияние rSLURP-2 на рост и миграцию (вставка) клеток Het-1A. Данные по росту клеток аппроксимированы уравнением Хилла ($IC_{50} 7.6 \pm 1.0$ нМ, $pH 1.5 \pm 0.4$, максимальный эффект 116 ± 1 %). (Б). Влияние 1 мкМ rSLURP-2, 1 мкМ атропина, 10 мкМ Мес, 1 мкМ α -Bgtx, и 1 мкМ МII на рост клеток Het-1A.

Пространственная структура и динамика rSLURP-1 и rSLURP-2, моделирование взаимодействия rSLURP-2 с $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR

В ЯМР-спектрах ^{13}C , ^{15}N -меченого препарата rSLURP-1 идентифицировали два набора сигналов, соответствующих двум структурным формам белка (*цис-транс* изомерия связи Tyr39-Pro40, заселенность состояний 1:1, время обменных переходов ~4 мс). Обе формы rSLURP-1 в растворе имели типичную трехпетельную структуру с двумя антипараллельными β -листами (Рис. 31Б,В). Первый лист включал остатки петли I (Leu1-Thr5 и Thr17-Cys21). Второй состоял из трех тяжей и включал фрагменты петель II (Ala26-Leu32, Thr48-Ser52) и III (Leu68-Cys72). Напротив, rSLURP-2 имел только одну структурную форму в растворе (Рис. 31Д,Е). Первый β -лист rSLURP-2 включал остатки петли I (Ile1-His4, Gly15-Cys18), а второй – фрагменты петель II (His24-Thr30, Leu41-His47) и III (Ile64-Cys67).

Концы всех трех петель молекул rSLURP-1 и rSLURP-2 были разупорядочены и, согласно данным ^{15}N релаксации, вовлечены в высокоамплитудные движения в пс-нс и мкс-мс диапазонах (Рис. 31В,Е). Однако амплитуда этих движений в молекуле rSLURP-1

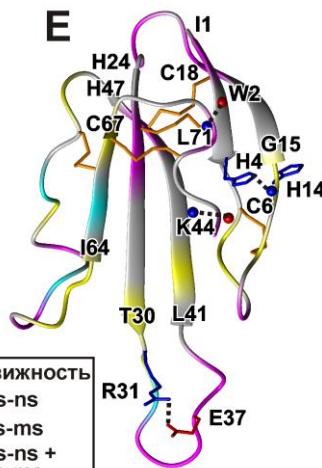
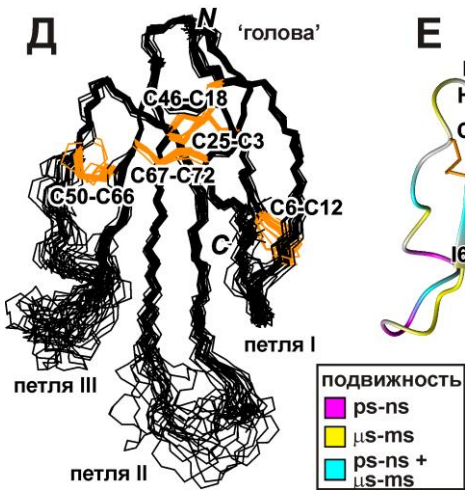
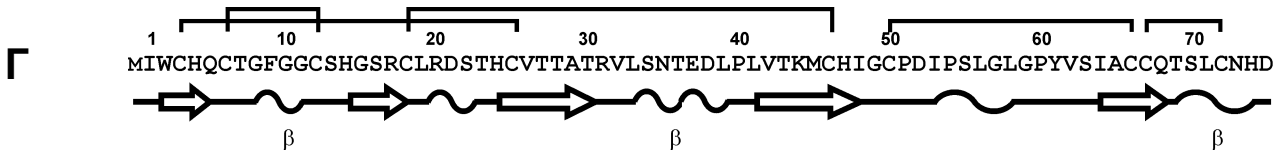
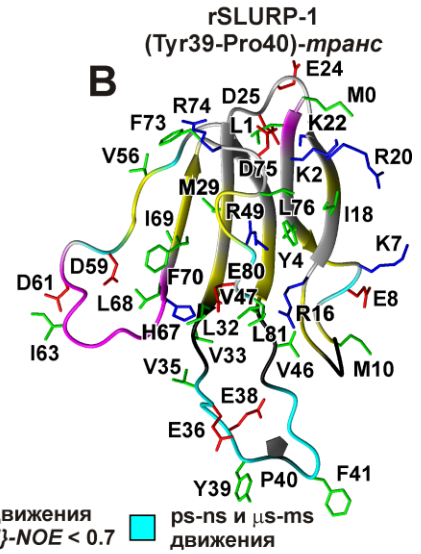
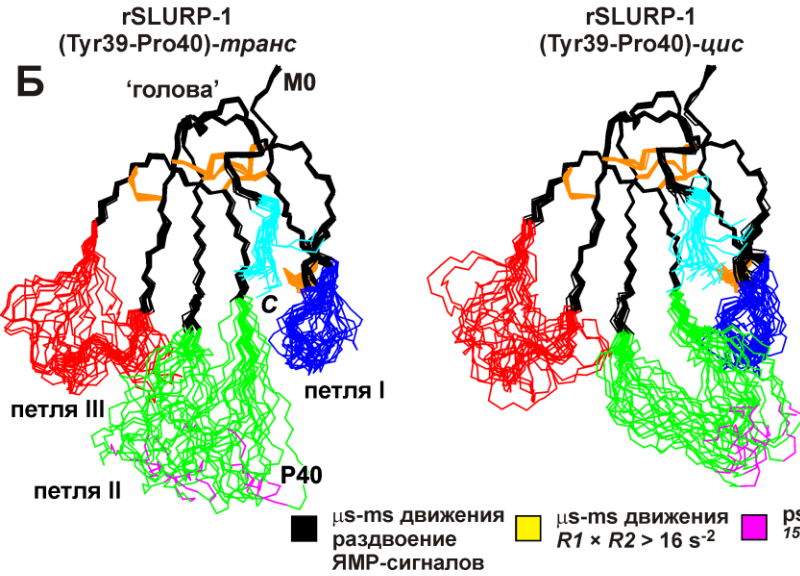
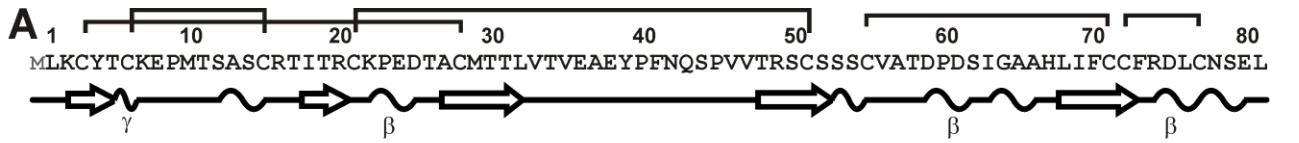
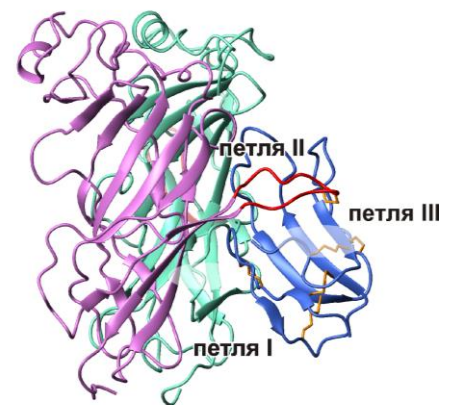
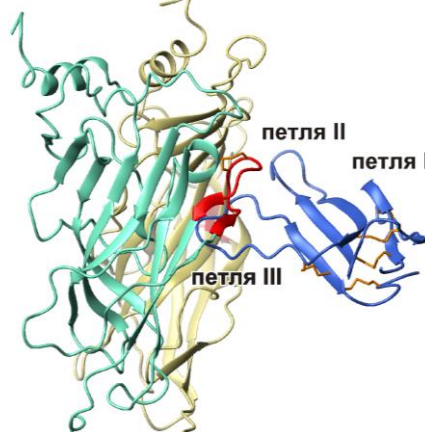
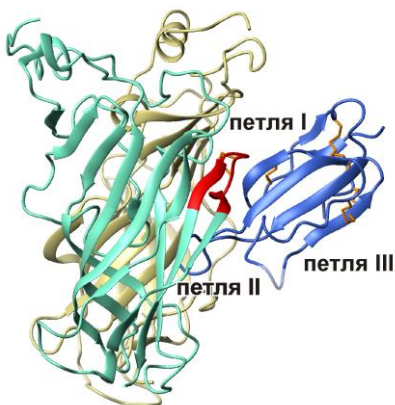


Рис. 31. (А,Г). Вторичная структура rSLURP-1 и rSLURP-2. (Б,Д). 20 лучших структур для двух форм rSLURP-1 и rSLURP-2. На Б петли и C-концевая последовательность показаны разными цветами. (В,Е). Данные о динамике основной цепи, полученные из ^{15}N релаксации. Дополнительные взаимодействия и водородные связи, стабилизирующие структуру rSLURP-2, показаны на панели Е. Амидные и карбонильные группы основной цепи обозначены синими и красными сферами, соответственно. (Ж). Модели комплексов rSLURP-2 с $\alpha\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR. С-петли основных субъединиц рецептора показаны красным цветом.

Ж α3β2 "закрытый" лиганд-связывающий карман

α7 "закрытый" лиганд-связывающий карман

α7 "открытый" лиганд-связывающий карман



была значительно выше. Можно предположить, что высокая подвижность петлевых участков обеспечивает адаптацию белков для взаимодействия с несколькими мишенями или несколькими сайтами на поверхности одного рецептора. Этот фактор, возможно, определяет способность SLURP-2 взаимодействовать с различными типами nAChR и mAChR. Предполагаемая активация ионотропного и метаболитического сигнальных путей может достигаться при взаимодействии SLURP-1 с различными сайтами на поверхности $\alpha 7$ -nAChR.

Влияние антагонистов nAChR на активность rSLURP-2 (Рис. 30Б) указывает на взаимодействие белка с ортостерическим сайтом рецептора. Поэтому при моделировании комплексов rSLURP-2 с внеклеточными доменами $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR предполагали, что белок взаимодействует с С-петлей основной субъединицы. Для учета конформационной пластичности взаимодействующих молекул использовали подход, описанный выше. Кластеризация МД траекторий внеклеточного домена $\alpha 3\beta 2$ -nAChR и rSLURP-2 (2×200 и 3×200 нс) дала 9 и 11 репрезентативных структур. В МД траектории оба лиганд-связывающих сайта имели «закрытую» конфигурацию. Также в расчетах использовали модели домена $\alpha 7$ -nAChR с «закрытым» и «открытым» сайтом.

