

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
академик РАН, доктор биологических наук
М.П. Кирпичников

Москва – 2019 г

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
ГЛАВА 1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ	10
1.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR)	10
1.1.1. Субъединичная организация nAChR	11
1.1.2. Пространственная структура nAChR	14
1.1.3. Механизм передачи сигнала через nAChR	16
1.1.4. Передача сигнала в нейромышечном синапсе	19
1.1.5. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы в ЦНС	20
1.1.6. nAChR и нейродегенерация	23
1.1.7. Не-нейрональная холинергическая сигнальная система	24
1.1.8. Холинергические механизмы в иммунной системе	26
1.1.9. Холинергическая система легких	27
1.1.10. Холинэргическая регуляция в клетках эпителия	28
1.1.11. Роль nAChR в развитии злокачественных опухолей	30
1.2. Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR)	32
1.2.1. Трансдукция сигнала в рецепторах GPCR	32
1.2.2. Пространственная структура mAChR	35
1.2.3. Лиганды мускариновых рецепторов	36
ГЛАВА 2. ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА LY6/UPAR	39
2.1. Токсины из яда змей	41
2.2. Нейромодуляторы насекомых	46
2.3. Трехпетельные белки рыб и земноводных	47
2.4. Трехпетельные белки млекопитающих	49
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
3.1. Материалы	60
3.1.1. Реактивы	60
3.1.2. Бактериальные и эукариотические клеточные линии	61
3.1.3. Плазмидные векторы	61
3.1.4. Питательные среды для роста бактериальных культур	62
3.1.5. Питательные среды для роста эукариотических клеточных линий	62
3.1.6. Антитела	63
3.1.7. Синтетические олигонуклеотиды	64
3.2. Методы	68
3.2.1. Препараты рекомбинантных белков	68
3.2.2. Эксперименты с модельными животными	75
3.2.2.1. Модельные животные	75
3.2.2.2. Доставка ws-Lynx1 в мозг	76
3.2.2.3. Поведенческие тесты	77
3.2.2.4. Иммуногистохимия и окрашивание тиофлавином S	79
3.2.2.5. Определение токсичности рекомбинантных токсинов	80
3.2.3. Электрофизиология	80
3.2.3.1. Электрофизиологические эксперименты в срезах коры головного мозга	80
3.2.3.2. Долговременная потенция в CA1 срезов гиппокампа	81
3.2.3.3. Электрофизиологические эксперименты в ооцитах <i>X. laevis</i>	82
3.2.4. Исследование взаимодействия трехпетельных белков с рецепторами	84
3.2.4.1. Аффинная экстракция	84
3.2.4.2. Связывание с mAChR	86

3.2.4.3. Взаимодействие белков с nAChR из <i>Torpedo californica</i>	87
3.2.4.4. Конкуренция с ¹²⁵ I- α -Bgtx за связывание с α 7-nAChR	87
3.2.5. Вестерн-блоттинг	88
3.2.6. Полимеразная цепная реакция	89
3.2.7. Эксперименты с модельными клеточными линиями.....	89
3.2.7.1. Культивирование эукариотических клеток.....	89
3.2.7.2. Культивирование клеток PC12 и анализ фосфорилирования ERK1/2 MAP-киназы	91
3.2.7.3. Анализ пролиферативной активности.....	92
3.2.7.4. Остановка клеточного цикла в клетках A549	93
3.2.7.5. Нокаун гена α 7-nAChR	93
3.2.7.6. Анализ фосфорилирования киназ под действием SLURP-1 и ws-Lynx1	94
3.2.7.7. Проточная цитометрия.....	94
3.2.8. ПЦР в реальном времени	95
3.2.9. Конфокальная микроскопия	96
3.2.10. Определение пространственной структуры и динамических характеристик с помощью ЯМР-спектроскопии	97
3.2.11. Компьютерное моделирование структуры комплексов	98
3.2.12. Статистическая обработка результатов экспериментов	100
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	101
4.1. Рекombинантная продукция трехпетельных белков	101
4.1.1. Продукция нейротоксина II из яда кобры <i>Naja oxiana</i> в составе слитного белка с тиоредоксином.....	101
4.1.2. Экспрессирующая конструкция для секреции рекombинантного нейротоксина II ..	105
4.1.3. Бактериальная продукция и ренатурация из телец включения трехпетельных белков человека и токсина WTX.....	107
4.1.4. Сравнение эффективности ренатурации различных трехпетельных белков	108
4.2. Структурные детерминанты, важные для взаимодействия трехпетельных нейротоксинов с мишенями.....	114
4.2.1. Мембранотропный сайт нейротоксина II из яда <i>Naja oxiana</i>	114
4.2.1.1. Нейротоксин II из <i>Naja oxiana</i> связывается с липосомами, имитирующими мембранное окружение nAChR.....	114
4.2.1.2. Сайт связывания с мембраной расположен в «голове» нейротоксина II.....	115
4.2.1.3. Компьютерное моделирование предсказывает топологию взаимодействия NTII с мембраной	116
4.2.1.4. Мутации в области «головы» нейротоксина II приводят к исчезновению специфического взаимодействия токсин/мембрана.....	117
4.2.2. Роль центральной петли нейротоксинов во взаимодействии с рецепторами-мишенями	118
4.2.2.1. Роль центральной петли длинных α -нейротоксинов во взаимодействии с нейрональными nAChR.....	118
4.2.2.2. Центральная петля длинных α -нейротоксинов важна для взаимодействия с ГАМК _A -рецепторами	123
4.2.2.3. Подвижная центральная петля – важная структурная детерминанта взаимодействия «слабого» токсина WTX с nAChR и mAChR.....	124
4.2.2.3.1. Взаимодействие рекombинантного аналога «слабого» токсина WTX с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами	125
4.2.2.3.2. Пространственная структура и конформационная гетерогенность «слабого» токсина.....	129
4.2.2.3.3. Компьютерное моделирование взаимодействия rWTX[P33A] с M1 и M3 mAChR.....	131
4.2.2.3.2. Взаимодействие «слабого» токсина с nAChR	138

4.3. Трехпетельные нейромодуляторы Lynx1 и Lypd6	147
4.3.1. Структурно-функциональные исследования Lynx1	147
4.3.1.1. Экспрессия Lynx1 в мозге крыс	147
4.3.1.2. Пространственная структура водорастворимого домена белка человека Lynx1 ...	150
4.3.1.3. Взаимодействие ws-Lynx1 с ацетилхолинсвязывающими белками, nAChR и mAChR	152
4.3.1.4. Влияние ws-Lynx1 на ACh-индуцированные токи через nAChR человека, экспрессированные в ооцитах <i>Xenopus laevis</i>	155
4.3.1.5. Определение активного сайта в молекуле ws-Lynx1	157
4.3.1.6. Ws-Lynx1 уменьшает никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 MAP киназ в клетках линии PC12 и срезах полосатого тела	161
4.3.1.7. Lynx1 экстрагирует различные субъединицы nAChR из мозга крысы и человека и конкурирует с амилоидным пептидом A β (1-42) за связывание с nAChR	163
4.3.1.8. Ws-Lynx1 предотвращает A β 1-42-индуцированную цитотоксичность <i>in vitro</i>	166
4.3.1.9. A β 1-42 снижает экспрессию Lynx1 в нейронах коры	166
4.3.1.10. Ws-Lynx1 предотвращает нарушение долговременной потенциации, вызванное A β 1-42	168
4.3.2. Влияние ws-Lynx1 на когнитивные процессы <i>in vivo</i>	170
4.3.2.1. Ws-Lynx1 способен проникать через гематоэнцефалический барьер	170
4.3.2.2. Ws-Lynx1 компенсирует нарушение моторного обучения, вызванное MLA	171
4.3.2.3. Ws-Lynx1 компенсирует вызванное MLA нарушение обонятельной памяти	174
4.3.2.4. Ws-Lynx1 усиливает ACh-индуцированные токи в α 7-nAChR в коре головного мозга крысы	174
4.3.2.5. Ws-Lynx1 усиливает долговременную потенцию и предотвращает блокаду ДВП, вызванную MLA	176
4.3.2.6. Ws-Lynx1 конкурирует с MLA за связывание с α 7-nAChR	178
4.3.2.7. Ws-Lynx1 компенсирует нарушения когнитивных функций и усиливает ДВП у 2хTg-AD мышей	179
4.3.2.8. Ws-Lynx1 увеличивает синаптическую плотность в гиппокампе мышей 2хTg-AD	183
4.3.3. Структурно-функциональные исследования водорастворимого домена белка человека Lypd6	185
4.3.3.1. rLypd6 ингибирует ACh-индуцированные токи в α 7-nAChR, экспрессированных в ооцитах <i>X. laevis</i>	185
4.3.3.2. Со-локализация Lypd6 с α 7-nAChR в нейронах коры и гиппокампа	186
4.3.3.3. rLypd6 ингибирует токи через α 7-nAChR, вызванные холином, на срезах гиппокампа мыши	187
4.3.3.4. rLypd6 подавляет долговременную потенцию в гиппокампе	188
4.3.3.5. Пространственная структура и динамика rLypd6 в растворе	189
4.3.3.6. Компьютерное моделирование комплекса rLypd6 с α 7-nAChR	192
4.4. Не-нейрональные эндогенные трехпетельные белки SLURP-1, SLURP-2 и Lynx1	196
4.4.1. Структурно-функциональные исследования rSLURP-1	196
4.4.1.1. rSLURP-1 снижает пролиферацию кератиноцитов, взаимодействуя с α 7-nAChR	196
4.4.1.2. rSLURP-1 селективно связывается с α 7 субъединицами nAChR, экстрагированными из коры головного мозга человека	198
4.4.1.3. rSLURP-1 взаимодействует с α 7-nAChR вне ортостерического сайта связывания	199
4.4.1.4. Пространственная структура и динамика rSLURP-1	202
4.4.2. Структурно-функциональные исследования rSLURP-2	205
4.4.2.1. rSLURP-2 может взаимодействовать с различными подтипами nAChR	205
4.4.2.3. Электрофизиологические исследования взаимодействия rSLURP-2 с nAChR человека	206

4.4.2.4. rSLURP-2 ингибирует никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 MAP киназ	209
4.4.2.5. rSLURP-2 влияет на рост кератиноцитов, взаимодействуя с различными типами ацетилхолиновых рецепторов	210
4.4.2.6. rSLURP-2 является аллостерическим модулятором M1 и M3 nAChR.....	212
4.4.2.6. Пространственная структура и динамика rSLURP-2	214
4.4.2.7. Компьютерное моделирование взаимодействия rSLURP-2 с $\alpha 7$ - and $\alpha 3\beta 2$ - nAChR	217
4.4.3. rSLURP-1 и rSLURP-2 контролируют рост эпителиальных раковых клеток, взаимодействуя с nAChR	221
4.4.3.1. rSLURP-1 и rSLURP-2 SLURP-1 и SLURP-2 тормозят рост клеток раковых линий эпителиального происхождения	222
4.4.3.2. $\alpha 7$ -nAChR – мишень действия rSLURP-1 в клетках карцином.....	224
4.4.3.3. Белки SLURP ингибируют рост клеток A431 и A549 посредством активации различных поверхностных рецепторов	227
4.4.3.4. rSLURP-1 ингибирует рост эпителиальных клеток по метаболитному механизму.....	231
4.4.3.5. Антипролиферативный эффект rSLURP-1 в различных клетках связан с активацией разных сигнальных внутриклеточных путей, но всегда с участием IP ₃ рецепторов.....	232
4.4.3.6. rSLURP-1 в клетках A431 вызывает фосфорилирование киназ и транскрипционных факторов, контролирующих пролиферацию	234
4.4.3.7. rSLURP-1 уменьшает экспрессию $\alpha 7$ -nAChR и индуцирует секрецию эндогенного SLURP-1 в клетках A431	237
4.4.4. Ws-Lynx1, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR, индуцирует арест клеточного цикла и апоптоз в клетках аденокарциномы легкого.....	241
4.4.4.1. Экспрессия генов Lynx1 и nAChR в не-нейрональных клетках человека	241
4.4.4.2. Lynx1 со-локализован с $\alpha 7$ -nAChR в эпителиальных клетках.....	243
4.4.4.3. Ws-Lynx1 снижает жизнеспособность клеток рака легкого и подавляет стимуляцию роста клеток, вызванную никотином	244
4.4.4.4. Ws-Lynx1 вызывает арест клеточного цикла в клетках A549.....	246
4.4.4.5. Ws-Lynx1 контролирует рост клеток A549, модулируя $\alpha 7$ -nAChR, активацию сигнального пути PKC/IP ₃ и других сигнальных каскадов	248
4.4.4.6. Ws-Lynx1 регулирует фосфорилирование киназ и транскрипционных факторов, контролирующих клеточный рост	250
4.4.4.7. Ws-Lynx1 индуцирует апоптоз в клетках A549 через фосфорилирование про- апоптотического фактора p53	253
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	256
ВЫВОДЫ	261
БЛАГОДАРНОСТИ	262
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	264

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БА – болезнь Альцгеймера
ВЧС – высокочастотная стимуляция
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ДВП – долговременная потенция
ДТТ – дитиотреитол
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
КПЛ – крестообразный приподнятый лабиринт
МД – молекулярная динамика
м.д. – миллионная доля
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
миРНК – малая интерферирующая РНК
ОП – открытое поле
ОСТ – транспортер органических катионов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
с.о. – стандартная ошибка среднего
ТАП – тканевый активатор плазминогена
ТМ – трансмембранный
фВПСП – фокальный возбуждающий постсинаптический потенциал
ЦНС – центральная нервная система
Аβ – β-амилоидный пептид
ACh – ацетилхолин
AChBP – ацетилхолин-связывающий белок *Lymnaea stagnalis*
AChE – ацетилхолинэстераза
ACSF – искусственная спинномозговая жидкость, artificial cerebrospinal fluid
BChE – бутирилхолинэстераза
α-Bgtx - α-бунгаротоксин
CarAT - карнитин-ацетилтрансфераза
ChAT – холин-ацетилтрансфераза
СНТ-1 – высокоаффинный транспортер ацетилхолина 1-го типа
Chol – холестерин
CSF – спино-мозговая жидкость
DOPC – диолеил-фосфатидилхолин;
DOPG – диолеил-фосфатидилглицерол;
DOPS – диолеил-фосфатидилсерин;
DhβE – дигидро-β-эритроидин
ECL – внеклеточная петля

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
ERK – регулируемая внеклеточными сигналами киназа
GPCR – рецептор, сопряженный с G-белком
GPI-якорь – гликозилфосфатидилинозитольный якорь
GST-Lyrd6 – Lyrd6, экспрессированный слитно с глутатион-S-трансферазой на N-конце
IC₅₀ – константа ингибирования, при которой блокирована половина рецептора
IgG – иммуноглобулин типа G
Kd – константа диссоциации
Ly6 – антиген лимфоцитов 6
nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор
NF-κB – ядерный фактор «каппа-би»
NMDA – N-метил-D-аспартат
NTII – нейротоксин II
mAChR – мускариновый ацетилхолиновый рецептор
OCT – транспортер органических катионов
PC – фосфатидилхолин;
PDAC – рак поджелудочной железы
PE – фосфатидилэтаноламин;
PG – фосфатидилглицерол;
PKC – протеинкиназа C
PLC – фосфолипаза C
POPC – пальмитоилолеоил-фосфатидилхолин;
PPF – отношение парной фасилитации
PS – фосфатидилсерин;
RMSF – среднеквадратичная флуктуация
STP – кратковременная потенциация
VAChT – везикулярный транспортер ацетилхолина
VEGFR – рецептор фактора роста сосудов
VGCC – потенциалчувствительный кальциевый канал
uPAR – рецептор активатора плазминогена урокиназного типа
WTX – необычный токсин из *Naja kaouthia*

ВВЕДЕНИЕ

Понимание механизмов функционирования мембранных белков является одной из ключевых проблем науки о живом. Эти белки вовлечены в работу нервной, иммунной и эндокринной систем организма, как в качестве рецепторов, передающих сигналы через клеточную мембрану, так и в качестве ионных каналов, ответственных за распространение импульсов вдоль нервных волокон. 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. Некоторые из лигандозависимых каналов (глициновые рецепторы, GABA_A рецепторы, никотиновые ацетилхолиновые и некоторые серотониновые рецепторы) имеют схожую пространственную организацию. Все они состоят из пяти гомологичных субъединиц, гидрофобные части которых образуют ионопроводящую трансмембранную пору, а внеклеточные N-концевые домены ответственны за взаимодействие с лигандами и передачу сигналов, открывающих и закрывающих пору канала. Эти каналы объединяют в большое супер-семейство, названное Cys-петельными рецепторами.

Одним из представителей этого супер-семейства является никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), играющий важную роль в межклеточной сигнализации. Этот рецептор может активироваться не только ацетилхолином, но и никотином, что является определяющим в возникновении никотиновой зависимости при табакокурении. Многообразие рецепторов семейства 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 заболеваний иммунной и эндокринной систем.

В качестве одного из перспективных путей в лечении заболеваний, связанных с дисфункцией отдельных типов нейрорецепторов, может быть предложено создание

искусственных нейромодуляторов направленного действия. В случае nAChR человека прообразами для создания подобных лекарственных средств могут выступать природные трехпетельные белки семейства Ly-6/uPAR, модулирующие работу этого рецептора. Однако, для рационального дизайна новых лекарственных препаратов необходимы дополнительные фундаментальные знания, а именно: данные о биохимических эффектах этих белков 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 трехпетельных белков обладает высокой степенью актуальности, а также научной и практической значимостью.

ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

1.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR)

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются представителями семейства Cys-петельных лигандозависимых ионных каналов, включающего также серотониновые рецепторы, GABA_A-рецепторы и глициновые рецепторы [1]. Ацетилхолин (ACh) или никотин активируют рецептор nAChR, в результате чего открывается ионный канал, проницаемый для катионов K⁺, Na⁺ и Ca²⁺. У человека рецепторы nAChR экспрессируются в центральной и периферической нервной системах на пре- и постсинаптической мембране нейронов, а также в нейромышечных синапсах. Кроме того, nAChR экспрессируются в не-нейрональных тканях: эпителиальных клетках, клетках иммунной системы и митохондриях [2–5].

nAChR участвуют в процессах формирования кратковременной и долговременной памяти [2]. Активация рецептора nAChR $\alpha 7$ типа положительно действует на когнитивные процессы: мышление, концентрацию внимания; стабилизирует эмоциональный фон, повышает устойчивость к стрессовым факторам. Поэтому современная фармакология рассматривает nAChR как одну из ключевых мишеней при создании лекарственных препаратов, направленных на сохранение и улучшение когнитивных функций [6–9]. Рецепторы nAChR контролируют ряд физиологических функций: сокращение мышечных волокон [10], воспалительные процессы [11,12], гомеостаз эпителиальных клеток [13]. Через каскад сигнальных киназ, связанные с митохондриальной мембраной nAChR, регулируют начальные события в митохондриальном пути апоптоза [5]. У человека дисфункции nAChR вызывают развитие заболеваний центральной нервной системы, в том числе сопровождающихся нарушением когнитивных функций [14,15], а также некоторые виды мышечной дистрофии [16], и приводят к возникновению опухолей эпителиального происхождения [17].

В настоящее время никотиновые рецепторы – одни из наиболее изученных рецепторных белков, чему в большой степени способствовало наличие высокоспецифичных и эффективных лигандов, – нейротоксинов змей [18]. Тем не менее, многие вопросы, связанные как со строением отдельных типов nAChR, так и с

механизмами передачи сигналов внутрь клетки, опосредованных этими рецепторами, остаются открытыми.

1.1.1. Субъединичная организация nAChR

Исследованию пространственной организации различных представителей nAChR посвящено множество работ, несмотря на это детальная пространственная структура nAChR долгое время оставалась неизвестной. Главными препятствиями для проведения структурных исследований рецепторов nAChR являются сложности при получении препаративных количеств белка и их низкая стабильность в искусственных мембраномоделирующих средах. Рецепторы nAChR безуспешно пытались получить при помощи бактериальных и дрожжевых систем экспрессии, а также в клетках млекопитающих [19–24]. Недавно было обнаружено, что для экспрессии функционального рецептора, например, гомопентамерного нейронального nAChR $\alpha 7$ типа, необходим уникальный кофактор (NACHO, novel nAChR regulator), отвечающий, как за сборку nAChR в эндоплазматическом ретикулуме, так и за его биогенез и трансфер в плазматическую мембрану. Нокаут гена *NACHO* у мышей приводит к селективной и полной элиминации функциональных $\alpha 7$ -nAChR [25].

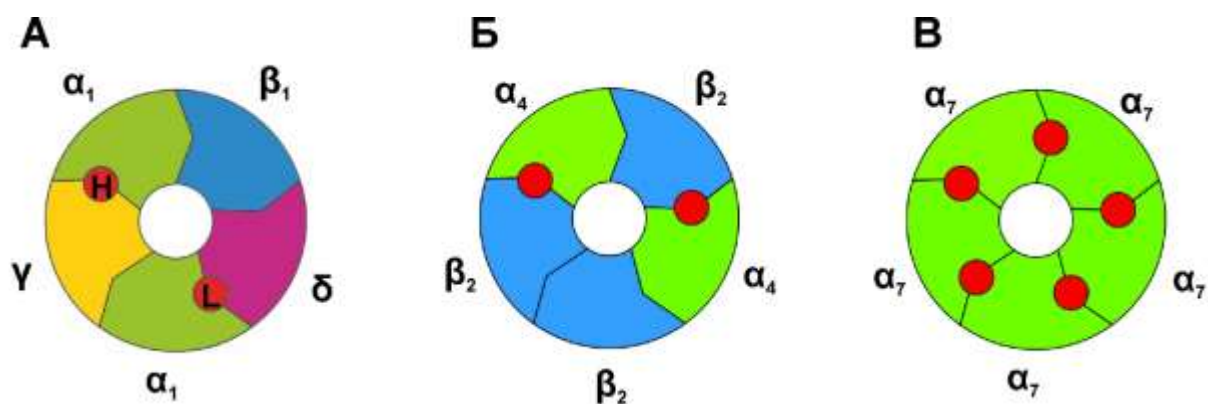
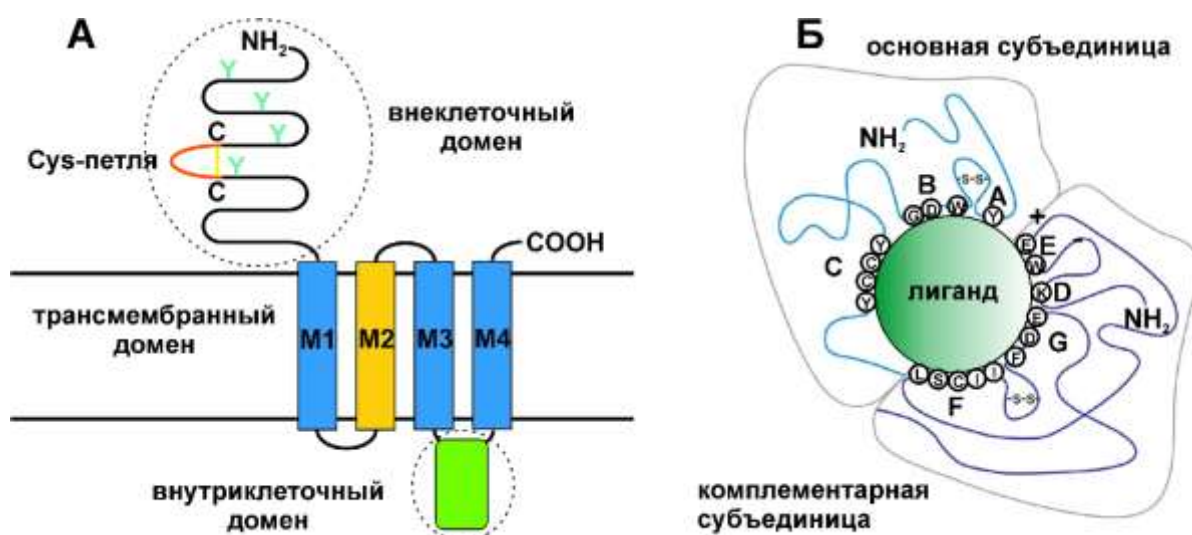


Рис. 1.1. Субъединичная организация nAChR. Примеры организации рецептора мышечного типа ($\alpha_1, \beta_1, \gamma, \delta$, эмбриональный) (А), нейронального гетеропентамерного рецептора (α_4)₃(β_2)₂ (Б) и нейронального гомопентамерного рецептора (α_7)₅ (В). Красными кружками показаны сайты связывания ACh. Обозначены высоко-(H) и низкоспецифичные (L) сайты связывания ACh в мышечном рецепторе.

Семейство рецепторов nAChR разделяют на две большие группы: мышечные и нейрональные. nAChR мышечного типа расположены в нейромышечных окончаниях в скелетной мускулатуре и отвечают за нервно-мышечную передачу. nAChR нейронального типа расположены в центральной и периферической нервной системе, где они отвечают за быструю синаптическую передачу [26]. Различные типы рецепторов nAChR образуются в результате комбинирования составляющих их субъединиц. Собираясь в различных комбинациях гомологичные субъединицы nAChR, образуют функциональные гомо и

гетеро-пентамеры (Рис. 1.1). В настоящее время известно 12 гомологичных субъединиц ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) образующих нейрональные nAChR, и 5 гомологичных субъединиц ($\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ , ϵ) образующих мышечные nAChR. Субъединицы каждого из пяти типов nAChR обладают 20-30% гомологией по аминокислотной последовательности. Внутри типа гомология выше, около 70%.

Каждая субъединица nAChR состоит из внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного доменов. Большой внеклеточный N-концевой домен, содержит сайты для гликозилирования и лиганд-связывающий участок. Трансмембранный домен образован четырьмя α -спиралями (M1-M4), соединенных тремя петлями. Внутриклеточный домен образован петлей между спиралями M3- и M4- и содержит сайты для фосфорилирования. C-Концевая последовательность каждой субъединицы экспонирована во внеклеточное пространство (Рис. 1.2А).



Сус-петля расположена во внеклеточном домене nAChR и образована 13 консервативными аминокислотными остатками, стабилизированными дисульфидной связью. Наличие Сус-петли характерно для всего суперсемейства пентамерных лиганд-зависимых ионных каналов. Кроме Сус-петли на внеклеточном домене имеется подвижная С-петля, «прикрывающая» ортостерический лиганд-связывающий сайт рецептора, который расположен в интерфейсе «основной» и «комплементарной» субъединиц (Рис. 1.2Б).

У nAChR мышечного типа, выделенного из электрического органа ската *Torpedo californica*, было обнаружено два сайта для связывания агонистов. Эти так называемые ортостерические сайты находятся на интерфейсе субъединиц α_{1L} - δ и α_{1H} - γ . В образовании сайта участвуют аминокислотные остатки 192-200 α_1 -субъединицы [28]. Схематично, ортостерический сайт связывания агонистов с рецепторами показан на Рис. 1.1А. Ортостерические сайты в нейрональных гетеропентамерных рецепторах расположены так же, как в рецепторах мышечного типа (Рис. 1.1Б). В случае гомопентамерных нейрональных рецепторов, например, α_7 типа (α_7 -nAChR), лиганды могут связываться с любым из пяти идентичных ортостерических сайтов (Рис. 1.1В). Однако, как показано на примере α -бунгаротоксина, связывание лиганда даже в одном ортостерическом сайте достаточно для конформационных изменений и блокировки канала рецептора, при этом сохраняется возможность «посадки» лигандов в соседние лиганд-связывающие участки [29].

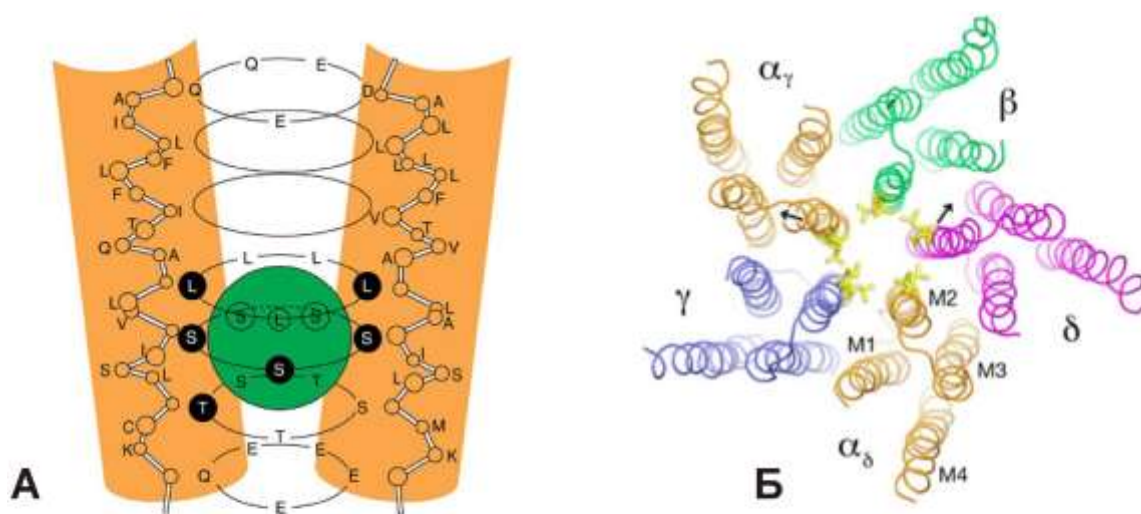


Рис. 1.3. Организация поры канала nAChR. (А) формирование поры с селективной проницаемостью за счет заряженных остатков в устье канала и гидрофобных остатков в его сужении, расположенных на трансмембранных спиралях М2; (Б) согласованное движение спиралей трансмембранного домена приводит к открытию поры мышечного nAChR из электрического органа ската *Torpedo* [29]. Обозначены субъединицы канала. Для субъединицы $\alpha\delta$ обозначены трансмембранные спирали М1-М4. Стрелочками показано движение спиралей М2 при открытии канала.

Открытие и закрытие ионного канала nAChR происходит в результате смещения спиралей М2, которые образуют внутренние стенки канала [30]. Сочетание заряженных аминокислотных остатков в устье канала и гидрофобных остатков в полости канала определяют селективную проницаемость nAChR для ионов (Рис. 1.3).

Рецепторы различного субъединичного состава обладают разной проницаемостью для ионов кальция и натрия. Для мышечных nAChR соотношение проводимостей ионов $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ составляет ~ 0.1 , для гетеромерных нейрональных рецепторов ~ 2.0 , для

гомопентамерных нейрональных рецепторов ~ 10.0 [31]. В рецепторе $\alpha 7$ -nAChR на интерфейсе, образованном спиралями M1 и M3 расположен сайт связывания аллостерических модуляторов. Связывание аллостерических модуляторов не приводит к открытию канала, но изменяет вероятность этого события и таким образом изменяет максимальный уровень ответа и кинетику десенситизации в популяции каналов [32].

Петли соединяющие спирали M3 и M4 формируют внутриклеточный домен nAChR. Данные петли характеризуются высокой консервативностью аминокислотной последовательности внутри каждого конкретного типа субъединиц и одновременно высокой степенью гетерогенности для различных типов субъединиц nAChR [33]. Внутриклеточный домен играет ключевую роль при сборки функционального рецептора из отдельных субъединиц [34] и определяет транспорт некоторых рецепторов в синапсы [35]. Внутриклеточный домен определяет кластеризацию мышечных nAChR в нейромышечных синапсах [36]. Возможно, на внутриклеточном домене nAChR расположен сайт связывания G-белков (см. ниже) [33,37].

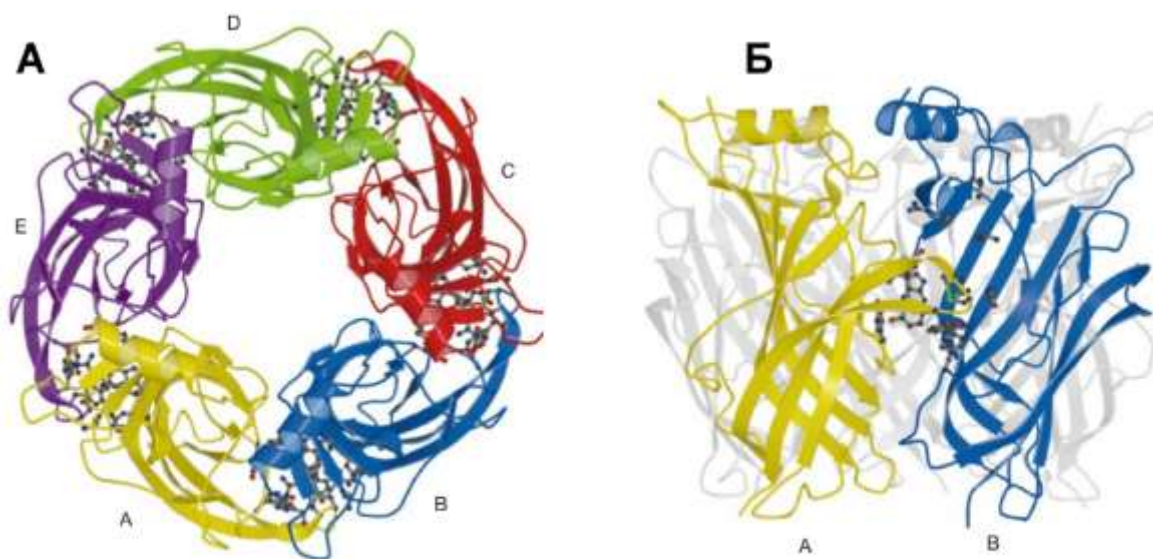


Рис. 1.4. Пространственная структура AChBP из *Lymnaea stagnalis* в ленточном представлении: вид сверху (А) и вид сбоку (Б). Разные субъединицы показаны разным цветом и обозначены А-Д [38].

1.1.2. Пространственная структура nAChR

Структура внеклеточного домена nAChR всегда представляла особый исследовательский интерес, поскольку именно здесь расположены сайты связывания эндогенных и экзогенных лигандов, например α -нейротоксинов из яда змей [38]. Первые данные о структурной организации внеклеточного домена были получены в 2001 г. когда появилась кристаллическая структура гомолога внеклеточного домена nAChR - ацетилхолин-связывающего белка (AChBP), выделенного из моллюска *Lymnaea stagnalis*

(Рис. 1.4) [39]. Гомология аминокислотных последовательностей AChBP и внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR составляет 24%, и доменов других nAChR – 20-24%. Были определены пространственные структуры комплексов AChBP с агонистами и антагонистами [40]. В 2011 г. удалось экспрессировать в клетках дрожжей водорастворимый химерный внеклеточный домен рецептора, содержащий участки как $\alpha 7$ -nAChR так и AChBP. Гомология с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR составила 71%. Полученный химерный домен обладал схожей с $\alpha 7$ -nAChR активностью [41]. Результатами этой работы явилось в частности изучение структуры аллостерических сайтов связывания модуляторов с $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 1.5) [42]. Данный подход получения стабильных водорастворимых внеклеточных доменов nAChR путем замены части аминокислотных остатков на гомологичные остатки из AChBP был использован и для других гомопентамерных Cys-рецепторов [43].

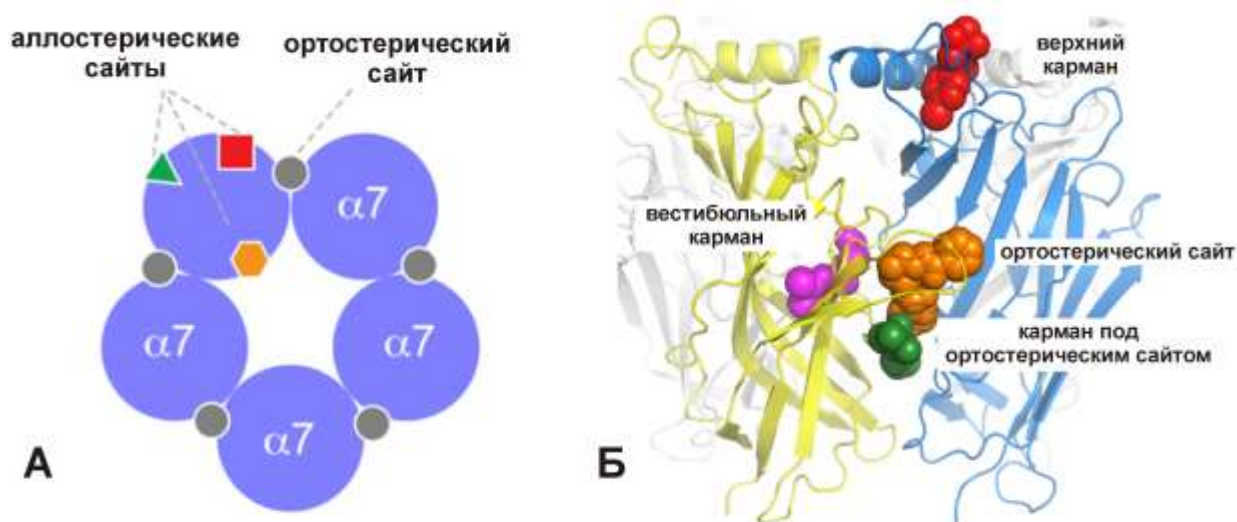


Рис. 1.5. Расположение различных аллостерических и ортостерического сайтов связывания лигандов, обнаруженных в химерном белке $\alpha 7$ -AChBP (адаптировано из работы [41]).

Отдельного упоминания заслуживает работа, в которой методом случайного мутагенеза в клетках дрожжей удалось получить внеклеточный домен $\alpha 1$ -nAChR и определить пространственную структуру комплекса домена с α -бунгаротоксином [44].

Структура первого полноразмерного никотинового рецептора была определена в 2005 году. Методами электронной микроскопии удалось получить структуру nAChR мышечного типа из электрического органа ската *T. californica* с разрешением 4 Å [32]. Первая пространственной структура полноразмерного нейронального рецептора была получена в 2016 г. Ею стала кристаллическая структура $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (разрешение 3.9 Å), экспрессированного в клетках HEK293 (Рис. 1.6) [45]. В 2018 г. методами криоэлектронной микроскопии (разрешение 3.5 Å) этой же группой ученых были получены структуры $\alpha 4\beta 2$ -nAChR двух разных стехиометрий [46].

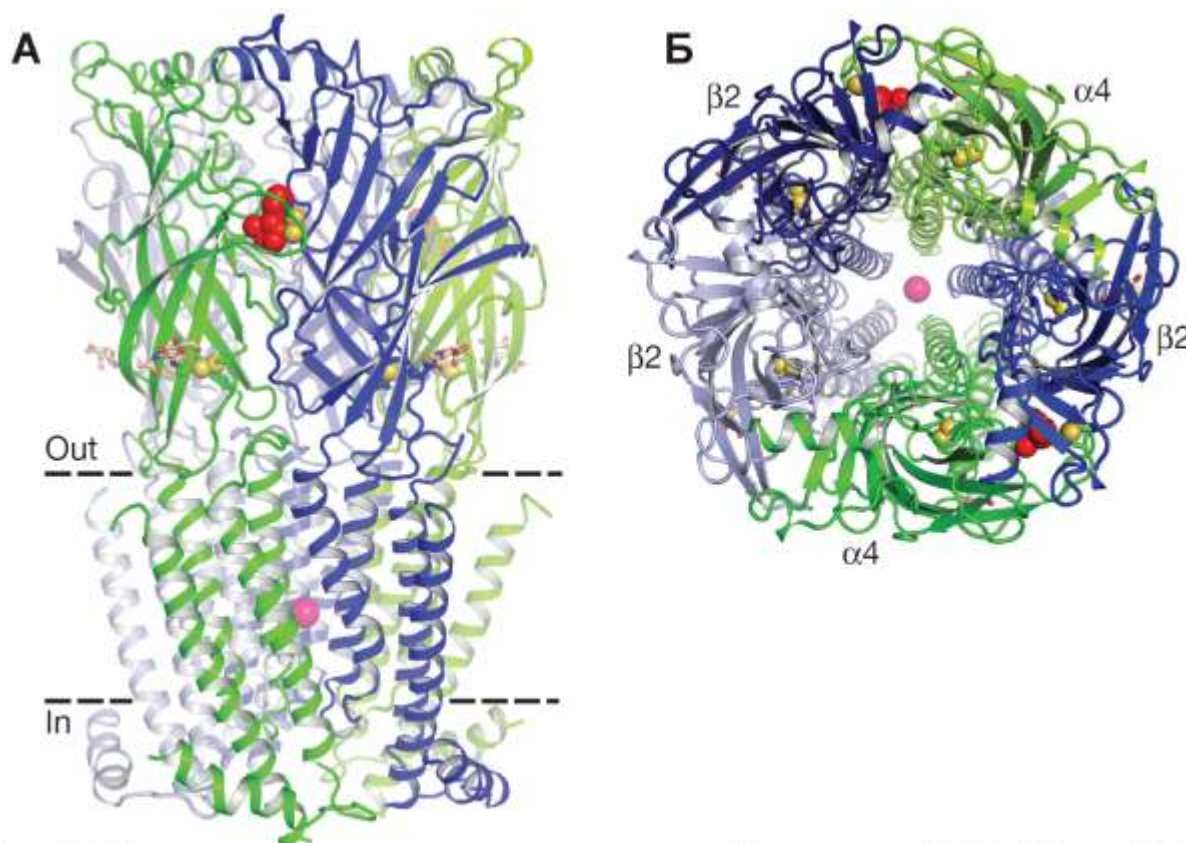


Рис. 1.6. Пространственная структура полноразмерного нейронального nAChR $\alpha 4\beta 2$ -типа [44]: (А) вид сбоку. Пунктирной линией, обозначенной Out, показана граница клеточной мембраны с внеклеточным пространством, пунктирной линией, обозначенной In, показана граница мембраны с внутриклеточным пространством; (Б) - вид сверху. Обозначены субъединицы канала.

1.1.3. Механизм передачи сигнала через nAChR

Открытие канала nAChR и протекание ионного тока происходит вследствие связывания двух молекул агониста, например, ACh или никотина. Помимо открытого и закрытого, nAChR может находиться в десенситизированном (инактивированном) состояний. В таком состоянии рецептор способен связывать агонист, но это не приводит к открытию канала. Рассматривая связывание лиганда с рецептором и открытие канала рецептора как независимые события, Monod, Wyman и Changeaux предложили модель, описывающую переходы между конформационными состояниями nAChR как вероятностные процессы (модель MWC). В дальнейшем, изучение активности одиночных каналов, привело к усложнению этой модели. Помимо открытого, закрытого и десенситизированного, появилось дополнительное состояние: «priming» [47,48]. Это состоянии возникает в присутствии низких концентрациях частичного агониста. В этом случае в среднем только одна молекула связывается с рецептором, что не приводит к открытию канала, но вызывает конформационные изменения в рецепторе, которые повышают чувствительность рецептора при последующем добавлении к ним полного агониста (Рис. 1.7А).

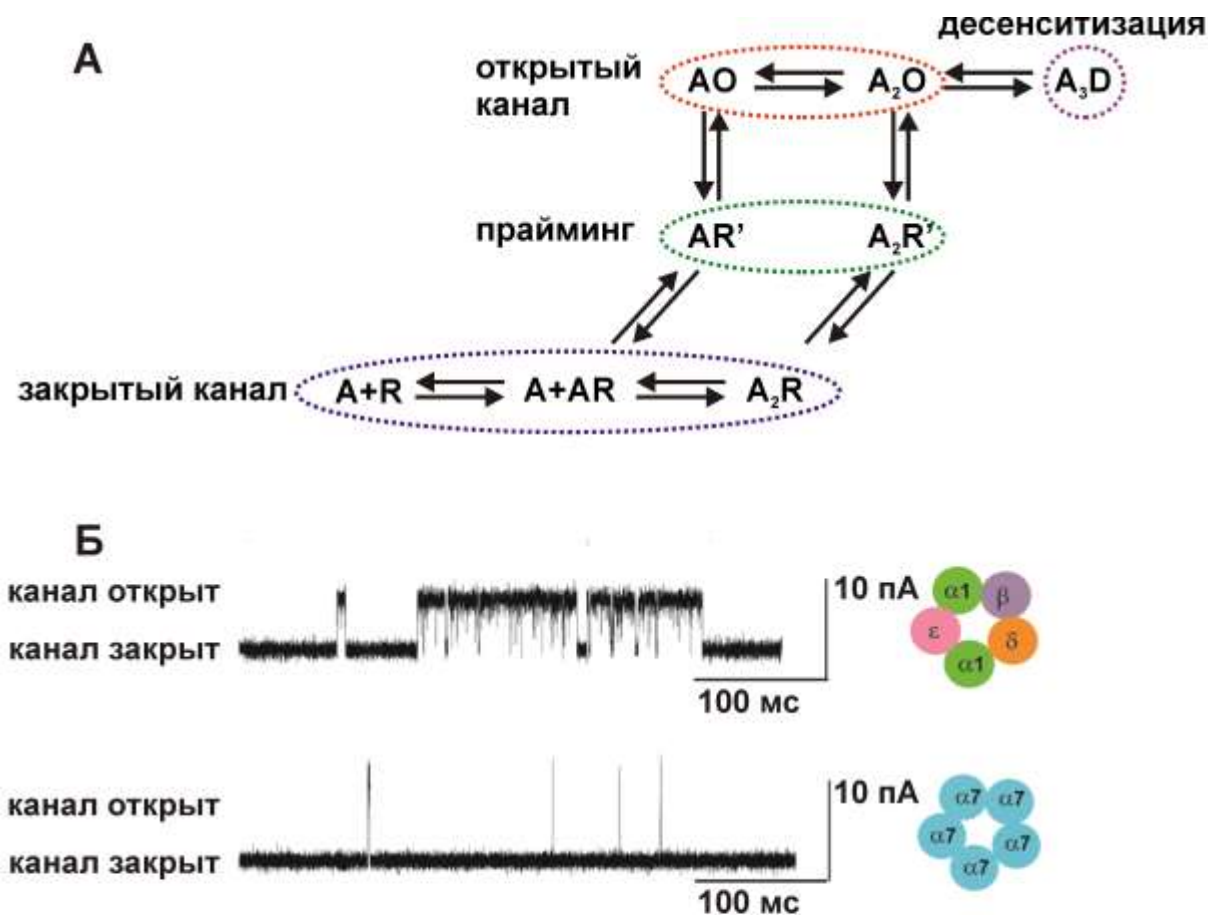


Рис. 1.7. Связь конформационных состояний рецептора и тока через канал nAChR: (а) схема переходов между конформационными состояниями рецептора. А – молекула агониста, А₁, А₂ и А₃ отображают количество молекул агониста, связанного с рецептором, R – рецептор в закрытом состоянии, R' – «priming» рецептора, O – рецептор в открытом состоянии, D – рецептор в десенситизированном состоянии (б). Сравнение кинетики открытия одиночных каналов nAChR мышечного типа и α7-типа [49].

Со временем модель конформационных состояний nAChR еще более усложнилась. Обнаружилось, что рецептор способен находиться не в одном, а в двух десенситизированных состояниях. Аффинность агонистов к этим двум десенситизированным состояниям (D1 и D2) различна. Так для комплекса ACh с мышечным nAChR, K_d закрытого состояния составляет 10 мкМ, для состояния D1 – 1 мкМ, для состояния D2 – 3-10 нМ [49]. У различных типов nAChR существенно отличаются скорость наступления десенситизации и время жизни десенситизированного состояния. Например, nAChR мышечного типа в присутствии агониста множество раз совершает переход из закрытого состояния в открытое и обратно перед переходом в десенситизированное состояние. А рецептор α7-nAChR практически постоянно находится в состоянии десенситизации [50], и лишь иногда переходит в открытое состояние (Рис. 1.7Б).

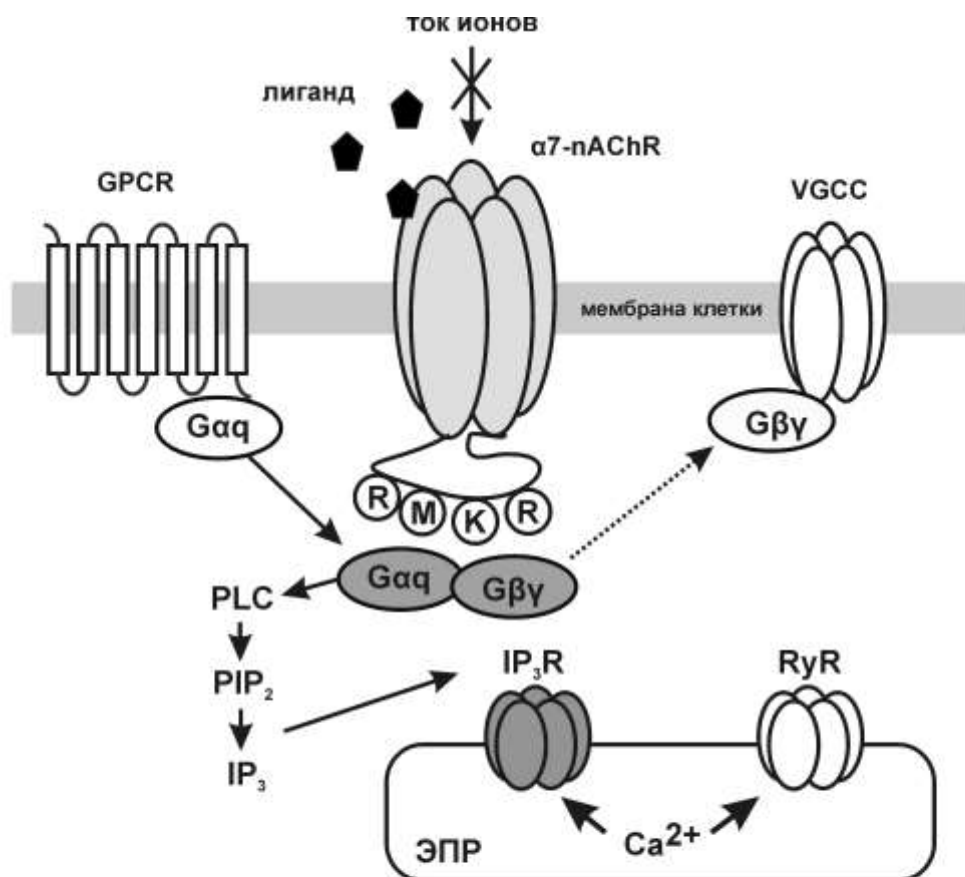


Рис. 1.8. Передача сигнала от $\alpha 7$ -nAChR без открытия канала (по метаботропному пути). Взаимодействие $\alpha 7$ -nAChR с лигандом приводит к диссоциации комплекса, образованного субъединицами G-белка $G_{\alpha q}/G_{\beta \gamma}$ и связанного с рецептором через мотив RMRK внутриклеточной петли M3-M4. Высвобождение $G_{\alpha q}$ приводит к IP_3 -зависимому выходу кальция из внутриклеточных депо, а высвобождение $G_{\beta \gamma}$ – к модуляции потенциалчувствительных кальциевых каналов (VGCC). Рисунок адаптирован из [50]. IP_3R – рецепторы инозитолтрифосфата, PIP_2 и IP_3 – формы инозитолфосфата, PLC – фосфолипаза C, RyR – рианодиновые рецепторы, ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

Вероятно, $\alpha 7$ -nAChR может осуществлять рецепторную функцию по так называемому метаботропному пути, без открытия ионного канала рецептора. Во внутриклеточном домене нейронального рецептора $\alpha 7$ -nAChR (петля M3-M4), была обнаружена последовательность (345-348), гомологичная кластерам связывания G-белков в рецепторе GlyR1 и рецепторах, сопряженных с G-белком (GPCR) [51]. На клетках PC12 в конусах роста нейритов обнаружено, что активация $\alpha 7$ -nAChR приводит к активации фосфолипазы C, высвобождению вторичного мессенджера инозитолтрифосфата IP_3 активации IP_3 -рецепторов и выходу кальция из внутриклеточных депо. Показано, что ингибирование $G_{\alpha q}$ или мутация фрагмента 345-348 в $\alpha 7$ -nAChR приводит к подавлению активации фосфолипазы C и снижению выхода кальция из внутриклеточных депо при стимуляции рецептора (Рис. 1.8, [51]). Таким образом, $\alpha 7$ -nAChR может передавать сигнал с внешней стороны мембраны внутрь клетки без открытия ионного канала, по

метаботропному пути, что также сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации кальция.

1.1.4. Передача сигнала в нейромышечном синапсе

Наиболее изученными являются мышечные никотиновые рецепторы и передача ими сигнала в нейромышечном синапсе. Прохождение потенциала действия по моторному нейрону приводит к выбросу в щель нейромышечного синапса ACh, который достигая nAChR на постсинаптической мембране вызывает сокращение мышечных волокон (Рис. 1.9). Быстрая передача отдельных моторных сигналов в нейромышечном синапсе обеспечивается резким изменением концентрации ACh. За высокую скорость нарастания концентрации ACh отвечает механизм экзоцитоза везикул, содержащих нейромедиатор из активной зоны синапса. Высокая скорость спада концентрации ACh, в свою очередь обеспечивается активностью ферментов ацетилхолинэстеразы (AChE) или бутирилхолинэстеразы (BChE), осуществляющих полный гидролиз ACh в синаптической щели примерно за 1 мс. Подсчитано, что только 50% молекул ACh успеют связаться с постсинаптическими рецепторами до того, как будут гидролизованы [10]. Интересно отметить, что AChE и BChE являются мишенями для фосфорорганических отравляющих веществ (зарин, зоман) а также для разнообразных лекарственных препаратов, например, для физостигмина, применяемого при лечении глаукомы или тетрогидроаминоакридина и донезепила, препаратов одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для компенсации нарушения когнитивных функций при болезни Альцгеймера, см. ниже).

На постсинаптической мембране нейромышечного синапса млекопитающих на ранних стадиях развития присутствуют рецепторы $(\alpha 1)2\beta 1\gamma\delta$ и $\alpha 7$ -nAChR, а в зрелом возрасте они заменяются в основном на рецепторы $(\alpha 1)2\beta 1\gamma\epsilon$. На пресинаптической мембране нейромышечного синапса обнаруживаются в основном $\alpha 3\beta 2$ -nAChR. Эмбриональные рецепторы мышечного типа (содержащие γ -субъединицу) или зрелые рецепторы (содержащие ϵ -субъединицу) различаются временем жизни и проводимости одиночных каналов. Проводимость одиночного канала эмбрионального рецептора примерно в 2 раза меньше, чем у зрелого рецептора, а время жизни в 2-10 раз больше [10].

Для зрелого нейромышечного синапса характерна кластеризация - неоднородное распределение никотиновых рецепторов и потенциал-зависимых натриевых каналов на поверхности постсинаптической мембраны. nAChR расположены ближе к пресинапсу, где они создают локальное изменение мембранного потенциала, которое усиливается потенциал-зависимыми натриевыми каналами. Нейрегулины NR-1 и NR-2 контролируют

кластеризацию зрелых nAChR на постсинаптической мембране нейромышечного синапса. При нарушении кластеризации эмбриональные nAChR распределяются по всей поверхности мышечных клеток, что приводит к утечке калия через каналы nAChR, и является причиной гиперкалиемии, сопровождающейся нарушениями сердечного ритма [10].

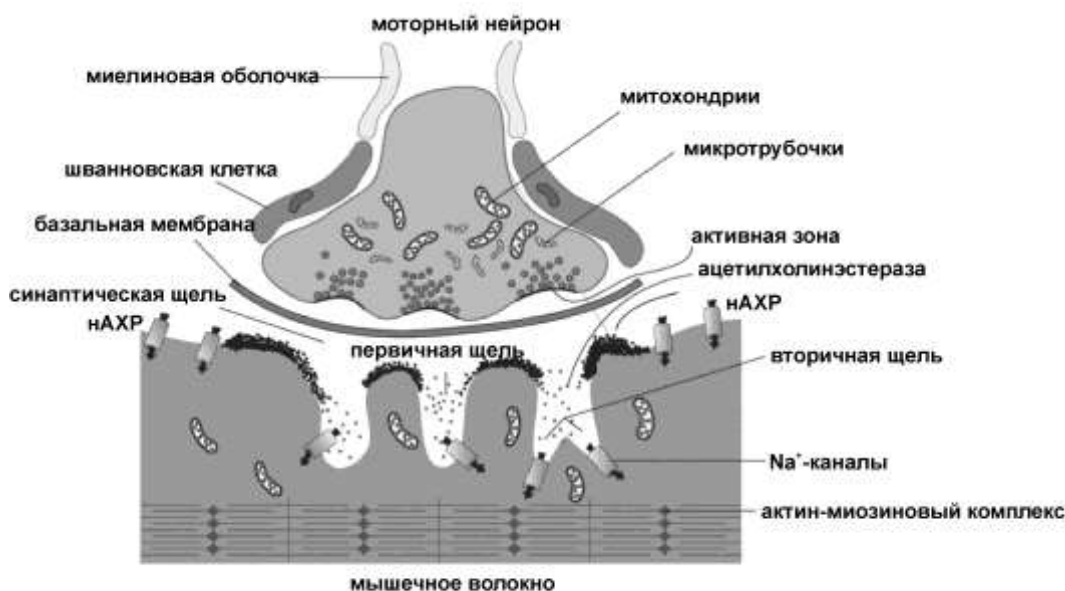


Рис. 1.9. Структура нейромышечного синапса зрелого типа (адаптировано из работы [10]).

Так называемые «миниатюрные» токи в нейромышечных синапсах регистрируются в отсутствие стимуляции моторного нейрона и при блокировании передачи спонтанного потенциала действия в моторном нейроне, например, с помощью тетродотоксина. Эти токи возникают из-за спонтанного высвобождения ACh из единичных везикул. Продолжительность миниатюрного тока составляет ~ 100 мкс, а амплитуда - 4 нА при мембранном потенциале -80 мВ. Ток концевой пластинки, фактически представляющий собой сумму миниатюрных токов возникает при стимуляции моторного нейрона в постсинаптической мембране. Продолжительность тока концевой пластинки – 300 мкс, амплитуда – 400 нА. Наличие таких токов приводит к деполяризации постсинаптической мембраны и сокращению мышечных волокон.

Нарушение функционирования мышечных nAChR является причиной миастении - Myasthenia Gravis. Это аутоиммунное заболевание, связанное с появлением аутоантител преимущественно к $\alpha 1$ -субъединице рецептора [16].

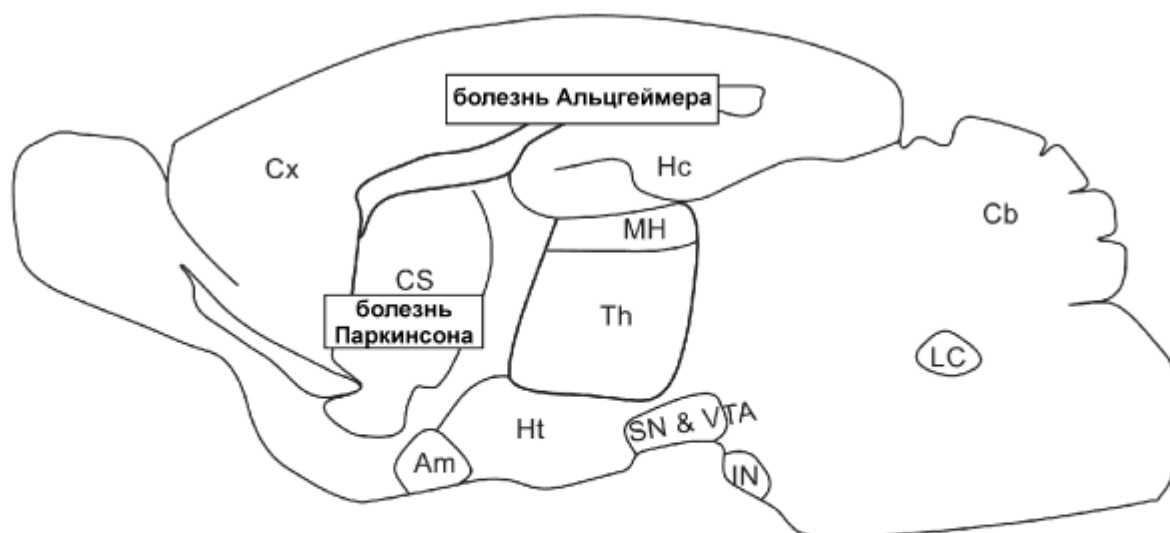
1.1.5. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы в ЦНС

Никотиновые рецепторы в центральной нервной системе могут быть локализованы как на пресинаптической мембране, где они регулируют быструю синаптическую

передачу и модулируют выброс нейромедиатора, так и на постсинаптической мембране, где они влияют на деполяризацию нейрона [2]. Наиболее распространенными типами nAChR в ЦНС являются $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ - рецепторы (Рис. 1.10, [14]). Нейроны секретирующие ацетилхолин, имеют протяженные проекции, идущие из ствола головного мозга и базального переднего мозга в другие зоны (Рис. 1.11). Многие нейроны выбрасывают ACh совместно с глутаматом или GABA. Например в интернейронах полосатого тела и гиппокампа одновременно экспрессируются везикулярные транспортеры ацетилхолина VChAT и глутамата VGLUT3 [52]. Совместная секреция ACh и GABA показана в нейронах базального переднего мозга [53].

Холинергическая сигнальная система мозга отвечает за такие когнитивные функции, как внимание, память и обучение [15]. Холинергические сигнальные механизмы регулируют например нейрональную пластичность в гиппокампе, процесс лежащий в основе формирования памяти и обучения. При стимуляции гиппокампальных пресинаптических nAChR может усиливаться выброс глутамата, GABA и норадреналина [54]. Глутамат является основным нейромедиатором служащим для передачи возбуждающих сигналов в ЦНС. Именно глутаматергическая система играет центральную роль в процессах длительной потенциации и длительной депрессии, которые лежат в основе нейрональной пластичности [55]. Глутамат выбрасывается из пресинаптического окончания в ответ на повышение концентрации внутриклеточного кальция, контролируемого потенциал-чувствительными кальциевыми каналами (VGCC). Концентрация внутриклеточного кальция в пресинаптическом окончании повышается также в результате активации пресинаптических $\alpha 7$ -nAChR. При некоторых условиях выброс глутамата может быть простимулирован исключительно за счет $\alpha 7$ -nAChR без участия VGCC [2].

Помимо прямой стимуляции выброса глутамата из пресинапса, никотиновые рецепторы могут стимулировать секрецию нейромедиатора косвенно – в результате кальций-зависимого выхода кальция из внутриклеточных кальциевых депо [56]. Кроме гиппокампа пресинаптические $\alpha 7$ -nAChR стимулируют выброс глутамата и в других областях мозга, отвечающих за память и обучение, например, в коре, мозжечке, миндалине, полосатом теле и таламусе [2]. Нокаут гена $\alpha 7$ субъединицы или ингибирование $\alpha 7$ -nAChR с помощью специфического ингибитора метилкаконитина (MLA) приводит к ухудшению памяти и внимания у животных [57,58].



Анатомическая область ЦНС	обозначение	Основные субъединицы nAChR
кора (cortex)	Cx	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 7$
гиппокамп (hippocampus)	Hc	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 7$
средняя ножка шишковидной железы (medial habenula)	MH	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 6\alpha 5\beta 3$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 3$
таламус (thalamus)	Th	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\alpha 3\beta 2$
полосатое тело (corpus striatum)	Cs	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$, $\alpha 7$
гипоталамус (hypothalamus)	Ht	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$
миндалина (amygdala)	Am	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$
черная субстанция (substantia nigra)	SN	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 6\alpha 5\beta 3$, $\alpha 3\beta 4^*$, $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$, $\alpha 7$
вентральная область покрышки (ventral tegmental area)	VTA	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 6\beta 3\alpha 5$, $\alpha 3\beta 4^*$, $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$, $\alpha 7$
межножковое ядро (interpeduncular nucleus)	IN	$\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 3\beta 4$, $\alpha 7$
голубое пятно (locus coeruleus)	LC	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$
мозжечок (cerebellum)	Cb	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7$

Рис. 1.10. Распределение подтипов nAChR в мозге крысы. Перечислены основные подтипы nAChR, экспрессируемые в определенных областях мозга. Показаны области мозга, участвующие в болезнях Паркинсона и Альцгеймера (адаптировано из работы [14]).

Постсинаптические никотиновые рецепторы обнаруживаются как на возбуждающих (глутаматергических), так и на тормозных (GABA-ергических) нейронах [2]. Стимулирование этих нейронов приводит к ингибированию или снятию ингибирования пирамидальных клеток гиппокампа, что в свою очередь влияет на активность всей нейронной сети [59].

Кроме пресинаптических и постсинаптических никотиновых рецепторов в мозге существуют также внесинаптические рецепторы. Известно, что они участвуют в

регуляции секреции GABA, но до конца роль внесинаптических nAChR в работе ЦНС в настоящее время не исследована [2].

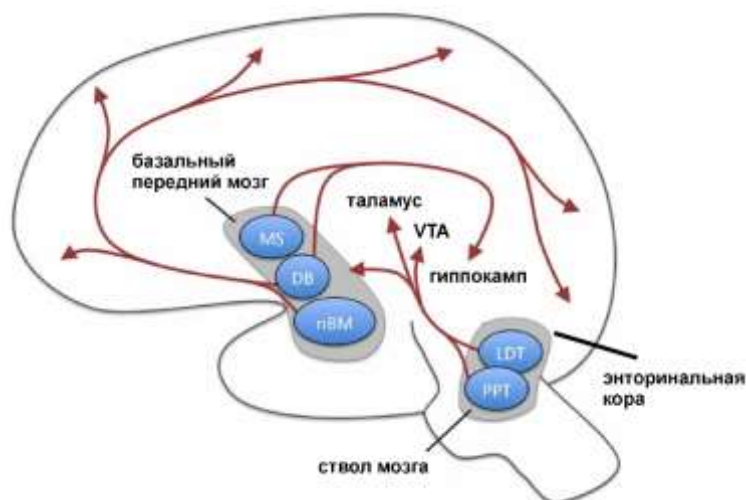


Рис. 1.11. Основные холинергические проекции в ЦНС. MS – ядро медиального септума, DB – диагональная полоска Брока, пВМ – базальное ядро Мейнерта, PPT – пендукулопонтинное ядро покрышки, LDT – латеродорзальное ядро покрышки, VTA – покрышка среднего мозга (адаптировано из работы [60]).

1.1.6. nAChR и нейродегенерация

При ряде психических и неврологических заболеваний, а также в старости происходит значительное ухудшение когнитивных функций. Никотиновые рецепторы участвуют в формировании памяти и играют важную роль в когнитивных процессах. С дисфункциями nAChR связывают возникновение и развитие заболеваний нервной системы, сопровождающихся нарушением когнитивных функций, таких как болезнь Альцгеймера (БА), шизофрения, эпилепсия, паркинсонизм, депрессия, аутизм [2,61–63].

Известно, что $A\beta_{1-42}$ – самая токсичная форма олигомерного β -амилоидного пептида ($A\beta$), ингибирует $\alpha 7$ -nAChR. При болезни Альцгеймера взаимодействие $A\beta$ с $\alpha 7$ -nAChR приводит к интернализации рецептора [64]. Установлено, что взаимодействие $A\beta_{1-42}$ с $\alpha 7$ -nAChR активирует c-Jun N-концевую киназу JNK, которая стимулирует процессинг предшественника $A\beta$ и образование нейрофибриллярных клубков при БА [65]. Снижение нейрональной пластичности при развитии БА связано также с дисфункцией в работе глутаматергической сигнальной системы. Механизм нарушения работы глутаматергической системы, также может быть обусловлен взаимодействием $A\beta_{1-42}$ с $\alpha 7$ -nAChR, в результате которого активируется белковая фосфатаза PP2B, которая, в свою очередь, вызывает дефосфорилирование и активацию фосфатазы STEP₄₆. Далее активированная фосфатаза STEP₄₆ дефосфорилирует субъединицу NR2B-глутаматного рецептора NMDA-типа, что вызывает эндоцитоз рецептора и снижает эффективность глутаматергической передачи [66].

У больных шизофренией наблюдается гиперактивность глутаматергической системы. Кроме того, для них характерна высокая распространённость курения. Эти

наблюдения привели к предположению, что взаимодействие холинергической и глутаматергической сигнальных систем может играть важную роль в развитии шизофрении. Одной из животных моделей для исследования шизофрении служит модель нарушения рабочей памяти у грызунов. Данное состояние вызывают избыточной стимуляцией глутаматергических рецепторов NMDA-типа. Схожее нарушение памяти достигается при введении животным никотина или специфических агонистов $\alpha 7$ -nAChR. Напротив, при снижении экспрессии $\alpha 7$ -nAChR наблюдается уменьшение количества NMDA-зависимых рецепторов и глутаматергических синапсов в мозге крыс [67].

Аутосомная доминантная ночная фронтальная эпилепсия (ADNFLE) ассоциирована с мутациями в генах, кодирующих $\alpha 4$ - и $\beta 2$ -субъединицы nAChR [59]. Предполагается, что мутации приводят либо к повышению чувствительности nAChR к ацетилхолину, либо влияют на стехиометрию $\alpha 4\beta 2$ -nAChR ($(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ – рецептор с высокой чувствительности к ацетилхолину и $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, с низкой чувствительностью). Такие изменения чувствительности рецепторов могут приводить к дисбалансу торможения и возбуждения в таламо-кортикальных связях и к формированию эпилептических очагов возбуждения.

Роль никотиновых рецепторов в развитии депрессии и тревоги в настоящее время до конца не определена [68], однако считается, что аномальная активация nAChR при длительном воздействии никотина может привести к депрессии [69]. У мышей при нокауте гена $\alpha 7$ -nAChR изменений в уровне тревоги не наблюдается [70], но кратковременная активация $\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ - nAChR никотином оказывает анксиолитическое действие на рыбок *Danio rerio* [68].

1.1.7. Не-нейрональная холинергическая сигнальная система

Ацетилхолин не только выступает в качестве нейромедиатора в нервно-мышечных окончаниях и синапсах ЦНС млекопитающих, но является также сигнальной молекулой в не-нейрональных тканях, а кроме того, присутствует у бактерий, водорослей и простейших [11]. Известно, что рецепторы ACh обнаруживаются практически во всех тканях организма человека. Помимо рецепторов, в состав холинергической сигнальной системы входят компоненты, осуществляющие синтез, транспорт и деградацию ACh (Рис. 1.12, [71] [72]).

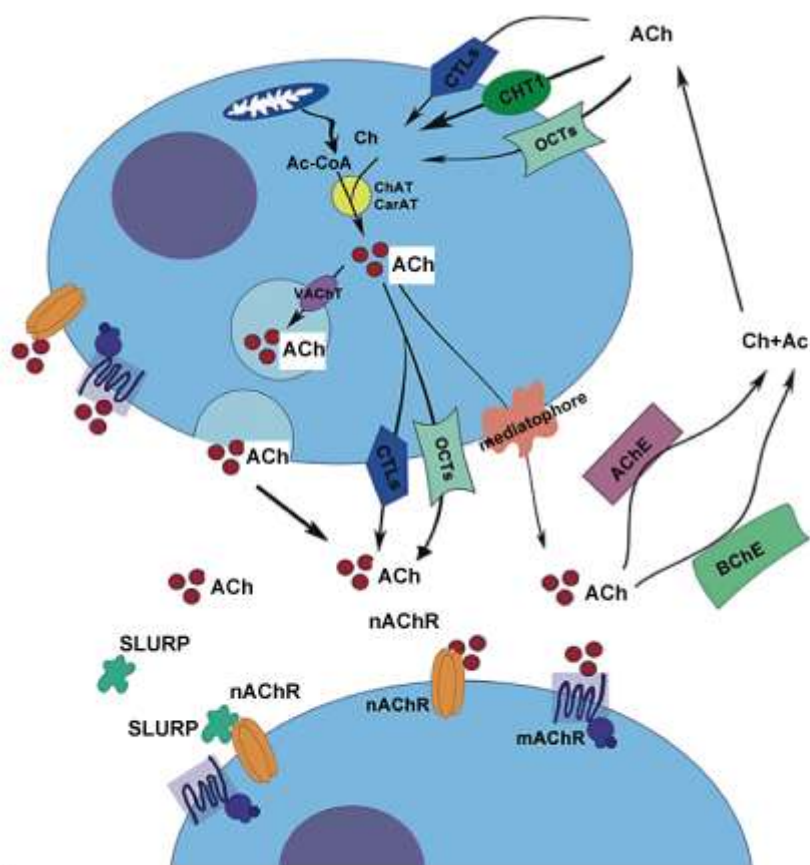


Рис. 1.12. Компоненты нервной холинергической системы, отвечающие за синтез, транспорт, деградацию и передачу сигналов. Ас- ацетат, Ас-СоА – ацетил-кофермент А, АСh – ацетилхолин, АСhЕ – ацетилхолинэстераза, ВСhЕ – бутирилхолинэстераза, СагАТ – каротин-ацетилтрансфераза, Сh- холин, СhАТ – холин-ацетилтрансфераза, СhТ-1 – высокоаффинный транспортер холина I типа, СТL – гомолог холинового транспортера, mAChR – мускариновый ацетилхолиновый рецептор, nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор, ОСТ – транспортер органических катионов, SLURP – секретируемые белки семейства Ly-6/uPAR, VACHT – везикулярный транспортер ацетилхолина (адаптировано из работы [72]).

В большинстве клеток организма, синтез АСh осуществляется путем переноса на молекулу холина ацетильной группы с молекулы ацетил-кофермента А. Эта реакция осуществляется ферментом холин-ацетилтрансферазой (СhАТ). В ряде случаев, например, в клетках скелетной мускулатуры, данная реакция осуществляется с помощью карнитин-ацетилтрансферазы (СагАТ). Поступление холина в клетки регулирует скорость синтеза АСh. В клетках нервной системы холин транспортируется высокоаффинным транспортером холина I (СhТ-1) и запасается в везикулах нейронов благодаря работе специфического везикулярного транспортера АСh (VACHT). За пределами нервной системы поступление АСh осуществляется транспортером органических катионов (ОСТ) и гомологом холинового транспортера СТL1-5. Секреция АСh из цитоплазмы в не-нейрональных клетках также осуществляется ОСТ и, возможно, медиатором [71]. Мишенью действия АСh, секретированного во внеклеточное пространство, являются nAChR и mAChR. Избыток АСh подвергается гидролизу с помощью ацетилхолинэстеразы (АСhЕ) и бутирилхолинэстеразы (ВСhЕ). Взаимодействие АСh с рецепторами на поверхности не-нейрональных клеток приводит к открытию канала nAChR, входу катионов в клетку и активации множества сигнальных каскадов за счет роста концентрации катионов.

1.1.8. Холинергические механизмы в иммунной системе

Клетки иммунной системы не располагают компонентами везикулярной системы транспорта ACh, что существенно отличает их от нервных клеток. Однако эти две регуляторные системы организма связаны. Классическим примером служит регуляция иммунных клеток с помощью ACh при электрической стимуляции блуждающего нерва. [73]. Нервные окончания, идущие из ствола мозга и периферических нервных узлов, локализуются возле мест скопления В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов и макрофагов в органах иммунной системы, что создает предпосылки для регуляции воспалительных процессов периферической нервной системой [73].

В моноцитах периферической крови обнаруживают мРНК различных субъединиц nAChR ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 4$) [12,74]. Холинергическая регуляция иммунных клеток играет важную роль на финальной стадии воспалительного рефлекса (Рис. 1.13). В ходе развития воспалительного рефлекса активация афферентных нейронов экзогенными и эндогенными продуктами воспаления приводит к иннервации блуждающего нерва и секреции ACh в селезенке. Стимулирование $\alpha 7$ -nAChR на поверхности макрофагов высвободившимся ACh, приводит к ингибированию ядерного фактора NF- κ B и подавлению синтеза провоспалительного цитокина HMGB1, что знаменует собой завершение воспалительного рефлекса [75]. Секреция провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-18) ингибируется также и при стимуляции nAChR на поверхности Т-лимфоцитов [76]. Нарушение описанного механизма может привести к возникновению хронических воспалительных реакций [4]. Показано, что нокаутные по гену кодирующему $\alpha 7$ -nAChR мыши, демонстрируют повышенный уровень провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6, IL-1 β в ответ на введение эндотоксинов, а стимуляция блуждающего нерва не снижает уровень цитокинов [77]. Также показано, что обработка Т-лимфоцитов никотином приводит к значительному снижению экспрессии $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ и $\alpha 7$ субъединиц nAChR. [78].

ACh ингибирует активацию макрофагов селезенки используя сигнальный путь JAK2-STAT3 [79]. Более того, стимуляция селезеночных ветвей блуждающего нерва останавливает миграцию В-лимфоцитов и подавляет продукцию ими антител [80]. Холинергическая регуляция воспалительных процессов может рассматриваться в качестве перспективного терапевтического подхода. В частности, показано, что стимуляцией блуждающего нерва можно добиться ингибирования NF- κ B и снижения воспаления при овариэктомии у крыс [81].

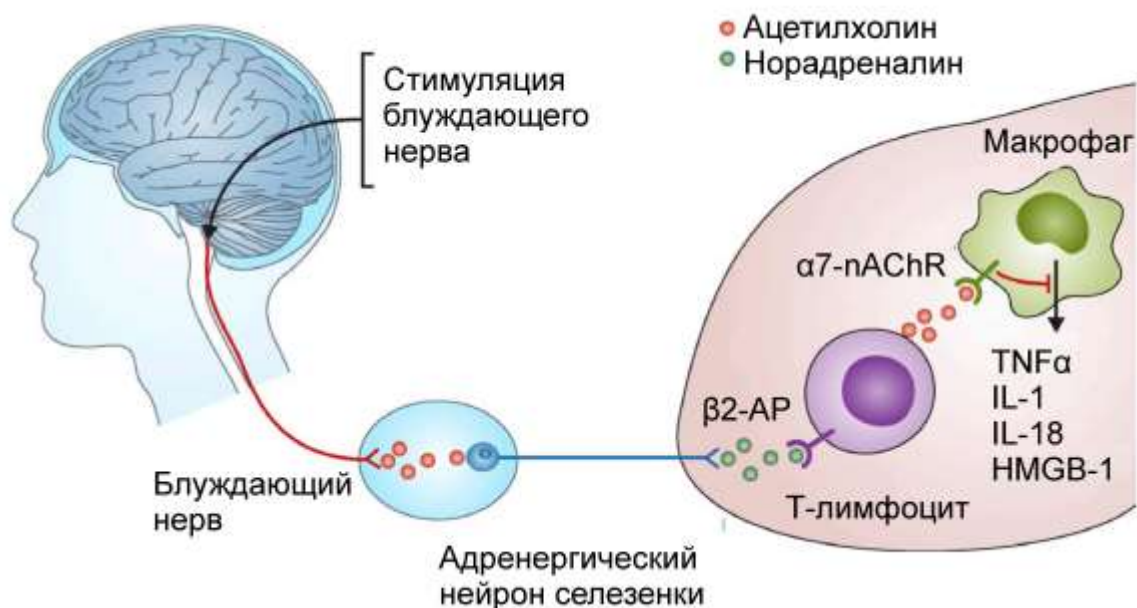


Рис. 1.13. Воспалительный рефлекс. Пример рефлекторной цепи, регулирующей воспалительный процесс, которая состоит из афферентных и эфферентных сигналов, передаваемых через блуждающий нерв в ответ на молекулярные маркеры инфекций и повреждений. Активация адренергических нейронов в селезенке приводит к высвобождению норадреналина в непосредственной близости от Т-клеток, которые способны секретировать АСh в ответ на активацию β-адренергических рецепторов (β₂-AR). АСh взаимодействует с α7-nAChR на поверхности макрофагов, что активирует рецептор и ингибирует синтез и секрецию цитокинов TNFα, IL-1, IL-18 и HMGB1 (рисунок адаптирован из работы [73]).

Регуляция дифференцировки CD4⁺-Т-клеток - еще один процесс, контролируемый холинергической системой. В случае снижения экспрессии mAChR М₃-типа и β₂- и β₄-субъединиц nAChR, CD4⁺-Т-лимфоциты дифференцируются в Т-хелперные клетки I типа [75]. Помимо этого, активация В-лимфоцитов контролируется уровнем экспрессии CD40, зависимым от nAChR [82].

Возможно, что nAChR-опосредованные метаботропные пути передачи сигнала участвуют в регуляции иммунных клеток. В Т-лимфоцитах стимуляция никотином приводит к выходу ионов Ca²⁺ из внутриклеточных депо, но антагонисты α7-nAChR не оказывают влияния на этот процесс [83]. Именно метаботропный путь передачи сигнала через α7-nAChR, возможно, приводит к активации в иммунных клетках сигнального пути JAK2/STAT3, ингибированию NF-κB и продукции провоспалительных цитокинов [84,85].

1.1.9. Холинергическая система легких

Наряду с компонентами нейрональной холинергической системы, расположенной в парасимпатических нервах, в тканях легкого развита и не-нейрональная холинергическая система. Например, культуры мелкоклеточного и не-мелкоклеточного рака легкого синтезируют и секретируют АСh. Секретированный в культуральную среду нейромодулятор регулирует рост клеток путем активации nAChR и mAChR по

аутокринному механизму [13]. Аналогично клеткам иммунной системы, эпителиальные клетки легкого секретируют ACh, в основном, через сравнительно неселективные и медленные транспортеры ОСТ. ОСТ обеспечивают передачу длительных сигналов малой интенсивности, поскольку скорость и направление транспорта ACh через ОСТ зависит от градиента концентрации. Было показано, что $\alpha 7$ -nAChR влияет на секрецию муцина. Регуляция $\alpha 7$ -nAChR, с помощью эндогенного нейромодулятора человека Lynx1 (о нем речь пойдет в Главе 2), приводит к снижению фосфорилирования киназы Src, уменьшению экспрессии мРНК GABA_A и белка MUC5A, что в конечном итоге влияет на секрецию муцина [86]. Поэтому $\alpha 7$ -nAChR рассматривается в качестве перспективной мишени при лечении заболеваний, связанных с гиперсекреции муцина, например, при табакокурении.

1.1.10. Холинэргическая регуляция в клетках эпителия

Холинэргическая и адренэргическая системы играют важную роль в поддержании гомеостаза клеток эпителия и выполнении его барьерной функции. ACh принимает участие в регуляции таких процессов как: пролиферация, миграция, дифференцировка и апоптоз эпителиальных клеток [3]. В ходе формирования слоистой структуры эпидермиса происходит дифференцировка кератиноцитов. Клетки каждого слоя экспрессируют на поверхности цитоплазматической мембраны свой уникальный набор субъединиц nAChR. Для базального слоя характерна экспрессия субъединиц $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ и $\beta 4$ nAChR. В нижних и верхних клетках шипикового слоя эпидермиса экспрессируется $\alpha 9$ -субъединица nAChR, и $\alpha 7$ - $\alpha 9$ -, $\alpha 10$ - и $\beta 1$ -субъединицы nAChR соответственно. В зернистом слое экспрессируются $\alpha 7$ -, $\alpha 10$ - и $\beta 1$ - субъединицы nAChR [87,88].

В настоящее время данные о локализации nAChR в различных слоях эпидермиса недостаточно точны и различаются у разных авторов. Одной из причин является то, что на экспрессию nAChR оказывают влияние такие факторы как возраст, курение, кожные аллергические реакции. Функциональные nAChR представлены гомо- и гетерорецепторами образованными разными субъединицами. В базальном слое представлены $\alpha 3\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 4$ - и $\alpha 9$ -nAChR, в шипиковом слое содержатся гетерорецепторы содержащие $\alpha 5$ -nAChR, а также $\alpha 9$ -nAChR и $\alpha 3(\beta 2/\beta 4)\alpha 5$ -nAChR. Рецептор $\alpha 7$ -nAChR представлен в зернистом слое (Рис. 1.14А, [3]).

Ингибирование $\alpha 7$ -nAChR останавливает миграцию эпителиальных клеток [89]. Ингибирование экспрессии $\alpha 3$ - и $\alpha 9$ -nAChR и M₃-mAChR, влияет на адгезию кератиноцитов и формирование межклеточных контактов. (Рис. 1.14Б, [90]). Среди всех ацетилхолиновых рецепторов, по-видимому, именно $\alpha 7$ -nAChR играет ключевую роль в

регуляции гомеостаза клеток эпидермиса (Рис. 1.14Б). Ингибирование $\alpha 7$ -nAChR не только останавливает дифференцировку кератиноцитов, но в то же время способствует делению клеток [91]. На поздних стадиях развития кератиноцитов активация $\alpha 7$ -nAChR, а также $\alpha 9$ -nAChR и ингибирование mAChR вызывает апоптоз, который сопровождается интенсивной секрецией ACh [92]. Холинергическая система участвует также в ответе кератиноцитов на стресс, вызванный инфекцией или механическими повреждениями. Показано, что активация $\alpha 7$ -nAChR увеличивает чувствительность к бактериальной инфекции из-за подавления экспрессии антимикробных пептидов кератиноцитами [93].

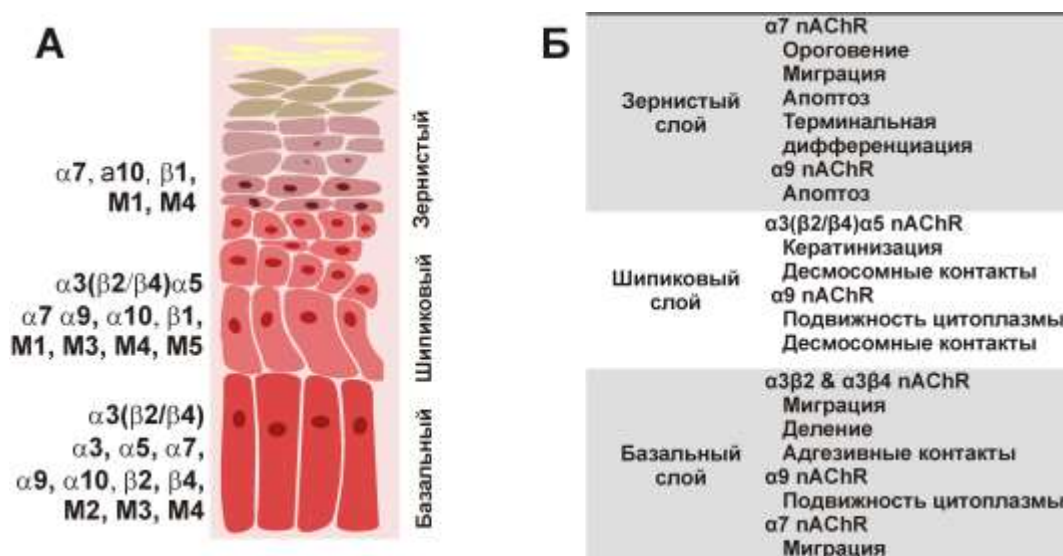


Рис. 1.14. Влияние nAChR на гомеостаз клеток эпителия. (А). Экспрессия различных типов субъединиц nAChR в слоях эпидермиса [3,87,89]. (Б). Эффекты, оказываемые nAChR на разных стадиях развития кератиноцитов (преобладающий тип рецептора/биологический эффект [3,87,89]).

nAChR регулируют физиологические процессы в фибробластах дермы. При активации $\alpha 3$ -nAChR в фибробластах повышается экспрессия белка p21 и активируются каспазы-3 и bcl-2, за счет чего происходит регуляция клеточного цикла и апоптоза [94]. Кроме того, $\alpha 3$ -содержащие nAChR по-видимому вовлечены в процессы ремоделирования межклеточного матрикса, поскольку их активация приводит к увеличению экспрессии коллагена $\alpha 1$, эластина и металлопротеиназы MMP-1 [94].

Как и в случае клеток иммунной системы и легкого, в холинергической регуляции эпителиальных клеток участвуют не только ионные механизмы. nAChR-опосредованная метаботропная активация внутриклеточных сигнальных каскадов, возможно, сопровождается высвобождением кальция из внутриклеточных депо. Вторичными мессенджерами метаботропного пути являются киназы Ras/Raf-1/MEK1/ERK, тогда как вторичными мессенджерами классического ионотропного пути являются кальмодулин-зависимая киназа CaMKII, протеинкиназа C и PI3K/AKT-сигнальный путь. [88,[95].

1.1.11. Роль nAChR в развитии злокачественных опухолей

Табакокурение вызывает не только рак легкого, но также увеличивает вероятность развития опухолей шеи, желудка, поджелудочной железы, желчного пузыря, печени, толстой кишки, молочной железы, шейки матки, мочевого пузыря и рака почек [17]. Был предложен молекулярный механизм образования и развития рака связанного с потреблением табака. В соответствии с предложенным механизмом, злокачественная трансформация клеток непосредственно вызывается активацией $\alpha 7$ -nAChR никотином и его канцерогенными производными [96]. Именно таким образом онкогенную трансформацию кератиноцитов вызывают нитрозамины (NNK и NNN) [97]. В результате стимуляции $\alpha 7$ -nAChR в опухолевых клетках активируются митогенные и антиапоптотические сигнальные пути. Воздействие никотина на $\alpha 7$ -nAChR стимулирует секрецию факторов роста (EGF) и нейротрофических факторов, которые соответственно активируют EGFR и β -адренорецепторы [97]. Показано, что воздействие никотина на кератиноциты вызывает повышение экспрессии $\alpha 5$ -nAChR и $\alpha 7$ -nAChR, что приводит к образованию положительной обратной связи в ответ на последующее воздействие никотином [98].

Проницаемость для ионов кальция делает nAChR важным регулятором сигнальных путей в опухолевых клетках. Увеличение концентрации кальция модулирует активность многих киназ (ERK, Src, PKC, JAK2), β -аррестина и транскрипционных факторов (NF- κ B, GATA3, STAT1 и STAT3), что с одной стороны стимулирует пролиферацию и способствует прохождению клеток через контрольные точки клеточного цикла, а с другой стороны запускает синтез ряда антиапоптотических белков, например, ингибитора каспаз XIAP [99–104]. Таким образом, в опухолевых клетках воздействие никотина и нитрозаминов на nAChR стимулирует пролиферацию и формирует устойчивость к апоптозу (Рис. 1.15).

Помимо участия в развитии и прогрессии солидных опухолей nAChR играет важную роль в лейкемии. Ацетилхолин является аутокринным фактором роста клеток лейкемии и секретируется злокачественно трансформированными Т-лимфоцитами. Регуляция клеточной пролиферации происходит в результате изменения кальциевой динамики. Кроме того, ACh, продуцируемый Т-лимфоцитами, недостаточно эффективно гидролизуется, поскольку активность ацетилхолинэстеразы (AChE) в этих клетках снижена. Кроме nAChR существенную роль в патогенезе лейкемий играют мускариновые ацетилхолиновые рецепторы [105].

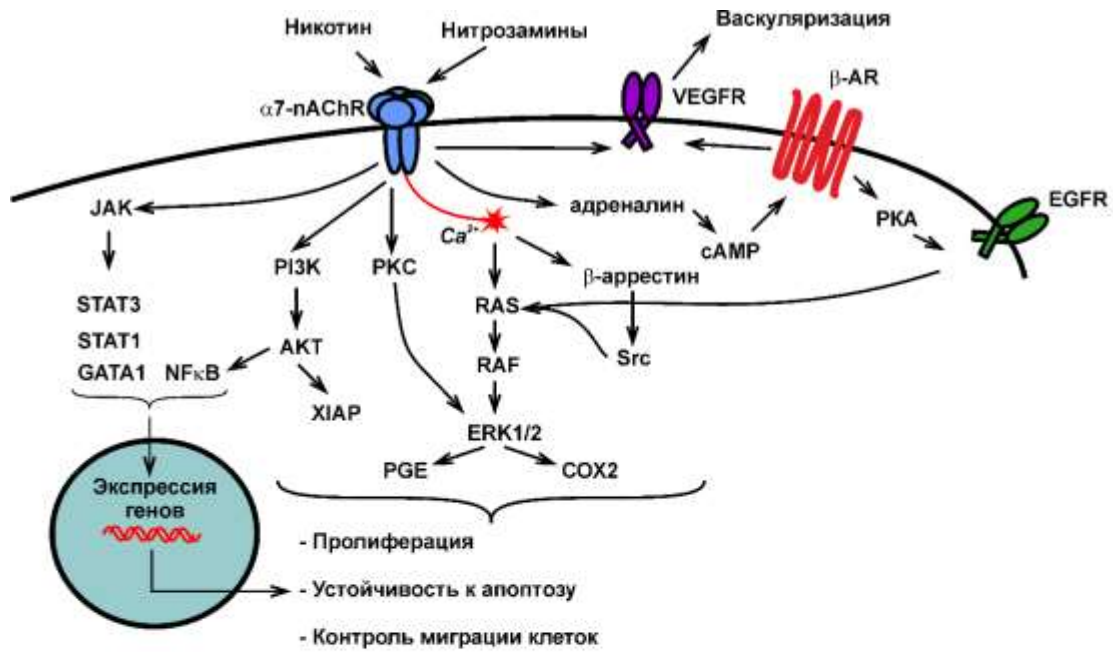


Рис. 1.15. Роль $\alpha 7$ -nAChR в развитии и прогрессии злокачественных неоплазий. Активация $\alpha 7$ -nAChR увеличивает чувствительность опухолевых клеток к никотину и может стимулировать передачу сигналов через рецепторы факторов роста, запускающие митогенные и антиапоптотические сигнальные пути в клетках. Активация $\alpha 7$ -nAChR также вызывает секрецию проонкогенных нейротрансмиттеров и контролирует миграцию опухолевых клеток. АКТ – серин/треониновая протеинкиназа Ras- α , β -AR – β -адренергические рецепторы, сАМР – циклоаденозинмонофосфат, COX2 – циклооксигеназа 2, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, ERK – внеклеточные регулируемые сигналом киназы, Jak – Янус-киназа, NF- κ B – ядерный фактор «каппа-би», PGE – простагландин E, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, PKA – протеинкиназа A, PKC – протеинкиназа C, RAF – серин-треониновая протеинкиназа, RAS – малые GTP-азы, Src – киназа семейства SFK, STAT – передатчик сигнала и активатор транскрипции, VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов, XIAP – X-связанный ингибитор терминальных каспаз.

Кроме регуляции пролиферации, nAChR вероятно также участвует в регуляции миграции (метастазировании) раковых клеток. Было показано, что проинвазивный эффект никотина связан с активацией $\alpha 7$ -nAChR и вызывает изменения в экспрессии генов обеспечивающих эпителиально-мезенхимальный переход различных опухолевых клеток [106].

Нокаут генов $\alpha 5$ -nAChR и $\alpha 3$ -nAChR усиливает миграцию клеток рака легкого и пищевода соответственно [107]. Нокаут гена $\alpha 7$ -nAChR в ассоциированных с опухолью макрофагах ингибирует метастазирование колоректального рака через сигнальный путь JAK2/STAT3 [108]. Активация миграции никотином может также контролироваться MAP киназой p38 как в случае рака толстой кишки [109].

Никотин и нитрозамины активируют также ангиогенез или процесс формирования новых кровеносных сосудов в опухолевой массе. Прорастание новых сосудов в опухоль обеспечивает быстроделющиеся раковые клетки кислородом и ростовыми факторами что приводит к разрастанию опухолевой массы и в дальнейшем к метастазированию рака.

Было показано *in vivo*, что никотин усиливает ангиогенез рака желудка через активацию ERK1/2, COX-2) [110]; [109] и простагландина E [111].

Эндогенный нейромодулятор человека Lynx1 (см. Главу 2) является регулятором никотин-индуцированного увеличения экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в клетках карциномы легкого [86,112]. Уменьшение экспрессии Lynx1 стимулирует пролиферацию клеток рака легкого, в то время как увеличение экспрессии Lynx1 (с помощью лентивирусной трансдукции) уменьшает рост клеток [112].

1.2. Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR)

Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR) человека M₁ - M₅ типов относятся к семейству GPCR [113] и представляют собой трансмембранные рецепторы, принимающие участие в регуляции проведения калиевых каналов и в подавлении медленных, потенциал-независимых кальциевых токов. Современные данные [114] позволяют предположить, что недостаточный синтез некоторых типов mAChR связан с развитием некоторых форм шизофрении, и направленное воздействие, в особенности, на рецепторы M₁ типа может привести к улучшению состояния больных. Таким образом, исследование механизмов активации и взаимодействия с лигандами mAChR представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

1.2.1. Трансдукция сигнала в рецепторах GPCR

Все представители семейства GPCR обеспечивают передачу сигнала внутрь клетки через взаимодействие с гетеротримерными G-белками и некоторыми другими эффекторами, например, с β -аррестином [115]. Передача сигнала сопровождается переходами между функционально-различающимися конформациями [116], стабилизированными взаимодействием с лигандами и эффекторами (Рис. 1.16).

При активации GPCR происходит изменение пространственной структуры трансмембранного региона. В этом регионе можно выделить внеклеточную ЕС и внутриклеточную область IC (Рис. 1.17), различающиеся по степени гомологии аминокислотной последовательности и по масштабу изменения пространственной структуры при активации рецептора [117]. В ЕС происходит связывание ортостерических лигандов (такие лиганды способны непосредственно активировать рецептор), для этой области характерно высокое разнообразие аминокислотной последовательности среди GPCR класса А и относительно небольшой масштаб изменения пространственной структуры при активации, для IC региона – низкое разнообразие аминокислотной

последовательности и сильное изменение пространственной структуры, которое приводит к активации G-белка и других эффекторов.

При активации рецептора ортостерическим лигандом происходит смещение внутриклеточных концов спиралей V и VI в направлении от центральной оси трансмембранного региона, спираль VII смещается к центральной оси, а спираль III смещается вдоль своей оси к внеклеточной стороне мембраны. Движение спиралей V и VI обеспечивает связывание и активацию G-белка, а движение спиралей III и VII, предположительно, передачу сигнала по альтернативным сигнальным путям [116].

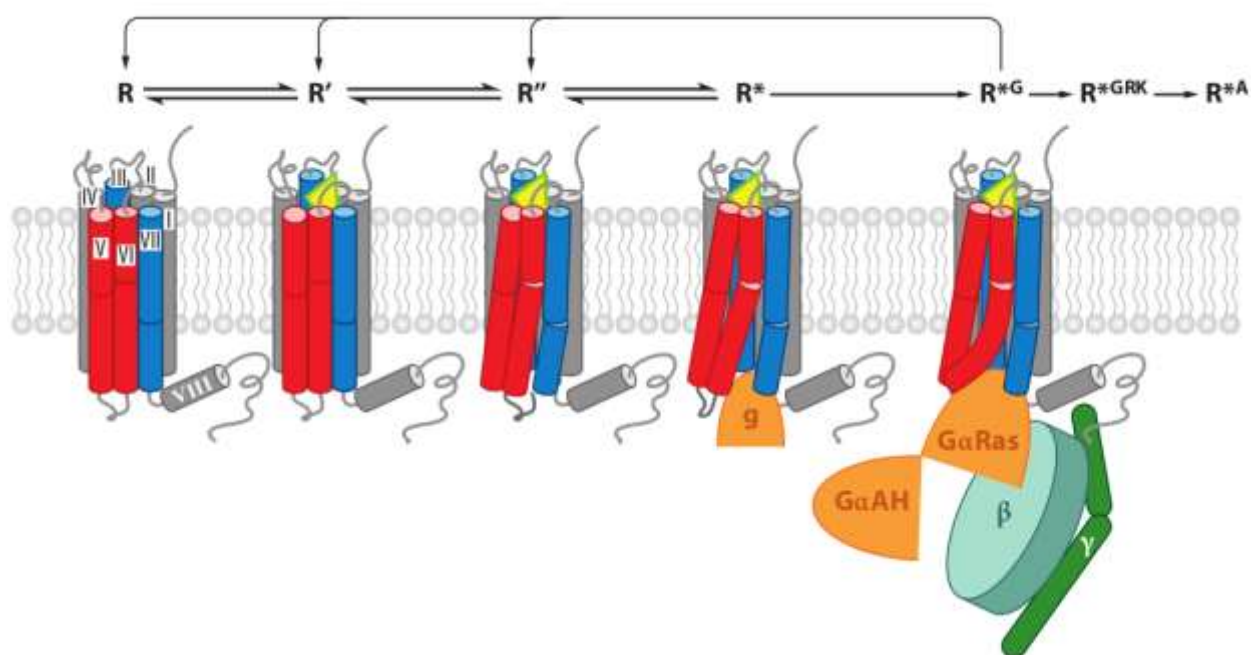


Рис. 1.16. Конформации GPCR, стабилизируемые взаимодействием с лигандами и эффекторами. R – неактивное состояние, стабилизируется инверсными агонистами и антагонистами; R' – неактивное состояние, стабилизируемое низкоаффинными агонистами; R'' – активированное состояние, в котором начинается структурная перестройка трансмембранного региона; R* – экспонирование сайта связывания C-концевой α -спирали G α -субъединицы (или ее белкового аналога, обозначенного g на рисунке); R*^G – состояние связывания и активации полноразмерного гетеротримерного G $\alpha\beta\gamma$ -комплекса; R*^{GRK} и R*^A – предполагаемые конформации, стабилизируемые альтернативными эффекторами GPCR. Конформации выделены на основе сравнительного анализа кристаллических структур GPCR, описанного в [116].

Кроме значительного смещения трансмембранных спиралей, при активации происходят изменения в конформации боковых цепей аминокислотных остатков, принадлежащих консервативным среди GPCR мотивам WxP, NPxxY, D(E)RY [118]. Мотив D(E)RY в спирали III взаимодействует со спиралью VI как через образование межспирального солевого мостика Arg^{3.50} – Asp^{6.30} (в бычьем родопсине), так и через образование водородных связей с Thr^{6.34} (в κ - и μ -опиоидных рецепторах). Мотив NPxxY расположен у внутриклеточного конца спирали VII, остаток Tyr^{7.53} изменяет ориентацию

боковой цепи при переходе в активное состояние и формирует через молекулу воды контакт с Tyr^{5.58}, стабилизируя положение спирали VII относительно спирали V.

Взаимодействие с гетеротримерным G-белком происходит в основном через контакт IC региона трансмембранной части GPCR и $\alpha 5$ -спирали $G\alpha$ -субъединицы. Активация рецептора приводит к повороту $\beta 6$ - $\alpha 5$ фрагмента, сопряженному с выходом молекулы GDP из $G\alpha$. Кроме трансмембранного региона с $G\alpha$ контактирует также внутриклеточная петля ICL2. Информация о влиянии конформации GPCR на передачу сигнала в G-белок нуждается в уточнении, т.к. на настоящий момент структура комплекса GPCR-G-белок с атомным разрешением известна только для $\beta 2$ -адренергического рецептора [119].

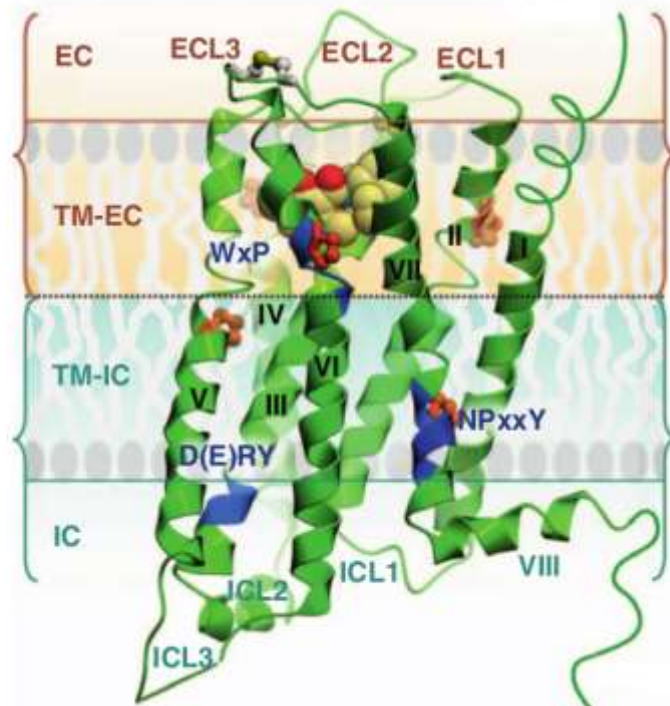


Рис 1.17. Основные структурные элементы GPCR на примере D3 допаминового рецептора. Цифрами I-VII обозначены трансмембранные спирали, ECL1-ECL3 – внеклеточные петли, ICL1-ICL3 – внутриклеточные петли. Отмеченные синим цветом фрагменты – важные для функциональной активности мотивы, консервативные для GPCR класса A. Рисунок адаптирован из [117].

В некоторых случаях передачу сигнала могут контролировать не только трансмембранный регион и внутриклеточные петли, но и внеклеточные петли. Так, в рецепторе сфингозина S1P1 петля ECL2 перекрывает доступ к внутренности трансмембранного региона [120]. Предположительно, в этом случае ортостерический сайт связывания находится между спиралями I и VII вблизи плазматической мембраны.

1.2.2. Пространственная структура mAChR

В человеческом организме присутствует около 800 генов, кодирующих белки семейства GPCR [14]. Представители этого семейства обладают сходной структурой трансмембранной части полипептидной цепи: 7 α -спиралей, N-концевая последовательность расположена снаружи плазматической мембраны, C-концевая – внутри. По степени гомологии аминокислотной последовательности трансмембранной части в семействе GPCR выделяются несколько классов: класс А (родопсина-подобные – 701 представитель), класс В (секретиновые и адгезионные рецепторы — 15 и 24 представителя соответственно), класс С (семейство метаботропных глутаматных рецепторов – 15 представителей) и класс Frizzled/TAS2 рецепторов (24 представителя). Степень гомологии аминокислотной последовательности трансмембранной части (SI) между представителями различных классов составляет не более 20%, в классе А также выделяются 4 подкласса α - δ ($SI \geq 25\%$).

Первая попытка моделирования структуры мускаринового рецептора опиралась на известную пространственную структуру другого представителя GPCR — бычьего родопсина [121]. Гомологичная модель была получена наложением аминокислотной последовательности M1-mAChR (с пропуском 20 аминокислот на N-конце и делецией 129 аминокислот в третьей внутриклеточной петле) на 3D структуру родопсина и последующей оптимизацией по энергии. Для уточнения модели использовались данные сканирующего мутагенеза. В этой модели трансмембранные спирали TM1-TM3, TM5-TM7 образуют эллиптический канал, стенка которого поддерживается TM4, пересекающей внешние поверхности TM2 и TM3. Полость этого канала содержит сайт связывания лигандов. Спираль N8 располагается вдоль внутренней стороны мембраны, где, как предполагают авторы, фиксируется в мембране с помощью пальмитоилированного остатка цистеина. Сканирующий мутагенез позволил установить, что остатки Asp122, Tyr124 и Trp150 играют существенную роль в стабилизации контактов между трансмембранными спиралями, т. к. их замещение приводит к полной утрате активности рецептора. Кроме того, были идентифицированы остатки, формирующие полость, в которой происходит связывание ацетилхолина: Asp105, Tyr106, Tyr381, Asn382, Tyr404, Cys407 и Tyr408. Эта полость и является ортостерическим сайтом связывания лиганда (обеспечивает активацию рецептора), в отличие от аллостерического, наличие лиганда в котором не активирует рецептор, но изменяет характер связывания в ортостерическом сайте.