Репрезентативные решения для трех серий белок-белкового докинга показаны на Рис. 31Ж. Несмотря на различия полученных моделей, во всех случаях петлевые участки rSLURP-2 взаимодействуют с внутренней стороной С-петли рецептора и всегда с участием петли II. Различия в способах взаимодействия rSLURP-2 с «закрытыми» сайтами $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR могут объяснить разную активность белка на этих рецепторах. Противоположное влияние rSLURP-2 на пролиферацию кератиноцитов, опосредованное взаимодействием с $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, может быть результатом как разных способов взаимодействия рецептор/лиганд, так и разных внутриклеточных сигнальных каскадов, связанных с этими рецепторами.

rSLURP-1 и rSLURP-2 ингибируют рост эпителиальных раковых клеток

В работе было исследовано влияние белков rSLURP на рост клеток карцином человека (эпидермоидная карцинома A431, аденокарциномы груди MCF-7 и SKBR3, аденокарцинома легкого A549 и карцинома кишечника HT-29)¹. 24-часовая инкубация с препаратами rSLURP приводила к значительному уменьшению числа жизнеспособных клеток до 40–70 % с EC₅₀ в диапазоне от 0.02 до 3.1 нМ (Рис. 32). Только на клетках A549 наблюдалось усиление роста до ~ 125 % в присутствии rSLURP-2. Поскольку микроскопический анализ не выявил признаков цитотоксичности, наблюдаемый эффект объяснили антипролиферативным действием SLURP. α -Bgtx также тормозил рост всех изученных линий со значениями EC₅₀ в диапазоне от 0.01 до 1.4 нМ. При этом, 24-часовая инкубация нормальных клеток (кератиноцитов Het-1A и клеток легкого WI-38) с препаратом rSLURP-1 уменьшала число жизнеспособных клеток не более чем на 20 % (Рис. 32).

Исследование антипролиферативного эффекта на линии A431 в присутствии ингибиторов nAChR (Мес), mAChR (атропин), EGFR (гефитиниб) и β -адренорецепторов (β AR,

¹Совместно с лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН (руководитель д.б.н. А.В. Феофанов) и кафедрой биоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова

тимолол) показало, что rSLURP-1 подавляет рост клеток за счет взаимодействия с nAChR, а действие rSLURP-2 связано как с nAChR так и с mAChR. В соответствии с опубликованными данными (Lin et al., 2010), препарат гефитиниб, используемый для лечения опухолей, связанных с активацией EGFR, ингибировал рост клеток A431. Эффекты rSLURP и гефитиниба на этих клетках были сравнимы, однако в случае SLURP они достигались при значительно меньших концентрациях. 24-часовая инкубация клеток A431 с гефитинибом и белками rSLURP приводила к аддитивному ингибированию пролиферации и полностью останавливала рост.

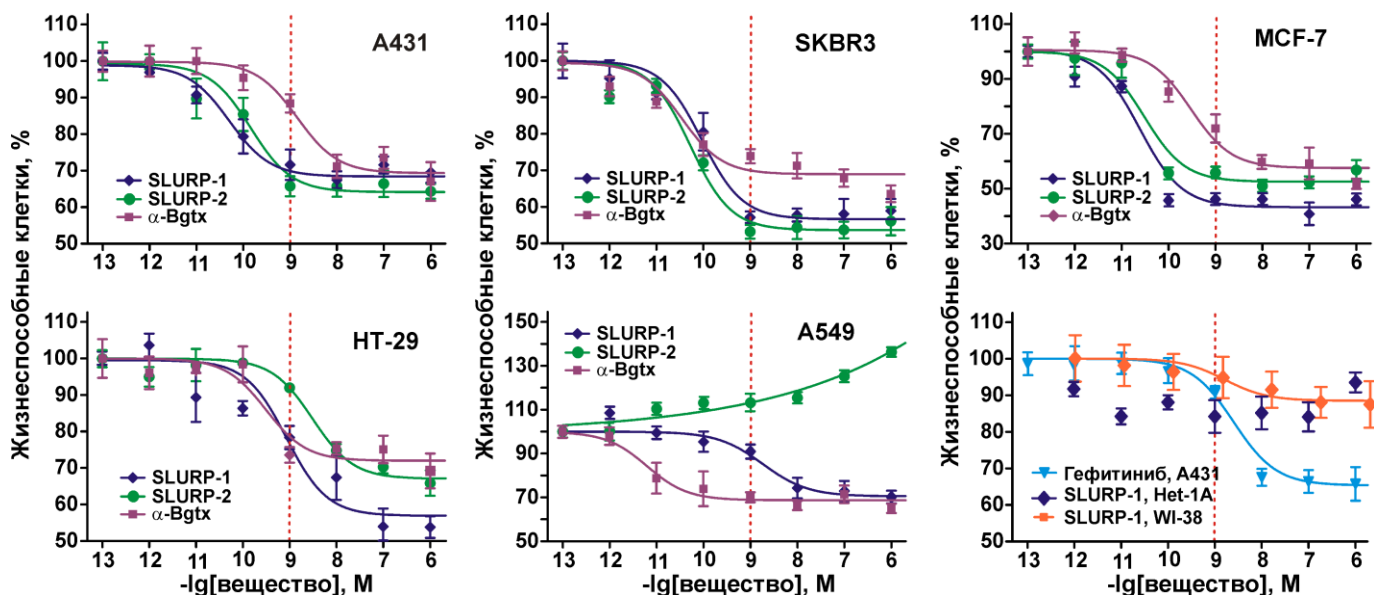


Рис. 32. Влияние rSLURP-1, rSLURP-2, α -Bgtx и гефитиниба на рост эпителиальных клеток при 24-часовой инкубации. Данные приведены как % от контроля (n=6).

$\alpha 7$ -nAChR – мишень действия rSLURP-1 в клетках эпителия

Методами проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-меченого α -Bgtx было показано, что все исследованные линии клеток экспрессируют на поверхности функциональные $\alpha 7$ -nAChR. Конфокальная микроскопия выявила солокализацию флуоресцентно-меченого rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR в раковых клетках. Нокдаун экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431 с помощью siRNA отменял антипролиферативные эффекты rSLURP-1 и α -Bgtx. При этом, активность белков восстанавливалась после дополнительной трансфекции клеток плазмидой, кодирующей ген $\alpha 7$ -nAChR дикого типа (Рис. 33Б).

В настоящее время ряд исследователей предполагают, что $\alpha 7$ -nAChR может передавать сигналы внутрь клетки по метаботропному пути, не связанному с током ионов через канал. Механизм передачи сигнала объясняют наличием G-белок связывающего сайта в цитоплазматическом домене рецептора (King et al., 2015). Для исследования роли этого механизма в клетки A431 после нокдауна $\alpha 7$ -nAChR вводили ген рецептора с заменой остатков G-белок связывающего сайта (345-348 а.о.) на последовательность, кодирующую Ala-Ala-Ala-Ala. В результате антипролиферативная активность α -Bgtx восстанавливалась, а активность rSLURP-1 – нет (Рис. 33Б). В дополнительных экспериментах было показано, что положительный аллостерический модулятор $\alpha 7$ -nAChR PNU120596, который ингибирует десенситизированное состояние рецептора, полностью отменяет антипролиферативный эффект rSLURP-1 на клетках линий A431, A549 и кератиноцитах Het-1A. Таким обра-

зом, в отличие от α -Bgtx взаимодействие rSLURP-1 с десенситизированным состоянием α 7-nAChR запускает внутриклеточные каскады по G-белок опосредованному метаболитному пути и, возможно, не связано с открытием канала рецептора.

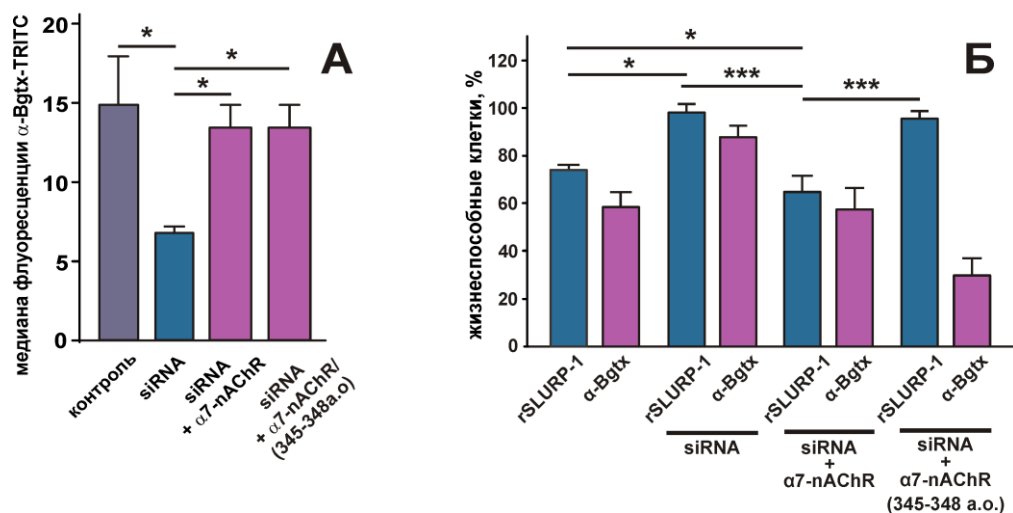


Рис. 33. Влияние нокдауна α 7-nAChR на экспрессию функционального α 7-nAChR (А) и антипролиферативную активность rSLURP-1 и α -Bgtx в клетках A431 (Б), n=4-6.

Антипролиферативный эффект rSLURP-1 связан с активацией IP_3 каскада

Активация nAChR может приводить к изменениям транскрипции генов (Schuller, et al., 2009) и секреции клетками различных факторов (Sfera et al., 2015). Сигнальные пути, задействованные в антипролиферативной активности rSLURP-1 на клетках A431, A549 и Het-1A, исследовали с помощью ингибиторного анализа. В дополнение к ингибиторам nAChR, mAChR, EGFR и β AR (см. выше) использовали ингибиторы ERbB2 (HER2) и GABA_A рецепторов (AG-825 и бикикуллин). Было обнаружено, что наряду с nAChR, антипролиферативный эффект на клетках A431 также связан с GABA_A рецепторами. На клетках A549 были задействованы nAChR, и, возможно, EGFR и β AR. Торможение роста нормальных кератиноцитов Het-1A было связано с активацией nAChR и β AR. Связь эффекта rSLURP-1 с nAChR во всех случаях подтверждает роль α 7-nAChR, как основной мишени белка, а активация других рецепторов, по-видимому, связана со вторичными ответами.