В 2012 г. методами рентгеноструктурного анализа были определены пространственные структуры двух мускариновых рецепторов M2 и M3 типа [122,123].

Несмотря на высокую степень гомологии аминокислотных остатков в сайте связывания были выявлены различия в пространственной структуре ортостерического сайта (Рис. 1.18), что представляет интерес в связи с разработкой новых терапевтических препаратов, селективно взаимодействующих с мускариновыми рецепторами различного типа и демонстрирующими различные фармакологические свойства [124].

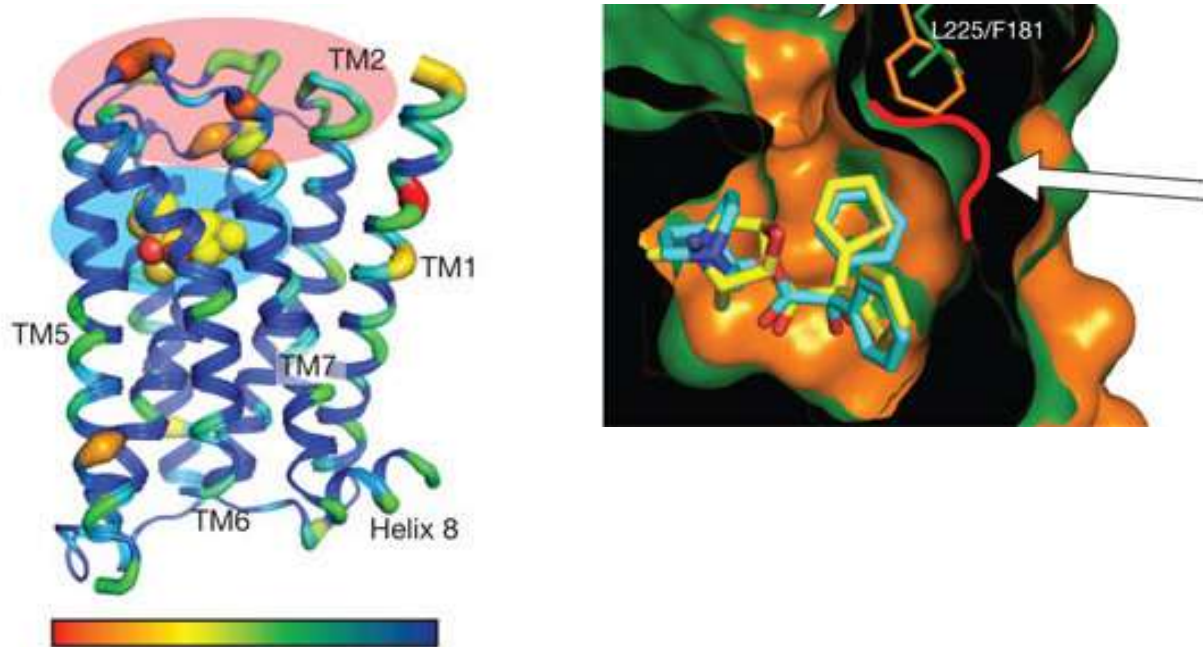


Рис. 1.18. (А). Структура M3-mAChR. Цветом показана степень гомологии аминокислотных остатков с M2-mAChR (синим цветом –гомологичные остатки, красным –негомологичные). (Б). Ортостерический сайт связывания лиганда. Красный контур показывает полость, имеющуюся в M3 (зеленый) и отсутствующую в M2 рецепторе (оранжевый) [123].

1.2.3. Лиганды мускариновых рецепторов

Природные и синтетические лиганды разделяют на три группы: агонисты, смещают это равновесие в сторону активного состояния; инверсные агонисты (или антагонисты), смещают это равновесие в сторону неактивного состояния; и нейтральные антагонисты не влияют на равновесие, но могут препятствовать связыванию лиганда с рецептором (Рис. 1.19). Агонисты в свою очередь разделяют на сильные и слабые. Последние не могут полностью активировать белок даже при концентрациях насыщения. Биофизические исследования очищенного флуоресцентно-меченого β_2AR показали, что слабые и сильные агонисты, содержащие разные функциональные группы, стабилизируют разные конформационные состояния рецептора [125].

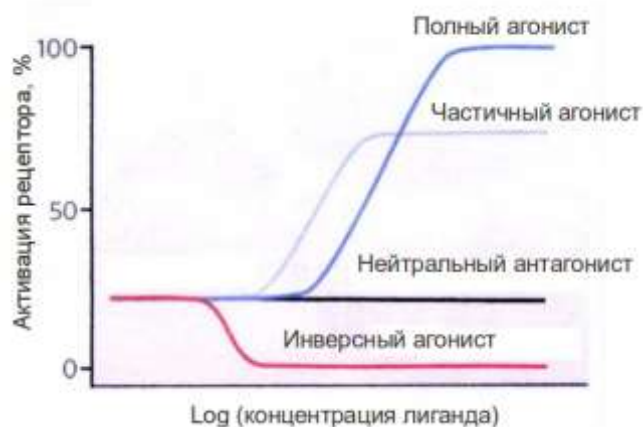


Рис. 1.19. Активность GPCR в зависимости от концентрации лигандов различного типа. Адаптировано из [126].

Для лигандов mAChR было выявлено два сайта связывания лигандов: ортостерический и аллостерический [123]. Агонисты и конкурентные антагонисты взаимодействуют с ортостерическим сайтом, расположенным внутри трансмембранного домена. Аллостерический сайт расположен ближе к внеклеточной части трансмембранного домена, и при взаимодействии с ним существенно изменяется кинетика связывания лигандов с основным (ортостерическим) сайтом. Благодаря этому аллостерическая активность лиганда может быть идентифицирована по влиянию на диссоциацию комплекса рецептора и ортостерического лиганда. Некоторые лиганды мускариновых рецепторов представлены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1. Лиганды мускаринового рецептора M1 типа [127].

Название	Действие на рецептор	Аффинность	Происхождение
Ацетилхолин	Полный агонист	$pK_i = 5,0$	Эндогенный нейромедиатор
Атропин	Антагонист	$pK_i = 8,5-9,7$	Растительный алкалоид
Пирензепин	Антагонист	$pK_i = 7,8-7,9$	Синтетический
NMS	Антагонист	$pK_i = 9,9$	Синтетический
MT7	Антагонист	$pK_i = 11,1$	Белковый токсин из яда змей рода <i>Dendroaspis</i>
Стрихнин	Негативный аллостерический модулятор	$pK_i = 4,9-5,0$	Растительный алкалоид

Мускариновые токсины представляют собой трехпетельные белки, содержащие 65-66 аминокислотных остатков (о них речь пойдет ниже, в Главе 2). Характер взаимодействия мускариновых токсинов с mAChR был исследован как с равновесной, так и с кинетической точки зрения ([127], <http://www.iuphar-db.org/>) с использованием радиоактивных лигандов $^3\text{H-NMS}$, $^3\text{H-QNB}$, $^3\text{H-пирензепина}$ в качестве индикаторов взаимодействия. В Таблице 1.2 приведены значения констант ингибирования K_i , определенные по связыванию $^3\text{H-NMS}$ с mAChR человека.

Было показано, что мускариновый токсин МТ7 взаимодействует с аллостерическим сайтом M1-mAChR, образуя высокостабильный комплекс и блокируя впоследствии связывание $^3\text{H-NMS}$ или $^3\text{H-пирензепина}$ с рецептором в течение нескольких часов [127]. В силу стабильного связывания с рецептором, высокой селективностью и белковой природы (что облегчает введение радиоактивных или флуоресцентных меток) мускариновые токсины представляют собой эффективное средство для определения локализации и изучения активности мускариновых рецепторов.

Таблица 1.2. Константы ингибирования мускариновых токсинов для различных типов рецепторов. Столбцы соответствуют различным токсинам, строки — различным типам рецепторов.

Тип	MT1	MT2	MT3	MT4	MT7	MT α	MT β
M1	20-35 nM	360 nM – 1,5 uM	78-300 nM	62 nM	14 pM	23 nM	> 1 uM
M2	> 1 uM	> 2 uM	> 1 uM	> 1 uM	> 10 uM	44 nM	> 2 uM
M3	> 1 uM	> 2 uM	> 1 uM	> 1 uM	> 10 uM	3 nM	140 nM
M4	30-70 nM	760 nM – 1,9 uM	2 nM	87 nM	> 10 uM	5 nM	120 nM
M5	> 1 uM	> 2 uM	> 1 uM	> 1 uM	> 10 uM	8 nM	350 nM

ГЛАВА 2. ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА LY6/UPAR

В названии семейства трехпетельных белков Ly6/uPAR объединены имена двух представителей: лимфоцитарного антигена-6 (Ly6) и рецептора активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR). Для белков Ly6/uPAR характерно наличие одного или нескольких LU доменов, содержащих 60-90 аминокислотных остатков. LU домен состоит из β -структурного ядра, сформированного из двух β -листов, стабилизированных системой четырех инвариантных дисульфидных связей, и выступающих из ядра трех протяженных петель (Рис. 2.1). Благодаря такой характерной структуре, Ly6/uPAR белки еще называют трехпетельными белками. Функциональное многообразие Ly6/uPAR белков обусловлено вариабельностью петлевых участков. В петлях также могут содержаться дополнительные дисульфидные связи (Рис. 2.1, 2.2).

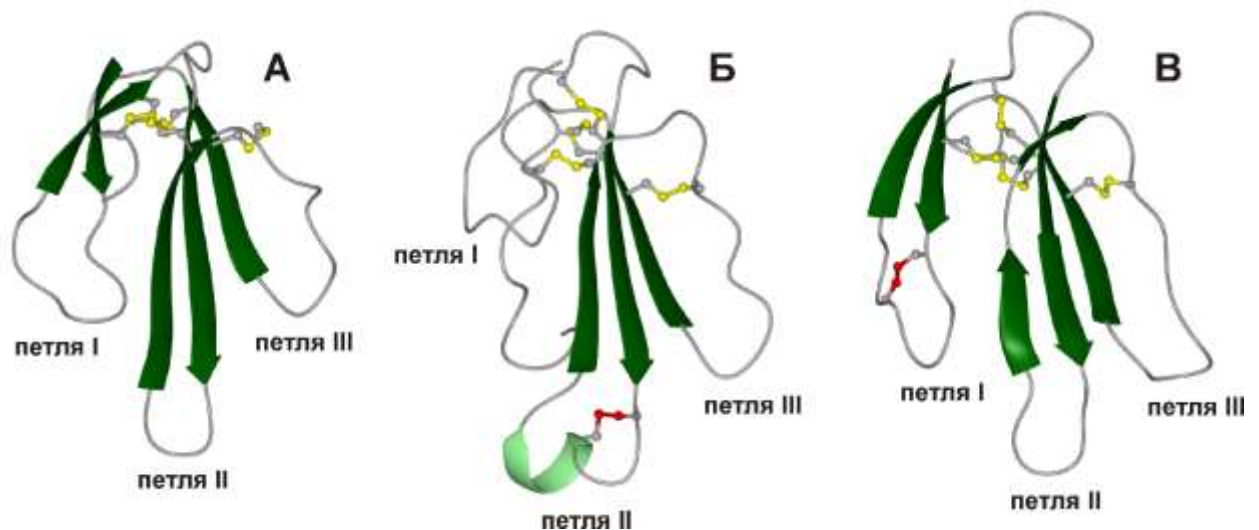


Рис. 2.1. Пространственные структуры α -нейротоксинов в ленточном представлении. (А). Короткий нейротоксин II из яда *Naja oxiana*, (Б). Длинный α -кобротоксин из яда *Naja siamensis*, (В). “Необычный” токсин кандоксин из яда *Bungarus candidus*. Петли, образованные β -листами, обозначены римскими цифрами. Желто-серыми линиями показаны консервативные S-S связи, красно-серыми линиями – дополнительная дисульфидная связь длинных и “необычных” нейротоксинов.

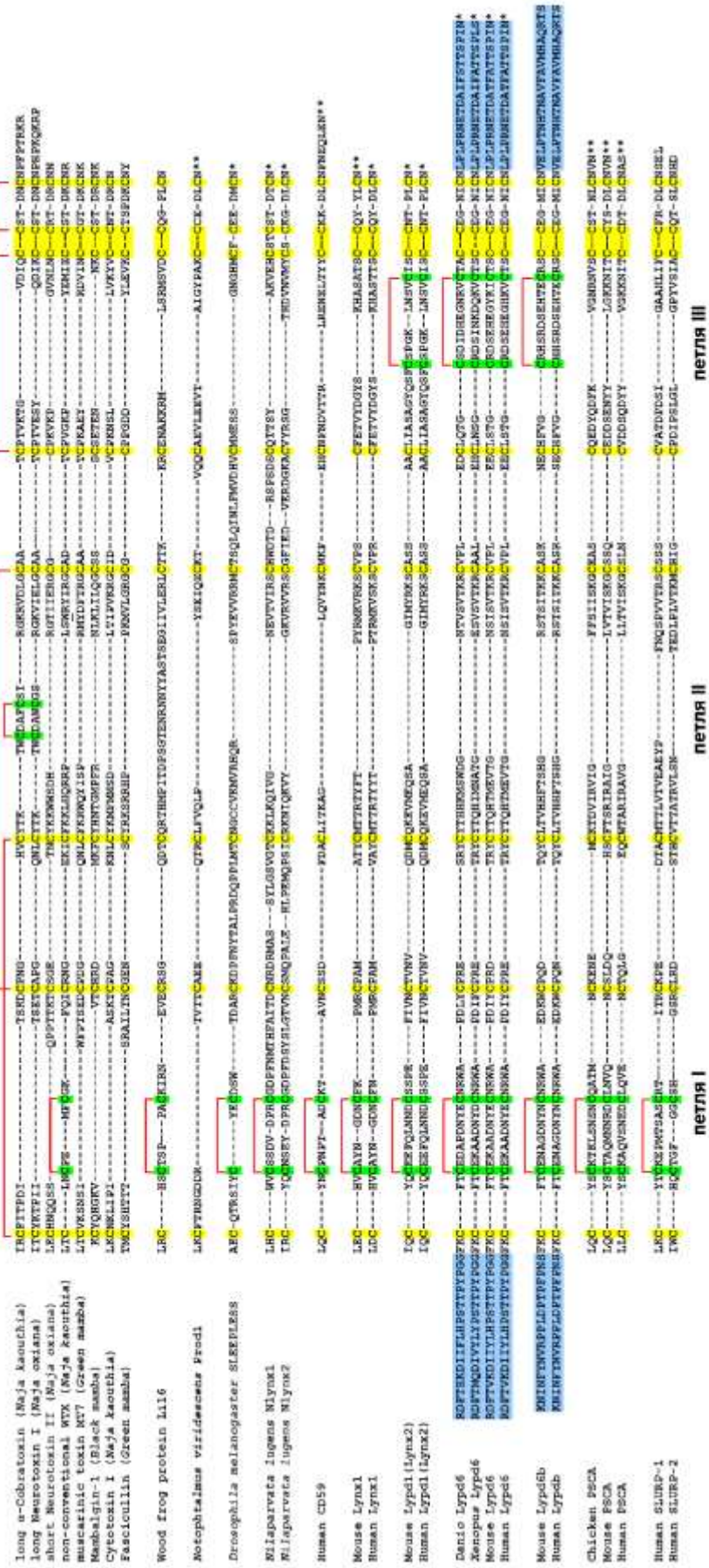


Рис. 2.2. Сравнение аминокислотных последовательностей трехпетельных белков различного происхождения. Остатки консервативных цистеинов показаны желтым цветом. Остатки цистеинов, участвующих в образовании дополнительных дисульфидных связей, показаны зеленым. Голубым цветом показаны дополнительные последовательности Lyrdb6 и Lyrdb5. Одной звездочкой помечены последовательности белков, для которых показано наличие GPI-заякоренной формы, двумя звездочками показаны последовательности белков, для которых показано наличие, как GPI-заякоренной формы, так и секреторируемой формы.

В настоящее время $\text{L}\alpha\text{b}/\text{uPAR}$ белки обнаружены у иглокожих [128], насекомых [129] и хордовых, включая рыб [130], земноводных [131], пресмыкающихся [132], птиц [133] и млекопитающих [134] (Рис. 2.2). Однако, нейротоксины яда змей являются наиболее известными представителями $\text{L}\alpha\text{b}/\text{uPAR}$ белков [135]. Трехпетельные токсины яда змей действуют на различные мишени, среди которых: никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR), α/β -адренергические рецепторы, ГАМК_A-рецепторы, Ca^{2+} каналы L-типа, кислоточувствительные ионные каналы (ASIC), клеточная мембрана и ацетилхолинэстераза [135].

Впервые $\text{L}\alpha\text{b}/\text{uPAR}$ белки у млекопитающих были найдены 40 лет назад в лимфоцитах мыши [136]. Позже были идентифицированы гомологичные им трехпетельные белки человека [137]. Консервативный структурный мотив указывает на большую функциональную важность $\text{L}\alpha\text{b}/\text{uPAR}$ белков у млекопитающих. В геноме человека насчитывается 35 генов, кодирующих $\text{L}\alpha\text{b}/\text{uPAR}$ белки [138]. Функциональная активность большинства этих белков, в настоящее время, остается малоизученной или неизвестной. $\text{L}\alpha\text{b}/\text{uPAR}$ белки принято делить на две группы: секретируемые и закрепленные на клеточной мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитольного якоря (GPI-якоря).

2.1. Токсины из яда змей

α -Нейротоксины и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Основным белковым компонентом ядов змей являются токсины, среди которых наиболее изучены высокоспецифичные ингибиторы nAChR - α -нейротоксины. Эти токсины всегда привлекали огромное внимание, поскольку могут быть использованы как инструменты для изучения свойств nAChR и быть прообразами лекарственных препаратов, направленных на лечение ряда болезней нервной системы [18]. α -Нейротоксины из яда змей содержат 4–5 дисульфидных связей и 60–75 аминокислотных остатков. α -Нейротоксины принято делить на две группы – короткие и длинные. Короткие α -нейротоксины содержат 60-62 аминокислотных остатка, 4 дисульфидные связи, а длинные - 66-75 аминокислотных остатка и 5 дисульфидных связей. Причем 5-я дисульфидная связь расположена в центральной петле (Рис. 2.1). Короткие и длинные α -нейротоксины одинаково эффективно взаимодействуют с nAChR мышечного типа, но с $\alpha 7$ -nAChR нейронального типа эффективно взаимодействуют исключительно

длинные нейротоксины, несущие дополнительную пятую дисульфидную связь в центральной петле [139]. Благодаря изучению кристаллических структур комплексов α -бунгаротоксина (α -Bgtx) и α -кобратоксина с лиганд-связывающими доменами nAChR, было определено, что α -нейротоксины блокируют ортостерический сайт связывания лигандов на рецепторе именно с помощью центральной петли (Рис. 2.3) [140,141].

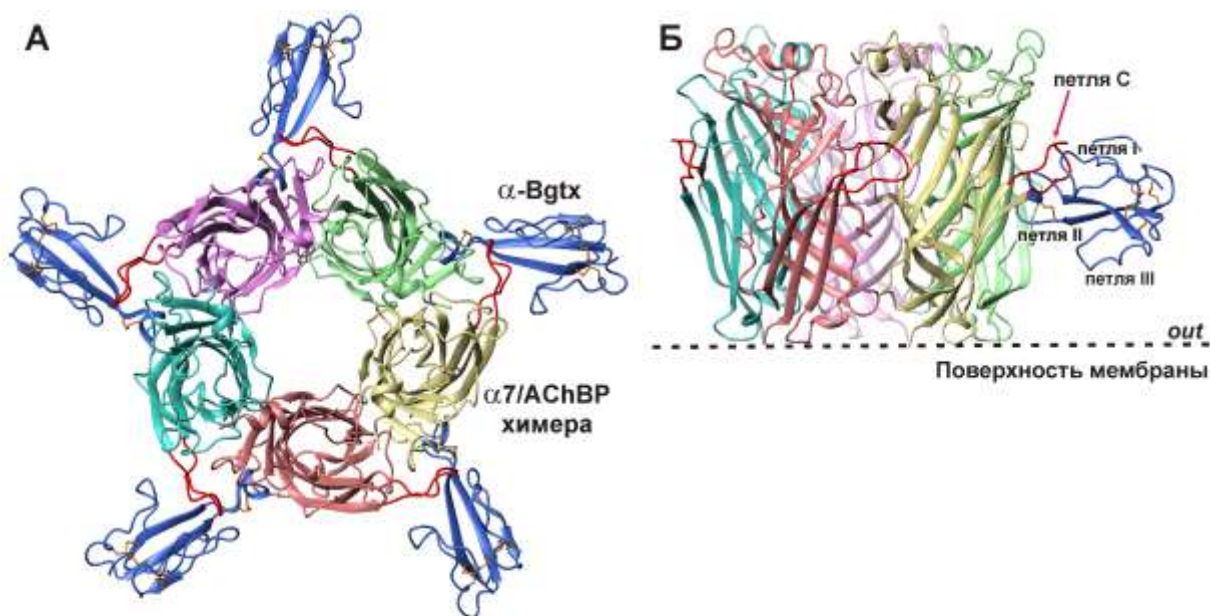


Рис. 2.3. Структура комплекса α -Bgtx с химерным белком, гомологичным внеклеточному домену $\alpha 7$ -nAChR (PDB 4HQF) [141]. Показан вид сверху (А) и вид сбоку (Б). Разные субъединицы рецептора раскрашены в разные цвета. Красным цветом показана С-петля рецептора, закрывающая вход в ортостерический лигандсвязывающий сайт.

Нейротоксины и мускариновые ацетилхолиновые рецепторы. Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR), относящиеся к семейству рецепторов, связанных с G-белками (GPCR) также являются мишенями действия нейротоксинов из яда змей [142]. Мускариновые нейротоксины способны выступать в качестве агонистов, антагонистов или аллостерических модуляторов различных типов mAChR [142]. Из яда мамб выделили несколько трехпетельных мускариновых токсинов (MT1-MT7, 4 дисульфидных связи). MT3 и MT7 из *Dendroaspis angusticeps* являются высокоспецифичными аллостерическими антагонистами по отношению к M1 и M4 mAChR, Таблица 1.2), в то время как остальные мускариновые токсины не так специфичны [142]. Используя метод сайт-направленного мутагенеза недавно было продемонстрировано, что центральная петля токсина является основной структурной детерминантой MT7, необходимой для высокоаффинного взаимодействия с M1-

mAChR, [143] а остаток Arg34, расположенный центральной петле оказался наиболее важным для этого взаимодействия [143].

«Необычные» нейротоксины. Нейротоксины, содержащие пятую дополнительную дисульфидную связь в петле I, получили название «необычных» нейротоксинов. Насчитывается около 30-ти «необычных» нейротоксинов, выделенных исключительно из змей семейства *Elapidae*, в основном это *Naja spp.*, *Bungarus spp.*, *Dendroaspis jamesoni* (мамба) и *Micrurus corallinus* (коралловая змея) [144]. До сих пор остаются не достаточно изученными функции и молекулярные мишени этих токсинов [144]. У большинства «необычных» нейротоксинов значительно более низкая токсичностью (LD_{50} - 5-80 mg/kg), по сравнению с короткими и длинными α -нейротоксинами (LD_{50} - 0.04-0.30 мг/кг) [144]. Однако, есть примеры и высокотоксичных «необычных» токсинов: γ -бунгаротоксин из *B. multicinctus* (LD_{50} ~ 0.15 мг/кг) и кандоксин из *B. candidus* (LD_{50} ~ 0.83 мг/кг) [145] [146]. Семейство «необычных» токсинов не однородно. Согласно филогенетическому анализу, некоторые «необычные» токсины (в большинстве своем из *Naja spp*) ближе к мускариновым токсинам, в то время как токсины из *Bungarus spp* ближе к длинным α -нейротоксинам [132].

Выделенный из *Naja kaouthia* «необычный» (слабый) токсин WTX (LD_{50} > 2 мг/кг) сочетает биологические свойства α -нейротоксинов, и мускариновых токсинов. Подобно α -нейротоксинам WTX необратимо блокирует nAChR мышечного типа и $\alpha 7$ -nAChR, хотя и с низкой аффинностью (IC_{50} ~10 мкМ, [147]). Подобно мускариновым токсинам WTX может аллостерически взаимодействовать с разными типами mAChR, и модулировать их взаимодействие с ортостерическими лигандами, таким как ACh и N-скополамин [147].

Нейротоксины и ГАМК_A-рецепторы. В яде коралловой змеи *Micrurus mipartitus* были обнаружены трехпетельные токсины, действующие на рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК_A-рецепторы), относящиеся к лиганд-управляемым ионным каналам [148]. Токсины MmTX1 и MmTX2 увеличивают чувствительность ГАМК_A-рецепторов к агонистам и действуют в наномолярных концентрациях [148]. В другой работе было показано, что известнейший высокоспецифичный ингибитор nAChR α -Bgtx с значительно меньшей эффективностью (100% ингибирование тока наблюдалось при концентрации токсина 5 мкМ) способен селективно ингибировать ГАМК-индуцированные токи через канал рецептора $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ типа [149].

Нейротоксины и кислоточувствительные ионные каналы (ASIC).

Кислоточувствительные ионные каналы (ASIC) являются нейрональными рецепторами, участвующими в проведении болевых импульсов у млекопитающих и в том числе человека [150]. Недавно из яда черной мамбы были выделены трехпетельные белки – мамбалгины, обладающие анальгезирующим действием, сравнимым по силе с эффектом морфина [151]. Поэтому мамбалгины рассматриваются как прообразы перспективных лекарств, направленных на лечение боли, и возможно, других неврологических заболеваний. Мишенью действия этих нетоксичных трехпетельных белков являются гомо и гетеро рецепторы состоящие из субъединиц: ASIC1a, ASIC1b, ASIC1a/ASIC2a, ASIC1a/ASIC2b ASIC2a/ASIC2b [151].

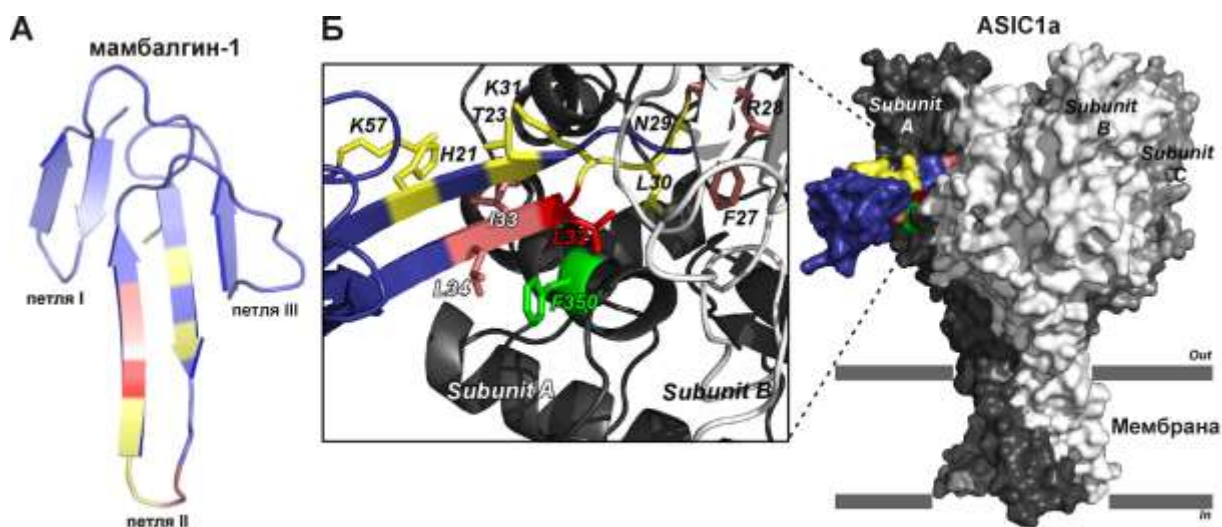


Рис. 2.4. Модель комплекса мамбалгина-1 с каналом ASIC1a [152]. Показаны кристаллическая структура мамбалгина-1 (А) и контакты центральной петли токсина с каналом (Б).

Кристаллическая структура мамбалгина-1 была определена в 2016 году и методами двойного сайт-направленного мутагенеза был определен сайт связывания пептида с каналом ASIC1a [152]. Оказалось, что основным функциональным элементом мамбалгина-1 тоже является центральная петля и расположенные на ней остатки Phe27, Leu32 и Leu34 (Рис. 2.4).

Цитотоксины. Клеточные мембраны являются мишенью действия цитотоксинов из яда змей. В окончаниях петель цитотоксинов расположены гидрофобные аминокислотные остатки, образующие мембраносвязывающий мотив [153]. При взаимодействии с анионными липидами, цитотоксины вызывают дезинтеграцию клеточных мембран например, мембран миоцитов [154]. Поскольку мембраны

бактериальных клеток богаты анионными фосфолипидами, некоторые цитотоксины демонстрируют выраженную антимикробную активность [155]. Была продемонстрирована избирательная активность цитотоксинов и по отношению к раковым клеткам [156]. Активность цитотоксинов на опухолевые клетки зависит как от типа токсина так и от типа раковых клеток. Активность цитотоксинов обусловлена их накоплением в лизосомах, как это было показано на клетках аденокарциномы легкого A549 и промиелоцитарной лейкемии HL60 [157]. При превышении предельной концентрации цитотоксинов в лизосомах, лизосомальная мембрана дезинтегрируется, что приводит к апоптозу или некрозу опухолевых клеток [157].

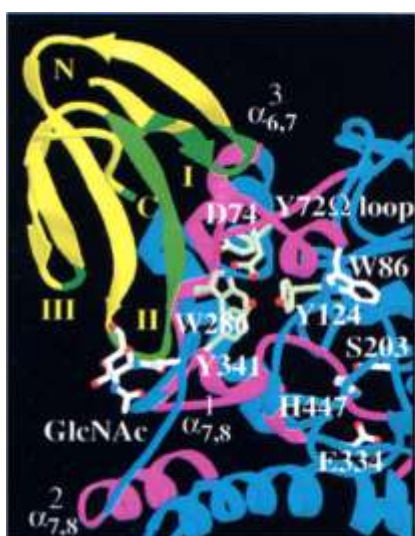


Рис. 2.5. Комплекс фасцикулина-2 с ацетилхолинэстеразой. Вторая петля фасцикулина-2 взаимодействует с периферическим анионным сайтом фермента, тогда как петля I связывается с Ω -петлей ацетилхолинэстеразы. Участки фасцикуллина и фермента, участвующие в образовании комплекса, показаны зеленым и пурпурным цветами, соответственно [158].

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы. Этот тип трехпетельных белков, выделенный из яда мамб *Dendroaspis sp*, вызывает фасцикуляцию мышц из-за накопления в синапсе значительных количеств ACh, вследствие ингибирования токсином фермента ацетилхолинэстеразы. По своей структуре фасцикулины напоминают короткие α -нейротоксины (Рис. 2.1). Методами рентгеноструктурного анализа показано, что фасцикулины взаимодействуют с ацетилхолинэстеразой остатками первой и второй петель (Рис. 2.5). Первая петля токсина отвечает за большую площадь взаимодействия токсина с ацетилхолинэстеразой, в то время как вторая петля, благодаря гидрофобным остаткам, блокирует доступ ACh в каталитический сайт фермента [158].

2.2. Нейромодуляторы насекомых

Регулятор сна дрозофил *Sleepless*. В 2008 г. у дрозофилы был обнаружен ген *sleepless*, необходимый для сна. Кодированный им трехпетельный белок SLEEPLESS экспрессируется в большом количестве в мозге дрозофилы и заякорен на клеточной мембране нейронов с помощью GPI-якоря [129]. Потеря SLEEPLESS приводила к значительному сокращению продолжительности сна (> 80%), в то время как умеренное подавление экспрессии SLEEPLESS оказывало минимальное влияние на сон, но заметно снижало продолжительность восстановительного сна в условиях депривации. Молекулярно-генетический анализ показал, что ранее описанная мутация *quiver*, влияющая на ток через K^+ -канал Shaker, расположена в гене *sleepless*. Дрозофилы с мутацией *quiver*, демонстрируют снижение экспрессии Shaker и страдают бессонницей [129]. Более позднее исследование показало, что белок SLEEPLESS не только увеличивает уровень экспрессии Shaker, но и напрямую взаимодействует с ионным каналом, увеличивая вероятность его открытия [129,159]. Оказывается, SLEEPLESS является антагонистом nAChR [159]. Эти факторы приводят к пониженной возбудимости нервных клеток и к ослаблению синаптической передачи, что в свою очередь вызывает переход из состояния бодрствования в состояние сна [159]. С помощью мутагенеза, в результате которого последовательно удаляли петлевые участки молекулы SLEEPLESS (Рис. 2.6), была выявлена ключевая роль центральной петли белка в его взаимодействии с Shaker и nAChR [160]. Таким образом, SLEEPLESS является важной сигнальной молекулой, контролирующей приход сна.

***Lynx1* и *Lynx2* бурой рисовой цикадки *Nilaparvata lugens*.** В мозге насекомых nAChR отвечают за быструю холинергическую синаптическую передачу и поэтому являются мишенями для неоникотиноидных инсектицидов. У бурой рисовой цикадки *Nilaparvata lugens* обнаружены два трехпетельных белка Nl-lynx1 и Nl-lynx2, модулирующих работу nAChR [161]. Эти белки увеличивают вызванные агонистами макроскопические токи на гетеромерных рецепторах $Nl\alpha1/\beta2$, экспрессированных в ооцитах *Xenopus*, но не влияют на чувствительность к агонистам и степень десенситизации рецептора [162]. Известна мутация Y151S $\alpha1$ -субъединицы рецептора, увеличивающая устойчивость насекомых к неоникотиноидным инсектицидам, таким как имидаклоприд. На мутантных $Nl\alpha1/\beta2$ рецепторах nAChR оба белка Nl-lynx1 и Nl-lynx2 значительно увеличивали амплитуду тока, вызванного имидаклопридом, при

этом, не влияли на токи, вызываемые природным агонистом рецептора ACh [162]. Это свидетельствует о том, что трехпетельные белки NI-lynx1 и NI-lynx2 могут выступать факторами, влияющими на чувствительность насекомых к неоникотиноидным инсектицидам [162].

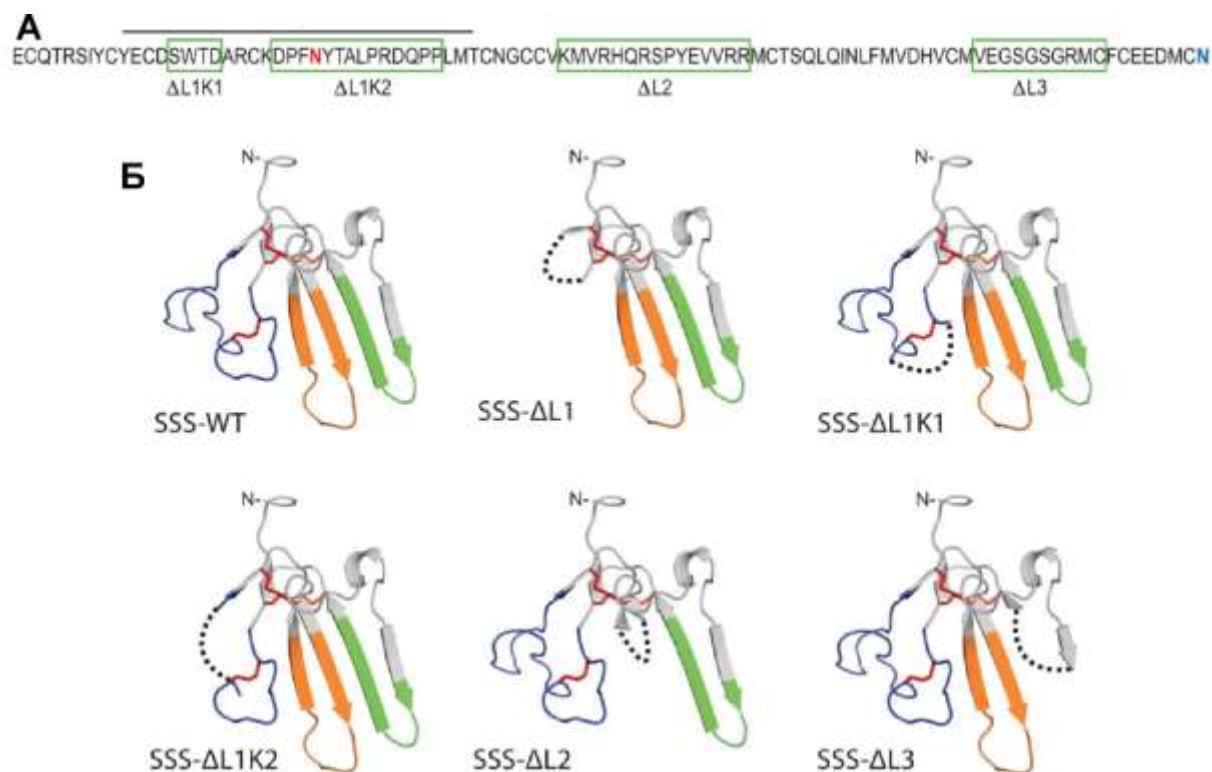


Рис. 2.6. Структурное моделирование мутантов SLEEPLESS с удаленными петлевыми участками. (А). Аминокислотная последовательность SLEEPLESS. Удаленные петли удаления обозначены зелеными прямоугольниками. Предсказанный сайт N-связанного гликозилирования выделен красным, а предсказанный сайт прикрепления GPI-якоря голубым. (Б). Варианты мутантов SLEEPLESS. Красными линиями показаны дисульфидные связи. Области петли обозначены темно-синим (петля I), оранжевым (петля II) и зеленым (петля III). Для всех мутантов удаленные сегменты белка обозначены пунктирной линией [160].

2.3. Трехпетельные белки рыб и земноводных

Белок *Li16* древесной лягушки *Rana sylvatica*. Древесная лягушка *Rana sylvatica* способна пережить продолжительную зимнюю спячку с замерзанием тела до 65%. При замерзании включаются механизмы адаптации, которые контролируют образование льда, предотвращают долговременную ишемию, регулируют изменение клеточного объема и защищают макромолекулы от разрушения. У древесной лягушки был идентифицирован ген *li16*, кодирующий трехпетельный белок, состоящий из 89 аминокислот и содержащий пять дисульфидных связей (Рис. 2.2, [163]). Было показано,

что при замерзании уровень экспрессии белка Li16 значительно увеличивается в течение первых 24 часов. Повышенную экспрессию Li16 вызывали также гипоксия и обезвоживание [163]. При разморозке и восстановлении нормального уровня кислорода экспрессия Li16 быстро снижалась, что, возможно, указывает на важную роль белка Li16 в развитии устойчивости к ишемии во время заморозки [163].

Белок Prod1, – регулятор процессов регенерации конечностей саламандры.

Prod1 – это трехпетельный белок [164], контролирующей направление роста конечностей при регенерации у саламандр [131]. При нарушении экспрессии *prod1* рост локтевой кости и передних пальцев останавливается [165]. Известно, что Prod1 прикрепляется к мембране с помощью GPI-якоря. Недавно группой японских ученых было показано, что мембраносвязанное состояние Prod1 играет важную роль в регуляции клеточной адгезии [166]. Оказалось, что связанные с мембраной молекулы Prod1 агрегируют в плоскости клеточной мембраны и взаимодействуют с молекулами Prod1 на клеточной мембране соседних клеток, что в итоге приводит к инициации клеточной адгезии в процессе регенерации конечностей.

Белок Lypd6, – регулятор процессов эмбриогенеза рыб и лягушек. В ходе эмбриогенеза рыбки *Danio rerio* на стадиях бластулы, гастрюлы, сегментации и органогенеза была показана экспрессия гена, кодирующего трехпетельный белок Lypd6 [130]. Было показано, что Lypd6 является положительным регулятором передачи сигналов в Wnt/ β -катенин каскаде, регулирующем эмбриогенез и дифференциацию клеток [130]. Суперэкспрессия ингибиторов Wnt/ β -катенин сигнального каскада Axin1 и Dkk1 в трансгенных эмбрионах подавляла экспрессию *lypd6* на стадии гастрюлы и сомитогенеза. В то же время суперэкспрессия активатора передачи сигналов *wnt8* в трансгенных эмбрионах приводила к значительному увеличению экспрессии *lypd6* на стадии сомитогенеза. Подавление экспрессии гена *lypd6* приводит к остановке развития эмбрионов, причем при дополнительной инъекции мРНК, кодирующей Lypd6, наблюдалось нормальное развитие эмбриона [130]. Также было обнаружено, что закрепление Lypd6 с помощью GPI-якоря в мембранных рафтах является необходимым условием для взаимодействия с компонентами рецепторного комплекса Lrp6/Frizzled8, при этом присутствие лиганда Wnt3a значительно усиливает взаимодействие между Lypd6 и Frizzled8. Lypd6 также способствовал активации фосфорилирования Lrp6 в мембранных рафтах [130]. Гомолог белка Lypd6 (Xlypd6, степень гомологии с белком рыбок ~ 85 %, Рис. 2.2) был обнаружен также у лягушек *Xenopus*. Xlypd6

демонстрирует схожую с *Lypd6 Danio rerio* экспрессию во время эмбриогенеза. *Xlypd6* обнаруживается на стадии бластулы, во время гаструляции он экспрессируется в эктодерме и мезодерме, а во время нейруляции – в нервной пластинке [130].

Кроме того, в хромосоме 2 *Danio rerio* обнаружили кластер генов, кодирующий три секретируемых трехпетельных белка, экспрессирующихся во внутреннем зародышевом слое (энтодерме) [167]. И хотя функция этих белков пока неизвестна, предполагается, что они участвуют в развитии внутренних органов [167].

2.4. Трехпетельные белки млекопитающих

Гликопротеин CD59, ингибитор мембраноатакующего комплекса, или протектин. CD59 является регуляторным белком системы комплемента, закрепленным в клеточной мембране посредством GPI-якоря. Этот белок обнаружен в клетках крови, включая лейкоциты, эритроциты, тромбоциты, а также в эпителиальных, эндотелиальных и плацентарных клетках. Кроме того, растворимые формы CD59 были найдены в слюне, амниотической жидкости и моче [137]. Мутации гена самого белка CD59 или генов ферментов, отвечающих за синтез гликозилфосфатидинозитола, например, субъединицы А фосфатидинозитол-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (PIG-A), приводят к частичному или полному элиминированию CD59. Такие мутации приводят к комплемент-опосредованному лизису эритроцитов и развитию различных форм гемолитической анемии [168]. Пространственная структура CD59 человека была определена методом ЯМР-спектроскопии в 1994 году и стала первой структурой трехпетельного белка млекопитающих [137]. Белок имеет характерную трехпетельную структуру, но в отличие от полностью β -структурных нейротоксинов змей, в удлиненной третьей петле CD59 содержится α -спиральный участок.

Рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR). Рецептор урокиназы uPA, по имени которого и было названо семейство трехпетельных белков, присутствует на моноцитах, фибробластах, тромбоцитах и эндотелиальных клетках. Кроме того, uPAR продуцируется опухолевыми клетками. Система uPA/uPAR участвует в регуляции пролиферации, дифференцировке, адгезии, миграции, инвазии клеток, в активации факторов роста и плазминогена, а также в ремоделировании внеклеточного матрикса и базальной мембраны [169]. Как и многие другие трехпетельные белки uPAR заякорен на мембране посредством GPI-якоря, однако существует и suPAR - растворимая форма рецептора (Рис. 2.7). Высокая концентрация

suPAR связана с ухудшением прогноза течения некоторых онкологических заболеваний. Поэтому ингибирование экспрессии или активности uPAR рассматривается как перспективный подход при лечении некоторых видов рака [170].

uPAR образован тремя «трехпетельными» или LU-доменами, которые обозначаются D1, D2 и D3 (Рис. 2.7) [171]. Активация плазминогена происходит при взаимодействии N-концевого участка uPA (ATF) с LU доменами рецептора. Кроме того, может происходить отщепление доменов D2 и D3 с их последующим взаимодействием с рецептором липоксина A4 (LXA4R), что в свою очередь ведет к передаче сигналов хемотаксиса [169]. Показано, что рецептор урокиназы также может связываться с рядом интегринов, в том числе экспрессированными на соседних клетках, способствуя тем самым межклеточному взаимодействию и адгезии [169].

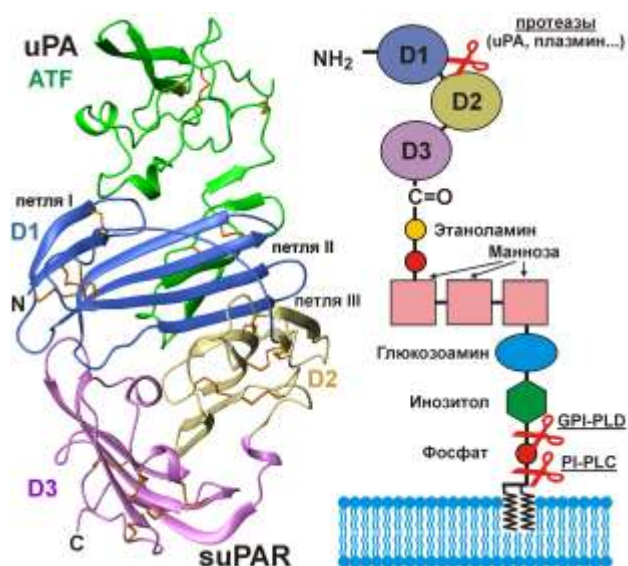


Рис. 2.7. Структура комплекса N-концевого фрагмента uPA (ATF) и водорастворимого аналога uPAR (suPAR, PDB 2FD6) [171]. Три LU-домена молекулы uPAR (D1, D2, D3) показаны разными цветами. К C-концевой последовательности uPAR присоединяется GPI-якорь, прикрепляющий рецептор к клеточной мембране. Справа показано схематическое строение uPAR, содержащего GPI-якорь. Показаны места возможного расщепления молекулы uPAR, которое приводит к формированию активных растворимых сигнальных форм рецептора.

Lynx1 – фактор нейрональной пластичности млекопитающих. Lynx1 является первым белком Lu6-uPAR, обнаруженным в центральной нервной системе млекопитающих [134]. Экспрессия Lynx1 обнаружена в клетках Пуркинье, в ядрах мозжечка, в нейронах V и VI слоя коры головного мозга, а также в гиппокампе – в полях CA2 и CA3 [134]. Было показано, что Lynx1 связан с мембраной GPI-якорем и солокализован с nAChR в коре головного мозга, таламусе, черной субстанции, мозжечке, гиппокампе и в амигдале [172]. Также экспрессия Lynx1 обнаружена, в ГАМК-ергических парвальбуминовых интернейронах зрительной коры головного мозга мыши [173].

Совместная экспрессия GPI-заякоренного Lynx1 и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR в культуре нейронов приводила к увеличению времени и степени десенситизации рецептора, а также проводимости канала [172]. Было показано, что Lynx1 может влиять на сборку $\alpha 4\beta 2$ -nAChR в эндоплазматическом ретикулуме, влияя на конечную стехиометрию рецептора. В присутствии Lynx1 стабилизируются $\alpha 4/\alpha 4$, но не $\beta 2/\beta 2$ димеры рецептора, что приводит к сдвигу стехиометрического состава в сторону nAChR с пониженной чувствительностью к ACh, $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ -nAChR, по сравнению с $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ -nAChR [174].

Создание трансгенных мышей, нокаутных по гену *lynx1*, позволило получить ряд уникальных данных о роли этого белка. Было показано, что нейроны нокаутных мышей более чувствительны к никотину [175]. У нокаутных мышей, в присутствии никотина, увеличивалась реакция на сигнальный стимул в тесте условно-рефлекторного избегания, а также повышалась моторная активность в тесте рота-род [175]. Интересно, что трансгенные мыши с экспрессирующей секретируемую форму Lynx1 демонстрировали повышенную обучаемость, в то время как трансгенные мыши с повышенной продукцией GPI-заякоренного Lynx1 не обладали улучшенными способностями к обучению [176]. Предполагается, что растворимый Lynx1 может использоваться как инструмент для регуляции ACh-зависимой пластичности мозга и механизмов обучения [176].

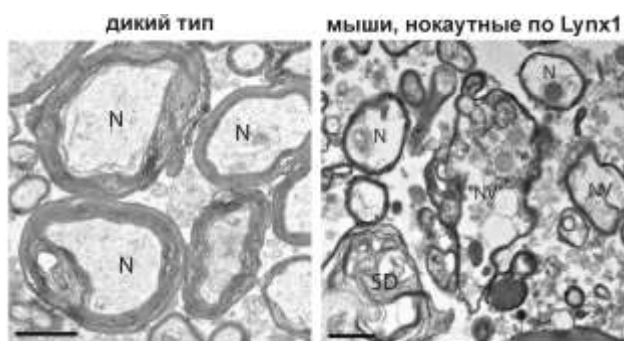


Рис. 2.8. Разрушение пучков нервных волокон у 13-месячных мышей, нокаутных по гену *lynx1*. У трансгенных мышей наблюдается увеличение расстояния между волокнами, утоньшение миелиновой оболочки (обозначено SD) и вакуолизация аксона (обозначено как NV). Масштаб линейки 1 мкм [177].

При исследовании нейродегенерации разновозрастных нокаутных мышей в 13-месячном возрасте было обнаружено разрушение пучков нервных волокон, а также потеря нервных волокон и нейрональных ядер в дорсальном полосатом теле (Рис. 2.8) [177]. Кроме того, наблюдалась вакуолизация и разрушение миелиновой оболочки нервных волокон при старении. Эти морфологические признаки не наблюдались у молодых трансгенных мышей или у гетерозиготных мышей любого возраста, что

указывает на привлекательную возможность потенциального поддержания здоровья нейронов при увеличении концентрации Lynx1 [177].

Монокулярная депривация в ювенильном возрасте приводит к потере зрения у животных. У мышей с нокаутом по гену *lynx1* происходило восстановление зрения после окончания критического периода [178]. В течение критического периода в первичной зрительной коре повышена активность тканевого активатора плазминогена (ТАП), а у взрослых животных активность ТАП не изменяется [179]. При этом у взрослых нокаутных по *lynx1* мышей активность ТАП была повышена, что приводило к уменьшению плотности дендритных шипиков и изменению формирования глазодоминантности [179]. Исследование вклада Lynx1 в изменение формы дендритных шипиков до и после монокулярной депривации показало, что делеция *lynx1* увеличивает скорость появления и исчезновения дендритных шипиков в коре головного мозга взрослых животных [180]. Таким образом, Lynx1 является одним из факторов, регулирующих завершение критического периода и пластичность мозга молодых животных.

Примечательно, что белки Lynx1 насекомых и млекопитающих имеют очень низкую степень гомологии (~19%, при этом 10% приходится на консервативные остатки цистеина). Напротив, среди млекопитающих наблюдается высокая степень гомологии белков Lynx1 (~90%, Рис. 2.2). Таким образом, белки Lynx1 насекомых и млекопитающих объединяет только название, и, несмотря, на схожие мишени действия, активность и функции этих белков могут существенно различаться.

Lynx1 модулирует холинергическую активность в нормальных и опухолевых клетках бронхиального эпителия. Кроме мозга, Lynx1 также обнаружен в ткани легкого и почках [134,181]. В нормальной и опухолевой легочной ткани Lynx1 действует как негативный модулятор nAChR [112]. В здоровой легочной ткани Lynx1 снижает индуцированное никотином увеличение экспрессии nAChR и ГАМК_A-рецепторов и контролирует синтеза муцина [112]. Уровень экспрессии Lynx1 при раке легкого понижен по сравнению с уровнем экспрессии в здоровой легочной ткани. При этом нокаут гена *lynx1* стимулирует рост раковых клеток, а суперэкспрессия *lynx1* наоборот приводит к снижению их пролиферации [112]. Таким образом, Lynx1 является прообразом препаратов, нацеленных на лечение астмы и хронической обструктивной болезни лёгких, а также для лекарств, ограничивающих рост опухолевых клеток

легкого. Стоит отметить, что помимо *Lynx1*, экспрессия нейромодулятора *Lynx2* также была обнаружена в тканях легкого [112].

Нейромодулятор *Lynx2*. В клетках центральной и периферической нервной системы эмбрионов мышей была обнаружена экспрессия *Lynx2* [182]. Высокий уровень экспрессии белка *Lynx2* был обнаружен в областях мозга, отвечающих за контроль уровня тревожности: префронтальной коре, базолатеральной миндалине, гиппокампе и медиадорсальном ядре таламуса [182]. В спинном мозге *lynx2* экспрессируется в нейронах шейного, грудного и поясничного отделов [182]. В зрительной коре экспрессия мРНК *lynx2* наблюдается уже к моменту рождения [178].

Обнаружено, что *Lynx2* увеличивает десенситизацию и ингибирует ток через $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *Xenopus* [183]. Также *Lynx2* образует комплекс преимущественно с $\alpha 4$ субъединицей $\alpha 4\beta 2$ -nAChR и уменьшает экспрессию рецепторов, экспонированных на клеточной мембране [184]. Вероятно, *Lynx2* может влиять на стехиометрию $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, процессированного в эндоплазматическом ретикулуме, как это было выявлено для нейромодулятора *Lynx1* [174].

Несмотря на близкие фармакологические свойства, профиль экспрессии *lynx1* и *lynx2* в мозге существенно различается, указывая на участие этих нейромодуляторов в различных процессах. Об этом свидетельствуют и эксперименты с нокаутными по гену *lynx2* мышами [183]. Мыши, нокаутные по гену *Lynx2*, в тестах на тревожность демонстрировали повышенную тревожность и беспокойное поведение [183], при этом обладая нормальной моторной и сенсомоторной активностью по сравнению с диким типом (в отличие от мышей, нокаутных по гену *lynx1*, [175]). Кроме того, пациенты, у которых обнаруживается одиночный нуклеотидный полиморфизм в гене *LYNX2*, по ряду диагностических показателей демонстрируют симптомы повышенной тревожности (личная коммуникация с проф. Дж. Мива). Эти данные позволяют предположить, что *Lynx2* у млекопитающих задействован в контроле уровня тревожности. Однако конкретные мишени и механизм действия нейромодулятора в настоящее время остаются неизвестными.

Нейромодулятор *Lypd6*. Ген *lypd6* экспрессируется в спинном мозге и в коре головного мозга мышей (преимущественно в V и VI слоях) [185]. У крыс ген *lypd6* экспрессируется в мозге, тканях легкого, почек, сердца, печени и простаты [186]. У человека экспрессия *lypd6* обнаружена во многих тканях, более всего в головном мозге и сердце [187]. Также как и *lynx1*, нейромодулятор *lypd6* экспрессируется в ГАМК-

ергических интернейронах зрительной коры головного мозга мышей [173]. Причем, экспрессия *lynx1* наблюдалась только в интернейронах, экспрессирующих парвальбумин, а экспрессия *lypd6* была обнаружена только в интернейронах, экспрессирующих соматостатин [173]. Примечательно, что в интернейронах, экспрессирующих серотонин, не было обнаружено мРНК ни *lynx1*, ни *lypd6* [173]. Подобное разграничение областей экспрессии разных нейромодуляторов в мозге потенциально имеет важное значение и открывает возможность для специфической и направленной стимуляции отдельных популяций интернейронов при лечении когнитивных расстройств [173]. Однако, следует учитывать, что эти же нейромодуляторы могут экспрессироваться и в других жизненно важных органах [186,187].

Lyrd6 усиливает амплитуду Ca^{2+} -тока в нейронах тригемнального ганглия мыши при стимуляции никотином [185]. Стоит отметить, что трансгенные мыши с суперпродукцией *Lyrd6* характеризуются усиленным холинергическим тонусом, например для них характерна повышенная локомоторная активность, и висцеральная гипералгезия [185]. Применение селективных ингибиторов $\alpha 7$ -nAChR (α -Bgtx и метилкаконирина), показало, что мишенью действия *Lyrd6* не является гомопентамерный $\alpha 7$ -nAChR [185]. С другой стороны, в работе [186] было показано, что рекомбинантный вариант *Lyrd6*, с N-концевой глутатион-S-трансферазой (GST), способен ингибировать никотин-индуцированный ток на срезах CA1 слоя гиппокампа. Возможно, отличие в активности эндогенного и рекомбинантного *Lyrd6* связано, с наличием глутатион-S-трансферазы.

Введение ювинальным крысам никотина (начиная с 7-го эмбрионального дня до 21-го постнатального дня), приводило к значительному повышению экспрессии *Lyrd6* в гиппокампе. У взрослых крыс такого повышения уровня экспрессии нейромодулятора не наблюдалось [186]. Также не было обнаружено существенных изменений в профиле экспрессии *Lynx1* и $\beta 2$ субъединицы nAChR [186]. Все попытки получить мышей нокаутных по гену *lypd6* приводили либо к смерти, либо к появлению животных, не способных к дальнейшему размножению [185]. Эти наблюдения, а также высокая гомология аминокислотной последовательности *Lyrd6* мыши и *Danio rerio* (~ 87 %, Рис. 2.2), указывают на важную роль холинергической регуляции *Lyrd6* в эмбриональном развитии.

Как было отмечено выше, Lypd6 рыбы *Danio rerio* может участвовать в образовании рецепторного комплекса Wnt/ β -катенинового сигнального пути, который участвует в развитии эмбрионов [130]. Недавно было описано взаимодействие LU-домена Lypd6 человека с ко-рецептором Wnt – белком LRP6 [188], что согласуется с данными, полученными для Lypd6 *D. rerio*. Вероятно, Lypd6 связывается с доменом PE1 LRP6 с помощью мотива Asn42-Ser-Ile44, расположенного на конце петли II.

Нейромодулятор Lypd6b. Экспрессия гена *lypd6b*, кодирующего белок Lypd6b, известный также под названием Lypd7, была обнаружена в семенниках, легких, желудке, предстательной железе, мозге и других органах человека [189]. Показано, что *lypd6b* экспрессируется как в глутамат-ергических, так и ГАМК-ергических интернейронах глубоких слоев зрительной коры головного мозга взрослых мышей [173]. Lypd6 и Lypd6b демонстрируют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей (~54%, Рис.2.2). Также как у нейромодулятора Lypd6, к C-концевой аминокислотной последовательности Lypd6b потенциально может присоединяться GPI-якорь. Однако в настоящее время наличие GPI-якоря подтверждено только для Lypd6 [130]. Отличительной чертой, Lypd6 и Lypd6b является наличие дополнительных протяженных N- и C-концевых последовательностей, выступающих за пределы LU-домена (Рис. 2.2). Роль этих экстра-последовательностей на данный момент неизвестна.

Показано, что совместная экспрессия в ооцитах *Xenopus* Lypd6b с $\alpha 3\beta 4$ -nAChR увеличивает скорость десенситизации и чувствительность к ACh рецепторов состава $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$. Кроме того, Lypd6b ингибирует $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ -nAChR, но не мутантный рецептор, с заменой D/N в 398 положении субъединицы $\alpha 5$. Данную мутацию связывают с развитием никотиновой зависимости [190].

PSCA, – антиген стволовых клеток предстательной железы. PSCA обнаружен как в виде GPI-заякоренной формы [191], так и в растворимой форме [192]. Ген *psca* экспрессируется в эпителии мочевого пузыря, почек, пищевода, желудка, коже, базальных клетках предстательной железы и тканях плаценты [193,194]. PSCA является маркером нескольких видов рака, например, предстательной железы [195], желудка [196,197] и мочевого пузыря [198]. Уровень экспрессии PSCA сильно варьируется в разных типах опухолей. Предполагается, что PSCA обладает онкогенной активностью при раке предстательной железы и глиоме, но является супрессором опухолей при раке желудка и желчного пузыря [194].

В 2009 году впервые было показано, что PSCA экспрессируется также и в клетках ЦНС: экспрессию гена *pzca* обнаружили в цилиарных ганглиях курицы на 14 день эмбрионального развития, при этом вплоть до 8 дня экспрессия гена не наблюдалась [133]. На поздних стадиях эмбрионального развития небольшая экспрессия *pzca* наблюдалась также в грудных мышцах, печени, яичниках, яичках, сердце и мозжечке. Заметно большая экспрессия *pzca* наблюдалась в автономных вегетативных ганглиях: в цилиарных ганглиях, в поясничных симпатических ганглиях и в спинных ганглиях ствола головного мозга [133]. Также как и у куриных эмбрионов на поздних стадиях эмбрионального развития, в нейрональных тканях взрослых мышей содержалось значительно больше *pzca*, чем в не-нейрональных тканях. Таким образом, *pzca* экспрессируется в больших количествах в нервной системе, млекопитающих и птиц. Также было показано, что уровень экспрессии *pzca* коррелирует с экспрессией $\alpha 7$ -nAChR [133].

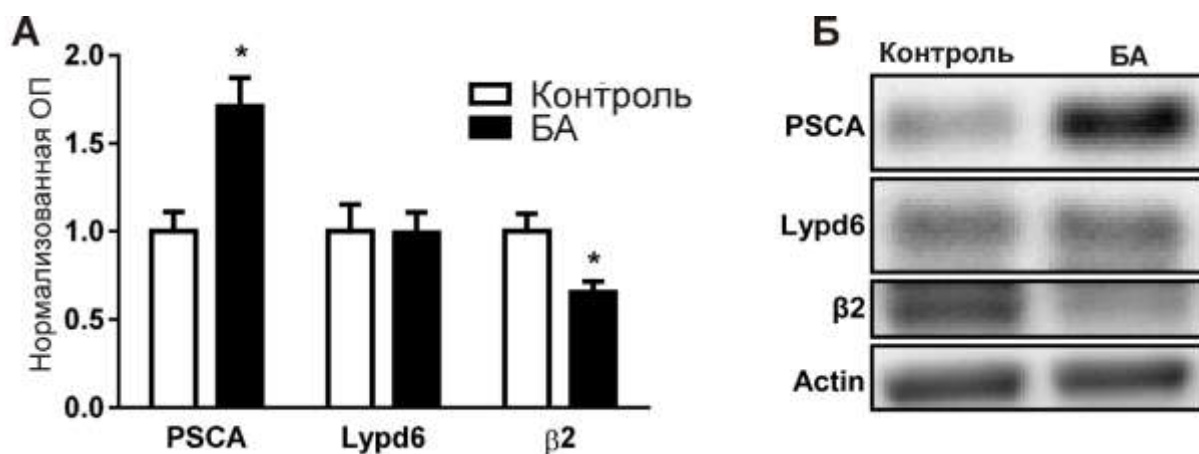


Рис. 2.9. Уровень PSCA повышен у пациентов с БА. (А). Нормализованные значения ОП белков PSCA и Lypd6, а также субъединицы $\beta 2$ nAChR из гомогенатов мозга пациентов с БА и здоровых людей (Контроль). (Б). Изображение вестерн-блота (адаптировано из работы [192]).

Установлено, что в нейронах цилиарного ганглия PSCA блокирует активацию $\alpha 7$ -nAChR. Гибель нейронов хориоидного сплетения, но не нейронов цилиарного ганглия снижена в трансгенных куриных эмбрионах суперэкспрессирующих *pzca* [133]. Кроме того, показано, что PSCA ингибирует никотин-индуцированное фосфорилирование MAP киназы ERK1/2 в клетках PC12 на ~30% [192]. Таким образом, PSCA, возможно, принимает участие в регуляции передачи сигналов по MAP/ERK-пути, который играет важную роль в регуляции синаптической пластичности. В лобной коре головного мозга

людей с БА, содержится на 70 % больше PSCA чем у здоровых людей (Рис. 2.9) [192]. Это указывает на возможное вовлечение PSCA в патогенез болезни Альцгеймера.

Секретируемые белки SLURP-1 и SLURP-2. SLURP-1 и SLURP-2 экспрессируются в клетках кожи и иммунной системы млекопитающих и считаются ауто/паракринными регуляторами гомеостаза клеток эпителия [199]. Белки SLURP участвуют в регуляции таких процессов как рост, миграция и дифференцировка эпителиальных клеток, а кроме того в развитии воспалений и опухолей [199]. SLURP-1 проявляет антипролиферативную активность в отношении кератиноцитов человека и способствует их апоптозу [200]. SLURP-2 напротив, ускоряет рост клеток, тормозя их дифференцировку и снижая ответ на проапоптотические сигналы [201]. Оба белка SLURP участвуют в регуляции заживления ран на слизистых оболочках и коже [202]. Следует отметить, что белки SLURP вовлечены в патогенез некоторых заболеваний кожи: точечные мутации в гене SLURP-1 связаны с развитием кератодермы Mal de Meleda [203], гиперэкспрессия SLURP-2 обнаружена при псориазе [204], а нокаут гена SLURP-2 приводит к развитию ладонно-подошвенной кератодермии [205]. Предположительными мишенями действия SLURP-1 и SLURP-2 до 2016 г считались $\alpha 7$ -nAChR и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, соответственно [200], [201].

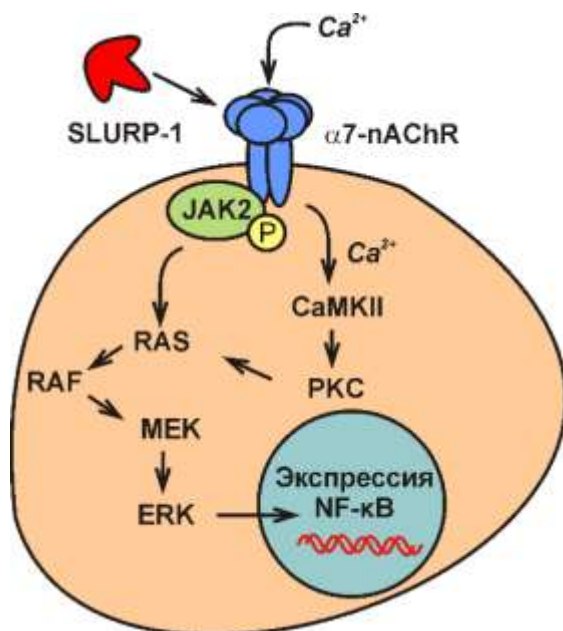


Рис. 2.10. Механизм регуляции экспрессии NF- κ B в кератиноцитах посредством SLURP-1. Активация $\alpha 7$ -nAChR с помощью SLURP-1 приводит к усилению экспрессии гена NF- κ B за счет активации сигнального каскада RAF-1/MEK1/ERK, которая происходит по метаболитному пути вследствие фосфорилирования JAK2 и по Ca^{2+} -зависимому пути, вследствие активации CaMKII/PKC. NF- κ B – ядерный фактор “каппа-би”, JAK – Янус-киназа, RAS – малая GTP-аза, RAF-1 – серин-теронинная протеинкиназа, MEK – митоген активируемая киназа, ERK – внеклеточные регулируемые сигналом киназы, CaMKII – Ca/кальмодулин-зависимая киназа, PKC – протеинкиназа.

У пациентов с кератодермой Mal de Meleda зачастую развиваются также плоскоклеточная карцинома кожи и меланома [206]. Показано, что в эпителиальных опухолевых клетках экспрессия гена *SLURP-1* снижена, и это снижение коррелирует со

стадией течения опухолевого заболевания [206]. Снижение экспрессии гена *SLURP-1* также наблюдается при раке кишечника [207] и легкого [208], а снижение экспрессии генов обоих белков *SLURP-1* и *SLURP-2* обнаружено в кератиноцитах при онкогенной трансформации, индуцированной нитрозамином NNK и NNN [199]. Кроме того, показано, что инкубация эпителиальных клеток с рекомбинантным *SLURP-1* отменяет вызванное нитрозамином увеличение экспрессии онкогенов [209,210]. Таким образом, белки *SLURP* являются протекторами от нитрозамин-индуцированной онкогенной трансформации эпителиальных клеток. *SLURP-1* обуславливает подавление миграции клеток и инвазивность рака поджелудочной железы (PDAC). Сравнительно высокая концентрация *SLURP-1* в крови пациентов с PDAC коррелирует с большей продолжительностью жизни после хирургического удаления первичной опухоли [211].

В передаче внутриклеточного сигнала в кератиноцитах вероятно участвует ассоциированная с $\alpha 7$ -nAChR тирозинкиназа Jak2. Показано, что при обработке кератиноцитов препаратом *SLURP-1* происходит активация сигнального каскада Jak2/Ras/Raf-1/MEK/ERK, возможно, по не-ионному механизму. Одновременно может происходить Ca^{2+} опосредованная активация сигнального каскада CaMKII/PKC [212]. Совместно это приводит к увеличению экспрессии фактора NF- κ B, регулирующего воспалительные клеточные процессы и принимающего участие в пролиферации и дифференцировке клеток (Рис. 2.10, [212]).

В качестве заключения можно отметить, что открытие у млекопитающих трехпетельных белков, обладающих структурной гомологией с трехпетельными токсинами змей, и схожими мишенями действия (nAChR, mAChR) вызвало множество вопросов, посвященных эволюционным связям внутри семейства Луб/uPAR. В настоящий момент большинство вопросов остаются нерешенными, однако наличие трехпетельных белков у насекомых, рыб и амфибий, позволяет предположить, что все же змеиные токсины имеют более позднее происхождение. Возможно, в ходе эволюции трехпетельные токсины приобрели способность взаимодействовать с мишенями эндогенных белков, регулирующих работу жизненно важных рецепторов, при этом получив ряд уникальных свойств, таких как высокая селективность, аффинность и способность необратимо блокировать рецепторы-мишени.

Все описанные на сегодняшний день эндогенные представители семейства Луб/uPAR играют ключевую роль в жизнедеятельности организма. Нарушение экспрессии одних из них приводит к возникновению различных заболеваний, в то время

как нарушение экспрессии других, например, *Lurd6*, носит летальный характер. В связи с этим особую актуальность приобретает вопрос о создании эффективных рекомбинантных систем продукции, позволяющих получать миллиграммовые количества *Lub/uPAR* белков, необходимых для проведения их структурно-функциональных исследований. Созданию таких рекомбинантных систем, а также получению и исследованию структурно-функциональных свойств ряда белков семейства *Lub/uPAR*, включая эндогенные пептиды человека, и посвящена настоящая работа.

ЧАСТЬ II. ЭСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

3.1.1. Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы:

Tris, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NH_4Cl , сульфит натрия, дитиотреитол (DTT), KOH, NaOH, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), трифторуксусная кислота, ацетонитрил, Triton X-100, мочеви́на, L-аргинин, глицерин – Panreac, Испания.

CaCl_2 – Fluka, Германия.

HEPES, MgSO_4 , восстановленный глутатион (GSH), окисленный глутатион (GSSG), тетрационат натрия, бычий сывороточный альбумин (BSA), фибронектин, бычий коллаген I-го типа, EGTA, коктейль ингибиторов протеаз для тканей млекопитающих, гидрохлорид мекамиламина (Mec), никотин, вортманнин и йодистый пропиций - Sigma-Aldrich, США.

$^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -глюкоза – Cambridge Isotope Laboratories, Великобритания.

Реактив для выделения тотальной РНК ExtractRNA, набор для синтеза кДНК MMLV RT kit, смесь для ПЦР в реальном времени с красителями и ДНК-полимеразой qPCR mix-HS SYBRHigh ROX – Евроген, Россия.

Триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар – BD Biosciences, США.

Водорастворимый тетразолиевый краситель WST-1, 1-метокси-5-метилфеназин метилсульфат (1-m-PMS), JSH-23 - Santa Cruz, США.

Бунгаротоксин, гeфитиниб, атропин, бикуюлин, гeфитиниб, AG-825, тимолол, метилликаконитин (MLA), PD98059, SP600125, SB203580, Bay-11-7082 и Go 6983 – Tocris, Великобритания

S31-201, 285986-31-4, ксестоспонджин В - Calbiochem (USA).

Соляная кислота, уксусная кислота – Химмед, Россия.

Для приготовления растворов и буферов использовали дистиллированную воду, дополнительно очищенную на установке Milli-Q (Millipore, США).

3.1.2. Бактериальные и эукариотические клеточные линии

Escherichia Coli XL-1 Blue: *endA1, HsdR17(r_km_k⁺), supE44, thi-1, λ⁻ recA1, gyrA96, relA1, Δ(lac), [F', proAB, lacI^q, ZΔM15, Tn10^{tet}]* (Stratagene, США).

Escherichia Coli BL21(DE3)*pLysS: F ompThsdS_B((r_Bm_B⁺) gal dcm (DE3) pLysS Cm^r* (Novagene, США).

Escherichia Coli BL21(DE3): *F ompThsdS_B((r_Bm_B⁺) gal dcm (DE3)* (Novagene, США).

Het-1A – нормальные иммортализованные кератиноциты пищевода человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC).

A431 – эпидермоидная карцинома человека, характеризуется повышенным уровнем экспрессии EGFR (получена из коллекции ATCC),

A549 – аденокарцинома базального альвеолярного эпителия человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

U251-MG – глиобластома человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

SKBR-3 – аденокарцинома молочной железы человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

HT-29 – колоректальная аденокарцинома человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC).

PC-12 – феохромоцитома крысы (получена из коллекции ATCC).

НЕК-293Т – эмбриональные клетки надпочечника человека, производная линия от НЕК-293 с экспрессией мутантной версии большого Т-антигена вируса SV40 (из коллекции Институт цитологии РАН, Россия)

3.1.3. Плазмидные векторы

Для экспрессии генов *slurp-1, slurp-2, lynx1, lypd6* в *E. coli* был использован плазмидные векторы *pET22b(+)* и *pET32a(+)* (Novagen, США).

Для экспрессии гена CHRNA7 (кодирует $\alpha 7$ -nAChR человека) в клетках A549 использовали вектор *pVAX1* (Thermo Fisher Scientific, США), содержащий ген $\alpha 7$ -nAChR человека (любезно предоставлен проф. Й.Линдстромом).

3.1.4. Питательные среды для роста бактериальных культур

Клетки *E. coli* выращивали в питательных средах LB, TB и M9. Состав среды LB: 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl. Состав среды TB: 12 г/л триптон, 24 г/л дрожжевой экстракт, 4мл/л глицерин, после автоклавирования добавляли стерильный раствор 0.17 М KH_2PO_4 , 0.72 М K_2HPO_4 в количестве 100мл/л. Состав среды M9: 6 г/л Na_2HPO_4 , 3 г/л KH_2PO_4 , 0.5 г/л NaCl, 2 г/л NH_4Cl , 240 мг/л MgSO_4 , 11 мг/л CaCl_2 , 3 г/л глюкоза, 2 мг/л дрожжевой экстракт, 200 мкл/л 5 %-й р-р тиамин хлорида, pH 7.4.

Твердую среду LB получали добавлением к среде LB бакто-агара до 1.5 % (вес/объем). Для селекции трансформированных клеток в среды добавляли антибиотик ампициллин до конечной концентрации 100 мкг/л.

3.1.5. Питательные среды для роста эукариотических клеточных линий

Для выращивания эукариотических клеточных линий использовали следующие среды:

A431, MCF-7, A549, U251 MG - DMEM (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия).

SKBR3 - McCoy's 5A (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 10% эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific).

A172, HT-29 - RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 10% эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific).

Het-1A - BEGM (Lonza/Clonetics Corporation, Швейцария). Для клеток Het-1A культуральный пластик предварительно покрывали смесью 0.01 г/л фибронектина (Sigma-Aldrich), 0.03г/л бычьего коллагена I-го типа (Sigma-Aldrich), 0.01г/л бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich), растворенных в культуральной среде BEGM в течение ночи при 37 °C, 5% CO_2 .

PC-12 - DMEM (Gibco, Life Technologies, США), 10 % инактивированная сыворотка лошади (Gibco, Life Technologies, США), эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific), 25 ед/мл пенициллин, 25 мкг/мл стрептомицин, 1 mM пируват натрия, 2 mM глутамин. Культуральный пластик предварительно покрывали р-ром поли-L-лизина 5мкг/мл.

3.1.6. Антитела

Первичные антитела:

β 2-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:1000 (предоставлены Dr. Cecilia Gotti, Instituto di Neuroscienze, Италия),

α 3-nAChR – поликлональный IgG козы, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-1771, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 4-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-5591, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 5-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-28795, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 6-nAChR – поликлональный IgG козы, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-27292, Santa Cruz Biotechnology, США),

5-HT₃ (серотониновый рецептор 3A типа) - поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-27292, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 7-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:1000, разведение для конфокальной микроскопии – 1:500, разведение для проточной цитометрии – 1:1000 (каталожный номер ab23832, Abcam, Великобритания),

β 4-nAChR - поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100, (каталожный номер ab156213, Abcam, Великобритания),

pERK1/2 (фосфорилированные MAPK-киназы ERK1 и ERK2) - поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:4000, (каталожный номер 9101, Cell Signalling Technology, Нидерланды),

EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) - моноклональный IgG кролика, разведение для конфокальной микроскопии 1:500, (каталожный номер 52894, Abcam, Великобритания),

SLURP-1 - моноклональный IgG мыши, разведение для конфокальной микроскопии – 1:500, (каталожный номер 52894, Abcam, Великобритания),

Lynx1 – моноклональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга – 1:1000 (каталожный номер 125035, Abcam, Великобритания).

Антитела для изотипического контроля:

IgG мыши - разведение для проточной цитометрии 1:1000 (каталожный номер 31903, Thermo Fisher Scientific, США),

IgG кролика - разведение для проточной цитометрии 1:1000 (каталожный номер 31235, Thermo Fisher Scientific, США),

Вторичные антитела:

Анти-IgG кролика, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) – поликлональный IgG козы, разведение вестерн-блоттинга – 1:2000 (каталожный номер P0448, Dako, Дания),

Анти-IgG козы, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) – поликлональный IgG кролика, разведение вестерн-блоттинга – 1:2000 (каталожный номер P0449, Dako, Дания),

Анти-IgG мыши, конъюгированный с флуоресцентным красителем AlexaFluor 488 – поликлональный IgG козы, разведение для проточной цитометрии – 1:1000 (каталожный номер A-11001, Invitrogen, США),

Анти-IgG кролика, конъюгированный с флуоресцентным красителем AlexaFluor 488 – поликлональный IgG козы, разведение для конфокальной микроскопии – 1:10000, разведение для проточной цитометрии – уточнить (A-11008, Invitrogen, США)

3.1.7. Синтетические олигонуклеотиды

Таблица 3.1. Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе. Все олигонуклеотиды, если не обозначено иначе, синтезированы в ЗАО Евrogen (Москва, Россия).

Ген	Последовательность олигонуклеотидов
Праймеры для ПЦР в реальном времени	
прямой b-actin [213]	TCATGTTTGAGACCTTCAACAC
обратный b-actin [213]	GTCTTTGCGGATGTCCACG
прямой GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC
обратный GAPDH	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
прямой RPL13A	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA
обратный RPL13A	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA
прямой SLURP-1	GTGAGGCCCTCAAGTGCTAC

обратный SLURP-1	GCTCTGGTTGAAGGGGTACTC
прямой SLURP-2	GAGGGACTCCACCCACTGTGT
обратный SLURP-2	GCAGCCTATGTGGCACATCTT
прямой Lynx-1	ACCACCTCGAACTTACTTCACC
обратный Lynx-1	ATCGTACACGGTCTCAAAGC
прямой $\alpha 3$ -nAChR	CCTGTTCCAGTACCTGTTCG
обратный $\alpha 3$ -nAChR	AGACATGGACACCTCAAACCTG
прямой $\alpha 4$ -nAChR	GTCAAAGACAACCTGCCGGAGACTT
обратный $\alpha 4$ -nAChR	TGATGAGCATTGGAGCCCCACTGC
прямой $\alpha 7$ -nAChR	TGCACGTGTCCCTGCAAGGC
обратный $\alpha 7$ -nAChR	GTACACGGTGAGCGGCTGCCG
прямой $\alpha 9$ -nAChR	ATCCTGAAGTACATGTCCAGGATC
обратный $\alpha 9$ -nAChR	TGGCCTTGTGGTCTTGAGGCACT
прямой $\beta 2$ -nAChR	ACGGTGTTCCTGCTGCTCATC
обратный $\beta 2$ -nAChR	CACACTCTGGTTCATCATCCTC
Список малых интерферирующих РНК, использованных в работе (Синтол, Россия)	
контроль	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
JNK-1	GGCAUGGGCUAUAAGAAATT
	UUUCUUUGUAGCCCAUGCCTT
JNK-2	GCCAGAGACUUAUUAUCAATT
	UUGAUAAUAAGUCUCUGGCTT
$\alpha 7$ -nAChR	GGAAGCUUUACAAGGAGCUGGUCAA
	UUGACCAGCUCCUUGUAAAGCUUCC
Олигонуклеотиды, использованные для сборки и клонирования гена <i>NTII</i> (синтезированы Н.С. Быстровым и С.К. Волковым в УНЦ ИБХ РАН).	
nno1	TCTAGAATGTCACAACCAGC
nno2	AGTCTTCCCAGCCGCCAACTACCAAACTTGCTCTGGCGAAA
nno3	CCTAACTGCTACAAAAAGTGGTGGTCCGACCACCGTGGTA
nno4	CCATCATCGAGCGCGGTTGTGGCTGTCCGAAAGTTAAACCG
nno5	GGTGTAACCTGAACTGCTGTCTGCTACCGATCGTTGCAACAACТАAGAGCTC
nno6	GGAAGACTGCTGGTTG
nno7	GCAGTTGGTTTCGCCA
nno8	GATGATGGTACCACGG
nno9	TTTACACCCGGTTTAA
nno10	GAGCTCTTAGTTGTTGCAAC
nno11	GGATCCTTAGTTGTTGCAACGATCGGTACGACAGCAGTTTACAGTTTACACC
Олигонуклеотиды, использованные для получения мутантных генов <i>NTII/</i>	
mutI	CTACAAAAAGTGGTGGTGCACGCGTGGTGCCTTCCCGTGGTACCATCATC
mutII	CTCGATGATGGTACCAACGGAAACCGCACAGCGGTGCACACCACCACTTTTGTAG
Олигонуклеотиды, использованные для сборки и клонирования гена <i>rSLURP-1</i>	

S1, прямой праймер для клонирования <i>slurp-1</i> в <i>pET22b(+)</i>	GAGATATACATATGCTGAAGTGCTACACTTGCAAAGAACCGATGACTAGCGCTTCC
S2	GCAAGCGGTGCTTCCGGTTTGCAACGGGTGATGGTACGGCAGGAAGCGTAGT
S3	GACACCGCTTGCATGACCACCCTGGTTACCGTTGAAGCTGAGTACCCGTC AAC
S4	AACACAAGAGGAAGAACAGGAACGGGTTACAACCGGGGACTGGTTGAACGGGTA
S5	TCCTCTTGTTGCTACTGACCCAGATTCCATCGGCGCAGCGCACCTCATCTTC
S6, обратный праймер для клонирования <i>slurp-1</i> в <i>pET22b(+)</i> , <i>pET22b(+)/STII</i> , и <i>pET32a(+)</i>	GGCTCGGATCCSTATCACAGTTCAGAGTTGCACAGGTCGCGGAAACAGCAGAAGATG AGGTG
S7, прямой праймер для клонирования <i>slurp-1</i> в <i>pET32a(+)</i>	GATCTGGGTACCGGTTCTGGTTCTGGTCTGGTGCCCGTGGTTCTCTGAAGTGCTAC ACTTGCAAAGAAC
S8, прямой праймер для клонирования <i>slurp-1</i> в <i>pET22b(+)/STII</i>	ACAAATGCGTACGCACTGCTACACTTGCAAAGAAC
Олигонуклеотиды, использованные для сборки и клонирования гена <i>ws-Lynx1</i>	
L1	GAGATATACATATGCTGGACTGCCACGTATGCGCATATAACGGCGATAACTGC
L2	GCAGTATGCTACCATTGCCGGGCAACGCATCGGGTTGAAGCAGTTATCGCC
L3	GTAGCATACTGCATGACTACTCGTACTTACTACACTCCGACTCGTATGAAA
L4	TACAGTCTCGAAGCAACCGGGTACACACGACTTCGATACTTTCATACGAGT
L5	TTCGAGACTGTATACGATGGCTACTCTAAGCACGCTTCCACCACCTCCTGC
L6	GGCTCGGATCCSTATCAGCCGTTGCACAAATCGTACTGGCAGCAGGAGGTGGT
Прямой праймер для клонирования гена <i>wd-Lynx1</i> в вектор <i>pET-32a(+)</i>	GATCTGGGTACCGGTTCTGGTTCTGGTCTGGT CTGGTGCCCGCTGGTTCT CTGGACTGCCAC GTATGCGC
Прямой праймер для клонирования гена <i>ws-Lynx1</i> в вектор <i>pET-22b(+)/STII</i>	ACAAATCGTACGCACTGGACTGCCACGTATGCGC
Олигонуклеотиды, использованные для клонирования гена <i>WTX</i>	
Прямой праймер для замены редко встречающихся кодонов аргинина	GCTTTAAAAAGTTACACCAACGT CGCC CATTGTCGTGG CGC TACATAC CGCGG ATGTGCTGATACTTGCCC
Обратный праймер для замены редко встречающихся кодонов аргинина	GGGCAAGTATCAGCACATCC GCG TATGTAG GCG CCACGACAATGG GCG ACGTT GGTGTAACSTTTTAAAGC
Прямой праймер для клонирования гена <i>WTX</i> в вектор <i>pET32a(+)</i>	CTGGGTACCGACGACGACGACAAGTTGACATGTCTCAATTGCCC
Прямой праймер для	ACAAATGCATATGCATTGACATGTCTCAATTGCCC

клонирования гена <i>WTH</i> в вектор <i>pET22b(+)/STII</i>	
Обратный праймер для клонирования гена <i>WTH</i> в векторы <i>pET22b(+)</i> и <i>pET32a(+)</i>	GGCCCCGGATCCCCCGATCCTTACTAGCGGTTGCATTTGTCTG
Олигонуклеотиды, использованные для сборки и клонирования гена <i>rSLURP-2</i>	
S2/1	TAGCGTGAAGACGACAGAACCATATGATTTGGTGCCATCAGTGCACCGGCTT TGGCGGCTGCTCCCATGGCTCCCGTTGCCTGCGTGAT
S2/2	GTGGTCACGCAATGGGTGGAATCACGCAGG
S2/3	GGATTGCGTGACCACCGCGACCCGTGTGCTCTCCAATACCGAAGATCTGCCG CTGGTGACC AAAATGTGCCATATTGGCTGCCCGGAT
S2/4	GGCCCAGGCCAGGGACGGAATATCCGGCC
S2/5	CCCTGGGCCTGGGCCCGTATGTGTCCATTGCGTGCTGCCAGACCTCCCTGTG CAATCATGATTAGTAGAAGCTTGTGTACTGAGTTC
S2/6	GAACTCAGTACAACAAGCTTCTACTAATCA
Синтетический ген <i>rLypd6</i> синтезирован в ЗАО Евроген (Москва, Россия)	
<i>CATATG</i> TTTAAATGCTTTACCTGCGAAAAAGCGGCGGATAATTATGAATGCAATCGTTGGGCGCCGGATATTTAT TGCCCCGCGTGAAACCCGTTATTGCTATACCCAGCATACCATGGAAGTGGGCTGCCGTGATTCCGAACATGAAGGC CATAAAGTGTGCACCTCCTGCTGCGAAGGCAATATTTGCAATCTGCCGCTGCCGCGTAATGAAACCGATGCGACC TTTGCG <i>TAGTAGAAGCTT</i>	

3.2. Методы

3.2.1. Препараты рекомбинантных белков

Клонирование генов *slurp-1*, *slurp-2*, *ws-lynx1*, *rlupd6*. Гены *slurp-1*, *slurp-2*, *lynx1*, *lupd6* кодирующие белки SLURP-1, SLURP-2, водорастворимые фрагменты белков Lynx1 (*ws-Lynx1*) и Lupd6 (*rLupd6*) человека были сконструированы с помощью ПЦР из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов (Евроген, Москва). Последовательность генов была оптимизирована для экспрессии в *E. coli*, сигнальный пептид во всех белках был удален, на 5'-конец был введен кодон *atg*, необходимый для инициации трансляции. Для Lynx1 и Lupd6 также были удалены N- и C-концевые последовательности, лежащие вне трехпетельного домена. Полученные гены клонированы в вектор *pET22b (+)* по сайтам рестрикции *NdeI* и *HindIII*, корректная последовательность вставки была подтверждена секвенированием (синтез олигонуклеотидов и секвенирование выполнены ЗАО «Евроген»).

Продукция нейротоксина II, rSLURP-1, ws-Lynx1 и WTX в виде слитной полипептидной цепи с тиоредоксином. Клетки штамма *E. coli BL21(DE3)(pLysS)* трансформировали рекомбинантным вектором и рассеивали на чашки с антибиотиками: ампициллином и хлорамфениколом. Для наращивания клеточной массы с поверхности чашек собирали примерно 0.5-2.0 колонии/мл и суспендировали их в среде ТВ, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 12°C и постоянном перемешивании до достижения оптического поглощения культуры на длине волны 600 нм величины 1 о.е. (примерно 24 ч). После этого добавляли IPTG до концентрации 0.025 мМ, и выращивание продолжали в тех же условиях в течение ночи.

Анализ локализации гибридных белков с тиоредоксином в клетках *E. coli*. Клетки *E. coli*, трансформированные соответствующими плазмидами, выращивали в питательной среде ТВ с необходимыми антибиотиками при температуре 12°C и хорошей аэрации до достижения оптической плотности $A_{600}=1.0$ о.е. Экспрессию рекомбинантных генов индуцировали добавлением ИПТГ, после чего клетки культивировали при температуре 12°C и хорошей аэрации в течение ночи.

Приготовление образцов для электрофоретического анализа в SDS-ПААГ суммарного клеточного белка. Образец полученной клеточной суспензии центрифугировали при 12 000 g в течение 2 мин. Осадок суспендировали в равном

объеме буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 1 мМ ЭДТА и 1 % SDS, и прогревали на водяной бане при 95°C в течение 5 мин. Водонерастворимый осадок отделяли центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин; супернатант смешивали с равным объемом буфера для нанесения на гель следующего состава: 50 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 8 % SDS, 40 % β-меркаптоэтанол, 20 % глицерин, 0.01 % кумасси R-250, и прогревали на водяной бане в течение 5 минут при 95°C.

Приготовление образцов для электрофоретического анализа фракции водорастворимых цитоплазматических белков. Образец полученной клеточной суспензии центрифугировали при 12 000 g в течение 2 мин, осадок ресуспендировали в 1/8 от исходного объема буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 5 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 0.1 мМ PMSF, лизоцим 1 мг/мл. Полученную суспензию инкубировали во льду в течение 30 мин, затем добавляли до исходного объема буфер 20 мМ Трис-НСl, рН 7.0, 1 мМ ЭДТА, 0.1 % Triton X-100. Полученную суспензию инкубировали во льду в течение 30 мин, затем центрифугировали при 12000g в течение 10 мин. Аликвоту полученного супернатанта смешивали с равным объемом буфера для нанесения на гель и прогревали на водяной бане при 95°C в течение 5 мин.

Выделение и очистка гибридного белка. Клетки собирали центрифугированием (2500 g, 45 мин., 4°C) и суспендировали в фосфатном лизисном буфере (20 мМ Na₂HPO₄, 0.1 М NaCl, рН 8.0). Суспензию переносили в стеклянный стакан, предварительно поставленный в баню со льдом, после чего добавляли PMSF до конечной концентрации 1 мМ. Клетки разрушали ультразвуком на приборе УЗДН-2Т (10 импульсами по 20-30 с с перерывами по 3 мин). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (4000 g, 90 мин, 4°C). Осветленный клеточный лизат наносили на Ni-NTA-SF-колонку, уравновешенную 50 мМ Na₂HPO₄, 0.1 М NaCl, 1мМ имидазола, рН 7.6. Белки элюировали возрастающим градиентом концентрации имидазола (от 0.001 до 0.1 М). Гибридный белок выходил с колонки при концентрации имидазола примерно 0.012 М. Удалив избыток соли при помощи диализа и сконцентрировав белок ультрафильтрацией, его дочищали на анионообменной колонке Mono-Q HR 10/10 (FPLC, Pharmacia, Швеция), уравновешенной 20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, в возрастающем градиенте концентрации NaCl (от 0 до 1 М). Гибридный белок TRX/SpH1/SpH2/Leu-Met/NT II элюировался с колонки при концентрации NaCl 0.12 М. Выделенный таким образом белок диализовали против воды Milli-Q и лиофилизовали.

Расщепление гибридного белка бромцианом с целью получения целевого рекомбинантного NTH проводили в 70% трифторуксусной кислоте с 300-кратным мольным избытком BrCN в расчете на количество остатков метионина и концентрацией гибридного белка 0.5-1.0 мг/мл. Инкубацию осуществляли в темноте при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли водой в 10-20 раз и лиофильно высушивали. Продукты реакции гидролиза гибридного белка бромцианом фракционировали на катионообменной колонке Mono-S HR 10/10 (FPLC, Pharmacia, Швеция), уравновешенной 50 mM NaOAc, 0.01 M NaCl, pH 5.0. Белки элюировали в градиенте концентрации NaCl (от 0.01 до 1 M). Нейротоксин II элюировался с колонки при концентрации соли примерно 0.14 M. 2.11.

Выделение и очистка рекомбинантных белков rSLURP-1, ws-Lynx1 и rWTX в слитной полипептидной цепи с тиоредоксином. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали рекомбинантным вектором pET-32a/белок и рассеивали на чашки с селективной средой LB-агар. Для наращивания клеточной массы колонии с поверхности чашек переносили в селективную среду LB, содержащую ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 37°C и постоянном перемешивании до достижения оптического поглощения культуры на длине волны 600 нм величины 0.6 о.е. После этого добавляли ИППГ в концентрации 0.05 mM и продолжали культивирование клеточной культуры в среде LB при 20°C в течение 1 суток.

Клеточную культуру центрифугировали при 8000 об/мин 20 мин при 4°C. Осадок, полученный с 1 л клеточной культуры, ресуспендировали в 30 мл буфера А (20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 8.0). Клетки разрушали с помощью ультразвука на льду с помощью дезинтегратора Branson Digital Sonifier (Branson, США) 1 минуту 40 секунд (по 10 секунд с перерывами в 1 минуту), лизат центрифугировали при 36000 g в течение 30 мин при 4°C. Затем супернатант переносили на хроматографическую колонку с 6 мл Ni-сефарозы (GE Healthcare, Швеция) и проводили элюцию белкового препарата ступенчато буфером А, содержащим возрастающие концентрации имидазола, а именно 20 mM, 200 mM, 500 mM (по 25 мл). Белковый препарат, содержащий целевой белок в слитной полипептидной цепи с тиоредоксином, элюировали при 200 mM имидазола. Фракции анализировали с помощью электрофореза.

Реакцию гидролиза тромбином проводили из расчета 5 ед. фермента на 1 мг гибридного белка в течение ночи при комнатной температуре. Буфер не заменяли. После гидролиза для удаления имидазола из образца, содержащего целевой белок,

ставили диализ 2 раза по 1 часу в буфере А в объеме 4 литра. Размер пор диализного мешка – 1кДа (Millipore, США).

Для отделения целевого белка от тиоредоксина после гидролиза диализованный препарат повторно наносили на хроматографическую колонку с 6 мл Ni-сефарозы (GE Healthcare, Швеция). Белковый препарат, содержащий целевой белок, сходил с колонки в проскоке. Тиоредоксин элюировали буфером А, содержащим 200 мМ имидазола.

Дальнейшую очистку целевого белка, предварительно диализованного против 20 мМ Tris-HCl, 1 мМ NaN₃, pH 8.0 в течение ночи при 4°C, проводили на хроматографической колонке с Q-сефарозой (Pharmacia Biotech, США). Элюцию белка осуществляли в градиенте NaCl. Фракции анализировали методом электрофореза в ПААГ.

Продукция rSLURP-1, ws-Lynx1 и rWTX в секретионной конструкции с лидерным пептидом STII. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали рекомбинантным вектором pET-22b/STII/SLURP-1 и рассевали на чашки с селективной средой LB-агар. Колонии с чашек инокулировали в минимальной среде M9, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 37°C с умеренным перемешиванием до достижения оптического поглощения культуры на длине волны 600 нм величины 0.6 о.е. Индукцию проводили добавлением ИПТГ до концентрации 0.05 мМ, после чего культивирование клеточной культуры продолжали в среде M9 при 37°C 24 часа.

Продукция нейротоксина II в секретирующей конструкции. Клетки *E. coli* штамма BL21 трансформировали рекомбинантным вектором pGEMEX-1/pR/NT и рассевали на чашки Петри с LB-агаром и ампицилином. Колонии с чашки инокулировали в минимальной среде M9, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 28°C с умеренным перемешиванием в течение ночи. Затем клеточную культуру осаждали, клеточный осадок ресуспендировали в свежей среде M9, разводили до оптической плотности примерно 0.5 и индуцировали транскрипцию гена NT повышением температуры культивирования до 37°C, и продолжали культивирование клеточной культуры в среде M9 при 37°C в течение 48 часов.

Приготовление образцов для электрофоретического анализа в SDS-ПААГ культуральной жидкости. Образец полученной клеточной суспензии центрифугировали при 12 000 g в течение 2 мин. Супернатант смешивали с равным

объемом буфера для нанесения на гель следующего состава: 50 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 8 % SDS, 40 % β -меркаптоэтанол, 20 % глицерин, 0.01 % кумасси R-250, и прогревали на водяной бане в течение 5 минут при 95°C.

Приготовление образцов для электрофоретического анализа фракции водорастворимых периплазматических белков. Образец полученной клеточной суспензии центрифугировали при 4°C и 6000 g в течение 15 мин. Затем клеточный осадок суспендировали в 100 мкл холодного 1 М Трис-НСl, рН 9.0, 2 мМ ЭДТА. Инкубировали клеточную суспензию во льду в течение 20 мин, затем осаждали клетки центрифугированием в тех же условиях, что и ранее в течение 30 мин. Аликвоту полученного супернатанта смешивали с равным объемом буфера для нанесения на гель и прогревали на водяной бане при 95°C в течение 5 мин.

Выделение и очистка секретируемых нейротоксинов. Клеточную культуру центрифугировали 45 минут при 4250 об/мин и 4°C. Подводили рН культуральной жидкости до 4.5, прогревали на водяной бане при 70°C в течение 20-25 минут и снова центрифугировали 45 минут при 4250 об/мин и 4°C. Далее супернатант отбирали, разбавляли в 2-3 раза водой Milli-Q, подводили рН до 5.0 и наносили на ионообменную смолу SP-Sepharose (Amersham Pharmacia, Швеция), уравновешенную 10мМ СН₃СООNa рН 5.0. Элюцию проводили линейным градиентом 0.0-1.0 М NaCl. Далее белковый препарат, содержащий нейротоксин, дочистали на колонке со смолой MonoS (Amersham Pharmacia, США), уравновешенной 10мМ СН₃СООNa рН 5.0. Элюировали нейротоксин возрастающим линейным градиентом 0.0-1.0М NaCl. На всех этапах очистки использовался хроматограф "Bio-Logic" умеренного давления фирмы BIO-RAD (США). Все фракции анализировались в SDS-ПААГ.

Производство rSLURP-1, rSLURP-2, ws-Lynx1, rLypd6 в виде цитоплазматических телец *E. coli*. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (Novagen, США) трансформировали соответствующим вектором и рассеивали на чашки Петри с LB-агаром и ампициллином 100 мкг/мл. Колонии с чашки инокулировали в 30 мл питательной среды TB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 37°C с умеренным перемешиванием (250 об./мин.) на орбитальном шейкере до достижения клеточной плотности в культуре, соответствующей величине поглощения 0.6 при 600 нм. Далее полученную культуру инокулировали в 2 л среды TB в ферментере (Bioflow 3000, New Brunswick Scientific, США). Культивирование осуществляли при 37°C в условиях автоматического поддержания относительного

содержания кислорода в системе не менее 30% от максимально достижимого. Регулируемыми параметрами были обороты мешалки и скорость подачи воздуха. Экспрессию генов *slurp-1* и *slurp-2* индуцировали добавлением изопропил- β -d-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до конечной концентрации 0.05 мМ при клеточной плотности в культуре, соответствующей величине поглощения 0.8 при 600 нм. После индукции культивирование клеток осуществляли в течение 16 ч.

Для продукции ^{13}C - ^{15}N -меченых аналогов трехпетельных белков 1 л клеточной культуры, предварительно выращенной на среде ТВ в колбах до клеточной плотности, соответствующей величине поглощения 0.8 при 600 нм, центрифугировали в течение 15 мин при 2500 g. Клеточный осадок стерильно ресуспендировали в 1 л минимальной среды M9, содержащей в качестве источников углерода и азота ^{13}C -глюкозу и ^{15}N - NH_4Cl (Cambridge Isotope Laboratories, Великобритания). Индукцию и дальнейшее выращивание проводили так же, как на среде ТВ.

Отмывка телец включения. Клетки собирали центрифугированием (10000 g, 20 мин, 4°C) и ресуспендировали в холодном буфере 20 мМ Трис- HCl , 100 мМ NaCl , 1мМ EDTA, pH 8.0 (буфер W) в соотношении 10 мл буфера на 1 г осадка. Далее суспензию клеток дезинтегрировали ультразвуком (Branson Digital Sonifier, США) при выходной мощности 50 Вт и 4°C в течение 10 мин. Полученную взвесь центрифугировали при 36000 g в течение 20 мин. Образовавшийся осадок ресуспендировали в буфере W, содержащем 2 М мочевины. Суспензию переносили в предварительно охлажденный стакан, дезинтегрировали 2 мин. и центрифугировали в тех же условиях, что и ранее. После отмывания 2 М мочевиной осадок промывали буфером W, содержащим 1 % Triton X-100, и затем - деионизованной водой (MilliQ, Millipore, США). Отмытые тельца включения хранили при – 20°C.

Восстановление целевых белков и очистка из телец включения. Отмытые тельца включения ресуспендировали в буфере 30 мМ Трис- HCl pH 8.7, 8 М мочевины, 0.4 М сульфит натрия, 0.15 М тетрагидрат натрия из расчета 10 мл буфера на 1 г телец включения. Суспензию дезинтегрировали ультразвуком (Branson Digital Sonifier) при выходной мощности 50 Вт и 4°C в течение 1 мин и оставляли на 12 ч при слабом перемешивании. Затем суспензию центрифугировали при 36000 g и 4°C в течение 30 мин, супернатант разводили деионизованной водой в 10 раз с добавлением сухой мочевины так, чтобы конечная концентрация мочевины была не ниже 2 М. После этого препарат сульфитированного целевого белка наносили на колонку с DEAP-сферонит-

ОН (совместная разработка ГНИИ ОЧБ, Санкт-Петербург и ИБХ РАН), предварительно уравновешенную буфером W (30 мМ Трис-НСl, рН 8.0). После нанесения белка колонку последовательно промывали буфером W, буфером W, содержащим 1 М NaCl, буфером W (для удаления NaCl) и буфером W, содержащим 8 М мочевины. Сульфитированный целевой белок элюировали буфером, имеющим следующий состав 30 мМ Трис-НСl, 8 М мочевины, 0.5 М NaCl, рН 8.0. Во фракции, содержащие целевой белок, добавляли 1000-кратный (по отношению к белку) молярный избыток ДТТ. Восстановленный целевой белок очищали с помощью ВЭЖХ на приборе “Smartline” (Кнауер, Германия) (колонка с обращенной фазой Jupiter C4, A300, 10 × 250 мм, Phenomenex, США). Целевой белок элюировали градиентом ацетонитрила (20–45 %) в течение 40 мин в присутствии 0.1 % ТФУ.

Ренатурация. Препараты восстановленных целевых белков лиофилизировали и растворяли в буфере для ренатурации, содержащем 50 мМ Трис-НСl рН 10.5, 2 М мочевины, 0.5 М L-аргинина, 4 мМ GSH и 1 мМ GSSG для rSLURP-1, 2 мМ GSH и 2 мМ GSSG для rSLURP-2, 3 мМ GSH и 0.3 мМ GSSG для ws-Lynx1 и rLypd6 до конечной концентрации белка 0.05 мг/мл. Полученный раствор титровали с помощью HCl до рН 7.0 для rSLURP-1, рН 9.0 для rSLURP-2, рН 9.5 для ws-Lynx1 и рН 7.5 для rLypd6. Ренатурацию проводили при 4°C в течение 3 суток. После окончания процесса ренатурации раствор, содержащий ренатурированный белок, диализовали против деионизованной воды (MilliQ, Millipore, США) в соотношении объемов 1:500, титровали ТФУ до рН 4.0 и концентрировали в 10 раз с помощью ячейки для ультрафильтрации с размером пор мембраны 1 кДа (Millipore, США).

Очистка ренатурированного белка. Анализ и очистку целевых белков после ренатурации проводили с помощью ВЭЖХ (колонка с обращенной фазой Jupiter C4, A300, 4.6 × 250 мм, Phenomenex, США). Элюцию белков осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 % до 45 % за 50 мин в присутствии 0.1 % ТФА. Количество целевого белка после очистки оценивали по поглощению при 280 нм с использованием расчетного коэффициента экстинкции. Препараты полученных ренатурированных белков лиофилизировали.

Анализ качества полученных препаратов. Для подтверждения чистоты и идентичности целевого белка масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре UltraFlex TOF/TOF фирмы «Brucker Daltonics» (Германия), оснащенным источником ионизации MALDI. В линейном режиме детектировали положительно

заряженные ионы. Также чистоту целевого белка подтверждали денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле. Степень замыкания дисульфидных связей анализировали с помощью реактива Элмана. Наличие вторичной структуры в рекомбинантных белках оценивали с помощью КД-спектроскопии. Спектры КД получали при комнатной температуре на спектрометре J-810 (Jasco, Япония). Содержание элементов вторичной структуры оценивали в программе CONTINLL. Правильную пространственную структуру полученных рекомбинантных белков подтверждали ЯМР-спектроскопией.

Конъюгирование rSLURP-1 и ws-Lynx1 с флуоресцентными метками. Конъюгирование rSLURP-1 и ws-Lynx1 с флуоресцентными красителями осуществляли с помощью карбодиимидной сшивки, используя набор Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit (Life Technologies, США) для rSLURP-1 и сукцинидный эфир красителя CF647 (Sigma-Aldrich, США). Для этого 50 мкл 7.7 мМ р-ра активированного сукцинимидного эфира AlexaFluor 647 в DMSO добавляли к 0.5мл 0.22 мМ р-ра rSLURP-1 в буфере 0.1 М бикарбонат натрия pH 8.3 и полученную смесь (молярное соотношение краситель: белок 7:2) инкубировали с перемешиванием 12 ч при комнатной температуре в темноте (для предотвращения распада красителя). Продукты реакции разделяли на ВЭЖХ (таким же образом, как проводили очистку ренатурированного белка), в результате была идентифицирована фракция, содержащая конъюгат белка с одной молекулой красителя (по данным масс-спектрометрии) и обладающая антипролиферативной активностью в отношении Het-1A, сходной с активностью rSLURP-1 без красителя. Выделение гомогенного продукта конъюгации ws-Lynx1 с красителем CF647 проводили аналогично.

3.2.2. Эксперименты с модельными животными

3.2.2.1. Модельные животные

Для экспериментов с Lynx1 84 мыши линии C57BL/6 (самцы, 7-8 месяцев, 26–30 г в конце эксперимента) и 12 крыс линии Wistar (8 самцов и 4 самки) были приобретены в НПП «Питомник лабораторных животных» (Пушино, Россия). Для экспериментов с rLypd6 18 мышей линии C57BL/6 (самцы, 4-6 месяцев) были приобретены НПП «Питомник лабораторных животных» (Пушино, Россия). Для электрофизиологических экспериментов с ws-Lynx1 и rLypd6 крыс породы Wistar разводили в виварии ИБХ РАН

и использовали особей обоих полов в возрасте 17-25 дней. 17 взрослых мышей B6C3-Tg (APP695) 85Dbo Tg (PSEN1) 85Dbo, экспрессирующих химерный белок-предшественник амилоида и мутант пресенилина-1 человека (2xTg-AD), а также 13 нетрансгенных однопаметных мышей B6C3 (Tg-) (8 месяцев, обоих полов, 30–35 г на конец экспериментов) были приобретены в Jackson Laboratory (США) и содержались в НПП «Питомник лабораторных животных». Обе мутации APP/PS1 связаны с ранним началом болезни Альцгеймера. Животные были акклиматизированы в течение минимум 7 дней после прибытия. Мышей и крыс содержали в группах по 3-4 особи с 12-часовым световым циклом, получали стандартный корм для грызунов (Ассортимент-Агро, Россия) и питьевую воду *ad libitum*. Все эксперименты проводились в соответствии с руководящими принципами, изложенными в Директиве Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609 / ЕЕС), и были одобрены этическим комитетом ИБХ РАН по содержанию и использованию экспериментальных животных (протокол #222 от 13 февраля 2018).

3.2.2.2. Доставка ws-Lynx1 в мозг

Использовали три группы мышей, по четыре особи в каждой ($n = 4$). Первая группа получала 3 мкл деионизированной воды интраназально (контроль), вторая группа получала 50 мкг CF647-Lynx1, растворенного в 3 мкл деионизированной воды через внутрижелудочковую канюлю, а третья группа получала 50 мкг CF647-Lynx1, растворенного в 3 мкл деионизированной вода интраназально. Канюли (нержавеющая сталь G30) для внутрижелудочковых инъекций имплантировали стереотаксически за 2 дня до экспериментов под изофлурановой анестезией с использованием координат AP = -0,2, ML = \pm 1,0, DV = -2,0 мм. Через 40-60 минут после введения препарата животных анестезировали изофлураном и перфузировали транскардиально PBS, а затем 4% PFA (по 15 минут каждый). Мозг выделяли, фиксировали в 4% PFA в течение 48 часов и помещали в 30% сахарозу на 3 дня. Корональные срезы цельного мозга готовили с использованием микротомы Microm HM-360 и хранили в PBS при + 4°C до последующего анализа на конфокальном микроскопе Nikon Eclipse T2000E (сухой объектив x10).

Для анализа доставки ws-Lynx1 в кортекс с помощью вестерн-блота три группы по три мыши в каждой ($n = 3$) получали деионизированную воду интраназально (контроль) и ws-Lynx1 (внутрижелудочково или интраназально), как описано выше. Через 40-60

минут после введения препарата животных анестезировали изофлураном и декапитировали. Мозг были выделен; гомогенаты коры мозга получали, как описано ранее [214], и анализировали с помощью вестерн-блота (см. ниже).

3.2.2.3. Поведенческие тесты

Комплекс поведенческих тестов для мышей дикого типа и мышинной модели болезни Альцгеймера (2xTg-AD) проводился в течение четырех последовательных дней (Рис. 2А). Все тесты проводились примерно в одно и то же время во второй половине дня (с 13:00 до 20:00). В течение этих дней животным давали привыкать к месту проведения поведенческих тестов по меньшей мере за 1 час до начала тестов, различные тесты проводились с интервалом в 1 час. Помимо ежедневных манипуляций, мышей приучали к контакту с руками экспериментатора в течение 10 дней перед тестами.

Пятьдесят мышей C57BL / 6 были случайным образом распределены в одну из четырех групп, по 12-13 особей в каждой (рис. 2А). Первые две группы получали 1,5 мг/кг ws-Lynx1 (примерно 50 мкг на животное), растворенного в деионизированной воде; две другие группы получали деионизированную воду в качестве контроля. Ws-Lynx1 и деионизированную воду вводили интраназально в объеме 3 мкл / мышь один раз в день в течение 14-15 дней. За один день до проведения комплекса поведенческих экспериментов (9-й день введения ws-Lynx1) одной из групп, получавших ws-Lynx1, и одной группе из групп, получавших воду, один раз в день вводили внутривентриально 3 мг / кг MLA (0,9% NaCl, 300 мкл/мышь), в то время как две другие группы получали внутривентриально физраствор (0,9% NaCl, 300 мкл/мышь). Интраназальное введение и внутривентриальные инъекции выполняли в течение всех тестовых дней за 45 мин до поведенческих тестов. Тесты в открытом поле OF, EPM, Rotarod и обонятельной памяти проводились в течение 10-13 дней (рис. 2А). В тестах OF, EPM и Rotarod несколько мышей выпрыгнули из лабиринта/установки, таким образом, данные не могли быть собраны в течение всей продолжительности теста и не были включены в анализ. В тесте обонятельной памяти одно из животных вело себя ненормально и полностью игнорировало представленный запах и, таким образом, было исключено. На 14-15 день пять особей из каждой группы были использованы для записи ДВП (n = 5).

Тест в открытом поле (ОП) проводился в первый день комплекса тестов. Мышей помещали в центр 60-сантиметровой круглой арены (Open Science, Россия), освещенной белым светом 300 лк.

Тест в приподнятом крестообразном лабиринте (КПЛ) проводили во второй день комплекса тестов. Использовался серый пластиковый лабиринт (Open Science, Россия) с рукавами длиной 30 см и шириной 5 см. Открытые рукава были освещены белым светом 300 лк, в то время как закрытые рукава были освещены более тускло (40 лк).

Тест обонятельной памяти состоял из двух испытаний, выполненных с интервалом в 24 часа в первый и второй дни комплекса тестов, соответственно. Во время контрольного испытания мышей помещали в плексигласовую камеру размером 20x15x15 см (ширина x длина x высота) и после 15-минутного привыкания на боковую стенку камеры прикрепляли фильтровальную бумагу, пропитанную 5 мкл мочи мыши. Моча была собрана от незнакомой особи того же пола. На следующий день испытание проводилось аналогично контрольному испытанию; мыши предьявляли тот же запах, что и в первый день.

Поведение мышей записывали на видео со скоростью 20 кадров в секунду в течение 10 мин. Видеозаписи были проанализированы с использованием EthoVision v. 8.5 (Noldus, Нидерланды) оператором, который не имел информации о принадлежности мыши к определенной экспериментальной группе.

Тест Rotarod (Neurobotics, Россия) проводился в течение четырех дней подряд. Каждый сеанс состоял из 5 испытаний. В течение 3 минут испытания частоту вращения цилиндра увеличивали с 5 до 30 об / мин и фиксировали время, в течение которого мышь могла удержаться на цилиндре. Результаты 5 испытаний были усреднены.

После завершения комплекса тестов мышей 2xTg-AD в течение недели подвергали мониторингу поведения и оперантному кондиционированию с использованием автоматической системы сбора данных PhenoMaster (TSE Instruments, Германия). Домашняя клетка (площадь пола 1500 см²) была оснащена сеткой инфракрасных лучей с детекторами для регистрации активности в домашней клетке, вращающимся колесом со счетчиком оборотов и модулем для оперантного кондиционирования с положительным подкреплением. Сеансы кондиционирования проводились автоматически один раз в день и начинались в 22:30 под управлением программного обеспечения IntelliMaze. Первые три дня предьявлялись стимулы для обучения простому выбору сторон модуля оперантного обучения (левая и правая стороны были

сбалансированы по группам) с положительным подкреплением, что позволяло мышам привыкнуть к новой среде и научиться взаимодействовать с системой. Количество вознаграждений за ответы было ограничено до 50; вознаграждение представляло собой подслащенную гранулу сухого молока весом 14 мг (Dustless Precision Pellets, TSE Systems). В последующие дни (дни 4-8 мониторинга) мышей обучали делать тычки носом попеременно в различные стороны модуля оперантного обучения в каждом испытании. Количество испытаний в этих сессиях не было ограничено и зависело от активности отдельных животных. Для стимулирования обучения мышей поддерживали на уровне 90% от веса тела при питании *ad libitum* (доступ к еде был обеспечен в течение дня с 07:30 до 19:00 - 20:00). Вознаграждение служило альтернативным источником пищи (3,60 ккал / г).

3.2.2.4. Иммуногистохимия и окрашивание тιοфлавином S

Мышей анестезировали изофлюраном и обескровливали путем транскардиальной перфузии холодным PBS (0,1 М, pH 7,4), а затем 4% параформальдегидом (PFA, Panreac, Испания) в 0,1 М фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4). Затем препараты мозга фиксировали в течение 24 ч в 4% PFA и хранили при 4 °С в 30% сахарозе в 0,1 М фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4) с 0,01% азида натрия. Фронтальные срезы (толщиной 20 мкм) получали с использованием моторизованного криостата Microm HM525 (Thermo Scientific, США). Срезы предварительно инкубировали в блокирующем фосфатном буферном растворе (0,01 М, pH 7,4), содержащем 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), 1% BSA (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 минут, затем инкубировали в течение ночи при 4 °С с первичным кроличьим моноклональным антителом к синаптофизину в разведении 1: 200 (Abcam, США). После промывания PBS (0,1 М, pH 7,4) срезы инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с Alexa Fluor® 488a в разведении 1: 500 (Life Technologies, США) в течение 1,5 часов при комнатной температуре.

Для окрашивания амилоидных бляшек срезы в течение 5 минут инкубировали в 1% тιοфлавине S (Sigma-Aldrich, США) в 50% этаноле. Затем срезы инкубировали в 70 % этаноле в течение 5 минут, промывали водой для удаления этанола и монтировали в Immu-Mount (Sigma-Aldrich, США). Изображения наблюдали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica DM 6000 CFS (Leica Microsystems, Германия). Степень распространения амилоидных бляшек, количество синаптофизина в

областях коры и гиппокампа анализировали с помощью программ LAS AF Lite (Leica, Германия) и ImageJ (НИН, США).

3.2.2.5. Определение токсичности рекомбинантных токсинов

Эксперименты по токсичности нейротоксина II проводились совместно с К.А. Плужниковым, сотрудником лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. Токсичность природного и рекомбинантного нейротоксина II определялась путем инъекции мышам линии BALB/C (вес животных составлял 15-20 гр) 10-70 мкл водных растворов токсинов с концентрацией 0,1 мг/мл.

3.2.3. Электрофизиология

3.2.3.1. Электрофизиологические эксперименты в срезах коры головного мозга

Корональные срезы первичной зрительной коры (для экспериментов с Lynx1) и поперечные срезы гиппокампа (для экспериментов с Lypd6) толщиной 300-350 мкм получали от молодых крыс линии Wistar (возраст от 17 до 25 дней). Перед записью срезы инкубировали при 22°C в течение не менее 1 часа в ACSF, содержащей (в mM) 125 NaCl, 3 KCl, 1,2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1,2 NaH₂PO₄, 10 глюкозу, pH 7,4 и насыщали карбогеном (95 % O₂ и 5% CO₂). Для эксперимента с Lynx1 были использованы 10 корональных срезов, один срез от одного животного, срезы были разделены на две группы (n = 5) – с обработкой 0,2 и 2,0 мкМ ws-Lynx1. Обе группы срезов первоначально измеряли в ACSF (контроль), пять ответов на 50 мс импульсов 1 mM ACh были записаны в каждом срезе с 5-минутными интервалами. Затем срезы инкубировали 20 мин в ACSF, содержащей ws-Lynx1 (0,2 и 2,0 мкМ для первой и второй группы соответственно), и регистрировали пять ответов на ACh. Наконец, срезы инкубировали 20 мин в ACSF без ws-Lynx1 и регистрировали пять ответов на ACh (отмывка). Для каждого среза пиковые амплитуды вызванных ACh токов, наблюдаемые на втором и третьем шагах, были усреднены и нормализованы к средней базовой амплитуде. Нормализованные пиковые амплитуды сравнивали с контрольным уровнем (100%) с использованием одностороннего двустороннего t-критерия. Эксперимент с Lypd6 был построен аналогично, была использована одна группа срезов (n = 4 среза от 4 животных) с обработкой 1 мкМ rLypd6.

Запись токов в режиме фиксации потенциала и конфигурации whole-cell проводили на интернейронах I слоя первичной зрительной коры головного мозга (для Lynx1) или интернейронах *str. radiatum* CA1 гиппокампа (для rLypd6), которые были идентифицированы под визуальным контролем с использованием микроскопа Olympus, оснащенного инфракрасной оптикой с системой дифференциального интерференционного контраста (Olympus BX51WI). Стеклоэлектроды для записи (сопротивление 5-7 МΩ) были заполнены внутриклеточным раствором, содержащим (в mM) 115 K-глюконат, 20 KCl, 10 динатрийфосфокреатин, 5 1,2-бис (2-аминофенокси)этан-N, N, Тетранатриевая соль N',N'-тетрауксусной кислоты, 10 HEPES, 4 MgATP и 0,3 GTP, pH 7,3. Чтобы уменьшить степень десенситизации $\alpha 7$ -nAChR при аппликации ацетилхолина, токи регистрировали при 22°C. Для записи использовался усилитель Axopatch 1D (Axon Instruments, США). Мембранный потенциал фиксировали на -60 мВ. Аналоговые сигналы подвергались низкочастотной фильтрации с частотой 1–2 кГц, оцифровывались при 50 кГц с использованием Clampex 9.2 и анализировались с помощью Clampfit 9.2 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния, США). Ацетилхолин (1 mM) растворенный в ACSF апплицировали на клетки из боросиликатных микропипеток (2-3 МОм) через Picospritzer III (Parker Hannifin Corporation, США) на расстоянии приблизительно 10-20 мкм от сомы записываемой клетки. Давление в пипетке с ацетилхолином при аппликации поддерживалось на уровне 15 фунтов на квадратный дюйм в течение 50 мс. На протяжении всей записи срезы перфузировали со скоростью ~5 мл / мин насыщенной карбогеном ACSF с добавлением атропина (200 нМ), тетродотоксина (300 нМ) и кинуреновой кислоты (2 mM).

При необходимости ws-Lynx1 или rLypd6 (растворы в ДМСО), MLA или Dh β E (водный раствор) добавляли в ACSF за 20 минут до записи. Конечная концентрация ДМСО в ACSF не превышала 0,1%.

3.2.3.2. Долговременная потенция в CA1 срезов гиппокампа

Мышей анестезировали изофлураном и декапитировали. Поперечные срезы гиппокампа толщиной 350 мкм инкубировали при 34°C в течение 1 ч в ACSF, содержащей (в mM) 125 NaCl, 3 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,3 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1,2 NaH₂PO₄, 10 глюкозу, pH 7,4, а затем хранили при 22 °C. При необходимости, срезы инкубировали в течение 1 часа в ACSF, содержащей 2 мкМ ws-Lynx1 и затем

переносили в чистую ACSF для записи. Для rLypd6 и α -Bgtx при необходимости срезы инкубировали в течение 1 часа в ACSF, содержащей 1 мкМ rLypd6 или 10 нМ α -Bgtx, запись эксперимента производили в ACSF с такими же концентрациями веществ.

Фокальные постсинаптические потенциалы возбуждения (фВПСП) регистрировали с использованием системы SliceMaster (Scientifica, UK) при 32 °С. Записывающий электрод, заполненный ACSF (1-3 МОм), был расположен в *stratum radiatum* CA1 гиппокампа. Синаптические ответы вызывались парной стимуляцией коллатералей Шаффера с использованием биполярного электрода, установленного в *stratum radiatum* CA3. Интенсивность стимула была отрегулирована так, чтобы вызывать фВПСП с наклоном в 40% от максимально возможного для данного среза. Интервал между двумя импульсами в стимуле составлял 50 мс, если не указано иное. Стимулы повторялись с интервалом 30 с. Исходные ответы фВПСП были записаны в течение 20 минут для определения базовой линии. После этого был применен протокол парной фасилитации (PPF), в котором интервал между импульсами в паре варьировался от 30 до 400 мс. Коэффициент PPF рассчитывался как отношение между наклоном фВПСП, вызванным первым и вторым импульсами в паре. Долговременную потенциацию (ДВП) индуцировали по стандартному протоколу высокочастотной стимуляции (ВЧС) (четыре последовательности по 100 импульсов с частотой 100 Гц с интервалом 5 минут). Затем фВПСП регистрировали в течение 90 минут после ВЧС. Наклон посттетанического ответа был нормализован к усредненному наклону исходных ответов (базовой линии). Сигналы записывали, фильтровали и анализировали с помощью Spike2 (Cambridge Electronic Design Limited, Великобритания) и SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, США).

3.2.3.3. Электрофизиологические эксперименты в ооцитах *X.*

laevis

Ооциты были выделены согласно методике, описанной ранее [215]: ткани яичников были извлечены из лягушки и помещены в среду Barth (88 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 2.4 мМ NaHCO₃, 1 мМ Hepes, 0.8 мМ MgSO₄, 0.33 мМ Ca(NO₃)₂, 0.4 мМ CaCl₂, pH 7.4) с добавлением канамицина 2 мг/мл. Перед инъекцией мРНК ооциты выделяли из фолликулярной ткани, обрабатывая 0.2 % коллагеназой 1-го типа (Sigma-Aldrich) в р-ре Рингера (82.5 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 5 мМ HEPES, 1 мМ MgCl₂, pH 7.4) при медленном перемешивании в течении 3-4 ч. После обработки коллагеназой ооциты промывали

избытком р-ра Рингера для удаления остаточной коллагеназной активности и проводили предварительную сортировку по размеру с помощью полимерного сита. Далее с помощью бинокулярного микроскопа и пинцета в чашке Петри вручную отделяли ооциты V-VI стадии развития, идентифицированные по размеру и окраске. Полученные ооциты переносили в новые 35мм чашки Петри со средой Barth с канамицином.

В ооциты инъецировали 2 нг мРНК, кодирующей $\alpha 4\beta 2$ (смесь мРНК двух субъединиц 1:1), $\alpha 3\beta 2$ (смесь 1:1), или $\alpha 7$ nAChR и инкубировали в среде Barth с канамицином при 18°C 2-5 суток перед измерениями, удаляя каждый день нежизнеспособные ооциты. Кэпированная мРНК была синтезирована с помощью набора mMessage mMachine T7 (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. После инъекции мРНК ооциты хранили в течение 2–3 дней при 19 ° C, а затем до 7 дней при 15°C в среде ND-96, с гентамицином (50 мкг/мл) и содержащей (в мМ): 96 NaCl, 2 KCl, 1,8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,4.

Для rLypd6 и ws-Lynx1 запись тока с фиксацией потенциала в двухэлектродном режиме выполняли с использованием усилителя GeneClamp500 (Axon Instruments, Inverurie, UK) при мембранном потенциале -50 мВ, как описано в [216]. Данные были отфильтрованы с частотой 20 Гц и оцифрованы с частотой 100 Гц с использованием преобразователя L780 AD (L-Card, Москва, Россия). Микроэлектроды были заполнены 3 М KCl. Внеклеточный раствор представлял собой ND-96 с pH 7.4. Токи были получены аппликацией 100 мкМ ацетилхолина в ND-96 в течение 100 мс. Для применения ws-Lynx1, rLypd6 и MLA раствор в камере для записи заменяли за 20 с до аппликации ацетилхолина. Электрофизиологические данные записывали с помощью программного обеспечения анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США).

Пиковые амплитуды вызванных ацетилхолином токов в присутствии лигандов (ws-Lynx1, rLypd6, MLA) были нормированы на токи в отсутствие лигандов в том же ооците. Кривые доза-ответ были проанализированы с помощью уравнения Хилла: $F(x) = A/(1 + (x-x_0)^{nH})$, где $F(x)$ – амплитуда регистрируемого тока при концентрации лиганда x , A – максимальная амплитуда тока, x_0 - величина IC₅₀, nH – коэффициент Хилла. Нормированные ответы в присутствии и в отсутствие лигандов сравнивали с помощью двухстороннего t-критерия Стьюдента.

Для экспериментов с rSLURP-1 и rSLURP-2 использовали автоматизированную систему двухэлектродной фиксации потенциала HiClamp (Multi-Channel Systems, Germany). Мембранный потенциал фиксировали на -100 мВ, ооциты омывались р-ром Рингера. Предварительная инкубация ооцитов с rSLURP-1 или rSLURP-2 проводилась в течении 100 с в р-ре Рингера с добавлением 20 мкг/мл BSA. Лиофилизованные rSLURP-1 или rSLURP-2 разводили в 100 % DMSO в концентрации 1 мМ, непосредственно перед использованием растворы с меньшей концентрацией получали разведением в р-ре Рингера. Конечная концентрация ДМСО при стимуляции составляла не более 1 %. Стимуляция проводилась с помощью перемещения ооцита с установленными электродами в камеру, содержащую р-р Рингера с добавлением ацетилхолина. Данные записывали с помощью усилителя, фильтра и АЦП, встроенных в HiClamp и затем анализировали с помощью программы MATLAB (Mathworks, США) с пакетом расширений, предназначенных для управления и обработки данных с HiClamp.

3.2.4. Исследование взаимодействия трехпетельных белков с рецепторами

3.2.4.1. Аффинная экстракция

Образцы ткани для экстракции мишеней rSLURP-1 и rSLURP-2 были получены при лобэктомии передней части височной доли у двух пациентов (женщины 30 и 38 лет) с медикаментозно неизлечимой формой эпилепсии с инициацией в гиппокампе. Было получено информированное согласие в письменной форме со стороны пациентов. Образцы тканей были получены в Университетском госпитале Копенгагена и переданы для проведения эксперимента в Отдел дизайна лекарств и фармакологии Университета Копенгагена. Данный эксперимент был одобрен Этическим Комитетом Центрального региона Дании (H-2-2011-104) и выполнен в соответствии с Хельсинкской декларацией. Полученные образцы были немедленно заморожены с помощью сухого льда и хранились при -80°C до момента использования. Гистологические исследования тканей не выявили значимых изменений. Для экстракции мишени ws-Lynx1 в присутствии различных лигандов nAHP использовали тотальный гомогенат мозга взрослых самцов крыс линии Wistar.

Для конъюгации с магнитными частицами PureProteome™ NHS Flexibind (Millipore, Billerica, MA) rSLURP-1, rSLURP-2 или ws-Lynx1 растворяли при концентрации 2мг/мл в PBS pH 7.4 (для rSLURP-1 и rSLURP-2) или pH 8.5 (для ws-

Lynx1) и смешивали с магнитными частицами в соотношении 1:2 (по объему), в соответствии с рекомендациями производителя. rSLURP-2 растворяли в концентрации 1.63 мг/мл в PBS pH 7.4. Реакцию конъюгации проводили в течение ночи при 4°C. Далее раствор целевого белка удаляли и свободные реактивные группы на поверхности магнитных частиц блокировали с помощью икубации в 100 mM Tris-HCl pH 8.0 в течение 1 ч при 4°C. Эффективность конъюгирования анализировали по содержанию белка (rSLURP-1 или rSLURP-2) в растворе до конъюгирования и после удаления магнитных частиц. Концентрацию белка в р-ре определяли с помощью реактива Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, США), эффективность конъюгирования составляла 90-95 %. В качестве контроля неспецифического связывания использовали магнитные частицы, обработанные по тому же протоколу с использованием PBS вместо р-ра белка. Для снижения неспецифического связывания магнитные частицы инкубировали в 0.1 % растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS pH 7.4 перед использованием в течении 1 ч при 4°C.

Образцы тканей мозга были гомогенизированы в 1 мл буфера для лизиса (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 5 mM ЭГТА, 10 мкл/мл коктейль ингибиторов протеаз для тканей млекопитающих, pH 7.5) с использованием гомогенизатора PT1200C (Kinematica, Luzern, Switzerland) в течение 20 секунд. Гомогенат центрифугировали 40 минут при 100,000×g и 4°C с использованием ультрацентрифуги Optima L90-K (Beckman), супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса с добавлением 2% Triton X-100 с помощью гомогенизатора в течение 20 секунд и инкубировали 2 часа при 4°C на орбитальном шейкере (15 rpm). Затем образец центрифугировали как описано выше и получившийся супернатант использовали для аффинной экстракции. Суммарное содержание белка в образце было определено с помощью реактива Брэдфорда.

Для аффинной экстракции образец гомогената в количестве, соответствующем 500-1000 мкг тотального белка, смешивали с 50 мкл магнитных частиц, объем суспензии доводили до 1500 мкл буфером для лизиса и инкубировали в течение 18-22 ч при 4°C на орбитальном шейкере (15 об/мин). Затем магнитные частицы дважды промывали в 1 M NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 0.5 % Triton X-100, pH 7.5 и три раза в 0.1 M NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 0.5 % Triton X-100, pH 7.0.

Для элюции экстрагированных белков магнитные частицы сразу после промывки ресуспендировали в 40мкл 2X буфера для нанесения (120 mM Tris, 20 % (v/v)

глицерин, 10 % (v/v) меркаптоэтанол, 4 % (w/v) SDS, 0.05 % (w/v) бромфеноловый синий, pH 6.8), инкубировали 10 мин. при 95°C в твердотельном термостате, инкубировали 10 мин. на льду. Далее магнитные частицы осаждали с помощью магнитного штатива, супернатант отбирали и использовали для вестер-блоттинга.

Эксперименты по аффинной экстракции мишени ws-Lynx1 в присутствии лигандов nAChR выполнялись в трех повторах (n = 3) с гомогенатами из мозга трех различных животных. Данные аффинной экстракции в присутствии лигандов $\alpha 7$ -nAChR были нормализованы на эксперимент по экстракции с тем же самым гомогенатом в отсутствие лигандов.

3.2.4.2. Связывание с mAChR

Для исследования взаимодействия rSLURP-2 с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами использовали мембранную фракцию клеток CHO, экспрессирующих индивидуальные типы никотиновых рецепторов (предоставлены проф. Т.И. Боннером). Методика получения мембран и характеристика клеточных линий были описаны ранее в [217]. Экспрессия различных типов mAChR в этих клетках подтверждали экспериментом с насыщением $^3\text{H-NMS}$. Уровень экспрессии рецепторов находился в пределах от 1.5 до 12.1 пмоль/мг тотального белка. Не трансфецированные клетки демонстрировали слабое, вероятно – неспецифическое, связывание $^3\text{H-NMS}$ (~ 0.07 пмоль/мг тотального белка). Эксперименты по связыванию радиоактивно-меченых лигандов проводили в 96-луночных планках при 30°C в буфере 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.4. Конечный объем реакции составлял 400 мкл для связывания с насыщением и 200 мкл для остальных экспериментов. Реакцию связывания проводили 1 ч для экспериментов с насыщением и 2 ч для экспериментов с псевдоконкуренцией. Для экспериментов с измерением диссоциации мембранную фракцию инкубировали 2 ч с 3.2 нМ $^3\text{H-NMS}$ в присутствии или в отсутствие 4.2 мкМ rSLURP-2 и стимулировали диссоциацию добавлением 10 мкМ атропина. rSLURP-2 растворяли в DMSO, который присутствовал в реакции в концентрации не более 1 %. Уровень неспецифического связывания определяли в присутствии 10 мкМ атропина.

Реакцию останавливали быстрой фильтрацией через фильтры GF/B (Whatman) с использованием фильтрующей системы Brandel (Gaithersburg, MD). Фильтры высушивали и остаточную радиоактивность измеряли с помощью твердотельного

сцинтиллятора Meltilex A (Perkin Elmer) в сцинтилляционном счетчике Microbeta (Perkin Elmer).

3.2.4.3. Взаимодействие белков с nAChR из *Torpedo californica*

Анализ взаимодействия белков с никотиновым ацетилхолиновым рецептором из *Torpedo californica* был произведен совместно с д.х.н. Кашеверовым И.Е., руководителем лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН. Суспензию обогащенных nAChR мембран, приготовленных как описано в [218] в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7.5, с концентрацией α -Bgtx-связывающих сайтов ~ 1 пмоль, инкубировали в течение 30 минут с различными количествами гибридного белка. Затем к смеси добавляли 3 пмоль ^{125}I -меченого α -Bgtx и инкубировали еще 30 минут. Для определения доли неспецифического связывания перед добавлением ^{125}I -меченого α -Bgtx мембраны инкубировали с 500-кратным избытком немеченого α -Bgtx. Несвязанный радиоактивно-меченый пептид удаляли быстрой промывкой на стеклянных фильтрах GF/F (Whatman, США). Экспериментальные данные анализированы при помощи уравнения Хилла, где IC_{50} – концентрация белка, при которой на рецепторах занята половина сайтов связывания, а $n\text{H}$ – коэффициент Хилла, в программной среде Origin 7.5 (MicroCal Software Inc).

3.2.4.4. Конкуренция с ^{125}I - α -Bgtx за связывание с $\alpha 7$ -nAChR

Исследуемые концентрации белков (от 1 до 30 мкМ) предварительно инкубировали в течение 3 часов с клетками GH_4Cl , экспрессирующими человеческий $\alpha 7$ -nAChR (или ацетилхолин-связывающий белок из *Lymnaea stagnalis*, - Ls-AChBP); финальная концентрация токсин-связывающих сайтов составляла 0.4 или 0.2 нМ, соответственно. Связывание с клетками GH_4Cl проводили в 50 мкл 20 мМ буфера Tris-HCl pH 8.0 с 1% BSA, с Ls-AChBP - в 50 мкл буфера для связывания (PBS с 0.7мг/мл BSA и 0.05% Tween-20, pH 7.5 при 25°C. Затем, ^{125}I - α -Bgtx (~ 2000 Ки/ммоль)) был добавлен до финальной концентрации 0.15-0.35 нМ, через 5 минут реакционную смесь фильтровали на GF/C фильтрах (Whatman, Maidstone), предварительно смоченных в 0.25% полиэтиленимине или на двойных DE-81 фильтрах (Whatman) смоченных в буфере для связывания (для Ls-AChBP). Несвязанную радиоактивную метку удаляли с фильтров промывкой 3х3мл буфером, в котором проводилась инкубация. Неспецифическое связывание определялось в присутствии 10 мкМ α -кобратоксина

(предварительная инкубация в течение 3 часов). Экспериментальные данные анализированы при помощи уравнения Хилла, где IC_{50} – концентрация белка, при которой на рецепторах занята половина сайтов связывания, а nH – коэффициент Хилла, в программной среде Origin 7.5 (MicroCal Software Inc).

3.2.5. Вестерн-блоттинг

В образцах гомогенатов тканей до и после инкубирования с магнитными частицами для вестерн-блоттинга измеряли содержание тотального белка с помощью набора для анализа концентрации белка DC Protein Assay Kit DC (Biorad, Hercules, CA, USA), образцы выравнивали по концентрации тотального белка с помощью разведения. В образцы добавляли 4x буфер для нанесения (состав 1x буфера для нанесения: 120 мМ Трис, 20% глицерин (v/v), 10% β -меркаптоэтанол (v/v), 4% додецилсульфат натрия (w/v) и 0,05% бромфеноловый синий (w/v), pH 6.8), инкубировали 5 минут при 95°C, подвергали электрофорезу с использованием гелей Any-kD (Bio-Rad, США) и переносили на мембрану PVDF (Bio-Rad, США) в буфере Trans-Blot Turbo Transfer Buffer (Bio-Rad, США) с помощью камеры для переноса Tran-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Перенос производили со следующими параметрами: 15V, 2.5A, 15 минут, стабилизация по силе тока. Для визуализации переноса на мембрану использовали окрашенный белковый маркер молекулярных весов PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo-Fisher, США).

Мембраны промывали 3 раза по 5 минут TBS (20 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 7.5) с 0.1 % Tween-20, затем блокировали 1 час в TBS + 5 % сухое молоко (BioRad, США), этот же раствор использовали для разведения первичных и вторичных антител.

Инкубацию в растворе первичных антител (список антител и рабочие разведения приведены выше в разделе «Материалы») проводили в течение ночи в контейнере с увлажняемым воздухом при 4°C. Затем раствор первичных антител удаляли, мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в TBS-T и инкубировали 1ч в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. После 5-кратной промывки TBS-T мембрану инкубировали 1 мин в растворе субстрата для хемилюминесценции (Western Lightning® ECL Pro, Perkin Elmer) и сигнал детектировали с помощью анализатора Chemidoc XR (Bio-Rad, США). В случае необходимости повторного детектирования с помощью других первичных антител на той же мембране, мембрану отмывали с помощью Restore

Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) и далее повторно инкубировали с раствором новых первичных антител, как описано выше для мембраны после переноса.

Для оценки относительного содержания целевого белка в образце использовали среднюю оптическую плотность детектированных полос в ожидаемом диапазоне масс с вычитанием фонового значения сигнала на мембране рядом с данной полосой. Молекулярный вес оценивали при сравнении с окрашенным маркером молекулярных весов.

3.2.6. Полимеразная цепная реакция

Сборку генов и введение мутаций в соответствующие гены осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и сайт-направленного мутагенеза, используя олигонуклеотиды, перечисленные в Таблице 3.1. Реакционная смесь в объеме 50 мкл содержала 1 пмоль матричной ДНК, по 10 пмоль праймеров, по 10 нмоль каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов и 1 ед. акт. Pfu ДНК-полимеразы в буфере для Pfu-полимеразы: 20 mM Трис-НСl, рН 8.75, 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % тритон X-100, 200 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина. Цикл амплификации включал в себя денатурацию ДНК при 95°C (1 мин), отжиг при 56°C (1 мин), и элонгацию при 70°C (30 сек). Всего проводили 30 циклов реакции. Реакционную смесь наносили на агарозный гель для разделения электрофорезом и нужные фрагменты выделяли из геля с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия).

3.2.7. Эксперименты с модельными клеточными линиями

3.2.7.1. Культивирование эукариотических клеток

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 (АТСС, США), клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (АТСС, США), клетки карциномы легкого человека A549 (АТСС, США) и клетки НЕК-293Т (Институт цитологии РАН, Россия) выращивали при 37°C, 5% CO₂ в среде DMEM с феноловым красным (Пан-Эко, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 mM L-глутамином (ПанЭко, Россия), далее обозначенной, как полная среда. Клетки HT-29 рака толстой кишки человека (АТСС) выращивали в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM L-глутамином. Иммуортализованные

оральные кератиноциты Het-1A человека (ATCC) культивировали в среде BEBM (Lonza, Швейцария). Перед субкультивированием клеток и проведением экспериментов культуральный пластик предварительно покрывали смесью 0,01 г/л фибронектина (Sigma-Aldrich, США), 0,03 г/л бычьего коллагена типа I (Sigma-Aldrich, США) и 0,01 г/л бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США), растворенных в культуральной среде BEBM. Все типы клеток пересеивали дважды в неделю. Первичная культура нейронов коры головного мозга была получена, как описано ранее [219]. Нейроны культивировали в среде Neurobasal-A (Gibco, США) с добавлением Glutamax (Life Technologies, США) и B27 (Gibco) (так называемая полная среда) на покрытых полилизинном покровных стеклах в 24-луночных планшетах в течение двух дней, затем для ингибирования роста глиальных клеток добавляли цитарабин (20 мкМ) (Sigma-Aldrich) и культуру выращивали в течение 12 дней со сменой среды каждые 4 дня, и использовали в экспериментах.

Для изучения влияния rSLURP-1 и rSLURP-2 на пролиферацию клетки высевали в 96-луночный планшет ($0.5 \cdot 10^4$ клеток на лунку для A549, A172 и U251 MG, $0.75 \cdot 10^4$ клеток на лунку для A431, $1 \cdot 10^4$ клеток на лунку для Het-1A и $1.5 \cdot 10^4$ клеток на лунку для MCF-7 и SKBR3) и культивировали в течение 24 ч. Затем добавляли rSLURP-1 или rSLURP-2 (растворенные в концентрации 1 мМ в 100 % DMSO и разведенные до необходимой концентрации соответствующей культуральной средой так, чтобы финальная концентрации DMSO не превышала 1 %), gefitinib или α -бунгаротоксин (водные растворы) в концентрациях от 1 мМ до 100 нМ и инкубировали в полной среде в течение 24 ч. Были использованы два типа отрицательного контроля: клетки без добавления каких-либо препаратов и клетки с добавлением rSLURP-1 в концентрации 0.001 нМ.

При обработке клеток rSLURP-1 или rSLURP-2 с различными ингибиторами (gefitinib, атропин, мекамиламин, тимолол) клетки предварительно инкубировали с этими ингибиторами (10 нМ на 10 мин) и промывали два раза полной средой. Затем к клеткам добавляли rSLURP-1 или rSLURP-2 (1 нМ) и соответствующий ингибитор (10 нМ), после чего клетки культивировали в течение 24 ч.

Для изучения пролонгированного эффекта rSLURP-1 или rSLURP-2 на пролиферацию (более 24 ч) к клеткам дополнительно добавляли rSLURP-1 или rSLURP-2 каждые 24 часа.

Для изучения влияния ws-Lynx1 на рост клеток A549 клетки высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток в полной среде ($0,5 \times 10^4$ клеток на лунку) и выращивали в течение 24 часов. После этого ws-Lynx1 из стокового раствора в 100% ДМСО разводили в полной среде и добавляли к клеткам в различных концентрациях для дальнейшей инкубации в течение 24, 48 или 72 часов. Каждые 24 часа клеточную среду аспирировали и заменяли свежей, содержащей предварительно растворенный ws-Lynx1 в той же концентрации, что и в исходной среде. Конечная концентрация ДМСО не превышала 0,1%. Добавленный ДМСО не влиял на рост клеток, как было проверено в дополнительных экспериментах.

Для совместного применения ws-Lynx1 с различными соединениями клетки A549 предварительно инкубировали с 2 мкМ бикикуллина, 10 нМ gefitinib, 150 нМ AG 825, 2 нМ тимолола, 1 мкМ Mes, 1 мкМ MLA, 10 нМ никотина, 1 мкМ PD98059, 100 нМ SP600125, 1 мкМ SB203580, 3 нМ вортманнина, 10 мкМ Bay11-7082, 1 мкМ JSH-23, 100 мкМ S31-201, 10 мкМ 285986 -31-4, 1 мкМ Go 6983 или 10 мкМ ксестоспонджина В в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали свежей полной средой, к клеткам добавляли 1 мкМ ws-Lynx1 и соответствующее соединение, и клетки дополнительно культивировали в течение 72 часов. Каждые 24 часа клеточную среду аспирировали и заменяли свежей, содержащей предварительно растворенный ws-Lynx1 и соответствующее соединение в той же концентрации, что и в исходной среде.

3.2.7.2. Культивирование клеток PC12 и анализ фосфорилирования ERK1/2 MAP-киназы

Клетки PC12 культивировали в 75-см² флаконах, покрытых 5мкг/мл поли-L-лизина (Sigma-Aldrich) в среде DMEM (Gibco Life Technologies, NY) с добавлением 10 % инактивированной сыворотки лошади, 5 % эмбриональной бычьей сыворотки, 25 ед/мл пенициллина, 25 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ глутамин при 37°C в увлажняемом инкубаторе с 5 % CO₂. Клетки пересаживали каждые 3-4 дня, отделяя их от подложки с помощью 0.25 % р-ра трипсина с 0.5 мМ ЭДТА в PBS и высевая при 15 % конфлюэнтности.

Для анализа фосфорилирования ERK1/2 клетки высевали в 24-луночные плашки при плотности 12×10^4 клеток/см² за 24 ч до эксперимента. В день эксперимента культуральную среду заменяли на среду с пониженным содержанием сыворотки (1 %

инактивированная сыворотка лошади, 0.5 % эмбриональная телячья сыворотка) на 3 часа, далее инкубировали 10 мин с добавлением rSLURP-1 или rSLURP-2, разведенных в DMSO/DMEM с финальной концентрацией DMSO не более 1 % и проводили стимуляцию 25 мкМ никотином в течение 5 минут. После стимуляции клетки лизировали в 100 мкл охлажденного на льду буфера для лизиса (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Трис, 4 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (v/v) NP-40, 1 мкл/мл коктейль ингибиторов протеаз, pH 7.4). Для достижения полного разрушения клеток лизат замораживали на 15 минут при -80°C, оттаивали, обрабатывали ультразвуком на льду. Лизаты хранили при -80°C до момента использования. Пептид VD-220 (RYNNHDPDGG) и rSLURP-1 в концентрациях 10 мкМ использовали в качестве негативных контролей.

Содержание фосфорилированной формы ERK1/2 в лизатах анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

3.2.7.3. Анализ пролиферативной активности

Клеточный рост измеряли с помощью колориметрического теста WST-1, являющегося аналогом МТТ-теста метаболической активности. Для этого водорастворимый тетразолиевый краситель WST-1 (Santa Cruz) и промежуточный электроноакцептор 1-m-PMS (Santa Cruz) добавляли к клеткам в конечных концентрациях 0.25 mM и 5 мкМ, соответственно, клетки инкубировали при 1 ч и детектировали образование окрашенного продукта по поглощению на 440-460 нм с нормализацией по поглощению на 655 нм с использованием микропланшетного сканера (Uniplan, ЗАР Пикон, Россия).

Флуоресцентная микроскопия с окраской Hoechst 33342/йодистый пропидий была использована для изучения токсических эффектов изучаемых препаратов, как было описано ранее в [220]. Клетки окрашивали 1 мкМ Hoechst 33342 и 0.5 мкМ йодистого пропидия в 96-луночных планшетах, затем исследовали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100-f с 40x объективом. Флуоресценцию йодистого пропидия возбуждали с использованием барьерного фильтра на 530–585 нм и регистрировали с использованием барьерного фильтра на 615 нм. Флуоресценцию Hoechst 33342 возбуждали с использованием барьерного фильтра на 359–371 нм и регистрировали с использованием барьерного фильтра на 410 нм. Для каждой лунки 96-

луночного планшета 5 кадров (320x240 мкм) анализировали с помощью функции «Analyze Particles» в программе ImageJ.

3.2.7.4. Остановка клеточного цикла в клетках A549

Клетки высаживали в 6-луночный культуральный планшет (12.5×10³ клеток на лунку) и инкубировали с 1 мкМ ws-Lyx1 в течение 24, 48, или 72 ч, как описано выше. Затем клетки открепляли трипсином, промывали EBSS и фиксировали в ледяном 70% этаноле в течение 4 часов. После фиксации клетки дважды промывали EBSS и ДНК экстрагировали 5-минутной инкубации в буфере для экстракции ДНК (200 мМ Na₂HPO₄ с 0.004% Triton X-100, pH 7.8). Затем клетки промывали EBSS, ресуспендировали в растворе для окраски ДНК (EBSS, 50 мг/мл йодистый пропидий, 0.2 мг/мл РНКазы без ДНКазной активности), и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Flowing 2.5.1 (Центр биотехнологий Турку, Финляндия).

3.2.7.5. Нокаун гена $\alpha 7$ -nAChR

Чтобы блокировать экспрессию нативных рецепторов $\alpha 7$, клетки A549 трансфецировали miRNA к $\alpha 7$ -nAChR (Таблица 3.1) [219]. Клетки высевали в 6-луночный культуральный планшет (1 × 10⁵ клеток на лунку) и выращивали в течение 24 часов. Затем РНК-дуплекс (1 мкг на лунку) разводили в 100 мкл буфера для трансфекции (Pan-Biotech, Германия), инкубировали в течение 5 минут и смешивали с 15 мкл предварительно разведенного реагента для трансфекции PanFect A-plus (Pan-Biotech, Германия). Конечную смесь инкубировали в течение 30 минут и добавляли к клеткам A549. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4 часов и среду заменяли свежей. Через 48 часов клетки отделяли раствором Версена и разделяли на две части. Одну часть инкубировали с α -Bgtx, меченным TRITC (Pan-Biotech, Германия), и экспрессию функционального $\alpha 7$ -nAChR анализировали с помощью проточной цитометрии. Другую часть высевали на 96-луночные культуральные планшеты (5 × 10⁴ клеток на лунку) и инкубировали с ws-Lyx1 в течение 72 часов, как описано выше. Жизнеспособность клеток анализировали с помощью теста WST-1. Для восстановления экспрессии $\alpha 7$ -nAChR клетки A549 совместно трансфецировали дуплексом miРНК и плазмидой, несущей ген полноразмерного $\alpha 7$ -nAChR человека (pVAX1/ $\alpha 7$ -nAChR) в избытке 10: 1 по отношению к дуплексу miРНК.

3.2.7.6. Анализ фосфорилирования киназ под действием SLURP-1 и ws-Lynx1

Чтобы исследовать влияние Lynx1 на внутриклеточные сигнальные пути в клетках A549, мы использовали набор антител Proteome Profiler (ARY003B, R&D Systems, США), который позволял одновременно обнаруживать фосфорилирование различных киназ. Клетки высевали в культуральные матрасы T25 и после прикрепления обрабатывали 1 мкМ ws-Lynx1 (из стока в ДМСО) или равным количеством ДМСО в контрольных образцах. Клетки выращивали в течение 72 часов. Каждые 24 часа клеточную среду аспирировали и заменяли свежей, содержащей предварительно растворенный ws-Lynx1 или ДМСО в той же концентрации, что и в исходной среде. После 72-часовой инкубации клетки отделяли с помощью скребка и лизировали в 400 мкл буфера для лизиса из комплекта реактивов к набору Proteome Profiler. После центрифугирования лизата супернатанты собирали и обрабатывали в соответствии с протоколом производителя. Кратко, мембраны из набора с иммобилизованными захватывающими антителами блокировали, инкубировали с клеточными лизатами в течение ночи и затем последовательно инкубировали с биотинилированными антителами для детектирования и конъюгатом стрептавидин-HRP. Сигнал HRP детектировали с помощью субстрата ECL с использованием сканера Bio-Rad Versa-Doc 4000 (Bio-Rad). Интенсивность пятен количественно определяли с помощью программного обеспечения Image J (NIH).

3.2.7.7. Проточная цитометрия

Оценка количества SLURP-1 и $\alpha 7$ -nAChR. Для предварительной инкубации в течение 24 ч 1 нМ rSLURP-1 добавляли в культуральную среду к клеткам, посеянным в 12-луночном планшете. Для инкубации в течении 1 ч клетки промывали дважды раствором солей Хэнкса (ПанЭко, Россия) и инкубировали в растворе Хэнкса с добавлением rSLURP-1 или в растворе Хэнкса без rSLURP-1 (в качестве контроля).

После инкубации с SLURP-1 клетки трижды промывали р-ром Версена (ПанЭко, Россия) и обрабатывали р-ром Версена с трипсином (ПанЭко, Россия) 10 мин, осаждали центрифугированием и фиксировали в 10 % растворе формальдегида в PBS в течение 15 мин. Фиксированные клетки пермеабелизировали в PBS, содержащем 0.1 % Triton X-100, 1 % BSA и 50 мМ NH₄Cl (для прекращения процесса фиксации). После этого

суспензию фиксированных и пермеабиллизированных клеток разделяли на 2 аликвоты, промывали PBS и инкубировали в р-ре первичных антител или контрольных изотипических антител IgG (контроль) в концентрации 10 мкг/мл в PBS с 1 % BSA в течение 45 мин при 20°C. Были использованы первичные антитела к SLURP-1 или к α 7-nAChR, в качестве изотипического контроля – IgG мыши или IgG.

После инкубации с первичными антителами клетки промывали PBS и инкубировали с вторичными антителами против IgG мыши или кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой AlexFluor-488 в концентрации 10 мкг/мл в PBS с 1 % BSA в течении 45 мин при 20°C. Обработанные клетки промывали и ресуспендировали в PBS, затем анализировали с помощью цитометра FC-500 (Beckman Coulter). Флуоресценцию возбуждали на длине волны 488 нм и регистрировали эмиссию в диапазоне 505-545 нм. Данные анализировали с помощью программы FlowJo X (Tree Star Inc., США). Для выделения интенсивности специфической компоненты окраски из медианной интенсивности флуоресценции с специфическими антителами вычитали медианную интенсивность флуоресценции соответствующего изотипического контроля.

Исследование апоптоза в клетках A549. В качестве маркера раннего апоптоза использовали экстернализацию фосфатидилсерина, который детектировали с помощью аннексина V. Для этого клетки A549 высевали на 35-мм чашку Петри (1 × 10⁵ клеток на чашку) и инкубировали с 1 мкМ ws-Lyx1 в течение 72 часов, как описано выше. После инкубации клетки отделяли раствором Версена и промывали в PBS. Затем клетки инкубировали с аннексином V, конъюгированным с фикоэритрином (PE) (A35111, Thermo Fisher Scientific), и промывали PBS. Наконец, клетки анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Flowing 2.5.1.

3.2.8. ПЦР в реальном времени

Для выделения суммарной мРНК из мозга крысы к замороженному мозгу крысы добавляли 1 мл реагента ExtractRNA (Евроген, Россия), а затем мозг быстро гомогенизировали на льду. Суммарная мРНК из культивируемых клеток также экстрагировалась с использованием реагента ExtractRNA в соответствии с инструкциями производителя. Затем мРНК из мозга крысы или культивируемых клеток обрабатывали ДНКазой I (Sigma-Aldrich, США) и очищали с использованием

стандартного набора CleanRNA (Евроген, Россия). Общая кДНК была синтезирована с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. После этого проводили ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, описанных в Таблице 1 (п. 2.1.7), и готовой к использованию смеси для количественного ПЦР с SYBR Green I и референсным флуоресцентным красителем ROX (Евроген, Россия). Кратко, 12,5 мкл разведенного образца кДНК, полученного из 1 мкг общей РНК, добавляли к 7,5 мкл мастер-смеси для ПЦР и 5 мкл смеси 5×qPCR-HS SYBRHigh ROX (Евроген, Россия). Отрицательные контроли содержали все компоненты смеси ПЦР, за исключением кДНК, и не давали сигнала. Все реакции ПЦР проводили с использованием термоциклера для детектирования в реальном времени DT96 Prime (ДНК-технология, Россия). Данные были проанализированы методом $\Delta\Delta C_t$ [219].

3.2.9. Конфокальная микроскопия

Для экспериментов с Lynx1 клетки высеивали в 8-луночную камеру на предметном стекле в полной среде за один день до эксперимента. Затем силиконовую камеру снимали с предметного стекла, и предметное стекло с прикрепленными клетками инкубировали в течение 2 часов в CO₂-инкубаторе с антителами к Lynx1 (кроличьи против Lynx1, Abcam, США, ab125035, 1: 1000, 0,76 мкг/мл) и с антителами к $\alpha 7$ -nAChR (мышинные анти- $\alpha 7$ -nAChR; Sigma, США, M220, 1: 2500, 2 мкг/мл). После этого клетки промывали 3 раза в сбалансированном солевом растворе Эрла (EBSS) и фиксировали 1% раствором формальдегида (20 мин, 4°C). Вторую инкубацию проводили с анти-кроличьим антителом, меченным AlexaFluor-488, (711-545-152, 1: 500, 2 мкг / мл Jackson Immunoresearch, США) для визуализации Lynx1 и анти-мышинным антителом, меченным AlexaFluor-594 IgG (Jackson Immunoresearch, 715-585-150, 1: 500, 2 мкг / мл) для визуализации $\alpha 7$ -nAChR. Нейроны культивировали на покровных стеклах и окрашивали, как и другие клетки. Ядра клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (0,1 мкг / мл, PanEco). После трехкратной промывки в EBSS клетки погружали в глицерин с помощью покровного стекла размером 24 × 50 мм. Покровное стекло иммобилизовали лаком для ногтей и наблюдали под масляным иммерсионным объективом × 60 с инвертированным конфокальным лазерным сканирующим микроскопом Nikon C1 + (TE2000E) (Nikon, Япония). Мощность лазера и напряжения детектора были одинаковыми для всех экспериментальных сеансов.

Для экспериментов с SLURP-1 клетки высевали на покровные стекла в 24-луночной планшете в полной среде за день до эксперимента. Клетки инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1/AlexaFluor-647 в течение 1 ч, фиксировали в 10 % растворе формальдегида, пермеабелизировали с помощью 0.1 % Triton X-100 (1 мин, 20°C), инкубировали в 1 % р-ре бычьего сывороточного альбумина в сбалансированном солевом р-ре Хэнкса (HBSS, ПанЭко, Россия) и окрашивали антителами. Для промежуточных отмывок использовали HBSS. Были использованы первичные антитела к EGFR и $\alpha 7$ -nAChR, вторичные антитела, конъюгированные с AlexaFluor 488. Окрашенные клетки помещали на предметное стекло, смачивали 50 мкл HBSS, накрывали покровным стеклом и исследовали с помощью инвертированного конфокального микроскопа SP2 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с 100× объективом с масляной иммерсией (NA=1.4). Изображения получали с латеральным разрешением примерно 0.2 мкм и аксиальным разрешением примерно 1.2 мкм. Изображения с окраской Alexa-488 и Alexa-647 были получены последовательно. Краситель Alexa-488 (Alexa-647) возбуждали лазером с длиной волны 488 нм (633 нм) и детектировали в спектральном диапазоне 505-550 нм (650-720 нм).

3.2.10. Определение пространственной структуры и динамических характеристик с помощью ЯМР-спектроскопии

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) были получены на спектрометрах Bruker Avance 600 и Avance 800, оборудованных криодатчиками. Для отнесения сигналов в спектре и для расчета пространственной структуры были использованы 0.3 мМ образец ^{13}C , ^{15}N -меченого rSLURP-1 (5 % D_2O , pH 4.7, 37°C), 0.5 мМ образец ^{13}C , ^{15}N -меченого rSLURP-2 (5 % D_2O , 5 % диоксан, pH 5.0, 37°C), 0.1 мМ образец ^{13}C , ^{15}N -меченого rLypd6 (5 % D_2O , pH 7.0, 37°C), 0.5 мМ образец ws-Lynx1 (5 % D_2O , pH 5.3, 25°C).

Отнесение сигналов белков в спектрах ЯМР выполняли по стандартной методике с использованием комбинации 3D ^{15}N -TOCSY-HSQC, ^{15}N -NOESY-HSQC, HCCN-TOCSY а также набора 3D спектров тройного (^1H , ^{13}C , ^{15}N) резонанса: HNCO, CBCACONH, HNCACB [221]. Для измерения вицинальных KCCB ($^3\text{J}_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$) использовали эксперимент 3D HNHA. Константы $^3\text{J}_{\text{H}\beta\text{N}}$ и $^3\text{J}_{\text{H}\beta\text{H}\alpha}$ оценивали по интенсивностям кросс-пиков в 3D спектре HNHB и анализу формы линий в 2D спектре NOESY, соответственно. Температурные коэффициенты амидных протонов ($\Delta\delta^1\text{H}^{\text{N}}/\Delta\text{T}$) измеряли в диапазоне 20

- 40° С, используя 2D ^{15}N -HSQC спектры. Для идентификации медленно обменивающихся амидных протонов образцы ^{15}N -меченных белков были лиофилизированы, а затем растворены в 100 % D_2O . Кинетику обмена H^{N} протонов на дейтерий растворителя оценивали по скорости уменьшения амплитуды сигналов в 2D $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC спектрах при 20°C. Для расчета вторичной структуры по значениям химических сдвигов использовали программу TALOS-N [222]. Релаксационные характеристики ядер ^{15}N молекул (скорости R1 и R2 релаксации и ядерный эффект Оверхаузера между ядрами ^{15}N и ^1H амидных групп основной цепи - $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}\text{-NOE}$) измеряли с использованием ^{15}N -меченых образцов на спектрометре AVANCE-600 с частотой резонанса ядер ^{15}N 60 МГц. Измерения проводили по стандартной методике с использованием псевдо 3D экспериментов. Параметры релаксации rSLURP-2 измеряли для двух образцов - образца, использованного для расчета структуры и 0.08 мМ образца $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -меченого rSLURP-2 в воде без добавления диоксана.

Для расчета пространственной структуры ограничения на расстояния были получены из интенсивностей кросс-пиков в 3D ^{15}N NOESY-HSQC и 2D спектрах NOESY с развязкой по ^{15}N ($\tau_{\text{m}} = 80\text{-}120$ мс). Ограничения на двугранные углы ϕ и χ_1 были получены из констант J и данных NOE. Пространственная структура была рассчитана с помощью программного обеспечения CYANA [223].

Координаты атомов для структуры rLypd6 были помещены в PDB под кодом доступа 6IB6, для rSLURP-2 – под номером 2N99, для ws-Lynx1 – 2L03, для rSLURP-1 – 2MUO (*транс*-конфигурация связи Tyr39-Pro40) и 2MUP (*цис*-конфигурация связи Tyr39-Pro40).

3.2.11. Компьютерное моделирование структуры комплексов

Модель внеклеточного лиганд-связывающего домена $\alpha 7$ -nAChR была построена по гомологии с кристаллической структурой химеры $\alpha 7/\text{AChBP}$ (PDB ID 3SQ9; [41]) и с помощью программного обеспечения MODELLER 8.2 [224]. Модели комплекса домена рецептора с лигандами были построены с использованием специальной процедуры белок-белкового докинга, разделенной на несколько этапов:

1. Молекулярную динамику (МД) модели $\alpha 7$ -nAChR в ячейке с водой рассчитывали, используя программу GROMACS 5.1.2 [225] с набором параметров Gromos96 45a3 и моделью воды SPC. Две независимые 200-нс траектории были рассчитаны и объединены. Конформационная кластеризация проводилась с

использованием объединенной 400-нс МД-траектории с алгоритмом кластеризации Gromos и порогом по расстоянию 0,25 нм. Модель внеклеточного домена $\alpha 3\beta 2$ -nAChR была построена аналогичным образом на основе двух независимо рассчитанных 200 нс траекторий. Для $\alpha 7$ -nAChR в процессе симуляции наблюдались различные конформации С-петли в отдельных субъединицах. В некоторых субъединицах наблюдалась «открытая» конформация, в некоторых – «закрытая». Кластеризация $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7$ («открытой») и $\alpha 7$ («закрытой») дала 9, 9, и 11 структур, соответственно.

2. Шесть траекторий МД по 200 нс каждая были рассчитаны для rLypd6 в воде, стартуя с разных структур ЯМР: три траектории для rLypd6 и три траектории для белка с удаленным С-концевым участком (Leu83-Ala95). Конформационная кластеризация была выполнена на объединенной 600-нс траектории для белка без С-концевой последовательности. Три МД-траектории продолжительностью 200 нс были рассчитаны для rSLURP-2 (с использованием трех различных ЯМР моделей в качестве начальной точки). Конформационная кластеризация для rSLURP-2 дала 11 структур.

3. Белок-белковый докинг был выполнен для комплексов $\alpha 7$ -nAChR/rLypd6, $\alpha 7$ -nAChR/rSLURP-2 (с «открытой» и «закрытой» С-петлей), $\alpha 3\beta 2$ -nAChR/rSLURP-2 в программе ZDOCK [226]. Для rLypd6 мы ограничили взаимодействие «фронтальной» половиной Lypd6 (содержащей три петли) и ортостерическим сайтом рецептора, используя стандартную опцию ZDOCK «block». Для каждого запуска ZDOCK систематически генерировал 2000 моделей комплекса; 100 лучших комплексов были использованы для дальнейшего анализа. Аналогично, было проведено $9 \times 11 = 99$, $9 \times 11 = 99$, и $11 \times 11 = 121$ раундов докинга для комплексов $\alpha 3\beta 2$ /rSLURP-2, $\alpha 7$ («закрытой»)/rSLURP-2 и $\alpha 7$ («открытой»)/rSLURP-2, соответственно. Также были введены ограничения на взаимодействие rSLURP-2 с участком вблизи от С-петли рецептора.

4. Решения докинга были дополнительно «отфильтрованы» с использованием нашего протокола пост-оценки, который требовал, чтобы: (а) rLypd6 или rSLURP-2 имели значительную площадь контакта с рецептором ($> 400 \text{ \AA}^2$); (б) число «хороших» контактов (h-связи, ионные мостики и стекинг) было выше 14, и (в) комплементарность гидрофобных / гидрофильных свойств в комплексе была $> 0,65$. Анализ этих свойств в комплексах проводился с помощью программного обеспечения PLATINUM [227].

3.2.12. Статистическая обработка результатов экспериментов

Все данные в работе представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (с.о.). $p < 0,05$ считали статистически значимым. Анализ проводился с использованием программы Prism v. 6.0 (GraphPad, США).

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Рекомбинантная продукция трехпетельных белков

Получение белков из природных источников в количествах, необходимых для структурно-функциональных исследований, почти всегда является трудно достижимой задачей. Это определяет необходимость разработки эффективных систем рекомбинантной продукции, позволяющих получать аналоги целевых белков в миллиграммовых количествах, в том числе содержащих различные (например, изотопные) метки и мутации. Трехпетельные белки семейства Луб/uPAR, объекты настоящей диссертационной работы, представляют собой небольшие белковые молекулы, состоящие из 60-90 аминокислотных остатков. Пространственная структура трехпетельных белков стабилизирована 4 консервативными дисульфидными связями, что делает их молекулы стабильными и устойчивыми даже в условиях сильных кислот и высоких температур [228]. Однако наличие в молекулах трехпетельных белков дисульфидных связей сильно затрудняет их получение *in vitro*. Наиболее экономичным и популярным способом получения белковых молекул *in vitro* является бактериальная продукция, но так как в бактериальной цитоплазме не образуются дисульфидные связи, молекула трехпетельного белка, не стабилизированная дисульфидными связями, подвергается протеолитической деградации или выпадает в тельца включения. В связи с этим, бактериальная продукция трехпетельных белков в достаточных для структурных и функциональных исследований количествах представляет собой сложную задачу и во многих случаях требует применения нестандартных подходов.

4.1.1. Продукция нейротоксина II из яда кобры *Naja oxiana* в составе слитного белка с тиоредоксином

Для продукции рекомбинантного аналога нейротоксина II из яда кобры *Naja oxiana* с целью получения его изотопно-меченых и мутантных вариантов для дальнейших структурных и функциональных исследований, было опробовано два подхода: продукция в виде слитного белка с тиоредоксином (Trx/NTII) и секрция (Рис. 4.1 А,Б).

Попытки культивировать клетки штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pLysS для продукции гибридного белка Trx/NTII при температуре 37°C приводили к полной

внутриклеточной преципитации целевого белка. Наиболее простым из известных способов повышения выхода растворимого белка является понижение температуры культивирования. При 20°C весь белок Trx/NTII находился в растворимой форме, но образовывал крупные ассоциаты, содержащие не менее пяти молекул гибрида. Дальнейшее понижение температуры культивирования до 12°C позволило решить проблему растворимости белка. При этой температуре практически весь белок находился в растворимом состоянии, причем не менее 60% в мономерной форме. Очистку гибридного белка Trx/NTII проводили в два этапа, используя хроматографию на металлохелат-аффинной и анионообменной смолах.

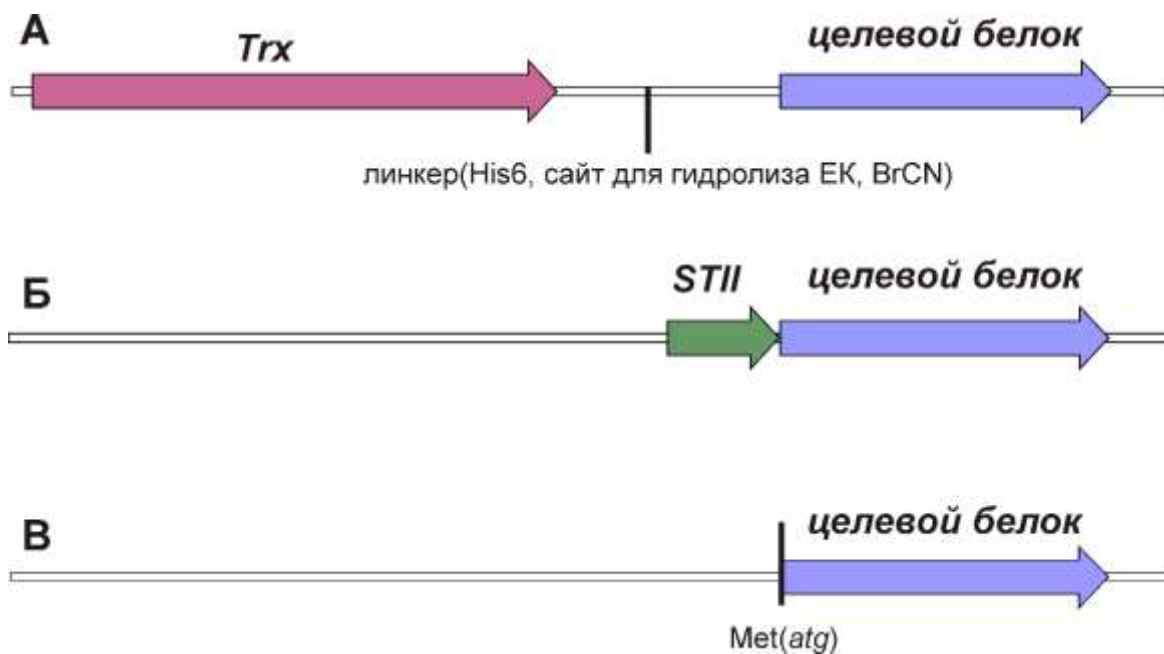


Рис. 4.1. Конструкции, использованные для получения рекомбинантных белков Луб/uPAR в настоящей работе: (А) конструкция для продукции в виде слитной полипептидной цепи с тиоредоксином; (Б) конструкция, содержащая лидерный пептид STII и обеспечивающая транслокацию синтезируемого белка в периплазматическое пространство клетки; (В) конструкция для продукции в виде цитоплазматических телец включения. Показано положение дополнительного остатка Met, возникающего из-за трансляции стартового кодона *atg*.

Пространственная структура гибридного белка Trx/NTII была проанализирована с помощью 1D ¹H ЯМР-спектроскопии¹. ЯМР-спектр гибридного белка Trx/NTII обладал следующими характерными особенностями: значительной дисперсией химических сдвигов NH-протонов, узкими линиями и большим сдвигом сигналов

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н.З.О. Шенкаревым, группа структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН

некоторых алифатических протонов в область сильного поля. Значительная дисперсия химических сдвигов сигналов NH-протонов указывает на наличие пространственной структуры (Рис. 4.2). Узкие линии сигналов ЯМР-спектра говорят о стабильности этой структуры, а большой сдвиг сигналов протонов некоторых алифатических боковых цепей свидетельствует о пространственной сближенности этих боковых цепей с ароматическими остатками, что часто наблюдается в β -структуре. На основе всего этого можно сделать вывод, что гибридный белок Tgx/NTII обладает пространственной структурой, и, видимо, нейротоксин II, присоединенный к тиоредоксину, также имеет определенную пространственную структуру.

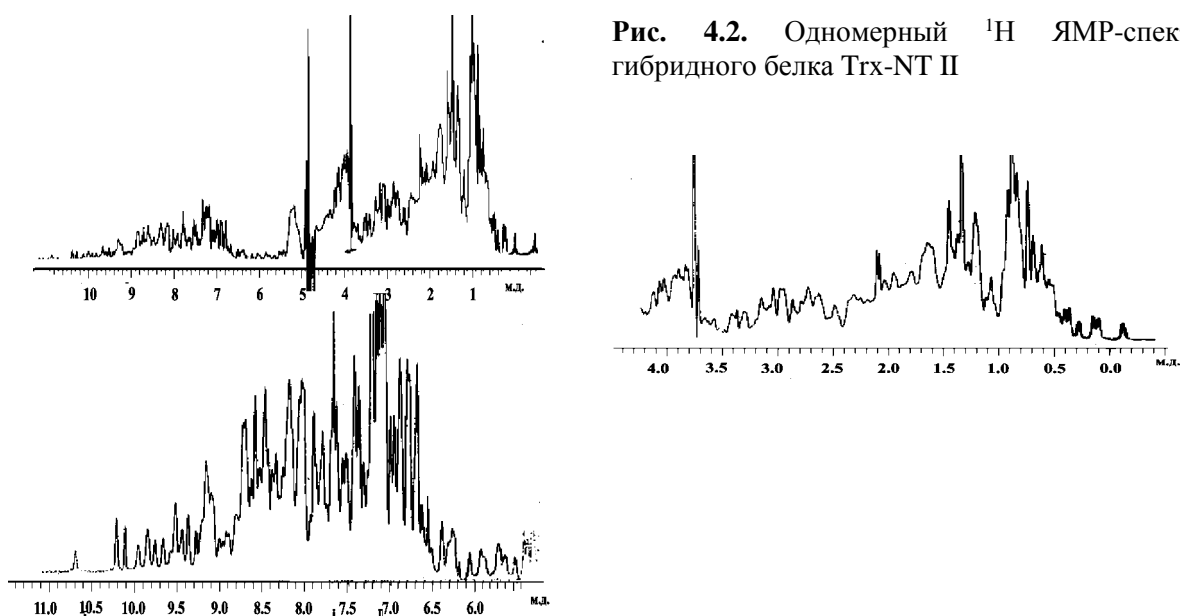


Рис. 4.2. Одномерный ^1H ЯМР-спектр гибридного белка Tgx-NT II

Был проведен эксперимент по ингибированию связывания ^{125}I -меченного α -бунгаротоксина с мышечным nAChR гибридным белком Tgx/NTII¹. Кривая ингибирования имела характерную S-образную форму и константа ингибирования (IC_{50}) равнялась $2,46 \cdot 10^{-7}$ М (Рис. 4.3). Таким образом, гибридный белок обладает способностью конкурировать с α -бунгаротоксином за специфические сайты связывания, расположенные на ацетилхолиновом рецепторе, сравнимой со способностью природного нейротоксина II ингибировать nAChR мышечного типа.

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и д.х.н. И.Е. Кашеверовым, Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

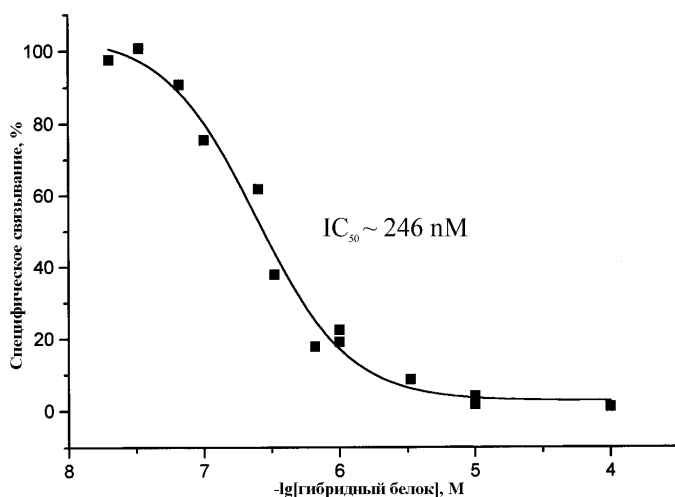


Рис. 4.3. Конкурентное ингибирование связывания ^{125}I - α -бунгаротоксина с ацетилхолиновым рецептором мышечного типа в присутствии гибридного белка Тгх/NTII.

Гидролиз выделенного и очищенного гибридного белка Тгх/NTII, включающего линкер ((Gly-Ser)₅-Gly-(Asp)₄-Lys-Leu-Met), малой субъединицей энтеропептидазы привел к получению белковых продуктов с молекулярными массами около 12 и 7 кДа, что соответствует расчетным массам молекул тиоредоксина и нейротоксина II. Однако, из-за низкой эффективности ферментативного гидролиза основным способом получения изолированного нейротоксина II стала обработка гибридного белка бромцианом. Известно, что остаток метионина в молекуле тиоредоксина не участвует в катализе окислительно-восстановительных реакций [229]. Поэтому, чтобы повысить выход целевого белка на стадии гидролиза бромцианом, аминокислотный остаток M37 тиоредоксина с помощью сайт-направленного мутагенеза был заменен на остаток аланина. В результате реакции с бромцианом был получен нейротоксин II с природной N-концевой последовательностью, что было подтверждено анализом по методу Эдмана. Сравнительный масс-спектрометрический анализ природного нейротоксина и рекомбинантного белка, а также электрофорез в полиакриламидном геле доказал идентичность их молекулярных масс. Сравнение спектров ^1H -ЯМР рекомбинантного и природного нейротоксина II показало, что белки обладают идентичной пространственной структурой и NH-C $^{\alpha}$ H-области в 2D COSY спектрах совпадают.

Таким образом, была разработана экспрессирующая система, которая позволяет получать нейротоксин II, – белок, содержащий четыре дисульфидных связи, в растворимой форме и с природной N-концевой последовательностью. Выход конечного продукта в этой системе составил примерно 6 мг с литра бактериальной культуры.

4.1.2. Экспрессирующая конструкция для секреции рекомбинантного нейротоксина II

Еще более эффективной оказалась другая конструкция, предназначенная для секреции нейротоксина II в периплазматическое пространство бактериальной клетки и культуральную среду (Рис. 4.1Б). В этой системе полипептидная последовательность нейротоксина II синтезируется вместе с лидерным пептидом, расположенным на *N*-конце молекулы токсина, который затем при секреции в периплазматическое пространство отщепляется специфической протеазой. После индукции нейротоксин II секретируется в периплазматическое пространство, и затем, видимо в результате лизиса внешней мембраны бактериальной клетки, накапливается в больших количествах в культуральной жидкости.

Конечный выход нейротоксина II в такой системе достигал около 30 мг с литра бактериальной культуры на минимальной среде. Эта система кроме высокого уровня экспрессии имеет еще ряд преимуществ перед системой для экспрессии нейротоксина II в составе слитного белка с тиоредоксином. Кроме того, так как белок секретируется в периплазматическое пространство и затем накапливается в культуральной жидкости, проблем с образованием правильно замкнутых дисульфидных связей не возникает. Достигнутый нами уровень экспрессии позволяет использовать эту систему для наработки миллиграммовых количеств мутантных вариантов нейротоксина II (даже в случае вероятного падения уровня экспрессии после мутагенеза в несколько раз).

N-концевой анализ по методу Эдмана показал, что полученный нами нейротоксин II, обладает *N*-концевой последовательностью, идентичной природной. Это свидетельствует о том, что нейротоксин действительно секретируется в культуральную жидкость и лидерный пептид отщепляется правильно. Сравнительный масс-спектрометрический анализ природного нейротоксина и рекомбинантного белка, а также электрофорез в полиакриламидном геле показали идентичность их молекулярных масс.

Анализ пространственной структуры рекомбинантного нейротоксина II был проведен с помощью метода ^1H ЯМР-спектроскопии¹ (Рис. 4.4). ЯМР спектр рекомбинантного аналога практически не отличался от спектра природного токсина и имел следующие характерные особенности: значительная дисперсия химических

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым, группа структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН

сдвигов NH-протонов, узкие линии и большой сдвиг сигналов некоторых алифатических протонов в область сильного поля. Значительная дисперсия химических сдвигов сигналов NH-протонов указывает на наличие пространственной структуры. Узкие линии сигналов ЯМР-спектра говорят о стабильности этой структуры, а большой сдвиг сигналов протонов некоторых алифатических боковых цепей свидетельствует о пространственной сближенности этих боковых цепей с ароматическими остатками, что часто наблюдается в β -структуре. На основе всего этого можно сделать вывод, что рекомбинантный нейротоксин II обладает корректной пространственной структурой.

Токсичность нейротоксина II проверяли на мышах линии BALB/C. После инъекции мыши препарата, содержащего рекомбинантный нейротоксин II, наблюдался эффект, схожий с эффектом от инъекции природного нейротоксина II. Инъекция рекомбинантного токсина в дозе 65 мкг/кг веса мыши приводила к смерти животного по истечении 2,5 часа, что согласуется с данными по токсичности природного нейротоксина II.

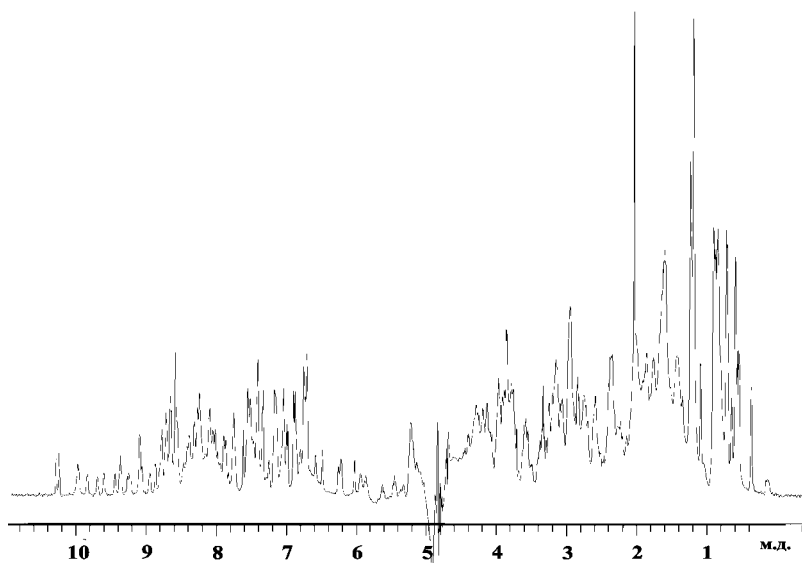


Рис. 4.4. Одномерный спектр ^1H -ЯМР рекомбинантного нейротоксина II

Следует заметить, что эта экспрессирующая система обладает рядом преимуществ перед уже существующими системами экспрессии токсинов, которых описано немало. В работе [230] ген эрабутоксина А экспрессировали в *E. coli*, сшивая его с геном фрагмента белка А. Однако выход рекомбинантного белка в этой системе составил всего 2 мг с 1 г сухих клеток, что примерно соответствует 2 мг белка с 1 л бактериальной культуры. В еще одной работе этих же авторов [231] также не удалось достичь уровня биосинтеза целевого белка – α -кобротоксина из яда *N. kaouthia* выше

1.2 мг/л бактериальной культуры. Группой американских ученых была опубликована работа [232], в которой α -Bgtx нарабатывали в клетках *Pichia pastoris* в виде секретирующегося белка, но и тут выход белка составил около 1 мг/л. Наиболее успешной является работа китайских коллег [233], демонстрирующая систему для экспрессии в *E. coli*, которая позволяет получать короткий α -нейротоксин из яда кобры в составе гибридного белка с тиоредоксином. Гибридный белок секретировался в периплазматическое пространство клеток *E. coli*. Выход нейротоксина в этой работе достигал 12 мг/л бактериальной культуры, однако, рекомбинантный нейротоксин, полученный в результате кислотного гидролиза гибридного белка, имел дополнительный аминокислотный остаток пролина на *N*-конце молекулы.

4.1.3. Бактериальная продукция и ренатурация из телец включения трехпетельных белков человека и токсина WTX

В ходе работы обе системы продукции, разработанные для нейротоксина II, были опробованы для бактериальной продукции «слабого» токсина WTX и рекомбинантных аналогов белков человека ws-Lynx1 и rSLURP-1. Для всех этих белков наблюдалась схожая картина: в первой системе гибридный белок с тиоредоксином накапливался в растворимой форме в цитоплазме. Однако, либо не удавалось найти условия специфического гидролиза слитного белка (WTX, ws-Lynx1), либо целевой белок не обладал корректной пространственной структурой в составе гибридного белка (rSLURP-1). Использование второй системы, разработанной для бактериальной секреции, оказалось еще менее удачным, так как в этом случае выход целевого белка во всех случаях был ничтожно мал (< 50 мкг с 1 л бактериальной культуры).

В связи с этим для получения рекомбинантных трехпетельных белков человека (ws-Lynx1, rLypd6, rSLURP-1, rSLURP-2) и «слабого» токсина WTX мы использовали альтернативный подход, основанный на «прямой» экспрессии в клетках *E. coli* в виде цитоплазматических нерастворимых телец включения (Рис. 4.1В) с последующей солюбилизацией и рефолдингом. Для увеличения эффективности очистки денатурированных белков с помощью ионообменной хроматографии, Cys остатки в рекомбинантных белках были химически модифицированы в S-сульфонаты (Cys-S-SO₃⁻). Окислительный сульфитолиз был осуществлен путем солюбилизации телец включения в 8 М мочеvine в присутствии сульфита натрия и тетрагидрата натрия. Для первоначальной очистки S-сульфированных белков использовали хроматографию на

анион-обменной смоле ДЕАП-Spheronit. Большая часть слабо заряженных и положительно заряженных примесей не сорбируется на этой смоле. В то же время связывание S-сульфированных белков к смоле достаточно сильно; что позволяет отделить отрицательно заряженный белок и небелковые примеси (например, нуклеиновые кислоты) путем промывания колонки 1 М NaCl. Примеси, связавшиеся со смолой из-за образования водородных связей, смывали с колонки с помощью дополнительной промывки 8 М мочевиной. Одновременное применение 8 М мочевины и 0,3 М NaCl приводило к элюции целевого белка с колонки. Следует отметить, что использование мочевины в буфере для элюции позволяет сохранить низкую концентрацию NaCl, чтобы избежать дополнительной стадии обессоливания.

После первоначальной очистки на ионообменной хроматографии, S-сульфированные белки восстанавливали с помощью DTT и очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Последующая стадия рефолдинга чрезвычайно чувствительна к чистоте восстановленного белка. Предложенный способ последовательного применения ион-обменной и гидрофобной хроматографий позволяет добиться высокой степени очистки денатурированного белка, необходимой для успешной ренатурации.

Ренатурацию белков осуществляли в буфере, содержащем L-аргинин и мочевины в присутствии восстановленной и окисленной формы глутатиона. Было показано, что добавление 1,5 М мочевины в буфер для ренатурации предотвращает преципитацию токсина WTX и rSLURP-1 и увеличивает общий выход свернутых белков. Другой добавкой, увеличивающей выход ренатурации трехпетельных белков, является L-аргинин. Способность L-аргинина и L-глутамата стабилизировать белки в денатурирующих условиях была описана в [234], но наши данные свидетельствуют о том, что только L-аргинин способствует правильному сворачиванию трехпетельных белков. Для дальнейшей оптимизации условий ренатурации, пробовали различные концентрации восстановленной и окисленной формы глутатиона в буфере для ренатурации.

4.1.4. Сравнение эффективности ренатурации различных трехпетельных белков

Описанный выше метод продукции в виде бактериальных цитоплазматических телец включения успешно был применен для получения токсинов змей STX1, WTX и

мамбалгина-2 (Mblgn-2) и четырех аналогов белков человека Lynx1, Lypd6, SLURP-1 и SLURP-2. Эти белки имеют разное количество дисульфидных связей и разную длину петель (Таблица 4.1). Протоколы рефолдинга для каждого белка были тщательно оптимизированы и отличались только содержанием форм глутатиона и значением pH буфера для ренатурации. Используя CTX1, WTX, Mblgn-2, Lynx1, SLURP-1 и SLURP-2, мы сравнили эффективности ренатурации трехпетельных белков в зависимости от их физико-химических и структурных свойств. Выход ренатурации определялся нами как отношение количества ренатурированного белка к количеству первоначального белка, очищенного из телец включения и варьировался от 4,0% для ws-Lynx1 и rSLURP-1 до 19,5% для rSLURP-2 (Таблица 4.1). Эти величины сравнивали с различными параметрами, описывающими аминокислотную последовательность (длина, распределение отдельных аминокислот), физические свойства (заряд, значение pI, гидрофобность) и пространственную структуру (содержание элементов вторичной структуры и площадь заглубленной поверхности) белка. Наиболее важные результаты сравнения приведены в Таблице 4.1 вместе с расчетными значениями квадрата коэффициента корреляции (R^2).

Удивительно, но длина молекулы белка, его общий заряд и теоретическое значение изоэлектрической точки вместе с числом дисульфидных связей и общего количества остатков пролина совершенно не коррелировали с наблюдаемыми выходами ренатурации (Таблица 4.1). Например, выход ренатурации Mblgn-2 (4 дисульфидных связи) был сравним с выходами ws-Lynx1 и rSLURP-1 (5 дисульфидных связи). Эти три белка имели самую низкую способность к ренатурации *in vitro* среди исследованных трехпетельных белков (Таблица 4.1). Содержание β -структуры и длина петлевых участков также не коррелировали с эффективностью ренатурации. Так, ws-Lynx1 имеет наибольшее содержание β -структуры (~ 46%) и, соответственно, самые короткие петлевые участки, но при этом обладает одним из самых низких выходов ренатурации (Таблица 4.1). Напротив, rSLURP-2 обладает наиболее высоким выходом ренатурации (~ 19.5%), а его структура характеризуется одними из самых коротких β -тяжей (содержание ~ 30%) и длинными неструктурированными петлями.

Существует мало информации о влиянии конкретных структурных факторов на процесс ренатурации трехпетельных белков *in vitro*. Ранее было выдвинуто предположение, что длина второй петли может определять общую скорость сворачивания трехпетельных токсинов змей [235]. Однако, анализ последовательности

исследованных трехпетельных белков не обнаружил такой корреляции с эффективностью ренатурации (Рис. 4.5). В другой работе было показано, что сворачивание токсина СТХIII может включать в себя несколько этапов: сначала формируется антипараллельный тройной β -лист в петлях II и III, а затем идет формирование двойного β -листа в петле I [236]. Поэтому мы проанализировали последовательности петли III в исследуемых трехпетельных белках. Ws-Lynx1 содержит самую длинную петлю III, и методами ЯМР-спектроскопии была показана высокая конформационная подвижность этой области (см. п. 4.3.1.2). При этом, консервативный остаток Pro43 (нумерация дана для СТХ1, Рис. 4.5) присутствует только в белках, которые сворачиваются с высокой эффективностью (rSLURP-2, WTX и rCTX1), но не в ws-Lynx1, rSLURP-1, и Mblgn-2. Наличие остатков пролина может способствовать фиксации специфической конформации белковой цепи и влиять на сворачивание белка [237].

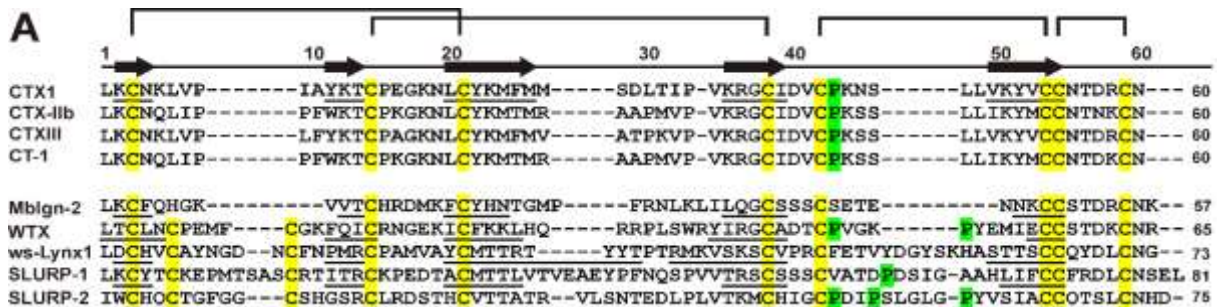


Рис. 4.5. Сравнение аминокислотных последовательностей токсина СТХ1 из *N. oxiana* (UniProt номер: P01451) с другими токсинами и трехпетельными белками человека: СТХ-IIb из *N. mossambica* (P01467), СТХIII из *N. atra* (P60301), CT-1 из *N. pallida* (P01468), Mblgn-2, -mambalgin-2 из *D. polylepis* (P0DKS3), WTX из *N. kaouthia* (P82935), водорастворимый домен белка человека Lynx-1 (Q9BZG9-2), SLURP-1 (P55000), SLURP-2 (Q9BZG9-3). Остатки Cys и Pro петли III выделены желтым и зеленым цветом. Фрагменты пространственной структуры, соответствующие β -тяжам, подчеркнуты.

Следует отметить, что rSLURP-2, который имеет самый высокий выход ренатурации, обладает тремя остатками Pro в петле III. Вероятно, небольшая длина и присутствие остатков Pro в конкретных положениях петли III имеют важное значение для быстрого и эффективного сворачивания тройного антипараллельного β -листа в петлях II и III, которое инициирует общую сборку трехпетельной структуры. С другой стороны, повышенная подвижность длинной петли III может мешать ренатурации трехпетельных белков. Следует отметить, что СТХIII [236] также содержит остаток Pro в положении, гомологичном Pro43 (Рис. 4.5). Линейный регрессионный анализ ($R^2 \sim$

0,61, Таблица 4.1) также указал на наличие вероятной положительной корреляции между количеством остатков Pro в петле III и выходом ренатурации.

Есть и другие факторы, которые могут влиять на фолдинг глобулярных белков *in vitro*. Хорошо известно, что большинство глобулярных белков содержит ядро, сформированное боковыми цепями неполярных остатков, и гидрофобные взаимодействия играют решающую роль в стабилизации их пространственной структуры [238]. В соответствии с этим, мы наблюдали слабую корреляцию ($R^2 \sim 0,35$) между выходом ренатурации и общим индексом гидрофобности белка (GRAVY), который рассчитывается с использованием шкалы гидрофобности предложенной Kyte и Doolittle [239] (Таблица 4.1). Корреляция становится более выраженной ($R^2 \sim 0,63$), если для сравнения использовать алифатический индекс (Al) [240] (Рис. 4.6А). Этот показатель отражает содержание алифатических остатков (Ala, Ile, Leu, Val) в молекуле белка, взвешенное по относительному объему их гидрофобных боковых цепей.

Анализ пространственных структур трехпетельных белков показал статистически значимую корреляцию ($R^2 \sim 0,86$, $p < 0,05$) между выходом ренатурации и долей поверхности белка, заглубленной внутри молекулы (Рис 4.6В). Следует отметить, что относительно небольшой прирост в заглубленной площади поверхности (от $\sim 41\%$ до 46%) приводит к увеличению выхода ренатурации на $\sim 15\%$. Анализ заглубленной поверхности по типу остатков показал, что эффективность процесса ренатурации контролируется взаимодействием между неполярными или ароматическими остатками (Рис 4.6В). Эти данные указывают на то, что гидрофобное ядро также имеет важное значение для сворачивания трехпетельных белков, β -структурное ядро которых стабилизировано дисульфидными связями.

Эффективная ренатурация *in vitro*, зависящая гидрофобных взаимодействий, не всегда приводит к высокой стабильности свернутого белка в растворе. Например, наиболее гидрофобный из исследуемых трехпетельных белков, – SLURP-2 (GRAVY индекс +0,12), характеризуется наиболее высоким выходом ренатурации, но в то же время имеет ограниченную стабильность в растворе. Изменение величины pH из выше или ниже значений 5-6 или увеличение концентрации белка выше 0,2 мМ приводит к разворачиванию или агрегации этого белка (п. 4.4.2.6).

Таблица 4.1. Сравнение эффективности ренатурации *in vitro* и физико-химических и структурных свойств трехпетельных белков, ренатурированных из телец включения *E. coli*.

Белок ^a PDB ID	Выход ренатуры, % ^b	№ а.о. ^c	№ S-S связей	№ Pro в петле III	содержание (%) а.о. ^c				Физические свойства ^d				Вторичная структура (%) ^e			Доступн.растворителю/заглубл.поверхность ^f			
					Cys	Pro	Заряж. +поляр.	Неполяр. аромат. - CP	заряд	pI	GRAVY	AI (%)	β-тяжи	β/γ-поворот	неупор.	Sbur. (Å ²)	Pbur. (%)	Заряж.+Полярн (%)	неполяр+аромат. (%)
SLURP2 2N99	19.5	76	5	3	13.2	5.3	52.6	28.9	-1	6.5	+0.12	74.3	30.3	34.2	35.5	4526	46.2	20.8	25.3
CTX1 1RL5	15.0	61	4	1	13.1	6.6	42.6	37.7	+6	9.0	+0.05	82.9	39.3	39.3	21.3	3734	45.2	18.2	27.0
WTX-P33A 2MJO	9.5	66	5	2	15.2	4.5	50.0	30.3	+6	8.9	-0.39	54.7	34.8	36.4	28.8	4072	43.5	19.9	23.7
Mblgn-2 2MFA [241]	5.0	58	4	0	13.8	1.7	60.3	24.1	+5	8.9	-0.58	43.6	31.0	39.7	29.3	3394	42.9	20.2	22.7
Ws-Lynx1 2LO3	4.0	74	5	0	13.5	5.4	47.3	33.8	+2	8.0	-0.29	35.5	45.9	24.3	29.7	4276	43.3	20.4	23.0
SLURP1 2MUO 2MUP	4.0	82	5	1	12.2	6.1	48.8	32.9	-2	5.2	+0.04	63.0	29.3	32.9	37.8	4511	41.4	17.7	23.7
R² g		0.01	0.01	0.61	0.0	0.11	0.05	0.02	0.0	0.0	0.35	0.63	0.02	0.13	0.03	0.02	0.86	0.03	0.68

^aКоординаты атомов трехпетельных белков взяты из базы данных (<http://www.rcsb.org>). Все структуры определены с помощью ЯМР-спектроскопии. Все структуры кроме CTX1 и Mlgn-2 определены, используя рекомбинантные аналоги с дополнительным N-концевым Met остатком.

^bВыход ренатурации определялся как соотношение количества ренатурированного белка к количеству белка, очищенного из телец включения.

^cПоследовательности всех белков содержат дополнительный N-концевой остаток метионина. Относительное содержание остатков (Cys and Pro), «заряженных плюс полярных остатков» (DEKR+GNQHST), «неполярных плюс ароматических остатков за исключением Cys и Pro» (AILVM+FWY).

^dФизико-химические свойства белков: теоретическое значение pI, индекс гидрофобности (GRAVY, шкала Kyte и Doolittle [239]) и алифатический индекс (AI) [240] были рассчитаны, используя инструмент ProtParam EXPASY web-ресурса (web.expasy.org/protparam/).

^eЭлементы вторичной структуры были проанализированы, используя программу STRIDE [242].

^fПлощадь поверхности белков и их остатков, доступной растворителю, рассчитана, используя программу MOLMOL [243] и зонд радиусом 1.4 Å. Площадь заглубленной поверхности белка (*Sbur*) есть разница между площадью поверхности, доступной растворителю, в полностью развернутой конформации (*SASext*), и средней площадью поверхности свернутого белка, доступной растворителю, в наборе ЯМР структур. Доля заглубленной поверхности (*Pbur*) есть отношение *Sbur/SASext*. «заряженные плюс полярные остатки» были определены как (DEKR+GNQHST) и «неполярные плюс ароматические остатки» определялись как (CPAILVM+FWY).

^gВеличины квадратичного корреляционного коэффициента Пирса (R²) со статически достоверными линейными корреляциями (p<0.05) показаны жирным шрифтом.

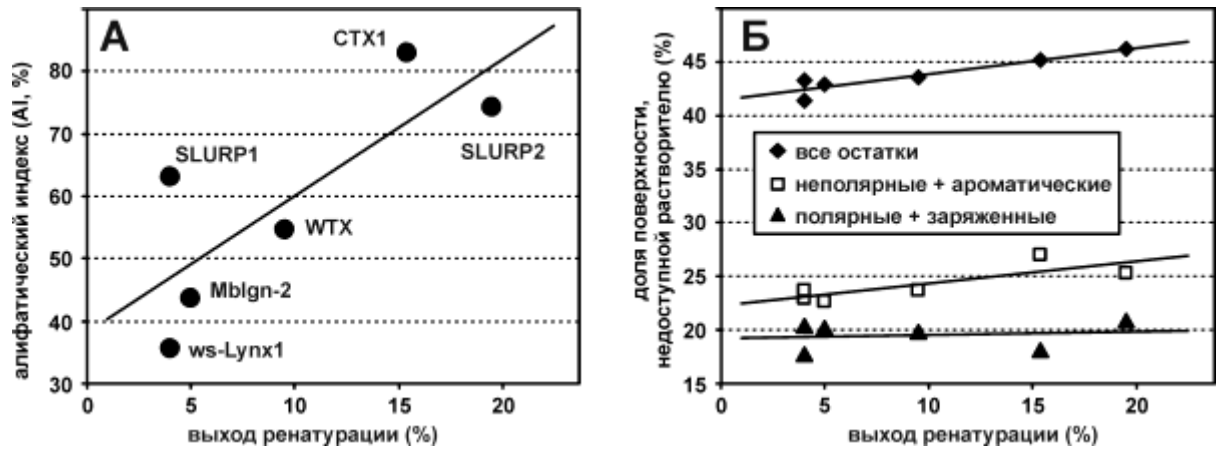


Рис. 4.6. Анализ зависимости эффективности ренатурации трехпетельных белков от алифатического индекса (AI) (А) и доли белковой поверхности, недоступной растворителю (Б). Линейная корреляция на панели (А) характеризуется величиной R^2 0.63 и не достигает статистической значимости. Линейные корреляции на панели (В), рассчитанные для доли заглубленной поверхности «всех остатков» и «неполярных и ароматических остатков» (CPAILVM+FWY) статистически достоверны ($p < 0.05$) с величинами R^2 0.86 и 0.68, соответственно. Выход ренатурации не коррелирует с долей заглубленной поверхности полярных и заряженных остатков (DEKR+GNQHST) ($R^2 = 0.03$). См. подпись к Таблице 4.1 для детального описания вычислений.

Представленный анализ можно рассматривать лишь в качестве предварительного шага в понимании ренатурации трехпетельных белков *in vitro*. Наличие новых пространственных структур и исследований по ренатурации предоставит дополнительную информацию и позволит сделать более детальные выводы о корреляции между специфическими структурными детерминантами и механизмами сворачивания.

Таким образом, для достижения поставленных задач были опробованы различные подходы к экспрессии рекомбинантных аналогов трехпетельных белков: токсинов змей и белков человека. Для получения рекомбинантного аналога нейротоксина II, содержащего четыре дисульфидных связи в «ядре» молекулы, наиболее удачным вариантом с точки зрения выхода функционального белка является секретионная конструкция, предназначенная для секреции белка в периплазматическое пространство и накоплению его в среде роста. Для трехпетельных белков, содержащих дополнительную дисульфидную связь в первой петле, включая белки человека Lynx1, Lypd6, SLURP-1, SLURP-2 и токсин кобры *Naja kaouthia* WTX, наиболее эффективной оказалась система, основанная на продукции белков в виде нерастворимых цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией. При этом эффективность ренатурации зависит от индивидуальных особенностей целевого белка: от количества остатков пролина в третьей петле и площади поверхности заглубленных гидрофобных остатков.

4.2. Структурные детерминанты, важные для взаимодействия трехпетельных нейротоксинов с мишенями

4.2.1. Мембранотропный сайт нейротоксина II из яда *Naja oxiana*

Для многих мембранных рецепторов, включая nAChR, было показано, что мембранное окружение может влиять на местную концентрацию, диффузию, конформацию и ориентацию лигандов [244–250]. Предварительное взаимодействие лиганда с мембраной может значительно облегчить поиск рецептора-мишени и взаимодействие с ним, за счет более эффективной двумерной диффузии и «пред-ориентации» лиганда. Этот механизм может быть условно назван «механизмом мембранного катализа». В случае nAChR, хорошо известно, что физические свойства (текучесть, поверхностная плотность заряда, упаковка липидов и т.д.), а также состав липидной мембраны влияют на конформационное равновесие и функционирование рецептора [251–253], что может влиять на взаимодействие с α -нейротоксинами [250]. Исследование методами рентгеноструктурного анализа с низким разрешением ($\sim 14 \text{ \AA}$) комплекса α -бунгаротоксина с nAChR из *Torpedo californica* выявило прямые контакты между токсином и липидным окружением рецептора [251]. Было выдвинуто предположение, что липидное окружение рецептора может играть определенную роль во взаимодействии α -нейротоксинов с nAChR.

4.2.1.1. Нейротоксин II из *Naja oxiana* связывается с липосомами, имитирующими мембранное окружение nAChR

Природные мембраны, содержащие nAChR мышечного типа, состоят из фосфолипидов ($\sim 70\%$) с цвиттер-ионными (в основном фосфатидилхолин (PC) и фосфатидилэтаноламин (PE)) и анионными (в основном фосфатидилсерин (PS), а также фосфатидилинозитол, кардиолипин и фосфатидные кислоты) полярными головками, а также холестерина ($\sim 20\%$, Chol). Доля анионных фосфолипидов варьирует от $\sim 20\%$ для всей мембраны, содержащей nAChR, до $\sim 45\%$ среди липидов, напрямую контактирующих с рецептором [249,254]. Эксперименты с nAChR мышечного типа в модельных липидных мембранах показали, что работа рецептора чувствительна к составу мембраны, а именно к содержанию Chol, PS, и некоторых цвиттер-ионных фосфолипидов, таких как PC и PE [245,246,255]. В частности, nAChR сохраняет функциональную

активность в модельном липидном бислое, состоящем из фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и холестерина с молярным соотношением 3: 1: 1 [245,246].

Для исследования возможной роли клеточной мембраны во взаимодействии NTII с nAChR в настоящей работе¹ также была выбрана мембрана состава DOPC/DOPS/Chol = 3: 1: 1. Предварительные эксперименты показали сильное взаимодействие NTII с мембраной, которое зависело от молярного соотношения липид/белок (L/P) и ионной силы раствора. При 70 мМ KCl и L/P = 40:1 наблюдалось равное соотношение между мембраносвязанным и свободным состояниями токсина. Дальнейшее увеличение отношения L/P до 130:1 (при 70 мМ KCl) приводило к преобладанию мембраносвязанного состояния NTII. В целом, увеличение отрицательного заряда модельной мембраны, уменьшение ионной силы раствора и увеличение молярного соотношения липид/NTII сдвигали равновесие между связанным и свободным NTII в сторону связывания с липидным бислоем. Таким образом, мы можем ожидать, что при значении ионной силы, близком к физиологическому значению, значительная часть молекул токсина будет связана с липидным бислоем, окружающим nAChR, благодаря большому значению L/P в природной мембране.

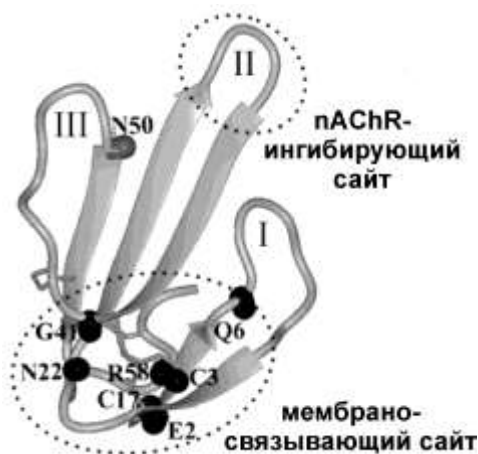


Рис. 4.7. Расположение HN групп остатков Glu2, Cys3, Gln6, Cys17, Asn22, Gly41 и Arg58 (обозначены шариками) в пространственной структуре NTII (Protein Data Bank, код 1NOR). Петли токсина обозначены римскими цифрами. Мембранотропный сайт и сайт, отвечающий за ингибирование nAChR, показаны пунктиром.

4.2.1.2. Сайт связывания с мембраной расположен в «голове» нейротоксина II

Анализ изменений химических сдвигов ¹H-¹⁵N-меченого нейротоксина при взаимодействии с мембраной выявил наиболее чувствительные остатки NTII (Glu2, Cys3, Gln6, Cys17, Asn22, Gly41 и Arg58, Рис. 4.7). Пространственная локализация Glu2, Cys3, Gln6, Cys17, Asn22, Gly41 и Arg58 остатков в "голове" молекулы NTII выявляет участок, отвечающий за связывание с мембраной (Рис. 4.7). Важно отметить, что сайт связывания с

¹ Совместно с к.ф.-м.н. Д.М. Лесовым и к.х.н. Э.В. Бочаровым, лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН

мембраной пространственно удален от сайта связывания с рецептором, расположенным на конце центральной петли II NTII [256]. Расстояние между сайтами составляет $\sim 35 \text{ \AA}$, что подразумевает независимость мембранного и рецепторного сайтов связывания NTII.

4.2.1.3. Компьютерное моделирование предсказывает топологию взаимодействия NTII с мембраной

Компьютерное моделирование взаимодействия NTII с липидным бислоем, состоящим из молекул DOPS, показало, что NTII образует наиболее устойчивые контакты с одной молекулой липида¹. Полярная головка липида взаимодействует с заряженными боковыми цепями остатков Glu2, Asp57 и Arg58, расположенными в мембраносвязывающем участке NTII, описанном выше. Поверхность участка обладает особыми электростатическими свойствами (Рис. 4.8B), т.е. существуют области высокого отрицательного и положительного электростатического потенциала, расположенные рядом друг с другом. Таким образом, отрицательно заряженные фосфатная и карбоксильная группы молекулы DOPS взаимодействуют с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg58, образуя 1-3 водородные связи, в то время как положительно заряженная аминогруппа DOPS взаимодействует с карбоксильными группами Glu2 и Asp57, образуя две водородные связи (Рис. 4.8B). Также было обнаружено, что две соседние молекулы DOPS, способны взаимодействовать с боковыми цепями Glu2, Thr14, Thr16 и Ser18. Суммируя полученные данные, можно заключить, что существует переменная сеть межмолекулярных водородных связей, образованных на интерфейсе комплекса мембрана/NTII, которая ограничивает ориентацию молекулы токсина ($30^\circ < \alpha < 60^\circ$, как обозначено на Рис. 4.8A), при этом обеспечивая определенную, но подвижную топологию токсина на поверхности мембраны. Таким образом, взаимодействие между токсином и мембраной не является прочным, что находится в согласии с наблюдаемой зависимостью от ионной силы раствора. Следует отметить, что такая топология NTII на липидном бислое (Рис. 4.8A) хорошо согласуется с экспериментальными данными ЯМР, указывающими на локализацию мембраносвязывающего сайта в области «головы» токсина (Рис. 4.7).