Внутриклеточные сигнальные каскады изучали с помощью селективных ингибиторов киназ: MEK/ERK (PD98059), JNK (SP600125), p38/MAPK (SB203580), PI3K (вортманнин), PKC (Go 6983), рецептора IP_3 (ксестоспонджин В), и факторов транскрипции: NF κ B (Bay 11-7082 и JSH-23), STAT3 (S3I-201) и STAT5 (285986-31-4). Результаты выявили отличия в механизме действия rSLURP-1 на разных линиях клеток. Так, в клетках A431 антипролиферативный эффект связан с киназами p38/MAPK, JNK, PI3K, PKC, а также с IP_3 рецепторами, и зависит от транскрипционного фактора STAT3, но не от NF κ B. Напротив, в клетках A549 эффект rSLURP-1 зависел только от PI3K киназы, IP_3 рецептора и фактора STAT3. В кератиноцитах Het-1A торможение роста клеток отменяли ингибиторы p38/MAPK, JNK и PKC киназ, IP_3 рецептора и NF κ B. Следует отметить, что ингибирование MEK/ERK киназ не влияло на эффект rSLURP-1 во всех протестированных линиях, что согласуется с результатами, полученными на PC12 клетках (см. выше). Передача сигналов по метаболитному пути включает активацию фосфолипазы C и рецепторов IP_3 . Таким образом, участие IP_3 рецепторов в действии rSLURP-1 на клетки эпителия согласуется с метаболитным механизмом.

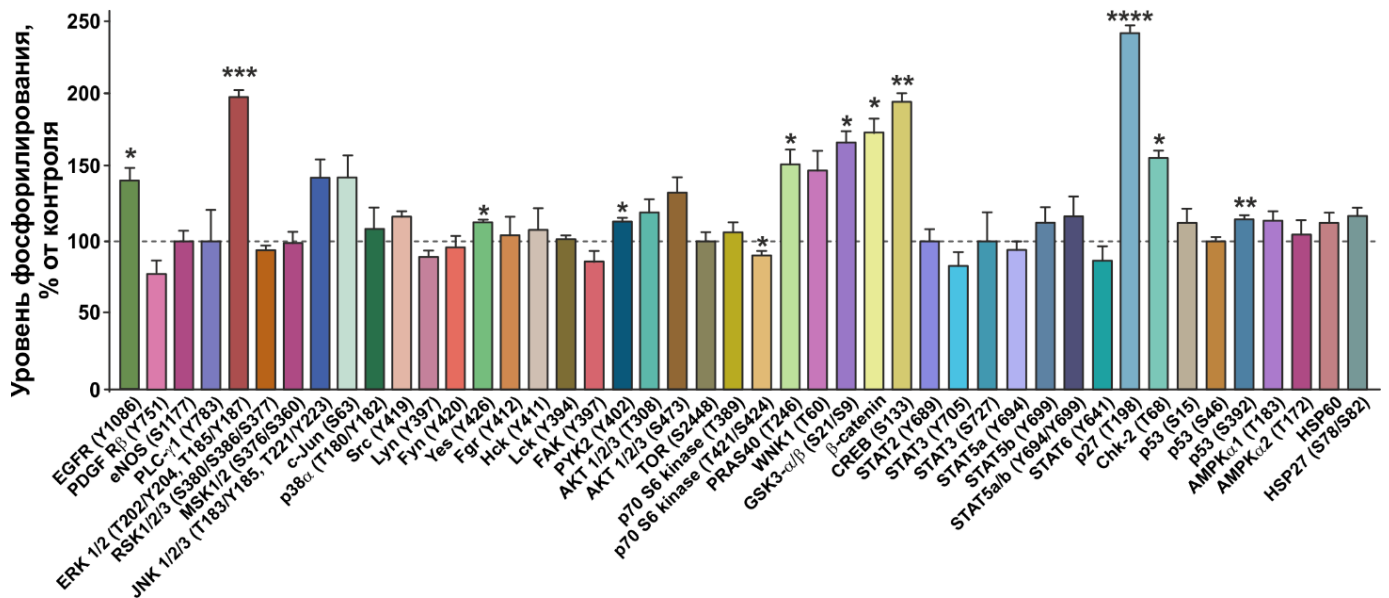


Рис. 34. Влияние 24-часовой инкубации с 1 мкМ rSLURP-1 на фосфорилирование внутриклеточных киназ и регуляторных белков в клетках A431 (n=4).

Изучение паттерна фосфорилирования 45 киназ и регуляторных белков при 24-часовой инкубации клеток A431 с 1 мкМ rSLURP-1 выявило увеличение фосфорилирования белков, задействованных в ERK (ERK1/2), Wnt (GSK3 α/β и β -катенин) и АКТ (медиатор PI3K/АКТ пути PRAS40) каскадах (Рис. 34). Так как ингибиторный анализ не подтвердил участие MEK/ERK в антипролиферативном эффекте rSLURP-1, можно предположить, что активация ERK происходит по MEK-независимому механизму (Simard et al., 2015). Активация этих каскадов, вероятно, приводит к наблюдаемому увеличению фосфорилирования белков, контролирующих транскрипцию генов и пролиферацию (Рис. 34). Так, ERK1/2 может опосредовать активацию фактора транскрипции CREB и увеличение фосфорилирования онкосупрессора p53 в стресс-индуцируемом сайте (Ser392). Это может говорить о запуске в клетках под действием rSLURP-1 стресса, связанного с повреждением ДНК, что косвенно подтверждается увеличением фосфорилирования киназы Chk-2. В свою очередь активация АКТ-сигнального пути может приводить к увеличению фосфорилирования регулятора клеточного цикла p27(Thr198) (ингибитор циклин-зависимой киназы), который считается онкосупрессором. Фосфорилирование p27 вызывает его протеасомную деградацию, что в свою очередь может приводить к остановке клеточной пролиферации. Под действием rSLURP-1 также наблюдалось увеличение фосфорилирования рецептора EGFR(Tyr1086). Так как конфокальная микроскопия не выявила солокализации rSLURP-1 с EGFR и ингибиторный анализ не подтвердил участие этого рецептора в действии rSLURP-1, можно предположить, что за активацию EGFR ответственен EGF, который секретируется клетками в ответ на аппликацию rSLURP-1.

rSLURP-1 уменьшает экспрессию $\alpha 7$ -nAChR и индуцирует секрецию эндогенного SLURP-1 в клетках A431

Инкубация с rSLURP-1 в течение 24 часов приводила к снижению уровня экспрессии функциональных $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеток A431 на ~ 25 % (Рис. 35Б). Кроме того, уровень эндогенного SLURP-1 значительно снижался (на ~ 30 %) уже после часовой инку-

бации клеток с rSLURP-1 (Рис. 35В). До обработки клеток препаратом rSLURP-1, эндогенный SLURP-1 преимущественно был локализован во внутриклеточных компартментах и частично на границе клеток, а после обработки, интенсивность окрашивания внутриклеточного SLURP-1 резко падала (Рис. 35А). Анализ культуральной среды показал значительное увеличение содержания SLURP-1 уже после часовой инкубации с 1 мкМ rSLURP-1 (Рис. 35Г). Обработка клеток А431 перед инкубацией с rSLURP-1 ингибитором экзоцитоза брефельдином А блокировала секрецию SLURP-1 (Рис. 35А,Г), что подтверждает предположение о том, что rSLURP-1 вызывает выход эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных компартментов во внеклеточную среду.

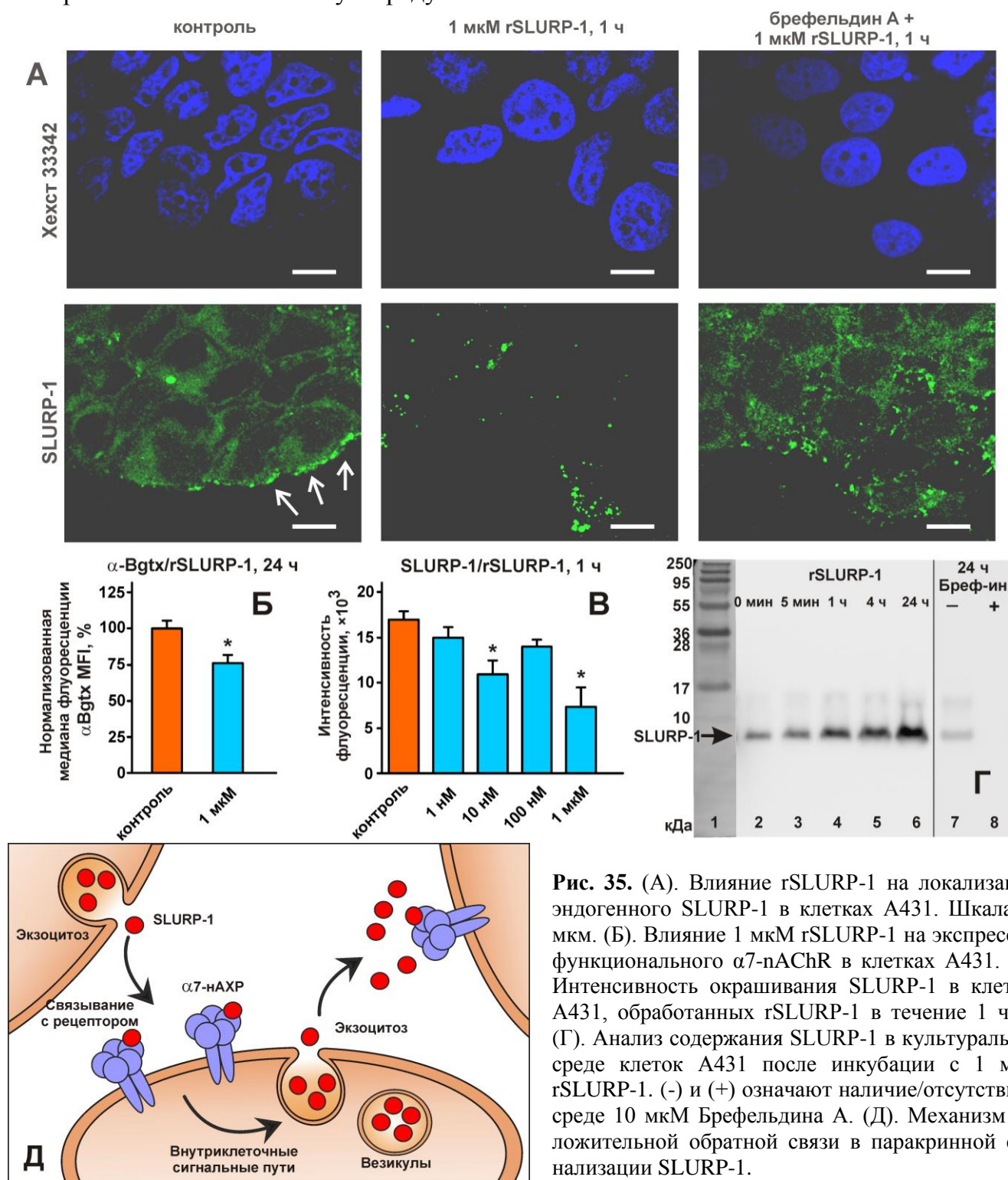


Рис. 35. (А). Влияние rSLURP-1 на локализацию эндогенного SLURP-1 в клетках А431. Шкала 20 мкм. (Б). Влияние 1 мкМ rSLURP-1 на экспрессию функционального α7-nAChR в клетках А431. (В). Интенсивность окрашивания SLURP-1 в клетках А431, обработанных rSLURP-1 в течение 1 часа. (Г). Анализ содержания SLURP-1 в культуральной среде клеток А431 после инкубации с 1 мкМ rSLURP-1. (-) и (+) означают наличие/отсутствие в среде 10 мкМ Брефельдина А. (Д). Механизм положительной обратной связи в паракринной сигнализации SLURP-1.