¹ Совместно с Ю.А. Косинским, лаборатория моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН

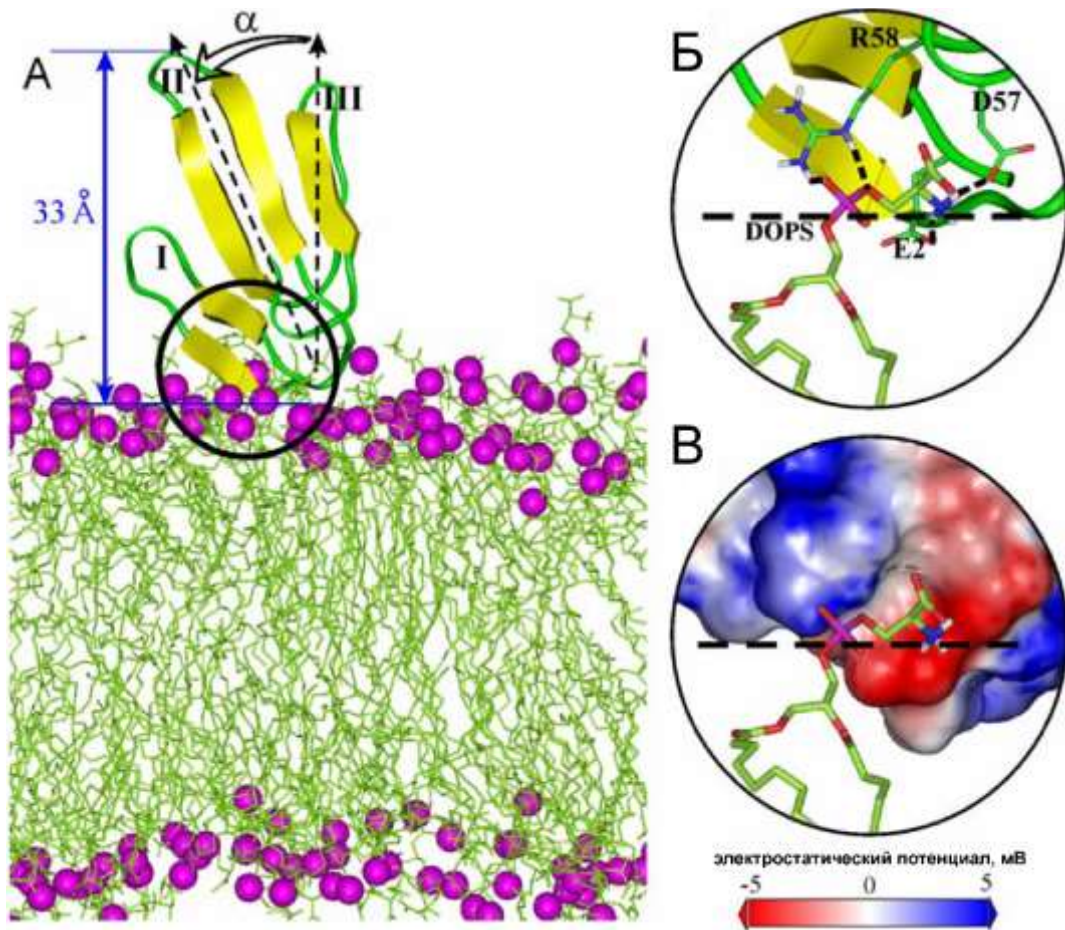


Рис. 4.8. Топология NTII на поверхности мембраны. (А). Модель ассоциации NTII с бислоем DOPS. Молекулы липидов показаны зелеными палочками, а атомы фосфора показаны пурпурными шариками. Показан угол α между центральной петлей NTII (вектор Thr21 C α – His31 C α) и нормалью мембраны. Расстояние от атомов фосфора липидов до конца центральной петли II токсина (сайт связывания с nAChR) обозначено синей стрелкой. (Б). “Захват” полярной головки фосфатидилсерина боковыми цепями остатков Glu2, Asp57 и Arg58 NTII. Атомы углерода, азота, водорода, кислорода и фосфора показаны зеленым, синим, белым, красным и пурпурным цветами, соответственно. Межмолекулярные водородные связи показаны пунктирными линиями. Липидный интерфейс показан пунктирной черной линией. (В). Электростатические взаимодействия заряженных групп полярной головки DOPS с мембраносвязывающим сайтом NTII.

4.2.1.4. Мутации в области «головы» нейротоксина II приводят к исчезновению специфического взаимодействия токсин/мембрана

Чтобы подтвердить участие «головы» токсина во взаимодействии с мембраной, был получен ряд мутантных форм NTII, с заменами остатков, которые по данным компьютерного моделирования, участвуют во взаимодействии с молекулой DOPS. Было получено три мутантных варианта NTII: Glu2Gln/Asp57Asn, Asp57Asn/Arg58Ala, Glu2Gln/Asp57Asn/Arg58Ala. Данные КД- и ЯМР-спектроскопии показали, что только мутантная форма NTII_{E2Q/D57N} сохраняла нативную пространственную структуру. Исследование взаимодействия NTII_{E2Q/D57N} с липосомами указало на отсутствие специфического взаимодействия токсина с мембраной.

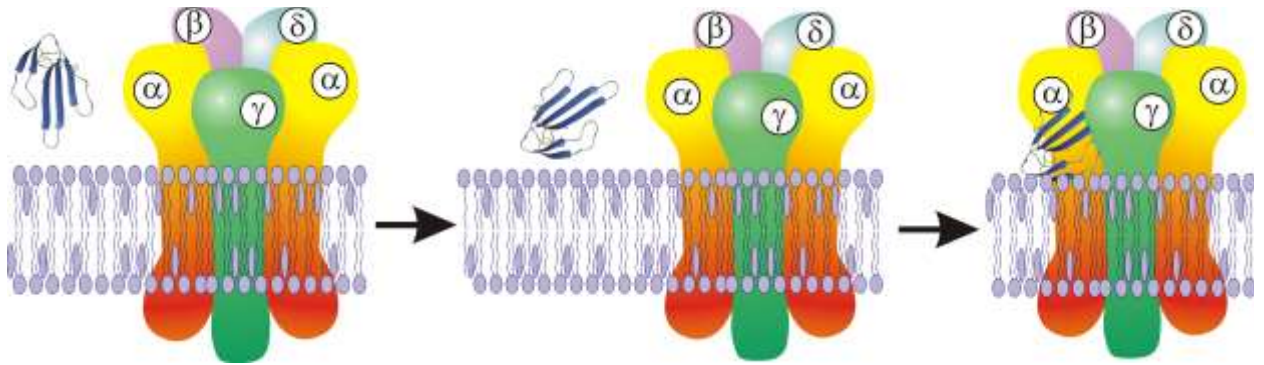


Рис. 4.9. Модель участия липидного окружения рецептора в токсин-рецепторном взаимодействии. Токсин, присоединяясь к мембране клетки-мишени, изменяет трехмерную диффузию в растворе на двумерную диффузию по поверхности мембраны, что значительно ускоряет поиск рецептора.

Таким образом, с помощью гетероядерной ЯМР-спектроскопии и молекулярного моделирования, подтвержденного данными сайт-направленного мутагенеза, показано, что α -нейротоксин NTII имеет мембранотропный сайт и взаимодействует с поверхностью липидного бислоя, имитирующего окружение nAChR, в ориентации, не препятствующей ингибированию токсином рецептора. В целом, эти данные указывают на то, что механизм "мембранного катализа" может иметь место при взаимодействии NTII с nAChR. Возможно, нейротоксин из раствора сначала связывается с мембранным окружением рецептора-мишени, изменяя тип диффузии с трехмерной на более быструю латеральную, что значительно ускоряет поиск рецептора [257] (Рис. 4.9). Затем из мембраносвязанного положения происходит непосредственное взаимодействие NTII с рецептором с участием центральной петли токсина (Рис. 4.9).

4.2.2. Роль центральной петли нейротоксинов во взаимодействии с рецепторами-мишенями

4.2.2.1. Роль центральной петли длинных α -нейротоксинов во взаимодействии с нейрональными nAChR

Исследования с помощью сайт-направленного мутагенеза [258,259], химических модификаций [139,260,261], а также исследование синтетического химерного короткого/длинного α -нейротоксина [262] позволили предположить, что центральная петля нейротоксинов, содержащая фрагмент с пятой дополнительной дисульфидной связью (Рис. 2.1Б), имеет важное значение для взаимодействия α - и κ -нейротоксинов с нейрональными $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ nAChR, соответственно. Методами рентгеноструктурного анализа была получена структура комплекса длинного α -кобротоксина из *Naja kaouthia* с

ацетилхолин-связывающим белком из прудовика *Lymnaea stagnalis* (AChBP) [140]. AChBP – природный водорастворимый белок, который является структурным гомологом лиганд-связывающего домена nAChR [39]. В этом комплексе наблюдались прямые межмолекулярные контакты между пятым дисульфидом нейротоксина в центральной петле и остатками на поверхности комплементарной субъединицы AChBP. Структура комплекса α -кобротоксин/AChBP объясняет общие принципы взаимодействия α -нейротоксинов и nAChR. Тем не менее, структурные особенности, которые определяют селективность действия нейротоксинов по отношению к различным подтипам nAChR, оставались не изученными.

Известно, что длинные α -нейротоксины эффективно ингибируют нейрональные nAChR $\alpha 7$ типа, и только некоторые из них способны ингибировать нейрональные nAChR других типов. К таким токсинам относится κ -бунгаротоксин из яда *Bungarus multicinctus*, высокоэффективный ингибитор nAChR $\alpha 3\beta 2$ типа, также являющийся длинным α -нейротоксином. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности центральной петли длинного α -кобротоксина из яда *Naja siamensis* (α -Cbtx) и κ -бунгаротоксина показал, что концевые фрагменты центральных петель этих двух токсинов отличаются лишь одним аминокислотным остатком в 29 положении (Рис. 4.10). Было выдвинуто предположение, что, возможно, это различие и определяет способность κ -бунгаротоксина ингибировать как nAChR $\alpha 7$ типа, так и nAChR $\alpha 3\beta 2$ типа [140].

Для проверки этой гипотезы на основе короткого α -нейротоксина NTII было сконструировано два химерных длинных α -нейротоксина NTII/I и NTII/I[A29K]. Химерный токсин NTII/I был получен путем замены фрагмента центральной петли короткого токсина NTII на аналогичный фрагмент центральной петли длинного α -нейротоксина I из яда *Naja oxiana*. В химерный токсин NTII/I[A29K] была введена дополнительная замена остатка аланина в положении 29 на остаток лизина (Рис. 4.10). Гены обоих химерных белков были клонированы в вектор *pET22b(+)/STII*, созданный для секреции нейротоксинов в клетках *E. coli*. Биосинтез, выделение и очистку осуществляли аналогично тому, как это делали в случае с нейротоксином II. Фрагмент центральной петли, пересаженный в молекулу нейротоксина II из молекулы нейротоксина I, состоял из 7 остатков и содержал дополнительную дисульфидную связь (Рис. 4.10).

Для установления возможных изменений в пространственной структуре химерных α -нейротоксинов, вызванных введением этой замены, было проведено исследование химерных нейротоксинов методом ЯМР-спектроскопии¹. Анализ 1D ¹H ЯМР спектров рекомбинантных белков NTII/I и NTII/I[A29K] выявил узкие линии сигналов и

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым, группа структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН

значительную дисперсию химических сдвигов NH-протонов. Большой сдвиг сигналов протонов некоторых алифатических боковых цепей в сильное поле свидетельствовало о пространственной сближенности этих боковых цепей с ароматическими остатками, что часто наблюдается в β -структуре. Сравнение 2D ^1H - ^{15}N корреляционных ЯМР спектров рекомбинантного ^{15}N -меченного NTII и химерного токсина NTII/I выявило практически полное совпадение химических сдвигов ^1H и ^{15}N для амидных групп общих остатков токсинов. Сравнение одномерного ^1H ЯМР спектра химерного токсина NTII/I[A29K] с HSQC спектром токсина NTII/I показало, что точечная мутация A29K не приводит к изменению пространственной структуры химерного токсина. Таким образом, можно сделать вывод, что все исследуемые белки обладали пространственной структурой, схожей со структурой нейротоксина II, и введение дополнительной аминокислотной последовательности не влияло на общую структуру токсина.

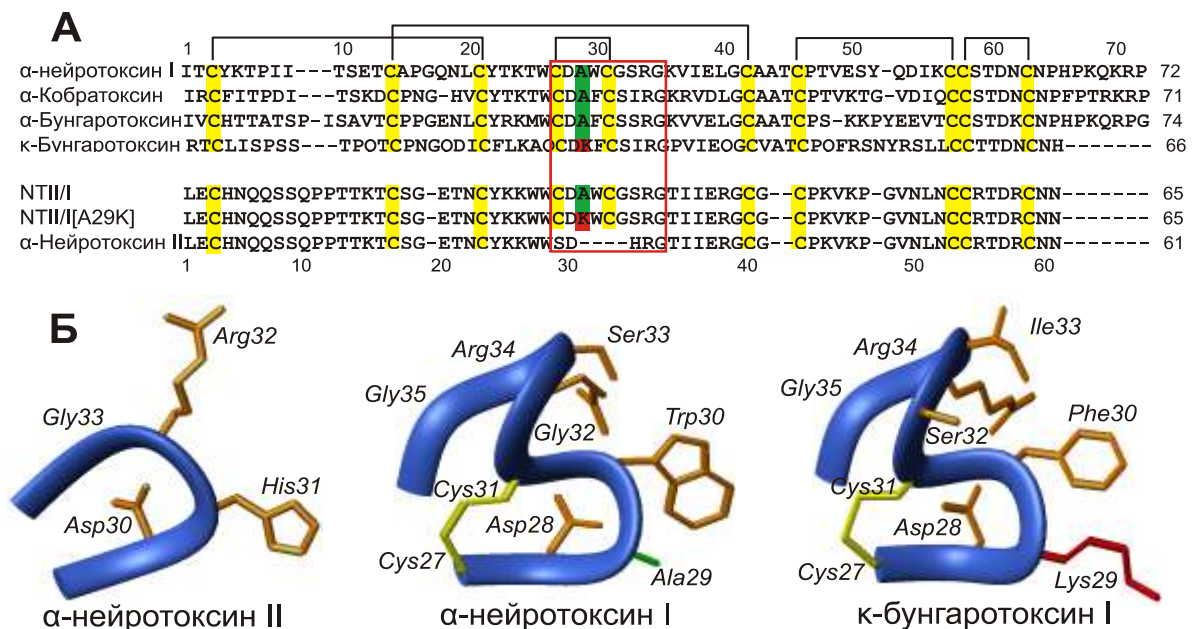


Рис. 4.10. (А). Сравнение аминокислотных последовательностей α -нейротоксинов яда змей и химерных токсинов. Аминокислотные остатки, локализованные на конце центральной петли, заключены в красный прямоугольник. Остатки Cys выделены желтым цветом. Остатки Ala/Lys в положении 29 выделены зеленым/красным цветом. (Б). Сравнение фрагментов центральных петель нейротоксина II, нейротоксина I и к-бунгаротоксина.

Исследование биологической активности химерных α -нейротоксинов NTII/I и NTII/I[A29K] проводили *in vitro* методами электрофизиологии, измеряя способность белковых препаратов ингибировать токи через ионные каналы нейрональных nAChR $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ типов, экспрессированных на поверхности ооцитов *Xenopus laevis*¹. Было показано, что оба химерных нейротоксина приобрели способность ингибировать nAChR $\alpha 7$ типа. Причем химерный токсин NTII/I оказался несколько активнее природного NTI по

¹ Совместно с проф. Д.Бертраном, HiQScreen Sàrl, Женева, Швейцария

отношению к нейрональному nAChR $\alpha 7$ типа (IC_{50} 6.1 нМ и 34 нМ, соответственно, Рис. 4.11А,Б). Таким образом, в отличие от исходного короткого токсина NTII, химерный токсин NTII/I приобрел способность взаимодействовать с nAChR $\alpha 7$ типа, что подтвердило ключевую роль центральной петли длинных α -нейротоксинов в селективном взаимодействии с нейрональным nAChR $\alpha 7$ типа.

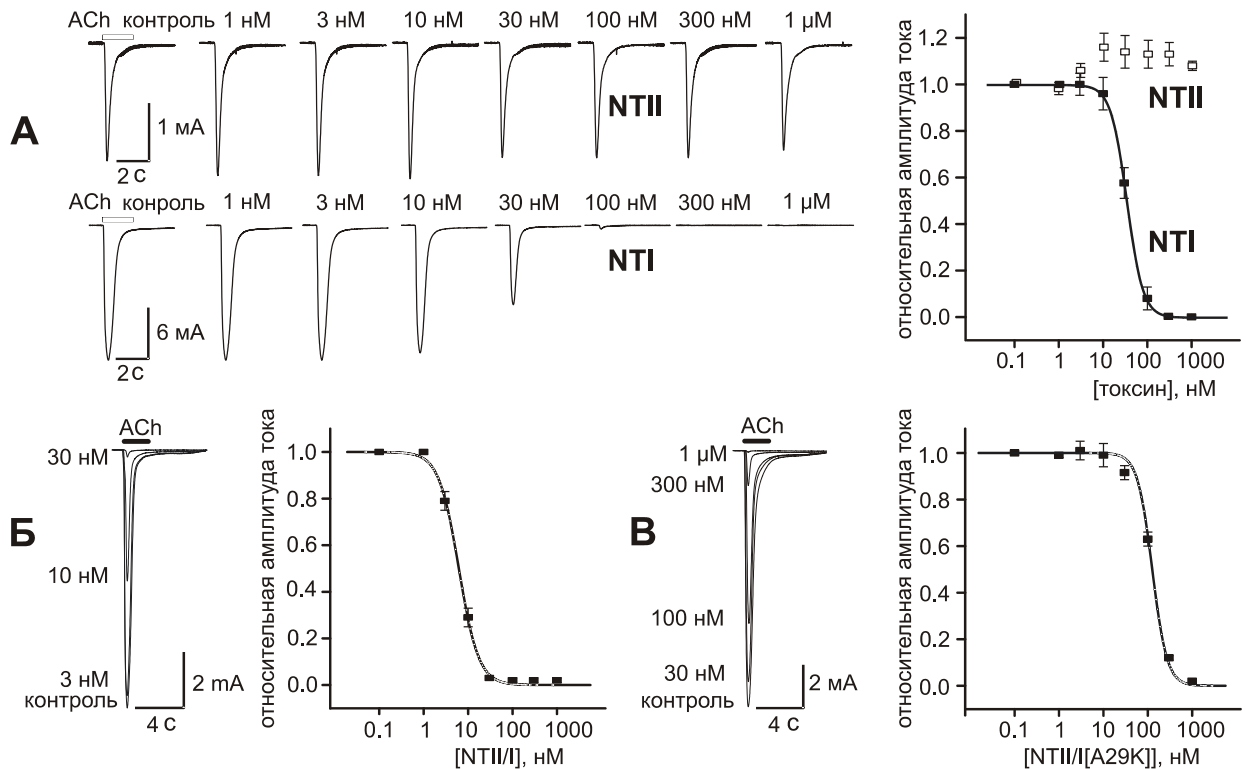


Рис. 4.11. Ингибирование ионных токов, индуцированных добавлением ацетилхолина, в ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих нейрональный nAChR $\alpha 7$ типа препаратами NTI, NTII и химерными токсинами. (А). NTI ингибирует токи с константой IC_{50} 34 нМ, в то время как NTII не вызывает подобного эффекта. (Б). Химерный токсин NTII/I ингибирует токи с константой IC_{50} 6 нМ. (В). Химерный токсин NTII/I[A29K] ингибирует токи с константой IC_{50} 126 нМ.

Многочисленные исследования указывают на то, что удлиненный *C*-концевой фрагмент длинных α -нейротоксинов возможно принимает участие во взаимодействии с nAChR $\alpha 7$ типа. Исследуемые в настоящей работе химерные α -нейротоксины были получены на основе короткого токсина NTII, не обладающего подобным фрагментом. Однако, наличие высокой активности химерного токсина NTII/I по отношению к нейрональному рецептору говорит о том, что, по крайней мере, для взаимодействия NTI с nAChR $\alpha 7$ типа не требуется наличия удлиненной *C*-концевой последовательности.

Предполагалось, что химерный токсин NTII/I[A29K] с заменой Ala/Lys приобретет способность взаимодействовать с nAChR $\alpha 3\beta 2$ типа. Однако электрофизиологические эксперименты показали, что введение вышеуказанной мутации в молекулу NTII/I не привело к возникновению активности по отношению к nAChR $\alpha 3\beta 2$ типа. Кроме того,

введение мутации Ala/Lys в молекулу NTII/I привело к снижению активности NTII/I[A29K] по отношению к нейрональному nAChR $\alpha 7$ типа (IC_{50} 126 нМ, Рис. 4.11В). Полученные данные свидетельствуют о том, что во взаимодействии к-бунгаротоксина с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR ключевую роль играют другие структурные детерминанты, локализованные не на конце центральной петли. Возможно, селективность действия к-бунгаротоксина на nAChR $\alpha 3\beta 2$ типа связана со способностью этого токсина образовывать нековалентные димеры в растворе [263].

Модели пространственных структур химерных токсинов были построены методом моделирования по гомологии на основе трехмерных структур длинных α -нейротоксинов NTI и α -Cbtx и короткого α -нейротоксина NTII (PDB коды 1NTN, 1CTX, 1NOR, соответственно)¹. Модели внеклеточных доменов nAChR $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ типов были построены методом моделирования по гомологии на основе трехмерной структуры ацетилхолин-связывающего белка (АХСБ) из моллюска *Lymnaea stagnalis* (PDB код 1I9B). В вычислительных «экспериментах» по белок-белковому докингу (NTII и NTI с $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR) и последующих молекулярно-динамических расчетах (МД) было установлено, что стабильный комплекс образуется только в случае взаимодействия NTI с $\alpha 7$ -nAChR. Взаимодействие химерного токсина NTII/I было, возможно, как с $\alpha 7$ -nAChR, так и с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, но только комплекс $\alpha 7$ -nAChR/NTII/I был стабилен в МД с длиной траектории 10 нс. Основные взаимодействия наблюдались между С-петлей рецептора и центральной петлей NTII/I, так же, как и в случае комплекса АХСБ/ α -Cbtx [140]. При этом между остатком Ala в положении 29 и остатками С-петли nAChR устанавливались слабые гидрофобные взаимодействия. Моделирование связывания NTII/I[A29K] с $\alpha 7$ -nAChR выявило, что остаток Lys в положении 29 не может участвовать в специфических взаимодействиях с остатками С-петли рецептора и отталкивается от положительно заряженного Lys192 $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 4.12). Возможно, этот факт и объясняет уменьшение активности химерного токсина NTII/I[A29K] по отношению к $\alpha 7$ -nAChR. С другой стороны, результаты молекулярного моделирования позволяют предположить, что Lys29 способен взаимодействовать с отрицательно заряженной боковой цепью остатка Glu190 из $\alpha 3$ субъединицы $\alpha 3\beta 2$ -nAChR. Однако комплекс $\alpha 3\beta 2$ -nAChR /NTII/I[A29K] был нестабилен в течение МД траектории (10 нс). Определенные энергии взаимодействия химерного токсина NTII/I[A29K] с nAChR $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ типов составили 1400 и 340 кДж/моль/связывающий сайт, соответственно.

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и к.х.н. Д.Ю. Мордвинцевым, Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

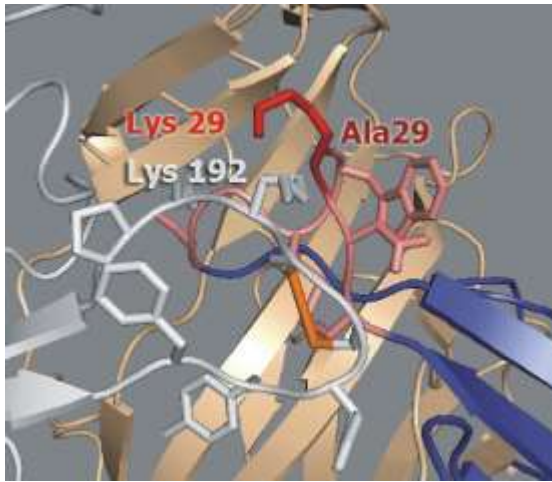


Рис. 4.12. Модель взаимодействия химерных токсинов с $\alpha 7$ -nAChR. Часть, относящаяся к молекуле N2P показана голубым цветом. Часть, относящаяся к молекуле N1, показана розовым цветом. Основная субъединица nAChR показана белым цветом. Комплементарная субъединица nAChR показана бежевым цветом. Показаны боковые цепи остатков N2P/I, N2P/I[A29K] и С-петли основной субъединицы nAChR.

4.2.2.2. Центральная петля длинных α -нейротоксинов важна для взаимодействия с ГАМК_A-рецепторами

В 2015 г. было опубликовано две работы, в которых было показано, что трехпетельные α -нейротоксины яда змей, единственной мишенью которых до последнего времени считали nAChR, действуют также на ГАМК_A-рецепторы [148,149]. Было показано, что α -Bgtx, высокоспецифичный ингибитор $\alpha 7$ -nAChR, является также антагонистом всех $\alpha \beta 2 \gamma 2$ ГАМК_A-рецепторов [149]. Было выдвинуто предположение, что структурный элемент в виде псевдоспиральной структуры на конце второй петли длинных нейротоксинов, как и в случае с нейрональными nAChR, может быть важен для взаимодействия длинных α -нейротоксинов с ГАМК_A-рецепторами.

Для подтверждения этой гипотезы, было проведено сравнение действия на $\alpha 1 \beta 3 \gamma 2$ рецепторы короткого нейротоксина II, длинного нейротоксина I и химерного варианта N2P/I с пересаженным фрагментом центральной петли из молекулы N1 в молекулу N2P¹. Короткий нейротоксин N2P не ингибировал рецептор вплоть до концентрации 10 мкМ, однако химерный токсин при этой же концентрации демонстрировал активность, близкую к активности длинного токсина N1 ($16 \pm 3\%$ и $19 \pm 3\%$ ингибирование тока, индуцированного ГАМК, соответственно, Рис. 4.13А). Компьютерное моделирование комплексов N2P и N2P/I с ГАМК_A-рецептором показало, что в случае короткого нейротоксина комплекс не образуется. В то же время химерный токсин формирует стабильный комплекс с рецептором, с образованием множественных контактов в ортостерическом сайте рецептора. При этом взаимодействие происходит в основном между второй (удлиненной) петлей токсина и С-петлей $\beta 3$ субъединицы рецептора (Рис. 4.13В).

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и к.б.н. Д.С. Кудрявцевым, Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

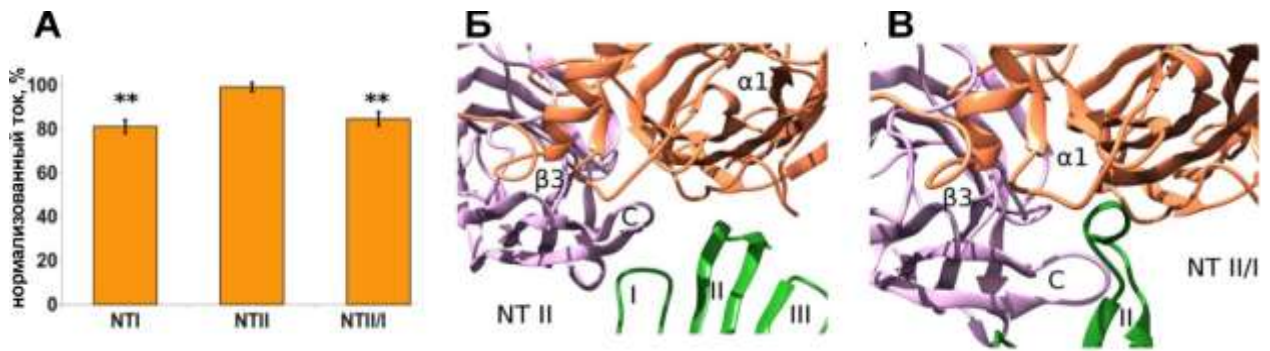


Рис. 4.13. (А). Нормализованные ГАМК-индуцированные токи (10 мкМ ГАМК, $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК_A-рецептор) в присутствии природных NT I, NT II и химерного токсина NTIII (концентрация всех токсинов 10 мкМ). Показано, что NTII не ингибирует рецептор, в то время как оба токсина NTI и NTIII показывают схожую активность ($19 \pm 3\%$ и $16 \pm 3\%$ ингибирования, соответственно, среднее \pm с.о., $n = 6$). Звездочки означают значимое отличие от контрольного уровня тока (100%) ($p < 0.01$, двухсторонний t-критерий Стьюдента). (Б). Компьютерное моделирование взаимодействия NTII с внеклеточным доменом ГАМК_A-рецептора, показан интерфейс $\beta 3/\alpha 1$ субъединиц. NTII не образует комплекса с рецептором. (В). Молекулярная модель химерного токсина NTIII с интерфейсом $\beta 3/\alpha 1$ субъединиц ГАМК_A-рецептора.

4.2.2.3. Подвижная центральная петля – важная структурная детерминанта взаимодействия «слабого» токсина WTX с nAChR и mAChR

Мишенями действия «необычных» токсинов выступают как мышечные nAChR, так и нейрональные nAChR $\alpha 7$ типа [144]. «Слабый» токсин (WTX, weak toxin) из яда кобры *Naja kaouthia*, относящийся к семейству «необычных» токсинов, был обнаружен сравнительно недавно [264,265]. Имея низкую токсичность (не летален для мышей при концентрациях до 20 мг/кг) и низкую аффинность к nAChR (в мкМ диапазоне концентраций) по сравнению с длинными α -нейротоксинами [264], WTX, тем не менее, необратимо связывается с nAChR мышечного и нейронального $\alpha 7$ типов, блокируя их [264]. В отличие от коротких и длинных нейротоксинов до недавнего времени практически отсутствовала информация о способе и характере взаимодействия «необычных» токсинов с nAChR.

Кроме nAChR, WTX имеет и иные мишени действия в нервной системе, а именно мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR) [147]. Показано, что «слабый» токсин может аллостерически взаимодействовать с различными подтипами mAChR, модулируя связывание ортостерических лигандов, таких как ацетилхолин и N-метилскополамин (NMS) [147]. Однако молекулярный механизм взаимодействия WTX с mAChR также не был ранее описан.

Мускариновые токсины (MT, трепетельные белки с четырьмя дисульфидными связями) взаимодействуют с различными подтипами mAChR и могут выступать в

качестве аллостерических агонистов, антагонистов или модуляторов [142]. Мускариновые токсины MT3 и MT7 из *Dendroaspis angusticeps* имеют высокую специфичность по отношению к M4 и M1 mAChR, соответственно, в то время как другие MT менее селективны [142]. Данные мутагенеза и компьютерного моделирования показали, что положительно заряженный остаток Arg34, расположенный в центральной петле MT7, является важным структурным элементом, определяющим высокое сродство токсина к M1 mAChR человека [143].

На основании сходства WTX с токсином MT7 (идентичность последовательностей ~ 59%, Рис. 4.14), мы предположили, что вторая петля WTX также может быть важна для взаимодействия с mAChR. Чтобы проверить эту гипотезу и определить функциональную роль различных структурных особенностей WTX, был получен рекомбинантный аналог WTX (rWTX), имеющий дополнительный N-концевой остаток Met (возникающий из-за трансляции стартового кодона *atg*) и семь его мутантных вариантов.

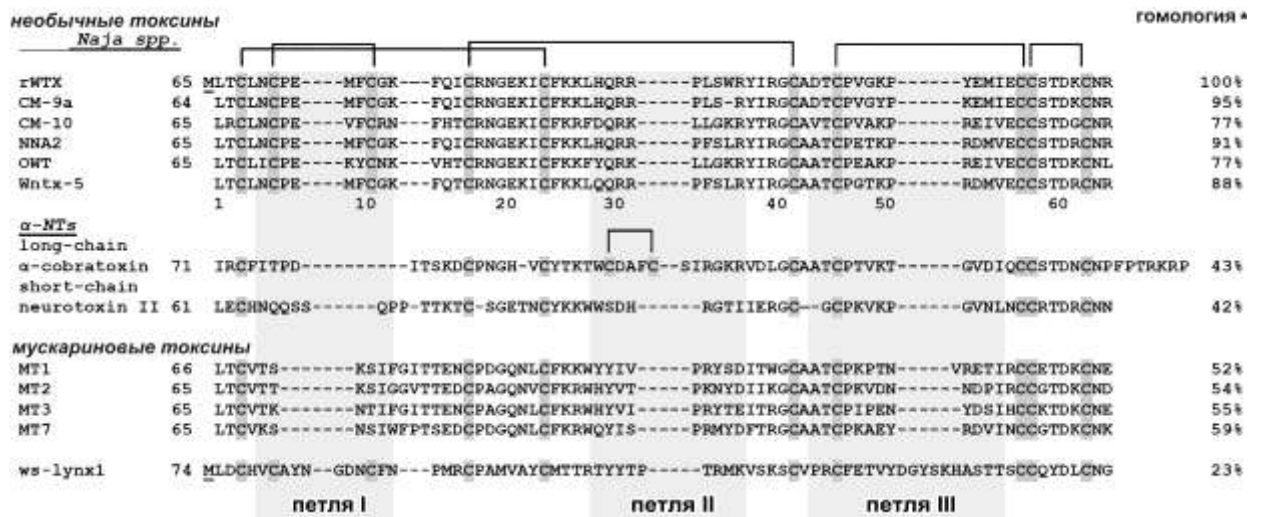


Рис. 4.14. Сравнение последовательностей rWTX, «необычных» токсинов из яда кобр, α-нейротоксинов, мускариновых токсинов, и водорастворимого домена белка человека Lynx1 (ws-Lynx1). Положение петель rWTX показано серым фоном. Дополнительный N-концевой остаток Met, возникающий в результате трансляции стартового кодона *atg*, подчеркнут. Гомология последовательностей rWTX и других трехпетельных белков рассчитана с помощью программы EMBOSS Stretcher (EMBL-EBI). Нумерация остатков дана для природного WTX.

4.2.2.3.1. Взаимодействие рекомбинантного аналога «слабого» токсина WTX с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами

Ранее было показано, что в молекуле природного WTX в растворе наблюдается конформационная гетерогенность, связанная с *цис-транс*-изомерией пептидной связи Arg32-Pro33, но дополнительная возможная изомерия связи Cys6-Pro7 не была полностью исключена [266]. Известно, что наличие стерически ограниченных остатков Pro может

фиксировать определенные конформации основной цепи белка [237]. Чтобы проверить роль этих факторов в биологической активности гWTX, было получено два мутантных варианта с заменами P7A и P33A. Чтобы исследовать важность заряженных остатков петли II при взаимодействии с mAChR было получено четыре мутантных формы токсина с точечными заменами R31A, R32A, R37A и двойной заменой R31A/R32A. Уникальной особенностью WTX среди других «необычных» нейротоксинов, выделенных из яда кобр, является остаток триптофана в центральной петле [267]. Для изучения биологической роли этого остатка был получен мутант с заменой W36A.

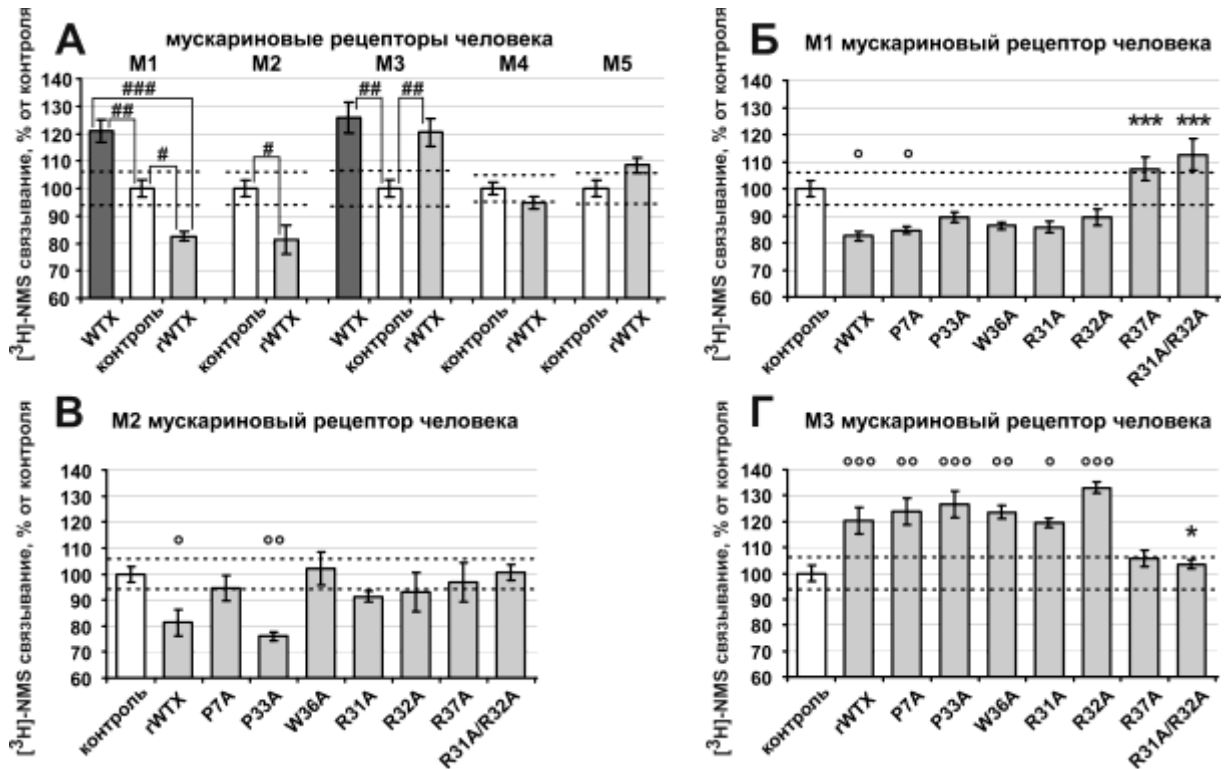


Рис. 4.15. Влияние гWTX и его мутантов на связывание $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ с различными подтипами mAChR. Данные (среднее \pm с.о.) представлены в процентах от контрольного уровня связывания $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ (100%), наблюдаемого без добавления токсина. Пунктирные линии означают 95% доверительный интервал контрольного связывания (пмоль/мг белка), который для M1 рецептора равен 1.81 ± 0.06 , $n=12$; для M2 0.28 ± 0.01 , $n=9$; для M3 1.46 ± 0.05 , $n=9$; для M4 0.49 ± 0.01 , $n=9$; и для M5 0.32 ± 0.01 , $n=9$. Во всех экспериментах концентрация токсинов была 10 мкМ. (А). Сравнение эффектов природного WTX и гWTX на связывание $^3\text{H}\text{-NMS}$ с mAChR. Никаких эффектов природного WTX на связывание $^3\text{H}\text{-NMS}$ с M2, M4 и M5 mAChR ранее не наблюдалось [147]. Данные, обозначенные # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$) и ### ($p < 0.001$), достоверно отличаются друг от друга (двухсторонний t-критерий Стьюдента, или ANOVA анализ и тест Тьюки для множественного сравнения). (Б-Г). Уровни связывания $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ для мутантных токсинов сравнивались с уровнями для гWTX и контрольным уровнем с помощью ANOVA анализа и теста Даннета для множественного сравнения. Данные, обозначенные * и ° ($p < 0.05$), ** и °° ($p < 0.01$), *** и °°° ($p < 0.001$) достоверно отличаются от гWTX и контроля, соответственно.

Способность гWTX и его мутантов специфически взаимодействовать с различными подтипами mAChR исследовали по влиянию токсинов в концентрации 10 мкМ на взаимодействие ортостерического антагониста $^3\text{H}\text{-N}$ -метилскополамина ($^3\text{H}\text{-NMS}$) с

рецепторами, экспрессированными в CHO клетках¹ (Рис. 4.15). Ранее было показано, что природный WTX при этой концентрации увеличивает связывание ³H-NMS с M1- и M3-mAChR, демонстрируя положительную кооперативность, но не влияет на связывание антагониста с M2, M4 и M5 рецепторами [147].

Так как рекомбинантный токсин был получен путем бактериальной экспрессии, то по сравнению с токсином дикого типа, rWTX имеет дополнительный N-концевой остаток Met. Оказалось, что это небольшая N-концевая модификация существенно изменяет фармакологический профиль токсина. Подобно природному токсину, rWTX усиливал связывание NMS, но только с рецептором M3 типа. На M1-mAChR наблюдалось переключение типа взаимодействия токсин/NMS с «положительного» на «отрицательный», что привело к уменьшению связывания ³H-NMS в присутствии rWTX на 20% (Рис. 4.15А). Более того, «отрицательная» кооперативность между rWTX и NMS наблюдалась на M2-mAChR, где для природного токсина никаких эффектов не наблюдали [147].

Чтобы подтвердить аллостерический характер взаимодействия между ортостерическим антагонистом и rWTX, исследовали изменение скорости диссоциации ³H-NMS из комплексов с M1, M2 и M3 рецепторами в присутствии rWTX (Рис. 4.16, А-В). Скорость диссоциации ³H-NMS в присутствии 10 мкМ rWTX была значительно снижена по сравнению с контрольными опытами (Рис. 4.16Г). Константа скорости диссоциации (мин⁻¹) уменьшалась с $0,118 \pm 0,005$ до $0,076 \pm 0,003$ ($n = 3$, $p < 0,01$), с $0,81 \pm 0,04$ до $0,63 \pm 0,03$ ($n = 3$, $p < 0,05$) и от $0,074 \pm 0,002$ до $0,065 \pm 0,002$ ($n = 3$, $p < 0,05$) на M1, M2 и M3 рецепторах, соответственно (Рис. 4.16). Снижение скорости диссоциации ³H-NMS на M1, M2 и M3-рецепторах, наблюдаемое в присутствии rWTX (Рис. 4.16Г), подтвердил аллостерический тип взаимодействия rWTX с mAChR. Учитывая сложный характер аллостерических взаимодействий [268], отличие в действии rWTX и природного токсина, описанное выше, не может быть совершенно неожиданным. Во-первых, отрицательная кооперативность действия между WTX и другим ортостерическим лигандом, - ацетилхолином, ранее наблюдалась для M1, M2, M4 и M5 mAChR [147]. Во-вторых, хорошо известно, что незначительные изменения в структуре аллостерических модуляторов может приводить к изменению типа кооперативности [268]. Например, изменения в режиме взаимодействия с ацетилхолином или NMS при связывании с различными подтипами mAChR были описаны для серии аналогов стрихнина и бруцина [269].

¹ Совместно с проф. В. Долежалем, Институт физиологии Чешской академии наук

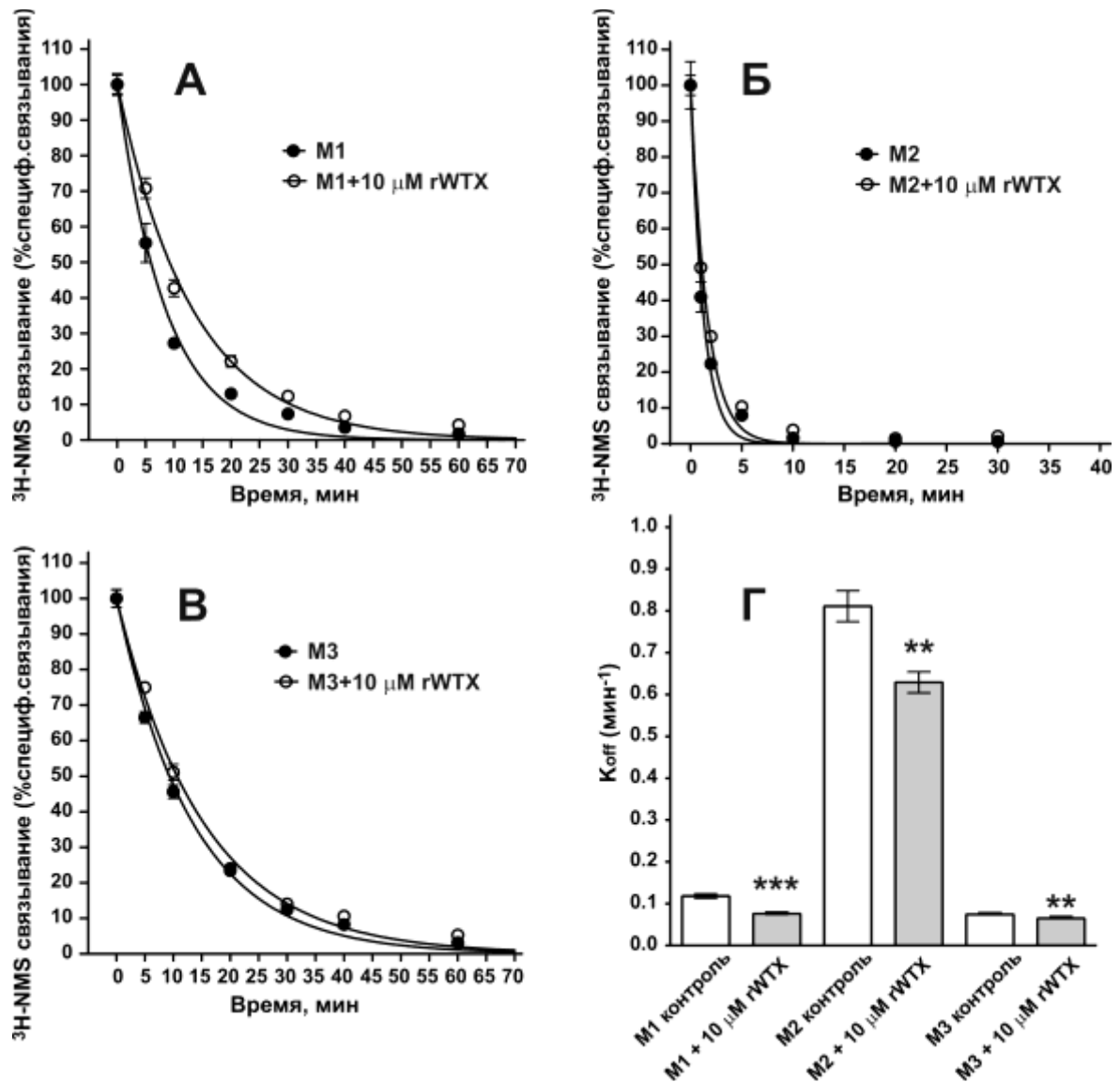


Рис. 4.16. Влияние rWTX на скорость диссоциации ортостерического антагониста $^3\text{H-NMS}$ на M1, M2 и M3 mAChR. (A-B). Временная зависимость диссоциации $^3\text{H-NMS}$ в присутствии и отсутствии 10 мкМ rWTX. Специфичное связывание $^3\text{H-NMS}$ определяли как разницу между общим связыванием и неспецифическим, измеренным в таком же эксперименте. Данные (среднее \pm с.о., $n=3$) выражены в процентах от начального связывания. (Г). 10 мкМ rWTX уменьшает константу скорости диссоциации $^3\text{H-NMS}$ (K_{off} , min^{-1}) на M1, M2 и M3 mAChR. Данные, обозначенные * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.01$) статистически отличаются от контрольных значений (двухсторонний t-критерий Стьюдента).

Набор мутантов rWTX был протестирован на mAChR M1, M2 и M3 типов. Данные, полученные для M1 и M3 рецепторов (Рис. 4.15Б,Г), показали, что Р7А и Р33А мутации не влияют на взаимодействие токсина с обоими рецепторами. Единичные замены во второй петле токсина также не влияют на взаимодействие между rWTX и $^3\text{H-NMS}$ на M1- и M3-mAChR, за исключением мутации R37А. Замены R37А или R31А одновременно с R32А приводят к исчезновению влияния токсина на связывание $^3\text{H-NMS}$ с рецепторами. В случае M2-mAChR, все мутанты rWTX, кроме Р33А, уменьшали влияние токсина на связывание $^3\text{H-NMS}$ (Рис. 4.15В), указывая на важность соответствующих остатков для

взаимодействия токсин/рецептор. Таким образом, только мутация P33A не влияла на активность токсина на всех протестированных рецепторах.

Таким образом, сайт-направленный мутагенез указал, что положительно заряженные остатки в центральной петле rWTX имеют важное значение для взаимодействия с M1, M2 и M3 nAChR. Это позволяет сделать вывод о том, что вторая петля токсина представляет собой важный участок для взаимодействия WTX с nAChR. Наши результаты хорошо согласуются с исследованиями других трехпетельных токсинов змей, для которых было показано, что положительно заряженный конец петли II является основным структурным элементом, определяющим взаимодействие токсинов с различными мишенями, в том числе nAChR (п.4.2.2.1) и mAChR [143].

4.2.2.3.2. Пространственная структура и конформационная гетерогенность «слабого» токсина

Также как и для природного WTX [266], в ЯМР-спектрах rWTX наблюдалось два набора сигналов, соответствующих двум структурным состояниям токсина¹. По данным ЯМР, две структурные формы rWTX имели равную заселенность в растворе, и характерное время обмена между ними значительно превышало 100 мс (так называемый "медленный конформационный обмен"). Наибольшие различия в химических сдвигах между двумя состояниями токсина наблюдались для остатков, расположенных вблизи Pro7 и Pro33. Анализ 1D ¹H-ЯМР-спектров мутантов rWTX показал, что конформационная гетерогенность rWTX связана с *цис-транс*-изомерией пептидной связи Arg32-Pro33, и rWTX[P33A] имеет только одно структурное состояние в растворе. Это (вместе с данными о схожей функциональной активности rWTX и rWTX[P33A]) было решающим фактором при выборе мутанта rWTX[P33A] для дальнейших структурных исследований методами ЯМР и компьютерного моделирования. Мутация P7A приводила к увеличению заселённости конформера с *транс*-конфигурацией пептидной связи Arg32-Pro33, что указало на наличие взаимодействий между первой и второй петлями токсина.

Пространственная структура rWTX[P33A] представляет собой трехпетельную структуру, состоящую из двух антипараллельных β-листов (Рис. 4.17). Первый из них образован двумя β-тяжами и включает остатки петли I (β1: Leu1-Leu4 и β2: Phe14-Cys17). Второй β-лист состоит из трех β-тяжей и включает в себя фрагменты петли II (β3: Ile23-Leu28, β4: Tyr38-Ala43) и петли III (β5: Glu56-Cys58). Эти результаты согласуются с более ранними данными о вторичной структуре дикого типа WTX [266]. Помимо системы

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым и к.б.н. А.С. Парамоновым, группа структурной биологии ИБХ РАН

водородных связей, связанных с каноническими элементами вторичной структуры, «голова» и петли токсина стабилизированы дополнительными водородными связями. Например, водородные связи HN(Lys62)-CO(Thr2), HN(Leu4)-O δ 1(Asn64) и HN ϵ (Arg40)-CO(Asn64) контролируют пространственное расположение C-концевой области по отношению к тягам β 1 и β 4.

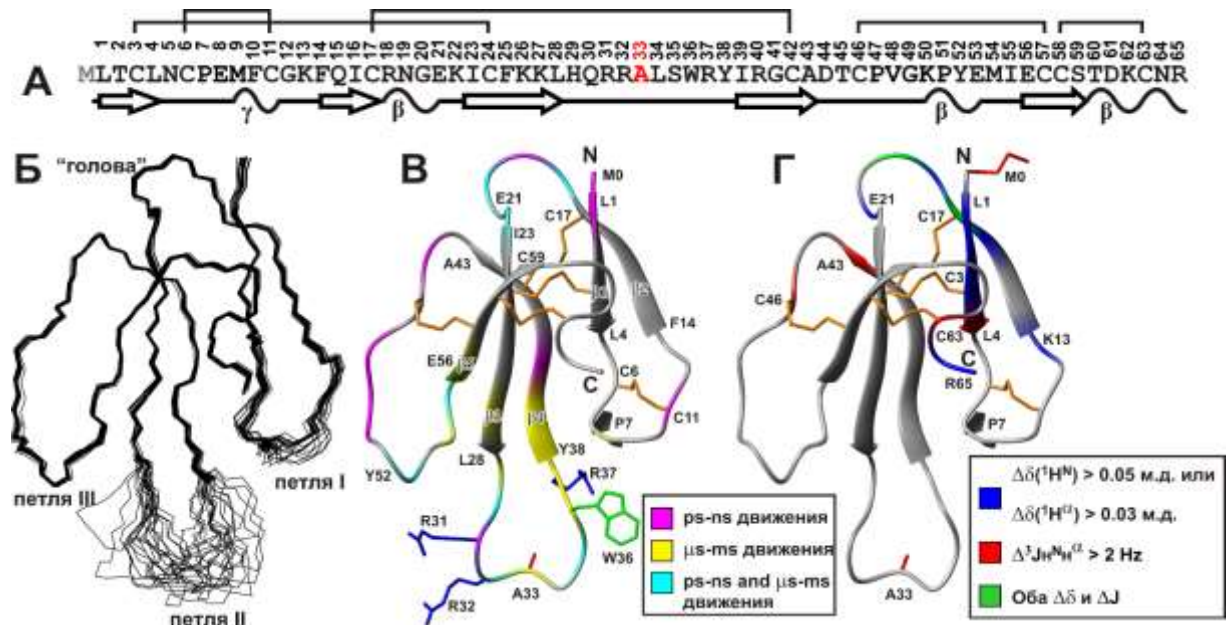


Рис. 4.17. Пространственная структура и динамика основной цепи rWTX[P33A] в растворе по данным ЯМР. (А). Показаны элементы вторичной структуры, β -тяги обозначены стрелками, β - и γ -повороты – волнистыми линиями. (Б). 20 лучших структур rWTX[P33A], совмещенных по участкам с хорошо определенной структурой. Подписаны три петли и «голова» токсина. (В). Ленточное представление структуры rWTX[P33A]. Дисульфидные связи показаны оранжевым цветом. Показаны боковые цепи мутированных остатков. Молекула rWTX[P33A] раскрашена соответственно с данными о динамике основной цепи, полученными из скоростей релаксации ядер ^{15}N . Остатки, участвующие в динамических процессах в диапазоне пс-нс (имеющие значение гетероядерного NOE < 0.7 или параметры порядка $S^2 < 0.8$) или в диапазоне мкс-мс (имеющие $R_{\text{EX}} > 2$ Hz) показаны пурпурным и желтым цветом, соответственно. Остатки, подвижные в обоих временных диапазонах, показаны голубым цветом. (Г). Качественные данные, описывающие конформационные изменения в молекуле WTX после введения N-концевого остатка Met, нанесенные на структуру rWTX[P33A]. Показаны остатки, демонстрирующие значительные изменения химических сдвигов основной цепи ($^1\text{H}^N$, $^1\text{H}^\alpha$) и констант спин-спинового взаимодействия $^3\text{J}_{\text{H}^N\text{H}^\alpha}$. Боковые цепи Met0 и Ala33 показаны красным цветом.

Почти вся структура rWTX[P33A] хорошо определяется из данных ЯМР за исключением центральной части петли II (His29-Arg37) (Рис. 4.17Б). Остатки из этого региона демонстрируют быстрый обмен HN протонов с водой и усредненные значения констант спин-спинового взаимодействия $^3\text{J}_{\text{H}^N\text{H}^\alpha}$ (6-8 Гц). Кроме того, интенсивность ^1H , ^{15}N -HSQC кросс-пиков для этих остатков была значительно ниже, по сравнению с сигналами от других частей молекулы токсина. Вместе с данными о ^{15}N -релаксации (Рис. 4.17В), это указывает на повышенную внутримолекулярную подвижность этого региона в микросекундном временном диапазоне (быстрый или промежуточный конформационный

обмен). Высокоамплитудная динамика в этом временном диапазоне наблюдалась для остатков Lys27-Ile39 петли II и в пространственно сближенных фрагментах петель I (Glu8) и III (Tyr52-Glu56) (Рис. 4.17В). Возможно, эти обменные процессы и взаимодействие между петлями I и II являются причиной относительно низкой сходимости ЯМР структуры, наблюдаемой на конце петли I (Pro7-Cys11, Рис. 4.17Б). Анализ ^1H , ^{15}N -HSQC-спектров rWTX также показал пониженную интенсивность резонансов в области конца петли II. Таким образом, эта область в молекуле rWTX одновременно участвует в двух типах мкс-мс движений (медленные движения, связанные с *цис-транс* изомерией пептидной связи Arg32-Pro33, и более быстрые движения). Кроме того, большие фрагменты петель II и III участвуют в высокоамплитудных движениях в пс-нс временном диапазоне (Рис. 4.17Б). «Голова» токсина демонстрирует меньшую динамику по сравнению с «петлями», однако повышенная подвижность в обоих пс-нс и мкс-мс диапазонах была обнаружена в петле Arg18-Lys22, выступающей из «головы» (Рис. 4.17В). Анализ данных ^{15}N релаксации также позволил сделать вывод о том, что rWTX[P33A] в водном растворе находится в состоянии мономера.

По сравнению с природным токсином, rWTX и его мутантные варианты имеют дополнительный остаток метионина на *N*-конце. Сравнение химических сдвигов $^1\text{H}^{\text{N}}$ и $^1\text{H}^{\alpha}$ ядер и констант спин-спинового взаимодействия $^3\text{J}_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ для WTХ [266], rWTX и rWTX[P33A] показало общую схожесть структуры токсинов. Незначительные изменения конформации основной цепи, по-видимому, вызванные введением *N*-концевого Met наблюдались в трех областях rWTX и rWTX[P33A]: Lys13-Glu21, Cys42-Cys46 и Cys63-Arg65. Эти фрагменты находятся в «голове» и *C*-концевой последовательности токсинов и пространственно сближены с тяжом β 1 (Рис. 4.17Г).

4.2.2.3.3. Компьютерное моделирование взаимодействия rWTX[P33A] с M1 и M3 mAChR

Чтобы понять, что лежит в основе положительного/отрицательного аллостерического эффекта rWTX на M1- и M3-mAChR, мы провели компьютерное моделирование структур комплексов токсин/рецептор используя метод белок-белкового докинга и расчеты МД¹. Для моделирования была использована полученная ЯМР-структура rWTX[P33A] и имеющейся на тот момент структура M3-mAChR [123], а также модель M1-mAChR, построенная по гомологии с M3 рецептором. Есть несколько «тонких» моментов, связанных с применением метода докинга к мембранным рецепторам, лигандами которых также являются белки. (1) Обычные протоколы молекулярного

¹ Совместно с к.б.н. Чугуновым А.О., группа анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН.

докинга не учитывают динамику взаимодействующих молекул. Это может исключить нахождение «правильного» решения для комплекса. (2) Докинг может обеспечить слишком много различных решений, и выбор «правильного» решения становится нетривиальной задачей. (3) Мембранное окружение рецептора может влиять на связывание лиганда, и это тоже следует принимать во внимание. Чтобы преодолеть эти препятствия, мы применили специальный протокол белок-белкового докинга, учитывающий эти «тонкости»: (1) для увеличения выборки по структурам взаимодействующих молекул токсина и рецептора для докинга мы использовали не одну конкретную структуру рецептора и токсина, а набор разных конформационных состояний, полученный с помощью МД расчетов для обеих молекул отдельно; (2) для того, чтобы отфильтровать «неправильные» или нереалистичные решения докинга, мы использовали имеющиеся данные мутагенеза и дополнительные ограничения на комплементарность 'гидрофобных/гидрофильных' свойств молекул токсина и рецептора в комплексе [268,269]; (3) полученные комплексы были подвергнуты дополнительной молекулярной динамике в гидратированном липидном бислое, чтобы оценить влияние окружающей среды на их стабильность.

Для оценки конформационной подвижности молекул рецепторов и токсина были выполнены МД расчеты, для токсина в воде (100 нс) и рецепторов в гидратированной липидной мембране (POPC/POPE/Chol 2:1:1, 50 нс). Анализ полученных траекторий показал, что наиболее подвижным участком молекул рецепторов являются внеклеточная петля 2 (ECL2), расположенная между трансмембранными спиралями 4 и 5; в случае токсина наибольшей подвижностью обладал конец второй петли (Рис. 4.18, черные и пурпурные кривые). Кластеризация конформаций из МД траекторий привела к пяти отличающимся структурам для M1-mAChR, шести - для M3-mAChR и пяти - для rWTX[P33A]. Эти структуры были использованы в серии запусков процедуры белок-белкового докинга, что позволило частично учесть конформационную подвижность токсина и рецепторов при взаимодействии. Полученные ансамбли комплексов «фильтровались» с использованием трех критериев: (1) с учетом полученных данных мутагенеза, а именно требования, что токсин образует, по меньшей мере, два ионных мостика или π -катионных взаимодействия с рецептором через положительно заряженные остатки центральной петли Arg37 и Arg31 и/или Arg32; (2) значение параметра комплементарности «гидрофобных/гидрофильных свойств» между молекулами токсина и рецептора в комплексе [270,271] должно превышать определенный порог ($> 0,65$); (3) общее число благоприятных межмолекулярных контактов в комплексе должно быть более 12. Применение этих критериев снизило число первоначальных решений компьютерного

докинга с 2500 и 60000 структур до 24 и 42 моделей для комплексов γ WTX[P33A]/M1-mAChR и γ WTX[P33A]/M3-mAChR, соответственно.

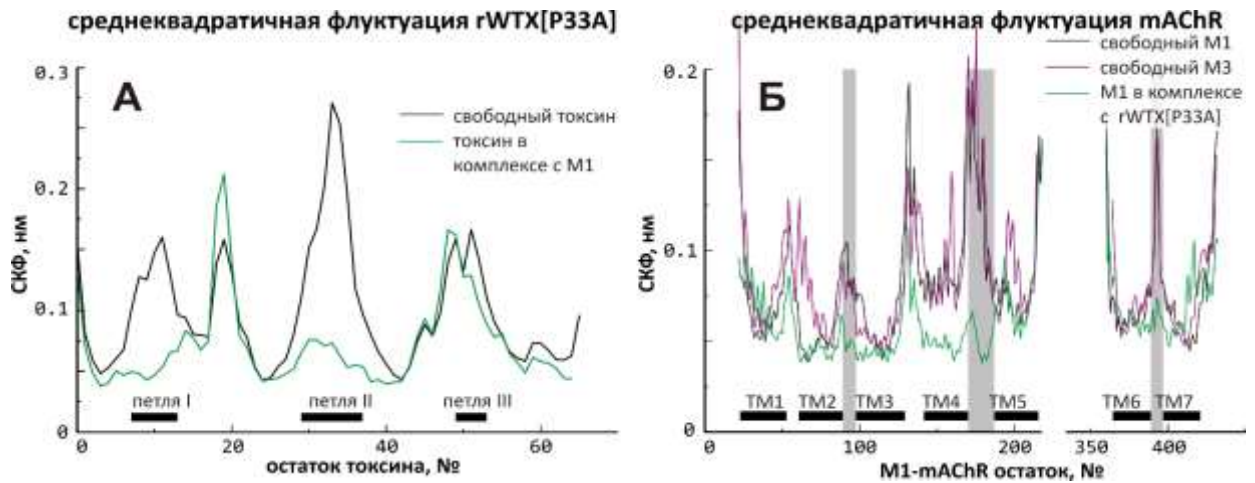


Рис. 4.18. Среднеквадратичная флуктуация (RMSF) в МД траекториях γ WTX[P33A] (А) и mAChR (Б). Свободный и связанный γ WTX[P33A] и M1-mAChR показаны черными и зелеными линиями, соответственно. Свободный M3-mAChR показан пурпурной линией. Показано положение петель I–III и ТМ α -спиралей для γ WTX[P33A] и mAChR, соответственно. Внутриклеточная петля 3 рецепторов, расположенная между ТМ-спиралями 5 и 6 удалена как в исходной структуре M3 рецептора. Номера аминокислотных остатков приведены для γ WTX[P33A] и M1 рецептора.

Для комплекса γ WTX[P33A]/M3-mAChR было получено три кластера решений докинга, содержащих 23, 8 и 11 структур. В этих кластерах молекула токсина располагалась (#1) на цитоплазматическом интерфейсе рецептора (решение было признано некорректным, артефактом); (#2) в непосредственной близости от лиганд-связывающего вестибюля, расположенного между ТМ-спиралями на внешней половине M3-mAChR (так называемый аллостерический лиганд-связывающий сайт [123] (Рис. 4.19А); и (#3) на границе раздела рецептор/мембрана (Рис. 4.19Б). Были проанализированы решения кластера #2. В этих моделях токсин не может глубоко проникнуть своими петлями в аллостерический лиганд-связывающий сайт и образовать прочный комплекс с рецептором (Рис. 4.19А). В результате петля II токсина не контактирует с входом в ортостерический сайт, расположенный ниже аллостерического сайта [123]. Комплекс γ WTX[P33A]/M3-mAChR стабилизирован в основном ионными взаимодействиями между положительно заряженными остатками петли II (Arg37 и Arg31 и/или Arg32) и отрицательно заряженными участками ECL2 (Glu220) и ECL3 (Asp518) рецептора (Таблица 4.2). При дополнительной молекулярной динамике в липидном бислое в течение 200 нс комплекс распался, что подтверждает слабое взаимодействие молекул в нем. В кластере решений #3 токсин также взаимодействует положительно заряженной второй петлей с отрицательно заряженными остатками ECL2 и ECL3

рецептора (Glu228 и Asp518, соответственно). Однако молекула токсина подходит к рецептору со стороны окружающей его мембраны (Рис. 4.19Б).

Для комплексов γ WTX[P33A] с M1-mAChR, все "отфильтрованные" решения докинга были очень похожи друг на друга, и значительно отличались от решений, описанных для рецептора M3. Во-первых, молекула токсина развернута на $\sim 180^\circ$ вокруг своей центральной оси (Рис. 4.19В). Во-вторых, в отличие от случая с M3-mAChR, токсин проникает своей наиболее длинной второй петлей глубоко в аллостерический лиганд-связывающий вестибюль рецептора M1, расположенный непосредственно над ортостерическим лиганд-связывающим сайтом, препятствуя таким образом взаимодействию ортостерических лигандов с рецептором. Два положительно заряженных остатка второй петли токсина (Arg32 и Arg37) образуют ионные мостики с тремя отрицательно заряженными остатками (Asp393, Glu397 и Glu401), расположенными в ECL3 и внешней части спирали TM7 рецептора (Рис. 4.19В, Таблица 4.2). Кроме того, два С-концевых положительно заряженных остатка токсина (Lys62 и Arg65) образуют ионные мостики с Glu170 из ECL2 рецептора. Gly12 первой петли токсина образует водородную связь с Val168 из ECL2 M1-mAChR (Таблица 4.2). Молекулярная динамика в липидном бислое (200 нс) выявила резкое уменьшение подвижности петли ECL2 рецептора и петель I, II токсина при связывании (Рис. 4.18, зеленые кривые), указывая на ключевую роль этих регионов во взаимодействии токсин/рецептор.

Слабую стабильность комплекса токсин/M3-mAChR и отсутствие взаимодействия петель токсина с аллостерическим сайтом рецептора можно объяснить структурными свойствами этого сайта. Действительно, анализ последовательностей внеклеточных петель (ECL) mAChR (Рис. 4.19Д) показал, что внеклеточная часть рецептора M1 имеет отрицательный заряд (суммарный заряд трех ECL составляет -3), в то время как соответствующая область рецептора M3 не заряжена.

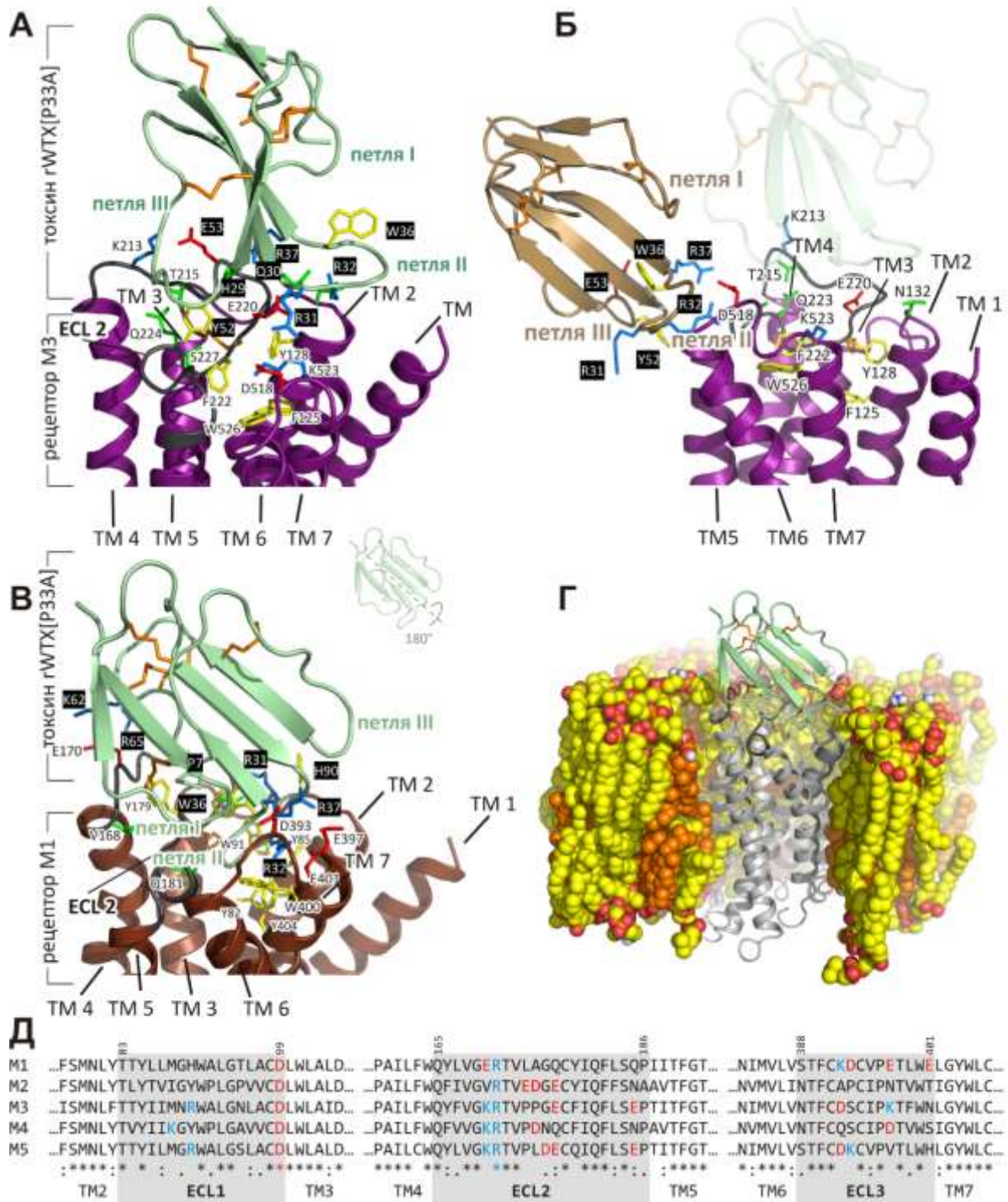


Рис. 4.19. Комплексы gWTX[P33A] с M1- и M3-mAChR. (А). Комплекс gWTX[P33A]/M3-mAChR из кластера решений #2. Молекулы токсина и рецептора показаны зеленым и пурпурным цветом, соответственно. Показаны остатки петель ECL2 и ECL3 M3-mAChR. (Б). Комплекс gWTX[P33A]/M3-mAChR из кластера решений #3. Молекулы токсина и рецептора показаны пшеничным и пурпурным цветом, соответственно. Для сравнения положение токсина из кластера #2 показано тенью. (В). gWTX[P33A] (зеленый) погружается петлей II в вестибюль M1-mAChR (коричневый), образованный связкой TM-спиралей; ECL2 рецептора (темно-серый) оставляет достаточно места для этого взаимодействия. Показаны остатки M1-mAChR, важные для взаимодействия. Отрицательно и положительно заряженные, полярные и ароматические остатки показаны красным, синим, зеленым и желтым, соответственно. Остатки токсина показаны на черном фоне. Дисульфидные связи показаны оранжевым. (Г). Комплекс gWTX[P33A]/M1-mAChR в липидном бислое POPC/POPE/холестерин (2:1:1) после молекулярной динамики. Гидрофобные атомы липидов и холестерина показаны желтым и оранжевым, соответственно. Атомы кислорода и азота фосфолипидов показаны красным и синим, соответственно. (Д). Сравнение последовательностей ECL в M1-M5 рецепторах.

Это может частично объяснить более предпочтительное связывание катионной молекулы токсина (общий заряд +6) с рецептором M1 по сравнению с M3. Остатки M1-mAChR Glu170 и Glu397 в ECL2 и ECL3-TM7, с которыми токсин образует ионные связи с участием положительно заряженных остатков петли II и C-концевых остатков, соответствуют Lys213 и Lys523 в ECL2 и ECL3-TM7 в M3-mAChR, соответственно (Рис. 4.19Д). Таким образом, благоприятные взаимодействия токсин/рецептор, стабилизирующие комплекс с M1-mAChR, по-видимому, отсутствуют в случае M3-mAChR. Негативное влияние остатка Lys523 в M3 рецепторе на аффинность катионных аллостерических лигандов недавно обсуждалось в работе [272]. Электростатические свойства других подтипов mAChR (Рис. 4.19Д) коррелируют с наблюдаемой активностью rWTX. Рецептор M2, для которого аналогично M1, наблюдалась отрицательное кооперативное взаимодействие при одновременном связывании rWTX с NMS, также имеет анионный аллостерический вестибюль (общий заряд ECL -2). В то же время, M4 и M5 рецепторы, для которых не наблюдалось никакого влияния rWTX на связывание NMS, имеют практически нейтральные аллостерические сайты (общие заряды 0 и -1, соответственно).

Анализ различий между комплексами rWTX[P33A] с M1- и M3-mAChR может дать структурную основу необходимую для понимания механизмов мишень-специфичной положительной/отрицательной аллостерической регуляции. Можно предположить, что наблюдаемое ингибирование связывания NMS с M1-mAChR и M2-mAChR в присутствии rWTX является следствием прямой блокировки входа в ортостерический сайт рецептора молекулой токсина. Напротив, молекула rWTX не блокирует лиганд-связывающий вестибюль рецептора M3, но может зафиксировать петли ECL в конформации, которая облегчает доступ лиганда в ортостерический сайт. Эта гипотеза объясняет наблюдаемую положительную кооперативность между rWTX и NMS при связывании с M3-mAChR. Положение токсина в комплексе с M3-рецептором в кластере решений #3 (Рис. 4.19Б) частично пересекается с одним из интерфейсов димеризации рецептора (TM4/TM5) [273], указывая на возможное участие гомодимера M3-mAChR во взаимодействии с rWTX. В настоящее время роль гомодимеризации в функционировании mAChR и других G-белок сопряженных рецепторов является предметом широкого обсуждения [274], тем не менее, мы не можем исключить эту возможность в случае WTX. Например, возможная роль гомодимеризации mAChR обсуждалась недавно в исследовании взаимодействия между мускариновым токсином MT7 и M1-mAChR [143]. Следует отметить, что молекула rWTX[P33A] в кластере #3 (аналогично ситуации с кластером #2) не погружается в аллостерический сайт связывания, но может «фиксировать» петли ECL рецептора. Таким

образом кластер решений #3 также согласуется с предложенной моделью положительной аллостерической регуляции. Согласно последним данным мутагенеза и молекулярной динамики, кластер ароматических остатков в M2-mAChR образует основной сайт связывания для ди-катионных аллостерических модуляторов [272]. Гомологичный кластер ароматических остатков M1-mAChR (Trp91 в ECL1, Trp164 в TM4, Tyr179 в ECL2 и Trp400 и Tyr404 в TM7) находится ниже положения rWTX[P33A] в комплексе. Несмотря на то, что π -катионных взаимодействий между остатками Arg второй петли токсина и ароматическими остатками рецептора в полученных моделях комплекса не наблюдалось, они могут иметь место при реальном взаимодействии. Кроме того, взаимодействие rWTX[P33A] с M1-mAChR напоминает взаимодействие низкомолекулярного аллостерического модулятора LY2119620 с M2-mAChR [275]. Подобно rWTX и мутанту P33A, это соединение демонстрирует умеренную отрицательную кооперативность с NMS на рецепторе M2-mAChR. Аналогично петле II токсина, ароматическая часть соединения LY2119620 занимает полость внутри рецептора, образованную связкой TM альфа-спиралей и контактирует с остатками Trp422 и Tyr426 спирали TM7 (остатки Trp400 и Tyr404 в случае M1-mAChR). Кроме того, аналогично C-концевым остаткам токсина, пиперидиновая группа LY2119620 участвует в электростатическом взаимодействии с Glu172 из ECL2 (Glu170 в случае M1-mAChR). Таким образом, сайт связывания rWTX[P33A] на M1-mAChR совпадает с участком связывания низкомолекулярных аллостерических лигандов. Схожая активность природного токсина WTX и rWTX, наблюдаемая на M3-mAChR (Рис. 4.15А), свидетельствует о том, что природный и рекомбинантный токсины одинаково взаимодействуют с этим типом рецептора (Рис. 4.19А,В). В то же время, тип взаимодействия природного WTX с рецептором M1 может существенно отличаться от модели, полученной в нашей работе для комплекса rWTX[P33A]/M1-mAChR (Рис. 4.19В). Положительная кооперативность связывания природного WTX и NMS, наблюдаемая на M1 и M3 рецепторах предполагает, что тип взаимодействия токсин/рецептор должны быть очень похожи в обоих случаях. Введение N-концевого остатка Met в молекулу токсина вызывает конформационные изменения в «голове» и C-концевой последовательности rWTX, что было показано методом ЯМР (Рис. 4.17Г). Эти изменения могут способствовать возникновению дополнительных контактов петли I и C-концевой последовательности токсина с ECL2 рецептора M1 (Таблица 4.2, Рис. 4.19В). Это в свою очередь может привести к изменению взаимной ориентации токсина и петель рецептора ECL и стабилизировать токсин в положении, погруженном в лиганд-связывающий вестибюль, изменив при этом фармакологические свойства rWTX.

Таблица 4.2. Контакты между токсином и рецепторами в комплексах rWTX[P33A]/M1-mAChR и rWTX[P33A]/M3-mAChR.

остатки M1-mAChR	Взаимодействие с остатками rWTX[P33A] ^a	остатки M3-mAChR	Взаимодействие с остатками rWTX[P33A] ^a
ECL1			
		Asn132	Arg32 (H)
His90, Trp91	Arg31 (H)		
His90	Arg31 (T)		
ECL2			
Val168	Gly12 (H)		
Glu170	Lys62, Arg65 (I)		
Glu170	Arg65 (H)	Lys213	Glu53 (I)
		Thr215	His29 (H)
Gln177	Arg32 (H)	Glu220	Gln30 (H)
		Glu220	Arg32, Arg37 (I)
Gln181	Arg32, Ser35 (H)	Gln224	Tyr52 (H)
		Ser227	Tyr52 (H)
ECL3 и верхняя часть TM7			
		Asp518	Arg31 (I)
Asp393	Arg37 (I)		
Glu397	Arg32, Arg37 (I)		
Glu397	Arg37 (H)		
Trp400	Arg32 (T)		
Glu401	Arg32 (I)		
Tyr404	Ala33 (H)		
a, типы взаимодействия: H — водородная связь; T — T-стэкинг; I — ионное взаимодействие.			

4.2.2.3.2. Взаимодействие «слабого» токсина с nAChR

Проведенные исследования показали, что при взаимодействии WTX с mAChR большую роль играет центральная петля токсина. Основываясь на данных, что (1) центральная петля нейротоксинов, содержащая положительно заряженные остатки Arg, зачастую является главным структурным элементом, определяющим их взаимодействие с мишенями (п.4.2.2.1), (2) большая конформационная подвижность центральной петли WTX (см. выше), делает теоретически возможным взаимодействие токсина с несколькими структурно-различными рецепторами, мы сделали предположение, что центральная петля WTX также играет важную роль при взаимодействии с nAChR.

Чтобы проверить эту гипотезу и изучить влияние разных структурных особенностей токсина на его способность взаимодействовать с nAChR, мы проанализировали активность десяти мутантных вариантов rWTX¹ (Рис. 4.20). В дополнение к семи мутантам, описанным выше, были получены еще три мутантных варианта. Главной особенностью «необычных» токсинов является пятая дисульфидная связь в петле I (Рис. 4.14). Для исследования функциональной значимости этой дисульфидной связи был

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и д.х.н. Кашеверовым И.Е., Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

получен мутантный вариант с заменой соответствующих остатков Cys6 и Cys11 на Ser. Для того чтобы более детально исследовать роль заряженных остатков петли II, было получено 2 дополнительных мутантных варианта с заменами R31E/R32A и R31A/R32E, где положительный заряд остатков аргинина был заменен на отрицательный заряд глутаминовой кислоты.

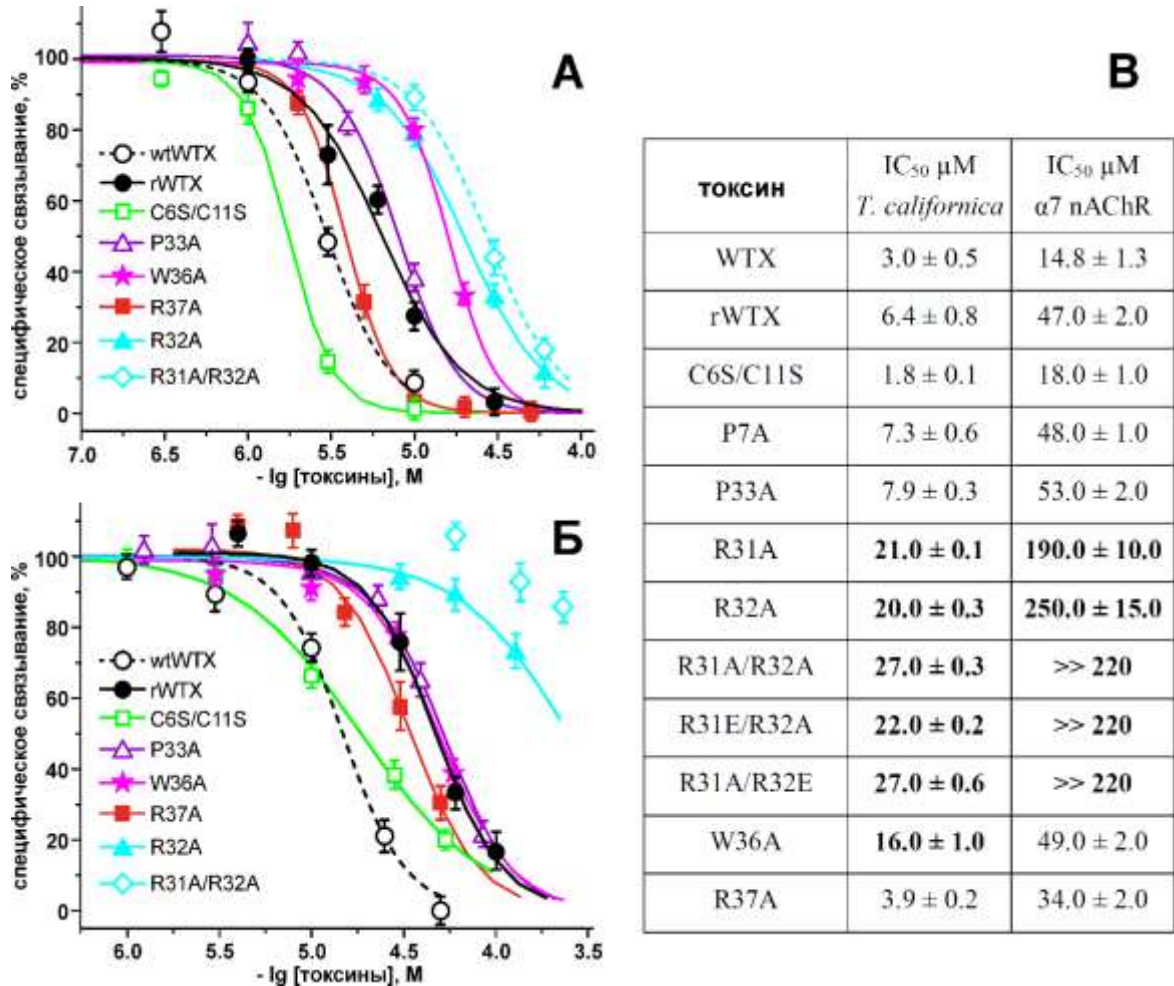


Рис. 4.20. Конкуренция природного (wtWTX) и рекомбинантного (rWTX) токсинов и его мутантов с ¹²⁵I-α-Bgtx за связывание с мышечным nAChR из *Torpedo californica* (A) и с α7-nAChR, экспрессированными в клетках линии GH₄C₁ (Б). Каждая точка есть среднее ± с.о. по трем независимым экспериментам. Нормализованные данные (% от контрольного связывания) аппроксимированы уравнением Хилла ($y = 100\% / (1 + ([Toxin]/IC_{50})^{nH})$). (B). Рассчитанные значения IC₅₀ (среднее ± с.о.). Значения IC₅₀, которые отличаются в 2 и более раз от значений для rWTX, показаны жирным шрифтом.

Способность rWTX и его мутантов взаимодействовать с nAChR была изучена в экспериментах по конкуренции с радиоактивным ¹²⁵I-меченым α-бунгаротоксином (α-Bgtx) за связывание с мембранами из ската *Torpedo californica*, содержащими nAChR мышечного типа, и GH₄C₁ клетками, гиперэкспрессирующими α7 нейрональные рецепторы человека. Полученные значения IC₅₀ приведены на Рис. 4.20B. Рекомбинантный аналог WTX демонстрировал 2-3х-кратное уменьшение сродства по

отношению к мышечным и $\alpha 7$ рецепторам по сравнению с природным токсином, выделенным из яда кобры. Есть несколько причин, которые могли бы объяснить наблюдаемое различие. Прежде всего, мы не можем полностью исключить различие в чистоте препаратов токсинов. Например, образец природного токсина может содержать следовые количества высокоактивных α -нейротоксинов, которые выделяются наравне со «слабым» токсином из яда кобры. С другой стороны, препарат rWTX может содержать незначительную часть неправильно свернутого белка. Однако, анализ с помощью ВЭЖХ, MALDI-MS и ЯМР-спектроскопии подтвердил высокую степень чистоты исследованных образцов. Таким образом, наиболее вероятной причиной наблюдаемого различия в активности природного и рекомбинантного токсинов является структурное отличие, а именно, наличие *N*-концевого остатка Met в молекуле rWTX.

С помощью ЯМР-спектроскопии было показано, что эта «незначительная» модификация приводит к конформационным изменениям в пространственно сближенных участках токсина: «голове», петле I, и *C*-концевой последовательности (п.4.2.2.3.2). Эта модификация значительно изменила фармакологический профиль rWTX на M1-mAChR, переключив режим аллостерического взаимодействия с *N*-метилскополамином с отрицательного на положительный (п.4.2.2.3.1). Возможно, конформационные изменения, возникающие в молекуле токсина из-за *N*-концевого Met, также влияют на взаимодействие токсина с nAChR. Это в свою очередь указывает на то, что, «голова», петля I или *C*-концевая последовательность могут принимать участие в формировании комплекса с nAChR.

Разрушение дисульфидной связи Cys6-Cys11 в петле I привело к восстановлению активности rWTX примерно до уровня, наблюдаемого для природного токсина на обоих рецепторах (Рис. 4.20). Вероятно, эта модификация компенсирует дестабилизацию конформации WTX, индуцированную *N*-концевым остатком метионина. Таким образом, дисульфидная связь Cys6-Cys11 сама по себе не участвует в образовании комплекса токсин/рецептор. Это противоречит полученным ранее моделям комплексов WTX/nAChR, для построения которых использовали структурную модель WTX, построенную по гомологии с другими нейротоксинами [276]. В этой работе было высказано предположение о том, что стабилизация петли I с помощью дисульфидной связи Cys6-Cys11 важна для взаимодействия WTX с мышечными и $\alpha 7$ нейрональными рецепторами [276]. Интересно отметить, что нарушение гомологичной дисульфидной связи в молекуле трехпетельного белка человека Lynx1, который подобно WTX способен взаимодействовать и с nAChR и с mAChR (см. п.4.3.1.3), привело к значительному снижению активности Lynx1 по отношению к nAChR [172].

Нейтрализация положительных зарядов остатков Arg31 и Arg32, локализованных на конце петли II, путем замены на остатки Ala привела к уменьшению сродства гWTX к мышечному и нейрональному $\alpha 7$ nAChR (в ~ 3 и 4-5 раз, соответственно, Рис. 4.20). Одновременная замена обоих остатков Arg дополнительно снижала активность токсина на рецепторе *Torpedo* (до ~ 4 раз по сравнению с гWTX) и приводила к полному исчезновению сродства гWTX к $\alpha 7$ nAChR. Неаддитивность эффектов, вызванных введением двойной мутации R31A/R32A, подтолкнула нас продолжить изучение роли положительных зарядов на петле II токсина. Введение отрицательного заряда в эту область молекулы (мутанты R31E/R32A и R31A/R32E) не привело к дальнейшему снижению активности токсина по отношению к обоим подтипам рецептора по сравнению с двойной заменой R31A/R32A (Рис. 4.20B). Таким образом, центральный фрагмент петли II, включающий два положительно заряженных остатка, представляет собой один из важных элементов, вовлеченных во взаимодействие WTX с nAChR, и нейтрализация любого из этих зарядов приводит к «выключению» элемента. Остаточная активность токсина, наблюдаемая для двойных мутантов на мышечном рецепторе, говорит о наличии дополнительных детерминант взаимодействия токсин/рецептор.

Примечательно, что мутант R31A/R32A также полностью утрачивал свою активность по отношению к M1, M2 и M3 mAChR (п.4.2.2.3.1). Таким образом, два положительных заряда на второй петле WTX играют важную роль во взаимодействии токсина с различными подтипами nAChR и mAChR. Интересно отметить, что мутация другого положительно заряженного остатка, расположенного в петле II (Arg37), существенно не влияла на активность гWTX по отношению к nAChR (Рис. 4.20). При этом эта замена приводила к полной потере активности токсина на всех исследованных типах mAChR (п.4.2.2.3.1). Таким образом, можно сделать вывод, что остаток Arg37 является специфическим детерминантом для взаимодействия WTX с mAChR, но не с nAChR.

Мутация W36A в петле II гWTX привела к ~ 2 -кратному снижению сродства токсина к рецептору мышечного типа из *T. californica*, и не оказывала никакого эффекта на связывание с $\alpha 7$ -nAChR, указывая на возможное участие Trp36 во взаимодействие с мышечным nAChR, но не с $\alpha 7$ рецептором. Ранее подобное селективное снижение активности для W36A мутанта наблюдалось на M2 mAChR, но не на M1 и M3-рецепторах (п.4.2.2.3.1).

Замена остатков Pro7 и Pro33 не приводила к существенным изменениям активности гWTX на обоих типах nAChR (Рис. 4.20). Хорошо известно, что наличие стерически ограниченного остатка Pro может приводить к фиксации определенной конформации основной цепи белка [237]. Данные, полученные для мутантов с заменами P7A и P33A,

вместе с результатами по восстановлению дисульфидной связи Cys6-Cys11 (см. выше), указывают на то, что конформация петель I и II и конформационная гетерогенность WTХ в растворе (связанная с *цис-транс*-изомерией пептидной связи Arg32-Pro33) не является ключевым фактором, определяющим взаимодействие токсина с nAChR. Ранее было показано, что мутации P7A и P33A также не влияют на активность WTХ по отношению к mAChR (п.4.2.2.3.1). Таким образом, конформационная гетерогенность WTХ не влияет на его фармакологические свойства.

Данные о связывании с nAChR (Рис. 4.20) вместе с данными ЯМР-спектроскопии (п.4.2.2.3.2) показывают, что мутант с заменой P33A сохраняет функциональную активность, аналогичную природному токсину и не демонстрирует конформационной гетерогенности, связанной с *цис-транс*-изомерией пептидной связи Arg32-Pro33. Тем не менее, этот мутант сохраняет конформационную пластичность петель, характерную для молекулы WTХ (п.4.2.2.3.2). Поэтому структура rWTХ[P33A] была использована для компьютерного моделирования взаимодействия с $\alpha 7$ -nAChR¹. Имея в виду, что WTХ конкурирует с антагонистом α -Bgtx за связывание с nAChR (Рис. 4.20), мы предположили, что сайт связывания WTХ на рецепторе как минимум перекрывается с «классическим» ортостерическим сайтом связывания рецептора. Этот сайт расположен на внеклеточной части рецептора на границе двух субъединиц и включает в себя петлю С основной субъединицы [141]. Поэтому компьютерный докинг молекулы rWTХ[P33A] к внеклеточному лиганд-связывающему домену $\alpha 7$ -nAChR проводили в предположении, что токсин взаимодействует с петлей С основной субъединицы. Модель внеклеточного домена $\alpha 7$ nAChR была построена используя в качестве шаблона кристаллическую структуру химеры ацетилхолин-связывающего белка (AChBP) и $\alpha 7$ -nAChR (PDB код 3SQ9; [41]).

Для того, чтобы учесть конформационную подвижность взаимодействующих молекул, для внеклеточного домена nAChR $\alpha 7$ типа были рассчитаны две МД траектории в ячейке с явно заданным растворителем (2×200 нс). Для rWTХ[P33A] это было сделано ранее (п.4.2.2.3.3). Последующая кластеризация полученных траекторий дала 11 и 5 отличающихся конформаций для рецептора и токсина, соответственно, которые были использованы в дальнейшем белок-белковом докинге. В полученных структурных ансамблях наблюдались разные конформации основной субъединицы домена $\alpha 7$ -nAChR: с «закрытым» и «открытым» лиганд-связывающим карманом, отличающиеся положением петли С. «Открытая» конформация петли С ранее наблюдалась в структурах комплексов AChBP и химеры $\alpha 7$ /AChBP с антагонистами [141,277]. Поэтому для докинга с токсином

¹ Совместно с к.б.н. Чугуновым А.О., группа анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН.

мы выбрали структуры домена $\alpha 7$ -nAChR с «открытым» ортостерическим сайтом связывания.

Следует отметить, что докинг, сделанный без дополнительных ограничений, может не дать информацию о структуре комплекса, наблюдаемого в природе. Это особенно важно, если, по крайней мере, один из взаимодействующих партнеров является мультидоменным белком (nAChR), который может участвовать в высокоамплитудных движениях [278]. В таком случае необходимо использовать дополнительные ограничивающие условия, основанные на экспериментальных данных. Поэтому мы использовали данные по функциональной активности мутантных вариантов для пост-фильтрации решений докинга. Одним из требований было то, чтобы оба остатка Arg31 и Arg32 образовывали солевые мостики с рецептором. В результате, мы получили набор из 14-ти возможных структур комплекса токсин/рецептор, которые могут быть разделены на четыре кластера (#1 - #4).

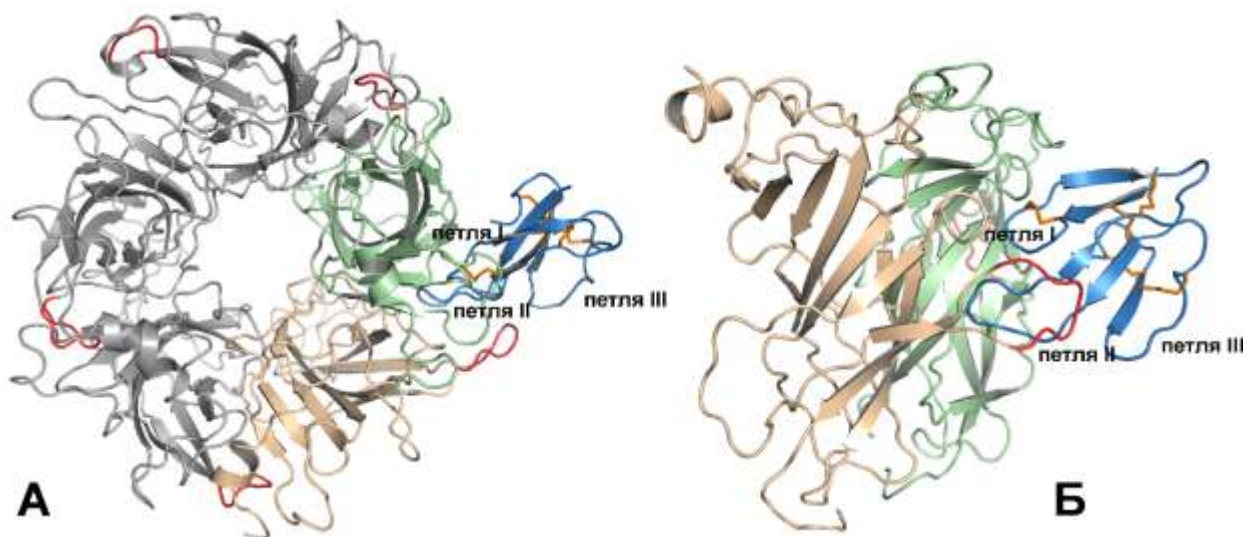


Рис. 4.21. Вид сверху и вид сбоку комплекса rWTX[P33A] и внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR с «открытым» ортостерическим сайтом связывания (решение из кластера #1) (А,Б). Молекула токсина показана синим цветом, дисульфидные связи оранжевым. Петли токсина пронумерованы. Основная и комплементарная субъединицы гомопентамерного $\alpha 7$ рецептора показаны пшеничным и светло-зеленым цветом, соответственно. Петля С каждой субъединицы показана красным.

Во всех полученных комплексах токсин демонстрирует антагонист-подобный способ взаимодействия с рецептором с формированием контактов между петлями II и ортостерическим лиганд-связывающим сайтом. При этом петля II проникает под С-петлю основной субъединицы рецептора. В то же время, каждый кластер решений характеризуется различными топологиями взаимодействия токсин/рецептор. В структурах из кластера #1 (Рис. 4.21) токсин взаимодействует с рецептором за счет петель I и II, а также остатка Arg65 С-концевой последовательности (полный список контактов приведен

в Таблице 4.3). Этот способ взаимодействия находится в хорошем согласии с данными мутагенеза и имеет самую большую площадь заглубленной поверхности ($\sim 600 \pm 2 \text{ \AA}^2$), а также объясняет пониженную активность рекомбинантного токсина, имеющего дополнительный *N*-концевой остаток Met. Напротив, контакты токсин/рецептор в кластере решений #2 образованы с участием петель II и III токсина (площадь заглубленной поверхности $\sim 480 \pm 2 \text{ \AA}^2$).

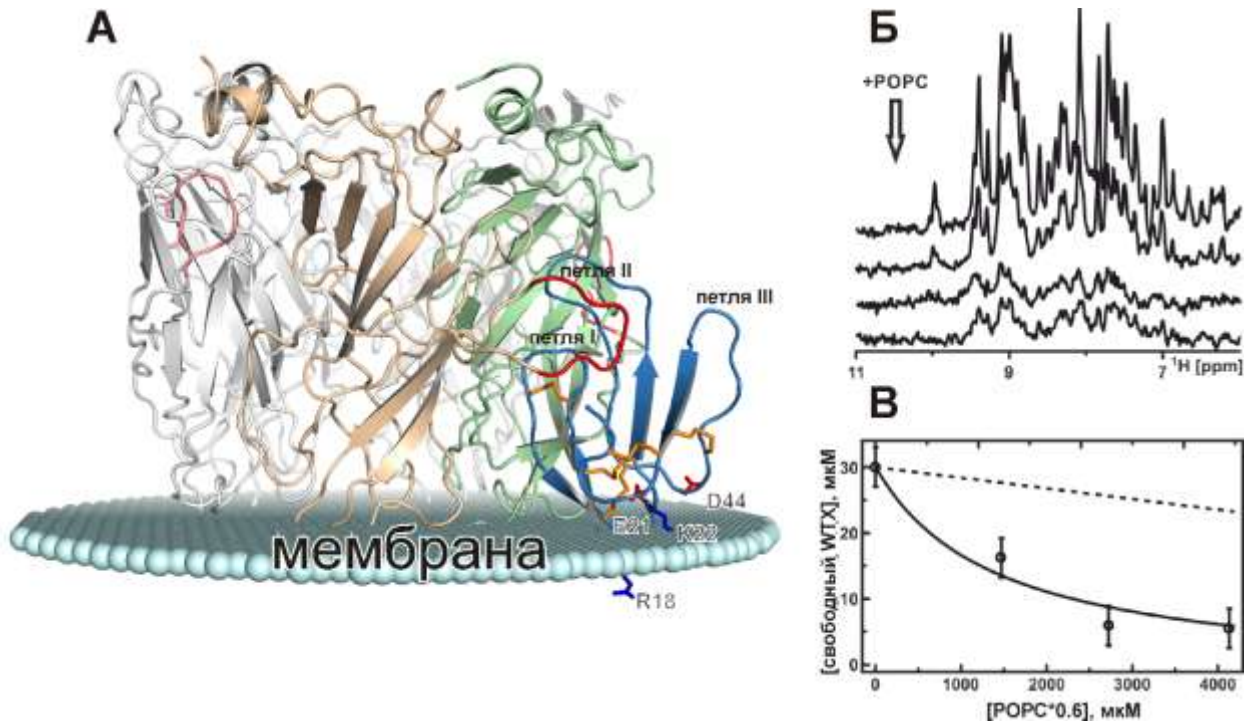


Рис. 4.22. (А). Репрезентативная структура комплекса WTX[Р33А]/α7-nAChR с «открытым» ортостерическим сайтом из кластера решений #3 Молекула токсина показана синим цветом, дисульфидные связи оранжевым. Петли токсина подписаны. Основная (+) и комплементарная (-) субъединицы гомопентамерного α7 рецептора показаны пшеничным и светло-зеленым цветом, соответственно. Петля С каждой субъединицы рецептора показана красным. Примерная граница липидного бислоя показана светло-голубыми сферами. Стоит отметить, что на самом деле головки липидов значительно больше, чем сферы на рисунке. (Б, В) Изотерма связывания rWTX[Р33А] с маленькими моноамеллярными липидными везикулами РОРС. При анализе данных предполагалось, что ЯМР-сигналы молекул токсина связавшихся с липосомами не наблюдаются в спектрах, из-за очень большой массы комплекса. Данные аппроксимированы уравнением равновесного распределения ($[\text{Toxin}]_{\text{bound}} = (K_P \times [\text{Toxin}]_{\text{free}} \times [\text{Липид}])$), в предположении, что внешний монослой везикулы содержит 60% липидных молекул. Кривая разведения показана пунктирной линией.

Таблица 4.3. Контакты между γ WTX[P33A] и $\alpha 7$ -nAChR в полученных комплексах. Выделенные серым фоном остатки соответствуют остаткам лиганд-связывающего участка в структуре комплекса α -Bgtx и химерного белка AChBP/ $\alpha 7$ -nAChR [141].

WTX	$\alpha 7$ -nAChR ^a , cluster #1	$\alpha 7$ -nAChR, cluster #2	$\alpha 7$ -nAChR, cluster #3	$\alpha 7$ -nAChR, cluster #4
ПЕТЛЯ I				
GLU 8	(-) LYS 98 (I)		(+) LYS 167 (I, H) (-) GLU 189 (H)	
PHE 10	(+) TRP 176 (T) (-) LYS 98 (H) (-) ASN 133 (H) (-) HIS 137 (H)		(+) TYR 115 (T) (+) LYS 167 (H) (+) ARG 208 (T)	
GLY 12	(-) SER 135 (H) (-) GLY 136 (H)		(+) THR 221 (H)	
LYS 13	(-) GLU 93 (I)		(-) TRP 196 (H) (-) ASP 197 (I, H)	
ПЕТЛЯ II				
LYS 26	(-) GLU 184 (I)	(+) GLU 211 (I, H)	(+) GLU 211 (I, H)	
LYS 27		(-) GLU 184 (I, H) (-) ASP 186 (I)		
LEU 28		(+) ARG 208 (H)		
HIS 29		(+) ARG 208 (H, T) (-) SER 188 (H) (-) GLY 189 (H)		(+) GLU 211 (H)
GLN 30		(+) PRO 218 (H)		(+) ARG 208 (H) (-) SER 188 (H) (-) GLY 189 (H)
ARG 31	(-) SER 56 (H) (-) GLU 184 (I, H) (-) ALA 185 (H) (-) ASP 186 (I, H) (-) SER 188 (H)	(+) PHE 209 (H) (+) GLU 211 (I)	(+) GLU 211 (I, H) (+) CYS 212 (H) (+) GLU 215 (I)	(-) SER 58 (H) (-) GLU 184 (I) (-) ASP 186 (I, H) (-) ILE 187 (H)
ARG 32	(+) ARG 208 (T) (+) TYR 210 (T) (+) GLU 215 (I, H) (+) TYR 217 (H) (+) PRO 218 (H) (+) ASP 219 (I, H) (-) SER 188 (H)	(+) ASP 219 (I, H) (-) ASP 186 (I) (-) ILE 187 (H) (-) SER 188 (H)	(-) GLU 93 (I) (-) ASN 133 (H) (-) GLU 184 (I) (-) ASP 186 (I)	(+) GLU 211 (I) (-) TRP 77 (T) (-) SER 188 (H)
ALA 33	(+) TYR 115 (H) (-) SER 188 (H)			(+) TYR 210 (H)
LEU 34	(-) SER 188 (H)		(+) ARG 208 (H) (+) GLU 215 (H)	
SER 35	(+) GLU 215 (H)		(-) ASP 186 (I)	
TRP 36	(-) SER 188 (H)			
ARG 37	(+) TYR 210 (H, T) (+) GLU 211 (I) (+) CYS 212 (H) (+) CYS 213 (H) (+) LYS 214 (H) (+) GLU 215 (I, H)	(-) ASP 197 (I)	(-) GLU 184 (I) (-) ASP 186 (I)	(+) GLU 211 (H)
TYR 38	(-) GLU 184 (H)	(+) GLU 211 (H)	(+) PHE 209 (H)	
ARG 40	(-) HIS 137 (H) (-) GLU 184 (I)	(+) GLU 211 (I)	(+) GLU 211 (I, H) (+) ASP 219 (I)	
ПЕТЛЯ III				
GLY 49		(-) GLN 139 (H)		
LYS 50		(-) SER 56 (H) (-) GLN 79 (H) (-) GLN 83 (H) (-) ASP 186 (I)		
TYR 52		(+) ARG 208 (H) (-) SER 58 (H) (-) TRP 77 (T) (-) GLN 79 (H) (-) ASP 186 (H)		(+) ARG 208 (H) (-) GLY 189 (H) (-) TYR 190 (H)
GLU 53		(-) SER 188 (H)		
GLU 56		(+) CYS 213 (H)		(-) ARG 227 (I)
C-КОНЦЕВАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ				
ARG 65	(-) THR 52 (H) (-) TYR 54 (H, T) (-) GLN 181 (H) (-) GLN 183 (H)		(+) GLU 207 (I)	

^a(+) означает остатки основной субъединицы; (-) означает остатки комплементарной субъединицы. H, T, и I означают тип взаимодействия: водородная связь, T-стэкинг, и ионные взаимодействия, соответственно.

Кластеры решений #3 и #4 содержат решения, где токсин взаимодействует с ортостерическим сайтом со стороны липидного бислоя, окружающего рецептор (Рис. 4.22А). Эти модели отличаются друг от друга топологией токсина при взаимодействии с $\alpha 7$ -nAChR (петли I/II или II/III, соответственно, Таблица 4.3). Такой тип взаимодействия токсин/рецептор, вполне может рассматриваться как вероятный, так как липидная мембрана вокруг рецептора может играть определенную роль во взаимодействии α -нейротоксинов змей с nAChR (п.4.2.1). Аналогично этому, анализ комплексов токсин/рецептор из кластеров решений #3 и #4 показал пространственную сближенность заряженных остатков «головы» токсина (Arg18, Glu21, Lys22, Asp44) и головок липидов мембраны (Рис. 4.22А).

Способность WTX взаимодействовать с цвиттер-ионными модельными мембранами, содержащими липиды POPC (в виде маленьких моноламеллярных везикул или липид-белковых нанодисков [279]) была подтверждена с помощью ЯМР-спектроскопии¹ (Рис. 4.22Б). Несмотря на то, что наблюдаемая аффинность токсина к незаряженным мембранам была не очень высокой (коэффициент распределения $K_p \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$), взаимодействие токсин/мембрана все же может играть определенную роль в связывании WTX с nAChR.

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым, группа структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН

4.3. Трехпетельные нейромодуляторы Lynx1 и Lynx6

4.3.1. Структурно-функциональные исследования Lynx1

Эндогенные трехпетельные белки семейства Lyb/uPAR привлекают к себе большое внимание благодаря способности некоторых из них модулировать функцию нейрональных nAChR, которые играют важную роль в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, паркинсонизм, депрессию и др. [64]. Одним из объектов исследования данной диссертационной работы являлся нейромодулятор Lynx1, экспрессирующийся в мозге млекопитающих.

4.3.1.1. Экспрессия Lynx1 в мозге крыс

В ходе нашей работы было показано, что Lynx1 в коре головного мозга крыс является исключительно мембраносвязанным белком¹ (Рис. 4.23А). На уровне органов, Lynx1 был обнаружен в больших количествах в коре головного мозга и в мозжечке, а также в небольших количествах в легочной ткани (Рис. 4.23Б). Lynx1 не был обнаружен в сердце, печени, почках или в предстательной железе. Это согласуется с предыдущей работой [134], в которой было показано на уровне мРНК, что Lynx1 обнаруживается в головном мозге мышей, но не в предстательной железе, печени или почках.

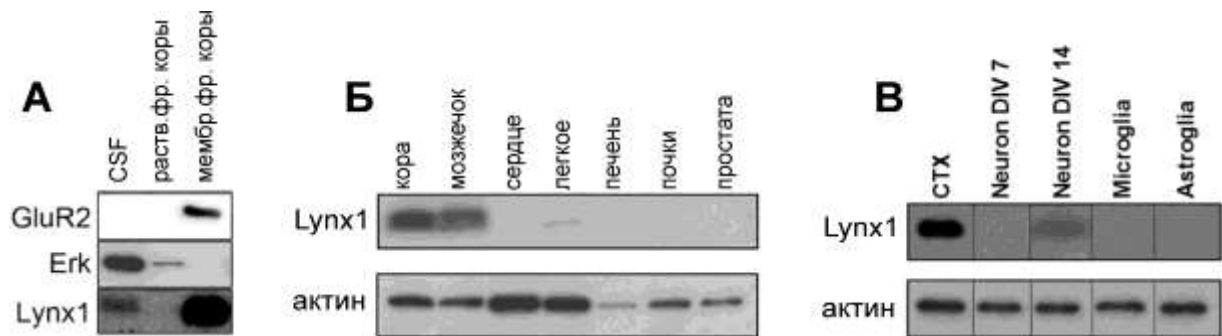


Рис. 4.23. Экспрессия Lynx1 в различных клетках и органах крыс. (А). Анализ растворимой и мембранной фракций коры головного мозга и спинномозговой жидкости с помощью Вестерн-блоттинга (n=4). (Б). Экспрессия Lynx1 в разных органах взрослого самца крысы (n = 2). (В). Уровень экспрессии Lynx1 в коре взрослого самца крысы (CTX), в первичной культуре нейронов коры, культивированных 7 и 14 дней *in vitro* (Neuron DIV 7 и 14, соответственно), в первичной культуре микроглиальных клеток, культивированных 15 дней *in vitro*, и в первичной культуре астроглиальных клеток, культивированных 18 дней *in vitro* (n = 3).

Для того, чтобы определить какие именно типы клеток в мозге экспрессируют Lynx1, мы проанализировали экспрессию нейромодулятора в коре взрослых крыс, в первичных нейронах коры крысы, культивированных 7 или 14 дней, в первичных клетках микроглии, культивированных 15 дней, и в первичных астроглиальных клетках,

¹ Совместно с проф. М.Томсенем, Университет Копенгагена, Дания

культивированных 18 дней (Рис. 4.23В). Lynx1 был обнаружен в коре и в первичных нейронах на 14 день, но не был обнаружен в нейронах на 7й день, а также в микроглиальных и астроглиальных клетках.

Некоторые Lynx1/uPAR белки существуют как в виде растворимых белков, так и в мембраносвязанной форме [137]. Существование растворимых форм белка может указывать на место действия и функцию этого белка. Так, растворимый белок может диффундировать через синаптическую щель, в то время как связанный с мембраной белок более ограничен в своем взаимодействии с nAChR [176]. В соответствии с этим, гиперэкспрессия полноразмерного (мембраносвязанного) или растворимого Lynx1 у трансгенных мышей по-разному влияла на моторную память [176].

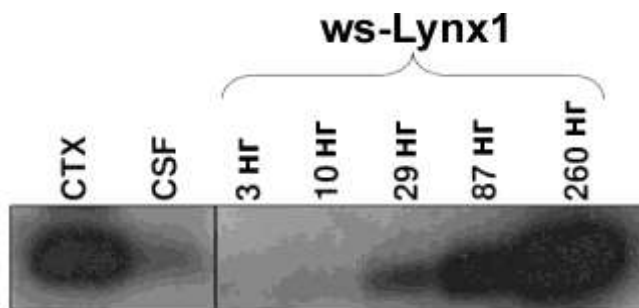


Рис. 4.24. Концентрация Lynx1 в коре (CTX) и спинномозговой жидкости (CSF). Уровень экспрессии Lynx1 определяли путем анализа образцов (по 20 мкг) мембранной фракции коры и спинномозговой жидкости взрослого самца крысы с помощью Вестерн-блота по сравнению с разным количеством рекомбинантного препарата ws-Lynx1. n = 2.

В соответствии с выше сказанным, в спинномозговой жидкости (CSF) была также обнаружена экспрессия водорастворимого Lynx1 (Рис. 4.23А, Рис. 4.24). Концентрация Lynx1 в коре головного мозга крыс и в спинномозговой жидкости была оценена нами с помощью Вестерн-блоттинга путем сравнения с препаратом рекомбинантного аналога водорастворимого белка человека Lynx1, не содержащего GPI-якорь (ws-Lynx1, см. ниже) с известной концентрацией (Рис. 4.24). Согласно полученным данным, в ткани коры головного мозга содержится ~ 8,6 нг Lynx1/мкг общего белка. Учитывая молекулярную массу ws-Lynx1 8399,6 г/моль, это соответствует ~ 1,0 пмоль/мкг общего белка. Аналогичным образом концентрация в спинномозговой жидкости оценивалась в ~ 1,1 нг Lynx1/мкг общего белка, что соответствует ~ 0,13 пмоль/мкг общего белка. Беря во внимание объем CSF, нанесенный на гель, получается, что концентрация Lynx1 в спинномозговой жидкости у крыс составляет ~0,5 мкМ, а в коре ~ 1 мкМ (из предположения, что 1 кг мозга соответствует объему 1 л). Учитывая преимущественную локализацию Lynx1 на поверхности клеток мозга, реальная локальная концентрация Lynx1 может быть значительно выше. Нами было показано, что ws-Lynx1 в концентрации 1 мкМ может увеличивать ACh-индуцированный ток на $\alpha 7$ -nAChR, а при концентрации 10 мкМ ингибировать его (п.4.3.1.4). Таким образом, Lynx1 экспрессируется в головном и спинном мозге в достаточно высоких концентрациях, необходимых для модуляции

функции nAChR. Стоит отметить, что ранее абсолютные количества Lynx1 / $\beta 2$ белков в головном мозге не определялись.

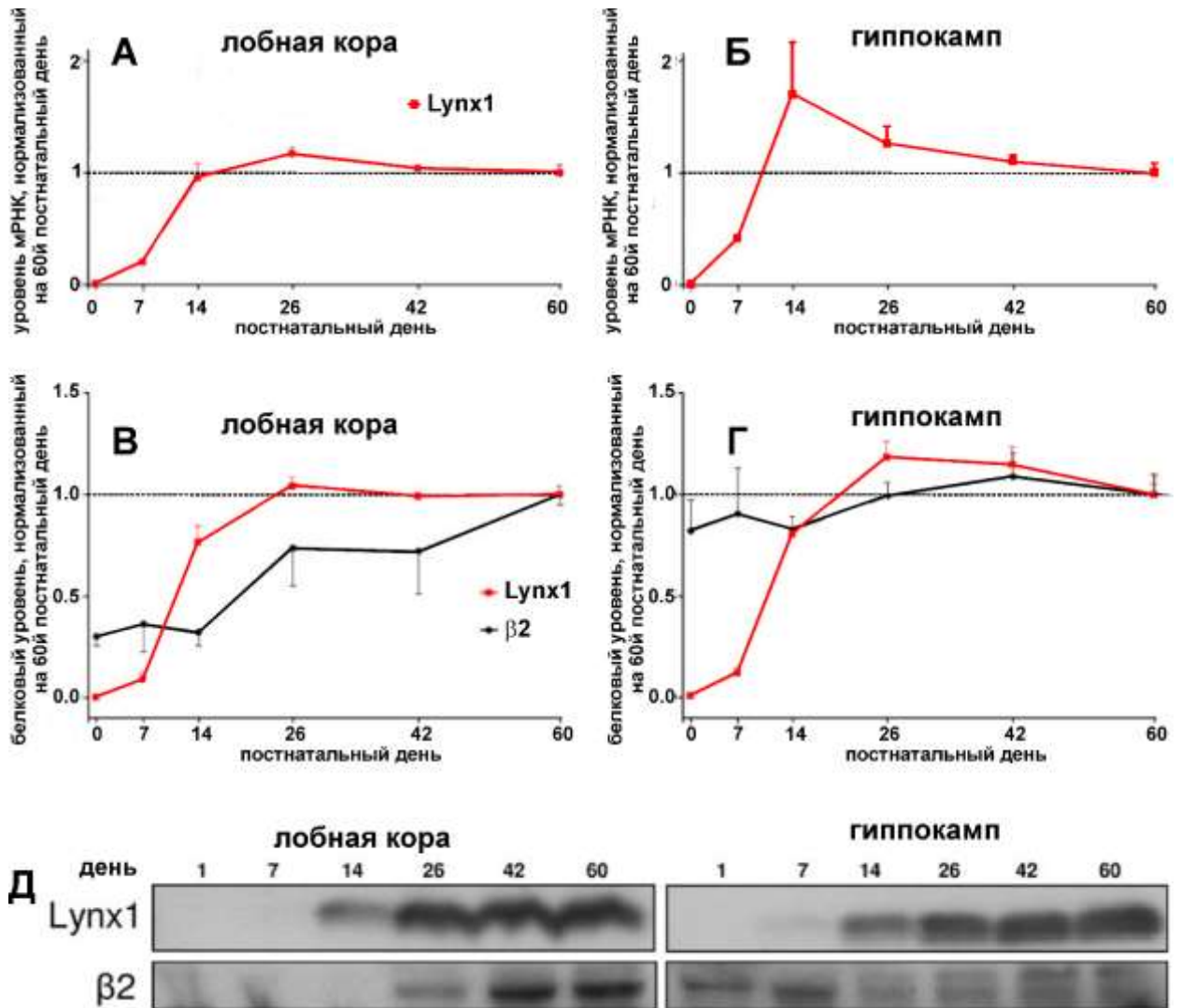


Рис. 4.25. Экспрессия Lynx1 в ходе развития. Самцы крыс были обезглавлены на 1, 7, 14, 26, 42, или 60 постнатальный день, и лобная кора или гиппокамп были извлечены и проанализированы. Уровень экспрессии Lynx1 и $\beta 2$ субъединицы nAChR были проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга. Показаны репрезентативные блоты. $n = 5$.

Также была проанализировано изменение экспрессии Lynx1 и nAChR в ходе развития организма. Показано, что в лобной коре и гиппокампе крысы при рождении экспрессия мРНК Lynx1 отсутствует, однако после рождения происходит увеличение уровня экспрессии Lynx1 с 7го по 14й день, достигая уровня экспрессии в коре как у взрослой особи, а в гиппокампе даже выше, чем у взрослого животного (Рис. 4.25А,Б). Похожая динамика экспрессии наблюдалась для Lynx1 на белковом уровне (Рис. 4.25В,Г). Эти данные согласуются с предыдущим исследованием, демонстрирующим увеличение экспрессии мРНК Lynx1 в зрительной коре мышей с 18 до 60 дня [178]. Кроме того, в работе [182] было показано отсутствие эмбриональной экспрессии Lynx1 , в отличие от

ЛубН и Lynx2, что также согласуется с нашими данными по отсутствию экспрессии Lynx1 на первый постнатальный день. Напротив, уровень экспрессии $\beta 2$ субъединицы nAChR на белковом уровне увеличивался лишь втрое в коре и с самого рождения держался примерно на уровне экспрессии взрослого животного в гиппокампе (Рис. 4.25В,Г). Эти данные впервые описывают степень согласованности между экспрессией генов семейства Луб/uPAR и субъединиц nAChR. Различие в профиле экспрессии Lynx1 и nAChR в лобной коре и гиппокампе, позволяет предположить, что возможная взаимная регуляция этих белков отличается в разных областях мозга, что не удивительно, учитывая, отличающееся распределение nAChR в лобной коре и гиппокампе [1]. Анализ полученных данных вместе с данными, полученными по экспрессии Lynx1 в первичной культуре нейронов (Рис. 4.23), позволяют предположить, что профили экспрессии нейромодулятора *in vivo* и *in vitro* совпадают.

4.3.1.2. Пространственная структура водорастворимого домена белка человека Lynx1

Мембраносвязанный белок млекопитающих Lynx1 локализуется в мозге с некоторыми подтипами nAChR и модулирует активность этих рецепторов [172]. Структурно-функциональные исследования GPI-заякоренного Lynx1 практически невозможны. Для упрощения задачи по изучению Lynx1, мы в качестве модели выбрали рекомбинантный растворимый аналог Lynx1 (ws-Lynx1), аминокислотная последовательность которого идентична последовательности Lynx1 человека до сайта прикрепления GPI-якоря (Рис. 4.26). Из-за ожидаемого пространственного сходства Lynx1 с секретируемыми трехпетельными нейротоксинами, мы предположили, что их действие на nAChR должно иметь некоторые общие черты и не сильно зависеть от наличия GPI-якоря.

Разработка системы рекомбинантной продукции (п.4.1.4) и получение миллиграммовых количеств ^{15}N -меченого ws-Lynx1 позволили поставить задачу об определении пространственной структуры этого белка. Пространственная структура ws-Lynx1 была изучена методами ^1H - ^{15}N -ЯМР-спектроскопии¹ в водном растворе при pH 5.3. Было обнаружено, что белок состоит из трех длинных петель (I, II и III), выступающих из β -структурного «ядра». Вторичная структура ws-Lynx1 представляет собой два антипараллельных β -листа, один из которых состоит из двух тяжей: Asp3-His5 и Pro17-Arg19 (петля I), а другой - из четырех тяжей: Cys7-Tyr9 (петля I), Tyr26-Thr35 (петля II),

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым и к.ф.-м.н. К.С. Минеевым, Отдел структурной биологии ИБХ РАН

Arg38-Val46 (петля II) и Ser62-Cys67 (петля III). Почти вся структура была хорошо определена по данным ЯМР, за исключением части третьей петли (остатки Thr52-Ala61) (Рис. 4.26). Остатки в этой области белка демонстрировали значения ^1H химических сдвигов, близкие к значениям в неупорядоченной структуре, и усредненные значения констант $^3\text{J}_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}} \sim 7$ Гц. Кроме того, для этих остатков не наблюдалось ни дальних ни средних NOE контактов, что свидетельствует о повышенной подвижности этого фрагмента.

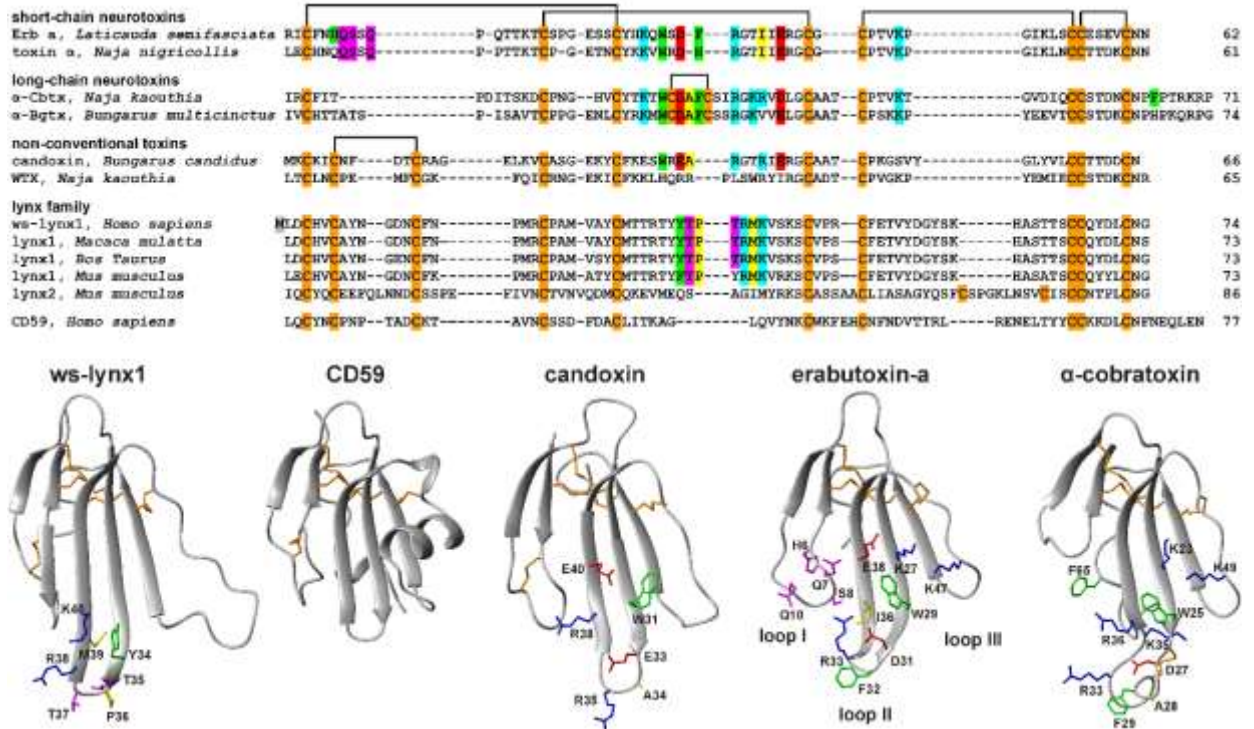


Рис. 4.26. Сравнение аминокислотной последовательности ws-Lynx1 и других белков семейства Lub/uPAR (показаны без консенсусной последовательности для GPI-якоря на C-конце), CD59 и трехпетельных α -нейротоксинов змей (верхняя панель); сравнение пространственной структуры ws-Lynx1, CD59, кандоксина, эрабутоксина-а и α -кобратоксина (нижняя панель). Данные взяты из базы данных Swiss-Prot. Эрабутоксин-а, α -кобратоксин, α -бунгаротоксин и «слабый» токсин обозначены как Erb-a, α -Cbtx, α -Bgtx and WTX, соответственно. Дополнительный остаток Met1 ws-Lynx1 выделен серым цветом. Остатки Cys окрашены в оранжевый цвет, и показано положение дисульфидных связей. Координаты атомов для α -Cbtx, Erb-a, кандоксина и CD59 взяты из базы данных Protein Data Bank (PDB коды 2CTX, 1QKD, 1JGK, 2J8V, соответственно). Показаны остатки α -Cbtx и Erb-a, важные для взаимодействия с nAChR [258,280], а также гомологичные остатки в кандоксине [145] и соответствующие остатки в петле II ws-Lynx1. Ароматические, гидрофобные, положительно заряженные, отрицательно заряженные и полярные остатки показаны зеленым, желтым, синим, красным и пурпурным цветом, соответственно.

Структура ws-Lynx1 стабилизирована четырьмя дисульфидными связями в "голове" молекулы (Cys4-Cys27, Cys20-Cys45, Cys49-Cys66 и Cys67-Cys72), и одной дисульфидной связью в первой петле (Cys7-Cys14). Эти результаты подтверждают расположение дисульфидных связей, ранее предложенное для Lynx1 [172]. Помимо водородных связей, связанных с каноническими элементами вторичной структуры, "голова" и петли белка стабилизированы дополнительными H-связями и электростатическими взаимодействиями.

Например, две водородные связи (HN(Leu71)-CO(Asp3) и HN(Asp3)-O δ 1(Asp70) контролируют относительное пространственное расположение N- и C-концевых последовательностей белка. N-H \cdots N водородная связь между HN Asn16 и N δ 1 His5 и возможный солевой мостик (Asp3-Arg19) фиксируют первую петлю. Водородная связь HN(Cys66)-O ϵ 1(Glu51) стабилизирует третью петлю. Кроме того, несколько β - и γ -поворотов присутствуют как на конце петель I и II, так и в области «головы» молекулы. Сравнение ^{15}N -HSQC спектров ws-Lynx1, измеренных при разных pH (5.3 и 7.0), указало на то, что белок имеет схожую пространственную структуру при нейтральных и слабо кислых условиях.

Так как мишенью действия Lynx1 являются nAChR, интересно было сравнить его трехмерную структуру со структурами трехпетельных нейротоксинов змей, действующих на эти же рецепторы (Рис. 4.26). CD59, регуляторный белок семейства Lyb/uPAR, был также включен в сравнение, так как известна пространственная структура его формы без GPI-якоря [137]. На рисунке 4.26 показано общее структурное сходство этих белков. Пятая дисульфидная связь в петле I является общей чертой для ws-Lynx1, «необычных» токсинов и CD59. Однако, длинная и в основном неупорядоченная петля III является уникальной особенностью ws-Lynx1. CD59 также содержит довольно длинные вставки в петле III, но этот элемент хорошо структурирован и принимает α -спиральную конформацию в кристалле и растворе [137].

4.3.1.3. Взаимодействие ws-Lynx1 с ацетилхолинсвязывающими белками, nAChR и mAChR

Предыдущие исследования показали, что Lynx1 влияет на ацетилхолин-индуцированные токи в ооцитах *Xenopus* и клеточных линиях, экспрессирующих α 4 β 2 nAChR [134,172,175]. Однако, дать количественную оценку активности GPI-заякоренного Lynx1 и измерить величину Kd или EC₅₀ наблюдаемых эффектов было невозможно. В нашей работе мы измерили параметры взаимодействия ws-Lynx1 с nAChR, а также с ацетилхолин-связывающими белками Ac-AChBP и Ls-AChBP¹, которые являются структурными и функциональными моделями лиганд-связывающих доменов nAChR[39]. Так как гомопентамерные AChBP наиболее близки к гомопентамерным α 7-nAChR, и поскольку Ls-AChBP связывает α -Bgtx с наномолярной аффинностью, конкуренция с ^{125}I - α -Bgtx делает возможным обнаружение соединений, которые, вероятно, могут взаимодействовать и с α 7-nAChR [281,282]. Соединения, мишенью которых являются

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и д.х.н. Кашеверовым И.Е., Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

другие подтипы nAChR, также могут взаимодействовать с AChBP, хотя и с более низкой аффинностью [283].

Эксперименты по конкуренции с ^{125}I - α -Bgtx определили IC_{50} для связывания ws-Lynx1 с AChBP 10 мкМ (Рис. 4.27А). Связывание ws-Lynx1 с AChBP позволило предположить, что рекомбинантный белок может также взаимодействовать и с nAChR. Действительно, наличие взаимодействия Lynx1 с $\alpha 7$ - или $\alpha 4\beta 2$ -nAChR ранее было показано с помощью иммунопреципитации [134,172,175]. Однако, конкуренции ws-Lynx1 с ^{125}I - α -Bgtx за взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированными в клеточной линии GH₄C₁, не было обнаружено вплоть до концентрации рекомбинантного белка 30 мкМ (Рис. 4.27В). В аналогичных экспериментах по конкуренции за взаимодействие с $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, экспрессированных в клеточной линии SH-EP₁, также не наблюдалось конкуренции с ^3H -эпибатицином вплоть до концентрации ws-Lynx1 30 мкМ (Рис. 4.27Г). Так как ранее была показана совместная иммунопреципитация Lynx2 с мышечным nAChR [183], мы также протестировали способность ws-Lynx1 взаимодействовать с мышечным nAChR, выделенным из ската *Torpedo californica*, в экспериментах по конкуренции с ^{125}I - α -Bgtx. Было показано, что ws-Lynx1 взаимодействует с мышечным nAChR с $\text{IC}_{50} \sim 30$ мкМ (Рис. 4.27Б). Наблюдаемая конкуренция с ^{125}I - α -Bgtx за взаимодействие с рецептором и ацетилхолин-связывающими белками указывает на возможное, по крайней мере, частичное, перекрытие сайтов связывания ws-Lynx1 и α -Bgtx на поверхности AChBP и мышечного nAChR. Различие во взаимодействии с nAChR различных подтипов, наблюдаемое для ws-Lynx1, ранее было описано для трехпетельных α -нейротоксинов и α -конотоксинов. α -Bgtx, длинный нейротоксин с удлиненной центральной петлей и дополнительной дисульфидной связью, эффективно взаимодействует с $\alpha 7$ и мышечным nAChR, в то время как нейротоксины с короткой центральной петлей, и не имеющие в ней дополнительной дисульфидной связи, эффективно ингибируют только nAChR мышечного типа (п.4.2.2). Наиболее близким примером является α -конотоксин ImII: он демонстрирует такую же ингибирующую активность на $\alpha 7$ -nAChR, как и α -конотоксин ImI, но при этом вытесняет ^{125}I - α -Bgtx намного менее эффективно [284]. Более того, было показано, что связывание α -конотоксина ImII происходит в классическом ортостерическом сайте в случае AChBP и $\alpha 7$ -nAChR, в то время как в случае мышечного рецептора из *Torpedo californica* этот конотоксин связывается в основном за пределами этого сайта [285].

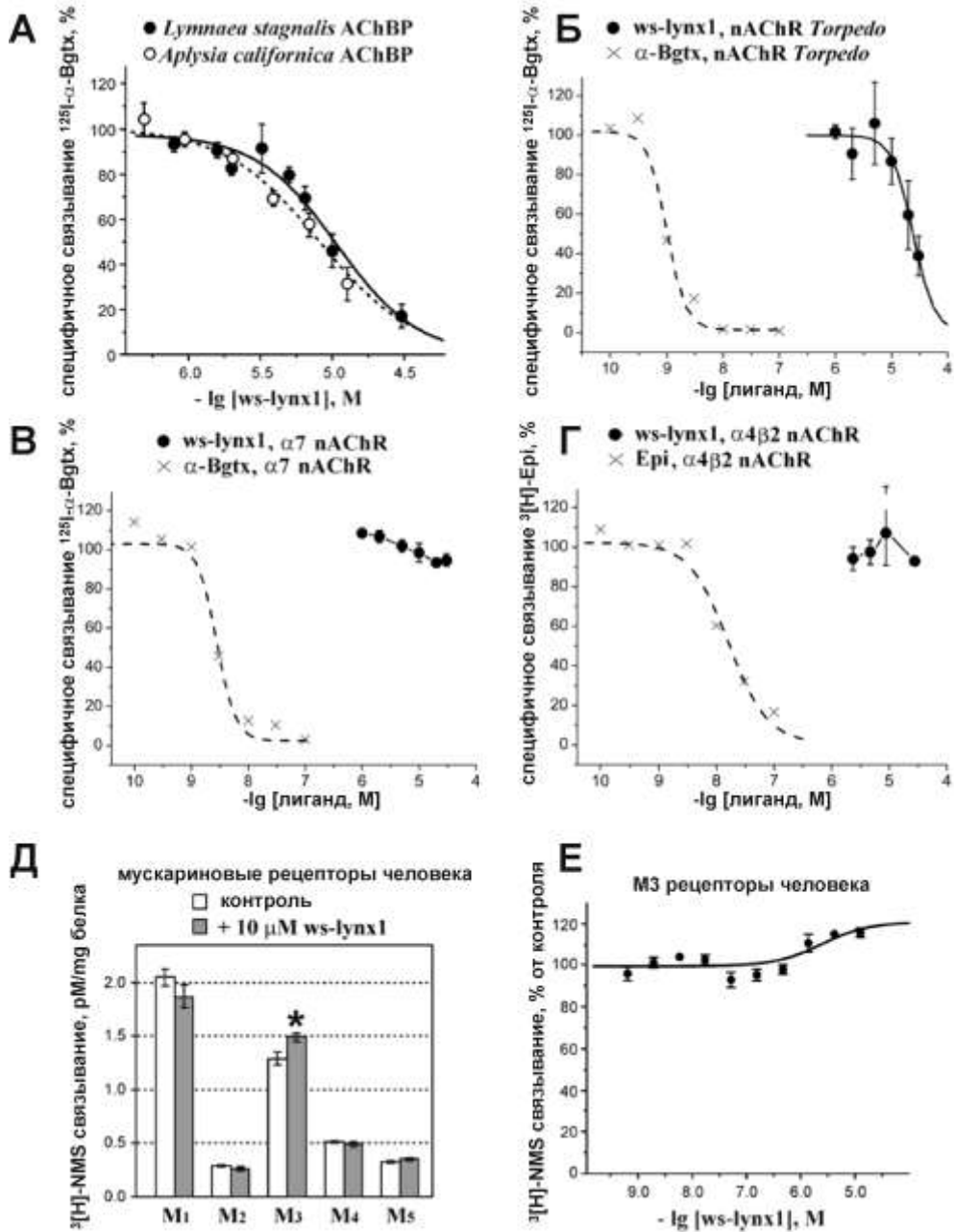


Рис. 4.27. Взаимодействие ws-Lynx1 с AChBP, nAChR и mAChR. Конкуренция ws-Lynx1 с ^{125}I -Bgtx за связывание с *Ls*-AChBP и *Ac*-AChBP (А), мышечным nAChR из *T. californica* (Б), и с α7-nAChR, экспрессированными в GH4C1 клетках (В). Конкуренция ws-Lynx1 с ^3H -эпибатином за связывание с α4β2-nAChR, экспрессированными в SH-EP1 клетках показана на панели (Г). Для сравнения также показано вытеснение ^{125}I -Bgtx и ^3H -эпибатидина немечеными Bgtx и эпибатином. Каждая точка представляет собой среднее ± S.E. трех независимых экспериментов. Нормализованные данные (% от контрольного связывания) аппроксимированы уравнением Хилла. Рассчитанные параметры IC₅₀ и pN равны 10.7 μM и 1.5 для *Ls*-AChBP, 9.4 μM и 1.2 для *Ac*-AChBP, 24 μM и 2.3 для мышечного nAChR. (Д). Влияние 10 μM ws-Lynx1 на связывание ^3H -NMS с M1–M5 mAChR человека, экспрессированными в CHO клетках. * – означает статистически достоверную разницу связывания ^3H -NMS с M3 рецептором в присутствии ws-Lynx1 с контролем без ws-Lynx1 ($p < 0.05$, двухсторонний t-критерий Стьюдента, $n = 4$). (Е). Влияние ws-Lynx1 на связывание ^3H -NMS с M3 mAChR. Мембраны, экспрессирующие M3 мускариновый рецептор инкубировали в присутствии различных концентраций ws-Lynx1 и 108 pM ^3H -NMS. Связывание ^3H -NMS выражено в процентах от контроля (связывание ^3H -NMS в отсутствие ws-Lynx1, $n = 4$). K_d ^3H -NMS на M3 рецепторе (207 pM) была определена в параллельных экспериментах по насыщению связывания. Аппроксимация полученных данных уравнением ($y = 100\% \times ([\text{NMS}] + K_d) / ([\text{NMS}] + K_d \times (K_a + 10^{[\text{ws-Lynx1}]}) / (K_a + 10^{[\text{ws-Lynx1}]/\alpha}))$) позволила определить равновесную константу диссоциации ws-Lynx1 ($K_a = 3.0 \mu\text{M}$) и фактор кооперативности ($\alpha = 0.8$).

Дополнительная дисульфидная связь в петле I и микромолярное сродство к nAChR мышечного и $\alpha 7$ типов характерны для «слабого» токсина WTX из яда *Naja kaouthia* (п.4.2.2.3). Для WTX было показано, что этот токсин также взаимодействует и с mAChR ([147], п.4.2.2.3.1). Мы также протестировали взаимодействие ws-Lynx1 с мускариновыми рецепторами M1-M5 типов¹. На Рисунке 4.27E видно, что 10 мкМ ws-Lynx1 не оказывает никакого влияния на все протестированные подтипы рецептора, за исключением рецептора M3 типа, для которого наблюдалось статистически значимое увеличение связывания ³H-N-метилскополамина (NMS) на 15% в присутствии ws-Lynx1. Слабое положительное аллостерическое взаимодействие (коэффициент кооперативности $\alpha \sim 0,8$) между ws-Lynx1 и ³H-NMS было подтверждено в эксперименте по псевдоконкуренции на M3-рецепторе (Рис. 4.27E). Сродство ws-Lynx1 к рецептору было относительно низким ($K_a \sim 3$ мкМ) по сравнению с WTX ($K_a \sim 0,3$ мкМ). Тем не менее, полученные данные указывают на возможное существование отличных от nAChR молекулярных мишеней действия Lynx1.

Различие в действии ws-Lynx1 и змеиных нейротоксинов можно объяснить существенными различиями в характере их функциональных групп. На рисунке 4.26 показаны боковые цепи остатков «длинного» нейротоксина α -Cbtx, важных для взаимодействия с нейрональным $\alpha 7$ -nAChR [258]. В то же время, остатки, важные для взаимодействия «коротких» α -нейротоксинов с мышечными рецепторами [280], показаны на примере эрабутоксина-а. Центральная петля обоих нейротоксинов, а также «необычных» токсинов, эффективно блокирующих nAChR (например, candoxin [145]) содержит комбинацию из ароматических, положительно и отрицательно заряженных остатков (Рис. 4.26), которые, возможно, и определяют взаимодействие этих токсинов с ортостерическим сайтом связывания на поверхности рецептора [44,140]. Положительно заряженный остаток, расположенный на конце петли II (Arg33 в α -Cbtx и эрабутоксине-а или Arg35 в кандоксине) имитирует положительный заряд ACh, тем самым предотвращая одновременное связывание нейротоксина и агониста. Ws-Lynx1 не имеет такого набора остатков и, в принципе, может связываться с другим сайтом на поверхности nAChR, при этом оставляя возможность для одновременного взаимодействия рецептора с ACh.

4.3.1.4. Влияние ws-Lynx1 на ACh-индуцированные токи через nAChR человека, экспрессированные в ооцитах *Xenopus laevis*

Влияние ws-Lynx1 на амплитуду ACh-индуцированных токов через каналы $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 7$ nAChR было исследовано на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих

¹ Совместно с проф. В. Долежалем, Институт физиологии Чешской академии наук

соответствующие рецепторы, в отсутствие и в присутствии 1 мкМ или 10 мкМ нейромодулятора¹. Измеряли амплитуду токов через канал рецептора, индуцированных различными концентрациями ACh в пределах от 10 нМ до 1 мМ. Было показано, что сама по себе ws-Lynx1 в отсутствие ACh не оказывала никакого влияния на ток через рецептор. Совместная аппликация 1 мкМ ws-Lynx1 с ACh также не оказывала никакого эффекта на $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3\beta 2$ nAChR, однако наблюдалось небольшое увеличение амплитуды ACh-

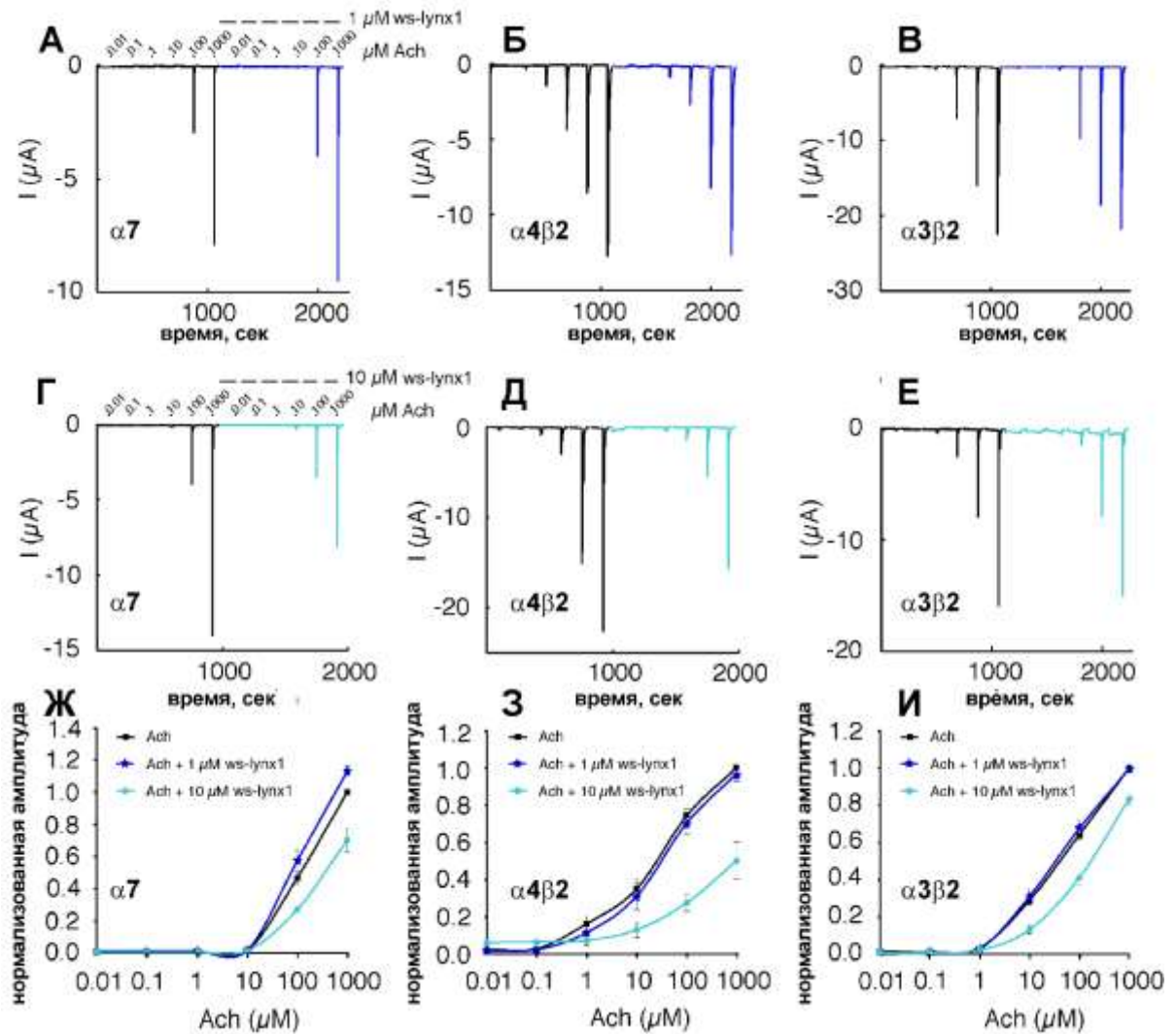


Рис. 4.28. Действие ws-Lynx1 на nAChR человека, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*. (А-В), ACh-индуцированные ответы на рецепторах $\alpha 7$ (А), $\alpha 4\beta 2$ (Б) и $\alpha 3\beta 2$ (В) типов в отсутствие и в присутствии 1 мкМ ws-Lynx1. (Г-Е), ACh-индуцированные ответы на рецепторах $\alpha 7$ (Г), $\alpha 4\beta 2$ (Д) и $\alpha 3\beta 2$ (Е) типов в отсутствие и в присутствии 10 мкМ ws-Lynx1. (Ж-И), Величины ACh-индуцированных ответов на рецепторах $\alpha 7$ (Ж), $\alpha 4\beta 2$ (З) и $\alpha 3\beta 2$ (И) типов в отсутствие и присутствии 1 и 10 мкМ ws-Lynx1, усредненные по нескольким экспериментам (n = 3–11). 1 мкМ ws-Lynx1 увеличивает ответ на 1 мМ ACh только на $\alpha 7$ -nAChR.

индуцированных токов для $\alpha 7$ nAChR (Рис. 4.28А-В). Этот эффект был подтвержден в другой партии ооцитов с 1 мМ ACh в присутствии или в отсутствие 1 мкМ ws-Lynx1 (n =

¹ Совместно с проф. Д.Бертраном, HiQScreen Sàrl, Женева, Швейцария

б). В то же время, аппликация 10 мкМ ws-Lynx1 приводила к ингибированию ACh-индуцированных токов на всех трех типах рецепторов, но эффект был более выраженным на $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (Рис. 4.28Г-Е). Эти данные указывают на зависимость эффекта ws-Lynx1 на $\alpha 7$ -nAChR от концентрации, что может выражаться в потенцировании или ингибировании рецептора.

Так как в экспериментах по связыванию мы не видели при 30 мкМ ws-Lynx1 ни ингибирования связывания ^3H -эпибатидина с $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, ни связывания ^{125}I - α -Bgtx с $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 4.27Г), эффекты, наблюдаемые в электрофизиологических экспериментах, показывают, что, по крайней мере, частично, активность ws-Lynx1 обусловлена взаимодействием с рецепторами за пределами ортостерического сайта связывания. Это предположение также подтверждается тем фактом, что ингибирующее действие ws-Lynx1 становится еще более выраженным, особенно, на $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, при высоких концентрациях ACh (Рис. 4.28З), как было ранее показано для мембраносвязанного Lynx1 [172]. Так, при 10 мкМ ACh не наблюдалось каких-либо эффектов ws-Lynx1 на $\alpha 7$ -nAChR, но явное снижение амплитуды тока было зафиксировано при 100 и 1000 мкМ ACh. Для природного Lynx1 (хотя при неизвестных концентрациях) ранее было описано увеличение скорости десенсibilизации для $\alpha 4\beta 2$ -nAChR [172], но наши данные не выявили какой-либо заметной модификации времени отклика в присутствии 1 мкМ или 10 мкМ ws-Lynx1 для всех исследуемых рецепторов.

4.3.1.5. Определение активного сайта в молекуле ws-Lynx1

Определение пространственной структуры ws-Lynx1 позволило моделировать взаимодействие этого белка со своими мишенями. Поскольку наибольшее сродство у ws-Lynx1 наблюдалось к AChBP, и для этих белков известны кристаллические структуры, в том числе и их комплексов с агонистами и антагонистами [140,277], мы решили осуществить докинг рекомбинантного нейромодулятора с Ls-AChBP и сравнить полученную модель со структурой комплекса AChBP с длинным α -нейротоксином α -Cbtx¹. Для докинга использовали два типа структур Ls-AChBP: со смещенной к центральной оси С-петлей (как в комплексах с агонистами карбамоилхолином и никотином) и с «отодвинутой» С-петлей (как в комплексе с конкурентным антагонистом α -Cbtx). Докинг и последующее исследование молекулярной динамики показали, что аффинность ws-Lynx1 к Ls-AChBP в первом случае была значительно выше (оцененные энергии взаимодействия были -342 и -239 кДж/моль/сайт связывания, соответственно).

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и С.Ю. Филькиным, Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

Таким образом, более стабильным является комплекс с положением С-петли, характерным для комплексов Ls-AChBP с агонистами.

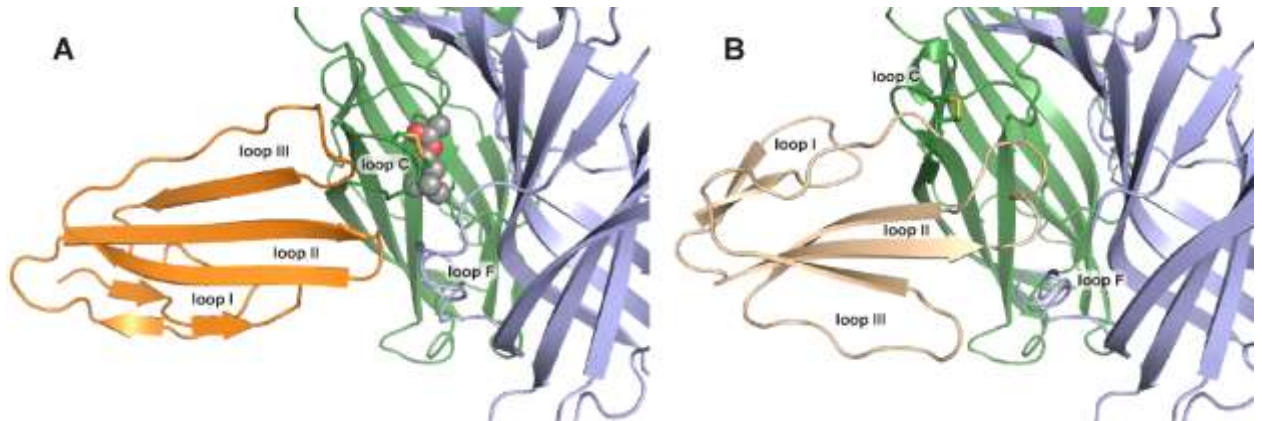


Рис. 4.29. (А). Модель комплекса ws-Lynx1/Ls-AChBP в сравнении с кристаллической структурой комплекса α -Cbtx/Ls-AChBP (Protein Data Bank, код 1YI5) (В). Основная субъединица AChBP показана синим цветом; комплементарная субъединица – зеленым. Вицинальная дисульфидная связь в С-петле показана желтым цветом. Ws-Lynx1 и α -Cbtx показаны оранжевым и пшеничным цветами, соответственно. На панели А показана молекула ACh.

Полученная модель комплекса ws-Lynx1/Ls-AChBP показана на рисунке 4.29А, и для сравнения приведена структура комплекса α -Cbtx/Ls-AChBP (Рис. 4.29В). С одной стороны, ws-Lynx1 взаимодействует с С-петлей AChBP посредством петли II подобно α -нейротоксину. С другой стороны, имеются отличия в положении С-петли и ориентации молекул относительно AChBP: в случае ws-Lynx1 петля I находится ниже петли II, а в комплексе с α -Cbtx – выше. Кроме того, сайт связывания ws-Lynx1 лишь частично перекрывается с сайтом связывания α -нейротоксина. В отличие от α -Cbtx, ws-Lynx1, по-видимому, стабилизирует С-петлю AChBP в положении, прижатом к центральной оси в конформации, которая ранее наблюдалась в комплексах AChBP с агонистами [286], не мешая при этом взаимодействию ацетилхолин-связывающего белка с ацетилхолином (Рис. 4.29).

Чтобы оценить, насколько близка эта модель к реальности и в какой степени она отражает взаимодействие ws-Lynx1 с nAChR был получен ряд мутантов нейромодулятора с заменами в II и III петлях (Рис. 4.30А) и исследована активность этих мутантов по отношению к химерному рецептору $\alpha 7$ /GlyR, представляющему собой гибрид внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR цыпленка и трансмембранной и цитоплазматической части глицинового рецептора¹ [287]. Мутации были выбраны на основе компьютерной модели комплекса ws-Lynx1/Ls-AChBP (Рис. 4.29), которая позволила предположить возможное участие фрагмента 35–40 петли II и области 54–59 петли III ws-Lynx1 во

¹ Совместно с проф. П.Д. Брежестовским, Brain Dynamics Institute, Aix-Marseille University, Франция.

взаимодействии с рецептором. Правильность первичных структур мутантов была подтверждена MALDI масс-спектрометрией, показавшей близкое совпадение рассчитанных и определенных молекулярных масс рекомбинантных белков. Ни одна из мутаций не приводила к значительному нарушению трехмерной структуры Lynx1, о чем свидетельствовали данные КД- и ЯМР-спектроскопии.

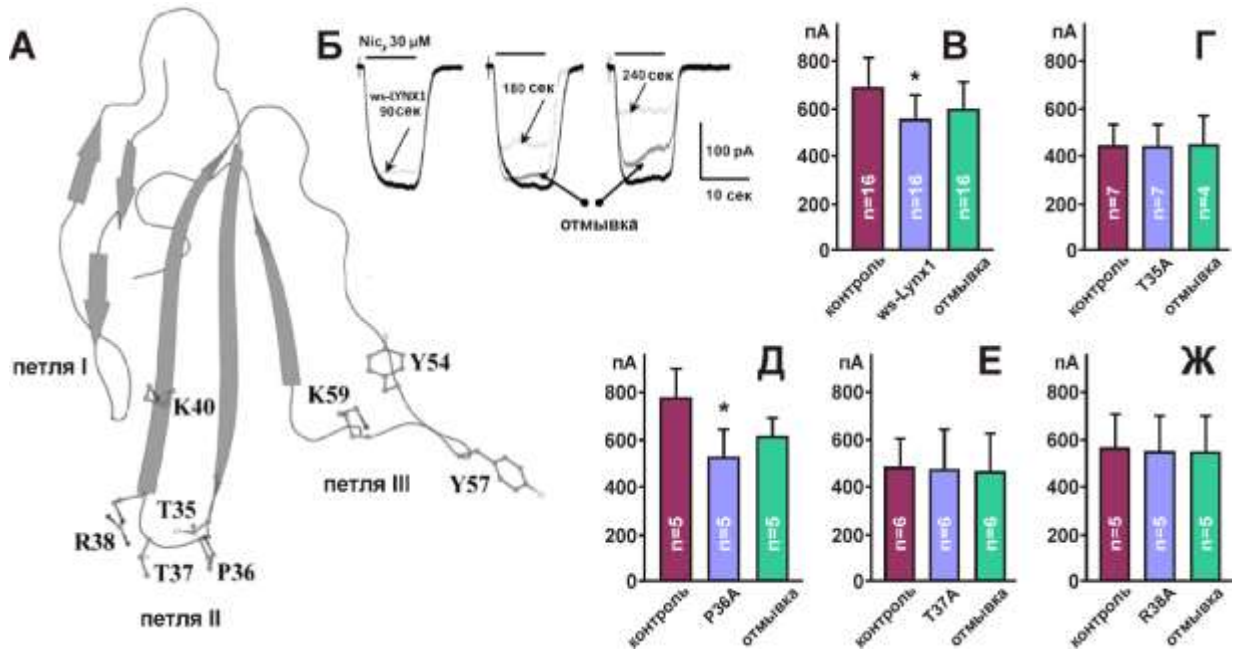
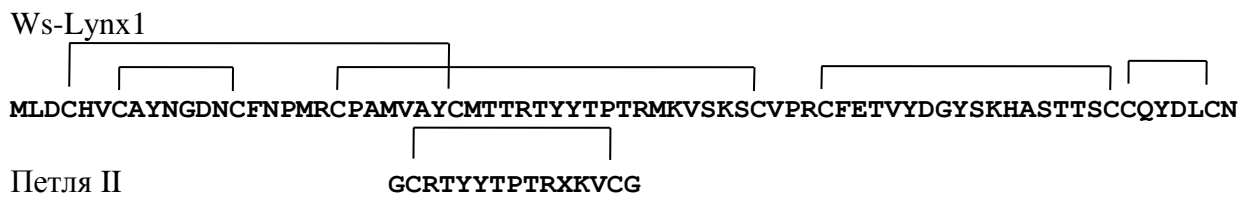


Рис. 4.30. (А). Расположение мутаций в молекуле ws-Lynx1. (Б). Влияние времени инкубации клеток с СНО, экспрессирующих $\alpha 7$ /GlyR, с 10 мкМ ws-Lynx1 на амплитуду никотин-индуцированного тока. (В). Влияние 10 мкМ ws-Lynx1 на никотин-индуцированные токи в химере $\alpha 7$ /GlyR. (Г-Ж). Влияние мутантов ws-Lynx1 с заменами в центральной петле на никотин-индуцированные токи в химере $\alpha 7$ /GlyR. Данные представлены как средние амплитуды тока, индуцированного никотином, в контроле (до аппликации мутанта), через 90 сек инкубации с мутантом (10 мкМ) (в центре) и после 5 минут отмывки (справа). * означает статистически значимое отличие от контроля ($p < 0.05$, согласно ANOVA анализу).

Эффект ws-Lynx1 был протестирован с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации «целая клетка» (whole-cell) на 22 клетках СНО-K1, экспрессирующих $\alpha 7$ /GlyR. Его аппликация не меняла входное сопротивление клеток по оценке токов утечки (29 ± 8 пА и 26 ± 7 пА, соответственно) до и после 90–240 сек аппликации 10 мкМ ws-Lynx1). На 16 клетках аппликация ws-Lynx1 в течение 90 сек вызывала частично обратимое уменьшение амплитуды токов, вызванных аппликацией 30 мкМ никотина (Рис. 4.30Б). Средние амплитуды перед добавлением ws-Lynx1 (контроль) и после 90 или 180 с обработки 10 мкМ ws-Lynx1 были 674 ± 149 пА и 478 ± 102 пА ($p < 0,05$) соответственно, т.е. среднее ингибирование ($n=16$) было $23,9 \pm 3,2$ % (Рис. 4.30Б) наблюдалась вариация амплитуды ингибирования от 10 до 50 %. Увеличение времени аппликации 10 мкМ ws-Lynx1 приводило к более сильному ингибированию никотин-индуцированных токов (Рис. 4.30Б).

Перед тестированием мутантов ws-Lynx1 на $\alpha 7$ -GlyR, мы исследовали взаимодействие нейромодулятора с «диким типом» $\alpha 1$ -GlyR. Ws-Lynx1 не оказывал влияния на токи, индуцированные в этом рецепторе, что указывает на то, что в $\alpha 7$ -GlyR сайт связывания ws-Lynx1 находится в пределах внеклеточного $\alpha 7$ домена. Результаты, полученные для мутантов ws-Lynx1, представлены на Рис. 4.30Г-Ж. Большинство мутаций приводило к сильному снижению ингибирования амплитуды тока, вызванного никотином. Например, мутация T35A полностью отменяла ингибирующую активность ws-Lynx1 (Рис. 4.30Г). Мутации соседних остатков T37A и R38A в петле II также отменяли ингибирование тока (Рис. 4.30Е,Ж). Напротив, мутант P36A проявлял еще более высокую ингибирующую активность, чем ws-Lynx1 со средним ингибированием 32% при аппликации в течение 90 сек (Рис. 4.30Д). Усиление никотин-индуцированного тока было также вызвано мутацией Y57A в петле III, в то время как при мутациях остатков Tug54 и Lys59 сохранялась склонность к слабому ингибированию никотин-индуцированного тока. Таким образом, мы предположили, что основным сайтом взаимодействия ws-Lynx1 с рецептором, по-видимому, является петля II.



А

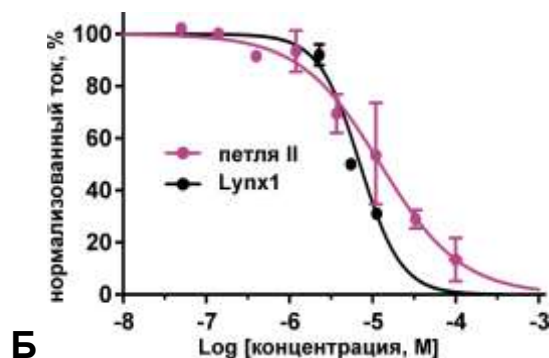


Рис. 4.31. Влияние ws-Lynx1 и пептида на основе центральной петли нейромодулятора на $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*. Кривые доза-ответ для вызванных ACh токов в присутствии пептидов. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm с.о. из трех независимых экспериментов. Рассчитанные параметры IC_{50} и nH составляли 6.3 ± 1.0 мкМ, $nH = 1.8 \pm 0.2$ и 12.5 ± 4.5 мкМ, $nH = 0.9 \pm 0.1$ для ws-Lynx1 и пептида, соответственно.

Для подтверждения этой гипотезы был получен пептидный синтетический аналог на основе фрагмента центральной петли Lynx1, стабилизированный дисульфидной связью, образованной двумя остатками цистеина, введенными в N- и C-концевые части пептида¹ (Рис. 4.31А). Мы исследовали активность полученного пептида на ооцитах *X. laevis*,

¹ Совместно с к.х.н. В.Н. Азевым, группа химии пептидов ИБХ РАН

экспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR в сравнении с ws-Lynx1¹ (Рис. 4.31Б). Было показано, что пептид ингибирует $\alpha 7$ -nAChR при концентрациях > 10 мкМ практически также эффективно, как и полноразмерный ws-Lynx1. Таким образом, нами был идентифицирован основной функциональный элемент молекулы Lynx1, ответственный за взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR.

4.3.1.6. Ws-Lynx1 уменьшает никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 MAP киназ в клетках линии PC12 и срезах полосатого тела

Для того чтобы исследовать влияние ws-Lynx1 на nAChR-опосредованную внутриклеточную сигнализацию, в качестве модельной системы мы использовали никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 MAP киназ в PC12 клетках, часто используемых в качестве модели нейрональных клеток, экспрессирующих различные подтипы nAChR². Преинкубация PC12 клеток с 0.1-10 мкМ ws-Lynx1 снижала никотин-индуцированное увеличение ERK фосфорилирования, достигая максимального эффекта при концентрации нейромодулятора 10 мкМ (снижение доли фосфорилированных ERK киназ на 53 %, $p < 0,001$, рис. 4.32А,Б). Эффект никотина отменялся преинкубацией с 1 и 10 мкМ неспецифического блокатора nAChR мекамиламина ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно) и снижался в результате преинкубации клеток с α -конотоксином AuIB, который селективно ингибирует $\alpha 3\beta 4$ -nAChR [288]. Однако, никакого эффекта не наблюдалось при преинкубации клеток ни с 10 мкМ DhbE, ни с 100 нМ MLA, которые являются селективными ингибиторами $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, соответственно, ни с α -конотоксинами PIA и MII, которые селективно ингибируют $\alpha 6$ - и $\alpha 3\beta 2$ -содержащие nAChR, соответственно [289,290] (Рис. 4.32В). При этом ПЦР в режиме реального времени на экстрактах из клеток PC12 показал наличие $\alpha 2-7$, $\alpha 9$ и $\beta 2-4$ субъединиц nAChR, хотя степень экспрессии разных субъединиц отличалась до 43 раз по сравнению с экспрессией $\alpha 3$ субъединицы (Рис. 4.32Г).

¹ Совместно с д.х.н. С.А. Козловым и к.б.н. С.Г. Кошелевым, Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН

² Совместно с проф. М. Томсенном, Университет Копенгагена.

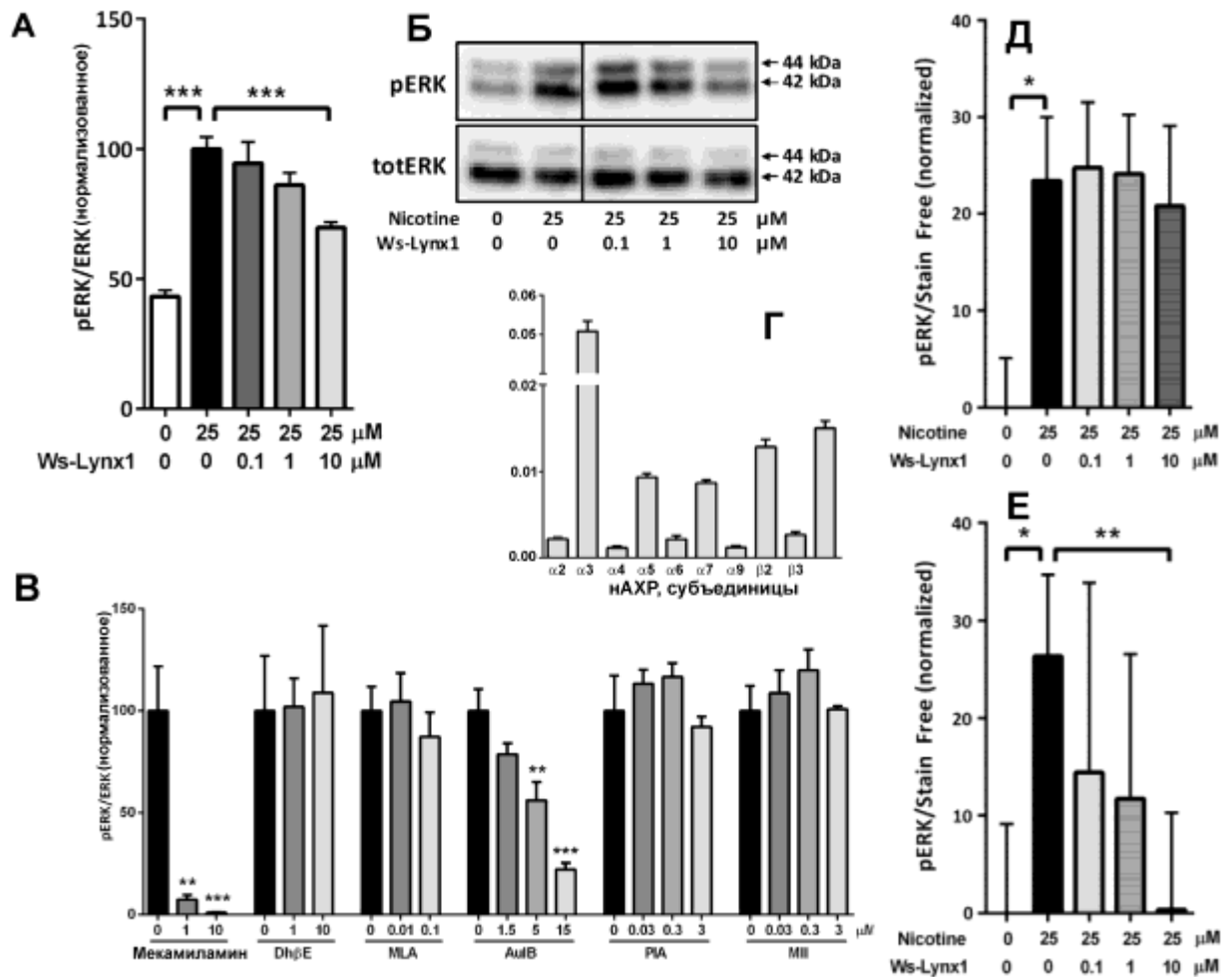


Рис. 4.32. Ws-Lynx1 ингибирует никотин-индуцированный сигналинг с участием nAChR в PC12 клетках. (А). Никотин увеличивает внутриклеточное фосфорилирование MAP ERK1/2 киназ (ERK) в PC12 клетках, и этот ответ уменьшается при прединкубации клеток с 10 мкМ ws-Lynx1. Анализировали отношение фосфорилированных ERK1/2 киназ (pERK) к общему количеству ERK1/2 киназ (totERK), нормализованное к значению, достигаемому при активации 25 мкМ никотином ($n=6$). (Б). Репрезентативный блот, данные по которому представлены на панели (А). (В). Прединкубация с мекамиламином ($n=4$) и с α -конотоксином AuIB ($n=4$), но не с DhbE ($n=7-8$), метилликаконитином (Methyllyscosonitine (MLA), $n=20$) или с α -конотоксинами PIA или MII ($n=4$) ингибировала фосфорилирование ERK в ответ на аппликацию 25 мкМ никотина. (Г). Уровень экспрессии мРНК разных субъединиц nAChR в PC12 клетках, нормализованный на уровень экспрессии GAPDH ($n=3-6$). Никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 не отменяется/отменяется в результате прединкубации срезов коры (Д) и полосатого тела (Е), соответственно с 10 мкМ ws-Lynx1 ($n=8$). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) и *** ($p < 0.001$) означают статистически значимые отличия данных от группы с 25 мкМ никотином (ANOVA и тест Даннета для множественного сравнения).

Таким образом, никотин-индуцированное фосфорилирование ERK киназ, видимо, не было связано с активацией $\alpha 7$ - или $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, - рецепторов, для которых методами электрофизиологии было показано взаимодействие с ws-Lynx1 (п.4.3.1.4). Значительное ингибирование никотин-индуцированного фосфорилирования ERK α -конотоксином AuIB указывает на то, что эффект никотина главным образом вызван активацией $\alpha 3\beta 4$ -nAChR,

что согласуется с предыдущей работой [291]. Это в свою очередь позволяет предположить, что еще одной мишенью действия ws-Lynx1 является $\alpha 3\beta 4$ -nAChR.

Микромолярные концентрации, необходимые для ингибирующего действия ws-Lynx1 на PC12 клетках, находится в полном соответствии с концентрацией белка, необходимой для ингибирования тока через $\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, экспрессированных в ооцитах *Xenopus* (п.3.1.4). Интересно, что активация сигнального пути, опосредованного MAP киназой, важна для формирования долговременной потенциации (ДВП) и памяти [292].

Кроме того, никотин значительно индуцировал фосфорилирование ERK в срезах лобной коры и полосатого тела крысы (22%, $p < 0,05$ и 13%, $p < 0,05$ увеличение по сравнению с контролем). Ws-Lynx1 при 0,1-10 мкМ не влиял на никотин-опосредованное увеличение ERK-фосфорилирования в срезах лобной коры, но дозозависимо снижал ERK-фосфорилирование в срезах полосатого тела, достигая значимости при 10 мкМ (снижение на 98%, $p < 0,01$, рис. 4.31E). Поскольку в лобной коре преимущественно экспрессируются nAChR $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$ подтипов, а в полосатом теле представлен более широкий спектр nAChR [293], это говорит о том, что мишенью действия ws-Lynx1 в полосатом теле могут быть nAChR других подтипов, не $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$.

4.3.1.7. Lynx1 экстрагирует различные субъединицы nAChR из мозга крысы и человека и конкурирует с амилоидным пептидом A β (1-42) за связывание с nAChR

Для того чтобы определить, может ли ws-Lynx1 связывать природные субъединицы nAChR, мы приготовили магнитные частицы с ковалентно-пришитыми на их поверхность молекулами ws-Lynx1, и проинкубировали эти частицы с гомогенатом височной доли коры головного мозга человека, а также с гомогенатами коры головного мозга, среднего мозга и обонятельных луковиц крысы¹. Анализ экстрактов, изолированных с помощью ws-Lynx1, показал, что нейромодулятор связывается с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ субъединицами nAChR (Рис. 4.33A). При этом, взаимодействия ws-Lynx1 с гомологичным серотониновым рецептором 5-HT₃ не наблюдалось. В качестве контроля использовали «пустые» частицы и было показано, что «пустые» частицы не взаимодействуют с субъединицами nAChR, указывая, таким образом, на специфичность взаимодействия ws-Lynx1/nAChR. Дополнительным контролем, подтвердившим специфичность использованных антител, был эксперимент, в котором не наблюдали экстракции и прокрашивания $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединиц из коры головного мозга мышей нокаутных по

¹ Совместно с проф. М. Томсенем, Университет Копенгагена, Дания.

соответствующим генам. Таким образом, с помощью аффинной очистки мы показали, что ws-Lynx1 в мозге человека и крысы может образовывать комплексы с nAChR, содержащими $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединицы. Возможно, Lynx1 может регулировать широкий спектр nAChR-зависимой сигнализации в мозге.

Патология болезни Альцгеймера (БА) характеризуется образованием бляшек и нейрофибриллярных клубков, содержащих агрегированный β -амилоидный пептид (A β) и гиперфосфорилированный Тау-белок [294]. Растворимые формы A β , особенно олигомерный пептид A β_{1-42} , считаются наиболее токсичными формами A β и связаны с когнитивными нарушениями, наблюдаемыми при БА [295,296]. A β_{1-42} в концентрации 200 нМ ингибирует работу $\alpha 7$ -nAChR – наиболее распространенного в головном мозге никотинового холинорецептора, а взаимодействие A β с этим рецептором при БА приводит к его интернализации [297]. Несмотря на то, что до сих пор еще до конца не ясно, как именно A β_{1-42} и nAChR взаимодействуют друг с другом [297,298], уже сейчас убедительно показано, что активация nAChR блокирует A β -опосредованную нейротоксичность *in vitro* [299–301]. Кроме того, показано, что ингибирование взаимодействия между A β_{1-42} и $\alpha 7$ -nAChR уменьшает накопление амилоидных бляшек у мышей после интрацеребровентрикулярного введения амилоидного пептида [302]. Скрещивание $\alpha 7$ -nAChR дефицитных мышей с мышами с гиперэкспрессией предшественника амилоидного белка (APP) приводило к увеличению производства A β и к дефициту памяти, а также к развитию невропатологии у APP- $\alpha 7$ нокаутных мышей [303,304]. В сочетании с наблюдением, что при БА наблюдается дегенерация холинергических нейронов и уменьшение экспрессии nAChR [305–307], приведенные выше данные позволяют предположить, что взаимодействие между nAChR и A β_{1-42} влияет на когнитивные функции и может быть вовлечено в патофизиологию болезни Альцгеймера.

Так как ws-Lynx1 модулирует работу человека $\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (п.4.3.1.4), мы предположили, что A β_{1-42} и ws-Lynx1 могут конкурировать за взаимодействие с nAChR. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали влияние 200 нМ A β_{1-42} на взаимодействие магнитных частиц с иммобилизованным ws-Lynx1 с nAChR из гомогената лобной коры головного мозга крысы. В соответствии с этой гипотезой, после прединкубации с 200 нМ A β_{1-42} при аффинной очистке с помощью магнитных частиц с иммобилизованным ws-Lynx1 значительно уменьшилось количество экстрагированных $\alpha 3$ (23%, $p < 0,05$), $\alpha 4$ (20%, $p < 0,05$), $\alpha 5$ (25%, $p < 0,05$) и $\alpha 7$ (15%, $p < 0,05$) субъединиц nAChR по сравнению с контрольными образцами, очищенными в отсутствие A β_{1-42} (Рис. 4.33А,В). При этом количество очищенных $\alpha 6$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединиц nAChR существенно не менялось в присутствии или в отсутствие A β_{1-42} . Это указывает на то, что ws-Lynx1 и A β_{1-42} могут

конкурировать за связывание с nAChR, содержащих субъединицы $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$, и их сайты связывания на этих рецепторах, возможно, перекрываются (при этом прямого взаимодействия ws-Lynx1 и $A\beta_{1-42}$ не было обнаружено). Следует отметить, что прединкубация с 200 нМ обратного пептида $A\beta_{42-1}$ не влияла на количество очищенных с помощью ws-Lynx1 субъединиц nAChR (Рис. 4.33Г).

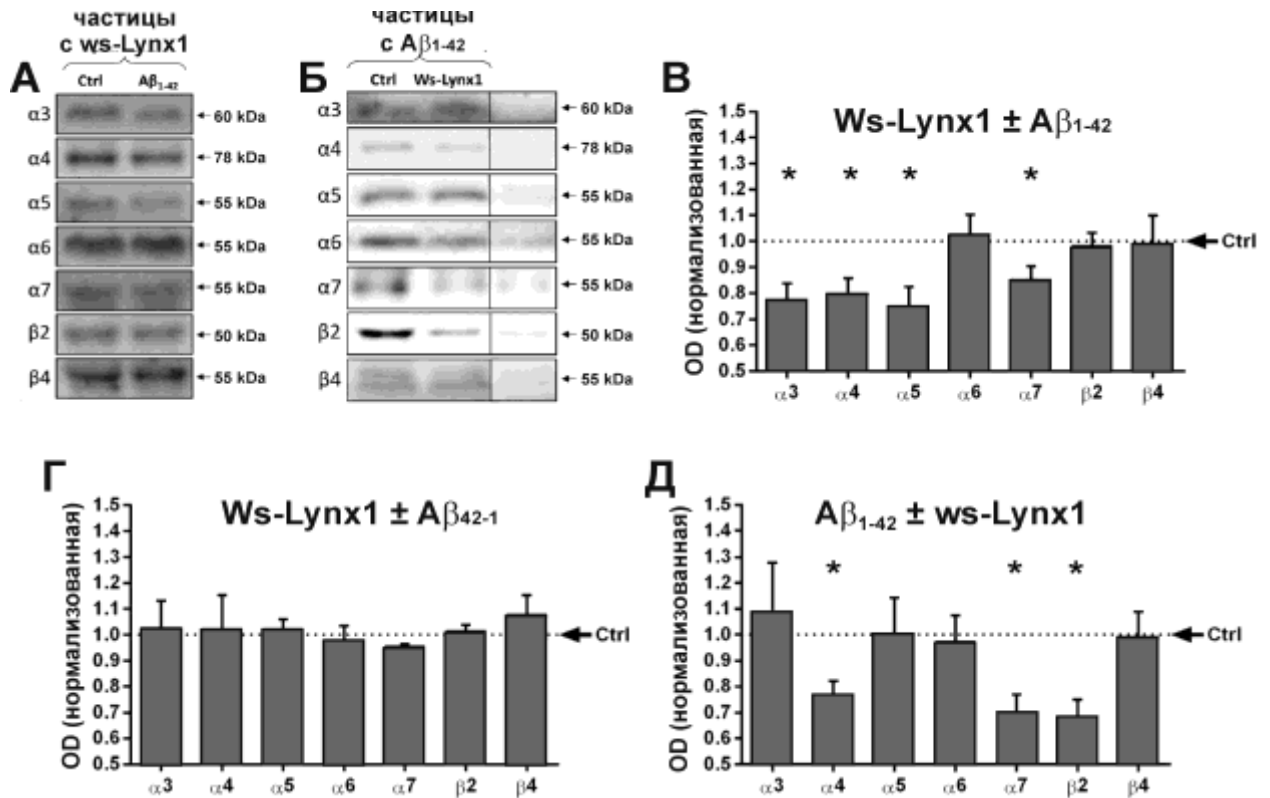


Рис. 4.33. Олигомерный $A\beta_{1-42}$ и ws-Lynx1 конкурируют за связывание с nAChR в коре головного мозга крысы. (А). Репрезентативный блот с анализом субъединиц nAChR, экстрагированных из коры с помощью магнитных частиц с иммобилизованным ws-Lynx1, в присутствии 200 нМ $A\beta_{1-42}$ или в его отсутствие (Ctrl). (Б). Репрезентативный блот с анализом субъединиц nAChR, экстрагированных из коры с помощью магнитных частиц с иммобилизованным $A\beta_{1-42}$, в присутствии 10 мкМ ws-Lynx1 или в его отсутствие (Ctrl). (В). Результаты денситометрического анализа полос, представленных на панели (А), с помощью измерения оптической плотности (OD) ($n = 5$ животных). (Г). Результаты анализа субъединиц nAChR, экстрагированных из коры с помощью магнитных частиц с иммобилизованным ws-Lynx1, в присутствии или отсутствии 200 нМ обратного пептида $A\beta_{42-1}$ с помощью измерения оптической плотности (OD) полос блота ($n = 3$ животных). (Д). Результаты денситометрического анализа полос, представленных на панели (Б), с помощью измерения оптической плотности (OD) ($n = 4$ животных). Величины нормализованы на контроль в каждой точке. * $p < 0.05$ означает статистически значимое отличие, наблюдаемое при аффинной очистке в присутствии или отсутствии $A\beta_{1-42}$ (В) или ws-Lynx1 (Д) согласно двухстороннему t-критерию Стьюдента.

Частицы с иммобилизованным амилоидным пептидом $A\beta_{1-42}$ изолировали из гомогената лобной коры головного мозга крысы $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединицы nAChR (Рис. 4.32Б). Это находится в согласии с предыдущими результатами, демонстрирующими, что $A\beta_{1-42}$ взаимодействует с $\alpha 7$ -, $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ - типами nAChR [308–312]. Однако, прединкубация гомогената мозга с 10 мкМ ws-Lynx1 значительно снизила количество $\alpha 4$ (23%, $p < 0,05$), $\alpha 7$ (30%, $p < 0,05$) и $\beta 2$ (32%, $p < 0,05$) субъединиц

nAChR, выделенных с помощью олигомерного $A\beta_{1-42}$ (Рис. 4.33Б,Д). Разница между относительной конкуренцией ws-Lynx1 и $A\beta_{1-42}$ (Рис. 4.33В,Д), вероятно, отражает разницу в аффинности к соответствующим подтипам nAChR.

4.3.1.8. Ws-Lynx1 предотвращает $A\beta_{1-42}$ -индуцированную цитотоксичность *in vitro*

Ранее было высказано предположение, что физиологический уровень $A\beta_{1-42}$ обеспечивает передачу сигнала через nAChR, но этот сигнал блокируется или действие $A\beta_{1-42}$ становится токсичным при избытке экспрессии амилоидного пептида, наблюдаемом при болезни Альцгеймера [298]. Поскольку ws-Lynx1 и $A\beta_{1-42}$ конкурируют за связывание с nAChR (п.4.3.1.8), мы исследовали на первичной культуре нейронов коры мыши, влияние ws-Lynx1 на $A\beta_{1-42}$ -индуцированную цитотоксичность¹. Инкубация нейронов с 20 мкМ олигомерного $A\beta_{1-42}$ в течение 24 часов значительно увеличивала количество лактат-дегидрогеназы в среде культивирования нейронов, что свидетельствовало о нарушении целостности нейронов (Рис. 4.34). Этот эффект $A\beta_{1-42}$ значительно снижался после предварительной инкубации нейронов в течение двух часов с ws-Lynx1 (Рис. 4.34). Таким образом, возможно, эндогенный Lynx1 способен уменьшать вредное воздействие избытка $A\beta_{1-42}$, наблюдаемого при БА, за счет снижения чувствительности nAChR к амилоидному пептиду.

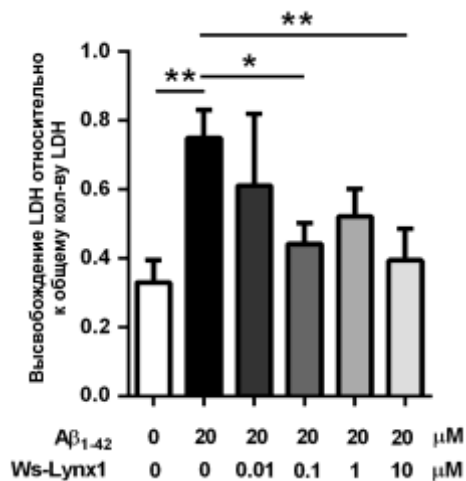


Рис. 4.34. Ws-Lynx1 предотвращает $A\beta_{1-42}$ -индуцированную цитотоксичность *in vitro*. Нейроны коры мыши инкубировали с ws-Lynx1 (0.01-10 мкМ) в течение 2х часов. Затем к культуре нейронов добавляли 20 мкМ олигомерного $A\beta_{1-42}$ и инкубировали еще 24 часа. Высвобождение лактат-дегидрогеназы (LDH) в среду культивирования нейронов было индикатором цитотоксичности. Приведенные величины определялись как доля общего внутриклеточного содержания LDH, n = 6-12. * (p < 0.05) и ** (p < 0.01) означают статистически значимое отличие от группы с 20 мкМ $A\beta_{1-42}$ и 0 мкМ ws-Lynx1 (согласно критерию Краскела-Уоллиса и тесту Данна для множественного сравнения).

4.3.1.9. $A\beta_{1-42}$ снижает экспрессию Lynx1 в нейронах коры

В лобной коре трансгенных 3xTg-AD мышей, у которых наблюдается как повышенный уровень экспрессии $A\beta$, так и Тау гиперфосфорилирование [313], мы обнаружили пониженный уровень экспрессии Lynx1 по сравнению с немутантными

¹ Совместно с проф. М. Томсенем, Университет Копенгагена, Дания.

мышами такого же возраста¹ (Рис. 4.35). При этом ранее было показано, что уровень другого Lуб/uPAR белка, PSCA (антиген простаты стволовых клеток), наоборот повышен в лобной коре пациентов с болезнью Альцгеймера [192]. Вполне возможно, что пониженная концентрация Lупх1 в мозге модельных животных способствует взаимодействию Aβ₁₋₄₂ с nAChR. Следует отметить, что у мышей, нокаутных по гену Lупх1, наблюдалась nAChR-зависимая возрастная дегенерация нейронов, на основании чего было сделано предположение о нейропротекторных свойствах Lупх1 за счет снижения избыточной активации nAChR [175,177]. Таким образом, было выдвинуто предположение, что одновременное сочетание избытка Aβ₁₋₄₂ и снижения уровня Lупх1 может увеличивать Aβ₁₋₄₂-опосредованную токсичность в нейронах. Ингибирование взаимодействия Aβ₁₋₄₂ с nAChR, например, с помощью Lупх1, вероятно, может способствовать снижению когнитивного дефицита, наблюдаемого при болезни Альцгеймера. С другой стороны, возможно, именно накопление Aβ₁₋₄₂ приводит к снижению уровня этого нейромодулятора в мозге и влечет за собой нарушение баланса Aβ₁₋₄₂/Lупх1, вызывая нарушение работы α7-nAChR.

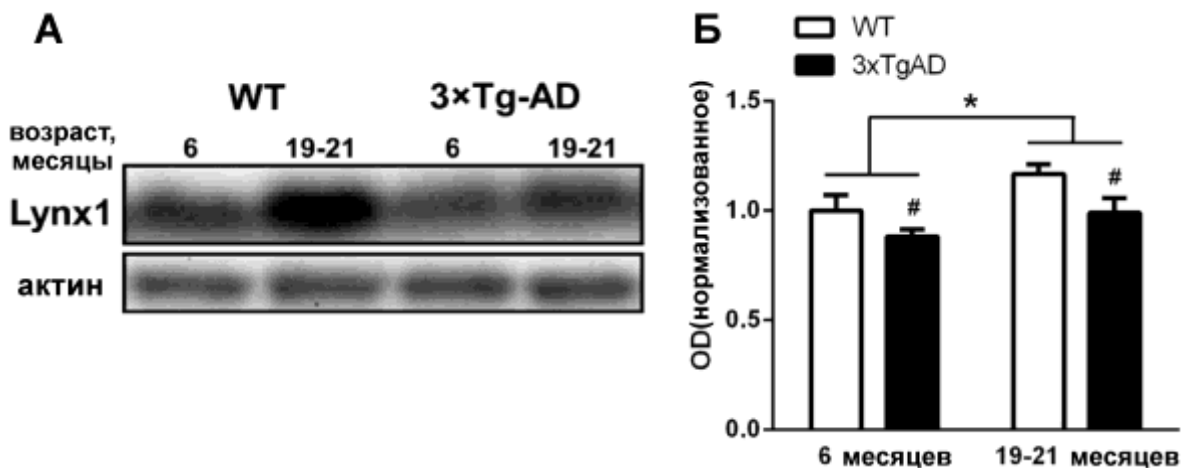


Рис. 4.35. 3xTg-AD трансгенные мыши, имеющие β-амилоидоз, сопровождающийся гиперфосфорилированием белка Тау, демонстрируют пониженный уровень экспрессии Lупх1 в лобной коре. Уровень экспрессии Lупх1 анализировали в лобной коре головного мозга. Мыши были декапитированы в возрасте 6 и 19/21 месяцев. (А). Репрезентативный Вестерн-блот. (Б). Расчет уровня Lупх1, нормализованный на уровень актина. # и * ($p < 0.05$) означают статистически значимое отличие в группах по генотипу и возрасту, соответственно, согласно двухфакторному ANOVA анализу ($n = 7-8$ животных).

Чтобы проверить гипотезу о влиянии Aβ₁₋₄₂ на экспрессию эндогенного Lупх1, первичную культуру нейронов коры и гиппокампа инкубировали с 1 μM олигомерного Aβ₁₋₄₂ и анализировали уровень мРНК *Lупх1*. В нейронах коры было замечено значительное снижение уровня мРНК *Lупх1* (до $78,4 \pm 4,4$ % от контрольного уровня). Это

¹ Совместно с проф. М. Томсенем, Университет Копенгагена, Дания.

согласуется с данными, представленными на Рис. 4.35. Инкубация с 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ приводила к еще большему снижению экспрессии *Lynx1* в нейронах коры (до $65,8 \pm 4,9$ % от контрольного уровня).

Ранее было показано, что связывание $\text{A}\beta_{1-42}$ с $\alpha 7$ -nAChR активирует c-Jun N-концевую киназу JNK [65], которая играет ключевую роль в регуляции генной экспрессии и других жизненно-важных процессов [314]. Для того, чтобы выяснить, не является ли падение уровня экспрессии *Lynx1* в нейронах коры, индуцированное олигомерным $\text{A}\beta_{1-42}$, результатом активации JNK, нейроны коры инкубировали с $\text{A}\beta_{1-42}$ и SP600125, – селективным ингибитором JNK-1, -2 и -3. Одновременная инкубация нейронов с амилоидным пептидом и SP600125 приводила к отмене ингибирующего эффекта $\text{A}\beta_{1-42}$, что подтвердило связь снижения экспрессии *Lynx1* с JNK. Одновременная инкубация нейронов с ws-*Lynx1* и $\text{A}\beta_{1-42}$ также приводила к остановлению уровня *Lynx1*.

Для дополнительного подтверждения связи JNK с регуляцией экспрессии *Lynx1* экспрессия JNK-1 и JNK-2 в нейронах была заблокирована с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA). В этом случае падения экспрессии *Lynx1* в присутствии $\text{A}\beta_{1-42}$ не наблюдалось. Нокдаун JNK-1 и JNK-2 в отсутствие $\text{A}\beta_{1-42}$ также не влиял на экспрессию *Lynx1*, что подтверждает связь амилоидного пептида, активации JNK и снижения транскрипции эндогенного нейромодулятора.

Анализ промотора гена человека *LYNX1* (chr8:143841246 - chr8:143879640) и промотора гена мыши *Lynx1* (chr15:74573409 - chr15:74603409) обнаружил два возможных сайта связывания транскрипционных факторов c-Jun и c-Fos, формирующих транскрипционный комплекс AP-1. Известно, что активация JNK с помощью $\text{A}\beta_{1-42}$ приводит к одновременным активации c-Jun [65] и снижению экспрессии c-Fos [314]. Вероятно, дисбаланс между экспрессией c-Jun и c-Fos, возникающий под влиянием $\text{A}\beta_{1-42}$, является причиной нарушения образования транскрипционного комплекса AP-1, и как результат происходит снижение экспрессии *Lynx1*. Восстановление уровня *Lynx1*, наблюдаемое при одновременной инкубации нейронов с ws-*Lynx1* и $\text{A}\beta_{1-42}$, полностью согласуется с этой гипотезой. Возможно, ws-*Lynx1*, конкурирует с $\text{A}\beta_{1-42}$ за связывание с $\alpha 7$ -nAChR (п.4.3.1.8), активирует $\alpha 7$ -nAChR, в результате чего происходит повышение экспрессии c-Fos и восстановление экспрессии *Lynx1*.

4.3.1.10. Ws-*Lynx1* предотвращает нарушение долговременной потенции, вызванное $\text{A}\beta_{1-42}$

Известно, что $\text{A}\beta$ ингибирует долговременную потенцию (ДВП) [315], лежащую в основе памяти и обучения [55]. Ранее, было обнаружено, что нарушение ДВП,

наблюдаемое при инкубации срезов гиппокампа крысы с олигомерным $A\beta_{1-42}$, связано с активацией JNK [316]. Мы исследовали влияние 200 нМ $A\beta_{1-42}$ на ДВП на переживающих срезах гиппокампа мыши в присутствии и в отсутствие 10 мкМ ws-Lynx1¹. В результате инкубации срезов в течение 1 часа в растворе, содержащем $A\beta_{1-42}$, уже на первых минутах после индукции ДВП наблюдалось значительное снижение посттетанического фокального возбуждающего постсинаптического потенциала (фВПСП). Значение усредненного за первые 10 минут записи наклона фВПСП снижалось почти в полтора раза по сравнению с контрольным значением усредненного наклона фВПСП (Рис. 4.36Б). При этом снижение наклона фВПСП под действием $A\beta_{1-42}$, имеющее место в течение всего времени после индукции ДВП, приближалось к значениям непотенцированных фВПСП (Рис. 4.36Б).

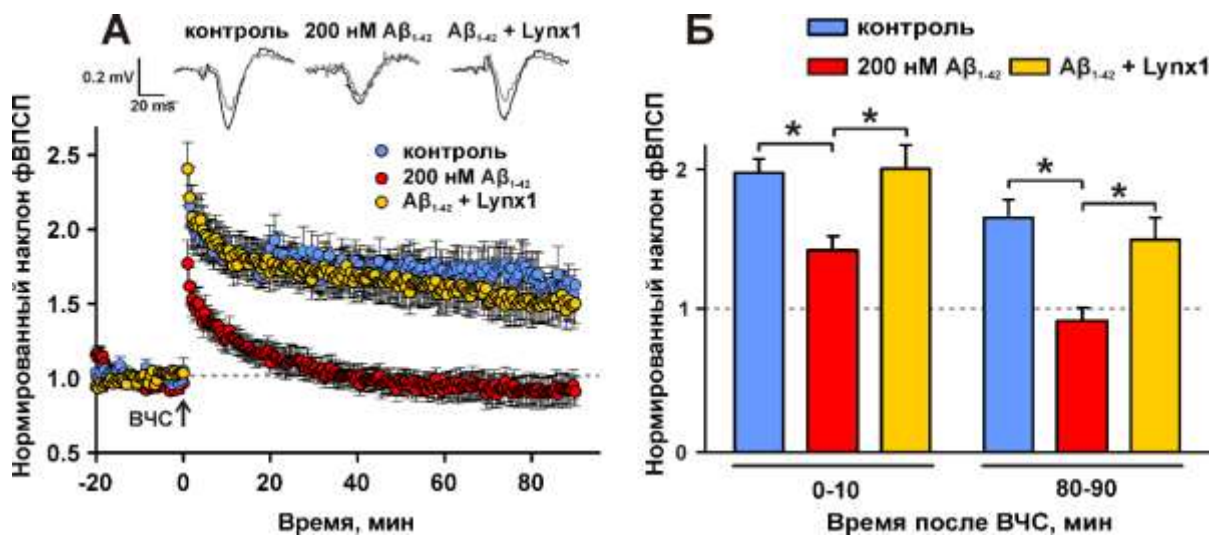


Рис. 4.36. ws-Lynx1 отменяет нарушение ДВП, вызванное $A\beta_{1-42}$ на в срезах гиппокампа мыши. (А). Изменение наклона фВПСП, регистрируемых на срезах гиппокампа контрольных животных и перфузированных раствором без $A\beta_{1-42}$ ($n=8$), перфузированных раствором с 200 нМ $A\beta_{1-42}$ ($n=6$) и перфузированных раствором с 200 нМ $A\beta_{1-42}$ + 2 мкМ ws-Lynx1 ($n=5$). (Б). Усредненные значения наклона фВПСП, зарегистрированные в первые и последние 10 мин регистрации после ВЧС. * ($p < 0.05$) означает статистически значимое отличие групп (ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения).

Инкубация срезов гиппокампа в среде, одновременно содержащей $A\beta_{1-42}$ и ws-Lynx1, восстанавливала уровень ДВП практически до контрольного уровня (Рис. 4.36). Значение усредненного наклона фВПСП в этом случае статистически не отличалось от значения усредненного наклона фВПСП в контроле в течение всего времени регистрации после высокочастотной стимуляции (ВЧС), таким образом, ws-Lynx1 полностью нивелировал ингибирующее действие $A\beta_{1-42}$ и восстанавливал ДВП (Рис. 4.36Б).

¹ Совместно с чл.-кор. П.М. Балабаном и к.б.н. Н.А.Васильевой, ИВНД РАН.

4.3.2. Влияние ws-Lynx1 на когнитивные процессы *in vivo*

В рамках представленной диссертационной работы было показано, что ws-Lynx1: (1) положительно модулирует $\alpha 7$ -nAChR, экспрессируемые в ооцитах *Xenopus laevis*, в диапазоне микромолярных концентраций (п.4.3.1.4); (2) конкурирует с олигомерным $A\beta_{1-42}$ за связывание с различными субъединицами nAChR (п.4.ж3.1.8); (3) устраняет цитотоксический эффект $A\beta_{1-42}$ в первичной культуре нейронов коры (п.4.3.1.9); (4) отменяет снижение экспрессии эндогенного *Lynx1* в первичной культуре нейронов коры, вызванное $A\beta_{1-42}$ (п.4.3.1.11); (5) восстанавливает снижение ДВП, наблюдаемое при инкубации переживающих срезов гиппокампа с $A\beta_{1-42}$ (п.4.3.1.12). На основании этих данных мы предположили, что ws-Lynx1 может быть использован для компенсации нарушений когнитивных функций и для предотвращения нейротоксических эффектов $A\beta$ *in vivo*.

4.3.2.1. Ws-Lynx1 способен проникать через гематоэнцефалический барьер

Прежде чем исследовать влияние ws-Lynx1 на когнитивные процессы *in vivo*, было протестировано два подхода к доставке пептида в мозг с использованием флуоресцентно меченного CF647/ws-Lynx1: внутривентрикулярная инъекция через имплантированную канюлю и интраназальная аппликация. В обоих случаях распределение флуоресценции в мозге было неравномерным. Накопление CF647/ws-Lynx1 наблюдалось в коре, гиппокампе и мозжечке, в то время как флуоресценция в миндалине и стриатуме была менее интенсивной и сходной с фоновыми уровнями (Рис. 4.37). CF647/ws-Lynx1 накапливался во всех слоях коры и был распространен по всему гиппокампу, включая зубчатую фасцию (DG). Он также был обнаружен в молекулярном слое, в гранулярных клетках и клетках Пуркинье мозжечка; примечательно, что гораздо менее интенсивная флуоресценция наблюдалась в белом веществе мозжечка (Рис. 4.37). Вестерн-блот также подтвердил значительное увеличение содержания *Lynx1* в экстрактах коры после интраназального введения. Таким образом, ws-Lynx1 способен преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) при интраназальном введении, и этот неинвазивный способ доставки был выбран для дальнейших исследований как наименее травматичный.

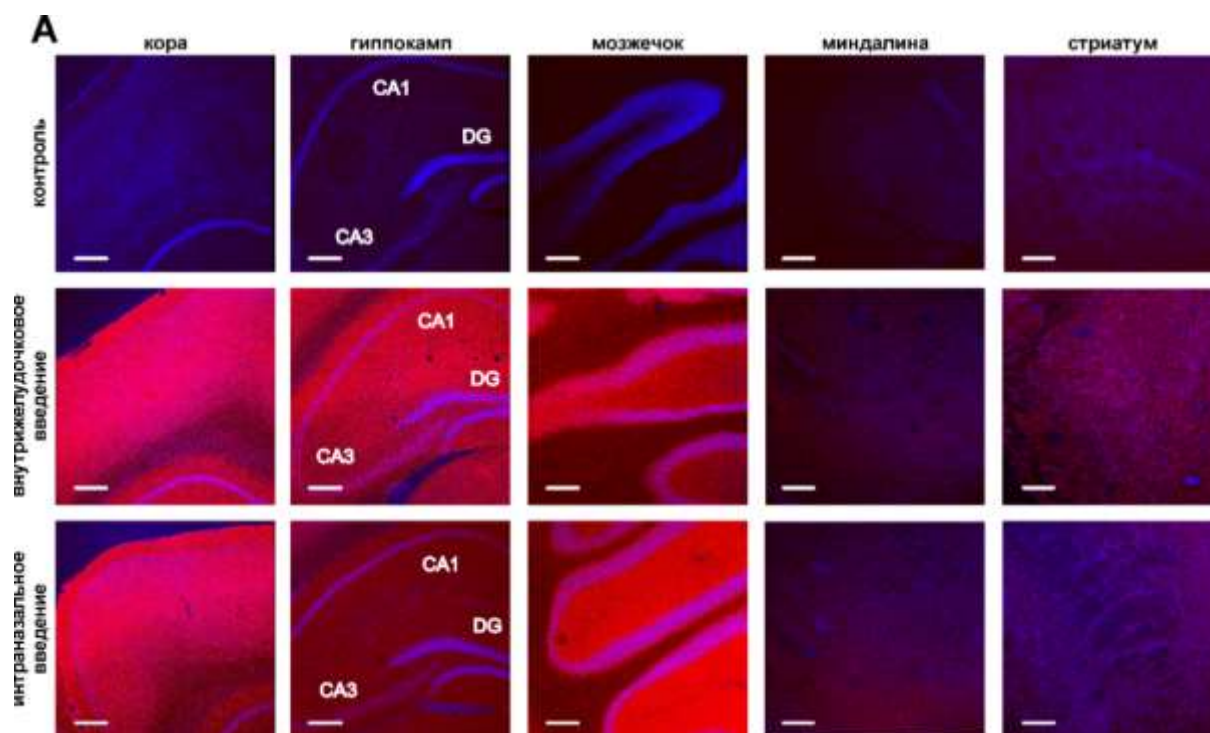


Рис. 4.37. Ws-Lynx1 проникает через ГЭБ при интраназальном введении. Изображения срезов мозга мыши после интраназального и внутрижелудочкового введения CF647-Lynx1 получены с помощью конфокальной микроскопии. Флуоресценция CF647-Lynx1 показана красным, клеточные ядра окрашены синим с помощью Hoeschst 33342. Шкала 125 мкм.

4.3.2.2. Ws-Lynx1 компенсирует нарушение моторного обучения, вызванное MLA

Для моделирования когнитивных нарушений, опосредованных утратой функции nAChR, мы использовали два подхода¹: (1) регулярное введение модельным животным дикого типа метилликаконитина (MLA) - конкурентного ингибитора $\alpha 7$ -nAChR, хорошо известного своими амнестическими свойствами [58]; и (2) исследование 2хTg-AD трансгенных мышей, экспрессирующих химерный белок-предшественник амилоида мыши/человека (APP) и мутантный пресенилин-1 человека, и являющихся общепризнанной моделью БА (см. материалы и методы).

В первой серии экспериментов мышей C57BL/6 разделили на четыре группы: «контроль», получавшую интраназально физ.раствор; «ws-Lynx1», получавшую интраназально ws-Lynx1; «MLA», получавшую внутрибрюшинно MLA; и «ws-Lynx1+MLA», получавшую ws-Lynx1 и MLA (Рис. 4.38А). Обработку мышей ws-Lynx1 и MLA начинали за девять и один день до поведенческих тестов, соответственно, и продолжали в течение всех поведенческих экспериментов. Для оценки двигательной активности, исследовательской активности и тревожности были использованы тесты «приподнятый крестообразный лабиринт» (КПЛ) и «открытое поле» (ОП). Эти тесты

¹ Совместно с к.б.н. А.А. Андриевским, к.б.н. А.С. Поповой, Е.А. Лагеревой, ИМБП РАН.

выявили лишь незначительные изменения между группами в параметрах, чувствительных к двигательной активности, исследовательскому поведению, вниманию и/или тревоге, вызванной новизной (общее пройденное расстояние, частота вставания и продолжительность чистки).

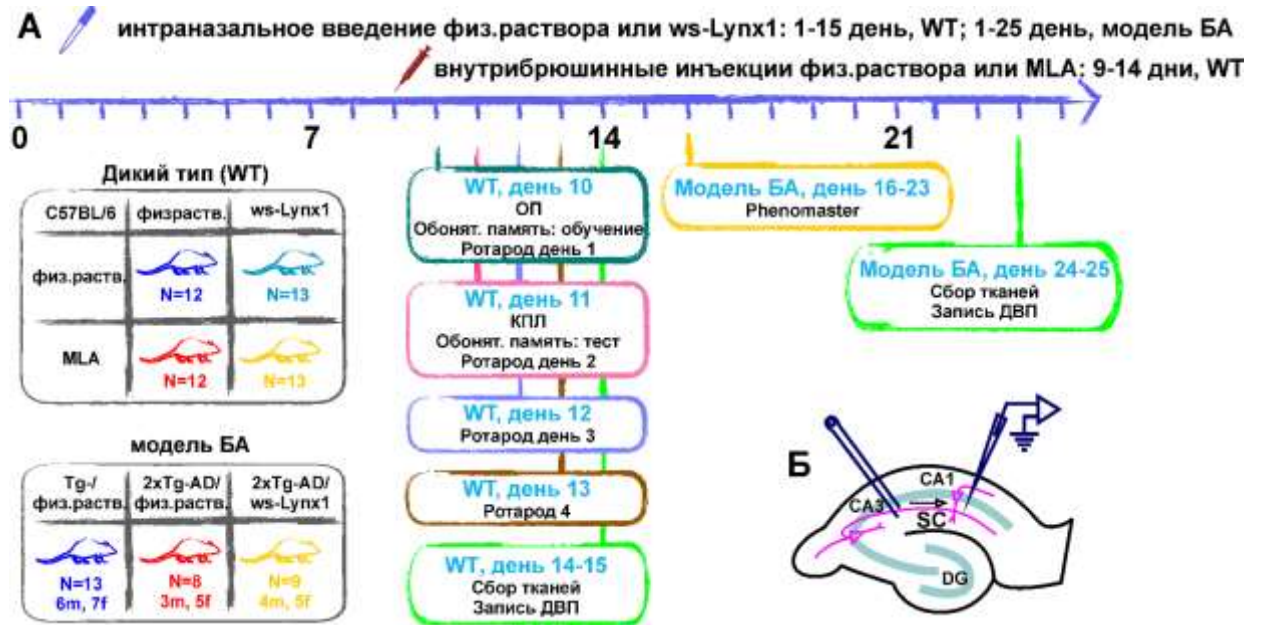


Рис. 4.38. Схемы введения препарата, батареи поведенческих и электрофизиологических экспериментов. (А). Мыши C57BL/6 были разделены на четыре группы и получали интраназально физ.раствор или ws-Lynx1 с 1 по 14-15 день и внутрибрюшинно физ.раствор или MLA с 9 по 14-15 день (мыши WT). Мыши 2xTg-AD получали интраназально физ.раствор или ws-Lynx1 с 1 по 24-25 день, а не-трансгенные одноплетные мыши B6C3(Tg-) получали интраназально физ.раствор с 1 по 24-25 день (модель БА). На рисунке показан порядок проведения поведенческих экспериментов для обеих линий мышей. (Б). Схема размещения электродов при записи ДВП: биполярный стимулирующий электрод помещали в область *str. radiatum* CA3 гиппокампа, регистрирующий электрод располагали в *str. radiatum* CA1 гиппокампа. SC – коллатерали Шаффера. DG – зубчатая фасция, КПЛ – крестообразный приподнятый лабиринт, ОП – открытое поле.

Ранее сообщалось, что активация nAChR никотином улучшает моторное обучение мышей, измеренное в тесте ротарод [175]. В данной работе был поставлен вопрос, может ли ws-Lynx1 влиять на этот процесс (Рис. 4.39А,Б). Мыши, получавшие физ.раствор (контрольная группа) или ws-Lynx1, показывали значительное улучшение результатов в тесте Ротарод на второй день (Рис. 4.39А). Результаты животных, получавших MLA, также улучшались при повторном проведении теста, но скорость моторного обучения была намного медленнее (Рис. 4.39А). В целом, мыши, получавшие MLA, показывали в данном тесте результаты заметно хуже, чем мыши, получавшие физ.раствор или ws-Lynx1 (Рис. 4.39А,Б). Таким образом, введение MLA нарушало процесс моторного обучения у мышей. В то же время совместное введение ws-Lynx1 и MLA приводило к значительному улучшению процесса моторного обучения, в результате чего результаты данного теста

были схожи с результатами, наблюдаемыми у мышей, получавших физ.раствор или ws-Lynx1 (Рис. 4.39А,Б).

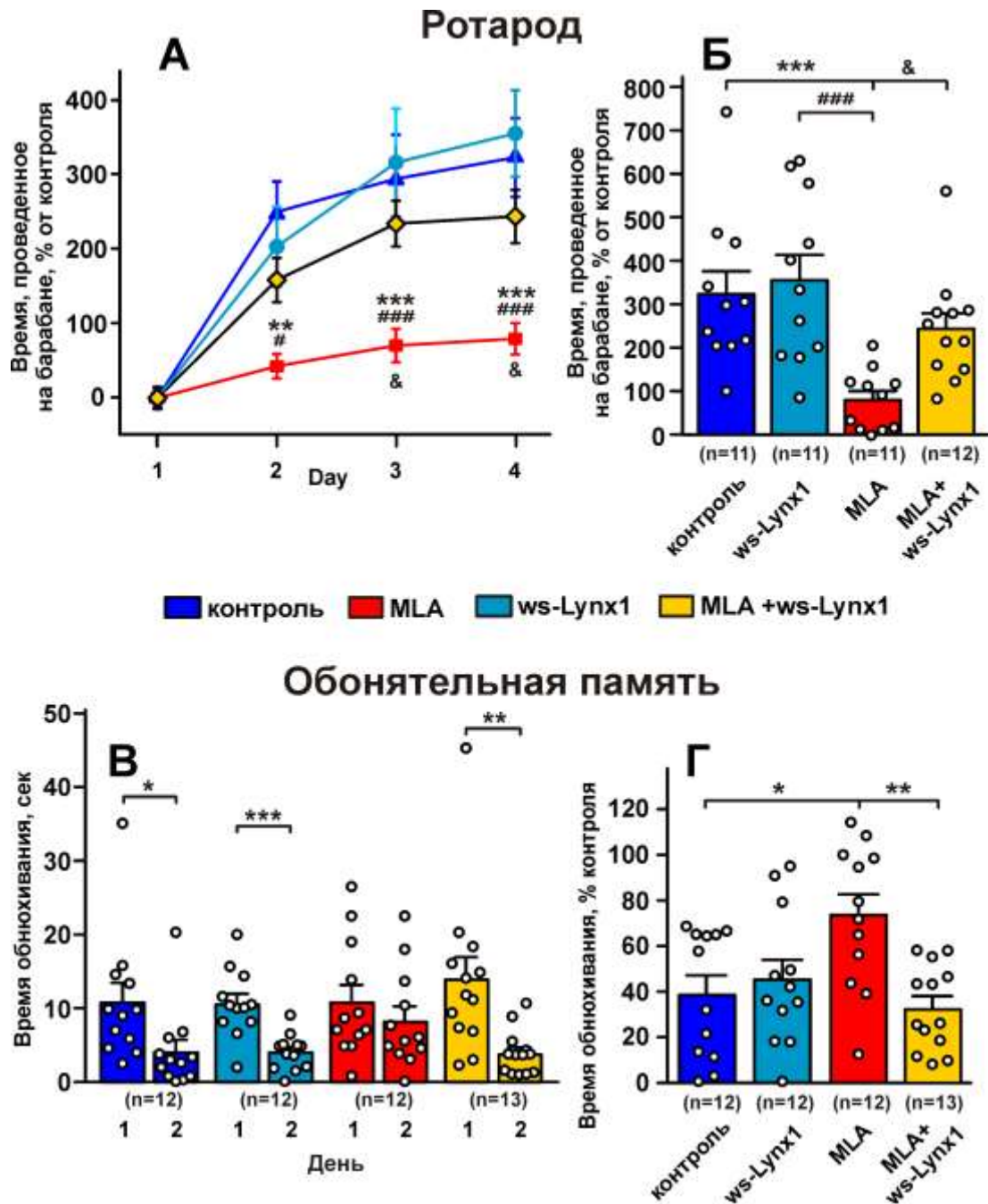


Рис. 4.39. Поведенческие тесты показывают способность ws-Lynx1 восстанавливать когнитивные нарушения. (А). Динамика обучения мыши в тесте Ротарод в течение 4 дней подряд в процентах от базовых значений в первый день. (Б). Изменения в результатах теста Ротарод на четвертый день. (В,Г). Тест на обонятельную память. (В). Общая продолжительность обнюхивания бумаги, пропитанной мочой незнакомого однополого животного в контрольном (день 1) и тестовом (день 2) эксперименте. (Г). Время обнюхивания в тестовом испытании, выраженное в процентах от контрольного значения. Данные представлены в виде среднего \pm с.о. */& ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), ***/### ($p < 0,001$) указывают на статистически значимое отличие групп согласно одно- или двухфакторному ANOVA анализу и тесту Тьюки для множественного сравнения или двустороннему t-критерию Стьюдента для связанных выборок (панель В).