Полученные данные иллюстрируют механизм положительной обратной связи в паракриной сигнализации с участием белка SLURP-1. Повышение концентрации SLURP-1 во внеклеточной среде и его взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR стимулирует выброс эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных депо, что приводит к лавинообразному усилению сигнала и его передаче соседним клеткам (Рис. 35Д).

Экспрессия *Lynx1* и nAChR в не-нейрональных клетках человека

Помимо мозга, мРНК *Lynx1* была обнаружена в легких, почках и кератиноцитах. В клетках рака легкого наблюдалось снижение уровня *Lynx1* (Song et al., 2008), а нокаут гена *LYNX1* в клетках карциномы легкого A549 приводил к значительному увеличению роста раковых клеток (Fu et al., 2015). В диссертационной работе в эпителиальных клетках человека (Het-1A, A549, A431, HT-29, MCF-7, за исключением HEK-293T) обнаружен значительный уровень экспрессии генов различных субъединиц nAChR, а также *LYNX1*. Отсутствие экспрессии *LYNX1* в клетках HEK-293T не противоречит предыдущим данным об экспрессии этого гена во взрослой почке (Miwa et al., 1999). Вероятно, экспрессия *LYNX1* зависит от стадии развития организма и может увеличиваться в постнатальный период аналогично тому, как это наблюдалось для нейронов коры (Рис. 9В). Данные конфокальной микроскопии подтвердили экспрессию белка *Lynx1* и $\alpha 7$ -nAChR во всех исследуемых клетках, кроме HEK-293T (Рис. 36). На первичной культуре нейронов коры наблюдали солокализацию *Lynx1* и $\alpha 7$ -nAChR в соме, но не в дендритах. Практически полная солокализация *Lynx1* и $\alpha 7$ -nAChR наблюдалась в клетках Het-1A, A549 и HT-29, а в клетках MCF-7 и A431 *Lynx1* и $\alpha 7$ -nAChR имели разные распределения: точечные внутри клетки и на мембране, соответственно. Таким образом, в рамках работы белок *Lynx1* впервые обнаружен в кератиноцитах и клетках карцином кожи, толстой кишки и молочной железы.

Ws-*Lynx1* снижает жизнеспособность клеток рака легкого и подавляет рост клеток, вызванный никотином

При действии никотина на раковые клетки эпителия увеличивается экспрессия $\alpha 7$ -nAChR и усиливается их рост и миграция (Egleton et al., 2008). Напротив, эндогенный *Lynx1* подавляет индуцированное никотином повышение экспрессии $\alpha 7$ -nAChR, а увеличение экспрессии *Lynx1* в клетках карциномы легкого A549 уменьшает пролиферацию клеток (Fu et al., 2015). В диссертационной работе исследовали влияние рекомбинантного ws-*Lynx1* на клетки A549. Продолжительная 72-часовая инкубация клеток с белком приводила к выраженному уменьшению числа жизнеспособных клеток до ~ 65 % с EC₅₀ ~ 2 нМ (Рис. 37А). При 48-часовой инкубации наблюдался слабый эффект, а при 24-часовой инкубации эффект отсутствовал, что отличает ws-*Lynx1* от rSLURP-1 (Рис. 32). Вероятно, быстрое антипролиферативное действие rSLURP-1, наблюдаемое уже при 24 часах инкубации, связано с секрецией эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных депо. Напротив, эндогенный *Lynx1* заякорен в мембране, и его концентрация в среде не может увеличиваться. Инкубация клеток A549 в течение 72 часов с 10 нМ никотина повышала число жизнеспособных клеток до ~118 % (по сравнению с контролем), а аппликация 1 мкМ

ws-Lynx1 отменяла эффект никотина и уменьшала количество клеток до ~ 79 % (Рис. 37Б). Таким образом, ws-Lynx1 подавляет индуцированный никотином рост раковых клеток *in vitro*.

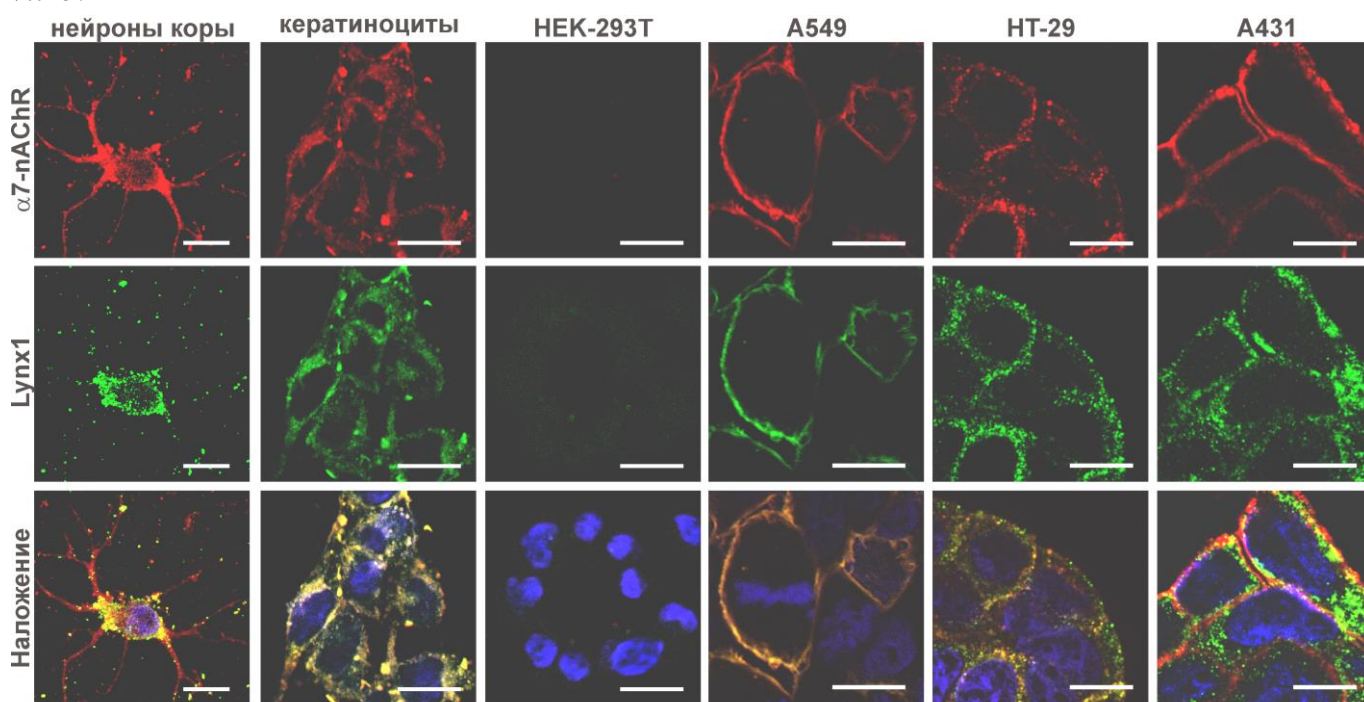


Рис. 36. Анализ локализации эндогенных Lynx1 и $\alpha 7$ -nAChR в различных клетках. Ядра клеток визуализированы с помощью Hoechst 33342 (синий). Шкала 10 мкм.

Отсроченное влияние ws-Lynx1 на число жизнеспособных клеток может быть следствием многоэтапного ответа, включающего первичные (изменение под действием ws-Lynx1 экспрессии ауто-паракринных регуляторов, таких как SLURP, факторы роста, цитокины и т.д.) и вторичные (активация этими регуляторами внутриклеточных сигнальных каскадов, контролирующих рост и пролиферацию клеток) эффекты.

Ws-Lynx1 контролирует рост клеток A549, модулируя $\alpha 7$ -nAChR, активацию сигнального пути PKC/IP₃ и других сигнальных каскадов

Для изучения механизма, лежащего в основе влияния ws-Lynx1 на рост клеток A549, использовали панель ингибиторов мембранных рецепторов (Рис. 37Б). Только преинкубация клеток с Мес или MLA (селективный ингибитор $\alpha 7$ -nAChR) отменяла эффект ws-Lynx1, восстанавливая число жизнеспособных клеток до контрольного уровня. Блокирование экспрессии $\alpha 7$ -nAChR с помощью siRNA значительно снижало уровень функционального $\alpha 7$ -nAChR на мембране клеток и отменяло эффект ws-Lynx1 (Рис. 38А,Б). При этом, мутант ws-Lynx1(R38A) и α -нейротоксин NTII, не активные по отношению к $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 2 и 13), не снижали рост клеток (Рис. 38Б). Таким образом, эффект ws-Lynx1 на клетках A549 опосредован взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR.

Сигнальные пути, участвующие в действии ws-Lynx1 на клетки A549, исследовали с помощью селективных ингибиторов и анализа фосфорилирования сигнальных молекул (Рис. 37В и 39). Все ингибиторы (кроме ингибитора STAT3) значительно снижали влияние ws-Lynx1 на рост клеток. Отмена эффекта ингибиторами IP₃, PKC и MEK/ERK указывает на PLC-зависимую передачу сигнала. Вовлечение MEK/ERK пути в действие ws-Lynx1

подтверждалось значительным увеличением фосфорилирования ERK1/2 (Рис. 39). Этот каскад, вероятно, активирует фактор транскрипции NFκB, ингибирование которого блокировало эффект ws-Lynx1 (Рис. 37В). Зависимость эффекта ws-Lynx1 от JNK, p38/MAPK и PI3K указывает на возможное вовлечение и других сигнальных путей. Важно отметить, что в отличие от других типов клеток, где ERK и JNK рассматриваются как проонкогенные киназы, активация сигнальных путей MEK/ERK (Wang et al., 2000), JNK и p38/MAPK (Min et al., 2015) в клетках A549 необходима для запуска цитостатических или апоптотических эффектов.