4.3.2.3. Ws-Lynx1 компенсирует вызванное MLA нарушение обонятельной памяти

Согласно литературным данным, модуляция активности $\alpha 7$ -nAChR может влиять на обонятельную рабочую память [317]. Чтобы изучить влияние ws-Lynx1 и MLA на обонятельную рабочую память, мы использовали тест, в котором мышам предъявляли незнакомый запах во время обучающей сессии, и память об этом запахе была проверена спустя 24 часа во время тестовой сессии. В ходе обучения мыши из всех групп проводили примерно одинаковое время, нюхая пропитанную запахом бумагу (Рис. 4.38Д). Мыши, получавшие физ.раствор и ws-Lynx1, тратили меньше времени на обнюхивание запаха во время тестовой сессии по сравнению с обучающей сессией. Чтобы учесть выраженную межиндивидуальную изменчивость, время обнюхивания во второй день выражалось в процентах от времени обнюхивания в первый день (Рис. 4.39Г). Существенной разницы между контрольной группой и мышами, получавшими ws-Lynx1, не наблюдалось (изменение времени обнюхивания на 40-45%, Рис. 4.39Г). Напротив, животные, получавшие MLA, тратили примерно вдвое больше времени, нюхая знакомый запах (~74%), что свидетельствует об ухудшении обонятельной памяти по сравнению с контрольной группой (Рис. 4.39Г). Совместное применение MLA с ws-Lynx1 восстанавливало время обнюхивания на второй день до контрольного уровня, что указывает на компенсацию обонятельной памяти (Рис. 4.39В,Г).

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

Активность Lynx1 в отношении холинергических рецепторов ранее была изучена только в гетерологических системах [134,172]. Ранее мы продемонстрировали, что 1 мкМ ws-Lynx1 в присутствии ACh положительно модулирует $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*, тогда как при более высокой концентрации (10 мкМ) ws-Lynx1 ингибирует рецепторы $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 4\beta 2$ (п.4.3.1.4). Чтобы исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе прокогнитивной функции ws-Lynx1, активность рекомбинантного нейромодулятора была протестирована на природных nAChR в срезах коры головного мозга крысы¹. Чтобы исключить влияние эндогенного Lynx1, который может маскировать эффекты рекомбинантного ws-Lynx1, мы выбрали интернейроны 1-го слоя первичной зрительной коры, где Lynx1 не экспрессируется согласно литературным

¹ Совместно с чл.-кор. П.М. Балабаном и к.б.н. Н.А. Васильевой, ИВНД РАН.

данным [173]. При этом, эти интернейроны экспрессируют как $\alpha 7$ -, так и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR [318].

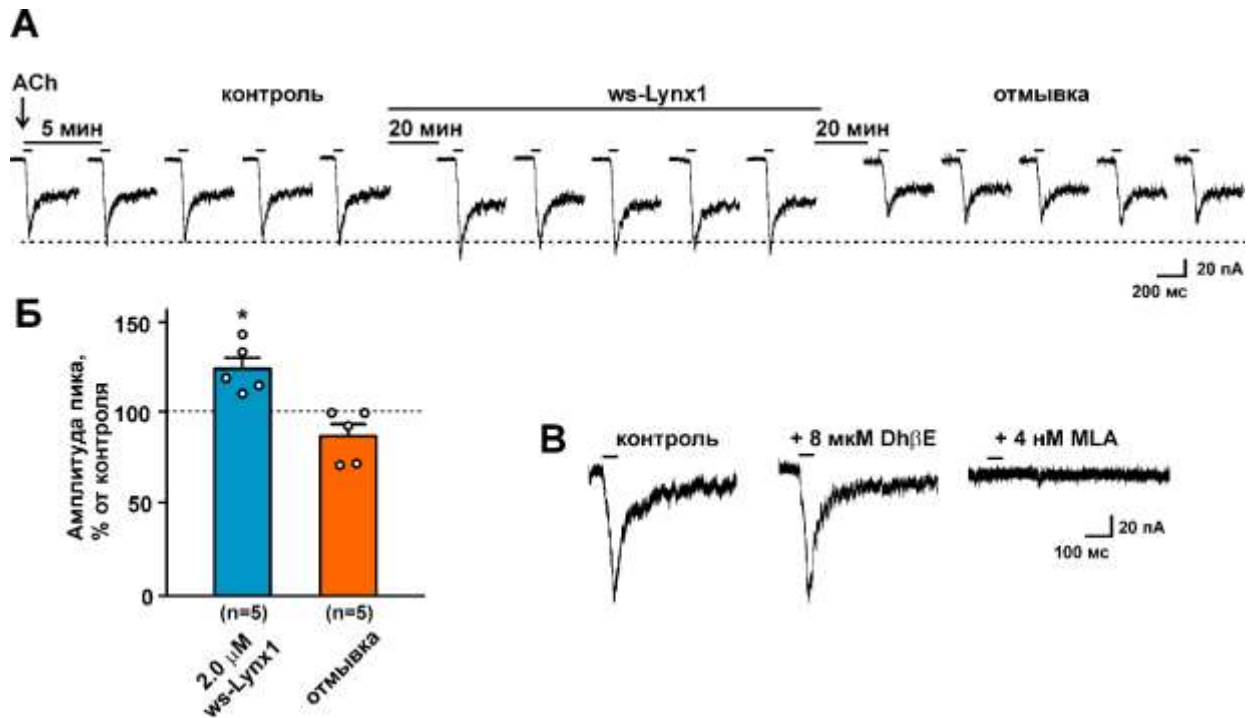


Рис. 4.40. Ws-Lynx1 увеличивает вызванный ACh ток в $\alpha 7$ -nAChR в срезах коры крысы. (А). Репрезентативные ответы на 50 мс импульсы 1 мМ ACh (показаны черточками над кривыми), записанные в отсутствие и в присутствии ws-Lynx1 в одном срезе коры. Схема эксперимента приведена выше. Средняя пиковая амплитуда тока в контрольной части эксперимента показана пунктирной линией. (Б). Амплитуда тока, вызванного ACh, в присутствии 2 мкМ ws-Lynx1 усреднялась по 5 различным срезам, взятым у 5 крыс. Данные нормализованы к средней пиковой амплитуде тока, зарегистрированной без ws-Lynx1 (100%, пунктирная линия) и представлены как среднее значение \pm с.о. Соответствующее значение при отмывке с помощью среды, не содержащей ws-Lynx-1, также показано на рисунке. Данные, обозначенные * ($p = 0,016$), значительно отличаются от контроля (100%) согласно двухстороннему t-критерию Стьюдента для одной выборки. (В). Репрезентативные ответы на импульсы 1 мМ ACh (показаны черточками над кривыми), зарегистрированные без ингибиторов (контроль) и в присутствии 8 мкМ Dh β E или 4 нМ MLA.

Апликация 1 мМ ACh вызвала токи в интернейронах срезов первичной зрительной коры (Рис. 4.40). Использование специфических ингибиторов 8 мкМ Dh β E ($IC_{50} \sim 0,4$ мкМ для $\alpha 4\beta 2$ -nAChR) и 4 нМ MLA ($IC_{50} \sim 1$ нМ для $\alpha 7$ -nAChR) выявило, что эти токи связаны с $\alpha 7$ -nAChR, но не с $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (Рис. 4.40В). Короткая (20 мин) инкубация срезов в среде, содержащей 0,2 мкМ ws-Lynx1, не влияла на амплитуду ответа $\alpha 7$ -nAChR на ACh, тогда как 2 мкМ ws-Lynx1 значительно увеличивало амплитуду до 124% от контроля (Рис. 4.40АБ). Отмывка срезов средой без ws-Lynx1 в течение 20 мин возвращала амплитуду токов, вызванных ACh, к контрольному уровню, что свидетельствует об обратимом связывании ws-Lynx1 с $\alpha 7$ -nAChR.

4.3.2.5. Ws-Lynx1 усиливает долговременную потенцию и предотвращает блокаду ДВП, вызванную MLA

Для исследования возможного влияния ws-Lynx1 на синаптическую пластичность *in* были проведены эксперименты по изучению долговременной потенции (ДВП) в переживающих срезах гиппокампа мышей C57BL/6¹ (Рис. 4.41А). После инкубации срезов гиппокампа в среде, содержащей 2 мкМ ws-Lynx1 в течение 1 ч, срезы переносили в чистую среду для измерений. Инкубация с ws-Lynx1 значительно усиливала ДВП (увеличение наклона фВПСП) в течение первых 10 мин после ВЧС по сравнению с контрольной группой (рис. 4.41А,Б). Примечательно, что отношение парной фасилитации (PPF) - параметр, связанный с вероятностью высвобождения нейромедиатора, после инкубации срезов головного мозга с ws-Lynx1 был значительно увеличен при интервале между импульсами 30 мс (Рис. 4.41В).

Записи полевых потенциалов в срезах гиппокампа мышей C57BL/6, которые получали ws-Lynx1 в течение 14-15 дней, также выявили значительное усиление ДВП в течение первых 10 минут после ВЧС (Рис. 4.41Г,Е). Регулярное введение MLA в течение 6 дней значительно ингибировало ДВП в течение всех 90 минут записи по сравнению с мышами из контрольной группы, получавшими физ.раствор (Рис. 4.40Д,Е). Степень блокады ДВП с помощью MLA была более выраженной по сравнению с уровнем, наблюдаемыми при введении ws-Lynx1. Совместное введение MLA с ws-Lynx1 восстанавливало ДВП и увеличивало наклон фВПСП немного выше уровня, наблюдаемого для контрольных животных (Рис. 4.41Д,Е).

PPF было значительно увеличено у мышей, получавших ws-Lynx1, по сравнению с контрольной группой (получавшей физ.раствор) в диапазоне интервалов между импульсами 30-100 мс (Рис. 4.41Ж). Введение MLA снижало PPF для интервалов между импульсами 75-150 мс, но эти изменения не были статистически значимыми по сравнению с контрольной группой. Совместное введение MLA с ws-Lynx1 восстанавливало соотношение PPF и увеличивало его немного выше уровня, наблюдаемого для контрольных животных (Рис. 4.41Ж).

¹ Совместно с чл.-кор. П.М. Балабаном и к.б.н. Н.А. Васильевой, ИВНД РАН.

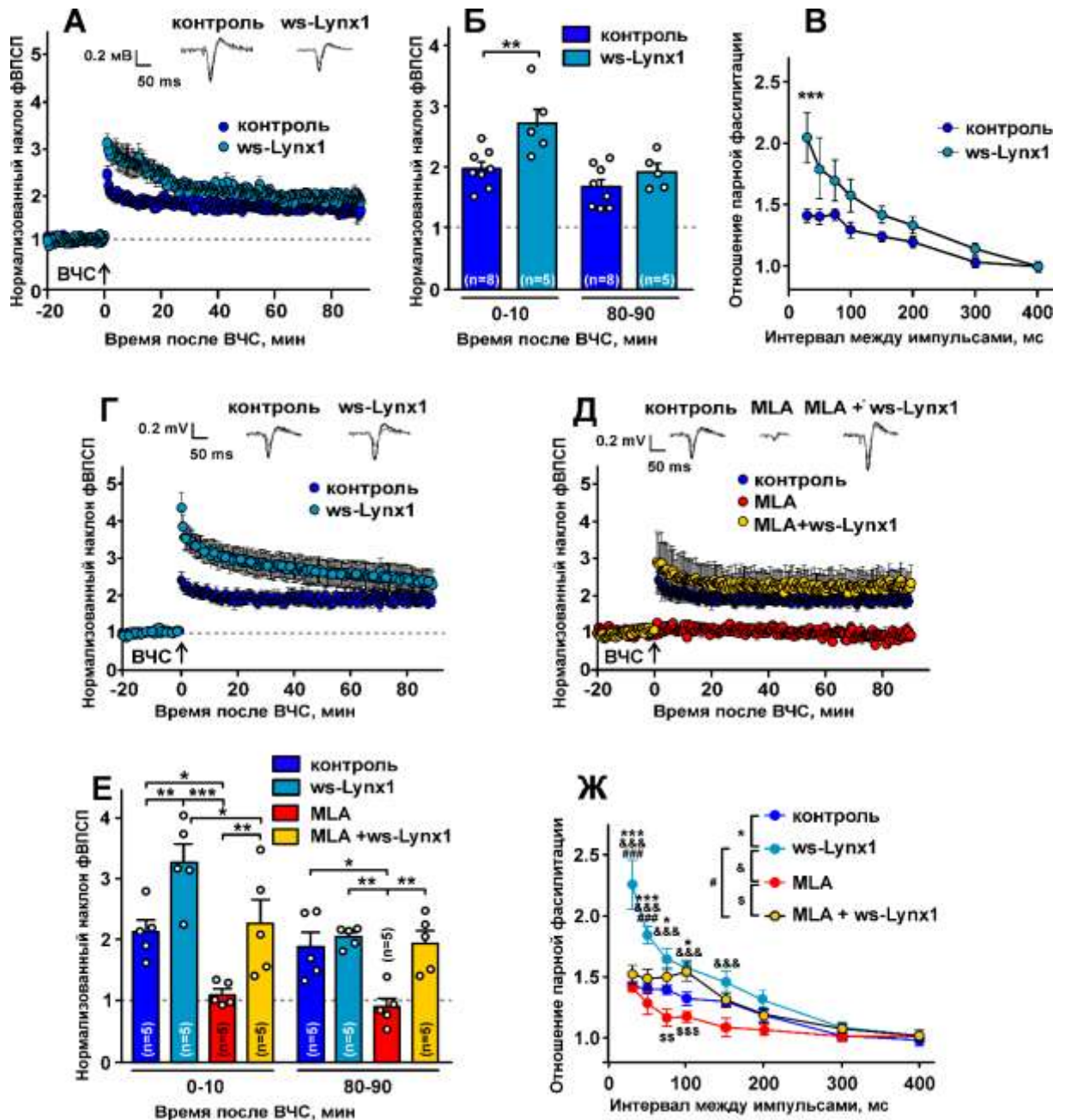


Рис. 4.41. *Ws-Lynx1* усиливает ДВП в срезах гиппокампа и предотвращает вызванную MLA блокаду. (А). Усредненные записи ДВП при инкубации срезов гиппокампа в среде, содержащей 2 мкМ *ws-Lynx1* в течение 1 ч ($n = 5$ срезов, 5 мышей) и без *ws-Lynx1* ($n = 8$ срезов, 8 мышей). Репрезентативные записи отдельных фВПСП показаны выше: серый - базовая линия, черный – после ВЧС. (Б). Нормализованные наклоны фВПСП, усредненные по периодам 0-10 и 80-90 минут после ВЧС для срезов гиппокампа, инкубированных с и без *ws-Lynx1*. (В). PPF при инкубации срезов гиппокампа с и без *ws-Lynx1*. (Г,Д). Усредненные записи ДВП в срезах гиппокампа от мышей, получавших физ.раствор, *ws-Lynx1*, MLA и MLA + *ws-Lynx1* (в каждом случае $n = 5$ срезов, 5 мышей). Контрольный ответ ДВП (введение физ.раствора) показан на обеих панелях для большей наглядности. (Е). Нормализованные наклоны фВПСП, усредненные по периодам 0-10 и 80-90 минут после ВЧС у мышей, получавших физ.раствор, *ws-Lynx1*, MLA и MLA + *ws-Lynx1*. (Ж). Соотношение PPF в тех же группах. Данные представлены в виде среднего \pm с.о. * ($p < 0,05$), **/\$\$ ($p < 0,01$), ***/###/\$\$\$ ($p < 0,001$) означают статистически значимое отличие групп согласно ANOVA анализу тесту Сидака (Б,В) или Тьюки (Е,Ж) для множественного сравнения.

4.3.2.6. Ws-Lynx1 конкурирует с MLA за связывание с $\alpha 7$ -nAChR

Одним из возможных механизмов, объясняющих, почему ws-Lynx1 может предотвращать вызванную MLA блокаду ДВП, является конкуренция ws-Lynx1 с MLA за связывание $\alpha 7$ -nAChR. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели аффинную экстракцию $\alpha 7$ -субъединицы nAChR из гомогената мозга крысы с помощью иммобилизованного на магнитных частицах ws-Lynx1 в присутствии различных лигандов nAChR (неспецифический агонист nAChR - никотин, ингибитор $\alpha 4\beta 2$ -nAChR - Dh β E, ингибитор $\alpha 3\beta 2$ - конотоксин MII и ингибитор $\alpha 7$ -nAChRs - MLA) (Рис. 4.42А). Ws-Lynx1 экстрагировал субъединицы $\alpha 7$ -nAChR из гомогената мозга, и количество экстрагированных субъединиц $\alpha 7$ значительно снижалось в присутствии MLA (~ 52%), в то время как влияние других лигандов на экстракцию $\alpha 7$ -nAChR не было статистически значимым (Рис. 4.42Б).

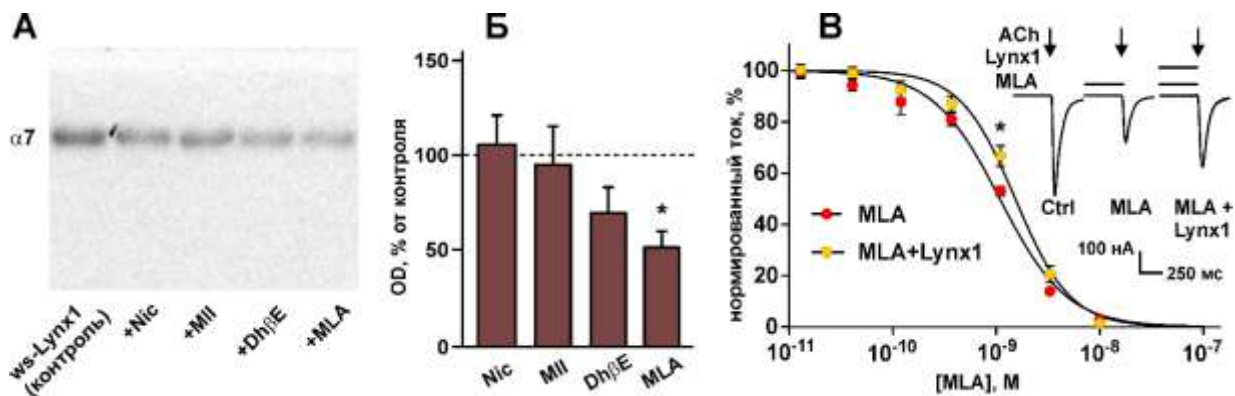


Рис. 4.42. Ws-Lynx1 конкурирует с MLA за связывание с $\alpha 7$ -nAChR. (А). Репрезентативный блот аффинной экстракции субъединицы $\alpha 7$ -nAChR из мембранной фракции гомогената коры головного мозга крысы с использованием магнитных частиц, ковалентно связанных с ws-Lynx1, в присутствии (+) или в отсутствие (-) никотина (Nic), MII, Dh β E и MLA. (Б). Оптическая плотность (OD) полос на вестерн-блоте, использованная для оценки количества $\alpha 7$ -nAChR, экстрагированных в присутствии различных лигандов. Значения нормализованы на количество $\alpha 7$ nAChR, очищенное в отсутствие лигандов. Каждый столбец представлен как среднее \pm с.о. (n = 3 крысы). (В). Кривые ингибирования MLA для $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированного в ооцитах *X. laevis*, в присутствии и в отсутствие 1 мкМ ws-Lynx1. Кривые были описаны уравнением Хилла, каждая точка представляет среднее \pm с.о. (n = 4 и 3 ооцита для MLA и MLA + ws-Lynx1, соответственно). Показаны репрезентативные ответы для 100 мс импульсов 100 мкМ ACh, зарегистрированных в отсутствие или в присутствии 1 нМ MLA и/или 1 мкМ ws-Lynx1, в одном ооците. * означает статистически значимое отличие групп (двухсторонний t-критерий Стьюдента).

Чтобы подтвердить эту конкуренцию на функциональном уровне, мы измерили значение IC₅₀ MLA для $\alpha 7$ -nAChR, экспрессируемых в ооцитах *X. laevis*, в отсутствие и в присутствии 1 мкМ ws-Lynx1¹. Токи через рецептор были вызваны аппликацией 100 мкМ ацетилхолина. Совместное применение ws-Lynx1 и MLA ослабляло ингибирующую

¹ Совместно с д.х.н. С.А. Козловым и к.б.н. С.Г. Кошелевым, лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов, ИБХ РАН.

активность MLA и увеличивало IC_{50} с $1,08 \pm 0,07$ до $1,53 \pm 0,1$ нМ (Рис. 4.42В). Разница в нормированных значениях тока становилась значимой при концентрации MLA 1 нМ.

4.3.2.7. *Ws-Lynx1* компенсирует нарушения когнитивных функций и усиливает ДВП у 2xTg-AD мышей

Наши результаты показывают, что *ws-Lynx1* способен компенсировать когнитивные нарушения и блокаду ДВП, индуцированную ингибированием $\alpha 7$ -nAChR. Поэтому мы предположили, что *ws-Lynx1* может оказывать «терапевтический» эффект и влиять на когнитивные функции при болезни Альцгеймера. В качестве модели БА использовали 8-месячных трансгенных мышей 2xTg-AD, которые совместно экспрессировали химерный белок-предшественник амилоида мыши/человека (Mo/HuAPP695swe) и мутантный пресенилин 1 человека (PS1-dE9). Три группы животных: трансгенные мыши (2xTg-AD), которые регулярно получали физ.раствор или *ws-Lynx1* (в течение девяти дней до начала эксперимента), и нетрансгенных однопометников (Tg-), получавших физ.раствор, подвергали серии поведенческих тестов¹ (Рис. 4.38А).

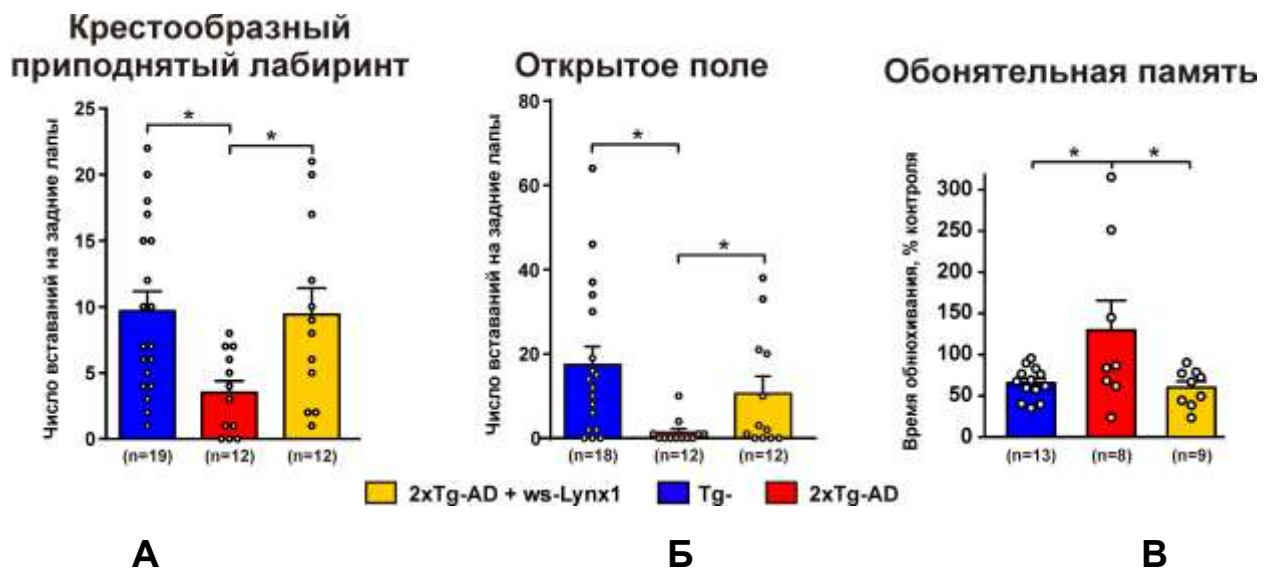


Рис. 4.43. Поведенческие тесты подтвердили способность *ws-Lynx1* восстанавливать нарушения когнитивных функций у мышей 2xTg-AD. (А). Число вставаний на задние лапы в 5-минутном испытании КПЛ. (Б). Число вставаний на задние лапы за 10 мин теста ОП. (В). Тест на обонятельную память. Время обнюхивания в тестовом эксперименте (день 2) выражается в процентах от значения в контрольном эксперименте (день 1). Данные представлены в виде среднего значения \pm с.о. ($n = 8-13$ мышей). * ($p < 0,05$) означает статистически значимое отличие групп (ANOVA и тест Тьюки).

Для мышей 2xTg-AD наблюдалось значительное снижение исследовательской активности в тестах КПЛ и ОП по сравнению с однопометными Tg- мышами (Рис. 4.43А,Б). Введение *ws-Lynx1* возвращало исследовательскую активность мышей 2xTg-AD

¹ Совместно с к.б.н. А.А. Андриевским, к.б.н. А.С. Поповой, Е.А. Лагеревой, ИМБП РАН.

(число вставаний на задние лапы) приблизительно до уровней, наблюдаемых для Tg – однопометников. Аналогично мышам C57BL/6, введение ws-Lynx1 не влияло на двигательную активность мышей 2xTg-AD в тестах КПЛ и ОП.

Чтобы исключить влияние стресса, вызванного экспериментальными манипуляциями, мы исследовали поведение мышей с помощью автоматической системы PhenoMaster, где эксперимент проводился в более «комфортных» условиях домашней клетки без непосредственного участия экспериментатора. Результаты показали очень низкую двигательную активность у всех трех групп животных. Мыши 2xTg-AD проводили больше времени в движении колеса и пробегали большие расстояния (до 200 м в день) по сравнению с животными Tg- (до 100 м, Рис. 4.44Б). Интересно, что введение ws-Lynx1 снижало активность мышей 2xTg-AD до уровня, близкого к контрольным животным Tg- (Рис. 4.44Б). Незначительное увеличение общего пробега в течение 7 дней мониторинга (Рис. 4.44Б) при почти постоянной средней скорости (данные не показаны) свидетельствовали о низкой способности к моторному обучению у мышей Tg- и 2xTg-AD. Это хорошо согласуется с результатами теста Rotarod, где мыши продемонстрировали очень низкое улучшение результатов с течением времени и не наблюдалось влияния ws-Lynx1 на моторное обучение (Рис. 4.44А). В то же время у мышей 2xTg-AD, получавших ws-Lynx1, в домашней клетке наблюдалась аномальная гиперактивность по сравнению с животными Tg-, что было установлено с помощью мониторинга частоты пересечения лучей инфракрасной сетки. Наиболее существенные различия наблюдались во второй половине активной (ночной) фазы циркадного цикла (Рис. 4.44В).

Для изучения рабочей памяти использовали оперантный модуль с положительным подкреплением, встроенный в домашнюю клетку системы PhenoMaster. Во время первых трех ночных сессий была использована задача простого выбора с положительным подкреплением. После того, как мыши научились взаимодействовать с оперантным модулем, в течение пяти дней подряд была построена более сложная задача с чередующимся предъявлением стимулов. Как правило, все три группы показывали плохие результаты в этом задании, демонстрируя очень небольшое увеличение показателя успешного выбора (Рис. 4.44Г). Неожиданно, 2xTg-AD и 2xTg-AD+ws-Lynx1 группы решали задачу более успешно, чем Tg-. Тем не менее, более подробный анализ показал, что увеличение уровня успешности было связано с улучшением обучения и производительности только у 2xTg-AD+ws-Lynx1 и Tg- животных. Мыши 2xTg-AD достигали более высокого уровня успеха из-за значительно увеличения общего числа попыток, сопровождаемого резким увеличением количества ошибок (Рис. 4.44Д,Е). Таким образом, введение ws-Lynx1 приводит к смене «беспокойного» поведения мышей 2xTg-

AD на более «уравновешенное» поведение, характерное для нетрансгенных животных, и восстанавливает их способность к обучению.

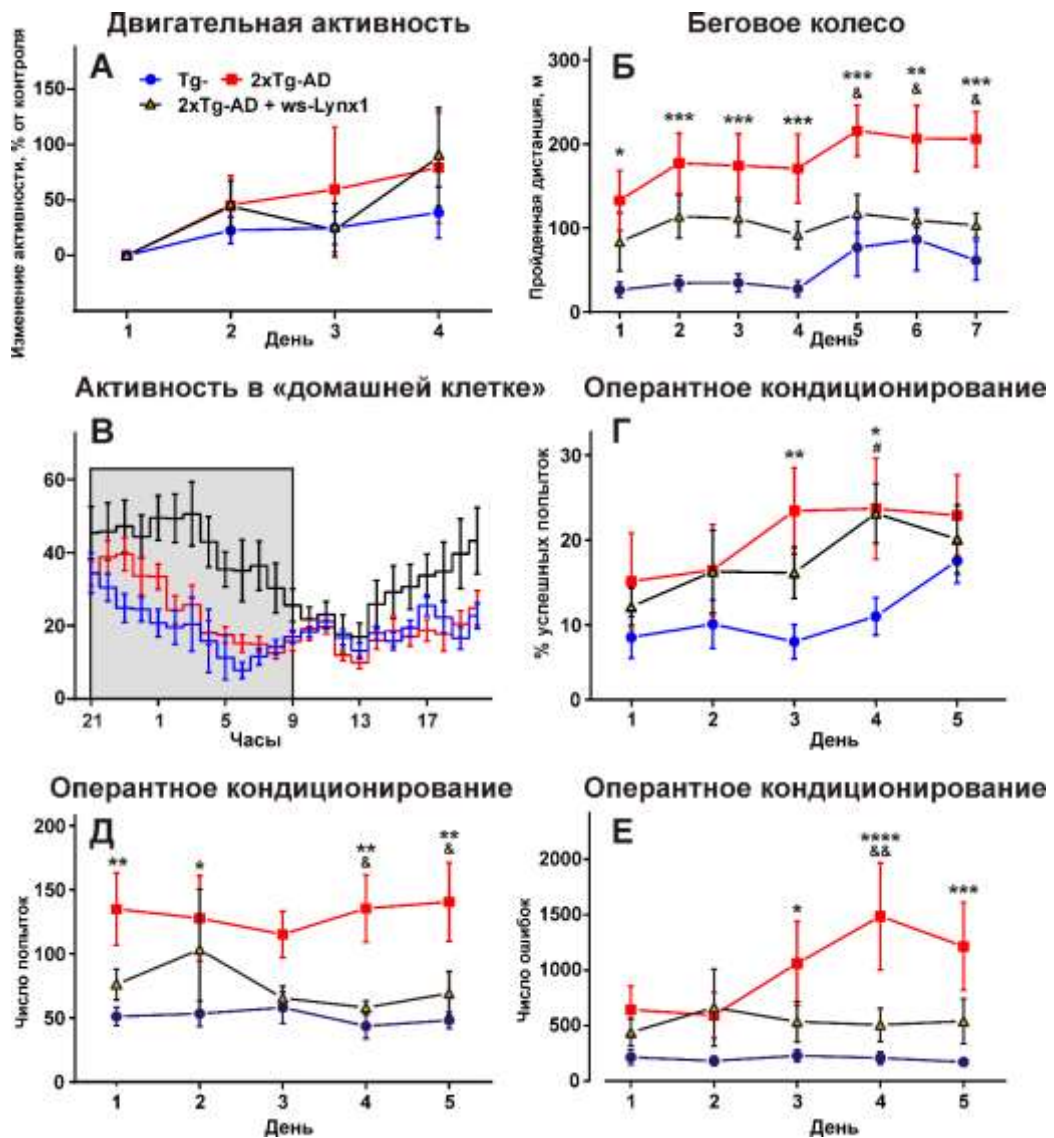


Рис. 4.44. Мониторинг в системе «домашняя клетка» (PhenoMaster) выявил изменения в активности и рабочей памяти у мышей 2xTg-AD при введении ws-Lynx1. Данные представлены в виде среднего значения \pm с.о. ($n = 8-13$ мышей). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) означает статистически значимое отличие групп Tg- и 2xTg-AD, # ($p < 0,05$) означает статистически значимое отличие групп Tg- и 2xTg-AD+ws-Lynx1 и & ($p < 0,05$), && ($p < 0,01$) означает статистически значимое отличие групп 2xTg-AD и 2xTg-AD+ws-Lynx1 (ANOVA, тест Тьюки).

Значительный эффект ws-Lynx1 наблюдался в тесте обонятельной памяти (Рис. 4.43В). Мыши Tg- тратили на 30% меньше времени на обнюхивание знакомого запаха на второй день теста, в то время как мыши 2xTg-AD тратили в среднем на 30% больше времени. Введение ws-Lynx1 уменьшило продолжительность обнюхивания на второй день до уровня, наблюдаемого для мышей Tg- (Рис. 4.43В).

Известно, что нарушение обонятельной памяти у людей с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА и другие, приводит к потере их способности различать

запахи [319]. Мыши, нокаутные по гену $\alpha 7$ -nAChR демонстрировали значительное ухудшение в тестах на обонятельную память по сравнению с мышами WT [57]. Агонисты $\alpha 7$ -nAChR могут усиливать обонятельную рабочую память у крыс, тогда как антагонисты значительно ингибируют ее [317]. В соответствии с этим, у мышей C57BL/6, получавших MLA, и мышей 2xTg-AD наблюдался значительный дефицит обонятельной памяти, который может быть скомпенсирован введением ws-Lynx1 (Рис. 4.39В,Г и 4.43В).

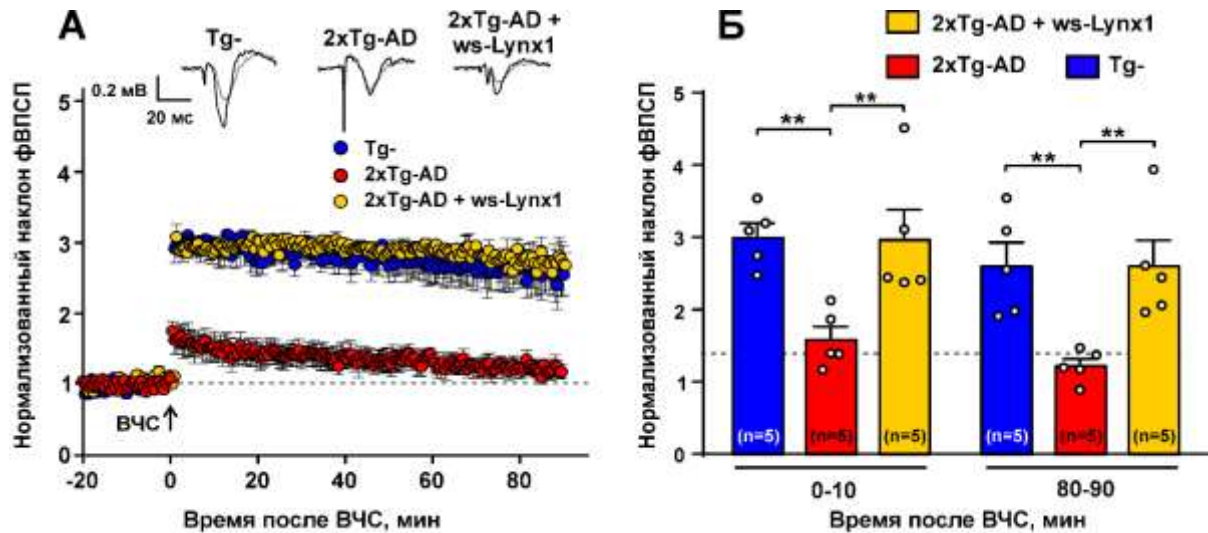


Рис. 4.45. Ws-Lynx1 предотвращает A β -индуцированную блокаду ДВП у мышей 2xTg-AD. (А). Усредненные ответы ДВП для мышей Tg- и 2xTg-AD, получавших физ.раствор или ws-Lynx1 (n = 5 срезов, 4 мыши в каждой группе, один или два среза от одного животного). (Б). Нормализованные наклоны фВПСП в среднем через 0-10 и 80-90 минут после ВЧС у мышей Tg- и 2xTg-AD, получавших физ.раствор или ws-Lynx1 (среднее \pm с.о., n = 5 срезов, 4 мыши). ** (p < 0,01) означает статистически значимое отличие групп (ANOVA, тест Тьюки).

Аналогично мышам, получавшим MLA, значительное подавление ДВП наблюдалось в срезах мозга у мышей 2xTg/AD в течение всех 90 минут записи эксперимента. Регулярное (в течение 24-25 дней до записи эксперимента) введение ws-Lynx1 восстанавливало ДВП до контрольного уровня, наблюдаемого у мышей Tg- (Рис. 4.45). Повышение ДВП в течение первых десяти минут после стимуляции вместе с измененным соотношением PPF, наблюдаемым у мышей, принимавших ws-Lynx1 (Рис. 4.41Г,Е,Ж), свидетельствует в пользу пресинаптического механизма увеличения ДВП [320]. Участие пресинаптических $\alpha 7$ -nAChR в модуляции ДВП и, следовательно, в синаптической пластичности было описано ранее [2]. Поэтому 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, усиленное высвобождение глутамата приводит к более сильной активации глутаматных рецепторов, которые опосредуют увеличение постсинаптического Ca²⁺-тока и индукции ДВП.

4.3.2.8. Ws-Lynx1 увеличивает синаптическую плотность в гиппокампе мышей 2xTg-AD

Нарушение когнитивной функции, наблюдаемое при БА, коррелирует с потерей синапсов в гиппокампе и коре [321]. Корреляция между потерей пресинаптического везикулярного белка синаптофизина и уровнем синаптической дегенерации ранее была установлена для различных экспериментальных моделей БА [321,322]. В представленной работе был измерен уровень иммунореактивности синаптофизина в срезах головного мозга энторинальной коры и полей CA1, CA3 и DG гиппокампа мышей Tg- и 2xTg-AD, в течение длительного времени получавших физ.раствор или ws-Lynx1¹ (Рис. 4.46А). Было обнаружено, что у трансгенных животных уровень синаптофизина был снижен на ~ 30-40% как в гиппокампе, так и в коре по сравнению с мышами Tg- (Рис. 4.46Б). Введение ws-Lynx1 значительно уменьшало потерю синаптофизина в области CA3 у мышей 2xTg-AD (Рис. 4.46Б). В то же время, среднее количество амилоидных бляшек в коре и гиппокампе не изменялось при введении ws-Lynx1 (Рис. 4.47). Стоит отметить, что увеличение плотности синапсов также может быть частично ответственным за наблюдаемое усиление ДВП.

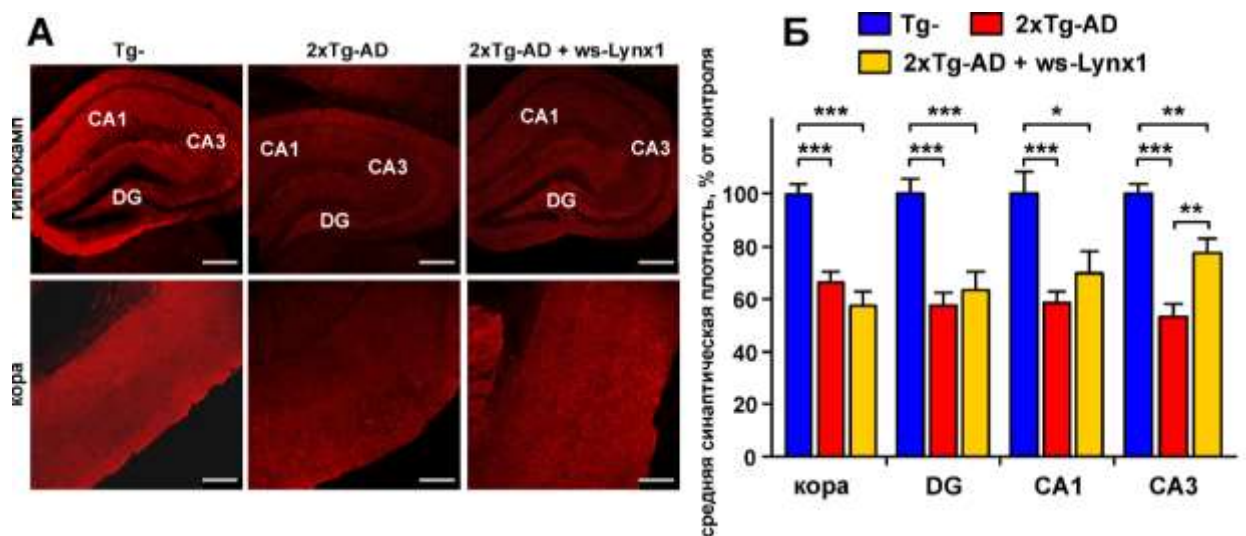


Рис. 4.46. Ws-Lynx1 влияет на уровень экспрессии синаптофизина у мышей 2xTg-AD. (А). Изображения срезов мозга мыши, окрашенных антителом к синаптофизину, полученные с помощью конфокальной микроскопии. Шкала 250 мкм. (Б). Количественная оценка потери синаптофизина в зубчатой фасции (DG), CA3 и CA1 областях гиппокампа и энторинальной коре мышей Tg- и мышей 2xTg-AD, получавших физ.раствор или ws-Lynx1 (n = 32, 4 мыши в каждой группе, 8 срезов от каждого животного). Данные представлены как среднее значение ± с.о. * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001), означает статистически значимое отличие групп согласно ANOVA анализу и тесту Даннета для множественного сравнения.

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

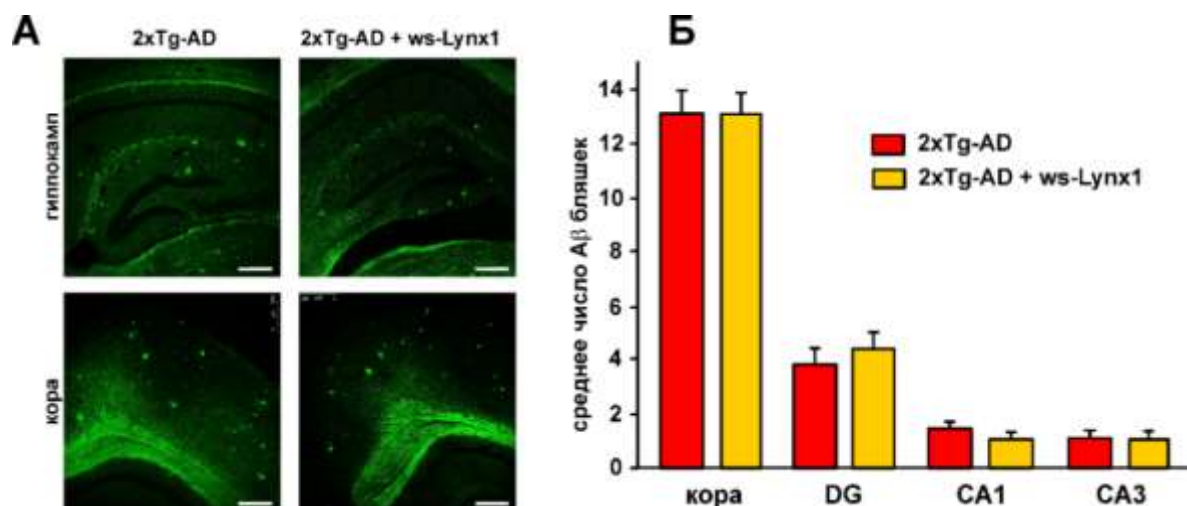


Рис. 4.47. Ws-Lynx1 не влияет на количество бляшек A β у мышей 2xTg-AD. (А). Изображения конфокальной микроскопии срезов мозга, окрашенных тиофлавином S. Шкала 250 мкм. (Б). Среднее число бляшек A β (\pm с.о.) на изображениях срезов зубчатой фасции (DG), областей гиппокампа CA3 и CA1 и энторинальной коры ($n = 32$, 4 мыши в каждой группе, 8 поперечных срезов от каждого животного).

Полуданные позволяют предположить, что положительное влияние ws-Lynx1 на когнитивную функцию может быть как результатом относительно быстрого усиления ДВП (одночасовая инкубация срезов головного мозга с ws-Lynx1), так и медленных изменений плотности синапсов (хронический прием ws-Lynx1 в течение 25 дней). Последний эффект не может быть объяснен простой активацией $\alpha 7$ -nAChR, а скорее всего является результатом перестройки внутриклеточной и межклеточной передачи сигналов. Известно, что активация $\alpha 7$ -nAChR никотином влияет на экспрессию генов посредством транскрипционных факторов CREB и c-Fos [323]. Активация CREB, в свою очередь, может усиливать ДВП [324]. Напротив, ингибирование $\alpha 7$ -nAChR олигомерным A β 1-42 приводит к ингибированию экспрессии CREB и c-Fos [314] и подавляет ДВП (Рис. 4.36). Вероятно, эффекты, наблюдаемые при хроническом приеме ws-Lynx1, также связаны с активацией $\alpha 7$ -nAChR и регуляцией экспрессии генов, участвующих в холинергической передаче сигналов и патогенезе БА.

Таким образом, мы впервые описали действие водорастворимого домена белка человека Lynx1 *in vivo*. Мы ожидаем, что связанный с мембраной Lynx1 имеет фармакологические свойства, сходные со свойствами его растворимого домена, обнаруженного в спинномозговой жидкости (Рис. 4.23). Принимая во внимание, что эффекты ws-Lynx1 *in vivo* хорошо заметны уже после 2-3 недель приема, можно предположить, что ws-Lynx1 является перспективным кандидатом для разработки новой терапии БА.

4.3.3. Структурно-функциональные исследования водорастворимого домена белка человека Lypd6

Lypd6 - белок семейства Ly6/uPAR с GPI-якорем, экспрессирующийся в мозге [185]. Lypd6 способен усиливать передачу сигналов через канонический сигнальный путь Wnt, взаимодействуя с комплексом LRP6/Frizzled [188]. Недавно были получены данные, указывающие на то, что, Lypd6 в составе гибридного белка с GST может экстрагировать различные субъединицы nAChR из гомогената мозга человека [186], что косвенно указывает на то, что, возможно, nAChR также являются мишенью Lypd6.

4.3.3.1. rLypd6 ингибирует ACh-индуцированные токи в $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*

Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали взаимодействие водорастворимого аналога Lypd6 человека без GPI-якоря (rLypd6) с несколькими типами nAChR, экспрессированными в ооцитах *X. laevis*¹ (Таблица 4.4). Как видно из таблицы, ингибирование ACh-индуцированного тока через канал рецептора наблюдалось для $\alpha 3\beta 4$ - и $\alpha 7$ -nAChR. Примечательно, что способность модулировать работу $\alpha 3\beta 4$ -nAChR недавно была показана для трехпетельного белка Lypd6b [190], близкого гомолога Lypd6 (степень гомологии аминокислотных последовательностей ~ 54%).

Таблица 4.4. Взаимодействие rLypd6 с различными nAChR, экспрессированными в ооцитах *X. laevis*.

тип nAChR	$\alpha 1\beta 1\delta \epsilon$	$\alpha 1\beta 1\delta \gamma$	$\alpha 4\beta 2$	$\alpha 3\beta 4$	$\alpha 3\beta 2$	$\alpha 7$
активность 10 мкМ rLypd6	-	-	-	+	-	+

Так как ранее взаимодействие Lypd6 с $\alpha 7$ -nAChR не было описано в литературе, мы провели более детальное исследование активности нейромодулятора на этом рецепторе². Запись тока в режиме двухэлектродной фиксации потенциала выполняли в присутствии различных концентраций rLypd6 в диапазоне от 0,33 мкМ до 100 мкМ. Аппликация rLypd6 без ACh не вызывала тока через $\alpha 7$ -nAChR. Напротив, в присутствии 100 мкМ ACh rLypd6 вызывал зависимое от концентрации ингибирование тока через канал рецептора с $IC_{50} \sim 11$ мкМ. Максимальное снижение амплитуды ACh-вызванного тока составляло ~ 54% от контрольного значения (Рис. 4.48Б). Наблюдаемое ингибирование было полностью обратимо (Рис. 4.48А). Неполное ингибирование тока через $\alpha 7$ -nAChR и отсутствие

¹ Совместно с проф. Я.Титгат и С. Пеньёр, университет KU Leuven, Бельгия.

² Совместно с д.х.н. С.А. Козловым и к.б.н. С.Г. Кошелевым, лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов, ИБХ РАН.

эффекта rLypd6 без активации рецептора агонистом (подобно ws-Lynx1, п. 4.3.1.4) указывали на модулирующее (аллостерическое) действие rLypd6.

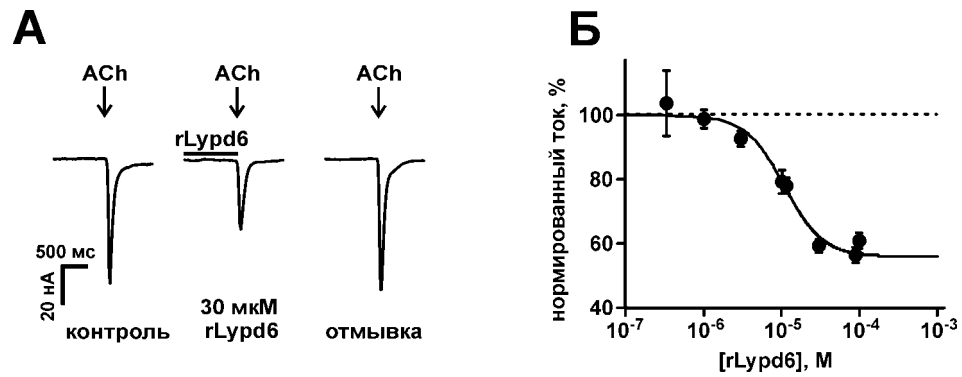


Рис. 4.48. (А). Репрезентативные ответы на 100 мс импульсов 100 мкМ АСh, зарегистрированных в ооцитах, экспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR в отсутствие и в присутствии 30 мкМ rLypd6. (Б). Кривая доза-ответ для ингибирования rLypd6 вызванных АСh токов в $\alpha 7$ -nAChR. Данные нормированы на пиковую амплитуду тока, зарегистрированную без rLypd6 (100%), и представлены как среднее значение \pm с.о. ($n = 8$ ооцитов). Данные аппроксимированы уравнением Хилла с $IC_{50} 10,9 \pm 1,8$ мкМ, $nH 1,6 \pm 0,4$, максимальная степень ингибирования $54 \pm 4\%$.

4.3.3.2. Со-локализация Lypd6 с $\alpha 7$ -nAChR в нейронах коры и гиппокампа

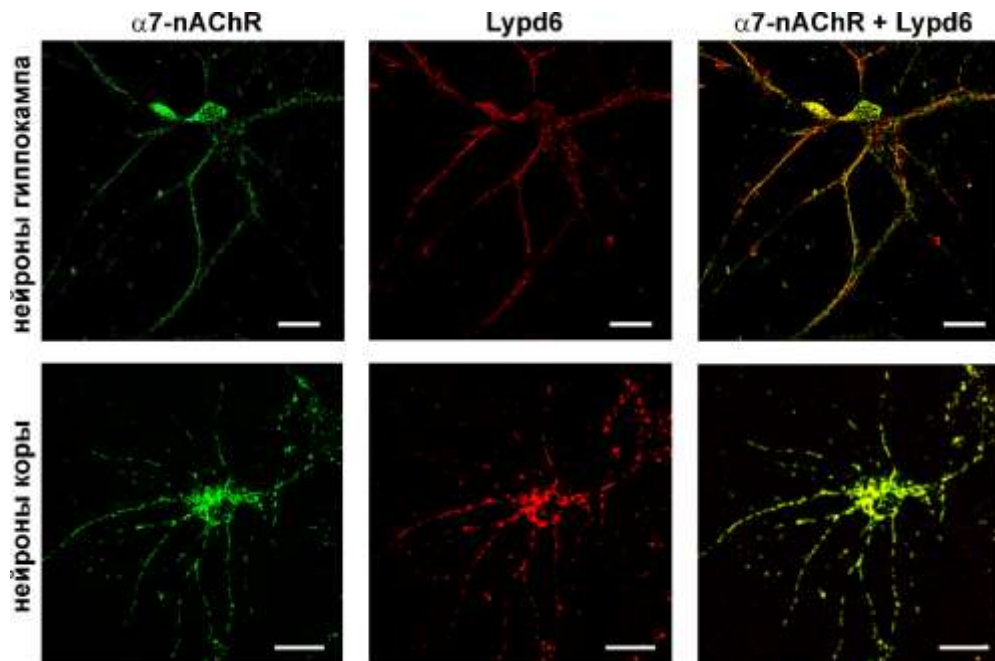


Рис. 4.49. Совместная локализация эндогенного Lypd6 и $\alpha 7$ -nAChR в первичной культуре нейронов коры и гиппокампа. Клетки последовательно инкубировали с мышиными анти-Lypd6 и кроличьими анти- $\alpha 7$ -nAChR-антителами, затем с вторичными IgG: анти-мышиными с меткой Alexa-594 (красный) и анти-кроличьими с меткой Alexa-488 (зеленые). Шкала 10 мкм.

Нейрональные рецепторы $\alpha 7$ типа являются одними из наиболее распространенных nAChR в мозге млекопитающих [325]. мРНК Lypd6 была обнаружена в коре головного

мозга и гиппокампе мыши [185], однако экспрессия *Lypd6* в нейронах на уровне белка не была в достаточной степени подтверждена экспериментальными данными. Чтобы исследовать экспрессию *Lypd6* в нейронах и его возможную со-локализацию с $\alpha 7$ -nAChR, мы использовали окрашивание методами иммуоцитохимии первичных культур нейронов из коры и гиппокампа крыс. Экспрессия белка *Lypd6* наблюдалась в соме и дендритах нейронов, как коры, так и гиппокампа, при этом наблюдалась очевидная со-локализация с $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 4.49).

4.3.3.3. *rLypd6* ингибирует токи через $\alpha 7$ -nAChR, вызванные холином, на срезах гиппокампа мыши

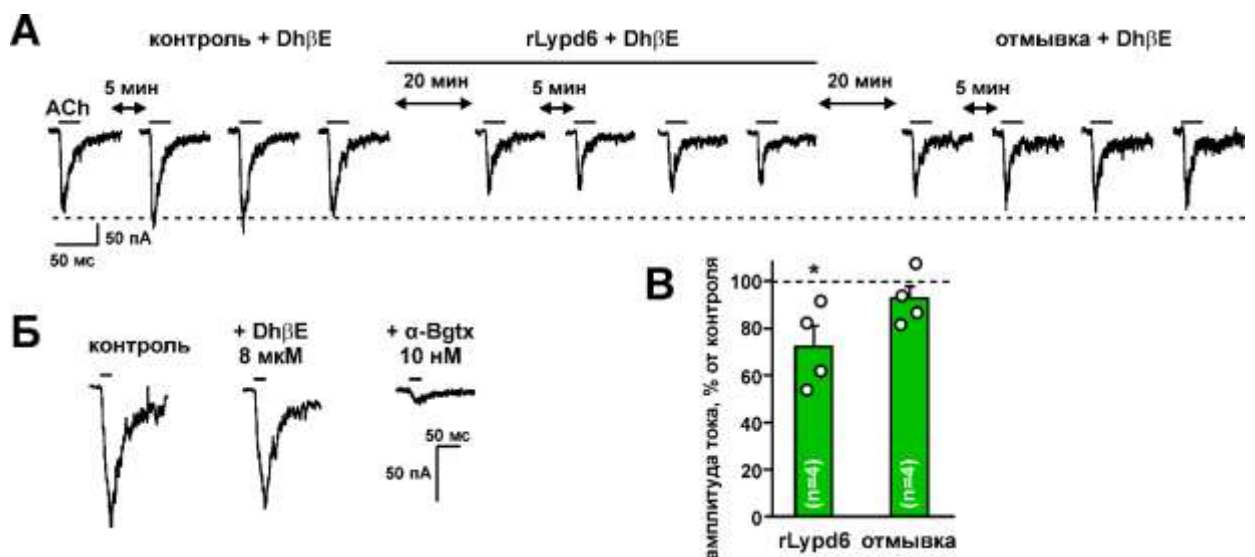


Рис. 4.50. *rLypd6* ингибирует вызванный холином ток через nAChR на срезах гиппокампа крысы. (А). Репрезентативные ответы на 25 мс аппликацию 1 мМ холина, зарегистрированные в одной клетке в отсутствие и в присутствии 1 мкМ *rLypd6*. (Б). Репрезентативные ответы на аппликацию 1 мМ холина в отсутствие и в присутствии 8 мкМ DhβE или 10 нМ α -Bgtx. (В). Амплитуды вызванного холином тока в присутствии 1 мкМ *rLypd6* и после отмывки ($n = 4$ среза, 4 крысы). Четыре ответа были усреднены для каждого среза и нормализованы на среднюю амплитуду ответа в контрольной части эксперимента (100%, показано пунктирной линией). Данные представлены в виде среднего значения \pm с.о. * ($p < 0,05$) означает статистически значимое отличие от контроля (двухсторонний t -критерий Стьюдента). Эксперименты на панелях А и В проводили в присутствии 8 мкМ DhβE.

Для дальнейшего изучения функциональной роли *Lypd6* в ЦНС, мы исследовали активность *rLypd6* на природных nAChR в переживающих срезах гиппокампа крыс¹. Аппликация холина приводила к устойчивому возникновению токов в интернейронах CA1 *str. radiatum* (Рис. 4.50Б). Использование 8 мкМ DhβE или 10 нМ α -Bgtx (селективных ингибиторов $\alpha 4\beta 2$ -nAChR и $\alpha 7$ -nAChR, соответственно) выявило значительное ингибирование токов только в присутствии α -Bgtx (Рис. 4.50Б). Таким

¹ Совместно с чл.-кор. В.Г. Скребицким, проф. И.Н. Шароновой и И.С. Поваровым, Научный центр неврологии РАН.

образом, наблюдаемые токи были в основном обусловлены активацией $\alpha 7$ -nAChR. Чтобы подавить теоретически возможную компоненту токов через $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, во всех последующих экспериментах в среду, омывающую срезы, добавляли 8 мкМ Dh β E. Добавление 1 мкМ rLypd6 в омывающую среду значительно уменьшало амплитуду тока до ~ 72% от контрольного значения (Рис. 4.50А,В). Промывка срезов средой без rLypd6 возвращала амплитуду вызванных холином токов до контрольного уровня, что подтверждает обратимость связывания rLypd6 с $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 4.50А,В). Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что гибридный белок GST-Lypd6 ингибирует вызванные никотином токи в срезах гиппокампа [186].

4.3.3.4. rLypd6 подавляет долговременную потенциацию в гиппокампе

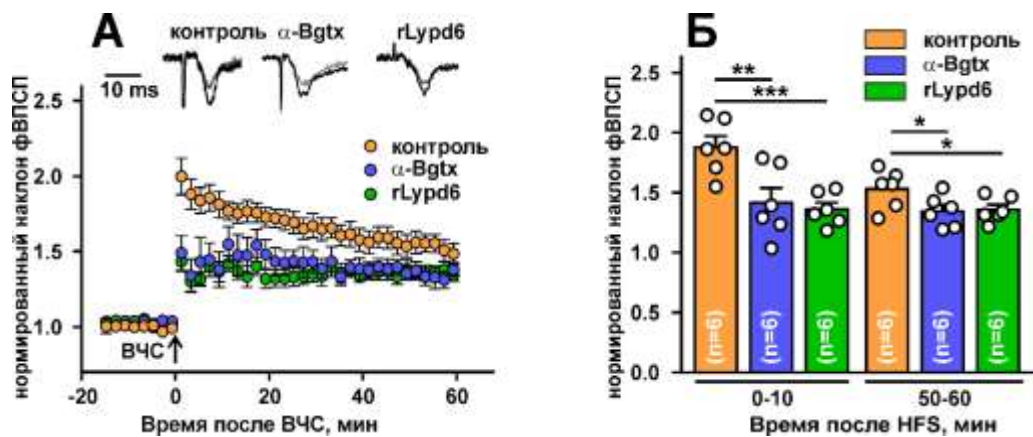


Рис. 4.51. rLypd6 подавляет ДВП в переживающих срезах гиппокампа мышей. (А). Усредненные записи ДВП в срезах гиппокампа, которые были инкубированы 1 ч в среде, содержащей 1 мкМ rLypd6 или 10 нМ α -Bgtx (в каждом случае n = 6 срезов, шесть мышей). Указанные вещества присутствовали в среде, омывающей срезы, также во время записи. Репрезентативные нормированные фВПСП показаны выше: серый - базовая линия, черный - запись после индукции ДВП. (Б). Нормализованные наклоны фВПСП, усредненные по промежуткам 0-10 и 50-60 минут после ВЧС. Данные представлены в виде среднего значения \pm с.о. * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) означает статистически значимое отличие (ANOVA анализ для повторных измерений и тест Тьюки).

Пресинаптические nAChR, содержащие $\alpha 7$ субъединицы, участвуют в регуляции высвобождения глутамата и синаптической пластичности [2]. Активация $\alpha 7$ -nAChR агонистами и положительными аллостерическими модуляторами усиливает ДВП, которая лежит в основе механизмов обучения и памяти [326], в то время как ингибирование $\alpha 7$ -nAChR с помощью α -Bgtx подавляет ДВП [327]. Чтобы изучить возможное влияние rLypd6 на синаптическую пластичность, мы провели запись ДВП в срезах гиппокампа

мышей C57BL/6¹. Инкубация переживающих срезов гиппокампа в среде, содержащей 1 мкМ Lypd6, значительно подавляла ДВП в течение всех 60 минут записи после ВЧС по сравнению с контрольным уровнем (Fig. 4.51А,Б). Аналогичный эффект наблюдался при инкубации срезов с 10 нМ α -Bgtx Fig. 4.51А,Б). Похожие эффекты, наблюдаемые при обработке срезов α -Bgtx и rLypd6 (Рис. 4.51), вместе с ингибированием индуцированных холином токов в срезах гиппокампа (Рис. 4.50) позволили нам предположить, что подавление ДВП с помощью rLypd6 связано с негативной модуляцией α 7-nAChR.

4.3.3.5. Пространственная структура и динамика rLypd6 в растворе

Получение изотопно-меченых ¹⁵N и ¹³C, ¹⁵N вариантов rLypd6 позволило нам изучить пространственную структуру и внутримолекулярную динамику белка методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии². В ходе исследования нами была выявлена конформационная гетерогенность C-концевого фрагмента rLypd6 (Pro86-Ala95), связанная с *цис-транс*-изомеризацией пептидной связи Leu85-Pro86. Заселенность двух структурных состояний белка в растворе была одинакова, и обмен между ними был относительно медленным - с характерным временем $> 0,2$ с. Данные ¹⁵N-релаксации показали, что C-концевой фрагмент (Pro86 и далее) в обеих структурных формах белка также обладает значительной подвижностью в пс-нс временном диапазоне (значения ¹⁵N-¹H-NOE $< 0,7$). В этом фрагменте не наблюдалось контактов NOE с большой и средней дальностью, что указывает на то, что C-конец молекулы не структурирован в растворе. Для сравнения с недавно определенной кристаллической структурой LU-домена Lypd6 [188], по данным ЯМР была рассчитана пространственная структура *транс*-изомера rLypd6 (Рис. 4.5.2.).

В рассчитанном наборе структур не все области основной цепи белка демонстрировали хорошую сходимость к единой конформации (Рис. 4.52А,В). Значительное расхождение в наборе структур наблюдалось у C-концевого фрагмента (Leu85-Ala95) и у соседних с ним участков: конца петли II (Val39-Gly41) и внешнего края и конца петли III (Leu57-Gly68). Слабоструктурированная область петли III включает C-концевой фрагмент спирали α 2 и тяжа β 4. Другими областями с низкой структурной конвергенцией являются три N-концевых остатка (Met0-Lys2) и соседний фрагмент петли I (Ala19-Pro25) (Рис. 4.52А,В). Данные релаксации ядер ¹⁵N (Рис. 4.52Б) выявили наличие высокоамплитудных движений в пс-нс временном диапазоне в соответствующих областях

¹ Совместно с чл.-кор. А.В. Семьяновым и к.б.н. А.В. Поповым, лаборатория внесинаптической передачи ИБХ РАН.

² Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым, к.б.н. А.С. Парамоновым и А.В. Царевым, группа структурной биологии ИБХ РАН.

основной цепи rLypd6 (значения $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}\text{-NOE} < 0,7$). Таким образом, отсутствие структурной конвергенции в первую очередь связано с высокой внутримолекулярной подвижностью молекулы rLypd6.

Релаксационные данные также выявили «медленные» конформационные флуктуации (характерные времена от мкс до секунды) в тяжах $\beta 2$ и $\beta 3$ (петля II, Рис. 4.52Б). Соответствующие ядра ^{15}N демонстрировали либо высокие значения произведения скоростей релаксации $R1 \times R2$ ($> 18 \text{ c}^{-1}$), либо очень слабую интенсивность в спектрах HSQC. Эти флуктуации, вероятно, также были связаны с конформационным обменом между *цис*- и *транс*-изомерами пептидной связи Leu85-Pro86. Согласно данным о химических сдвигах и о скоростях релаксации, изомеризация этой связи резко меняет конформацию и динамику C-концевого фрагмента и, следовательно, может влиять на соседние β -структурные области. Таким образом, петли LU-домена Lypd6 демонстрируют значительную конформационную пластичность в растворе. Наибольшая подвижность, связанная с движениями в разных временных масштабах (от пикосекунд до секунд), наблюдается на кончиках петель II и III (Рис. 4.52А-В).

Релаксация ядер ^{15}N также позволяет характеризовать вращательную диффузию белков в растворе. Общее время вращательной корреляции, рассчитанное по соотношению $R2/R1$ в «стабильных» областях белка ($\tau_R = 5,6 \pm 0,3 \text{ нс}$), подтвердило, что rLypd6 находится в состоянии мономера в водном растворе.

Таким образом, результаты ЯМР исследования показали, что rLypd6 имеет структуру, напоминающую LU-домены других Ly-6/uPAR белков. Консервативный паттерн дисульфидных связей, обнаруженный в регуляторных трехпетельных белках с GPI-якорем у млекопитающих, включает пять дисульфидных связей: четыре в «голове» и одну в петле I. Аналогичная картина наблюдается также в секретируемых белках (например, SLURP) и в необычных токсинах ядов змей (например, слабый токсин WTX, Рис. 4.17). Уникальной особенностью белка Lypd6 является наличие дополнительной дисульфидной связи в петле III (Cys61-Cys72 для rLypd6). Дополнительным уникальным свойством молекулы Lypd6 является наличие α -спиралей в I и III петлях. Ранее спиральные структурные элементы наблюдались в Ly-6/uPAR белках только по отдельности, либо в I, либо в III петле.

Анализ свойств поверхности LU-домена rLypd6 (Рис. 4.52Г) выявил практически равномерное распределение заряженных и полярных групп. Тем не менее, наблюдается сегрегация гидрофобных/ароматических остатков в циклические структуры, напоминающие пояса. Первый «пояс» сформирован в «голове» молекулы и включает боковые цепи Met0, Phe1, Pro25, Tyr30, Tyr32, Val51, Leu53 и Leu57. Вторым «пояс»

состоит из групп боковых цепей петли I и С-концевого фрагмента (Phe4, Ala10, Tyr13, Trp18, Ala19, Pro20, Ile22, Tyr23, Ile80, Leu83 и Pro84). Оба «пояса» окружают положительно и отрицательно заряженные группы и могут представлять потенциальные сайты взаимодействия с рецепторами-мишенями.

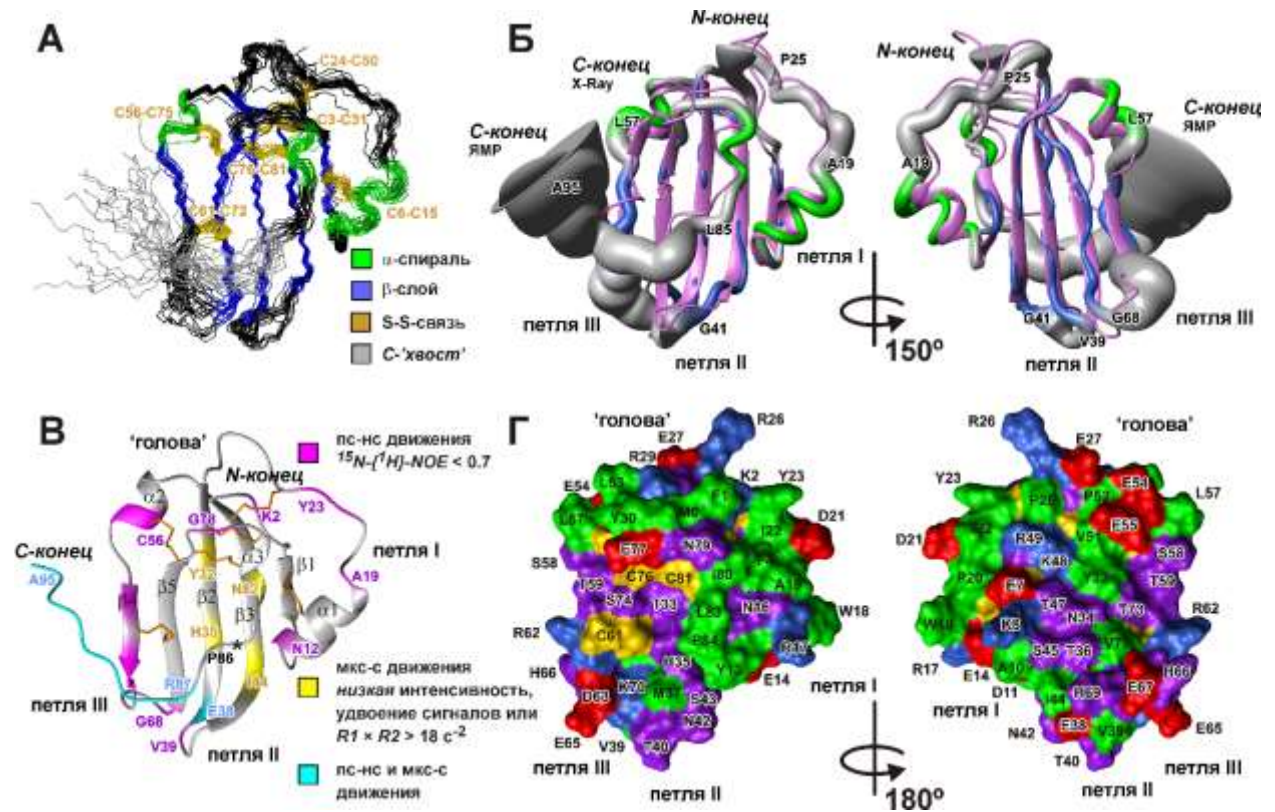


Рис. 4.52. Пространственная структура и динамика rLypd6 в растворе. (А). Наложение 20 лучших структур rLypd6 по атомам основной цепи в областях с четко определенной структурой. Дисульфидные связи, β -слои, α -спирали и гибкий С-концевой фрагмент показаны оранжевым, синим, зеленым и серым цветами соответственно. (Б). Сравнение структуры rLypd6 в растворе с кристаллической. Кристаллическая структура показана фиолетовым цветом в ленточном представлении. Усредненная структура ЯМР показана как «колбаса» с переменным радиусом, равным RMSD в наборе структур. β -слои, α -спирали и области поворотов, витков и неупорядоченной структуры показаны синим, зеленым и серым цветами соответственно. (В). Ленточное представление пространственной структуры rLypd6 с отображенными данными о динамике основной цепи белка. Три петли и «голова» белка помечены. * - указывает положение пептидной связи Leu85-Pro86. (Г). Поверхность молекулы rLypd6, вид с двух сторон. С-концевые остатки Leu85-Ala95 удалены. Гидрофобные/ароматические (Ala, Met, Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Tyr и Pro), полярные (Asn, Gln, Gly, His, Ser и Thr), положительно заряженные (Arg и Lys), и отрицательно заряженные остатки (Asp и Glu) окрашены в зеленый, пурпурный, синий и красный цвета соответственно. Остатки Cys выделены желтым цветом.

Недавно была опубликована кристаллическая структура LU-домена Lypd6 [188]. В указанной работе был использован тот же фрагмент Lypd6 (Phe1 (47) -Ala95 (141)), что и в нашем исследовании, но из-за наличия тегов для очистки и сайта расщепления протеазой, полученный белок содержал дополнительные N- и С-концевые последовательности. Сравнение кристаллической структуры LU-домена Lypd6 со структурой в растворе (Рис. 4.52Б) показало достаточно хорошее соответствие в упорядоченных областях белка. В то

же время области, испытывающие движения с высокой амплитудой, отличаются от кристаллической структуры. Этот результат является ожидаемым, т.к. кристаллизация сильно стабилизирует структуру белка и часто вызывает образование искусственных внутримолекулярных контактов. Например, в кристаллической структуре очень подвижный С-концевой участок Lypd6 изгибается к β -структурному ядру белка и образует дополнительный β -тяж ($\beta 6$). Напротив, структурные и динамические данные, полученные методом ЯМР, показывают, что остатки Pro84(130)-Ala95(141) не принадлежат LU-домену, но представляют собой часть длинного гибкого линкера, необходимого для соединения LU-домена с GPI-якорем.

4.3.3.6. Компьютерное моделирование комплекса rLypd6 с $\alpha 7$ -nAChR

Для анализа возможного механизма взаимодействия rLypd6 с его мишенью мы смоделировали комплексы rLypd6 с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR¹. Ранее наблюдаемая конкуренция GST-Lypd6 с α -Bgtx за связывание с субъединицей $\alpha 7$ -nAChR [186] указала на вероятное связывание Lypd6 в области ортостерического сайта рецептора. Поэтому мы провели белок-белковый докинг rLypd6 с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR, предполагая, что rLypd6 взаимодействует на интерфейсе основной и комплементарной $\alpha 7$ -субъединиц в окрестности С-петли основной субъединицы [141]. Интерфейс взаимодействия на молекуле rLypd6 был ограничен петлевыми участками.

Чтобы учесть структурную подвижность обоих партнеров по взаимодействию, вначале были рассчитаны молекулярно-динамические траектории для rLypd6 и домена рецептора в ячейках с явно заданным растворителем. Значения среднеквадратичной флуктуации (RMSF), полученные для трех 200 нс (суммарно 600 нс) траекторий rLypd6, согласовывались с данными ЯМР, описывающими движения в пс-нс временном диапазоне (Рис. 4.53). Высокоамплитудные колебания наблюдались в петлевых участках и С-концевом фрагменте. В попытке исключить возможное влияние высокой подвижности С-концевого фрагмента на структуру LU-домена, мы повторили вычисления МД для укороченного варианта rLypd6 с удаленными остатками Leu83-Ala95. Однако амплитуда флуктуаций в этих траекториях (600 нс) была больше, чем наблюдаемая в полном размере белке rLypd6 (Рис. 4.53). Чтобы получить более представительную выборку конформации петель, для дальнейшего расчета была использована укороченная молекула rLypd6. Кластеризация полученных МД траекторий привела к конформационному ансамблю содержащему 23 структуры rLypd6.

¹ Совместно с к.б.н. Чугуновым А.О., группа анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН.

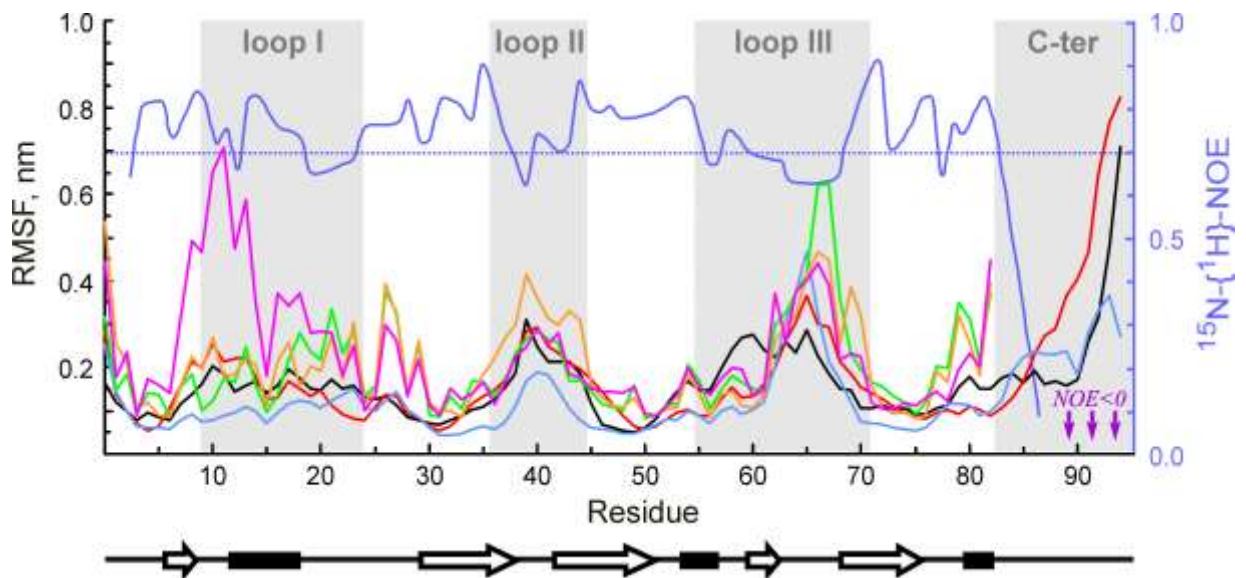


Рис. 4.53. Сравнение средноквадратического отклонения (RMSF) в траекториях МД rLypd6 с значениями $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$ -NOE для амидных групп основной цепи. Значения RMSF показаны для шести 200 нс траекторий: три траектории для rLypd6 и три траектории для rLypd6 с удаленным C-концевым участком (Leu83-Ala95). Порог $\text{NOE} < 0.7$ обозначает остатки с высокоамплитудной подвижностью в пс-нс масштабе времен. Соответствующие регионы в петлях и на C-конце белка обозначены серым фоном.

В МД траекториях внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR наблюдались различные конформации С-петли в разных субъединицах. Некоторые из межсубъединичных интерфейсов находились в «открытом», а некоторые в «закрытом» состоянии. Кластеризация «закрытых» и «открытых» интерфейсов дала 9 и 11 структур, соответственно.

Для каждой пары структур был проведен белок-белковый докинг ($9 \times 23 = 207$ и $11 \times 23 = 253$ отдельных расчетов), и было выбрано 100 лучших моделей. Полученные модели комплекса $\alpha 7$ -nAChR/Lypd6 (20700 и 25300, соответственно) были «отфильтрованы», чтобы выбрать наиболее вероятные комплексы (см. описание процедуры «фильтрации» в разделе Методы). Фильтрацию прошли 4 и 20 решений с «закрытым» и «открытым» ортостерическим участком, соответственно. Две и четыре модели, соответственно, с нереалистичным положением С-конца молекулы rLypd6 относительно ожидаемой поверхности мембраны были удалены (предполагалось, что нативный Lypd6 привязан к мембране с помощью С-концевого GPI-якоря). Репрезентативные модели (одна с «закрытым» и три с «открытым» сайтом) показаны на Рис. 4.54. Подробная «карта» взаимодействий $\alpha 7$ -nAChR/Lypd6 в этих комплексах приведена в Таблице 4.5. В моделях rLypd6 взаимодействует различными петлями с вестибулем ортостерического лиганд-связывающего сайта рецептора и контактирует с внешней («закрытый» сайт) или внутренней («открытый» сайт) сторонами петли С основной субъединицы рецептора (Рис. 4.54).

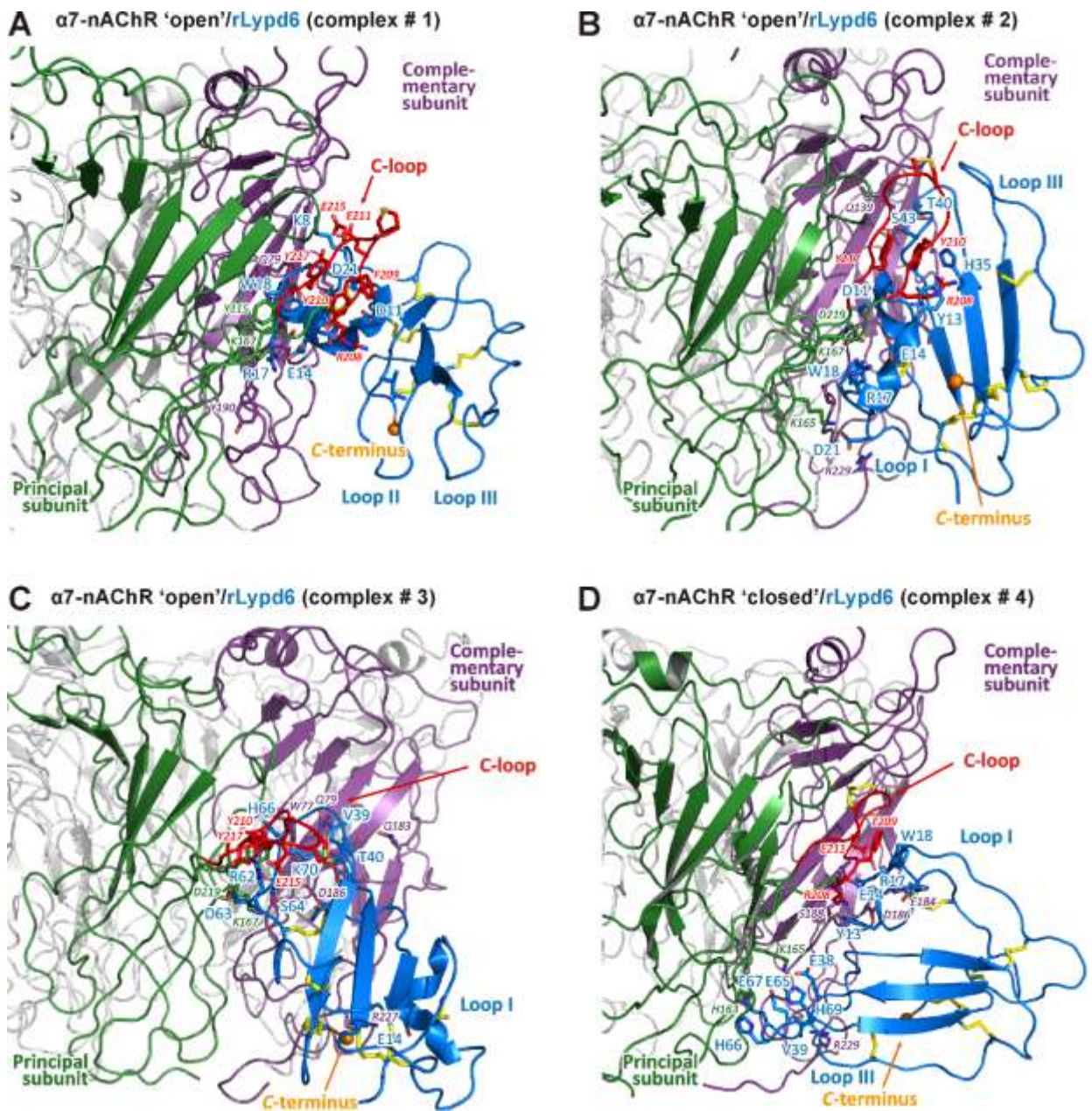


Рис. 4.54. Модели комплексов $\alpha 7$ -nAChR/rLypd6. Результаты моделирования дают спектр решений, где rLypd6 связывается с вестигионом ортостерического сайта $\alpha 7$ -nAChR либо с помощью петли I (A, D; комплексы #1, 4), либо петлями I/II (B; комплекс #2), либо петлями II/III (C; комплекс #3). В комплексах #1-3 сайт связывания рецептора моделировали с «открытой» конформацией С-петли, а комплекс #4 моделировали с «закрытой» С-петлей. Основная (+) субъединица рецептора показана зеленым цветом, комплементарная субъединица (-) – фиолетовым, остальные три субъединицы светло-серого цвета. С-петля основной $\alpha 7$ -субъединицы показана красным. Lypd6 синего цвета, дисульфидные связи желтого цвета. Остатки рецептора и Lypd6, которые образуют «благоприятные» контакты (таблица 4.6), показаны курсивом и жирным шрифтом соответственно. Положение С-конца LU-домена Lypd6 (Asn82) показано оранжевой сферой.

Таблица 4.5. Контакты между rLypd6 и внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR в комплексах с открытым (##1, 2, и 3) и закрытым (#4) положением петли С основной субъединицы рецептора.

rLypd6	$\alpha 7$ -nAChR #1	$\alpha 7$ -nAChR #2	$\alpha 7$ -nAChR #3	$\alpha 7$ -nAChR #4
Лиганд-связывающий сайт	открыт	открыт	открыт	закрыт
Взаимодействующие петли rLypd6	I	I, II	II, III	I-III
Петля I				
Lys 2	(-) Glu 184 (I)			
Lys 8	(+) Glu 211 (I, H) (+) Glu 215 (I) (+) Tyr 217 (H)	(-) Asp 186 (I) (-) Ser 188 (H)		
Ala 9	(+) Glu 211 (H)			
Ala 10		(+) Tyr 210 (H)		
Asp 11	(+) Arg 208 (I, H) (+) Phe 209 (H)	(+) Lys 167 (I, H)		
Asn 12	(+) Tyr 210 (H)			(+) Phe 209 (H)
Tyr 13		(+) Arg 208 (S)		(-) Ser 188 (H)
Glu 14	(+) Lys 167 (I, H)		(-) Arg 227 (I)	(+) Arg 208 (I, H)
Asn 16	(-) Ser 58 (H)			
Arg 17	(-) Ser 188 (H) (-) Tyr 190 (H)	(+) Lys 165 (H)		(+) Glu 211 (I) (-) Ser 56 (H) (-) Leu 57 (H) (-) Ser 58 (H) (-) Glu 184 (I, H) (-) Asp 186 (I)
Trp 18	(+) Tyr 115 (S)	(+) Lys 165 (H) (+) Asp 219 (H)		(+) Phe 209 (S)
Ala 19	(-) Gln 79 (H)			
Asp 21	(-) Ser 56 (H) (-) Gln 183 (H)	(-) Pro 192 (H) (-) Gly 194 (H) (-) Arg 229 (I, H)		
Петля II				
His 35		(+) Tyr 210 (S)		
Glu 38				(+) Lys 165 (I, H)
Val 39			(-) Gln 79 (H)	(-) Arg 229 (H)
Thr 40		(-) Gln 139 (H)	(-) Gln 183 (H)	
Gly 41			(-) Asp 186 (H)	
Asn 42			(-) Ile 187 (H)	
Ser 43		(+) Tyr 210 (H) (+) Tyr 217 (H)		
Ile 44	(+) Arg 208 (H)			
Петля III				
Arg 62			(+) Tyr 210 (H) (+) Glu 215 (I) (+) Tyr 217 (H) (+) Asp 219 (I)	
Asp 63			(+) Tyr 217 (H) (+) Asp 219 (H)	
Ser 64			(+) Lys 167 (H) (-) Gly 189 (H)	
Glu 65				(+) Lys 165 (I)
His 66			(+) Tyr 115 (H, S) (-) Trp 77 (S)	(+) His 163 (H)
Glu 67				(+) Lys 165 (I)
His 69				(+) Lys 165 (I)
Lys 70			(+) Glu 215 (I)	
Всего конт.:	I: 5, H: 20, S: 1	I: 3, H: 13, S: 2	I: 4, H: 14, S: 2	I: 7, H: 13, S: 1

^a (+) означает остатки основной субъединицы; (-) означает остатки комплементарной субъединицы. H, T, и I означают тип взаимодействия: водородная связь, взаимодействие, T-стэкинг, и ионные взаимодействия, соответственно.

4.4. Не-нейрональные эндогенные трехпетельные белки SLURP-1, SLURP-2 и Lynx1

4.4.1. Структурно-функциональные исследования rSLURP-1

Первоначально секретируемый трехпетельный белок человека SLURP-1 был выделен из крови и мочи [328]. С мутациями в гене SLURP-1 связано редкое наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся пальмоплантарной кератодермой, – Mal de Meleda (MDM). Ранее было показано, что SLURP-1 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, предположительно посредством взаимодействия с $\alpha 7$ -nAChR, и может функционировать как аутокринный/паракринный гормон в эпителии [199,200].

Несмотря на наличие данных, подтверждающих модулирующее действие SLURP-1 на nAChR, знания о механизме взаимодействий SLURP-1/nAChR до недавнего времени были очень ограничены. Прогресс в этой области сдерживался невозможностью получения достаточных количеств SLURP-1 из природных источников и трудностями в производстве рекомбинантного белка с природной последовательностью и структурой. Большинство предыдущих работ по SLURP-1 были выполнены с использованием слитных конструкций, содержащих, помимо SLURP-1, некоторые полипептидные фрагменты, например, N-концевой белок SUMO, белок MPB, белок GST или C-концевой Muc-tag [199,200,212,329]. Ранее было показано, что природный SLURP-1, выделенный из крови (MW 8,842 Да, 81 а.о.), и рекомбинантный аналог SLURP-1, продуцируемый в клетках HEK-293 (выход ~ 0,1 мг/л клеточной культуры), не гликозилированы [328,329]. Этот факт позволил использовать бактериальную систему для рекомбинантной продукции SLURP-1. В данной работе мы исследовали механизм действия белка человека SLURP-1 на примере его рекомбинантного аналога, полученного в клетках *E. coli* (rSLURP-1 п.4.1.4, 4.1.5). rSLURP-1 отличается от природного белка наличием одной дополнительной аминокислоты Met на N-конце.

4.4.1.1. rSLURP-1 снижает пролиферацию кератиноцитов, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR

Инкубация клеток Het-1A (иммортилизованная линия кератиноцитов ротовой полости человека) с rSLURP-1 в течение 48 ч приводила к значительному снижению количества жизнеспособных клеток до $60 \pm 2\%$ по отношению к контролю (Рис. 4.55Б). Чтобы различить возможный цитотоксический эффект и сниженную пролиферацию, мы

провели дополнительное микроскопическое исследование клеток. Окрашивание клеток по Hoechst33342/йодистым пропидием позволило наблюдать явное снижение их плотности, но в тоже время морфология большинства клеток была неизменной по сравнению с контролем. Окрашивание не выявило увеличения доли мертвых клеток даже при максимальных концентрациях rSLURP-1 (10 мкМ): 4 ± 1 % мертвых клеток как при обработке rSLURP-1, так и в контроле. Таким образом, воздействие rSLURP-1 на клетки Het-1A приводит к снижению пролиферации. Кроме того, была исследована активность rSLURP-1 в присутствии неспецифического ингибитора каспазной активности z-VAD-fmk, блокирующего ранние стадии апоптоза [330]. Отсутствие влияния z-VAD-fmk на активность rSLURP-1 указало на отсутствие связи между снижением количества жизнеспособных клеток и процессами апоптоза.

Антипролиферативное действие rSLURP-1 на клетки Het-1A было концентрационно-зависимо с EC_{50} равным 4 ± 0.5 нМ (Рис. 4.55Б). Для сравнения, мы анализировали рост клеток в присутствии ws-Lynx1, также действующего на nAChR (п. 4.3.1.4). В этом случае снижения числа клеток не наблюдалось.

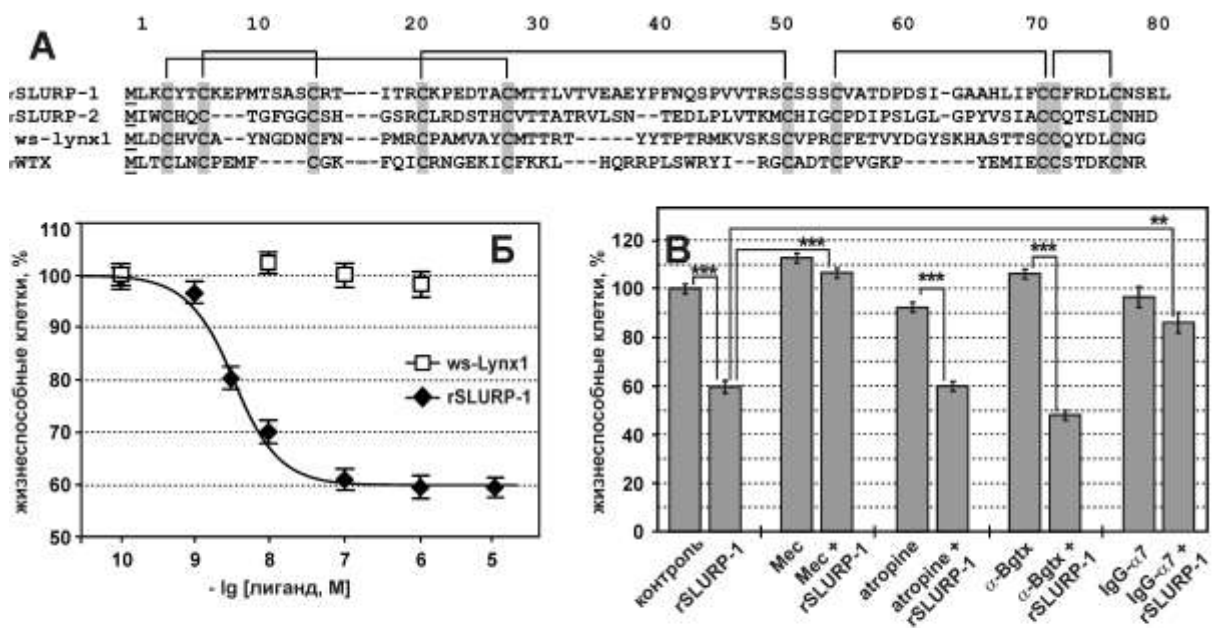


Рис. 4.55. Влияние rSLURP-1 на рост клеток Het-1A. (А). Выравнивание аминокислотной последовательности человеческого SLURP-1, SLURP-2, ws-Lynx1 и необычного токсина WTX из *N. kaouthia*. Остатки цистеина помечены серым, показаны дисульфидные связи; дополнительные N-концевые остатки Met подчеркнуты. (Б). Влияние rSLURP-1 (ромбы) и ws-Lynx1 (квадраты) на рост клеток. Каждая точка означает среднее \pm S.E. из шести независимых экспериментов. После усреднения для EC_{50} , pH и A1 были получены следующие значения: $4,3 \pm 0,6$ нМ, $1,4 \pm 0,2$ и $59,5 \pm 1,3$ % (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 6$). (В). Эффекты rSLURP-1 (1 мкМ), атропина (1 мкМ, atropine), мекамиламина (10 мкМ, Mec), α -Bgtx (1 мкМ) и поликлональных антител против $\alpha 7$ (IgG- $\alpha 7$, 1 мкг на 50 мкл). Каждый столбец означает \pm S.E. 4-6 независимых экспериментов. ** и *** ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно) указывают на достоверное отличие групп согласно t-критерию.

Существует два класса ацетилхолиновых рецепторов, участвующих в холинергической передаче сигналов в эпителии: никотиновые рецепторы, которые являются лиганд-управляемыми ионными каналами, и мускариновые рецепторы, которые

являются рецепторами, связанными с G-белком (GPCR, Глава 1). Кератиноциты экспрессируют оба типа рецепторов [331]. Некоторые структурные гомологи SLURP-1, например, необычный токсин WTX (п. 4.2.2.3.1 и 4.2.2.3.2) и ws-Lynx1 (п. 4.3.1.3) способны взаимодействовать с обоими классами рецепторов, nAChR и mAChR. Для исследования возможных взаимодействий SLURP-1 с разными классами холинорецепторов был проведен анализ антипролиферативного эффекта rSLURP-1 в присутствии мекамиламина (Мес) и атропина (atropine), – неселективных ингибиторов nAChR и mAChR, соответственно. Результаты (Рис. 4.55B) показали, что Мес не влияет на рост клеток, но при этом полностью блокирует антипролиферативный эффект rSLURP-1. Атропин не влиял ни на рост клеток, ни на антипролиферативный эффект rSLURP-1. Таким образом, никотиновые рецепторы являются мишенью SLURP-1 в кератиноцитах. Активность белка была также исследована в присутствии антител против внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR. Было обнаружено, что применение анти- $\alpha 7$ -антител не влияет на рост клеток, но значительно ингибирует антипролиферативную активность rSLURP-1 (относительное количество жизнеспособных клеток увеличилось с ~ 60% до ~ 85%, Рис. 4.55B). Таким образом, именно $\alpha 7$ -nAChR является основной мишенью rSLURP-1 в клетках. В тоже время преинкубация кератиноцитов с α -Bgtx (конкурентный антагонист мышечного, а также $\alpha 7$ - и $\alpha 9$ -nAChR) не влияла на антипролиферативный эффект rSLURP-1 (Рис 4.55B). Эти данные указали на возможный неклассический механизм взаимодействия SLURP-1/ $\alpha 7$ -nAChR, не похожий на взаимодействие рецептора с агонистами и конкурентными антагонистами.

4.4.1.2. rSLURP-1 селективно связывается с $\alpha 7$ субъединицами nAChR, экстрагированными из коры головного мозга человека

Чтобы дополнительно охарактеризовать потенциальные мишени rSLURP-1, мы провели аффинную очистку различных субъединиц nAChR с использованием магнитных частиц с ковалентно-пришитым rSLURP-1, аналогично тому, как это было сделано для ws-Lynx1¹ (п.4.3.1.7). Из-за низкой экспрессии никотиновых рецепторов в кератиноцитах [331] мы использовали другую ткань: экстракты коры головного мозга человека. Используя этот подход, было показано, что rSLURP-1 связывает $\alpha 7$ субъединицу nAChR, но не $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$, или $\beta 4$ субъединицы (Рис. 4.56). Более того, rSLURP-1 не связывал субъединицы гомологичного nAChR серотонинового (5-HT₃) рецептора. Ни одна из исследуемых субъединиц не была обнаружена при аффинной очистке с магнитными

¹ Совместно с проф. М. Томсенем, Университет Копенгагена.

частицами без иммобилизованного белка, что подтвердило специфичность взаимодействия SLURP-1/ $\alpha 7$ -nAChR. Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что rSLURP-1 связывается исключительно с $\alpha 7$ субъединицей nAChR (Рис. 4.56). Это поразительно отличается от фармакологического профиля ws-Lynx1, который в аналогичных экспериментах демонстрирует взаимодействие с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединицами nAChR (п. 4.3.1.7).

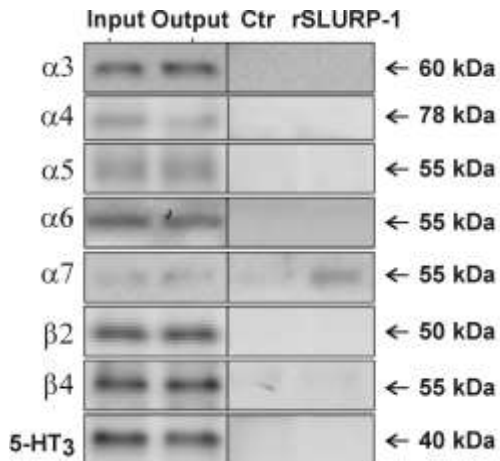


Рис. 4.56. rSLURP-1 связывает $\alpha 7$ субъединицы nAChR в мозге человека. Аффинную очистку проводили с помощью магнитных частиц, ковалентно связанных с rSLURP-1, или «пустых» частиц (Ctrl), используя гомогенат коры человека ($n = 2$). Образцы анализировали гель-электрофорезу и вестерн-блоттингу вместе с образцами гомогената, используемого для аффинной очистки (Input), и оставшегося гомогената после аффинной очистки (Output) с последующей детекцией субъединиц nAChR с помощью специфических антител.

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

Чтобы охарактеризовать действие rSLURP-1 на $\alpha 7$ -nAChR, были проведены электрофизиологические эксперименты на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих этот рецептор в присутствии 200 пМ - 40 мкМ rSLURP-1¹ (Рис. 4.57). В микромолярных концентрациях rSLURP-1 вызывал ингибирование ответа на ACh на 32 % по отношению к контролю (IC_{50} 940 \pm 80 нМ, Рис. 4.57А,Б), при этом сам по себе rSLURP-1 не влиял на проводимость канала в отсутствие ACh. Ингибирующая активность 5 мкМ rSLURP-1 была протестирована при различных концентрациях ACh (1 мкМ – 1 мМ, Рис. 4.57В). При низких концентрациях ACh не обнаруживалось эффекта ингибирования, он становился достоверным ($p < 0.05$, t-критерий), начиная с 100 мкМ ACh. Этот эффект напоминает ранее описанный ингибирующий эффект ws-Lynx-1. Непосредственное сравнение эффектов 5 мкМ ws-Lynx1 и rSLURP-1 на токи, вызванные 1 мМ ACh, показало сопоставимый уровень ингибирования (~50%, Рис. 4.57В). Более того, аппликация rSLURP-1 (1 мМ) не влияла на дозозависимую кривую ACh, что означает отсутствие конкуренции между этими лигандами (Рис. 4.57Г). Это позволяет сделать предположение, что rSLURP-1 действует не как ингибитор, а регулирует функцию рецептора в

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и к.б.н. Д.С. Кудрявцевым, Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

присутствии его агонистов, то есть действует наподобие негативного аллостерического модулятора.

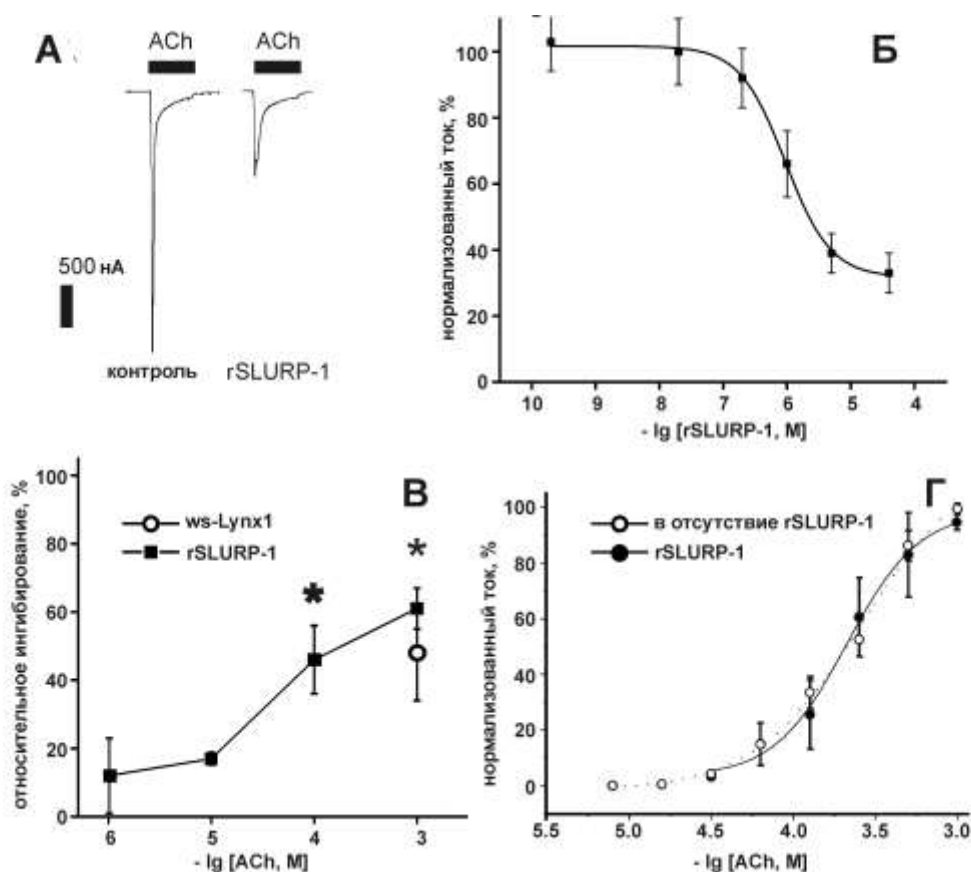


Рис. 4.57. Ингибирование ACh-индуцированного тока через $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*, с помощью rSLURP-1. (A). Электрофизиологические записи ингибирования $\alpha 7$ -nAChR с помощью 13 мкМ rSLURP-1. Токи были получены в ответ на 20 секундные импульсы 100 мкМ ACh (горизонтальные черточки). Ингибирование амплитуды тока наблюдали после 5-минутной предварительной инкубации с 13 мкМ rSLURP-1. Вертикальная черта представляет текущую шкалу (500 нА). (Б). Кривая доза-эффект влияния rSLURP-1 на ток, вызванный 1 мМ ACh. Каждая точка означает среднее \pm S.E. независимых измерений на трех ооцитах. После усреднения данных трех независимых экспериментов для IC_{50} , pH и A1 были получены следующие значения: $1,1 \pm 0,5$ мкМ, $1,4 \pm 0,3$ и $31 \pm 3\%$ (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 3$). (В). Зависимость эффекта 5 мкМ rSLURP-1 на $\alpha 7$ -nAChR от концентрации ACh. Данные по ингибированию, вызванному rSLURP-1, показаны закрашенными квадратами, влияние 5 мкМ ws-Lynx1 на 1 мМ ACh показан кружком. Звездочки указывают на значимое ($p < 0,05$, t-критерий) отличие от ингибирования рецептора rSLURP-1 при 1 мкМ ACh. (Г). Кривые доза-эффект для амплитуды ACh-индуцированного тока в отсутствие (пунктирная линия, пустые кружки) и в присутствии (сплошная линия, заполненные кружки) 1 мкМ rSLURP-1. Рассчитанные параметры EC_{50} и pH составили 232 ± 25 мкМ и $1,9 \pm 0,3$ в отсутствие rSLURP-1, и 214 ± 60 мкМ и $2,2 \pm 0,3$ в присутствии rSLURP-1 (среднее значение \pm S.E., $n = 3$).

Следует отметить, что ранее для рекомбинантного аналога SLURP-1 с C-концевым Мус-тагом было продемонстрировано увеличение токов через $\alpha 7$ -nAChR в наномолярных концентрациях [329]. В настоящей работе увеличение амплитуды токов при аппликации rSLURP-1 не было обнаружено в широком диапазоне концентраций (Рис. 4.57Б). Возможно, это несоответствие определяется различием в аминокислотной последовательности различных вариантов SLURP-1. Мус-таг содержит 10 аминокислотных остатков (EQKLISEEDL), пять из которых заряжены. Добавление такой относительно длинной отрицательно заряженной C-концевой последовательности могло повлиять на свойства молекулы SLURP-1 и ее взаимодействие с рецептором. Участие

длинной С-концевой последовательности трехпетельных α -нейротоксинов из яда змей во взаимодействии с $\alpha 7$ -nAChR было описано ранее [258].

Между rSLURP-1 и α -Bgtx наблюдалась конкуренция за связывание с nAChR мышечного типа и AChBP¹ (Fig. 4.58A). Эти данные позволяют предположить, что сайт связывания rSLURP-1, по крайней мере, частично перекрывается с сайтами связывания α -нейротоксинов на этих мишенях. В противоположность этому, в клетках GH₄C1, сверхэкспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR, конкуренция между rSLURP-1 и α -Bgtx не наблюдалась (Рис. 4.58Б). В то же время аффинная очистка показала, что rSLURP-1 способен связываться с $\alpha 7$ субъединицей nAChR в этих клетках, хотя и с более низкой аффинностью, чем α -Bgtx (Рис. 4.58В).

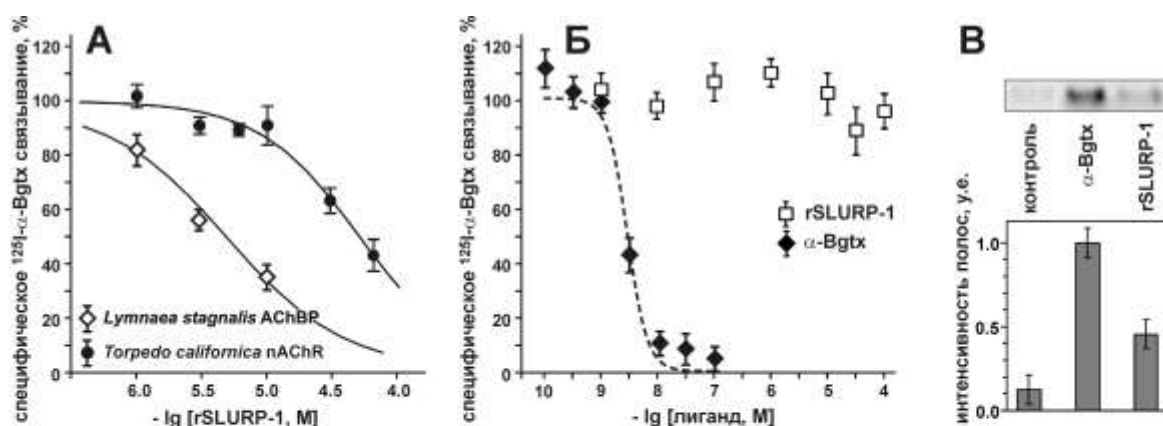


Рис. 4.58. Конкуренция rSLURP-1 с ¹²⁵I- α -Bgtx за связывание с Ls-AChBP, мембраносвязанным мышечным nAChR из *Torpedo californica* и $\alpha 7$ -nAChR в клеточной линии GH₄C1. (A). Каждая точка означает среднее \pm S.E. из трех независимых экспериментов. После усреднения были получены следующие значения для IC₅₀ и nH: 4,8 \pm 0,9 мкМ, 0,92 \pm 0,17 для Ls-AChBP, 54 \pm 15 мкМ и 1,3 \pm 0,3 для nAChR *T. californica* (среднее значение \pm S.E., n = 3). (Б). Вытеснение ¹²⁵I- α -Bgtx немеченым Bgtx и rSLURP-1 из $\alpha 7$ -nAChR в клетках GH₄C1. (В). Аффинную очистку субъединицы $\alpha 7$ -nAChR проводили с использованием магнитных частиц, ковалентно связанных с rSLURP-1 и α -Bgtx, или с «пустыми» частицами (контроль) на клетках GH₄C1, сверхэкспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR (n=2). Использовали 40 мкл клеток GH₄C1 с конечной концентрацией сайтов связывания α -Bgtx 0,4 нМ. Блоты анализировали денситометрией с использованием программного обеспечения ImageJ.

Вместе с данными об отсутствии конкуренции между rSLURP-1 и ACh на ооцитах *Xenopus*, экспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 4.57Г), эти результаты означают, что rSLURP-1 связывается с $\alpha 7$ -nAChR вне классического ортостерического сайта (сайта связывания агонистов и конкурентных антагонистов). Похожие результаты были получены для ws-Lynx1, который в концентрации 10 мкМ ингибировал токи через $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, и $\alpha 3\beta 2$ рецепторы, но не конкурировал с ¹²⁵I- α -Bgtx за связывание с $\alpha 7$ -nAChR в клетках GH₄C1 (п. 4.3.1.3 и 4.3.1.4).

Наблюдаемую разницу в два порядка между эффективными концентрациями rSLURP-1 в различных экспериментах (\sim 4 нМ для ингибирования пролиферации

¹ Совместно с чл.-кор. В.И. Цетлиным и д.х.н. И.Е. Кашеверовым, Отдел молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН

кератиноцитов и ~ 1 мкМ для подавления токов через $\alpha 7$ -nAChRs в ооцитах) можно объяснить следующим образом. Во-первых, мы не можем полностью исключить вероятность того, что $\alpha 7$ рецепторы в кератиноцитах могут отличаться от рецепторов, экспрессированных в ооцитах *Xenopus*. Однако, более вероятным представляется предположение о том, что ингибирование пролиферации в кератиноцитах препаратом rSLURP-1 не связано непосредственно с модуляцией токов через Ca^{2+} -проводящие $\alpha 7$ -nAChR. Это предположение согласуется с отсутствием антипролиферативной активности у ws-Lynx1, который на $\alpha 7$ -nAChR демонстрирует модуляторную активность, сравнимую с rSLURP-1 (Рис. 4.55А и 4.57В). Тот факт, что α -Bgtx, необратимый ингибитор $\alpha 7$ -nAChR не влияет на активность rSLURP-1 в кератиноцитах, также говорит в пользу участия “неклассического” метаботропного сигнального пути через $\alpha 7$ -nAChR, который активирует внутриклеточные сигнальные каскады без открытия канала рецептора.

Взаимодействие rSLURP-1 с высокоаффинным сайтом на поверхности $\alpha 7$ -nAChR может быть ответственно за активацию метаботропного пути передачи сигнала, а связывание с низкоаффинным сайтом – за ингибирование ионных токов через канал рецептора. Эта гипотеза объясняет результаты ко-аппликации SLURP-1 с различными ингибиторами $\alpha 7$ -nAChR на кератиноцитах: неспецифический трансмембранный блокатор Мес ингибирует и метаботропный и ионотропный сигнальные пути, а конкурентный антагонист α -Bgtx - только ионотропный.

Гипотеза об участии SLURP-1 в метаботропном сигналинге через $\alpha 7$ -nAChR была также предложена проф. С. Грандо и коллегами [212], когда они показали, что ингибирование тока Ca^{2+} через $\alpha 7$ -nAChR в безкальциевой среде, а также добавление Cd^{2+} или Zn^{2+} только частично подавляют эффекты SLURP-1 на кератиноцитах. Согласно недавним публикациям, метаботропный сигнальный путь через $\alpha 7$ -nAChR может включать различные эффекторные молекулы, такие как Jak2 киназа [212], рецепторные тирозинкиназы EGF и VEGF [332,333] и G-белки [51].

4.4.1.4. Пространственная структура и динамика rSLURP-1

В ЯМР-спектрах $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -меченного препарата rSLURP-1 было идентифицировано два набора сигналов, соответствующих двум структурным формам белка¹. Эта конформационная гетерогенность была вызвана *цис-транс* изомерией пептидной связи Tyr39-Pro40 (характерное время переходов ~ 4 мс). Две структурные формы rSLURP-1 обладали примерно равной заселенностью в растворе. Используя $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -меченный белок,

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым, к.б.н. А.С. Парамоновым, группа структурной биологии ИБХ РАН.

была определена пространственная структура для двух структурных форм rSLURP-1 и исследована их динамика в растворе (Рис. 4.59). Обе формы белка имеют типичную трехпетельный фолд с двумя антипараллельными β -листами. Первый β -лист сформирован двумя β -тяжами и включает остатки петли I (Leu1-Thr5 и Thr17-Cys21). Второй состоит из трех тяжей и включает фрагменты петли II (Ala26-Leu32, Thr48-Ser52) и петли III (Leu68-Cys72). Аналогично другим трехпетельным белкам, в структуре rSLURP-1 наблюдаются два консервативных β -поворота в области “головы” и C-концевой последовательности (Рис. 4.59B). C-концевая последовательность закреплена в пространстве относительно N-концевого β -тяжа водородными связями HN(Lys2)–O δ 1(Asn75) и HN(Leu76)–CO(Lys2).

Пространственная структура обоих конформеров rSLURP-1 хорошо определялась по данным ЯМР только в консервативном β -структурном ядре молекулы, в то время как три петли и C-концевая последовательность белка принимали разнообразные конформации (Рис. 4.59A). Полученные данные ^{15}N релаксации показали, что отсутствие структурной конвергенции в этих областях является следствием подвижности основной цепи белка на двух временных диапазонах – (пс-нс и мкс-мс, см. Рис. 4.59B,В).

Основные детерминанты, отвечающие за взаимодействие трехпетельных белков с nAChR, расположены в их петлях. Например, петля II α -нейротоксинов (п. 4.2.2), петли II и III ws-Lynx1 (п. 4.3.1.5) и петля I rLypd6 (п. 4.3.4.6) вероятно важны для холинергической активности этих белков. Полученные структурные данные (Рис. 4.59A,Б) указывают на значительную конформационную подвижность всех трех петель rSLURP-1, ранее не наблюдавшуюся для других трехпетельных лигандов nAChR. Сравнение последовательностей этих лигандов с SLURP-1 (Рис. 4.60) показало значительные отличия в распределении зарядов в областях петель. В отличие от Lynx1 и α -нейротоксинов, которые заряжены положительно, молекула SLURP-1 имеет отрицательный суммарный заряд. Другое распределение зарядов и отличия в структурных и динамических свойствах дополнительно указывает на то, что SLURP-1 возможно взаимодействует с альтернативным сайтом на поверхности $\alpha 7$ -nAChR.

Высокоамплитудная подвижность больших фрагментов rSLURP-1 (~60% остатков rSLURP-1 участвуют в интенсивных движениях в пс-нс и/или мкс-мс диапазонах) напоминает ситуацию с нативно разупорядоченными белками (intrinsically disordered proteins или IDP), многие из которых играют ключевую роль в процессах сигнализации и регуляции в клетках [334]. Можно предположить, что неупорядоченные фрагменты SLURP-1 могут обеспечивать обратимое взаимодействие с несколькими белками-мишенями или несколькими сайтами на поверхности одного рецептора. В этом случае предполагаемая активация ионотропного и метаботропного сигнальных путей с помощью

SLURP-1 (п. 4.1.4.3) может достигаться через взаимодействие с различными сайтами на поверхности $\alpha 7$ -nAChR.

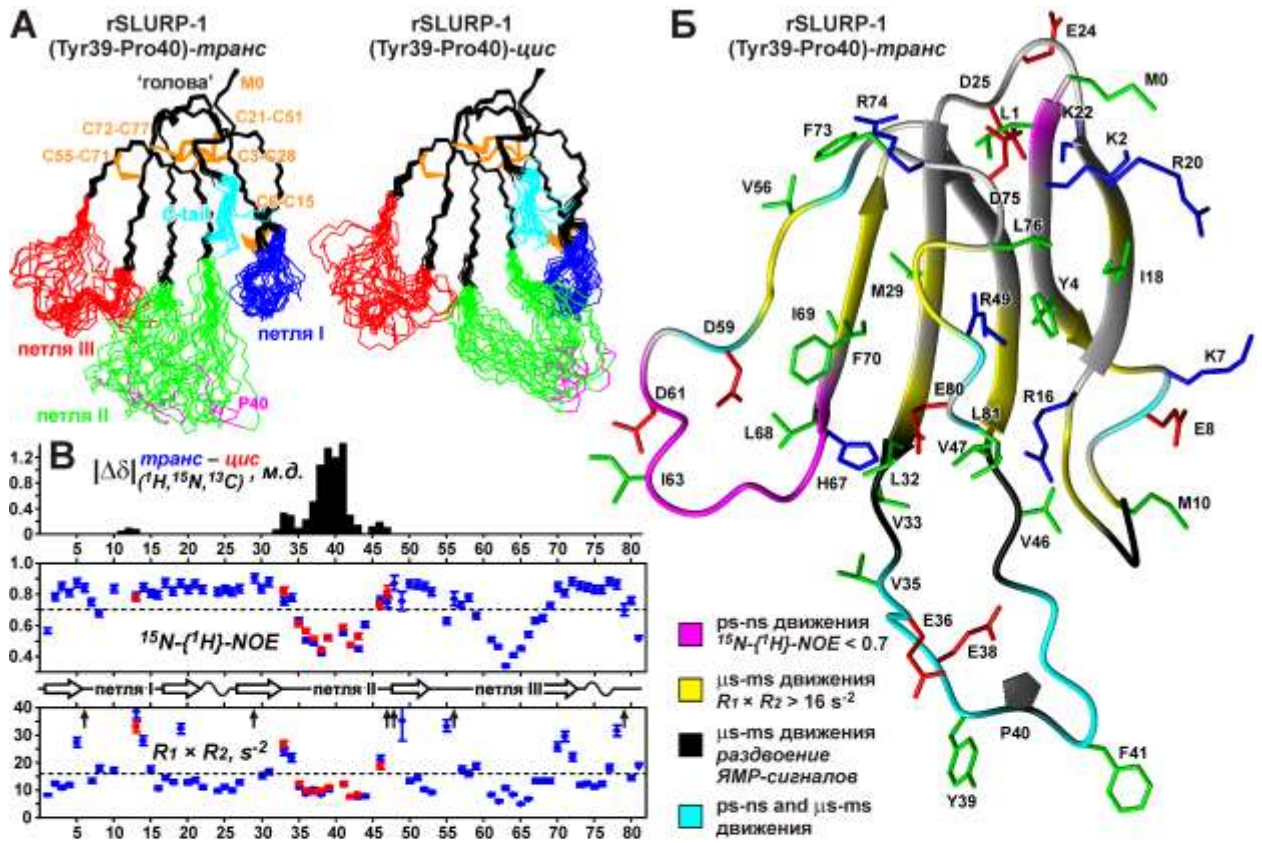


Рис. 4.59. Пространственная структура и динамика основной цепи двух структурных форм rSLURP-1, имеющих транс- и цис-конформацию пептидной связи Tyr39-Pro40. (А). Ансамбли 20 лучших структур, рассчитанных по данным ЯМР, для двух конформационных состояний белка. Дисульфидные связи показаны оранжевым цветом. Отмечены три петли, «голова» и С-концевой фрагмент белка. (Б). Ленточное представление транс-конформера rSLURP-1. Положительно заряженные остатки (Arg/Lys) и его боковые цепи выделены синим цветом. Боковые цепи с отрицательно заряженными остатками (Asp/Glu) и ароматическими/гидрофобными остатками (Phe/Tyr и Ile/Leu/Met/Val) показаны красным и зеленым цветом, соответственно. Основная цепь rSLURP-1 окрашена в соответствии с полученными динамическими данными ЯМР. (В). Обобщение данных, описывающих динамику основной цепи двух структурных форм rSLURP-1. Показаны усредненная разность химических сдвигов ядер ^1HN , ^1Ha , ^{13}Ca , ^{13}Cb и ^{15}NH между двумя структурными формами белка ($\delta\Delta$), значения стационарного $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$ -NOE и произведение скоростей релаксации ядер ^{15}NH ($R_1 \times R_2$). Разности ^{13}C и ^{15}N химических сдвигов были масштабированы с коэффициентами 0,5 и 0,2, соответственно. Значения NOE и $R_1 \times R_2$ для цис-конформера показаны красным. Остатки, демонстрирующие значения NOE < 0,7, вовлечены в высокоамплитудные движения в пс-нс временном диапазоне. Остатки, демонстрирующие расщепление сигналов ЯМР на несколько пиков или имеющие значения $R_1 \times R_2 > 16 \text{ s}^{-2}$, вовлечены в движения в масштабе времен мкс-мс. Вторичная структура rSLURP-1 показана отдельной строкой. β -тяжи и β -повороты обозначены стрелками и волнистыми линиями, соответственно.

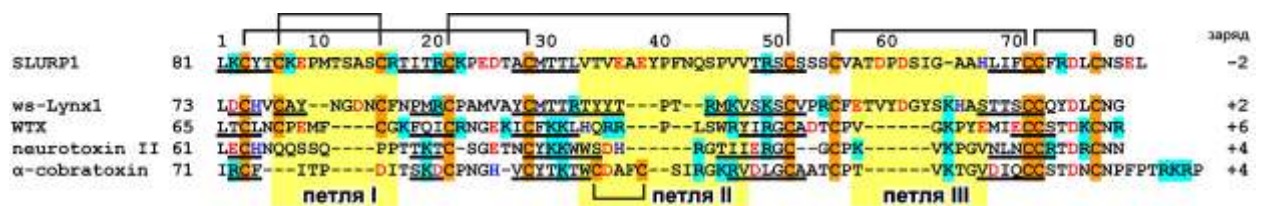


Рис. 4.60. Выравнивание аминокислотной последовательности SLURP-1, ws-Lynx1, токсина WTX из *Naja kaouthia*, нейротоксина II из *Naja oxiana* и α -кобратоксина из *Naja kaouthia*. Показаны положительно заряженные (Arg/Lys), отрицательно заряженные (Asp/Glu), His и Cys остатки. Фрагменты, соответствующие β -тяжам в пространственных структурах белков, подчеркнуты. Области петель выделены желтым фоном.

4.4.2. Структурно-функциональные исследования rSLURP-2

Ранее было показано, что SLURP-2 (второй секретируемый белок человека семейства Lu-6/uPAR) стимулирует рост кератиноцитов [201]. Предполагалось, что ауто/паракринная активность SLURP-2 опосредована его взаимодействием с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, но не с $\alpha 7$ -nAChR [201]. Кератиноциты полости рта, на которых ранее проводились исследования, и также использованные в данной работе, экспрессируют субъединицы nAChR нескольких типов ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 4$) и M2-M5-типы mAChR [3]. Холинергические рецепторы регулируют клеточную адгезию, миграцию, клеточный цикл, апоптоз и дифференцировку, и их репертуар меняется во время клеточного развития [3].

Здесь мы впервые описываем функциональные и структурные свойства рекомбинантного аналога SLURP-2 человека (rSLURP-2), отличающегося от природного белка только одним дополнительным аминокислотным остатком (*N*-концевой Met, который появляется вследствие трансляции стартового кодона *atg*).

4.4.2.1. rSLURP-2 может взаимодействовать с различными подтипами nAChR

Чтобы подтвердить, что nAChR является мишенью для SLURP-2, и охарактеризовать возможный фармакологический спектр его активности, мы выбрали модельную систему с большой плотностью рецепторов, а именно экстракты головного мозга. Аффинную очистку субъединиц nAChR из экстрактов височной коры человека проводили с использованием магнитных частиц с иммобилизованным на их поверхности rSLURP-2 с последующим вестерн-блот анализом¹. Специфичность взаимодействия субъединиц nAChR с rSLURP-2 подтверждали в контрольных экспериментах с «пустыми» частицами (Рис. 4.61). Несмотря на наличие некоторого неспецифического связывания, наблюдаемого для «пустых» частиц, мы пришли к выводу, что rSLURP-2 может взаимодействовать с субъединицами $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ (Рис. 4.61). Для субъединицы $\alpha 6$ была обнаружена лишь небольшая разница в интенсивностях полос между частицами, содержащими rSLURP-2, и контрольными частицами ($n=2$); таким образом, мы не можем быть уверены в специфичности связывания с этой субъединицей. Похожий фармакологический спектр был описан ранее для ws-Lynx1, который также способен взаимодействовать с множеством α и β субъединиц nAChR (п. 4.3.1.7). Напротив, rSLURP-1 проявлял сродство только к $\alpha 7$ субъединице (п. 4.4.1.2).

¹ Совместно с проф. М. Томсенем, Университет Копенгагена.

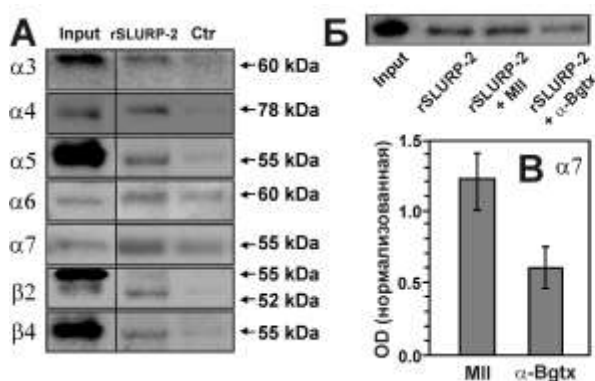


Рис. 4.61. rSLURP-2 связывается с различными субъединицами nAChR в экстрактах головного мозга человека. Аффинную очистку выполняли с помощью rSLURP-2, ковалентно связанного с магнитными частицами, или «пустыми» частицами (Ctrl). Экстракты анализировали с помощью вестерн-блоттинга вместе с образцами гомогената, использованными для аффинной очистки (Input). Представлен репрезентативный блот, полученный в одном (из двух) независимых экспериментов. Для субъединицы $\beta 2$ наблюдались две полосы. Как показано ранее, только нижняя полоса соответствует субъединице $\beta 2$.

4.4.2.3. Электрофизиологические исследования взаимодействия rSLURP-2 с nAChR человека

Чтобы подтвердить наличие взаимодействия rSLURP-2 с функционально-активными nAChR, эффекты rSLURP-2 были охарактеризованы на нескольких широко распространенных и важных подтипах рецептора ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 7$), экспрессированных в ооцитах *Xenopus*¹. Амплитуду вызванных ACh токов, зарегистрированных в отсутствие rSLURP-2, сравнивали с токами, наблюдаемыми в присутствии 30 нМ - 3 мкМ белка. Было показано, что аппликация rSLURP-2 самого по себе не вызывало токов ни на одном из протестированных рецепторов. Воздействие rSLURP-2 вызывало умеренное ингибирующее влияние на токи, вызванные ACh, на $\alpha 3\beta 2$ -nAChR ($IC_{50} > 3$ мкМ), в то время как наблюдалось четкое зависимое от концентрации ингибирование $\alpha 4\beta 2$ рецептора ($IC_{50} \sim 1,7$ мкМ) (Рис. 4.62А-Г). Аналогично, rSLURP-2 ингибировал $\alpha 7$ рецептор с $IC_{50} \sim 3$ мкМ. Однако при низких концентрациях (<1 мкМ) ответ, вызванный ACh на $\alpha 7$ рецепторе, усиливался в присутствии rSLURP-2.

Для дальнейшего исследования механизма усиления ответа на ACh в присутствии низких концентраций rSLURP-2, был разработан протокол с нерегулярной стимуляцией рецептора. Как показано на рисунке 4.62Ж (n = 9), аппликация 30 нМ rSLURP-2 приводила к значительному усилению тока, вызванного ACh, через $\alpha 7$ -nAChR. Потенцирование токов, наблюдаемых с использованием этого экспериментального протокола, соответствовало усилению ответа ACh на кривой доза-ответ (Fig. 4.62Е), однако амплитуда эффекта была значительно больше.

¹ Совместно с проф. Д.Бертраном, HiQScreen Sàrl, Женева, Швейцария

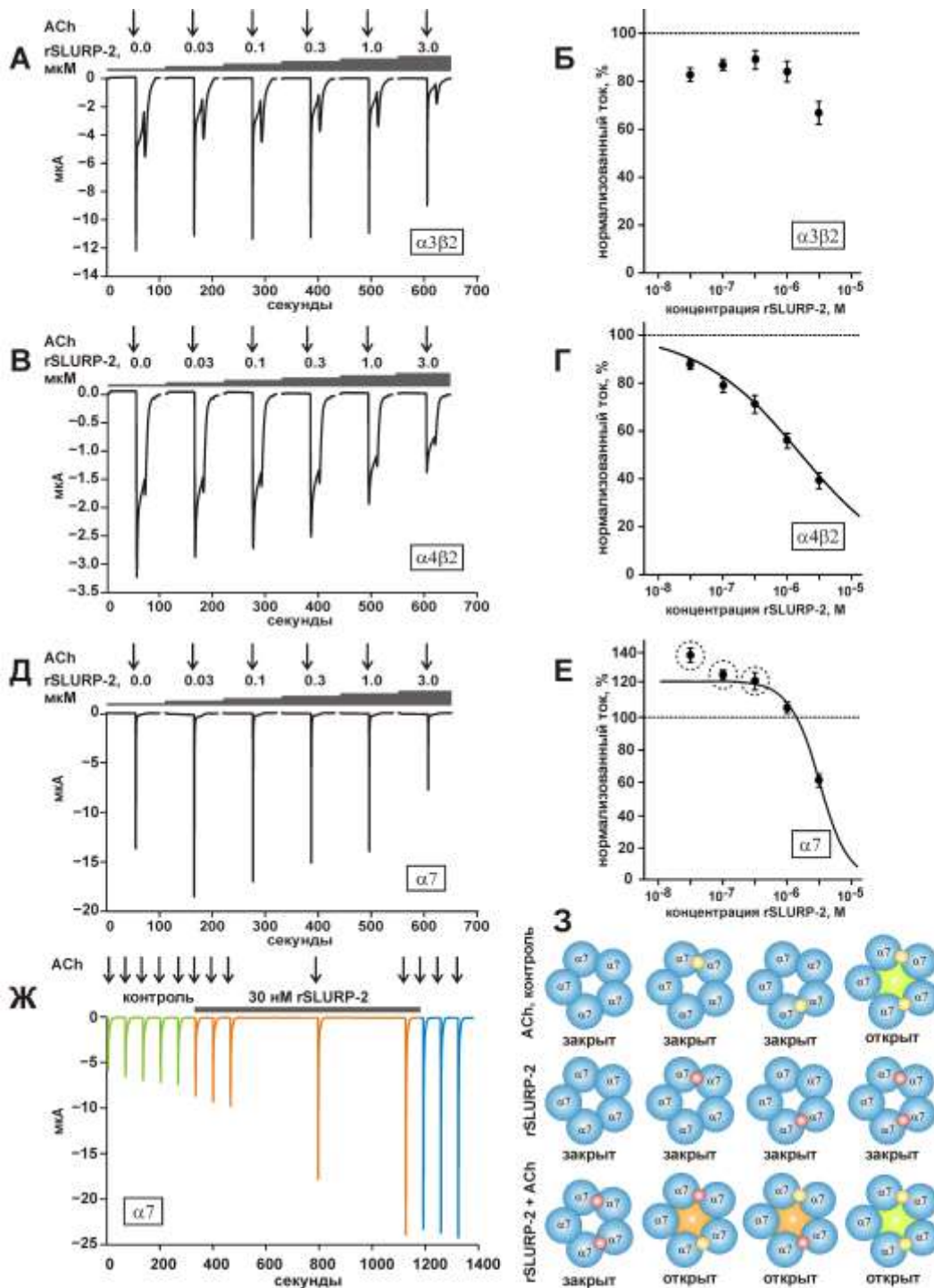


Рис. 4.62. Влияние rSLURP-2 на nAChR, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*. (А,В,Д). Электрофизиологические записи токов, вызванных 100, 10 и 100 μ М АСh на $\alpha 3\beta 2$ -, $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, соответственно. Концентрации АСh были аналогичны концентрациям половинной активации (EC_{50}) соответствующих подтипов рецепторов. 5-секундные импульсы АСh обозначены стрелками над кривыми. Концентрация rSLURP-2 указана над трейсами. (Б,Г,Е). Кривые доза-ответ для вызванных АСh токов в присутствии rSLURP-2 в $\alpha 3\beta 2$ -, $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm S.E. из семи, шести и семи независимых экспериментов, соответственно. Уравнение Хилла ($y = A_0 / (1 + ([rSLURP-2]/IC_{50})^n)$) соответствовало нормированным данным (% от контроля), полученным для рецепторов $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$. Для рецептора $\alpha 4\beta 2$ значение параметра масштабирования (A_0) было зафиксировано на уровне 100%. Расчетное значение A_0 для рецептора $\alpha 7$ составило $122 \pm 3\%$. Рассчитанные параметры IC_{50} и nH составляли $1,7 \pm 0,4$ μ М и $0,54 \pm 0,03$, а также $3,0 \pm 0,2$ μ М и $1,90 \pm 0,14$ для рецепторов $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$, соответственно. (Ж). Электрофизиологические записи тока, вызванного АСh, на $\alpha 7$ -nAChR в отсутствие и в присутствии 30 нМ rSLURP-2. Токи вызывались 5-секундными импульсами по 40 μ М АСh. Импульсы АСh прерывались периодами молчания. Показан один репрезентативный трейс из девяти независимых экспериментов. Зеленые кривые представляют собой ответы, вызванные АСh в отсутствие rSLURP-2, оранжевые кривые представляют собой ответы, вызванные тем же тестовым импульсом АСh в присутствии rSLURP-2, а синие кривые представляют собой ответы, вызванные АСh после прекращения подачи rSLURP-2. (3). Схема, демонстрирующая праймирующую активность SLURP-2 на $\alpha 7$ -nAChR. Молекулы АСh и SLURP-2 обозначены как желтые и красные сферы, соответственно. Открытые каналы $\alpha 7$ -nAChR обозначены зеленым и оранжевым фоном. Закрытые каналы обозначены белым фоном.

Усиление вызванного ACh тока, наблюдаемого на кривой доза-ответ для rSLURP-2 (Рис. 4.62Е, пунктирные кружки), напоминает ранее наблюдаемый нами эффект усиления токов в присутствии низких концентраций ws-Lynx1. Кроме того, похожие эффекты были описаны ранее для конкурентного ингибитора тубокурарина на $\alpha 3\beta 4$ -nAChR [335]. Было показано, что при низкой концентрации тубокурарин связывается только в одном (из двух) лиганд-связывающих сайтах рецептора, что способствует открытию канала при взаимодействии ACh с другим сайтом. Аналогичные наблюдения и выводы были получены при исследованиях нескольких холинергических препаратов (атропин, скополамин и физостигмин), которые демонстрировали конкурентное связывание на рецепторе $\alpha 4\beta 2$ типа [336]. Усиление ACh-вызванного тока при низких концентрациях лиганда также было описано для частичных агонистов $\alpha 7$ -nAChR: RG348739 и энциниклина EVP-612440.

Предложенный механизм активации $\alpha 7$ -nAChR (эффект прайминга, priming effect) в присутствии низких концентраций rSLURP-2 проиллюстрирован на Рис. 4.623. Эти рецепторы состоят из пяти идентичных субъединиц и активируются взаимодействием по меньшей мере с двумя молекулами ACh. Напротив, связывание $\alpha 7$ -nAChR с SLURP-2 не вызывает ток через канал. Если концентрация SLURP-2 низкая, то только некоторые рецепторы связаны с одной или двумя молекулами SLURP-2, и они остаются закрытыми. Добавление ACh в присутствии такой низкой концентрации rSLURP-2 приводит к ситуации, когда некоторая доля рецепторов занята одной молекулой ACh и одной молекулой SLURP-2. Эти рецепторы активируются (обозначены оранжевым фоном, рис. 4.623) вдобавок к тем, которые активируются двумя молекулами ACh, и в среднем через мембрану будет протекать больший ток по сравнению с контролем. В этом случае существует два типа активированных рецепторов: только двумя молекулами ACh и одновременно молекулами ACh и rSLURP-2. Таким образом, rSLURP-2 при низких концентрациях стимулирует ответ на ACh. Ингибирование $\alpha 7$ -nAChR, наблюдаемое при высоких концентрациях rSLURP-2, можно объяснить либо конкуренцией между ACh и rSLURP-2 за связывание с рецептором, либо десенсibilизацией $\alpha 7$ -nAChR при длительном воздействии rSLURP-2.

4.4.2.4. rSLURP-2 ингибирует никотин-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 MAP киназ

Для дальнейшего изучения спектра активности rSLURP-2 и для определения его возможных внутриклеточных эффектов были использованы клетки PC12¹. Эта клеточная линия наряду с экспрессией аденозиновых, дофаминовых и мускариновых рецепторов также экспрессирует субъединицы $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ nAChR. Клетки PC12 часто используются в качестве модельных нейроноподобных клеток для изучения влияния различных лигандов на nAChR-опосредованную внутриклеточную передачу сигналов. Например, воздействие никотина на клетки PC12 индуцирует фосфорилирование киназ ERK1/2, и этот эффект опосредуется активацией $\alpha 3\beta 4$ -nAChR [291]. Предварительная инкубация клеток PC12 с 10 мкМ rSLURP-2 значительно ингибировала фосфорилирование ERK1/2, индуцированное воздействием 25 мкМ никотина (до 60%, Рис. 4.63А,Б). Применение более низких концентраций rSLURP-2 (0,1 и 1 мкМ) не вызывало уменьшения индуцированного никотином фосфорилирования MAP-киназы (Рис. 4.63), что, вероятно, указывает на очень низкое (в диапазоне 10 мкМ) средство rSLURP-2 к рецептору $\alpha 3\beta 4$ типа. Стоит отметить, что подобное ингибирование никотин-индуцированного фосфорилирования MAP-киназы было описано для ws-Lynx1 (п. 4.3.1.6), что согласуется со схожими фармакологическими спектрами этих белков, определенными с помощью аффинной экстракции субъединиц nAChR из гомогенатов мозга человека (п.4.3.1.7 и п.4.4.2.2).

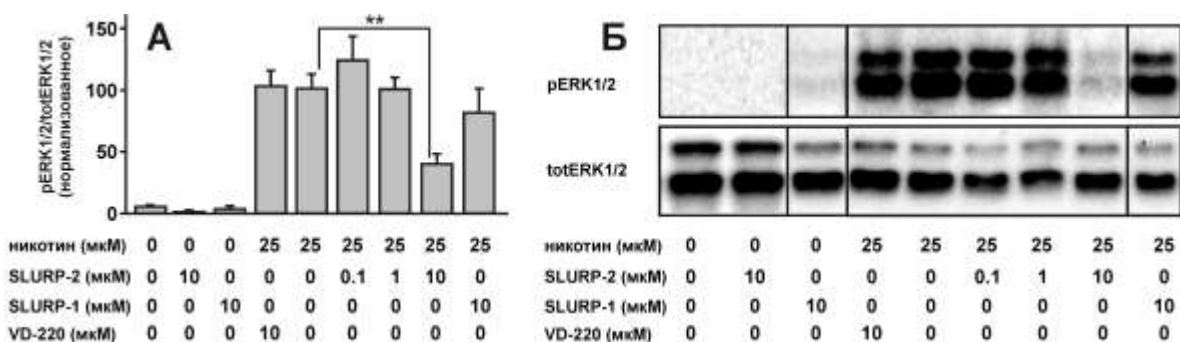


Рис. 4.63. rSLURP-2 снижает никотин-опосредованное фосфорилирование ERK1/2 в клетках PC12. (А). Увеличение фосфорилирования ERK1/2 в клетках PC12 вызывалось 25 мкМ никотина, и этот эффект блокировался путем предварительной инкубации с 10 мкМ rSLURP-2. Значения представлены как отношение фосфорилированного (pERK1/2) к общему белку ERK1/2 (totERK1/2) и нормированы на группу, индуцированную 25 мкМ никотина (n = 8, среднее значение \pm S.E.). ** указывает на достоверное отличие групп (p < 0,01, согласно тесту ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннетта). (Б). Репрезентативные изображения вестерн-блотов суммированные в (А).

¹ Совместно с проф. М. Томсенем, Университет Копенгагена.

Специфичность эффектов rSLURP-2 на $\alpha 3\beta 4$ -nAChR-опосредованное фосфорилирование MAP-киназы была подтверждена в контрольных экспериментах с двумя пептидами, которые не действуют на этот подтип рецептора. Как и ожидалось, 10 мкМ пептида VD-220 (RYHHNDPDGG) или 10 мкМ rSLURP-1 не оказывали значительного влияния на индуцированное никотином фосфорилирование ERK1/2. Примечательно, что воздействие rSLURP-2 (а также rSLURP-1) само по себе не влияло на базальные уровни фосфорилирования ERK1/2 (Рис. 4.63А,Б).

4.4.2.5. rSLURP-2 влияет на рост кератиноцитов, взаимодействуя с различными типами ацетилхолиновых рецепторов

В соответствии с ранее опубликованными данными [201], rSLURP-2 слегка стимулировал рост кератиноцитов (Рис. 4.64А). Инкубация кератиноцитов Het-1А с rSLURP-2 в концентрации превышающей 10 нМ приводила к статистически значимому увеличению числа клеток до $\sim 116\%$ по сравнению с контролем ($p < 0,01$, $n = 12$, Рис. 4.64А). Анализ кривой доза-ответ выявил концентрационно-зависимую активность rSLURP-2 с $EC_{50} \sim 8$ нМ (Рис. 4.64А). Для изучения роли различных подтипов nAChR в регуляции пролиферации кератиноцитов в присутствии rSLURP-2 мы использовали селективные ингибиторы рецепторов $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ типа, α -Bgtx и α -конотоксин МII, соответственно, и неспецифический ингибитор nAChR (Мес). α -Bgtx и Мес не оказывали значительного влияния на рост клеток как таковой, но α -конотоксин МII уменьшал количество жизнеспособных клеток до $\sim 87\%$ по сравнению с контролем (Рис. 4.64Б). Предварительная инкубация кератиноцитов с α -Bgtx приводила к приблизительно двукратному увеличению числа жизнеспособных клеток в присутствии rSLURP-2 (Рис. 4.64Б). Напротив, предварительная инкубация с α -конотоксином МII и Мес приводила к выраженному снижению количества жизнеспособных клеток в присутствии rSLURP-2 (до $34 \pm 4\%$ и $54 \pm 3\%$ относительно контроля, соответственно) (Рис. 4.64Б). Наблюдаемое увеличение пролиферативной активности rSLURP-2 при блокировании $\alpha 7$ -nAChR с помощью α -Bgtx указывает на то, что взаимодействие SLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR может ингибировать пролиферацию клеток, в то время как эксперименты с α -конотоксином МII показали, что взаимодействие SLURP-2 с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR способствует пролиферации клеток (Рис. 4.64Б).

Чтобы отличить снижение пролиферации от возможного цитотоксического эффекта, мы провели дополнительное микроскопическое исследование клеток и изучили их морфологию при окрашивании Hoechst/пропидий йодид (см. «Методы»). Наблюдалось четкое снижение плотности клеток, в то время как морфология большинства клеток и их

ядер не была изменена по сравнению с контролем (репрезентативные изображения показаны на Рис. 4.64В). Детальный анализ не выявил увеличения доли мертвых клеток ($4 \pm 1\%$ мертвых клеток как для обработанных, так и для контрольных клеток). Следовательно, совместное применение МП или Мес с rSLURP-2 переключает активность белка с пролиферативной на антипролиферативную.

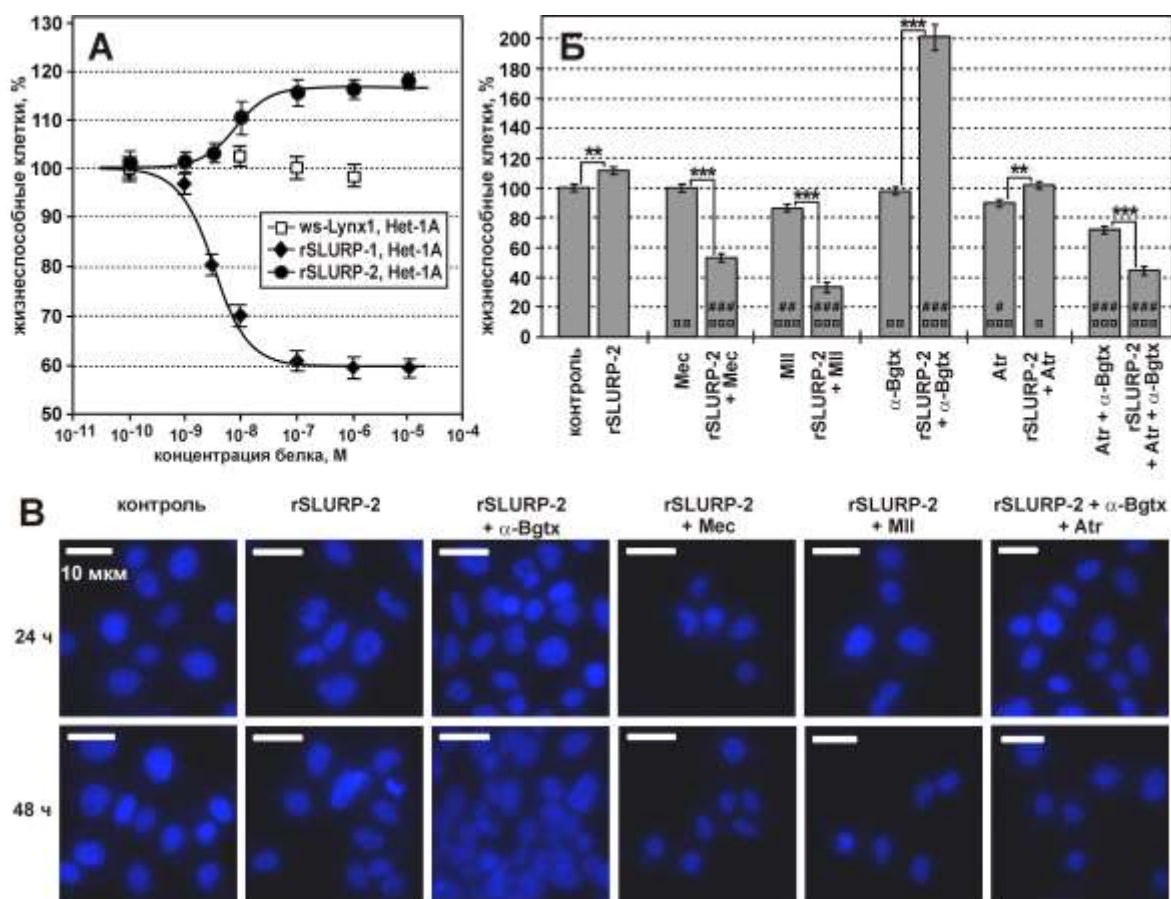


Рис. 4.64. Влияние rSLURP-2 на рост клеток Het-1A. (А). Влияние rSLURP-2, rSLURP-1 и ws-Lynx1 на рост клеток Het-1A (% от контроля, $n = 6-12$, среднее значение \pm S.E.). Уравнение Хилла было адаптировано к данным, измеренным с использованием реагента WST-1. Рассчитанные параметры EC_{50} , nH и $A1$ составили $7,6 \pm 1,0$ нМ, $1,5 \pm 0,4$ и $116 \pm 1\%$ (rSLURP-2/Het-1A) и $4,3 \pm 0,6$ нМ, $1,4 \pm 0,2$ и $60 \pm 1\%$ (rSLURP-1/Het-1A), соответственно. (Б). Влияние rSLURP-2 (1 мкМ), Atr (1 мкМ), Mec (10 мкМ), α -Bgtx (1 мкМ), МП (1 мкМ) и их совместного применения на рост клеток Het-1A после 48 ч. Каждый столбец - среднее значение \pm S.E. из четырех независимых экспериментов, выполненных в трех повторах. Парный статистический анализ групп данных, измеренных с и без rSLURP-2, был выполнен с использованием t-критерия. ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,001$) означают достоверное отличие групп друг от друга. Многочисленные сравнения всех групп данных с контрольной группой и с группой rSLURP-2 были выполнены с использованием ANOVA, после чего был проведен специальный тест множественных сравнений Даннетта. □ и # ($p < 0,05$), □□ и ## ($p < 0,01$), □□□ и ### ($p < 0,001$) означают достоверное отличие от групп «rSLURP-2» и «контроля», соответственно. (В). Влияние rSLURP-2 (1 мкМ) и его совместное применение с атропином (Atr, 1 мкМ), Mec (10 мкМ), α -Bgtx (1 мкМ) или α -конотоксином МП (MII, 1 мкМ) на морфологию ядер клеток Het-1A через 24 и 48 часов. Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 и йодидом пропидия.

Антипролиферативный эффект, наблюдаемый при одновременном применении Mec (неспецифического ингибитора nAChR) и rSLURP-2, свидетельствует о наличии других мишеней rSLURP-2 в кератиноцитах. Чтобы исследовать возможное взаимодействие rSLURP-2 с mAChR, которые экспрессируются в кератиноцитах наряду с nAChRs [3], мы изучили активность rSLURP-2 в присутствии атропина, конкурентного неспецифического

антагониста mAChR (Рис. 4.64Б). Воздействие на клетки 1 мкМ атропина привело к небольшому, но значительному снижению количества жизнеспособных кератиноцитов до ~ 91% по сравнению с контролем (Рис. 4.64Б). При одновременном применении атропина и rSLURP-2 антипролиферативный и пролиферативный эффекты этих соединений нейтрализовали друг друга (количество жизнеспособных клеток ~ 102%, что значимо отличалось от уровней наблюдаемых при одиночной аппликации rSLURP-2 и атропина, $p < 0,05$, $n = 4$, Рис. 4.64Б). Небольшая величина эффектов вызываемых rSLURP-2 и атропином не позволяет сделать однозначный вывод относительно вклада мускариновых рецепторов в действие rSLURP-2 на фоне больших эффектов опосредованных mAChR.

В целом, полученные данные предполагают возможное влияние SLURP-2 на рост кератиноцитов на разных стадиях их созревания посредством взаимодействия с различными типами рецепторов ацетилхолина. В дополнение к SLURP-2 кератиноциты также экспрессируют SLURP-1 и Lynx1 (детектируемые по крайней мере на уровне мРНК [337]). Полученные данные позволили сравнить влияние этих Ly-6/uPAR белков на пролиферацию кератиноцитов. В то время как rSLURP-2 стимулирует пролиферацию клеток Het-1A, rSLURP-1 ингибирует ее, а ws-Lynx1 не оказывает никакого эффекта (Рис. 4.64А). Таким образом, изменения уровня относительной экспрессии SLURP-1 и SLURP-2 кератиноцитами могут лежать в основе регуляции клеточного роста.

4.4.2.6. rSLURP-2 является аллостерическим модулятором M1 и M3 mAChR

Прямое исследование взаимодействия rSLURP-2 с mAChR в кератиноцитах с использованием аффинной очистки и вестерн-блот-анализа оказалось безуспешным, вероятно, из-за низкой плотности рецепторов в культивируемых клетках [3]. Поэтому, для изучения способности rSLURP-2 специфически взаимодействовать с различными подтипами mAChR человека, мы использовали мембраны клеток CHO, сверхэкспрессирующих отдельные подтипы рецептора¹. Слабое положительное влияние rSLURP-2 на связывание агониста mAChR ³H-N-метил-скополамина (NMS) наблюдалось в псевдоконкурентном эксперименте на рецепторах M1 и M3 типов (равновесная константа диссоциации $K_d \sim 230$ и 140 нМ соответственно, рис. 4.65А,Б). В отличие от этого, в отношении рецепторов M2, M4 и M5 типов не наблюдалось никакой конкуренции с NMS даже при относительно большой концентрации rSLURP-2 (1,4 мкМ) (Рис. 4.65В).

¹ Совместно с проф. В. Долежалем, Институт физиологии Чешской академии наук.

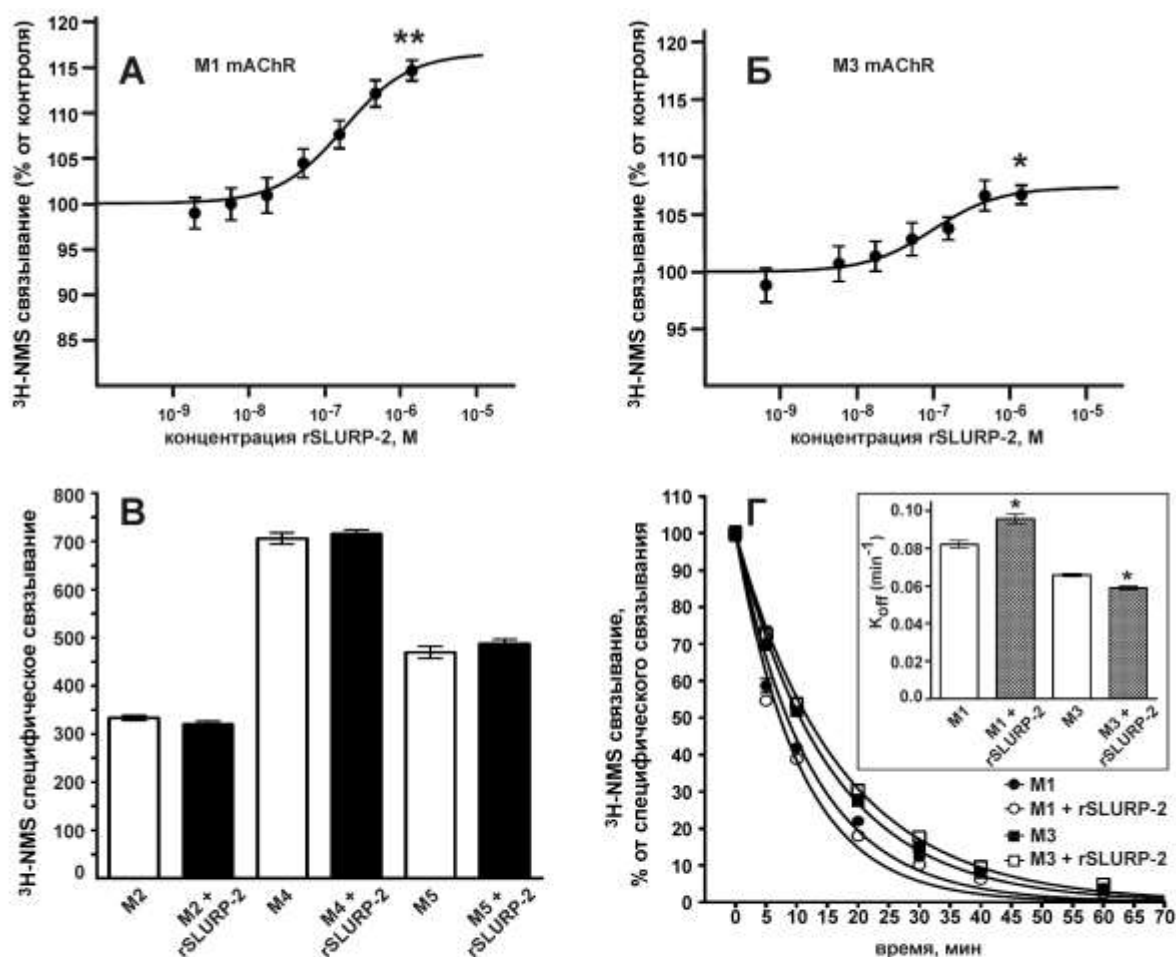


Рис. 4.65. Влияние rSLURP-2 на связывание [³H]-NMS с mAChR. (А, Б). Конкуренция rSLURP-2 со связыванием [³H]-NMS на рецепторах М1 и М3, соответственно. Мембраны (20 мкг белка) инкубировали в присутствии указанных концентраций rSLURP-2 и 100 пМ [³H]-NMS. Связывание [³H]-NMS выражается в процентах от контрольного связывания в отсутствие rSLURP-2. Точками данных являются средние значения ± S.E. из четырех независимых экспериментов, выполненных в четырех повторах. Уравнение $y = 100 * ([NMS] + Kd) / \{[NMS] + Kd (Ka + [rSLURP-2]) / (Ka + [rSLURP-2] / \alpha)\}$ было адаптировано к нормализованным данным. Kd связывания [³H]-NMS (197 и 187 пМ для mAChR М1 и М3, соответственно) определяли в экспериментах с параллельным насыщением. Рассчитанные параметры Ka (равновесная константа диссоциации rSLURP-2) и α (коэффициент кооперативности) составили 231 ± 81 нМ, $1,296 \pm 0,051$, 144 ± 56 нМ и $1,128 \pm 0,013$ для рецепторов М1 и М3, соответственно. * и ** указывают на значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$, $p < 0,01$, соответственно, t-критерий). (В). Конкуренция rSLURP-2 со связыванием [³H]-NMS на рецепторах М2, М4 и М5. Мембраны, экспрессирующие 5-20 мкг белка, инкубировали в присутствии 1,4 мкМ rSLURP-2 и 150 пМ [³H]-NMS. Столбцы представляют среднее значение ± S.E. специфического связывания [³H]-NMS в двух независимых экспериментах, выполненных в четырех повторах. (Г) Влияние rSLURP-2 на скорость диссоциации [³H]-NMS на М1 и М3 рецепторах. Временную зависимость диссоциации [³H]-NMS в присутствии и в отсутствие rSLURP-2 определяли, как описано в методах. Специфическое связывание [³H]-NMS рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием, измеренной в том же эксперименте, и выражали как процент от начального связывания (ордината). Уравнение экспоненциального затухания соответствовало нормированным данным (% от контрольного связывания). (Вставка). 4,2 мкМ rSLURP-2 менял константу скорости диссоциации [³H]-NMS (K_{off} , min⁻¹) с $0,082 \pm 0,002$ до $0,093 \pm 0,002$ ($n = 4$, $p < 0,05$, t-критерий) и с $0,066 \pm 0,001$ до $0,059 \pm 0,002$ ($n = 4$, $p < 0,05$, t-критерий) на рецепторах М1 и М3, соответственно. Константы скорости диссоциации представлены как среднее значение ± S.E. значений, полученных в четырех независимых экспериментах, выполненных в трех повторах.

Чтобы различить ортостерический и аллостерический способы взаимодействия rSLURP-2 с mAChR, было измерено его влияние на скорость диссоциации [³H]-NMS для рецепторов М1 и М3 (Рис. 4.65Г). Скорости диссоциации ортостерического агониста [³H]-NMS в присутствии rSLURP-2 менялись по сравнению с контрольными экспериментами

($n = 4$, $p < 0,05$, Рис. 4.65Г, вставка). Скорость диссоциации (мин^{-1}) увеличилась с $0,082 \pm 0,002$ до $0,093 \pm 0,002$ ($n = 4$, $p < 0,05$) на рецепторе M1 и снизилась с $0,066 \pm 0,001$ до $0,059 \pm 0,002$ ($n = 4$, $p < 0,05$) на рецепторе M3 (Рис. 4.65Г). Эти данные подтверждают аллостерическую природу взаимодействия rSLURP-2/mAChR.

Наблюдаемое влияние rSLURP-2 на скорость диссоциации NMS на M1 и M3 mAChR (Рис. 4.65Г) указывает на то, что rSLURP-2 является аллостерическим лигандом мускариновых рецепторов. Поскольку кератиноциты полости рта не экспрессируют M1 mAChR [3], rSLURP-2, по-видимому, действует в этих клетках на M3 рецепторы. Стоит отметить, что и другие белки Ly-6/uPAR могут взаимодействовать как с nAChR, так и с mAChR. Например, слабые аллостерические взаимодействия с mAChR были описаны для ws-Lyx (п. 4.3.1.3) и необычного змеиного токсина WTX (п. 4.2.2.3.1).

4.4.2.6. Пространственная структура и динамика rSLURP-2

Разработка бактериальной системы экспрессии позволила нам получить ^{13}C - ^{15}N -меченный препарат rSLURP-2 и изучить его пространственную структуру с помощью гетероядерной ЯМР-спектроскопии¹. Первоначальный скрининг оптимальных условий для ЯМР-исследования показал, что rSLURP-2 (рассчитанное значение $pI \sim 6,5$) при субмиллимолярных концентрациях стабилен в растворе только в узком диапазоне pH (4.5-6.0). Понижение pH ниже 4,5 приводило к обратимому разворачиванию β -структурного ядра белка. Увеличение pH выше 6,0 (концентрация 0,1 мМ) или увеличение концентрации rSLURP-2 выше 0,2 мМ при pH $\sim 5,0$ приводило к преципитации белка или обратной агрегации, соответственно. Чтобы уменьшить склонность белка к олигомеризации при pH $\sim 5,0$, к образцу добавили 5% диоксан, что значительно улучшило качество спектров ЯМР и позволило исследовать пространственную структуру белка в растворе, используя образец с концентрацией 0,5 мМ (Рис. 4.66Б). Сравнение химических сдвигов ядер ^1H и ^{15}N в смеси диоксан/вода с химическими сдвигами белка (концентрация 0,08 мМ) в чисто водном растворе, что добавление диоксана не нарушает пространственную структуру rSLURP-2.

Согласно данным ЯМР rSLURP-2 имеет типичный трехпетельный фолд, включающий два антипараллельных β -листа (Рис. 4.66В-Д). Первый β -лист образован двумя β -тяжами, сформированными в петле I (Ile1-His4, Gly15-Cys18). Вторым β -лист состоит из трех тяжей, которые образованы остатками из петли II (His24-Thr30, Leu41-His47) и петли III (Ile64-Cys67). Подобно другим трехпетельным белкам, rSLURP-2

¹ Совместно с проф. д.ф.-м.н. З.О. Шенкаревым и к.б.н. А.С. Парамоновым, группа структурной биологии ИБХ РАН.

включает в себя несколько консервативных β -поворотов в области «головы» и в C-концевом фрагменте. Молекула rSLURP-2 стабилизирована четырьмя дисульфидными связями в «голове» (Cys3-Cys25, Cys18-Cys46, Cys50-Cys66 и Cys67-Cys72) и одной в первой петле (Cys6-Cys12). Подобное расположение дополнительной дисульфидной связи наблюдается в других белках Lu-6/uPAR млекопитающих и в «необычных» нейротоксинах змей, например, в «слабом» токсине WTX из *Naja kaouthia* (Рис. 4.66А,Д). Помимо водородных связей основной цепи, ассоциированных с каноническими элементами вторичной структуры, «голова» и петли белка стабилизированы дополнительными Н-связями и электростатическими взаимодействиями (Рис. 4.66Г). Например, две водородные связи (HN Leu71 - CO Trp2 и HN Lys44 - CO Cys6) контролируют пространственное расположение петли I относительно C-концевой последовательности и петли II белка, соответственно. Потенциальный солевой мостик (Arg31 - Glu37) и водородная связь (H^N His14 – $N^{\delta 1}$ His4) стабилизируют структуру петель II и I, соответственно. Интересно, что подобная водородная связь H^N – $N^{\delta 1}$ ранее наблюдалась в структуре водорастворимого домена Lynx-1 человека (ws-Lynx, Рис. 4.66Д). Образование этой водородной связи между боковой цепью и основной цепью приводит к значительному сдвигу соответствующего сигнала $^1H^N$ группы основной цепи в слабое поле ($\sim 11,6$ м.д., Рис. 4.66Б).

Пространственная структура rSLURP-2 хорошо определялась по данным ЯМР только в консервативном β -структурном ядре, в то время как концы всех трех петель белка были слабо структурированы (Рис. 4.66В). Данные о релаксации ядер ^{15}N (Рис. 4.66Г) показали, что отсутствие структурной конвергенции в этих областях является следствием повышенной подвижности основной цепи белка в двух временных диапазонах (от пикосекунд до наносекунд и от микросекунд до миллисекунд). Следует отметить, что для сведения к минимуму влияния агрегации белка и добавления диоксана на результаты анализа динамики rSLURP-2, скорости ^{15}N релаксации измеряли, используя образец белка с концентрацией 0,08 мМ в воде без диоксана. Анализ полученных данных также подтвердил, что rSLURP-2 находится в мономерном состоянии в воде при концентрациях ниже 0,1 мМ.

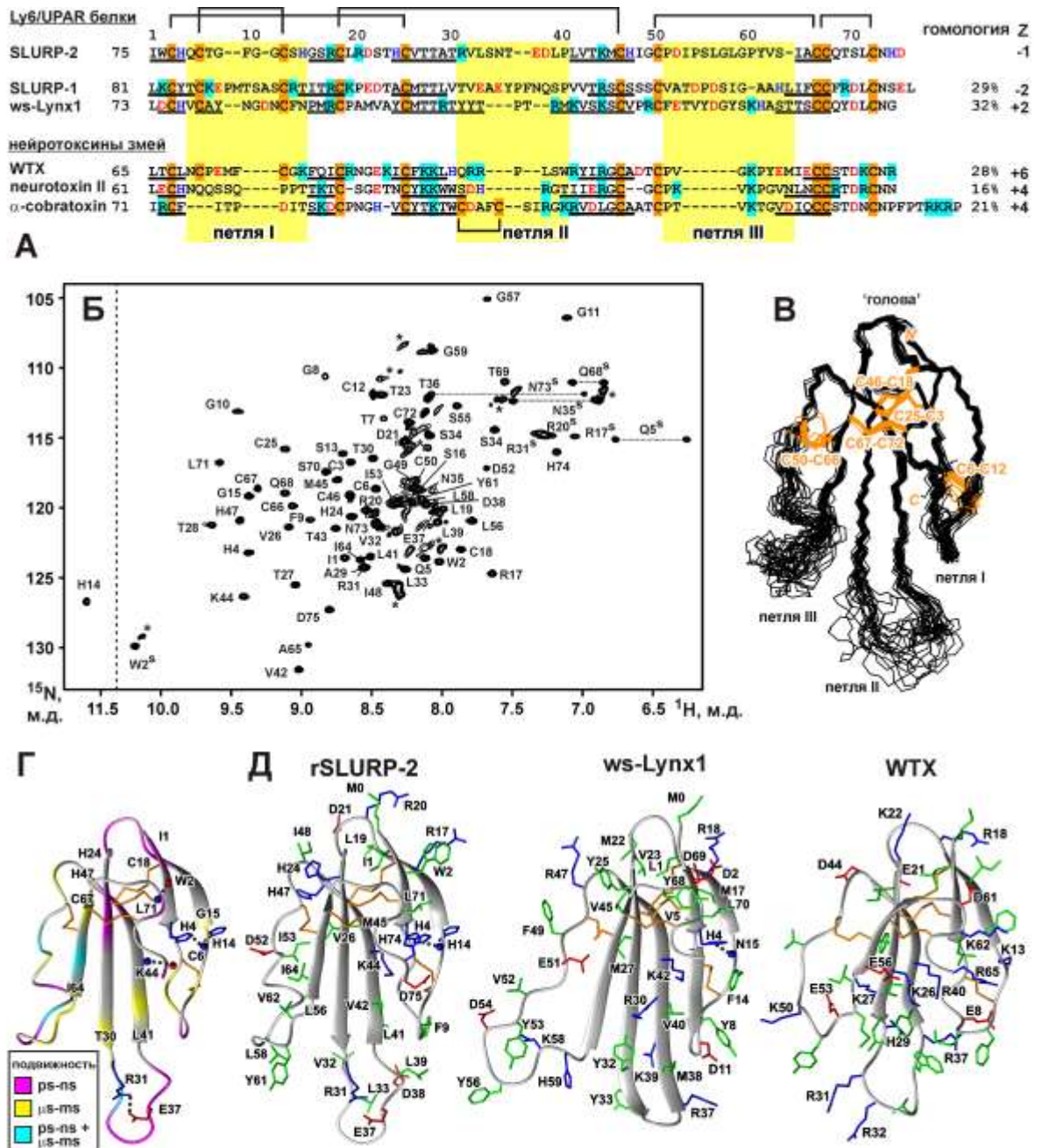


Рис. 4.66. Сравнение аминокислотной последовательности и пространственной структуры rSLURP-2 с другими Ly6/uPAR белками человека и трехпетельными нейротоксинами змей. (А). Выделены положительно заряженные (Arg/Lys), отрицательно заряженные (Asp/Glu) и His и Cys остатки. Фрагменты, соответствующие β -нитям в пространственных структурах белков, подчеркнуты. Области петель выделены желтым фоном. (Б). 2D ^1H , ^{15}N -HSQC спектр rSLURP-2 (0,5 мМ, 5% диоксан, pH 5,0, 37°C). Показано полученное отнесение сигналов. Сигналы групп боковых цепей обозначены надстрочными буквами «s». Сигналы, соответствующие развернутому/агрегированному белку, отмечены звездочками. Относительная популяция этой белковой формы не превышала 10%. (В). Наложение 20 лучших структур rSLURP-2. Подписаны три петли и «голова» белка. Дисульфидные связи показаны оранжевым цветом. (Г). Ленточное представление пространственной структуры rSLURP-2 с отображенными данными динамической подвижности. Скорости релаксации ^{15}N измеряли при 60 МГц (pH 5,0, 37°C) для 0,08 мМ rSLURP-2 в воде без добавления диоксана. Отмечены фрагменты основной цепи, подвергнутые динамическим процессам в шкале времени ps-ns (гетероядерное NOE <0,7) или в масштабе времени мкс-мс (RIR2 > 20 с-2 или сигналы HN, расширенные за пределы обнаружения). Показаны дополнительные электростатические и водородные связи, которые стабилизируют укладку белка. Основные амидные и карбонильные группы обозначены синими и красными сферами соответственно. (Д). Сравнение пространственных структур rSLURP-2, ws-Lynx1 и WTX[P33A]. Ароматические/гидрофобные, положительно заряженные (включая His), отрицательно заряженные и остатки Cys показаны зеленым, синим, красным и оранжевым цветом, соответственно.

Данные ЯМР выявили структурное сходство rSLURP-2 с другими белками Lys-6/uPAR (Рис. 4.66Д). Молекула rSLURP-2 содержит консервативное β -структурное ядро с тремя выступающими петлями. Петли rSLURP-2 демонстрируют значительную конформационную пластичность (Рис. 4.66В,Г). Было высказано предположение, что высокая подвижность петель является одним из факторов, лежащих в основе способности ws-Lynx1 и WTX взаимодействовать как с nAChR, так и с mAChR, хотя и с довольно низкой аффинностью (диапазон мкМ). Для сравнения, α -нейротоксины змей, которые имеют более упорядоченные петли, ингибируют nAChR с высокой специфичностью при наномолярных концентрациях. Сравнение последовательности SLURP-2 с другими трехпетельными белками, действующими на nAChR, выявило существенные различия в распределении зарядов в областях петель (Рис. 4.66А). В отличие от Lynx1 и α -нейротоксинов, которые заряжены положительно, молекула SLURP-2 имеет общий отрицательный заряд. Отличия в структурных и динамических свойствах петель SLURP-2 по сравнению с α -нейротоксинами, и белками Lynx1 и SLURP-1 могут указывать на отличия в способе взаимодействия с nAChR.

4.4.2.7. Компьютерное моделирование взаимодействия rSLURP-2 с $\alpha 7$ - and $\alpha 3\beta 2$ -nAChR

Определение пространственной структуры rSLURP-2 позволило построить модели комплексов rSLURP-2 с внеклеточными лиганд-связывающими доменами $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR (Рис. 4.67). Наши данные о том, что эффекты rSLURP-2 изменяются в присутствии селективных ортостерических антагонистов nAChR (рис. 4.64Б), свидетельствуют о вероятном перекрытии сайта связывания rSLURP-2 на поверхности рецептора с ортостерическим лиганд-связывающим сайтом. Этот «классический» сайт связывания расположен во внеклеточной части рецептора на интерфейсе между основной (+) и комплементарной (-) субъединицами и включает в себя С-петлю основной субъединицы [141]. Поэтому белок-белковый докинг rSLURP-2 с водорастворимыми внеклеточными доменами $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR осуществили исходя из предположения, что в комплексе молекула rSLURP-2 взаимодействует с С-петлей основной субъединицы nAChR.

Чтобы учесть структурную гибкость обоих партнеров, первоначально были выполнены молекулярно-динамические (МД) расчеты в ячейке с явно заданным растворителем отдельно для rSLURP-2 и внеклеточных доменов рецепторов. Последующая кластеризация полученных конформаций позволила получить конформационные ансамбли молекул, которые затем использовались в расчетах белок-белкового докинга. Для $\alpha 7$ -nAChR были использованы конформации с «закрытым» и

«открытым» лиганд-связывающим сайтом, которые отличались положением С-петли основной субъединицы. Напротив, в МД траектории рецептора $\alpha\beta 2$ оба лиганд-связывающих сайта имели «закрытую» конфигурацию. Кластеризация структур интерфейсов между основной и комплементарной субъединицами доменов $\alpha\beta 2$ рецептора с «закрытым» сайтом и $\alpha 7$ рецептора с «закрытым» и «открытым» сайтами дала 9, 9 и 11 структур, соответственно. В каждой группе структур наиболее существенные различия наблюдались в области С-петли и соседних петель. Кластеризация МД траектории для rSLURP-2 позволила получить 11 репрезентативных структур белка.

Затем мы выполнили три серии докинга rSLURP-2/nAChR: для рецептора $\alpha\beta 2$ с «закрытым» лиганд-связывающим карманом, для рецептора $\alpha 7$ с «закрытым» и «открытым» лиганд-связывающим карманом. Решения каждого цикла докинга были «отфильтрованы» с помощью специально разработанной процедуры (см. Методы). После фильтрации было выбрано 2, 5 и 20 решений для каждой серии, соответственно. «Окончательное» решение для докинга каждого комплекса было выбрано путем визуального анализа. Репрезентативные комплексы показаны на Рис. 4.67.

В комплексе с доменом $\alpha\beta 2$ -nAChR rSLURP-2 взаимодействует с «вестибюлем» «классического» сайта связывания посредством петель I и II, причем конец петли II помещен под С-петлю субъединицы $\alpha 3$ (см. Рис. 4.67А, см. Таблицу 4.6 для полного списка наблюдаемых контактов). В случае домена $\alpha 7$ -nAChR с «закрытым» лиганд-связывающим карманом rSLURP-2 взаимодействует с рецептором с помощью петель II и III (Рис. 4.67Б), и его удлиненная петля III проникает в «классический» сайт связывания. Для комплекса rSLURP-2 с «открытым» лиганд-связывающим карманом $\alpha 7$ -nAChR были получены две группы решений с различной ориентацией лиганда (Рис. 4.67В,Г). В этих группах rSLURP-2 также занимает «вестибюль» ортостерического сайта связывания и взаимодействует с внутренней стороной С-петли петлями I и II или петлями II и III, соответственно.

Несмотря на различную конформацию С-петли и разную ориентацию молекулы rSLURP-2 в полученных комплексах можно сделать вывод о том, что rSLURP-2 взаимодействует своими петлевыми участками с внутренней стороной С-петли рецептора (Таблица 4.6, Рис. 4.67). Примечательно, что центральная петля rSLURP-2 принимает участие в образовании всех рассчитанных комплексов. Также было обнаружено, что «закрытое» положение С-петли в доменах $\alpha\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR напоминает конформацию рецептора в модели комплекса ws-Lynx1 с ацетилхолин-связывающим белком (AChBP) (п. 4.3.1.5) и в структуре химерного комплекса $\alpha 7$ /AChBP с агонистом эпибатином [41]. Однако в вышеупомянутой модели ws-Lynx1 взаимодействовал с внешней стороной

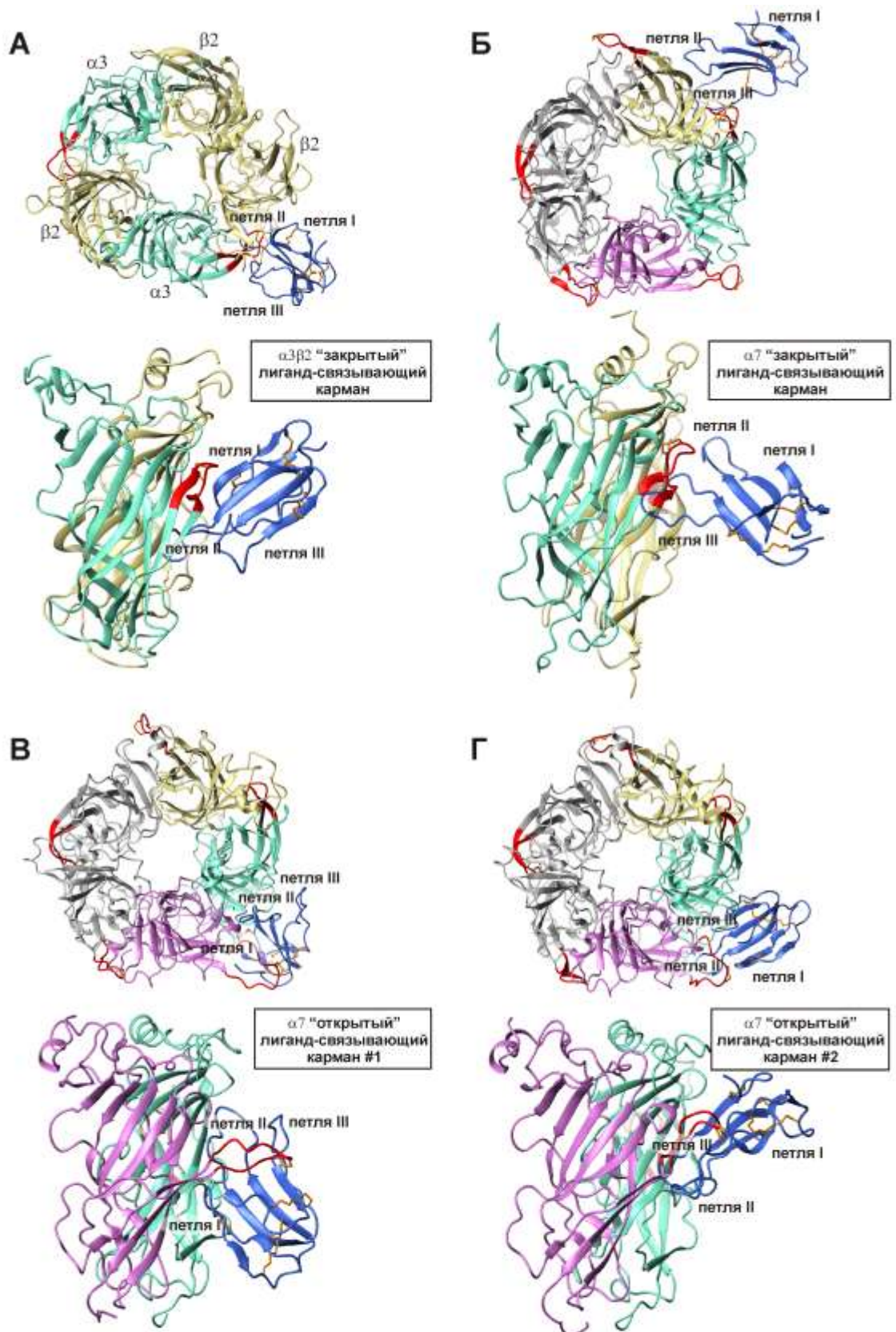


Рис. 4.67. Модели комплексов rSLURP-2 с $\alpha\beta_2$ - и α_7 -nAChR. (А,Б). Комплексы rSLURP-2 с «закрытыми» сайтами связывания в $\alpha\beta_2$ - и α_7 -nAChR. (В,Г). Два решения комплекса rSLURP-2 с «открытым» сайтом связывания в α_7 -nAChR. Полученные модели показаны сверху и сбоку. Молекула rSLURP-2 показана синим цветом, а ее дисульфидные связи обозначены оранжевым. Три петли rSLURP-2 подписаны. Для рецептора $\alpha\beta_2$ субъединицы α_3 показаны светло-зеленым цветом, а субъединицы β_2 показаны пшеничным цветом. Для «закрытого» сайта связывания гомопентамерного α_7 -рецептора основная и комплементарная субъединицы показаны светло-зеленым цветом и пшеничным, соответственно. Для «открытого» сайта связывания гомопентамерного α_7 -рецептора основная и комплементарная субъединицы обозначены пурпурным и светло-зеленым, соответственно. С-петли субъединиц α_3 и α_7 обозначены красным.

Таблица 4.6. Контакты между rSLURP-2 и $\alpha\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR в моделях комплексов.

rSLURP-2 ^a	$\alpha\beta 2$, закрытый лиганд-связывающий сайт	$\alpha 7$, закрытый лиганд-связывающий сайт	$\alpha 7$, открытый лиганд-связывающий сайт #1	$\alpha 7$, открытый лиганд-связывающий сайт #2
Петля I				
THR 7	(+) CYS 224 (H) (+) GLU 225 (H)			
PHE 9	(-) LYS 188 (H) (-) PHE 144 (T)			(-) TYR 190 (T)
GLY 10				(-) GLY 189 (H) (+) TYR 115 (H)
GLY 11	(-) LYS 188 (H)			
Петля II				
ARG 31	(-) ASP 195 (I) (-) ASP 196 (I)		(+) TYR 217 (H) (+) GLU 215 (I) (+) ASP 219 (I)	
SER 34		(-) TYR 54 (H) (-) GLN 181 (H)	(+) SER 206 (H)	
ASN 35			(+) ASP 219 (H) (+) THR 221 (H)	(-) ASN 133 (H)
THR 36	(+) ASN 125 (H) (+) TYR 124 (H) ^b (-) SER 63 (H)			
GLU 37	(+) ASN 222 (H) (-) SER 63 (H)			
ASP 38	(-) THR 84 (H)		(+) ARG 208 (I)	(+) GLY 175 (H)
LEU 39	(+) ASN 222 (H)			(-) SER 188 (H) (+) TYR 115 (H)
LEU 41				(-) SER 188 (H)
LYS 44				(+) GLU 215 (I) (+) ASP 219 (I)
Петля III				
ASP 52		(+) ARG 208 (I) ^b	(-) GLN 183 (H) (-) GLU 184 (H)	
ILE 53		(+) ARG 208 (H)		
SER 55		(-) SER 58 (H) (-) GLN 79 (H) (-) ASP 186 (H)		
LEU 56		(+) TYR 115 (H)		
GLY 57		(-) GLN 79 (H)	(-) SER 188 (H)	
LEU 58		(-) SER 56 (H) (-) GLN 79 (H)	(-) GLY 189 (H)	
GLY 59		(+) GLU 211 (H) (-) SER 56 (H)	(-) SER 58 (H)	
TYR 61		(-) GLU 184 (H)	(+) TYR 115 (H) (+) TRP 171 (H) ^b (+) SER 172 (H) (+) TRP 176 (H)	
C-конец				
ASN 73				(+) ARG 208 (H)
ASP 75			(+) LYS 98 (I)	(+) LYS 204 (I) (+) SER 206 (I) (+) ARG 208 (I) ^b

^a(+) обозначает остатки основной субъединицы; (-) означает остатки комплементарной субъединицы. H, T, и I означают типы взаимодействия: водородная связь, стэкинг и ионная связь, соответственно. Выделенные серым остатки соответствуют остаткам лиганд-связывающего сайта в структуре комплекса α -Bgtx с химерным белком AChBP/ $\alpha 7$ -nAChR [141].

^bЭти контакты возможны, но не рассчитаны программой.

C-петли AChBP (п. 4.3.1.5). Наблюдаемая здесь «открытая» конформация C-петли для домена $\alpha 7$ -nAChR напоминает положение C-петли в кристаллических структурах химерных комплексов AChBP и $\alpha 7$ /AChBP с антагонистами [141,277].

Во всех смоделированных комплексах интерфейсы взаимодействия $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR с rSLURP-2 частично перекрываются с ортостерическим лиганд-связывающим сайтом, выявленным в структуре комплекса химеры $\alpha 7$ /AChBP с α -Bgtx ([141], Таблица 4.6). Таким образом, результаты компьютерного моделирования подтверждают возможное взаимодействие SLURP-2 с ортостерическим сайтом nAChR. Сравнение комплексов rSLURP-2 с $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR в «закрытой» конформации показало, что ортостерический сайт связывания рецепторов занят удлиненными петлями II и III лиганда, соответственно (Рис. 4.67А,Б). Мы можем предположить, что это различие в способе связывания так или иначе связано с различием в активности rSLURP-2, наблюдаемым на этих рецепторах (Рис. 4.62). Противоположные эффекты на пролиферацию кератиноцитов, опосредованные взаимодействием rSLURP-2 с $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, могут быть результатом как разных способов взаимодействия рецептор/лиганд, так и разных внутриклеточных сигнальных каскадов, которые связаны с этими подтипами рецептора.

4.4.3. rSLURP-1 и rSLURP-2 контролируют рост эпителиальных раковых клеток, взаимодействуя с nAChR

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) представляют собой лиганд-зависимые ионные каналы, ответственные за передачу сигнала в центральной и периферической нервной системе и в нейро-мышечных соединениях. nAChR были также обнаружены в невозбудимых клетках, таких как иммунные и эпителиальные клетки [338]. Эти не-нейрональные рецепторы участвуют в пролиферации, дифференцировке, миграции и апоптозе эпителиальных клеток, в контроле воспаления, а также в регуляции транскрипции генов [3,4,323]. Экспрессия различных субъединиц nAChR была описана при различных формах рака эпителиального происхождения у человека, например при раке легкого, мезотелиоме и раке толстой кишки [339]. Так как rSLURP-1 и rSLURP-2 способны регулировать рост эпителиальных клеток, то было выдвинуто предположение, что эти рекомбинантные белки также смогут регулировать рост и опухолевых эпителиальных клеток. Для проверки этой гипотезы эффекты rSLURP-1 и rSLURP-2 были исследованы на нескольких клеточных линиях карцином человека.

4.4.3.1. rSLURP-1 и rSLURP-2 SLURP-1 и SLURP-2 тормозят рост клеток раковых линий эпителиального происхождения

Эффекты rSLURP-1 и rSLURP-2 были исследованы на нескольких клеточных линиях карцином человека¹ (Рис. 4.68). С помощью микроскопии было выявлено заметное уменьшение плотности эпителиальных клеток после их обработки наномолярными концентрациями рекомбинантных препаратов SLURP-1 или SLURP-2 в течение 24 часов. В то же время, изменений в морфологии клеток обнаружено не было. Изучение морфологии клеточных ядер с помощью их окрашивания красителями Hoechst33342 и йодидом пропидия показало, что обработка клеток SLURP-1 или SLURP-2 не приводит к апоптотическому изменению ядер и не вызывает некроз в клетках ($4 \pm 1\%$ мертвых клеток как для контрольных, так и для обработанных rSLURP-1 или rSLURP-2 клетки).

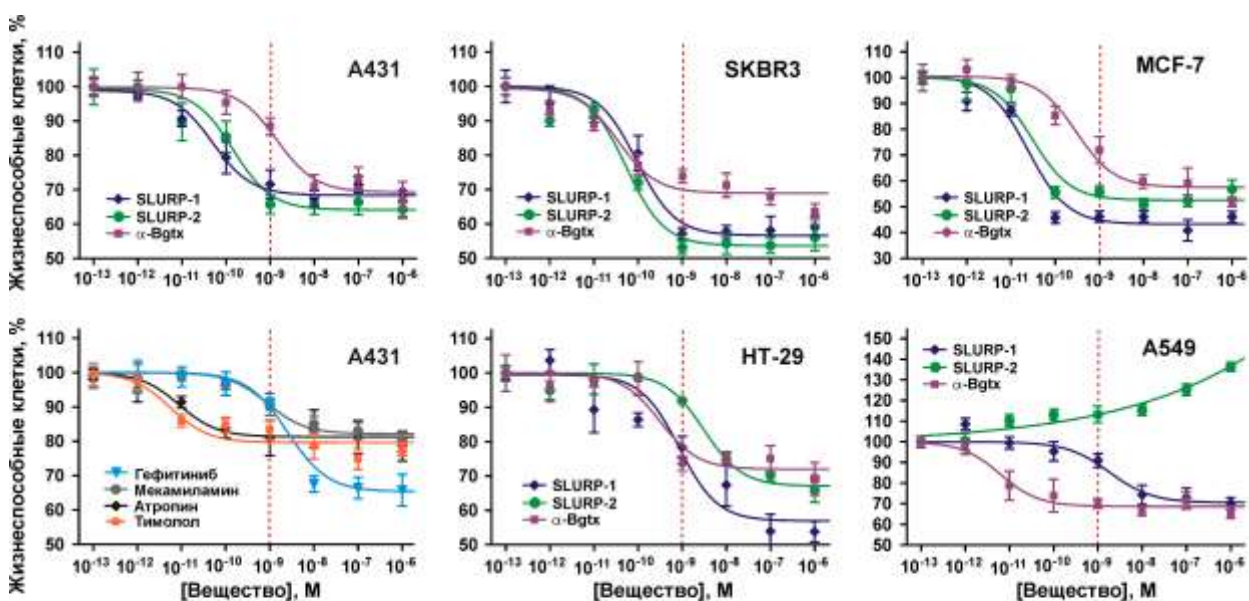


Рис. 4.68. Влияние SLURP-1, SLURP-2, α -Bgtx, gefitiniba, mecamylamina, atropina и timolola на рост опухолевых клеток при 24-часовой инкубации. Данные приведены как % от контроля \pm средне-квадратичная ошибка ($n = 6$). Параметры, описывающие кривые «концентрация-эффект» (A_{50} , EC_{50}), приведены в Таблицах 4.7 и 4.8.

Количественная оценка антипролиферативного эффекта препаратов rSLURP-1 и rSLURP-2 с помощью колориметрического теста WST-1 показала, что инкубация клеток карциномы кожи A431, карциномы толстой кишки HT-29, карцином груди MCF-7 и SKBR3 с белками SLURP в концентрациях, превышающих 1 нМ в течение 24 ч приводит к уменьшению количества жизнеспособных клеток до 40–70% от контроля (Рис. 4.68). Поскольку микроскопический анализ не выявил никаких признаков цитотоксичности,

¹ Совместно с д.ф.-м.н. А.В. Феофановым и А.Ефременко, лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН.

снижение количества клеток может быть объяснено антипролиферативным эффектом белков SLURP.

Был обнаружен дозо-зависимый характер антипролиферативной активности белков SLURP на линиях A431, HT-29, MCF7 и SKBR-3, значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) препаратов варьируются в диапазоне от 0,02 до 3,1 нМ (Рис. 4.68, Таблица 4.7). Интересно, что rSLURP-1 и rSLURP-2 продемонстрировали противоположное воздействие на клетки карциномы легкого A549. rSLURP-1 ингибировал пролиферацию клеток A549 до ~ 70% по сравнению с контролем (EC_{50} ~ 1,8 нМ), в то время как rSLURP-2, наоборот, стимулировал рост клеток до ~ 125% (Рис. 4.68).

Так как ранее антипролиферативный эффект был показан для α -нейротоксинов змей [340,341], на клетках A431, A549, HT-29, MCF-7 и SKBR3 был проведен сравнительный анализ действия белков SLURP с таковым у α -Bgtx (Рис. 4.68). α -Bgtx тормозил рост всех изученных клеток со значениями EC_{50} в диапазоне от 0,01 до 1,4 нМ (Таблица 4.7).

Таблица 4.7. Время удвоения клеток (ВУК) и параметры, описывающие влияние rSLURP-1, rSLURP-2 и α -Bgtx на жизнеспособность клеток раковых линий при 24-часовой инкубации.

Линия клеток	ВУК, часы	rSLURP-1		rSLURP-2		α -Bgtx	
		EC_{50} , нМ	A_0 , %	EC_{50} , нМ	A_0 , %	EC_{50} , нМ	A_0 , %
A431	25.7±2.5	0.05±0.01	68.3±1.7	0.14±0.06	64.1±3.0	1.4±0.7	69.4±2.3
MCF-7	24.1±1.3	0.02±0.01	43.5±1.7	0.03±0.01	52.6±2.0	0.3±0.1	57.4±2.6
SKBR3	26.8±1.4	0.09±0.04	56.6±2.2	0.05±0.01	53.7±1.6	0.03±0.01	68.9±1.5
A549	15.3±1.2	1.8±0.7	70.49±1.8	--	--	0.006±0.003	69.2±1.8
HT29	20.4±1.1	0.9±0.4	56.9±3.3	3.1±1.9	66.9±2.0	0.3±0.2	71.9±2.7

Таблица 4.8. Параметры, описывающие влияние гефитиниба, мекамиламина, атропина и тимолола на рост клеток A431 при 24-часовой инкубации.

Гефитиниб		Мекамиламин		Атропин		Тимолол	
EC_{50} , нМ	A_0 , %	EC_{50} , нМ	A_0 , %	EC_{50} , нМ	A_0 , %	EC_{50} , нМ	A_0 , %
2.4±0.9	65.1±2.3	0.9±0.5	82.2±1.4	0.01±0.005	81.24±1.6	0.006±0.003	79.6±1.4

Кроме того, было исследовано влияние rSLURP-1 на рост различных нормальных клеточных линий: кератиноцитов человека Het-1A, клеток легкого WI-38, фибробластов крайней плоти, и гепатоцитов Chang при 24 часовой инкубации с рекомбинантным белком. WST-1 тест показал, что рекомбинантный препарат rSLURP-1 в наномолярных концентрациях оказывает минимальное влияние на рост кератиноцитов HCAT и Het-1A, гепатоцитов Chang, клеток легочного эпителия WI38 и фибробластов крайней плоти (Рис. 4.69).

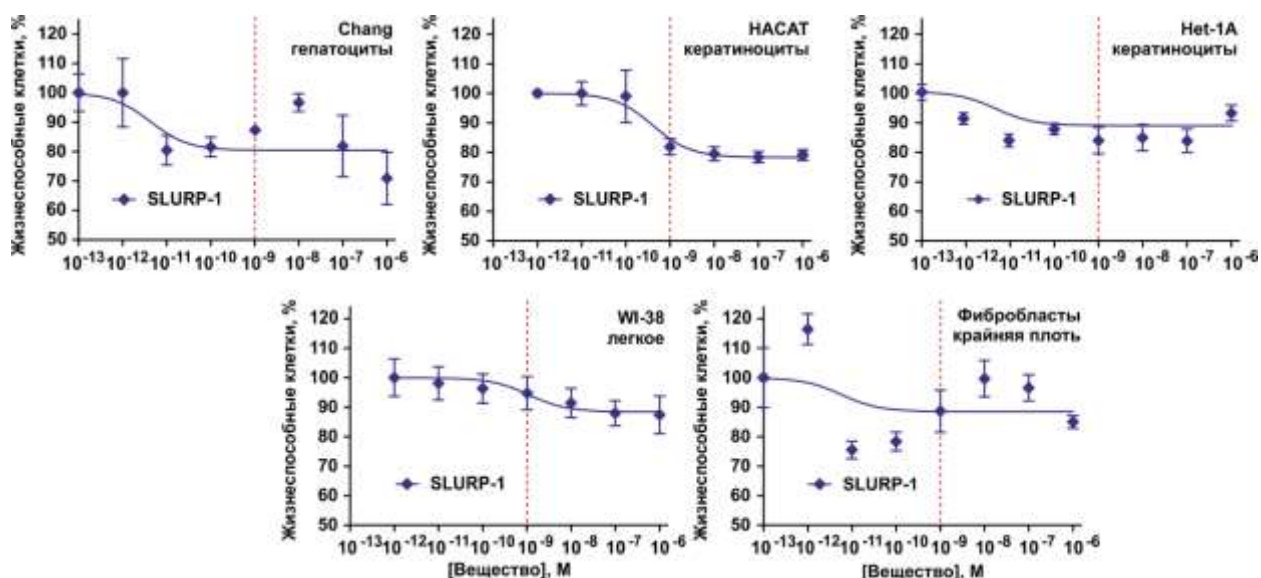


Рис. 4.69. Дозозависимые кривые влияния rSLURP-1 на пролиферацию нормальных клеток гепатоцитов, кератиноцитов HACAT и Het-1A, легочного эпителия WI38 и фибробластов крайней плоти. Клетки инкубировали с rSLURP-1 в течение 24 часов и определяли число жизнеспособных клеток с помощью теста WST-1. Данные приведены как % жизнеспособных клеток относительно контроля \pm среднеквадратичная ошибка ($n=3$).

Так как 1 нМ rSLURP-1 практически не влияет на рост нормальных кератиноцитов Het-1A ни при 24 часовой, ни при 48 часовой инкубации (Рис. 4.55Б), но снижает рост клеток карциномы кожи A431 до 60% относительно контроля в течение 24 часовой инкубации (Рис. 4.68), можно предположить наличие так называемого «фармакологического окна», т.е. диапазона концентраций, при котором rSLURP-1 селективно подавляет рост карцином, но не нормальных клеток.

4.4.3.2. $\alpha 7$ -nAChR – мишень действия rSLURP-1 в клетках карцином

Ранее сообщалось, что rSLURP-1, rSLURP-2 и α -Bgtx взаимодействуют с $\alpha 7$ -nAChR (п. 4.4.1.3 и 4.4.2.3, [342]). Для подтверждения экспрессии функциональных $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеточной мембраны, клетки различных раковых линий были проинкубированы с флуоресцентно-меченым α -Bgtx (α -Bgtx/A555), и экспрессия функциональных $\alpha 7$ рецепторов была проанализирована методом проточной цитометрии. Все исследованные клеточные линии экспрессировали функциональные $\alpha 7$ -nAChR на поверхности, но уровни экспрессии рецептора отличались от линии к линии. Наибольшее количество сайтов связывания α -Bgtx/A555 было обнаружено на поверхности клеток A431 и MCF-7, в то время как нормальные кератиноциты Het-1A, A549, SKBR3 и HT-29 экспрессировали примерно в два раза меньшие количества $\alpha 7$ -nAChR. Наблюдаемые уровни экспрессии $\alpha 7$ -nAChR на мембранах клеток различных линий не коррелировали с антипролиферативной активностью α -Bgtx и rSLURP-1 на изучаемых клетках (Рис. 4.68).

Таким образом, регуляция пролиферации клеток с помощью rSLURP контролируется внутриклеточными сигнальными путями и существенно не зависит от уровня экспрессии функциональных $\alpha 7$ -nAChR на мембране клеток.

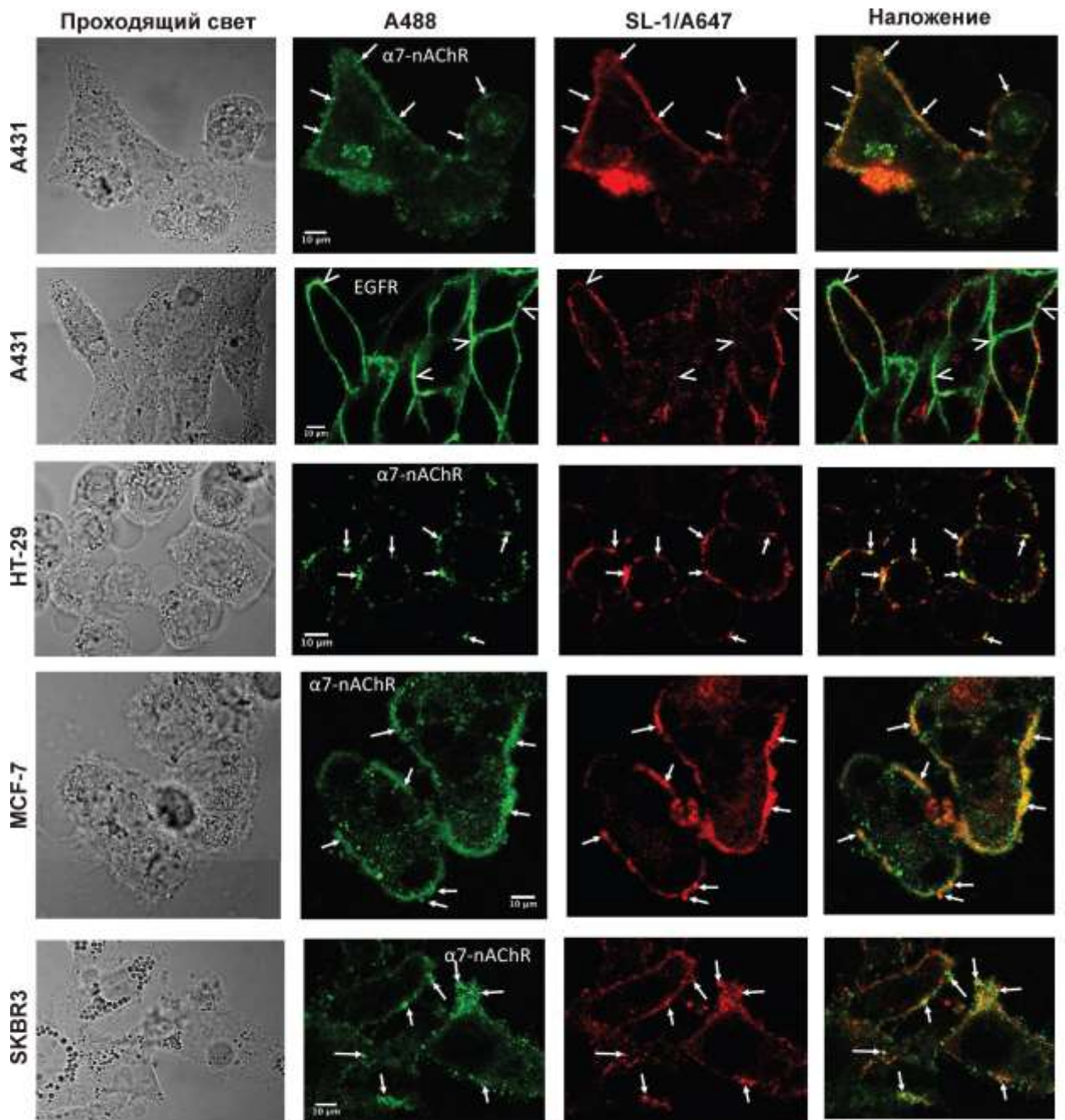


Рис. 4.70. Со-локализация флуоресцентно-меченого SLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR и EGFR в эпителиальных клетках. Клетки инкубировали в течение 1 часа с SL-1/A647, фиксировали и окрашивали антителами на $\alpha 7$ -nAChR или EGFR (для A431). Представлены изображения в проходящем канале (первый столбец) и конфокальные флуоресцентные изображения окрашивания рецепторов антителами, меченными A488 (второй столбец), распределения SL-1/A647 (третий столбец) и их наложение (четвертый столбец). Стрелки указывают точки на плазматической мембране, где SL-1/A647 со-локализуется с $\alpha 7$ -nAChR. Области клеточной мембраны с выраженным окрашиванием EGFR, но без или с низким связыванием SL-1/A647 также отмечены стрелками. Шкала = 10 мкм.

Чтобы определить мишень rSLURP-1 в раковых клетках, мы проанализировали локализацию флуоресцентно-меченого rSLURP-1 (SL-1/A647) и $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431, A549, MCF-7, SKBR3, и HT-29 при помощи конфокальной микроскопии¹. Со-локализация SL-1/A647 и $\alpha 7$ -nAChR на поверхности плазматической мембраны наблюдалась для всех исследованных клеточных линий (Рис. 4.70). Со-локализация rSLURP-1 с функциональными $\alpha 7$ -nAChR была дополнительно подтверждена в клетках A431 при их совместном окрашивании α -Bgtx/A555 и SL-1/CF488A.

Для клеток A431 характерна гиперэкспрессия EGFR [343]. Недавно, была показана со-локализация $\alpha 7$ -nAChR и EGFR на мембране клеток эпителия ротовой полости и клеток рака легкого [332]. Также предполагалось и наличие общих сигнальных путей, запускаемых активацией этих рецепторов. Поэтому, для определения рецептора, который мог бы опосредовать эффект SLURP-1 на клетках A431, была проанализирована локализация SL-1/A647 и EGFR. EGFR был довольно равномерно распределен на плазматической мембране клеток A431 (Рис. 4.70). Вследствие такого распределения, любой поверхностно-связанный SL-1/A647 был со-локализован с EGFR и наоборот, но их паттерны окрашивания не коррелировали, например, SL-1/A647 вообще не связывался с некоторыми участками мембраны с высоким уровнем экспрессии EGFR. Хотя эти результаты не могут исключать какого-либо взаимодействия между SLURP-1 и EGFR, они четко указывают, что EGFR не является основной мишенью действия SLURP-1 в клетках A431.

Для прямого доказательства связи антипролиферативной активности rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR на клетках A431 был проведен нокдаун экспрессии эндогенного $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431 при помощи малой интерферирующей РНК. Нокдаун экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431 приводил к достоверному падению экспрессии $\alpha 7$ -nAChR на мембране клеток A431 (Рис. 4.71АБ). Анализ числа жизнеспособных клеток A431 показал, что нокдаун экспрессии $\alpha 7$ -nAChR практически полностью отменяет антипролиферативный эффект rSLURP-1 (Рис. 4.71В). В качестве дополнительного контроля мы использовали α -Bgtx, который также ингибировал рост клеток A431, и почти не влиял на рост клеток после нокдауна $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 4.71).

¹ Совместно с д.б.н. А.В. Феофановым и к.б.н. Г.Шароновым, лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН.

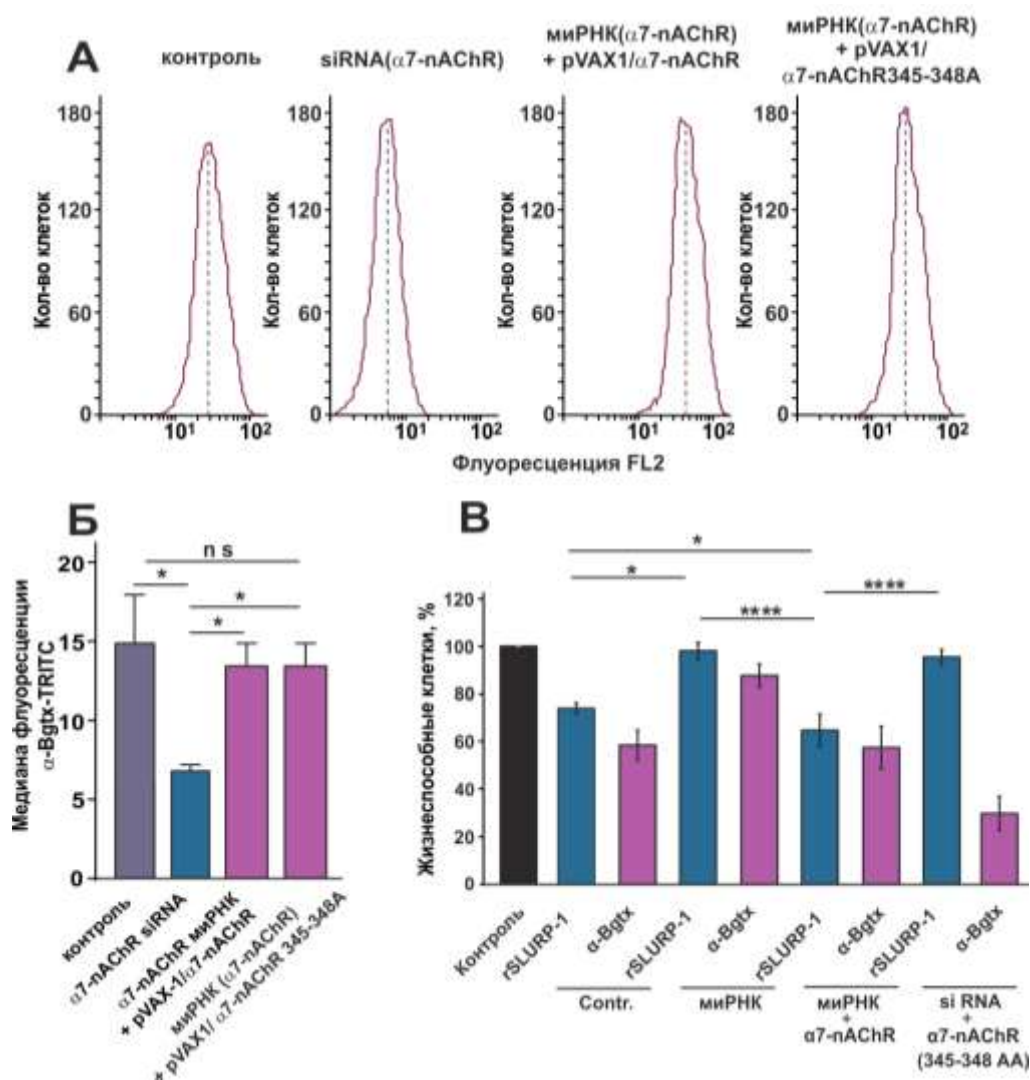


Рис. 4.71. Влияние нокдауна $\alpha 7$ -nAChR на антипролиферативную активность rSLURP-1 и α -Bgtx в клетках A431. (А). Репрезентативные гистограммы клеток A431, окрашенных TRITC-меченым α -бунгаротоксином. (Б). Медианы интенсивности флуоресценции TRITC-меченого α -бунгаротоксина, представленные как медиана \pm среднеквадратичная ошибка, $n = 4-6$. * ($p < 0.05$) указывает на статистически значимое отличие между группами данных (ANOVA, тест Тьюки). (В). Влияние rSLURP-1 и α -Bgtx на жизнеспособность клеток A431 после нокдауна экспрессии $\alpha 7$ -nAChR и восстановления экспрессии рецептора $\alpha 7$ -nAChR дикого типа либо мутантного рецептора $\alpha 7$ -nAChR (345-348A) с удаленным внутриклеточным доменом. Клетки (7500 шт/лунка планшета) инкубировали с веществами в течение 48 часов, и затем число жизнеспособных клеток определяли с помощью WST-1 теста. * ($p < 0.05$), **** ($p < 0.0001$) означает статистически значимое отличие между контрольными и обработанными SLURP-1 клетками (ANOVA, тест Даннета).

4.4.3.3. Белки SLURP ингибируют рост клеток A431 и A549 посредством активации различных поверхностных рецепторов

Для более детального изучения мишеней rSLURP в эпителиальных клетках, мы исследовали антипролиферативный эффект этих белков на клетках A431 в присутствии специфического ингибитора $\alpha 7$ -nAChR α -Bgtx и неспецифического антагониста nAChR мекамиламина. Кроме того, чтобы исследовать роль mAChR, EGFR и β -адренорецепторов в передаче антипролиферативных сигналов белков rSLURP, мы использовали ингибиторы

этих рецепторов: атропин, гевитиниб и тимолол, соответственно. Следует отметить, что атропин также является антагонистом $\alpha 9$ -содержащих nAChR [344].

Чтобы определить оптимальную концентрацию ингибиторов, мы изучали их активность на клетках A431. Все ингибиторы продемонстрировали антипролиферативную активность. Кривые «доза-эффект» и параметры EC_{50} показаны на Рисунке 4.68 и в Таблицах 4.7 и 4.8. Полумаксимальные эффективные концентрации α -Bgtx, гевитиниба и тимолола, определенные в работе, были близки к их ожидаемому средству к $\alpha 7$ -nAChR, EGFR и β -адренорецепторам, соответственно. В то же время EC_{50} для атропина и мекамиламина были ниже, чем ожидаемое средство атропина к мускариновым (~ 1 нМ) и мекамиламина к никотиновым (~ 1 мкМ) рецепторам ацетилхолина. Увеличение концентраций атропина и мекамиламина до 10 мкМ не приводили к усилению их антипролиферативных эффектов. Поэтому для дальнейших экспериментов, мы использовали концентрацию 10 нМ всех ингибиторов, при которой наблюдалось насыщение антипролиферативного действия.