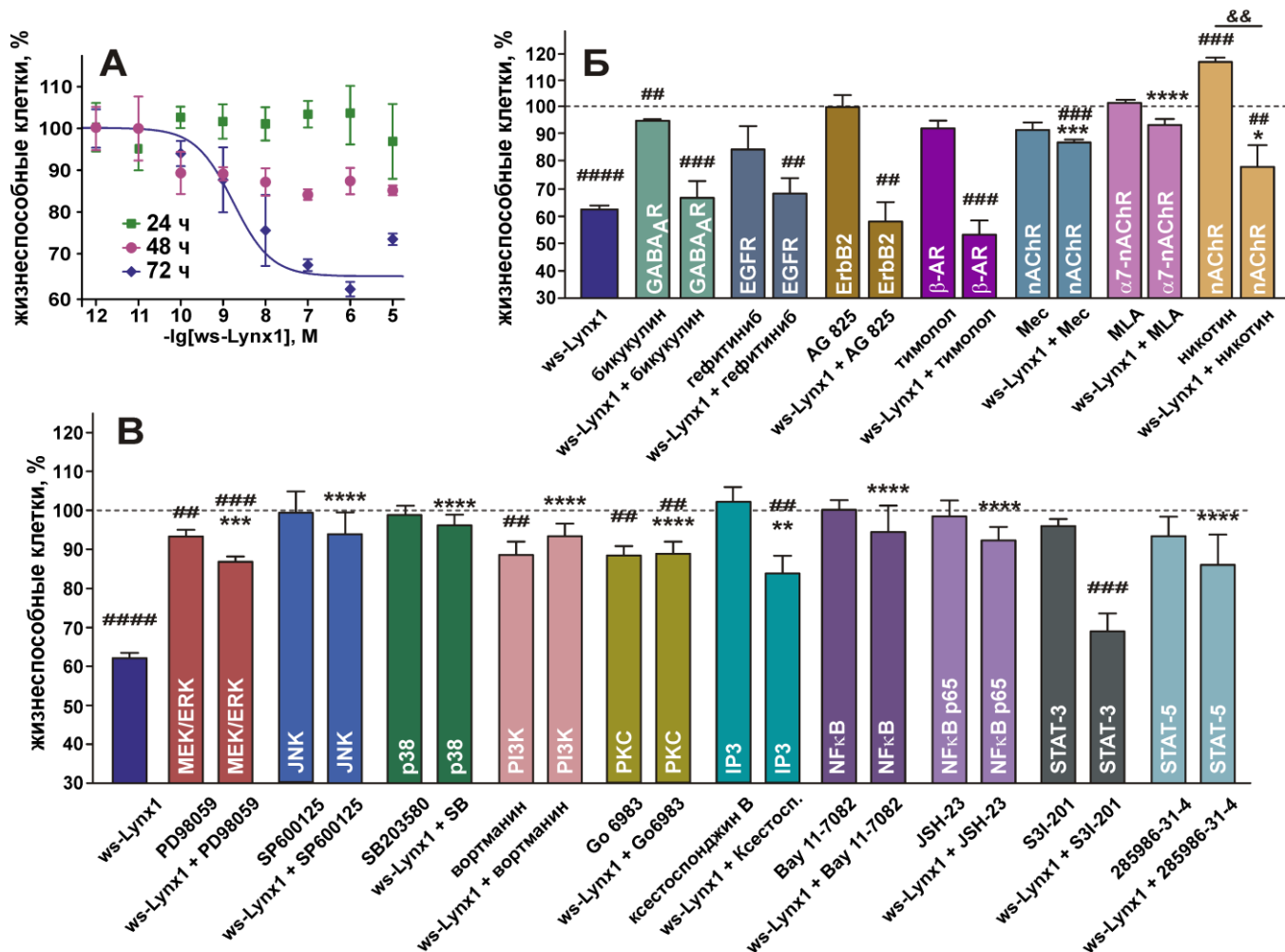
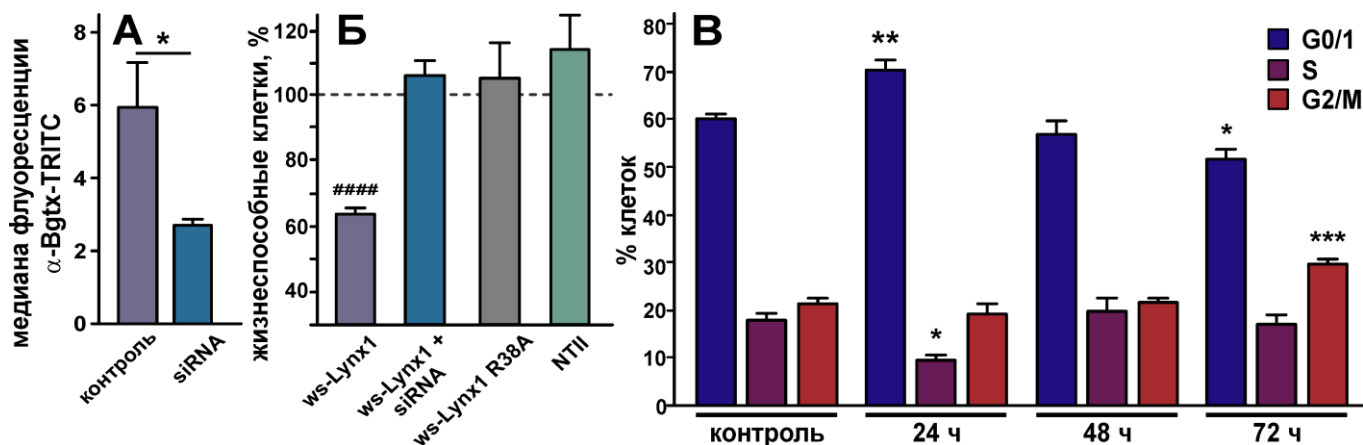


Рис. 37. (А). Влияние ws-Lynx1 на рост клеток A549 при 24-, 48- и 72-часовой инкубации, n=4-10. (Б,В). Влияние 1 мкМ ws-Lynx1, ингибиторов различных рецепторов и внутриклеточных сигнальных каскадов и никотина на рост клеток A549 (72 ч, n=4-8). Знаки # и * указывают на отличия от контроля (100 %) и между группами «ws-Lynx1» и «ws-Lynx1+агонист/ингибитор».

Длительная инкубация клеток с ws-Lynx1 может приводить к вторичным ответам, связанным с активацией различных рецепторов (факторы роста, интегрины, GPCR, T-клеточные рецепторы и т. д). Внутриклеточные каскады, запускаемые этими рецепторами, опосредованы киназами семейства Src. Действительно, наблюдалось значительное увеличение фосфорилирования рецептора фактора роста тромбоцитов β (PDGFRβ) и изменение уровня фосфорилирования Src киназ (Src, Fgr, Hck, Lyn, Fyn, FAK, Lck и Yes, Рис. 39), участвующих в контроле клеточного роста, пролиферации и адгезии.

Рецепторы факторов роста могут быть ответственны за наблюдаемые изменения в фосфорилировании АКТ. Этот сигнальный каскад, возможно, опосредован PI3 киназой,

ингибирование которой снижает эффект ws-Lynx1 (Рис. 37В). Активация АКТ, вероятно, приводит к наблюдаемому увеличению фосфорилирования опухолевого супрессора p27 (Рис. 39), что может вести к уменьшению пролиферации и вызывать апоптоз в клетках A549 (Ishii et al., 2004). Наблюдаемое снижение фосфорилирования участников сигнального пути Wnt (GSK3- α/β и β -катенина) указывает на отсутствие вовлечения этого каскада в действие ws-Lynx1. Однако, подавление GSK3- α/β может быть также связано с активацией АКТ (Рис. 40).



В согласии с результатами ингибиторного анализа, под действием ws-Lynx1 наблюдалось значительное усиление фосфорилирования факторов транскрипции STAT5a и STAT6, но не STAT3 (Рис. 37В и 39). Хотя STAT5 может быть активирован Src-киназами напрямую, одновременная активация нескольких факторов STAT, вероятно, связана с активацией цитокиновых рецепторов и нижестоящих JAK-киназ (Рис. 40). Этот сигнальный путь, приводящий к фосфорилированию STAT6, может снижать уровень COX2 и повышать чувствительность клеток A549 к апоптозу.

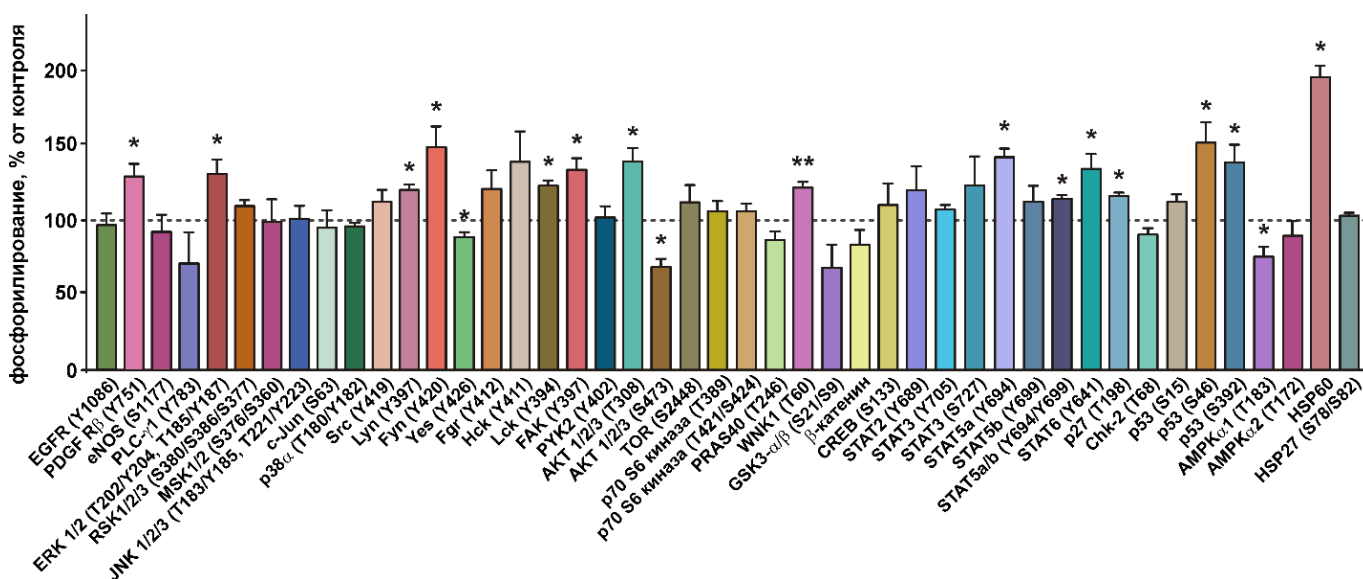


Рис. 39. Влияние 72-часовой инкубации клеток A549 с 1 мкМ ws-Lynx1 на фосфорилирование внутриклеточных киназ и регуляторных белков в, n=4.

Ws-Lynx1 вызывает арест клеточного цикла и апоптоз в клетках A549

Анализ методом проточной цитометрии показал, что 24-часовая инкубация клеток A549 с ws-Lynx1 приводит к значительному увеличению количества клеток в фазе клеточного цикла G0/1, в то время как количество клеток в S-фазе значительно уменьшается. Наоборот, после 48-часовой инкубации каких-либо различий в доле клеток в каждой фазе клеточного цикла не наблюдалось по сравнению с контролем, а 72-часовая инкубация приводила к увеличению числа клеток в фазе G2/M и уменьшению популяции клеток в фазе G0/1 (Рис. 38B). Наблюдаемые различия подтверждают наличие двухэтапного клеточного ответа на аппликацию ws-Lynx1.

Инкубация клеток A549 с ws-Lynx1 в течение 72 часов существенно увеличивала фосфорилирование онкосупрессора p53, ответственного за индукцию апоптоза (Рис. 39). О запуске апоптотической передачи сигналов в клетках также говорило увеличение фосфорилирования белка теплового шока HSP60. HSP60 инициирует события, предшествующие вызванной цитохромом С активации апоптосомы, и участвует в активации каспазы-3 (Chandra et al., 2007). Кроме того, наблюдалось снижение фосфорилирования другого партнера p53 – киназы AMPK α 1, ответственной за контроль пролиферации клеток (Рис. 39). Для подтверждения запуска апоптоза с помощью конъюгата аннексина V-PE исследовали выход раннего маркера апоптоза фосфатидилсерина на поверхность клеточной мембраны. Инкубация с 1 мкМ ws-Lynx1 значительно увеличивала долю клеток A549, содержащих фосфатидилсерин на поверхности (с ~ 5 % до ~ 37 %). Таким образом, ws-Lynx1 замедляет рост клеток A549, индуцируя апоптоз и подавляя пролиферацию через остановку клеточного цикла. Предложенный двухстадийный механизм действия ws-Lynx1 на клетки A549 показан на Рис. 40.

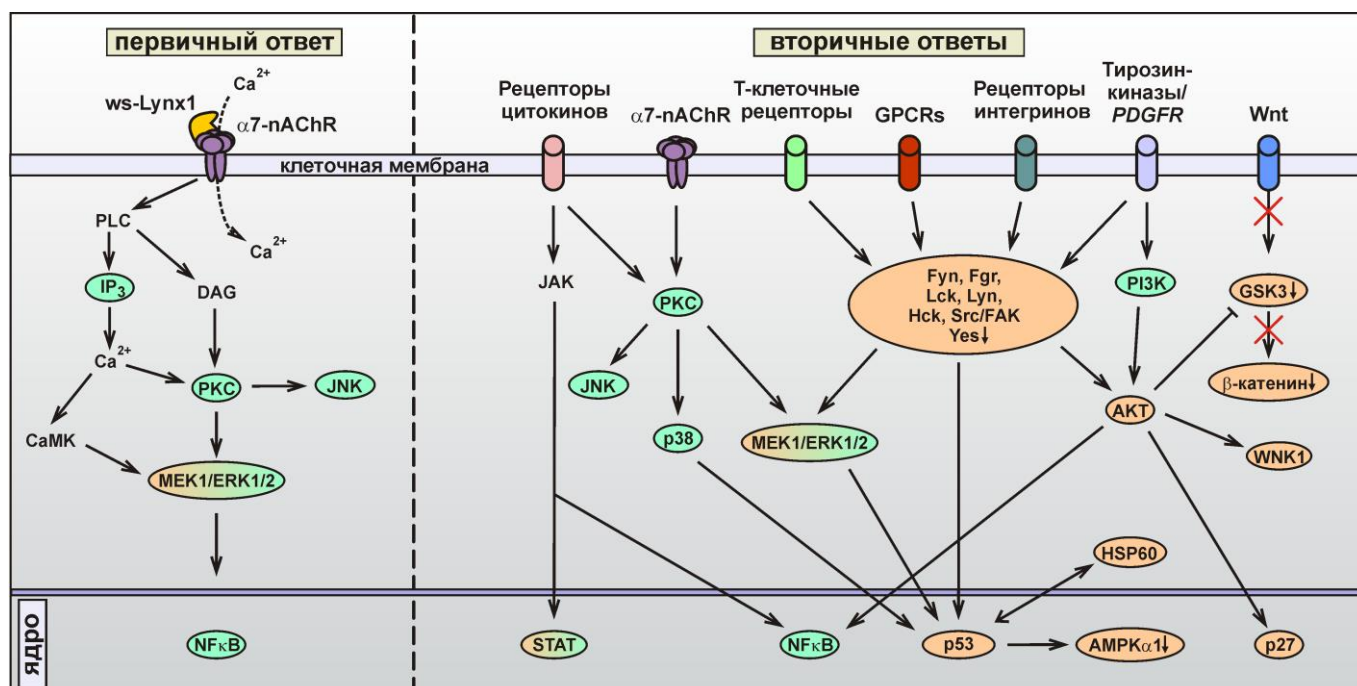


Рис. 40. Предполагаемый двухстадийный механизм действия ws-Lynx1 в клетках A549. Белки, окрашенные в зеленый цвет, обнаружены с помощью ингибиторного анализа, а белки, окрашенные в оранжевый цвет - с помощью анализа фосфорилирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгое время единственной известной функцией nAChR было участие в нейромускульной передаче. Позднее nAChR были обнаружены в ЦНС млекопитающих, и установлена их важная роль в процессах, связанных с когнитивной функцией. В последнее время стало очевидно, что развитие некоторых онкологических заболеваний связано с передачей сигналов через nAChR, которые широко представлены в эпителиальных клетках и клетках иммунной системы.

Трехпетельные нейротоксины змей являются высокоспецифичными ингибиторами nAChR, и поэтому они широко используются в качестве инструментов для изучения этих рецепторов. Полученные в диссертационной работе результаты показали важное значение аминокислотных остатков, расположенных в петлевых участках токсинов змей для взаимодействия с рецепторами-мишенями. Было подтверждено, что именно центральная петля токсинов является основным структурным элементом, отвечающим за взаимодействие с nAChR, mAChR и GABA_A рецепторами.

Свойства мембранного окружения влияют на функционирование мембранных рецепторов. В работе показано, что мембранное окружение nAChR также может играть определенную роль при взаимодействии с токсинами и способствовать формированию их преимущественной ориентации на мембране для последующего взаимодействия с лиганд-связывающим сайтом рецептора.

Недавние исследования показали, что многие рецепторы ЦНС имеют ассоциированные регуляторные белки, экспрессируемые в специфических нейронах (Maher et al., 2017). Некоторые из этих регуляторных белков относятся к семейству Lуб/uPAR и имеют трехпетельную структуру. Многие Lуб/uPAR белки закреплены на мембране вблизи соответствующих рецепторов, однако, в литературе описано и высвобождение водорастворимых форм этих белков с помощью специальных протеаз и фосфолипаз (Montuori, Ragno, 2009). В диссертационной работе в спинномозговой жидкости была обнаружена растворимая форма нейромодулятора Lynx1. Так как структурно-функциональные исследования GPI-заякоренных белков значительно затруднены, в качестве моделей для изучения регуляторных белков из мозга человека Lynx1 и Lурd6 в работе были использованы их водорастворимые домены без GPI-якоря. Это позволило получить ряд новых данных об их свойствах и значительно продвинуться в понимании роли этих белков в функционировании мозга.

В диссертационной работе впервые охарактеризованы ранее не описанные мишени Lynx1 и Lурd6. Показано положительное аллостерическое модулирующее действие Lynx1 на $\alpha 7$ -nAChR. Для Lурd6 впервые охарактеризовано взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR и показано наличие ингибирующей активности. Впервые продемонстрирована модулирующая активность обоих белков по отношению к $\alpha 7$ -nAChR в срезах мозга, что вместе с данными по влиянию на ДВП позволяет предположить участие Lynx1 и Lурd6 в процессах формирования памяти и обучения. Возможно, Lynx1 и Lурd6, солокализованные с $\alpha 7$ -nAChR на мембране нейронов, представляют собой пару положительного и отрицательного модуляторов, необходимых для тонкой настройки холинергической передачи сигналов. Впервые показано, что ws-Lynx1 конкурирует с β -

амилоидным пептидом(1-42) за связывание с $\alpha 7$ -nAChR. Исследование *in vivo* показало, что ws-Lynx1 может компенсировать нарушения обучения и памяти, связанные с недостатком холинергической активности у мышей дикого типа и моделирующих болезнь Альцгеймера, а также положительно модулировать синаптическую пластичность и восстанавливать снижение синаптической плотности.

Впервые с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения показано, что Lynx1 и Lypd6 имеют трехпетельную структуру, характерную для α -нейротоксинов яда змей. В то же время обнаружено значительное отличие между структурами Lynx1, Lypd6 и α -нейротоксинов, которое заключается в повышенной подвижности петлевых участков нейромодуляторов. Эта конформационная пластичность, возможно, позволяет нейромодуляторам взаимодействовать с несколькими мишенями, относящимися к различным структурным классам (nAChR и mAChR в случае Lynx1, nAChR и LRP6 в случае Lypd6). Высокая конформационная пластичность петлевых участков была также обнаружена в молекуле «необычного» токсина WTX и секретируемого белка человека SLURP-2, которые взаимодействуют как с nAChR, так и с mAChR, а также в молекуле секретируемого белка человека SLURP-1, для которого показана способность регулировать ионотропный и метаболитропный пути передачи сигнала через $\alpha 7$ -nAChR, по-видимому, в результате взаимодействия с разными сайтами на поверхности рецептора.

На основании данных компьютерного моделирования сделаны предположения об участках молекул Lynx1 и Lypd6, формирующих сайты взаимодействия с $\alpha 7$ -nAChR. В случае Lynx1 предложенная модель подтверждена данными сайт-направленного мутагенеза и синтезом пептидного фрагмента, сохраняющего активность нейромодулятора. Принимая во внимание, что эффекты ws-Lynx1 становятся очевидными уже после 2-3 недель приема, этот белок, а также фрагмент его центральной петли являются многообещающими кандидатами для разработки новых препаратов для терапии когнитивных нарушений при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера.

Клетки эпителия экспрессируют различные подтипы ацетилхолиновых рецепторов, и репертуар рецепторов зависит от стадии клеточного развития. Нарушение экспрессии тех или иных рецепторов приводит к различным кожным заболеваниям, а также наблюдается при некоторых онкологических заболеваниях. В диссертационной работе впервые исследованы фармакологические свойства и структура трехпетельных белков человека SLURP-1 и SLURP-2, секретируемых клетками эпителия. Показано, что rSLURP-1 селективно взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR, а rSLURP-2 способен взаимодействовать с несколькими типами nAChR и mAChR. При этом, rSLURP-1 ингибирует пролиферацию эпителиальных клеток, а rSLURP-2 может ингибировать или стимулировать рост клеток, в зависимости от репертуара рецепторов, представленных в клетке. Кроме того, показано, что rSLURP-2 стимулирует миграцию кератиноцитов. Возможно, SLURP-2 является универсальным регулятором, участвующим в контроле гомеостаза эпителия на разных стадиях клеточного развития.

В диссертационной работе впервые показано, что SLURP-1 и SLURP-2 могут контролировать рост клеток карцином. Охарактеризованы сигнальные каскады, запускаемые SLURP-1 в раковых и нормальных клетках. Показано, что взаимодействие

rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR запускает внутриклеточные каскады по метаботропному механизму, вероятно, не связанному с током ионов через канал рецептора. Кроме того, впервые описан механизм положительной обратной связи, лежащий в основе ауто-паракринной сигнализации между клетками эпителия с помощью SLURP-1. Действие SLURP-1 на клетки стимулирует быстрое высвобождение эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных депо, что значительно увеличивает концентрацию белка в межклеточном пространстве и позволяет передавать сигнал соседним клеткам. Высокая антипролиферативная активность rSLURP-1, наблюдаемая на опухолевых клетках, и существенно более низкая активность на нормальных клетках, указывает на перспективы использования этого белка в качестве прототипа для разработки новых противоопухолевых препаратов.

Впервые Lynx1 был обнаружен в мозге, однако позже его экспрессия на уровне белка была обнаружена также в здоровой и трансформированной легочной ткани. В диссертационной работе впервые показано, что Lynx1 широко представлен в различных клетках эпителия. Ws-Lynx1 ингибирует рост клеток аденокарциномы легкого линии A549, отменяет никотин-индуцированную стимуляцию роста опухолевых клеток и вызывает их апоптоз. Все эти эффекты, так же как и в случае rSLURP-1, опосредованы начальным взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR. Изучение сигнальных каскадов, запускаемых ws-Lynx1 в клетках карциномы, позволило предложить двухстадийную модель действия белка.

Таким образом, в работе получены новые фундаментальные знания о функционировании трехпетельных нейротоксинов змей и трехпетельных белков человека, и показаны перспективы последних для разработки на их основе препаратов, нацеленных на лечение онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, результаты диссертационной работы указывают на возможность создания новых пептидных молекул, селективно действующих на отдельные подтипы nAChR и mAChR в качестве аллостерических модуляторов.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждена важная роль центральной петли нейротоксинов змей во взаимодействии с рецепторами-мишенями (nAChR, mAChR, GABA_A-R).
2. Охарактеризовано взаимодействие нейротоксина II из *N. oxiana* и токсина WTX из *N. kaothia* с модельными мембранами. Предложена модель, описывающая участие мембранного окружения nAChR во взаимодействии токсин-рецептор.
3. Определены молекулярные мишени (различные подтипы nAChR и mAChR) и пространственная структура водорастворимого домена нейромодулятора человека Lynx1. Показано, что функционально важные остатки локализованы в центральной петле белка.
4. Показано, что Lynx1 конкурирует с β -амилоидным пептидом(1-42) за связывание с nAChR, способен потенцировать $\alpha 7$ -nAChR и компенсировать нарушения синаптической пластичности *ex vivo*, а также нарушения холинергической системы *in vivo*.

in vivo. На модели болезни Альцгеймера показана перспективность препарата Lynx1 для компенсации нарушений когнитивной функции.

5. Определена новая молекулярная мишень ($\alpha 7$ -nAChR) и пространственная структура водорастворимого домена нейромодулятора человека Lypd6. Показано, что Lypd6 ингибирует $\alpha 7$ -nAChR и снижает синаптическую пластичность *ex vivo*. Высказана гипотеза о том, что пара белков Lynx1 и Lypd6 отвечает за тонкую регуляцию холинергической системы мозга.
6. Впервые охарактеризовано действие секретируемого белка эпителия человека SLURP-1 на $\alpha 7$ -nAChR и определена его пространственная структура и динамика в растворе. Полученные данные указывают на то, что при взаимодействии SLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR в эпителиальных клетках происходит активация внутриклеточных сигнальных каскадов по метаболитному механизму.
7. Определены молекулярные мишени (различные подтипы nAChR и mAChR), пространственная структура и динамика секретируемого белка эпителия человека SLURP-2. Показано, что в зависимости от рецепторного репертуара белок может ингибировать или стимулировать пролиферацию и миграцию эпителиальных клеток.
8. Впервые показана перспективность препаратов SLURP-1, SLURP-2 и Lynx1 для контроля роста эпителиальных опухолевых клеток *in vitro*. Детализированы механизмы, лежащие в основе противоопухолевой активности белков.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в иностранных рецензируемых журналах:

1. M.L. Bychkov, Z.O. Shenkarev, M.A. Shulepko, O.V. Shlepova, M.P. Kirpichnikov, **E.N. Lyukmanova**. Water-soluble variant of human Lynx1 induces cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells via modulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *PLOS ONE*, (2019), 14(5):e0217339.
2. **E.N. Lyukmanova**, M.L. Bychkov, G.V. Sharonov, A.V. Efremenko, M.A. Shulepko, D.S. Kulbatskii, Z.O. Shenkarev, A.V. Feofanov, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Human secreted proteins SLURP-1 and SLURP-2 control the growth of epithelial cancer cells via interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* (2018), 175(11):1973-1986.
3. P.V. Dubovskii, M.A. Dubinnyi, A.G. Konshina, E.D. Kazakova, G.M. Sorokoumova, T.M. Pyasova, M.A. Shulepko, R.V. Chertkova, **E.N. Lyukmanova**, D.A. Dolgikh, A.S. Arseniev, R.G. Efremov. Structural and dynamic "portraits" of recombinant and native cytotoxin I from *Naja oxiana*: How Close Are They? *Biochemistry*. (2017), 56(34):4468-4477.
4. M.A. Shulepko, **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, P.V. Dubovskii, M.V. Astapova, A.V. Feofanov, A.S. Arseniev, Y.N. Utkin, M.P. Kirpichnikov, D.A. Dolgikh. Towards universal approach for bacterial production of three-finger Ly6/uPAR proteins: case study of Cytotoxin I from cobra *N. oxiana*. *Prot. Exp. Purif.* (2017), 130:13-20.
5. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, M.L. Bychkov, Z.O. Shenkarev, A.S. Paramonov, A.O. Chugunov, D.S. Kulbatskii, M. Avarinidi, Stefany, V. Dolezal, A.S. Arseniev, R.G. Efremov, M.S. Thomsen, D. Bertrand, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Secreted isoform of human Lynx1 (SLURP-2): spatial structure and pharmacology of interactions with different types of acetylcholine receptors. *Scientific Reports*. (2016), 6:30698.
6. M.S. Thomsen, M. Arvaniti, M.M. Jensen, M.A. Shulepko, D.A. Dolgikh, L.H. Pinborg, W.

- Härtig, **E.N. Lyukmanova**, J.D. Mikkelsen. Lynx1 and A β 1-42 bind competitively to multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes, *Neurobiology of Aging* (2016), 46:13-21.
7. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, Z.O. Shenkarev, I.E. Kasheverov, A.O. Chugunov, D.S. Kulbatskii, M.Y. Myshkin, Y.N. Utkin, R.G. Efremov, V.I. Tsetlin, A.S. Arseniev, M.P. Kirpichnikov, D.A. Dolgikh. Central loop of non-conventional toxin WTX from *Naja kaouthia* is important for interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*. (2016), 119:274-279.
 8. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, D. Kudryavtsev, M.L. Bychkov, D.S. Kulbatskii, I.E. Kasheverov, M.V. Astapova, A.V. Feofanov, M.S. Thomsen, J.D. Mikkelsen, Z.O. Shenkarev, V.I. Tsetlin, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Human secreted Ly-6/uPAR related protein-1 (SLURP-1) is a selective allosteric antagonist of α 7 nicotinic acetylcholine receptor. *PLOS ONE*. (2016), 11(2):e0149733.
 9. **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, M.A. Shulepko, A.S. Paramonov, A.O. Chugunov, H. Janickova, E. Dolejsi, V. Dolezal, Y.N. Utkin, V.I. Tsetlin, A.S. Arseniev, R.G. Efremov, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Structural insight into specificity of interactions between non-conventional three-Finger toxin WTX and muscarinic acetylcholine receptors. (2015), *J. Biol. Chem.* (2015), 290(39):23616–23630.
 10. D.S. Kudryavtsev, I.V. Shelukhina, L.V. Son, L.O. Ojomoko, E.V. Kryukova, **E.N. Lyukmanova**, M.N. Zhmak, D.A. Dolgikh, I.A. Ivanov, I.E. Kasheverov, V.G. Starkov, J. Ramerstorfer, W. Sieghart, V.I. Tsetlin, Y.N. Utkin. Neurotoxins from snake venoms and α -conotoxin ImI inhibit functionally active ionotropic GABA receptors. *J. Biol. Chem.*, (2015), 290(37): 22747-22758.
 11. M.S. Thomsen, B. Cinar, M.M. Jensen, **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, V. Tsetlin, A.B. Klein, J.D. Mikkelsen. Expression of the Ly-6 family proteins Lynx1 and Ly6H in the rat brain is compartmentalized, cell-type specific, and developmentally regulated. *Brain Struct. Funct.* (2014), 219(6):1923-1934.
 12. **E.N. Lyukmanova**, M.A. Shulepko, S.L. Buldakova, I.E. Kasheverov, Z.O. Shenkarev, R.V. Reshetnikov, S.Y. Filkin, D.S. Kudryavtsev, L.O. Ojomoko, E.V. Kryukova, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov, P.D. Bregestovski, V.I. Tsetlin. Ws-LYNX1 residues important for interaction with muscle-type and/or neuronal nicotinic receptors. *J. Biol. Chem.* (2013), 288(22):15888-15899.
 13. **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, M.A. Shulepko, K.S. Mineev, D. D'Hoedt, I.E. Kasheverov, S. Filkin, H. Janickova, V. Dolezal, D.A. Dolgikh, A.S. Arseniev, D. Bertrand, V.I. Tsetlin, M.P. Kirpichnikov. NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human lynx1. *J. Biol. Chem.* (2011), 286:10618-10627.
 14. L. Krabben, B.J. van Rossum, S. Jehle, E. Bocharov, **E.N. Lyukmanova**, A.A. Schulga, A. Arseniev, F. Hucho, H. Oschkinat. Loop 3 of short neurotoxin II is an additional interaction site with membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor as detected by solid-state NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, (2009), 390(4):662-671.
 15. D. Lesovoy, E. Bocharov, **E. Lyukmanova**, Yu. Kosinsky, M. Shulepko, D. Dolgikh, M. Kirpichnikov, R. Efremov, A. Arseniev. Specific membrane binding of neurotoxin II can facilitate its delivery to acetylcholine receptor. *Biophys. J.*, (2009), 97:2089-2097.
 16. **E.N. Lyukmanova**, Z.O. Shenkarev, A.A. Schulga, Y.S. Ermolyuk, D.Y. Mordvintsev, Y.N. Utkin, M.A. Shulepko, R.C. Hogg, D. Bertrand, D.A. Dolgikh, V.I. Tsetlin, M.P. Kirpichnikov. Bacterial expression, NMR, and electrophysiology analysis of chimeric short/long-chain alpha-neurotoxins acting on neuronal nicotinic receptors. *J. Biol. Chem.* (2007), 282:24784-24791.
 17. E.V. Bocharov, **E.N. Lyukmanova**, Ya.S. Ermolyuk, A.A. Shulga, K.A. Pluzhnikov, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov, A.S. Arseniev. Resonance assignment of ¹³C-¹⁵N-labeled snake neurotoxin II from *Naja oxiana*. *Appl. Magn. Reson.* (2003), 24:247-254.

Статьи в российских рецензируемых журналах:

18. М.А. Шулепко, Д.С. Кульбацкий, М.Л. Бычков, **Е.Н. Люкманова**. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы человека. Часть II: Не-нейрональная холинергическая система (обзорная статья). *Биоорг. химия*, (2019), 45(3):227-237.
19. Д.С. Кульбацкий, М.Л. Бычков, **Е.Н. Люкманова**. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы человека. Часть I: Строение, функция и роль в нейромышечной передаче и работе ЦНС (обзорная статья). *Биоорг. химия*, (2018), 44(6):595–607.
20. М.Л. Бычков, Н.А. Васильева, М.А. Шулепко, П.М. Балабан, М.П. Кирпичников, **Е.Н. Люкманова**. Lypx1 предотвращает нарушение долговременной потенциации и экспрессии нейромодулятора, вызванные Aβ1-42 и активацией JNK. *Acta Naturae*. (2018), 3(38):25-30.
21. Н.А. Васильева, Е.В. Локтюшов, М.Л. Бычков, З.О. Шенкарев, **Е.Н. Люкманова**. Трехпетельные белки семейства Lуб/uPAR: функциональное многообразие в рамках одного структурного мотива (обзорная статья). *Успехи биол. химии*. (2017), 57:303-330.
22. А.С. Парамонов, Д.С. Кульбацкий, Е.В. Локтюшов, А.В. Царев, Д.А. Долгих, З.О. Шенкарев, М.П. Кирпичников, **Е.Н. Люкманова**. Рекомбинантная продукция и исследование структуры белков человека Lypd6 и Lypd6b, *Биоорг. химия*, (2017), 43(6):620-630.
23. Г. Фауре, И.В. Шелухина, Д. Поровинска, М.А. Шулепко, **Е.Н. Люкманова**, Д.А. Долгих, Е.Н. Спирова, И.Е. Кашеверов, Ю.Н. Уткин, П.-Ж. Корринжер, В.И. Цетлин. Взаимодействие трехпетельных белков из яда змей и из мозга млекопитающих с CYS-петельными рецепторами и их моделями. *Доклады Академии Наук*, (2016), 468 (2):84-87.
24. **Е.Н. Люкманова**, М.А. Шулепко, М.Л. Бычков, З.О. Шенкарев, А.С. Парамонов, А.О. Чугунов, А.С. Арсеньев, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников. Белки человека SLURP-1 и SLURP-2, действующие на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, замедляют пролиферацию клеток колоректальной аденокарциномы HT-29. *Acta Naturae*, (2014), 6(4):58-65.
25. З.О. Шенкарев, **Е.Н. Люкманова**, А.С. Парамонов, С. Баландин, М.А. Шулепко, К.С. Минеев, Т.В. Овчинникова, М.П. Кирпичников, А.С. Арсеньев. Липид-белковые нанодиски: новые возможности для структурно-функциональных исследований водорастворимых мембраноактивных пептидов. *Acta Naturae*, (2014), 6(2):68-78.
26. М.А. Шулепко, **Е.Н. Люкманова**, А.С. Парамонов, А.А. Лобас, З.О. Шенкарев, И.Е. Кашеверов, В.И. Цетлин, Д.А. Долгих, А.С. Арсеньев, М.П. Кирпичников. Нейромодулятор SLURP-1 человека: бактериальная продукция, взаимодействие с мышечным никотиновым ацетилхолиновым рецептором, структура и конформационная гетерогенность в растворе. *Биохимия*, (2013), 78(2):276-285.
27. М.А. Шулепко, **Е.Н. Люкманова**, И.Е. Кашеверов, Д.А. Долгих, В.И. Цетлин, М.П. Кирпичников. «Бактериальная продукция водорастворимого домена lypx1, - эндогенного нейромодулятора никотиновых рецепторов человека». *Биоорг. хим.* (2011), 37(5):609-615. (543-549)
28. **Е.Н. Люкманова**, М.А. Шулепко, З.О. Шенкарев, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников. Продукция in vitro «трехпетельных» нейротоксинов из яда змей с высоким содержанием дисульфидных связей. Проблемы и решения (обзорная статья). *Биоорг. химия* (2010), 36(2):149-158.
29. **Е.Н. Люкманова**, М.А. Шулепко, Р.В. Тихонов, З.О. Шенкарев, А.С. Парамонов, А.Н. Вульфсон, И.Е. Кашеверов, Т.Л. Устич, Ю.Н. Уткин, А.С. Арсеньев, В.И. Цетлин, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников. Бактериальная продукция и ренатурация из телец включения «слабого» токсина, белка с высоким содержанием дисульфидных связей.

Биохимия, (2009), 74(10):1142-1149.

30. **Е.Н. Люкманова**, А.А. Шульга, Д.А. Арсеньева, К.А. Плужников, Д.А. Долгих, А.С. Арсеньев, М.П. Кирпичников. Экспрессирующая конструкция для наработки в *E. coli* нейротоксина II из яда кобры *Naja oxiana* в виде гибрида с тиоредоксином *Биоорг. хим.* (2004), 30(1):30-40.

Патенты:

1. **Е.Н. Люкманова**, М.А. Шулепко, Р.В. Тихонов, И.Е. Кашеверов, В.И. Цетлин, З.О. Шенкарев, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников. Рекомбинантная плазмидная ДНК *pET22b(+)/вд-Линкс1*, кодирующая белок со свойствами Линкс1, и штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/*pET22b(+)/вд-Линкс1* – продуцент белка со свойствами Линкс1 человека. Патент РФ № 2404246.
2. М.А. Шулепко, **Е.Н. Люкманова**, А.А. Лобас, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников. Рекомбинантная плазмидная ДНК *pET22b(+)/Сларп-1*, кодирующая белок Сларп-1 человека, и штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/*pET22b(+)/Сларп-1* – продуцент белка Сларп-1 человека. Патент РФ № 2453602.
3. **Е.Н. Люкманова**, М.А. Шулепко, З.О. Шенкарев, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников. Рекомбинантная плазмидная ДНК *pET22b(+)/Сларп-2*, кодирующая белок Сларп-2, и штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/*pET22b(+)/Сларп-2* – продуцент белка Сларп-2 человека. Патент РФ № 2583307.

Избранные тезисы докладов:

1. **Е.Н. Люкманова**. Эндогенные пептиды мозга человека как инструменты для лечения нейродегенеративных заболеваний. XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва. 2019. *Пленарный доклад*.
2. **Е.Н. Люкманова** Нейромодулятор человека *Lynx1* регулирует синаптическую пластичность и корректирует ухудшение когнитивной функции при нейродегенерации. VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии института цитологии РАН. Санкт-Петербург. 2018 г. *Приглашенный доклад*.
3. D. Kulbatskii, N. Vasilyeva, A. Andreev-Andrievsky, M. Bychkov, M. Shulepko, A. Popova, E. Lagereva, I. Zueva, K. Petrov, E. Loktyushov, D. Dolgikh, Z. Shenkarev, P. Balaban, M. Kirpichnikov, **Е. Lyukmanova**. *Lynx-1* protein is involved in synaptic plasticity and compensates cognitive deficits in neurodegeneration. 11th FENS Forum of Neuroscience. Berlin, Germany, 2018.
4. **Е.Н. Lyukmanova**, Tsarev A.V., Paramonov A.S., Kulbatskii D.S., Loktyushov E.V., Chugunov A.O., Shenkarev Z.O. NMR study of human *Lypd6* and *Lypd6b* proteins: differences and common features with other *Ly-6/uPAR* proteins acting on nicotinic acetylcholine receptors. EUROMAR-2018. Nantes, France, 2018.
5. **Е.Н. Lyukmanova**. Human three-finger proteins from the *Ly6/uPAR* family regulate essential functions in nervous system and epithelium. Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017 International Conference. Chania. Greece. 2017. *Пленарный доклад*.
6. **Е.Н. Люкманова**, М.А. Шулепко, Д.С. Кульбацкий, М.Л. Бычков, Н.А. Васильева, Е.В. Локтюшов, А.А. Бойко, А.В. Феофанов, З.О. Шенкарев, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников. Трехпетельные белки семейства *Ly-6/uPAR*: функциональное многообразие в рамках одного структурного мотива. V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург. 2016. *Приглашенный доклад*.
7. **Е. Lyukmanova**. Human Secreted *Ly-6/uPAR* related proteins: insights into specificity of interaction with acetylcholine receptors. XVth International Symposium on Cholinergic mechanisms. Marseille, France. 2016. *Пленарный доклад*.