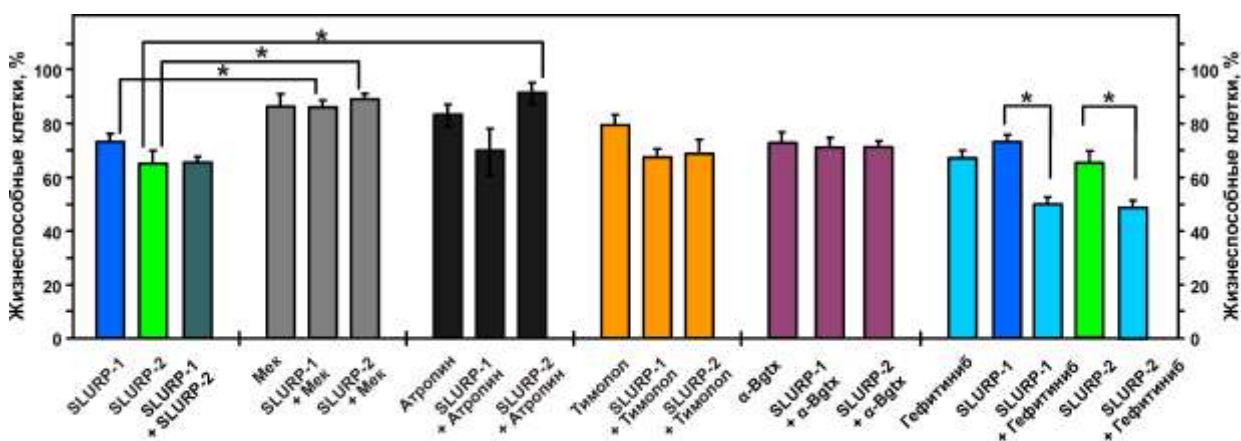


Рис. 4.72. Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 и их совместного применения с мекамиламином (Мек), атропином, тимололом, α -Bgtx и гевитинибом на рост клеток A431. Данные приведены как % от контроля \pm среднеквадратичная ошибка (n=6). Контрольные лунки не содержали никаких добавленных соединений. * ($p < 0,05$) означает, что группы данных значительно отличаются друг от друга согласно двустороннему t-тесту. Концентрации rSLURP-1 и rSLURP-2 составляли 1 нМ. Концентрации других ингибиторов составляли 10 нМ.

Мекамиламин и атропин в концентрациях от 10 нМ до 10 мкМ приводили к снижению количества жизнеспособных клеток A431 до $\sim 80\%$ контроля (Рис. 4.68, Таблица 4.8). Совместное применение 1 нМ SLURP с 10 нМ или 10 мкМ мекамиламина значительно уменьшило ингибирование роста клеток белками SLURP (Рис. 4.72). В то же время, совместная инкубация клеток A431 с 1 нМ белков SLURP и 10 нМ или 1 мкМ атропина приводила к значительной отмене антипролиферативного действия SLURP-2, но не влияла на активность SLURP-1 (Рис. 4.72). С учетом ранее определенных фармакологических профилей белков rSLURP-1 и rSLURP-2 (п. 4.4.1.3 и 4.4.2.3), можно сделать вывод, что антипролиферативный эффект rSLURP-1 на клетки A431 опосредован

путем передачи сигналов через $\alpha 7$ -nAChR, но действие rSLURP-2 может быть связано с взаимодействием с различными подтипами nAChR и mAChR.

Блокада β -адренорецепторов тимололом в концентрациях ≥ 1 нМ также приводила к уменьшению количества жизнеспособных клеток A431 до $\sim 80\%$ контроля (Рис. 4.68, Таблица 4.8) и достоверно не влияла на антипролиферативную активность белков rSLURP (Рис. 4.72). Эти результаты показывают, что β -адренорецепторы не участвуют в передаче антипролиферативного сигнала белков rSLURP в клетках A431.

В соответствии с ранее опубликованными данными [345], рост клеток A431 значительно ингибировался гефитинибом, необратимым ингибитором EGFR, в настоящее время используемым для лечения опухолей, связанных с активацией этих рецепторов [341], в концентрациях ≥ 10 нМ (до $\sim 65\%$ относительно контроля, Рис. 4.68, Таблица 4.8). Сравнение эффектов rSLURP и гефитиниба на клетках A431 выявило более высокую активность белков SLURP. Так, оба рекомбинантных белка проявляли значительный антипролиферативный эффект при концентрации 1 нМ, в то время как гефитиниб демонстрировал аналогичный эффект при концентрации 10 нМ (Рис. 4.68). Совместная 24-часовая инкубация клеток A431 с гефитинибом и белками SLURP приводила к аддитивному ингибированию пролиферации клеток и почти полностью останавливала рост клеток A431 (Рис. 4.72). Эти данные свидетельствуют о том, что ингибирование $\alpha 7$ -nAChR с помощью белков SLURP не влияет на активность EGFR, и, в свою очередь, ингибирование EGFR гефитинибом не влияет на активность $\alpha 7$ -nAChR. Таким образом, результаты экспериментов со специфическими ингибиторами и конфокальной микроскопии ясно показывают, что антипролиферативная активность rSLURP-1 не связана с EGFR. То, что и rSLURP-1 и rSLURP-2 ингибируют пролиферацию клеток MCF-7, которые экспрессируют EGFR в гораздо меньших количествах, чем клетки A431 [343], подтверждает то, что EGFR не является мишенью белков rSLURP.

Наблюдаемая разница в действии α -Bgtx и мекамиламина может быть связана с разным механизмом взаимодействия с nAChR. α -Bgtx является конкурентным специфическим ингибитором $\alpha 7$ -nAChR, взаимодействующим с ортостерическим лиганд-связывающим сайтом во внеклеточном домене рецептора, тогда как мекамиламин является неконкурентным ингибитором всех подтипов nAChR, вероятно, действующим через трансмембранный домен [346]. Возможно, что связывание белков rSLURP или α -Bgtx с рецепторами инициирует похожие, связанные с nAChR механизмы передачи сигнала [212], в то время как мекамиламин полностью блокирует проведение сигнала через nAChR. Совместная инкубация клеток A431 с белками rSLURP (1 нМ) и α -Bgtx (10 нМ) не приводила к аддитивному или синергическому подавлению роста клеток (Рис.

4.72). Инкубация клеток A431 одновременно с rSLURP-1 и rSLURP-2 также не вызывала усиления антипролиферативного действия белков, возможно из-за достижения максимально возможных эффектов, связанных с nAChR (Рис. 4.72).

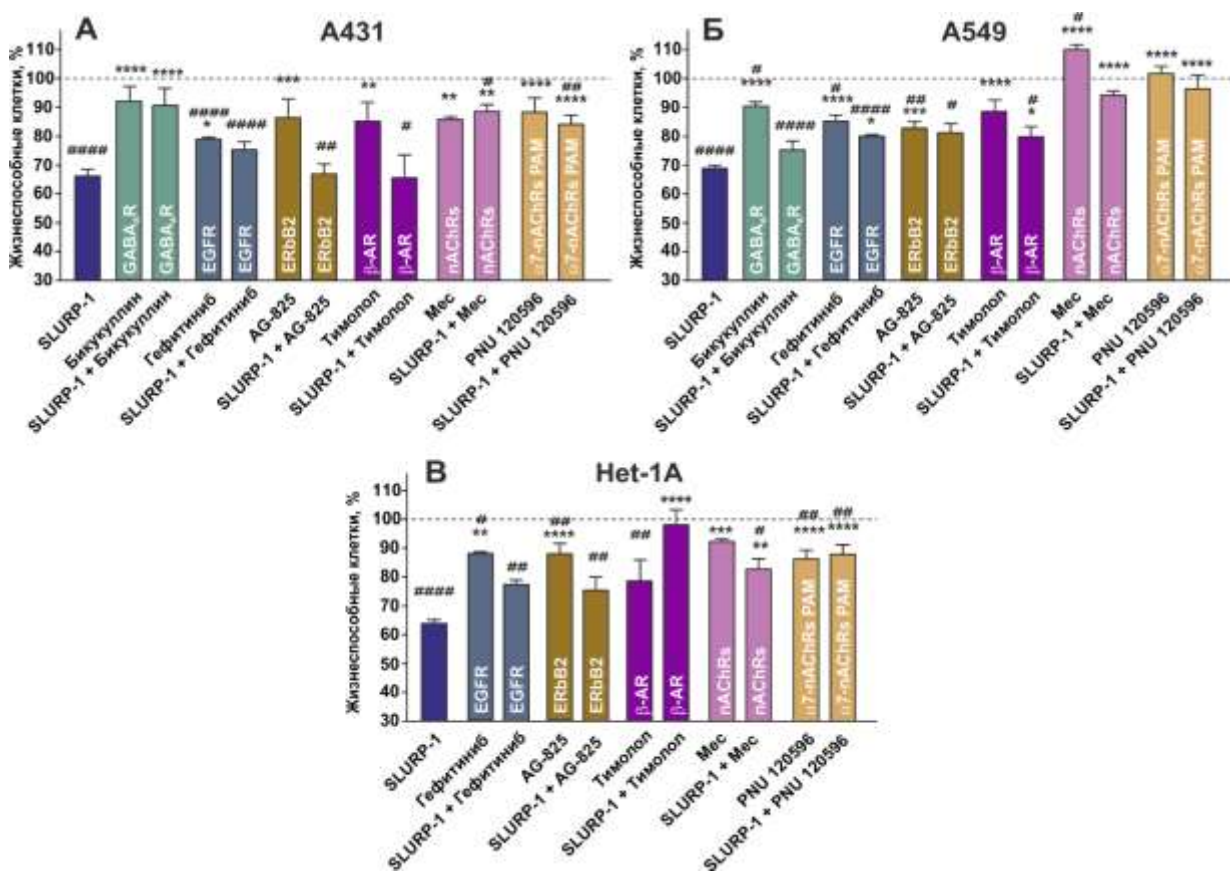


Рис. 4.73. Влияние rSLURP-1 и ингибиторов различных поверхностных рецепторов на рост клеток эпидермоидной карциномы A431 (A), аденокарциномы легкого A549 (Б) и нормальных кератиноцитов Het-1A (B). Данные представляют собой среднее \pm с.о., $n = 3-28$; # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), и #### ($p < 0.0001$) указывают на статистически значимое отличие от контроля (100%) согласно двухстороннему t-критерию Стьюдента; * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) и **** ($p < 0.0001$) указывают на статистически значимое отличие между «rSLURP-1» и группами «rSLURP-1+ингибитор/модулятор» (ANOVA, тест Даннета для множественного сравнения). Уровень контроля (100% жизнеспособных клеток) соответствует необработанным клеткам.

Чтобы исследовать возможную роль и других поверхностных рецепторов (ErbB2 и GABA_A рецепторов) в передаче антипролиферативных сигналов rSLURP-1, мы использовали ингибиторы этих рецепторов: AG-825 и бикикуллин, соответственно. Было обнаружено, что бикикуллин отменяет эффект rSLURP-1, что говорит о том, что антипролиферативный эффект rSLURP-1 на клетках эпидермоидной карциномы A431 опосредуется $\alpha 7$ -nAChR и GABA_A рецепторами (Рис. 4.73А). Также, мы уточнили поверхностные мишени rSLURP-1 на клетках карциномы A549 и сравнили полученные на опухолевых клетках результаты с данными, полученными на нормальных кератиноцитах Het-1A. На клетках аденокарциномы легкого A549 нами обнаружено, что антипролиферативный эффект SLURP-1 связан с активацией nAChR, EGFR и β -

адренергических рецепторов, но не опосредован ни ERbB2, ни GABA_A рецепторами (Рис. 4.73Б). В обеих клеточных линиях антипролиферативный эффект rSLURP-1 был связан с его действием на nAChR, что указывает на то, что мишенью действия SLURP-1 являются именно nAChR, а отличия в опосредующих эффект rSLURP-1 рецепторах между клетками A431 и A549 скорее всего объясняется секрецией различных факторов клетками A431 и A549 при инкубации с рекомбинантным SLURP-1. Торможение роста нормальных кератиноцитов Het-1A при их инкубации с rSLURP-1 опосредуется активацией nAChR, и, возможно, β-адренергическими рецепторами, но не EGFR и ERbB2 (Рис. 4.73В).

4.4.3.4. rSLURP-1 ингибирует рост эпителиальных клеток по метаботропному механизму

Кроме того, нами было исследовано влияние положительного аллостерического модулятора α7-nAChR II типа PNU 120596, ингибитора десенситизированного состояния рецептора, на активность rSLURP-1 в опухолевых клетках. PNU 120596 практически полностью отменял антипролиферативный эффект rSLURP-1 на раковых клетках A431 и A549 и на кератиноцитах (Рис. 4.73). Видимо, SLURP-1 взаимодействует с десенситизированным состоянием α7-nAChR как в опухолевых, так и в нормальных клетках, что находится в согласии с ранее высказанной нами гипотезой, что SLURP-1 взаимодействует с рецептором не в классическом ортостерическом сайте (п. 4.4.1.3). Таким образом, основным молекулярным механизмом, опосредующим антипролиферативный эффект rSLURP-1, является его взаимодействие с десенситизированным состоянием α7-nAChR, но при этом в различных типах опухолевых клеток rSLURP-1 происходит активация и других поверхностных рецепторов. Эти поверхностные рецепторы скорее всего активируются факторами, секреция которых может регулируется активацией α7-nAChR [347].

Кроме того, мы проверили ранее высказанную гипотезу о возможном действии rSLURP-1 на эпителиальные клетки по метаботропному механизму (п.4.4.1.3, [212]). Как известно, работа α7-nAChR может регулироваться как по ионотропному, так и по метаботропному пути, благодаря наличию G-белок связывающего сайта во внуклеточной петле рецептора (Рис. 1.8). Как было показано выше (Рис. 4.71Б,В), антипролиферативная активность белков rSLURP-1 и α-Bgtx на клетках A431 отменялась в результате нокдауна α7-nAChR. При этом, активность обоих белков восстанавливалась после дополнительной трансфекции клеток плазмидой, кодирующей ген α7-nAChR дикого типа (rSLURP-1 снижал число жизнеспособных клеток до 64.7 ± 6.7 %, а α-Bgtx до 57.4 ± 8.79 относительно контроля, Рис. 4.71В). Если же после нокдауна α7-nAChR клетки

трансфецировали плазмидой, содержащей ген мутантного рецептора с заменой G-белок связывающего сайта (345-348 а.о.), антипролиферативная активность rSLURP-1 не восстанавливалась. В то же время клетки, трансфецированные мутантным вариантом $\alpha 7$ -nAChR, отвечали на наличие в среде α -Bgtx (Рис. 4.71B). Полученные результаты указывают на то, что взаимодействие rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431 запускает внутриклеточные каскады по G-белок опосредованному метаботропному пути и не связан с открытием канала рецептора. При этом, действие α -Bgtx, как и ожидалось, связано именно с ингибированием тока через канал рецептора.

4.4.3.5. Антипролиферативный эффект rSLURP-1 в различных клетках связан с активацией разных сигнальных внутриклеточных путей, но всегда с участием IP3 рецепторов

Для исследования механизмов, лежащих в основе антипролиферативной активности rSLURP-1, были исследованы эффекты, оказываемые пептидом SLURP-1 на рост раковых и нормальных клеток в присутствии селективных ингибиторов различных внутриклеточных сигнальных каскадов. Были использованы селективные ингибиторы MAP-киназы MEK/ERK (PD98059), JNK (SP600125), MAP-киназы p38 (SB203580), фосфоинозитид-3-киназы PI3K (вортманнин), PKC (Go 6983), рецептора IP3 (ксестоспонгин B), и ингибиторов факторов транскрипции: NF κ B (Bay 11-7082, предотвращающий диссоциацию ингибирующей I κ B киназы (IKK) от NF κ B) и JSH-23 ингибирующий транслокацию субъединицы p65 NF κ B в ядро), а также STAT3 (S3I-201) и STAT5 (285986-31-4).

Проведенный анализ выявил отличия в действии пептида rSLURP-1 на опухолевые клетки A549 и A431. Было показано, что антипролиферативный эффект rSLURP-1 на клетках A431 опосредован сигнальными путями киназ JNK, p38/MAPK, PI3K, PKC, а также активацией IP3-рецепторов (Рис. 4.74A). Также, в проведении сигнала от SLURP-1 в данных клетках участвует транскрипционный фактор STAT3, но не NF κ B и STAT5 (Рис 4.74A), а MEK/ERK не участвует в проведении антипролиферативного сигнала от SLURP-1 в клетках A431 (Рис. 4.74A).

Аналогично ситуации, наблюдаемой для A431, ингибиторы ксестоспонгин B (IP₃ - рецептор) и вортманнин (PI3K) устраняли влияние rSLURP-1 на рост клеток A549. При этом, в отличие от A431, ингибиторы - SB203580 (MAP-киназа p38), Go 6983 (PKC) и SP600125 (JNK) и транскрипционных факторов NF κ B и STAT5 не отменяли антипролиферативную активность rSLURP-1 (Рис. 4.74Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что rSLURP-1 запускает в клетках A549 и A431 различные

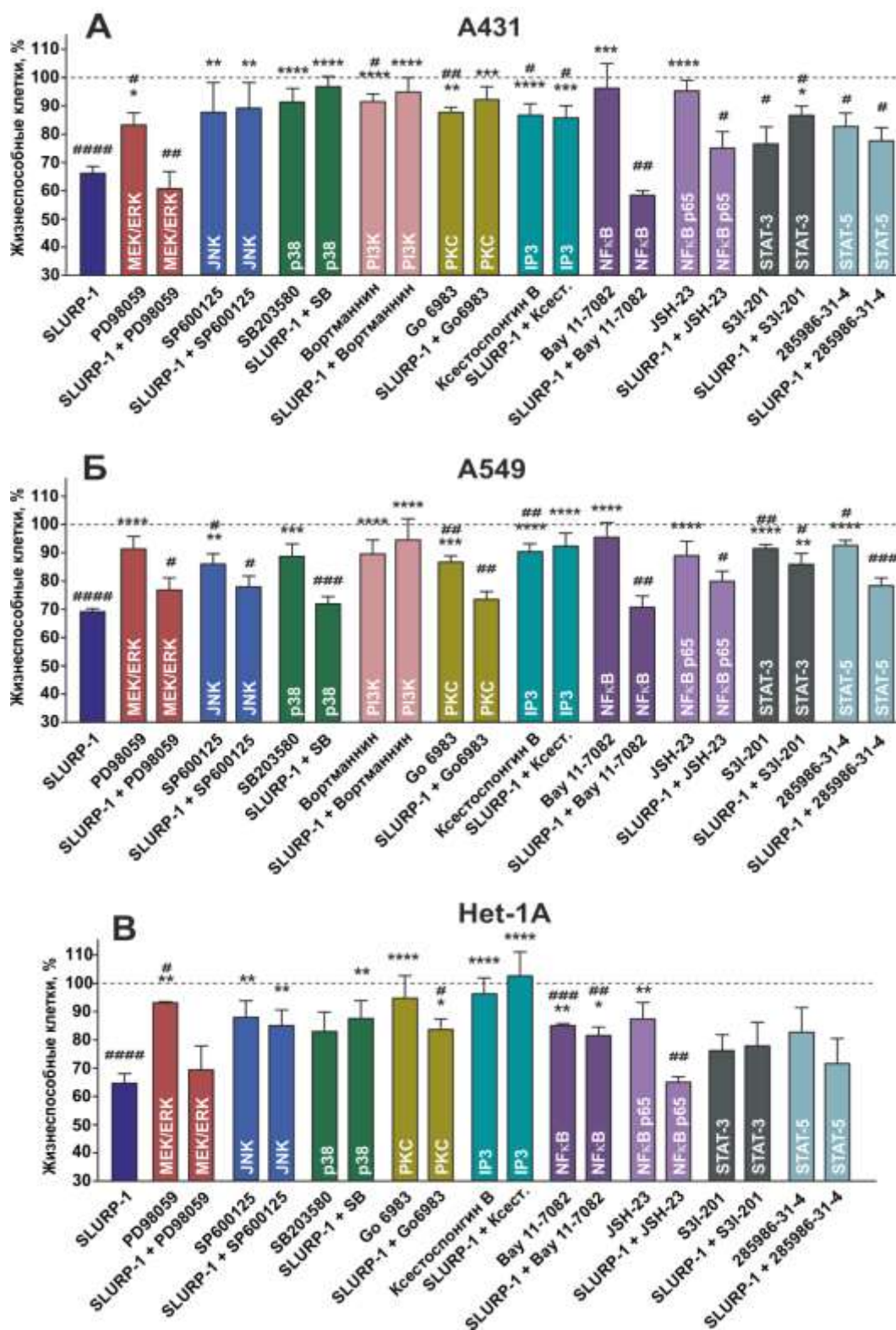


Рис. 4.74. Влияние rSLURP-1 и ингибиторов различных сигнальных путей на рост клеток эпидермоидной карциномы A431 (А), аденокарциномы легкого A549 (Б) и нормальных кератиноцитов Het-1A (В). Данные представляют собой среднее \pm средноквадратичная ошибка, $n = 3-28$; # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), ##### ($p < 0.0001$) указывают на статистически значимое отличие от контроля (100%) (двухсторонний t-критерий Стьюдента); * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) и **** ($p < 0.0001$) указывают на статистически значимое отличие между «rSLURP-1» и группами «rSLURP-1+ингибитор» (ANOVA и тест Даннета для множественного сравнения). Уровень контроля (100% жизнеспособных клеток) соответствует необработанным клеткам.

внутриклеточные сигнальные пути, что может быть связано, в том числе, с тем, что rSLURP-1 активирует разные поверхностные мишени в изучаемых клетках. Мы также определили влияние ингибиторов на жизнеспособность нормальных кератиноцитов Het-1A. Было показано, что в проведении сигнала rSLURP-1 участвует киназа p38/MAPK и IP₃-рецепторы, но не транскрипционные факторы STAT3 и STAT5 (Рис. 4.74B).

Важно отметить, что передача сигналов через $\alpha 7$ -nAChR может активировать внутриклеточные ответы двумя путями. Канонический ионотропный путь связан с током ионов Ca²⁺ через канал рецептора и последующей активацией Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназы (CaMK) [348]. Альтернативный метаботропный путь не связан с током ионов через канал рецептора, но включает активацию фосфолипазы C (PLC) и рецепторов IP₃ [33,51,349]. PLC гидролизует мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием двух вторичных мессенджеров - IP₃ и 1,2-диацилглицерина (DAG). IP₃ вызывает высвобождение Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума (ER) благодаря взаимодействию с рецепторами IP₃ [213], а Ca²⁺ и DAG, в свою очередь, активируют протеинкиназу C (PKC) [350]. Таким образом, участие IP₃-рецепторов в антипролиферативном эффекте rSLURP-1 на всех исследованных клетках согласуется с метаботропным механизмом, лежащим в основе действия rSLURP-1 (Рис. 4.71).

4.4.3.6. rSLURP-1 в клетках A431 вызывает фосфорилирование киназ и транскрипционных факторов, контролирующих пролиферацию

Для более детального исследования сигнальных каскадов, запускаемых rSLURP-1 в клетках A431, с помощью набора из 45 киназ и регуляторных белков был изучен паттерн фосфорилирования при 24-часовой инкубации клеток с 1 мкМ rSLURP-1 (Рис. 4.75). Эксперименты показали увеличение фосфорилирования EGFR(Y1086) при инкубации клеток с rSLURP-1, хотя эксперименты с использованием gefитиниба не выявили вовлечение данного рецептора в действие rSLURP-1 на клетках A431. Более того, было выявлено, что rSLURP-1 не солокализует с EGFR на поверхности клеток A431. Полученные результаты свидетельствуют о том, что rSLURP-1 активирует EGFR в клетках A431, возможно, не напрямую, а вследствие секреции различных факторов, что требует дополнительного исследования. Кроме того, мы наблюдали двукратное увеличение фосфорилирования ERK1/2 по аминокислотным остаткам T202, Y204, T185 и Y187 после обработки rSLURP-1 (Рис 4.75), хотя ингибиторный анализ не подтверждает участие MEK/ERK в антипролиферативном эффекте rSLURP-1. Возможно, rSLURP-1 вызывает

МЕК-независимую активацию ERK [351].

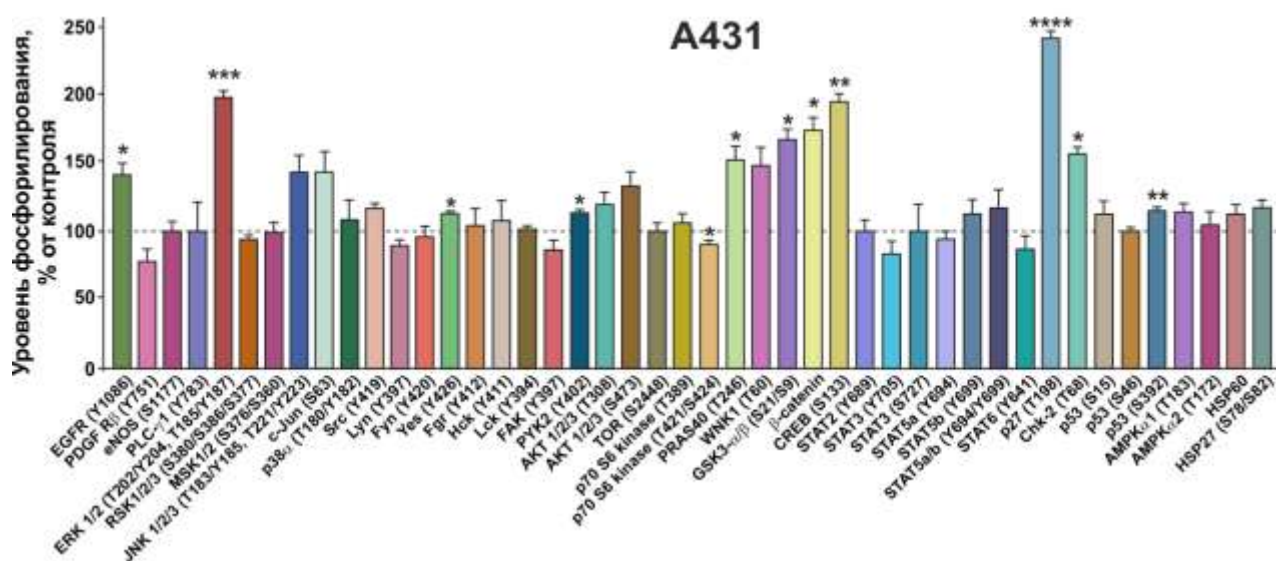


Рис. 4.75. Влияние rSLURP-1 на фосфорилирование внутриклеточных киназ и регуляторных белков в клетках A431. Уровень фосфорилирования представлен как % от контроля \pm среднеквадратичная ошибка, $n = 4$; * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.001$) и **** ($p < 0.0001$) указывают на значительное отличие от контроля согласно двухстороннему t-критерию Стьюдента. Уровень контроля (100%) соответствует необработанным клеткам.

Как уже обсуждалось неоднократно, $\alpha 7$ -nAChR имеет внутриклеточную последовательность, связывающую G-белки, и этот рецептор может активироваться по метаболитному пути [352]. Активация G-белков может стимулировать митоген-активируемый сигнальный путь, ответственный за выживание, подвижность клеток, а также дифференцировку и их митотическое деление. Стимуляция же GPCR может приводить к фосфорилированию EGFR и дальнейшему запуску RAF-МЕК-ERK сигнального каскада. Также известно, что киназы семейства ERK (p42/44 MAPK) участвуют в контроле митоза. Стимуляция клеток факторами роста коррелирует с активацией p42/44 MAPK. В фибробластах легких и клетках яичника китайского хомячка уровень активации MAPK в фазе G1 коррелировал со способностью клеток переходить в фазу S клеточного цикла [353]. На клетках PC-12 было показано, что пролиферацию клеток индуцирует короткая активация Ras/Raf, тогда как длительная активация заставляет эти клетки медленно проходить клеточный цикл [354]. Эти данные демонстрируют, что ERK играет ключевую роль в контроле прогрессии клеточного цикла [355]. Результаты, полученные в ходе исследования фосфорилирования, позволяют сформировать гипотезу, согласно которой, воздействие rSLURP-1 приводит к стимуляции RAF-МЕК-ERK и других сигнальных каскадов. В результате клетки предпочитают нормальное митотическое деление онкогенной пролиферации. Возможно, rSLURP-1 участвует в регуляции контрольных точек клеточного цикла, осуществляющих точный контроль за делением клетки и предупреждающих повреждения генетической информации. Клеточный цикл

имеет ряд контрольных точек, а неконтролируемая онкогенная пролиферация клеток всегда связана с функциональной отменой хотя бы одной из них.

Известно, что нижестоящим эффектором ERK является фактор транскрипции CREB, для которого мы также выявили усиление фосфорилирования (Рис. 4.75). Другим крупным сигнальным каскадом, активируемым rSLURP-1 согласно данным нашего анализа, был Wnt-каскад. Мы наблюдали статистически значимое увеличение фосфорилирования компонентов этого пути – GSK3 α/β и β -катенина (Рис. 4.75). Wnt-путь также играет важную роль при развитии рака. Известно, что активация ERK приводит к фосфорилированию GSK3 α/β , что ингибирует активность данного белка и увеличивает количество β -катенина (как и было нами обнаружено в клетках A431). Известно также, что гетеротримерные G-белки могут оказывать различное регуляторное влияние на GSK3 α/β . Димеры G $\beta\gamma$ активируют фосфоинозитид-3-киназу (PI3K) [356], что приводит к активации Akt и ингибированию GSK3 α/β . Также было показано, что активированный G $\beta 1\gamma 2$ рекрутирует GSK α/β на плазматическую мембрану и увеличивает его киназную активность [357]. Активированный G α_q также способен активировать GSK3 α/β [358]. Напротив, Gas разъединяет GSK3 α/β и Axin, и ингибирует GSK3-опосредованное фосфорилирование β -катенина [359]. Таким образом, GSK3 α/β имеет множественные регуляторные взаимодействия с G-белками [360]. Следует отметить, что активация Wnt, традиционно способствующая росту опухолевых клеток, вызывает торможение роста клеток меланомы и карциномы груди [361], поэтому rSLURP-1 может запускать Wnt каскад для торможения роста клеток A431.

В сигнальный каскад, активируемый rSLURP-1, также вовлечен АКТ-сигнальный путь. Несмотря на то, что увеличение фосфорилирования АКТ под действием SLURP-1 было недостоверным, мы обнаружили увеличение фосфорилирования белка PRAS40, медиатора PI3K/Akt пути.

Мы наблюдали значительное увеличение фосфорилирования ингибитора циклин-зависимой киназы p27 (T198), которое также может быть связано с активацией АКТ. Этот регулятор клеточного цикла считается опухолевым супрессором и часто инактивируется через нарушение синтеза, ускоренную деградацию или неправильную локализацию. Фосфорилирование p27 индуцирует неправильную локализацию p27 из ядра в цитоплазму, где он подвергается протеасомной деградации [362]. На примере клеток A549 показано, что подавление экспрессии p27 уменьшает пролиферацию клеток и вызывает апоптоз [363]. Таким образом, rSLURP-1 может индуцировать неправильную локализацию p27 и дальнейшую деградацию в цитоплазме, что может приводить к остановке клеточной пролиферации.

Кроме того, нами обнаружено увеличение фосфорилирования онкосупрессорного белка p53 в стресс-индуцируемом сайте S392, которое может запускаться активацией ERK (Рис. 4.75). Тот факт, что нами обнаружено увеличение фосфорилирования белка p53 в положении S329 свидетельствует о запуске в клетках A431 стресса, связанного с повреждением ДНК. Это подтверждается тем, что SLURP-1 усиливает фосфорилирование киназы Chk-2, которая играет важную роль в ответе клетки на повреждения ДНК [364].

Таким, образом, мы обнаружили, что в клетках A431 SLURP-1 запускает EGFR-опосредованные сигнальные каскады, включающие в себя активацию ERK, Wnt-сигнального пути и АКТ-каскада, что приводит к запуску множества механизмов, контролирующих пролиферацию клеток.

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

Для изучения влияния rSLURP-1 на экспрессию $\alpha 7$ -nAChR и эндогенного SLURP-1 в клетках A431, была использована проточная цитометрия¹. Инкубация клеток A431 в течение 24 часов с rSLURP-1 в концентрации 1 нМ и выше приводила к снижению уровня экспрессии $\alpha 7$ субъединицы nAChR на ~ 10% (Рис. 4.76Б). Использование флуоресцентно-меченого α -Bgtx позволило детектировать более выраженный эффект rSLURP-1 на экспрессию функциональных $\alpha 7$ -nAChR (снижение концентрации рецептора на клеточной мембране на ~ 25%). Неожиданно, проточная цитометрия показала значительное снижение уровня эндогенного SLURP-1 уже после часовой инкубации клеток A431 с 1 нМ и большими количествами rSLURP-1 (на ~ 30% в среднем, рисунок 4.76Г).

Анализ клеток A431, обработанных rSLURP-1 при помощи конфокальной микроскопии выявил значительные изменения в паттерне локализации эндогенного SLURP-1 (Рис. 4.77). До обработки клеток, SLURP-1 был преимущественно расположен во внутриклеточных компартментах, хотя наблюдалось и накопление белка на границе клеток (Рис. 4.77, левая панель). После обработки клеток 1 мкМ рекомбинантного SLURP-1, интенсивность окрашивания внутриклеточного SLURP-1 резко уменьшилась через 1 ч (Рис. 4.77, центральная панель). Было выдвинуто предположение, что воздействие рекомбинантного белка индуцирует секрецию эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных компартментов во внеклеточную среду. Чтобы подтвердить это, клетки A431 перед инкубацией с rSLURP-1 были предобработаны ингибитором экзоцитоза брефельдином А.

¹ Совместно с д.б.н. А.В. Феофановым и к.б.н. Г.Шароновым, лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН.

При этом, снижения содержания внутриклеточного SLURP-1 при обработке клеток рекомбинантным белком не наблюдалось (Рис. 4.77, правая колонка).

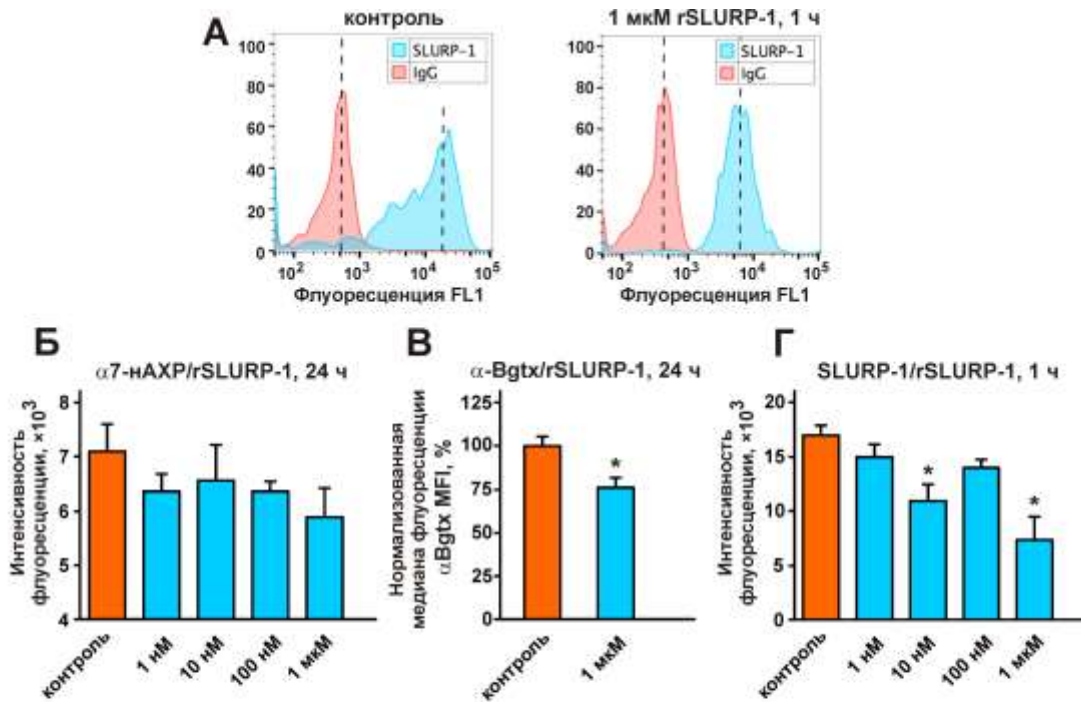


Рис. 4.76. Анализ интенсивности окрашивания эндогенного SLURP-1 и $\alpha 7$ -nAChR при обработке rSLURP-1 при помощи проточной цитометрии. (А). Гистограммы распределения клеток по интенсивности A-488 для необработанных клеток (левый график) и клеток, инкубированных с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 1 часа (правый график), после окрашивания либо контрольными антителами (красный), либо антителами на SLURP-1 (синий). Вертикальные пунктирные линии показывают средние значения каждого распределения. (Б). Средняя интенсивность окрашивания $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431, обработанных rSLURP-1 при различных концентрациях в течение 24 часов. (В). Нормированная медиана флуоресценции α -Bgtx/A555 в клетках A431, обработанных 1 мкМ rSLURP-1 в течение 24 часов. (Г). Средняя интенсивность окрашивания SLURP-1 в клетках A431, обработанных rSLURP-1 при различных концентрациях в течение 1 часа. Данные выражены в виде среднего значения \pm SEM, $n = 6$. * ($p < 0,05$) означает достоверное отличие данных от контрольной группы согласно двухстороннему t-тесту (В) или одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnet's/hoc тестом.

Для изучения кинетики секреции эндогенного SLURP-1 мы измерили уровни белка в клеточной среде спустя различные промежутки времени после добавления 1 мкМ рекомбинантного SLURP-1 (Рис. 4.78). Значительное увеличение содержания SLURP-1 в клеточной среде наблюдалось уже при часовой инкубации (Рис. 4.78Б). Кинетический анализ показал, что секреция эндогенного SLURP-1 достигала максимума через 4 часа. Ингибирование экзоцитоза с помощью брефельдина А приводило к отмене секреции SLURP-1 (Рис. 4.78Б). Полученные данные иллюстрируют ранее предполагаемый ауто/пара-кринный механизм передачи сигналов белков SLURP в эпителии [199,200] и позволили выявить механизм положительной обратной связи. Повышение содержания SLURP-1 во внеклеточной среде и его взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR на клеточной мембране стимулирует в клетках секрецию своего собственного SLURP-1 из внутриклеточных депо и, таким образом, приводит к лавинообразному усилению передачи сигнала на соседние клетки (Рис. 4.79).

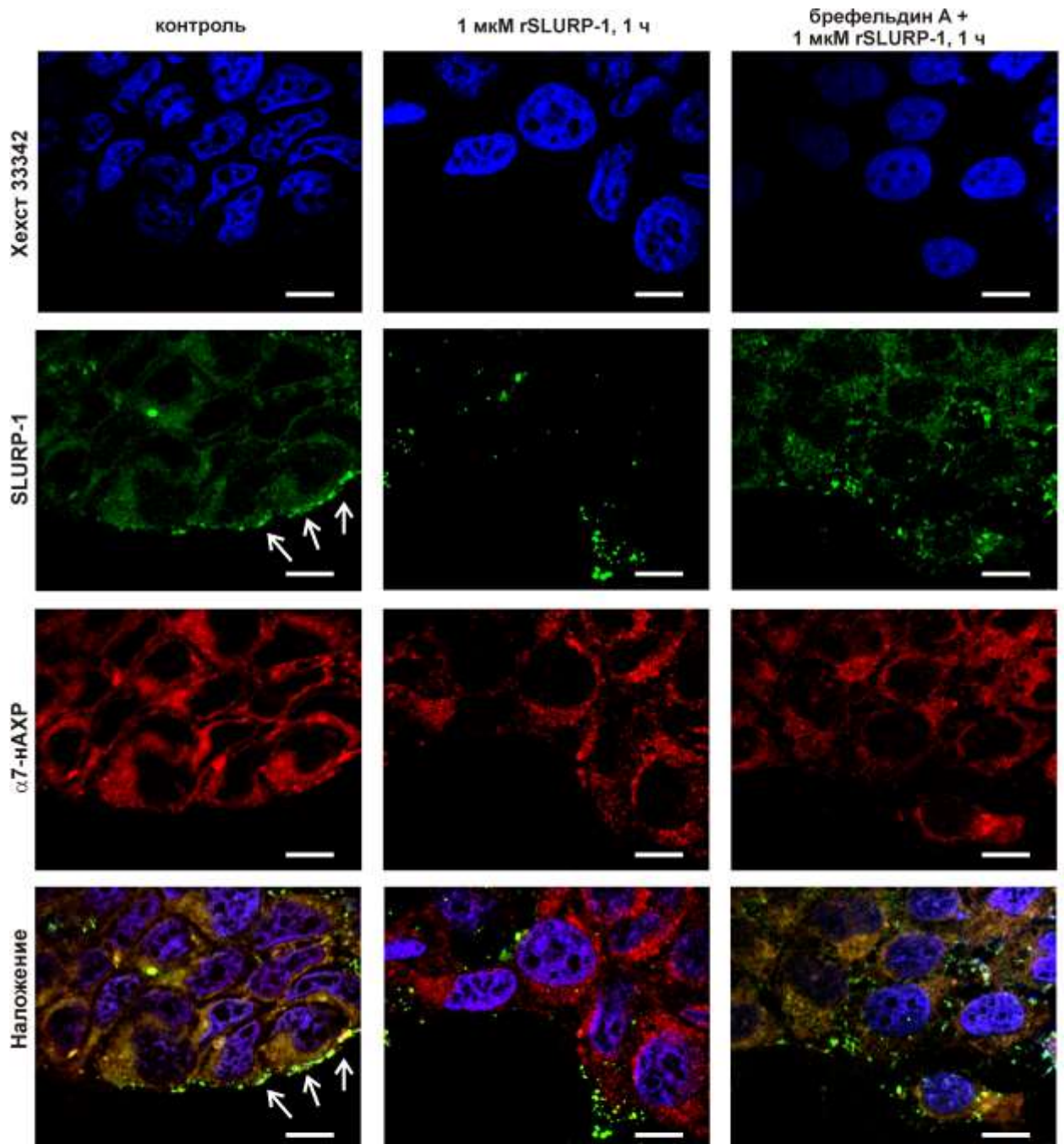


Рис. 4.77. Влияние рекомбинантного SLURP-1 (rSLURP-1) на экспрессию и локализацию эндогенных SLURP-1 и $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431. Контрольные (необработанные) клетки, а также клетки, проинкубированные с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 1 часа, и клетки после предобработки 10 мкМ Брефельдина А и часовой инкубации с 1 мкМ rSLURP-1, были зафиксированы и после пермеабилзации мембраны последовательно окрашены первичным антителами к $\alpha 7$ -nAChR и вторичными антителами, конъюгированными с Alexa594, а также первичными анти-SLURP-1 антителами, и вторичными антителами, меченными Alexa-488. Ядра окрашивались Hoechst 33342. Стрелки показывают накопление эндогенного SLURP-1 вблизи плазматической мембраны. Шкала = 20 мкм.

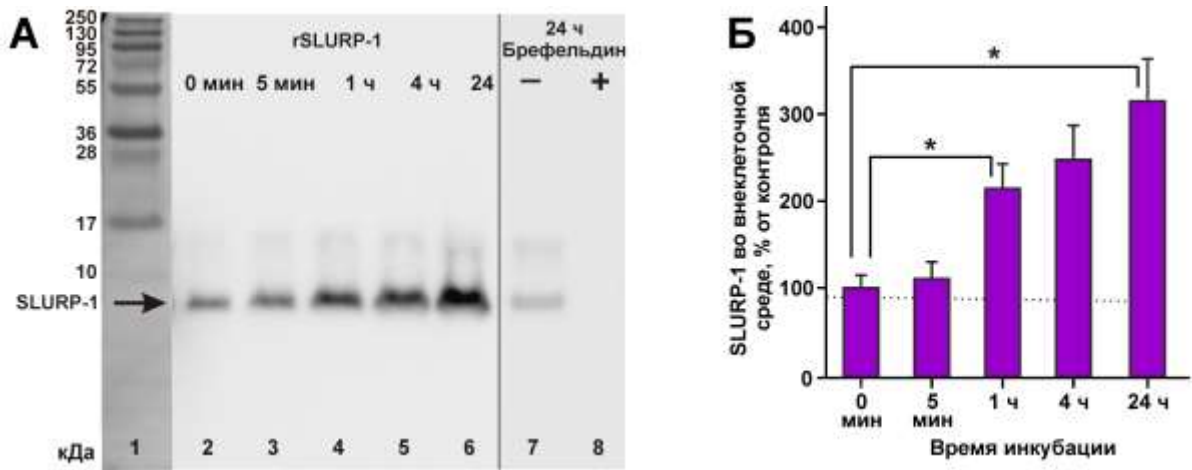


Рис. 4.78. Влияние рекомбинантного SLURP-1 на секрецию эндогенного SLURP-1 клетками A431. (А). 1, - Предокрашенный маркер молекулярных масс белков. 2-6, - репрезентативное изображение Вестерн-блоттинга культуральной среды клеток A431 после различных по длительности инкубаций с 1 мкМ рекомбинантного SLURP-1. Перед экспериментом культуральную среду меняли на свежую для удаления эндогенного SLURP-1. Начальная точка (0 мин) была отобрана после добавления рекомбинантного SLURP-1. 7,8, - репрезентативное изображение Вестерн-блоттинга культуральной среды клеток A431, выращенных в течение 24 ч без (-) или с (+) добавлением 10 мкМ Brefeldина А. Перед экспериментом культуральную среду меняли на новую для удаления эндогенного SLURP-1, рекомбинантный SLURP-1 не был добавлен. (Б). Количественный анализ интенсивностей полос Вестерн-блоттинга культуральной среды клеток A431 после различных по длительности инкубаций с 1 мкМ рекомбинантного SLURP-1, нормализованных на значение интенсивности в точке начальной точки («0 мин»). Данные показаны в виде среднего значения \pm средне-квадратичная ошибка ($n = 7$). * ($p < 0,05$) означает достоверное отличие групп данных от начальной «0» точки согласно одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnett's/hoc тестом. Изначальный уровень эндогенного SLURP-1 ($87 \pm 14\%$) во внеклеточной среде показан пунктирной линией. Аппроксимация данных уравнением ($y = 100\% + A_0 (1 - \text{Exp}[-k_0 t])$, не показано) позволяет предложить следующие параметры кинетики секреции SLURP-1: максимальная концентрация SLURP-1 во внеклеточной среде $A_0 = 291 \pm 22\%$, скорость процесса секреции $k_0 = 0,79 \pm 0,36 \text{ ч}^{-1}$.

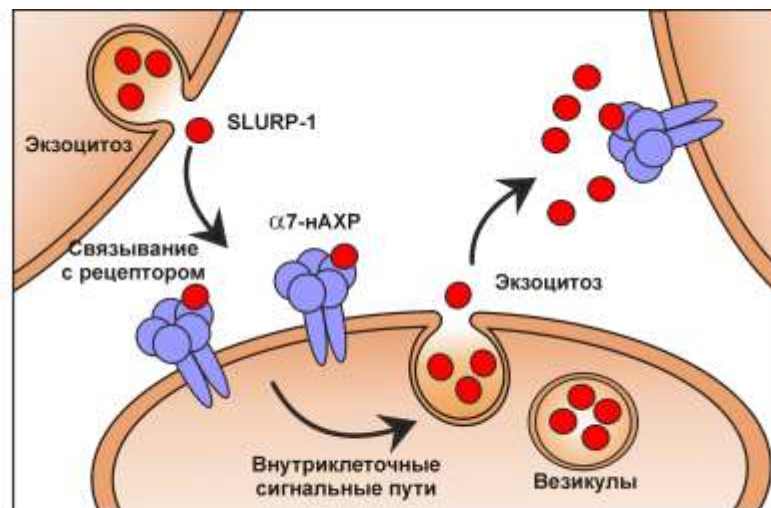


Рис. 4.79. Предложенная схема механизма положительной обратной связи паракринной сигнализации SLURP-1.

4.4.4. Ws-Lynx1, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR, индуцирует арест клеточного цикла и апоптоз в клетках аденокарциномы легкого

Помимо мозга, Lynx1 был обнаружен в легких (п. 4.3.1.1), почках и эпителии [134,181,337], где nAChR играют важную роль в регуляции роста клеток, миграции, дифференцировки и воспалительных процессов. Снижение уровня Lynx1 было выявлено в клетках рака легкого по сравнению с нормальными клетками [365]. Нокаут гена *LYNX1* в клетках карциномы легкого A549 приводит к значительному увеличению роста раковых клеток [112]. Вместе эти данные указывают на то, что Lynx1 может экспрессироваться не только в нервной системе, но также может участвовать в регуляции гомеостаза эпителиальных клеток. В представленной работе была исследована экспрессия Lynx1 в ряде эпителиальных клеток человека, а также его роль в развитии клеток карциномы легкого.

4.4.4.1. Экспрессия генов Lynx1 и nAChR в не-нейрональных клетках человека

В настоящей работе мы исследовали несколько линий клеток эпителиального происхождения, гомогенат головного мозга крысы выступал в качестве положительного контроля. Используя ПЦР в реальном времени, мы обнаружили различный профиль экспрессии генов субъединиц $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\beta 2$ nAChR в исследуемых клетках (Рис. 4.80).

В целом, полученные данные хорошо согласуются с предыдущими публикациями, хотя были выявлены некоторые новые детали. Подобно ранее опубликованным данным о локализации различных субъединиц nAChR в мозге млекопитающих [325], мы наблюдали экспрессию генов всех исследуемых субъединиц, кроме $\alpha 9$, в гомогенате мозга крысы. Экспрессия генов субъединиц nAChR $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\beta 4$ [366] и экспрессия $\alpha 9$ субъединицы nAChR на уровне белка в клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7 были описаны ранее [367]. В базе данных Human Protein Atlas (HPA) также описана экспрессия $\alpha 3$ субъединицы в этой клеточной линии, в то время как наши результаты дополнительно показывают наличие экспрессии генов $\alpha 4$ и $\beta 2$ субъединиц. Ранее анализ экспрессии субъединиц nAChR в клетках карциномы легкого A549 выявил присутствие $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединиц [104]. Однако, мы не наблюдали экспрессию субъединицы $\alpha 9$ nAChR. Согласно литературным данным, клетки колоректальной карциномы HT-29 экспрессируют гены $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ и $\beta 1$ [368], в то время как мы дополнительно обнаружили экспрессию $\alpha 9$ субъединицы nAChR. Ранее было показано, что клеточная линия

эпидермальной карциномы A431 экспрессирует ген $\alpha 7$ nAChR [369], и экспрессия гена $\alpha 3$ была указана в базе данных HPA, в то время как мы также обнаружили экспрессию генов $\alpha 4$, $\alpha 9$ и $\beta 2$. Мы обнаружили экспрессию генов $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\beta 2$ субъединиц nAChR в клетках Het-1A, что соответствует ранее опубликованным результатам [3]. Аналогично данным из базы HPA, в клетках эмбриональной почки HEK-293T мы наблюдали экспрессию только субъединицы $\alpha 3$ (Рис. 4.80). Следует отметить, что экспрессия субъединиц nAChR на уровне мРНК может не коррелировать с количеством функциональных рецепторов, состоящих из этих субъединиц, на клеточной мембране.

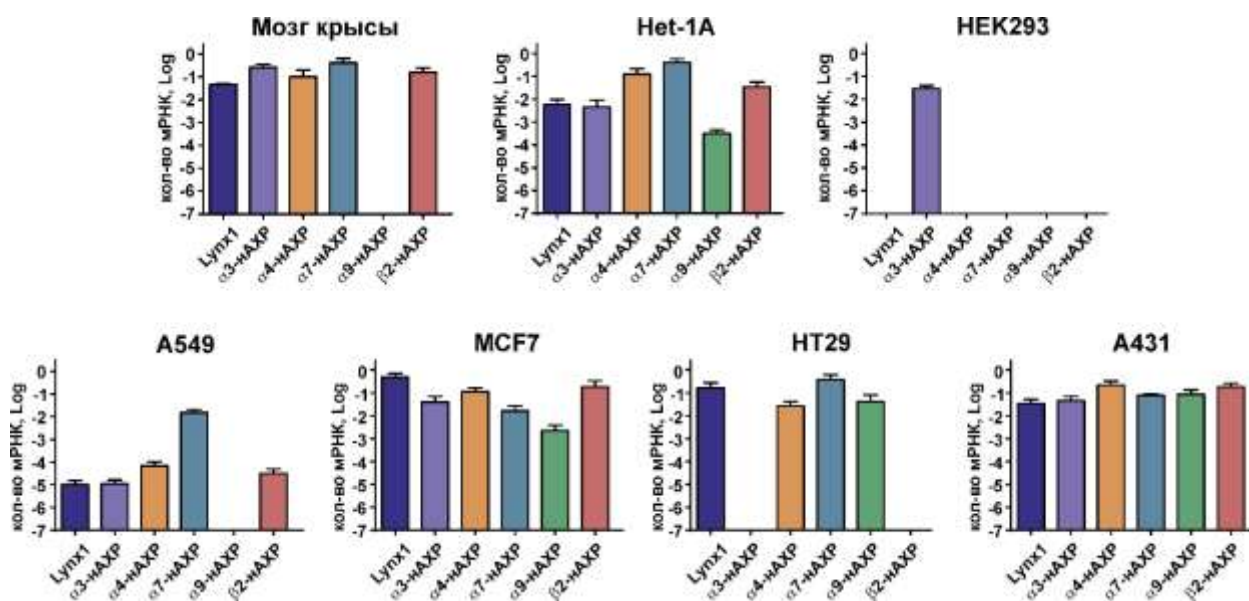


Рис. 4.80. Профиль экспрессии генов субъединиц $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\beta 2$ nAChR в эпителиальных клетках. Было проанализировано 5 различных партий клеток в трех повторах ($n = 15$). Измеренные данные были нормализованы на экспрессию гена домашнего хозяйства (β -актина) методом ΔC_t и представлены в виде среднего значения \pm с.о. в логарифмическом масштабе. Уровень экспрессии гена β -актина на этой шкале соответствует нулю.

Все исследованные клеточные линии, кроме HEK-293T, демонстрировали значительный уровень экспрессии *LYNX1* (Рис. 4.80). Это противоречит предыдущим данным об экспрессии *LYNX1* в почках [134]. Вероятно, экспрессия *Lynx1* зависит от стадии развития организма и может расти в постнатальный период. В соответствии с этой гипотезой, экспрессия *Lynx1* не обнаруживалась в коре и гиппокампе крыс в первые дни после рождения (п.4.3.1.1, Рис. 4.25), а значительное увеличение уровня мРНК *Lynx1* в мозжечке мыши наблюдалось с P0 до P20 дней [370]. Аналогично, *LYNX1* отсутствует в эмбриональных тканях молочной железы, кожи и толстого кишечника, но экспрессируется в соответствующих тканях взрослого организма (набор данных 68 FANTOM5 RNA-seq, <https://www.ebi.ac.uk/gxa>).

Согласно базе данных HPA, экспрессия *LYNX1* обнаруживается в клетках эпидермальной карциномы A431 и карциномы легкого A549, а также в иммортализованных кератиноцитах HASCAT, но не в клетках карциномы молочной железы MCF-7. Вероятно, эти расхождения в экспрессии *LYNX1* по разным источникам связаны с разными подходами и лабораторными условиями, используемыми для выделения и обнаружения мРНК.

4.4.4.2. Lynx1 со-локализован с $\alpha 7$ -nAChR в эпителиальных клетках

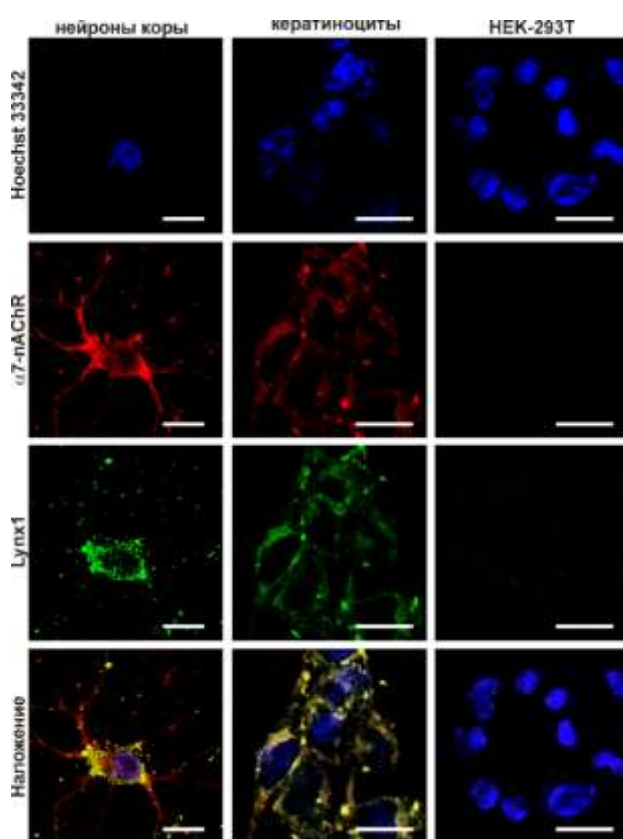


Рис. 4.81. Со-локализация эндогенных Lynx1 и $\alpha 7$ -nAChR в нейронах коры, кератиноцитах Het-1A и клетках HEK-293T. Клетки последовательно инкубировали с кроличьими анти-Lynx1 и мышинными анти- $\alpha 7$ -nAChR первичными антителами и со вторичными анти-кроличьими IgG AlexaFluor-488-мечеными (зеленый) и анти-мышинными AlexaFluor-594-мечеными (красный) антителами. Ядра клеток визуализированы с помощью Hoechst 33342 (синий). Шкала 10 мкм.

Чтобы исследовать экспрессию Lynx1 и $\alpha 7$ субъединицы nAChR на уровне белка, мы использовали конфокальную флуоресцентную микроскопию. В соответствии с наблюдаемыми паттернами экспрессии генов, Lynx1 и $\alpha 7$ -nAChR не были обнаружены на уровне белка в клетках HEK-293T, тогда как в других исследуемых клетках наблюдалась экспрессия обоих белков (Рис. 4.81 и 4.82). Насколько нам известно, это первое сообщение об экспрессии Lynx1 в клетках толстой кишки и рака молочной железы, а также в кератиноцитах Het-1A.

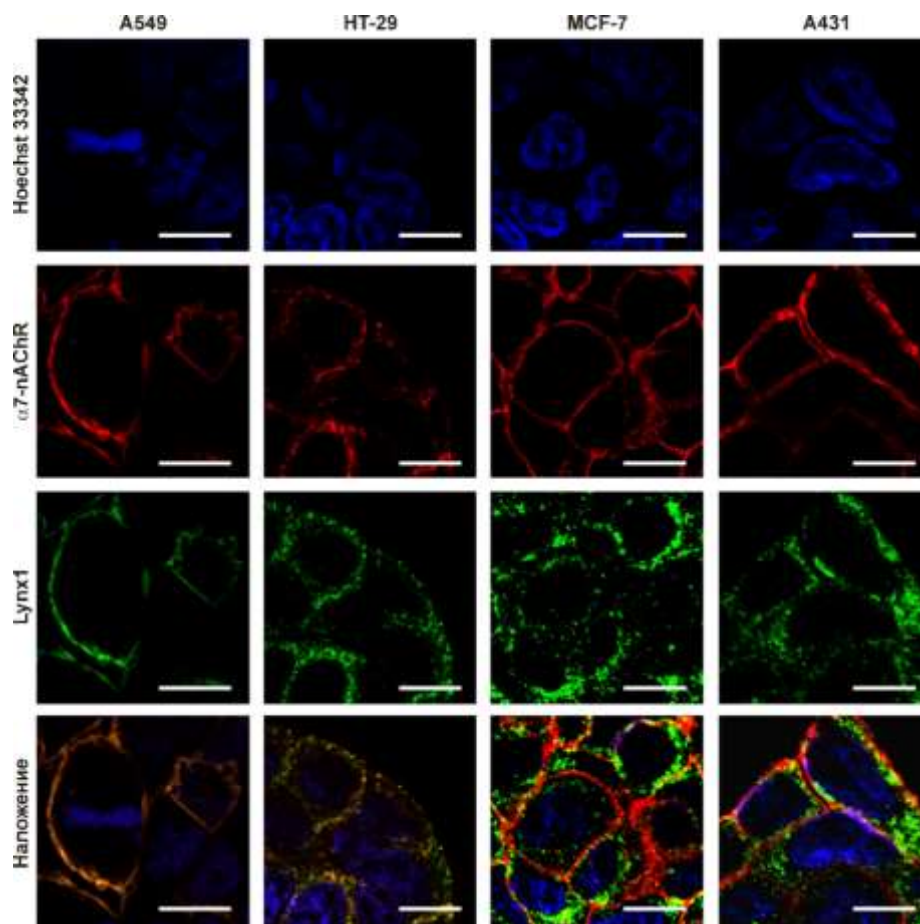


Рис. 4.82. Солокализация эндогенных Lynx1 и $\alpha 7$ -nAChR в клетках A549, HT-29, MCF-7 и A431. Клетки последовательно инкубировали с кроличьими анти-Lynx1 и мышинными анти- $\alpha 7$ -nAChR первичными антителами и со вторичными анти-кроличьими IgG-488-мечеными IgG (зелеными) и анти-мышинными Alexa-594-мечеными (красными) антителами. Ядра клеток визуализированы с помощью Hoechst 33342 (синий). Шкала 10 мкм.

4.4.4.3. Ws-Lynx1 снижает жизнеспособность клеток рака легкого и подавляет стимуляцию роста клеток, вызванную никотином

$\alpha 7$ -nAChR является основным рецептором, который опосредует пролиферативное действие никотина на раковые клетки [339]. Активация nAChR никотином может увеличивать экспрессию $\alpha 7$ -nAChR и стимулировать рост и миграцию раковых клеток [112,339,371]. Известно, что никотин усиливает экспрессию молекул, связанных с гипоксией, таких как HIF-1 α в клетках A549, стимулируя секрецию различных факторов роста и повышая устойчивость клеток к химиотерапии [371]. Кроме того, активация $\alpha 7$ -nAChR никотином в эндотелиальных клетках приводит к васкуляризации опухоли посредством высвобождения VEGF и FGF [371]. Другим аспектом действия никотина на развитие опухоли является его способность индуцировать самообновление раковых стволовых клеток путем одновременного увеличения синтеза сигнальных молекул стресса и снижения синтеза ГАМК [372]. С другой стороны, известно, что эндогенный Lynx1

подавляет индуцированное никотином повышение экспрессии $\alpha 7$ -nAChR [86,112]. Более того, активация экспрессии Lynx1 в клетках карциномы легкого A549 посредством лентивирусной трансдукции уменьшает пролиферацию раковых клеток [112]. На основании этих наблюдений мы решили оценить способность рекомбинантного водорастворимого аналога Lynx1 (ws-Lynx1) контролировать рост клеток A549.

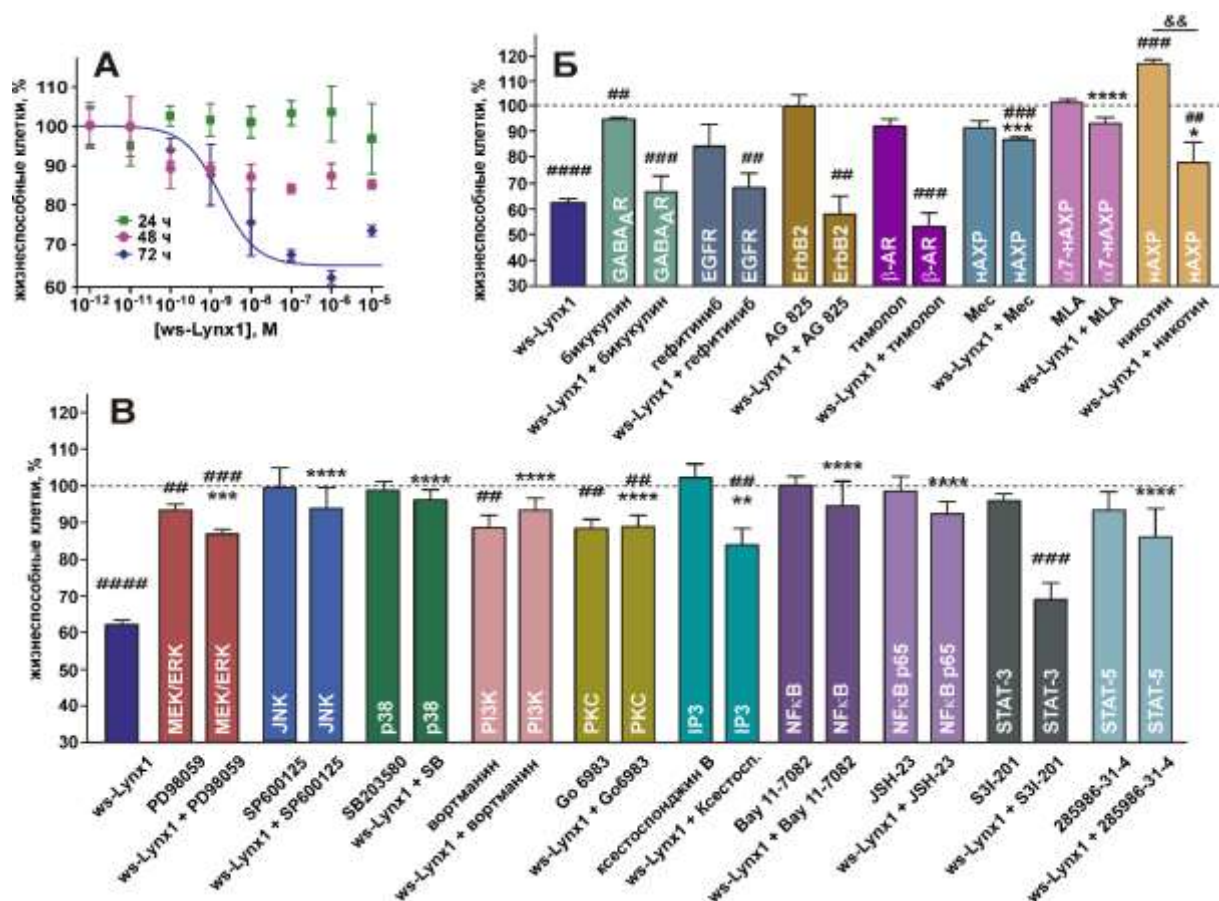


Рис. 4.83. Влияние ws-Lynx1 на рост клеток A549. (А). Влияние ws-Lynx1 на рост клеток A549 при 24-, 48- и 72-часовой инкубации. Данные выражены в % от контроля (необработанные клетки). Каждая точка представляет собой среднее значение \pm с.о. из четырех независимых экспериментов. (Б). Влияние ws-Lynx1, ингибиторов различных рецепторов (GABA_AR, EGFR, ErbB2, β -AR, nAChR и $\alpha 7$ -nAChR), и агониста nAChR (никотина) на жизнеспособность клеток A549. (В). Влияние ws-Lynx1 и ингибиторов внутриклеточных сигнальных каскадов (ингибиторы MEK/ERK, JNK, p38, PI3K, PKC, рецепторы IP3, NFκB/IKK, p65 NFκB, STAT-3 и STAT-5) на жизнеспособность клеток A549. Клетки в (Б, В) инкубировали с ws-Lynx1 и другими веществами в течение 72 часов. Данные представляют собой среднее \pm с.о., n = 4-8; ## (p < 0,01), ### (p < 0,001) и #### (p < 0,0001) указывают на статистически значимое отличие от контроля (100%) (двухсторонний t-критерий Стьюдента); && (p < 0,01) указывает на статистически значимое отличие между группами «никотин» и «ws-Lynx1+никотин» (двухсторонний t-критерий Стьюдента); * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) и **** (p < 0,0001) указывают на статистически значимое отличие между «ws-Lynx1» и группами «ws-Lynx1+агонист/ингибитор» (ANOVA и тест Даннета для множественного сравнения). Уровень контроля (100% жизнеспособных клеток) соответствует необработанным клеткам.

Продолжительная 72-часовая инкубация клеток A549 с ws-Lynx1 приводила к выраженному концентрационно-зависимому ингибированию роста клеток с EC₅₀ 2,3 \pm 0,4

нМ (Рис. 4.83А). Количество жизнеспособных клеток снижалось до $65,3 \pm 1,1\%$ относительно контроля. Более короткая 48-часовая инкубация приводила к слабому, но достоверному уменьшению количества жизнеспособных клеток, тогда как 24-часовая инкубация не оказывала достоверно значимого эффекта (Рис. 4.83А). Следует отметить, что аналогичная антипролиферативная активность в отношении клеток А549 была описана для рекомбинантного аналога другого белка человека, - SLURP-1, также действующего на $\alpha 7$ -nAChR (п. 4.4.3.1). Однако rSLURP-1 демонстрировал значительный антипролиферативный эффект уже при 24-часовой инкубации (п. 4.4.3.1). Эти результаты говорят о различиях в механизмах действия ws-Lynx1 и rSLURP-1. Вероятно, более быстрый эффект rSLURP-1 связан с секрецией эндогенного SLURP-1 из внутриклеточного депо в ответ на применение rSLURP-1. Это приводит к значительному увеличению концентрации SLURP-1 в клеточной среде через несколько часов (п. 4.4.3.4, Рис. 4.78). Напротив, эндогенный Lynx1 является мембранно-связанным белком, и его концентрация в клеточной среде не может быть увеличена секрецией. Отсроченное влияние ws-Lynx1 на жизнеспособность клеток подразумевает наличие многоэтапного ответа, который включает: (1) изменения в экспрессии ауто-паракринных регуляторов, таких как SLURP, факторы роста, цитокины (например, TNF α) и т.д.; и (2) активацию соответствующих рецепторов и внутриклеточных сигнальных каскадов, которые контролируют рост и пролиферацию клеток. Более того, как будет показано ниже, ws-Lynx1 модулирует проапоптотические сигнальные каскады, в то время как при исследовании SLURP-1 признаков апоптоза не было обнаружено (п. 4.4.1.1. и 4.4.3.1).

Мы также проверили, может ли ws-Lynx1 влиять на никотин-индуцированный рост клеток А549 (Рис. 4.83Б). Инкубация клеток А549 в течение 72 часов с 10 нМ никотина значительно увеличивала пролиферацию клеток А549 (~ 118% жизнеспособных клеток по сравнению с контролем). Напротив, совместное применение никотина с 1 мкМ ws-Lynx1 отменяло этот эффект и уменьшало количество жизнеспособных клеток до ~ 79% по сравнению с контролем (Рис. 4.83Б). Полученные результаты соответствуют ранее опубликованным данным о действии мембранно-связанного Lynx1 в клетках А549 [112]. Таким образом, можно сделать вывод, что водорастворимый вариант Lynx1 подавляет индуцированный никотином рост раковых клеток *in vitro*.

4.4.4.4. Ws-Lynx1 вызывает арест клеточного цикла в клетках А549

Чтобы выяснить, вызывает ли обработка ws-Lynx1 остановку клеточного цикла мы анализировали размер ядер клеток после окраски с помощью иодида пропидия. Анализ с

помощью проточной цитометрии показал, что 24-часовая инкубация клеток A549 с ws-Lynx1 приводила к значительному увеличению клеток в фазе G0/1 клеточного цикла, в то время как количество клеток в S-фазе значительно уменьшалось (Рис. 4.84А,Б). Наоборот, мы не наблюдали каких-либо различий в доле клеток в каждой фазе клеточного цикла после 48-часовой инкубации с ws-Lynx1, в то время как 72-часовая инкубация приводила к увеличению числа клеток в фазе G2/M по сравнению с контролем, что сопровождалось уменьшением популяции клеток G0/1 (Рис. 4.84А,Б). Таким образом, можно сделать вывод, что ws-Lynx1 индуцирует остановку клеточного цикла в фазах G0/1 и G2/M в клетках A549 после 24 и 72-часовой инкубации, соответственно. Это довольно неожиданное

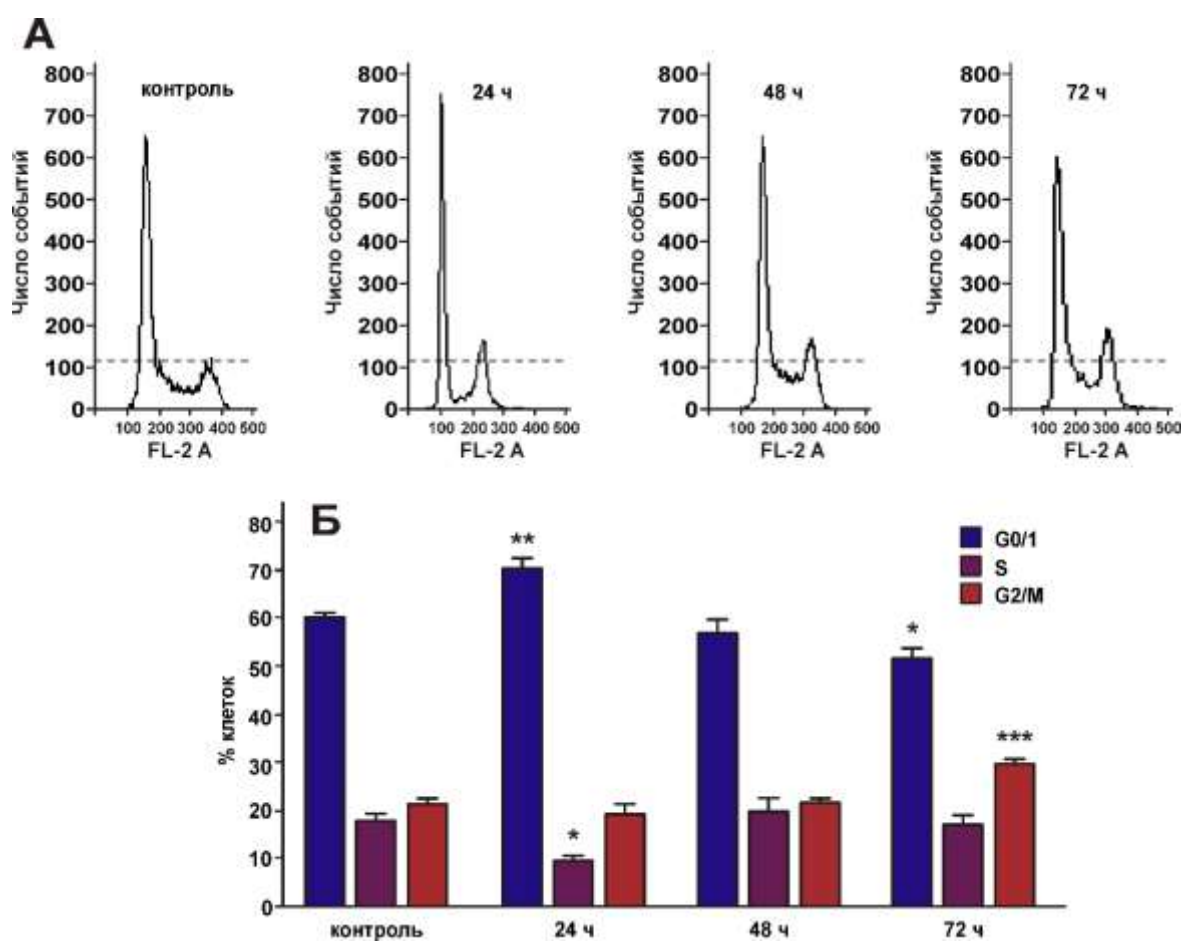


Рис. 4.84. Анализ клеточного цикла в клетках A549, обработанных ws-Lynx1. (А). Распределение репрезентативных популяций ядер клеток A549 до и после инкубации с ws-Lynx1. (Б). % клеток в каждой фазе клеточного цикла, определяемой Flowing Software. Данные представлены в виде % клеток в каждой фазе клеточного цикла (среднее \pm с.о., $n = 6-7$). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,001$) указывают на статистически значимое отличие групп (ANOVA и тест Даннета для множественного сравнения).

наблюдение подтверждает наличие многоэтапного клеточного ответа на воздействие ws-Lynx1. Первичный ответ на ws-Lynx1 приводит к остановке клеточного цикла в G0/1 фазе во время 24-часовой инкубации, предотвращая переход клеток в S-фазу, но через 48 часов

клетки A549 становятся способными преодолеть эту блокаду клеточного цикла и начать репликацию ДНК. Однако во время 72-часовой инкубации ответ на вторичные мессенджеры (ауто-паракринные регуляторы, факторы роста или цитокины) приводит к остановке клеточного цикла в G2/M фазе, поэтому клетки A549 не могут делиться после успешного прохождения S-фазы. Этот тип остановки клеток может быть напрямую связан с индукцией апоптоза клеток A549 ws-Lynx1 (см. ниже).

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

Чтобы изучить механизмы, лежащие в основе действия ws-Lynx1, мы исследовали его влияние на рост клеток A549 в присутствии различных ингибиторов рецепторов на поверхности клеток: антагониста рецепторов GABA_A - бикикулина, ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) - gefитиниба, ингибитора ErbB2 - AG825, ингибитора β -адренергических рецепторов (β -AR) - тимолола, неспецифического неконкурентного антагониста nAChR - мекамиламина (Mec) и специфического антагониста $\alpha 7$ -nAChR - метилликаконитина (MLA). Мы использовали концентрацию 1 мкМ ws-Lynx1, при которой наблюдалось максимальное снижение роста клеток, и концентрации ингибиторов эквивалентные или превышающие значения IC₅₀ для соответствующего рецептора. Все ингибиторы (кроме бикикулина) сами по себе не оказывали значительного влияния на жизнеспособность клеток A549 после 72-часовой инкубации. Совместная инкубация клеток с ws-Lynx1 и бикикуллином, gefитинибом, AG 825 или тимололом не уменьшала влияния ws-Lynx1 на рост клеток A549 (Рис. 4.83Б), в то время как совместное применение Mec или MLA отменяло эффект ws-Lynx1 и восстанавливало количество жизнеспособных клеток до контрольного уровня, что позволило предположить, что действие ws-Lynx1 на рост клеток A549 опосредовано $\alpha 7$ -nAChR.

Чтобы продемонстрировать, что эффект ws-Lynx1 напрямую связан с $\alpha 7$ -nAChR, мы заблокировали экспрессию этого рецептора с помощью миРНК. Проточная цитометрия показала, что 48-часовая трансфекция клеток A549 с помощью миРНК приводила к более чем двукратному снижению экспрессии функционального $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеток. Однако, если клетки были трансфицированы совместно миРНК и плазмидой, кодирующей полноразмерный ген $\alpha 7$ -nAChR, экспрессия функционального $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеток A549 восстанавливалась до контрольного уровня (Рис. 4.85А,Б). Тест WST-1 показал, что нокаут гена $\alpha 7$ -nAChR полностью отменяет антипролиферативный

эффект ws-Lynx1, но восстановление экспрессии $\alpha 7$ -nAChR экзогенной плазмидой восстанавливает активность ws-Lynx1 (Рис. 4.85В), что подтверждает, что антипролиферативное действие ws-Lynx1 на клетки A549 опосредовано $\alpha 7$ -nAChR.

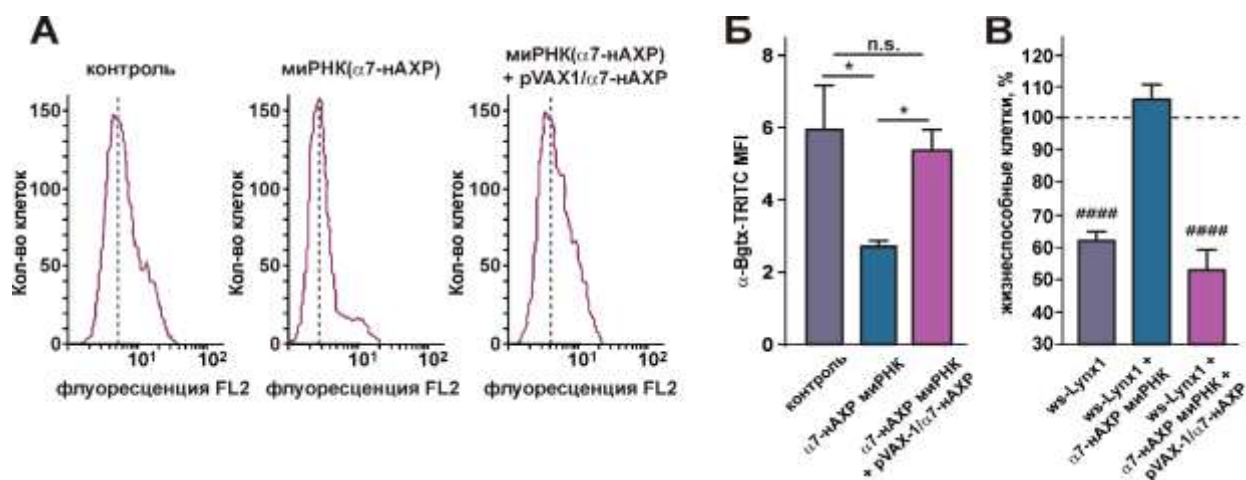


Рис. 4.85. Нокаут $\alpha 7$ -nAChR с помощью миРНК влияет на активность ws-Lynx1 на клетках A549. (А). Репрезентативные гистограммы клеток A549, окрашенных TRITC-меченым α -Bgtx. (Б). Медианы интенсивности флуоресценции TRITC-меченого α -Bgtx, представленные как медиана \pm с.о., $n = 4-6$. * ($p < 0,05$) указывает на статистически значимое отличие между группами данных (ANOVA, тест Тьюки). (В). Влияние нокаута $\alpha 7$ -nAChR с помощью миРНК на жизнеспособность клеток A549. Данные представляют собой среднее \pm с.о., $n = 7-11$; ##### ($p < 0,0001$) указывает на статистически значимое отличие от контроля (100%) согласно двухстороннему t-критерию Стьюдента для одной выборки. Контрольный уровень (100% жизнеспособных клеток) соответствует необработанным клеткам и показан пунктирной линией.

Наблюдаемое различие между эффектами никотина (агониста nAChR), MLA (специфического антагониста $\alpha 7$) и ws-Lynx1 на жизнеспособность клеток A549 (Рис. 4.85В) выявило различие в механизмах действия этих соединений. Похоже, что ws-Lynx1 действует на nAChR в клетках A549 не как агонист или антагонист. Это согласуется с ранее опубликованными данными о действии ws-Lynx1 на $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*. Было установлено, что ws-Lynx1 сам по себе не способен вызывать токи через канал рецептора, но он потенцирует токи, вызванные ацетилхолином, при концентрациях ≤ 1 мкМ и подавляет их при более высоких концентрациях (п. 4.3.1.4). Вероятно, ws-Lynx1 может модулировать действие агониста на передачу сигнала через $\alpha 7$ рецептор (как показано в данной работе для никотина), но не может преодолеть эффекты антагонистов, которые блокируют рецептор.

Передача сигналов через $\alpha 7$ -nAChR может активировать внутриклеточные ответы двумя путями: по каноническому ионотропному пути и по альтернативному метаботропному пути с активацией PLC)и рецепторов IP₃ [33,51,349]. Оба этих пути приводят к фосфорилированию киназы ERK, которая передает сигнал в ядро, активируя различные факторы транскрипции. Интересно, что ws-Lynx1 может ингибировать

никотин-индуцированное фосфорилирование MAP-киназы ERK в срезах стриатума (п. 4.3.1.6, Рис. 4.32). Более того, ws-Lynx1 может ингибировать активацию с-Jun N-терминальной киназы (JNK) в первичных кортикальных нейронах, вызванную взаимодействием β -амилоидного пептида A β 1-42 с α 7-nAChR (п. 4.3.1.11).

Для изучения возможных сигнальных путей, участвующих в действии ws-Lynx1 на клетки A549, мы использовали селективные ингибиторы MAP-киназы MEK/ERK (PD98059), JNK (SP600125), MAP-киназы p38 (SB203580), фосфоинозитид-3-киназы PI3K (вортманин), PKC (Go6983), рецептора IP₃ (ксестоспонжин B) и фактора транскрипции NF κ B (Bay 11-7082 и JSH-23), STAT3 (S3I-201) и STAT5 (285986-31-4). Bay 11-7082 предотвращает диссоциацию ингибирующей I κ B киназы (IKK) от NF κ B, а JSH-23 ингибирует ядерную транслокацию субъединицы p65. PD98059, вортманин и Go6983 несколько снижали жизнеспособность клеток A549 при 72-часовой инкубации, тогда как другие ингибиторы не оказывали значительного влияния на рост клеток A549. Все исследованные ингибиторы (кроме S3I-201) значительно снижали или даже отменяли влияние ws-Lynx1 на рост раковых клеток (Рис. 4.83B).

Наблюдаемое подавление эффекта ws-Lynx1 ингибиторами рецептора IP₃, PKC и MEK/ERK подразумевает участие PLC-зависимой передачи сигналов с дальнейшей активацией транскрипционных факторов NF κ B и STAT5, но не STAT3. Зависимость эффекта ws-Lynx1 от JNK, p38 MAP-киназы и PI3K указывает на возможное вовлечение других сигнальных путей. Следует отметить, что в отличие от других типов клеток, где ERK и JNK рассматриваются как про-онкогенные киназы, активация сигнальных путей MEK/ERK [373], JNK и p38 MAPK [374] в клетках A549 необходима для запуска цитостатических или апоптотических эффектов.

4.4.4.6. Ws-Lynx1 регулирует фосфорилирование киназ и транскрипционных факторов, контролирующих клеточный рост

Для более детального исследования сигнальных каскадов, запускаемых ws-Lynx1 в клетках A549, мы изучили фосфорилирование набора из 45 киназ и регуляторных белков при 72-часовой инкубации клеток с 1 мкМ ws-Lynx1 (Рис. 4.86). В соответствии с результатами ингибиторного анализа (Рис. 4.83B), мы наблюдали значительное увеличение фосфорилирования ERK1/2 по аминокислотным остаткам T202, Y204, T185 и Y187 после обработки ws-Lynx1 (Рис. 4.86). В отличие от ERK, мы не обнаружили увеличения уровня фосфорилирования JNK1/2/3 (T183, Y185, T221, Y223) и p38 α (T180, Y182) (Рис. 4.86), хотя ингибиторный анализ выявил участие этих киназ в ws-Lynx1-индуцированном подавлении роста клеток (Рис. 4.83B). Вероятно, уровень

фосфорилирования JNK и p38α не изменяется при обработке ws-Lynx1 и уже достаточен для активации нижестоящих элементов этих сигнальных каскадов. В соответствии с этой гипотезой постоянная активность JNK и p38 в клетках A549 была показана ранее [375,376].

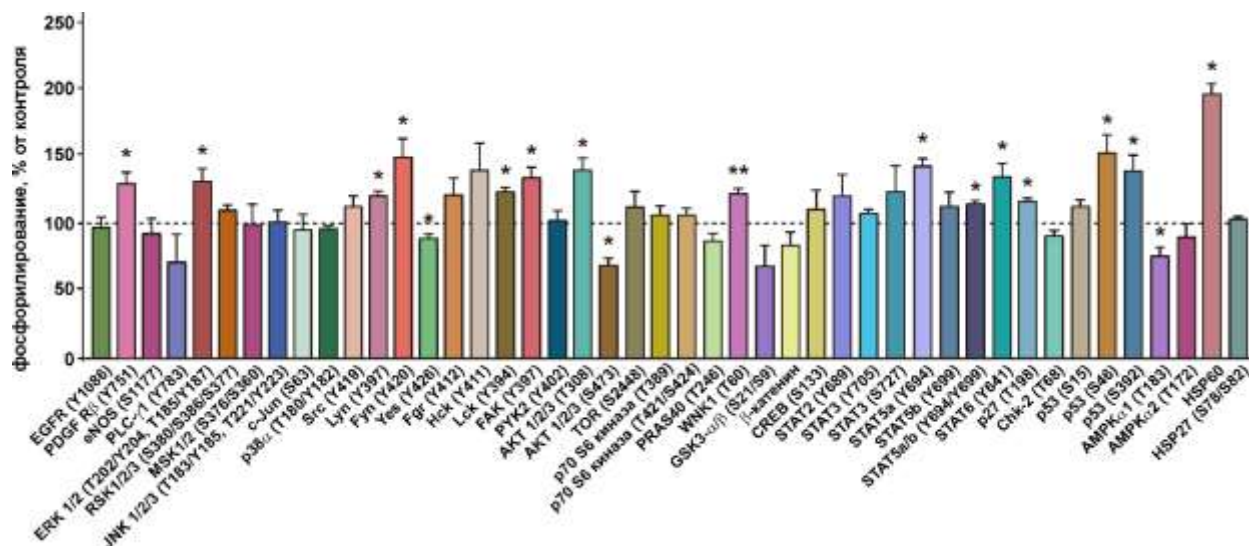


Рис. 4.86. Влияние ws-Lynx1 на фосфорилирование внутриклеточных киназ и регуляторных белков в клетках A549. Клетки инкубировали с 1 мкМ ws-Lynx1 в течение 72 часов. Уровень фосфорилирования представлен как % от контроля (100%, необработанные клетки, пунктирная линия), $n = 4$; * ($p < 0,05$) и ** ($p < 0,001$) указывают на статистически значимое отличие от контроля (двухсторонний t-критерий Стьюдента).

Как описано выше, анализ клеточного цикла показал, что ws-Lynx1 вызывает два типа остановки клеточного цикла - в G0/1 фазе после 24-часовой инкубации и в G2/M фазе после 72-часовой инкубации. Таким образом, длительное применение ws-Lynx1 может привести к вторичному ответу (ответам), связанному с активацией различных мембранных рецепторов, включая рецепторы факторов роста, интегринов, рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), T-клеточных рецепторов и т. д. Внутриклеточные сигнальные каскады, запускаемые этими рецепторами, опосредованы различными киназами из семейства Src (Рис. 4.87). Действительно, мы наблюдали повышенное фосфорилирование рецептора фактора роста тромбоцитов β (PDGFRβ) в положении Y751, и изменения уровня фосфорилирования различных киназ из семейства Src (Рис. 4.86). Значительное увеличение фосфорилирования Lyn (Y397), Fyn (Y420), FAK (Y397) и Lck (Y394) и снижение фосфорилирования Yes (Y426) наблюдалось при обработке ws-Lynx1 (Рис. 4.88). Кроме того, было также обнаружено повышенное фосфорилирование киназ Src (Y419), Fgr (Y412) и Hck (Y411), но эти отличия не были статистически достоверными. Некоторые из Src-киназ участвуют в контроле клеточного роста, пролиферации и адгезии и считаются онкогенными. Например, активность Fyn- и Fgr-киназ значительно подавлена у пациентов с раком легких по сравнению с нормальными клетками [377]. Сайленсинг Fgr усиливает

фосфорилирование протеинкиназы В (АКТ) в положении Ser473, что приводит к стабилизации АКТ при раке яичника [378], а киназа Yes способствует росту немелкоклеточного рака легкого. Таким образом, обратная картина фосфорилирования, возникающая при воздействии ws-Lynx1 (Рис. 4.86), может быть причиной подавления роста раковых клеток. FAK- и Fyn-киназы участвуют в регуляции адгезии клеток рака толстой кишки [379].

Рецепторы фактора роста также могут быть ответственными за наблюдаемые изменения в фосфорилировании АКТ (Рис. 4.87). Этот сигнальный каскад может быть опосредован PI3K, ингибирование которого устраняет эффект ws-Lynx1 (Рис. 4.83В). Наоборот, участие сигнального пути ERK в активации АКТ маловероятно, поскольку не наблюдалось изменений в фосфорилировании митоген- и стресс-активируемой протеинкиназы MSK1/2(S376, S360), которая передает сигнал между ERK и АКТ (Рис. 4.86). Применение ws-Lynx1 увеличивало фосфорилирование АКТ в положении T308 и уменьшало фосфорилирование Ser473 (Рис. 4.86). Фосфорилирование АКТ в этих положениях вызывает активацию и стабилизацию активного АКТ, соответственно [380]. Таким образом, невозможно точно сказать, увеличивает ли обработка ws-Lynx1 активность АКТ в клетках A549 или просто происходит стабилизация активной формы. В то же время, мы наблюдали значительное увеличение фосфорилирования ингибитора циклин-зависимой киназы p27(T198), которое может быть связано с активацией АКТ. Этот регулятор клеточного цикла считается опухолевым супрессором и часто инактивируется через нарушение синтеза, ускоренную деградацию или неправильную локализацию. Фосфорилирование p27 индуцирует неправильную локализацию p27 из ядра в цитоплазму, где он подвергается протеасомной деградации [381]. В соответствии с этим было показано, что подавление p27 уменьшает пролиферацию клеток и вызывает апоптоз в клетках A549 [382]. Таким образом, ws-Lynx1-индуцированная неправильная локализация p27 и дальнейшая деградация в цитоплазме также могут участвовать в контроле роста A549. Активация АКТ также может подавлять киназы гликоген-синтазы $3\alpha/\beta$ (GSK3- α/β) - участники сигнального каскада Wnt. Мы наблюдали умеренное (статистически не значимое) снижение фосфорилирования GSK3- α/β (S9, S21) и β -катенина - белка, участвующего в сигнальном пути Wnt после GSK3- α/β (Рис. 4.86). Таким образом, можно предположить, что эффекты ws-Lynx1 не связаны с сигнальным путем Wnt. Другой киназой, уровень фосфорилирования которой был повышен и которая может быть активирована посредством АКТ, является киназа WNK1 (Рис. 4.86).

Активация фактора транскрипции NF κ B, который, согласно ингибиторному анализу, участвует в эффекте ws-Lynx1 на рост клеток A549 (Рис. 4.83В), может быть

опосредована активацией ERK1/2 и/или АКТ (Рис. 4.87). В соответствии с результатами ингибиторного анализа, мы наблюдали значительное усиление фосфорилирования факторов транскрипции STAT5a(Y694) и STAT6(Y641), но не STAT3(Y705, S727) (Рис. 4.86). Хотя STAT5 может быть активирован Src-киназами, одновременная активация нескольких STAT, вероятно, связана с активацией цитокиновых рецепторов и нижестоящих JAK-киназ (Рис. 4.87). Этот сигнальный путь может быть ответственным за некоторые эффекты, вызванные ws-Lynx1. Например, дефосфорилированный STAT6 управляет экспрессией конститутивной циклооксигеназы-2 (COX2) и устойчивостью к цитотоксичности в клетках рака легких [383], поэтому фосфорилирование STAT6, индуцированное ws-Lynx1, может снизить уровень COX2 и повысить чувствительность клеток A549 к апоптозу.

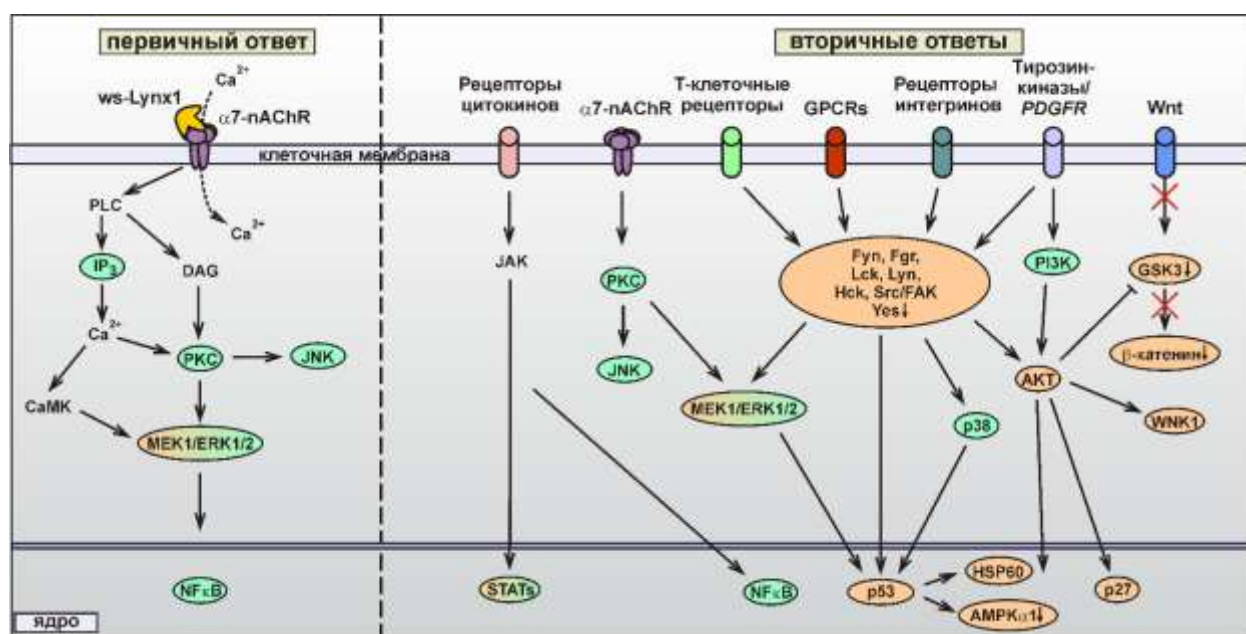


Рис. 4.87. Предполагаемый двухстадийный механизм действия ws-Lynx1 в клетках A549. На первой стадии ws-Lynx1 взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR в клеточной мембране A549. Это активирует сигнальные пути PLC (PKC/IP₃) и ERK, фактор транскрипции NF κ B и индуцирует транскрипцию генов ауто-паракринных регуляторов (факторов роста, цитокинов и т.д.). Вторичные эффекты ws-Lynx1 опосредованы различными мембранными рецепторами, активированными этими регуляторами. На втором этапе активируются киназы JAK, JNK, p38 α , Src, PI₃K и АКТ. Это приводит к активации факторов транскрипции, про-апоптического фактора p53 и неправильной локализации белка p27. Белки, окрашенные в зеленый цвет, были обнаружены с помощью ингибиторного анализа, а белки, окрашенные в оранжевый цвет - с помощью анализа фосфорилирования.

4.4.4.7. Ws-Lynx1 индуцирует апоптоз в клетках A549 через фосфорилирование про-апоптического фактора p53

При обработке клеток A549 ws-Lynx1 наблюдалось существенное увеличение фосфорилирования опухолевого белка p53, необходимое для индукции апоптоза [384],

(Рис. 4.86). Фосфорилирование p53 в положениях Ser46 и Ser392 характерно для активных киназ p38 и ERK1/2 соответственно [385,386]. Фосфорилирование p53 также можно контролировать с помощью Lck- и Lyn-киназ из семейства Src [387,388]. Запуск апоптотической передачи сигналов поддерживается увеличением фосфорилирования белка теплового шока 60 (HSP60, Рис. 4.86). HSP60 инициирует события, предшествующие вызванной цитохромом С активации апоптосомы, и участвует в активации каспазы-3 [389]. Кроме того, мы наблюдали снижение фосфорилирования другого сигнального партнера p53 - киназы AMPK α 1 в положении T183, ответственной за контроль пролиферации клеток (Рис. 4.86). Таким образом, активация p53 с помощью ERK, p38 и/или Src-киназ может вызывать апоптоз в клетках A549 в ответ на применение ws-Lynx1.

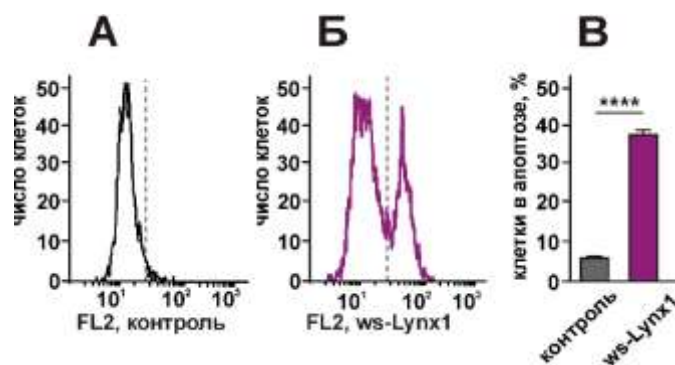


Рис. 4.88. Выход фосфатидилсерина на поверхность клеток A549 через 72 ч инкубации с ws-Lynx1. (А). Репрезентативная гистограмма проточной цитометрии после окрашивания аннексином V-PE контрольных клеток. Серая линия показывает порог для аннексина V положительного клеточного фенотипа. Ось X показывает флуоресценцию PE (канал FL2). (Б). Репрезентативная гистограмма проточной цитометрии после окрашивания аннексином V-PE клеток, обработанных ws-Lynx1. Серая линия показывает порог для аннексина V положительного клеточного фенотипа. Ось X показывает флуоресценцию PE (канал FL2). (В). Столбцы отображают процент клеток с поверхностным фосфатидилсерином в контроле и клетках, обработанных ws-Lynx1. Данные представлены в виде % клеток, n = 8, **** (p < 0,0001) указывает на значимое отличие между группами по двухстороннему критерию Стьюдента.

Чтобы подтвердить индукцию апоптоза под действием ws-Lynx1, был использован конъюгат аннексина V-PE, который связывается с представленным при апоптозе на поверхности клеточной мембраны фосфатидилсерином - ранним маркером апоптоза. Анализ методом проточной цитометрии показал, что количество клеток A549 с поверхностным фосфатидилсерином значительно увеличилось после 72-часовой обработки 1 мкМ ws-Lynx1 с $5,39 \pm 0,6\%$ до $37,44 \pm 2,16\%$ по сравнению с контролем (Рис. 4.88). Таким образом, ws-Lynx1 подавляет рост клеток A549 не только путем подавления пролиферации через остановку клеточного цикла, но и посредством индукции апоптоза. Примечательно, что фрагментации ДНК в ядрах клеток A549, окрашенных Hoechst 33342 после 72-часовой инкубации с ws-Lynx1 не наблюдалось. Следует

отметить, что анализ, основанный на морфологическом анализе ядер, окрашенных красителем Hoechst 33342, обнаруживает изменения, характерные для поздних стадий апоптоза, тогда как выход фосфатидилсерина на поверхность клеточной мембраны является маркером раннего апоптоза [390]. В соответствии с этим, не наблюдалось и значительного увеличения фосфорилирования p53 в положении Ser15, связанного с повреждением ДНК на поздних стадиях апоптоза (Рис. 4.86).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгое время единственной известной функцией nAChR было участие в нейромышечной передаче. Позднее nAChR были обнаружены в центральной нервной системе млекопитающих и установлена их важная роль в различных когнитивных функциях. В последнее время стало очевидно, что появление и развитие некоторых видов рака связано с передачей сигналов через никотиновые рецепторы, которые широко представлены в эпителиальных клетках и клетках иммунной системы. Рецепторы этого семейства вовлечены во множество жизненно-важных процессов, поэтому получение новых знаний о структуре и функции nAChR имеет большое значение для разработки новых лекарственных препаратов.

Трехпетельные α -нейротоксины змей, принадлежащие семейству белков Lуб/uPAR, являются высокоспецифичными ингибиторами никотиновых рецепторов, и поэтому они широко использовались и до сих пор используются в качестве инструментов для изучения nAChR. Полученные в диссертационной работе результаты показали важное значение аминокислотных остатков, расположенных в петлевых участках токсинов змей для взаимодействия с рецепторами-мишенями. В рамках работы было подтверждено, что именно центральная петля токсинов является основным структурным элементом, отвечающим за их взаимодействие с nAChR, GABA_A-R и mAChR. Полученные данные также позволили выдвинуть гипотезу о том, что, наблюдаемая в некоторых случаях высокая конформационная пластичность петлевых участков, позволяет трехпетельным белкам взаимодействовать со структурно различными мишенями, например, с никотиновыми и мускариновыми рецепторами ацетилхолина.

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

Недавние исследования показали, что многие рецепторы ЦНС имеют ассоциированные регуляторные белки, экспрессируемые в специфических нейронах [391]. Ассоциированные регуляторные белки были описаны для глутаматных рецепторов AMPA- и NMDA-типов, рецепторов ГАМК_A, а также для nAChR. Некоторые из этих регуляторных белков относятся к семейству трехпетельных белков Lуб/uPAR. Открытие в самых разных тканях человеческого организма эндогенных трехпетельных модуляторов никотиновых рецепторов (Lynx, Lypd6, SLURP), обладающих структурной гомологией с

α -нейротоксинами змей, вызвало множество вопросов, посвященных эволюционным связям внутри семейства Lуб/uPAR. В настоящий момент большинство вопросов остаются нерешенными, однако, наличие трехпетельных белков у насекомых, рыб, амфибий и иглокожих позволяет предположить, что токсины змей имеют более позднее происхождение. Наличие у амфибий и насекомых трехпетельных регуляторных белков указывает на то, что исходно трехпетельные молекулы не имели токсичной функции. Возможно, в ходе эволюции эндогенные трехпетельные белки, регулирующие работу жизненно важных рецепторов, приобрели ряд уникальных свойств, таких как высокая селективность, аффинность и способность необратимо блокировать рецепторы-мишени, и таким образом превратились в нейротоксины.

Все описанные на сегодняшний день эндогенные трехпетельные белки играют важную роль в жизнедеятельности организма. Нарушение экспрессии одних из них приводит к возникновению различных заболеваний, в то время как нарушение экспрессии других, например, Lурд6, может носить летальный характер. В связи с этим особую актуальность приобретает вопрос структурно-функциональных исследований трехпетельных белков.

Многие регуляторные Lуб/uPAR белки закреплены на мембране вблизи соответствующих рецепторов. Например, трехпетельный белок Lунх1 с GPI-якорем со-локализуется с $\alpha 7$ -nAChR в областях мозга, важных для обучения и памяти [172]. Lурд6 также представляет собой GPI-закрепленный трехпетельный белок и, аналогично Lунх1, мы наблюдали его со-локализацию с $\alpha 7$ -nAChR в первичных культурах нейронов коры и гиппокампа (Рис. 4.49). Однако в литературе описано и высвобождение водорастворимых форм Lуб/uPAR белков с помощью специальных протеаз и фосфолипаз [392]. Растворимые формы были обнаружены для многих Lуб/uPAR белков [137], особенно в раковых клетках [393,394]. В нашей работе в спинномозговой жидкости была обнаружена растворимая форма нейромодулятора Lунх1 (п.4.3.1.1).

Структурно-функциональные исследования GPI-заякоренных белков значительно затруднены. Поэтому в качестве моделей для изучения регуляторов семейства Lуб/uPAR, нами были выбраны их водорастворимые домены, не включающие GPI-якорь. В представленной работе впервые были изучены водорастворимые домены нейромодуляторов Lунх1 и Lурд6 человека, что позволило получить целый ряд новых данных об их свойствах и значительно продвинуться в понимании роли этих белков в функционировании мозга. Впервые с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения было показано, что Lунх1 и Lурд6 имеют трехпетельную структуру, характерную для α -нейротоксинов яда змей. В то же время было обнаружено значительное отличие между

структурами Lynx1, Lypd6 и нейротоксинами, которое заключается в повышенной конформационной пластичности петлевых участков нейромодуляторов. Возможно, такой подвижностью объясняется наличие у этих нейромодуляторов нескольких мишеней действия, относящихся к различным структурным классам (nAChR и mAChR в случае Lynx1, и nAChR и LRP6 в случае Lypd6). Стоит отметить, что высокая конформационная пластичность петлевых участков была обнаружена и в молекуле секретируемого белка человека SLUPR-2, который также имеет несколько мишеней и взаимодействует как с nAChR, так и с mAChR, а также в молекуле секретируемого белка человека SLUPR-1, для которого нами была показана способность регулировать ионотропный и метаботропный пути передачи сигнала через $\alpha 7$ -nAChR, по-видимому, в результате взаимодействия с разными сайтами на поверхности рецептора.

В настоящей работе впервые охарактеризованы ранее не описанные мишени Lynx1 и Lypd6. Показано положительное аллостерическое модулирующее действие Lynx1 на $\alpha 7$ -nAChR. Для Lypd6 впервые было охарактеризовано взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR и показано наличие ингибирующей активности в присутствии ACh. Впервые продемонстрирована модулирующая активность обоих нейромодуляторов по отношению к $\alpha 7$ -nAChR на срезах мозга, что вместе с данными по влиянию на долговременную потенциацию позволяет предположить участие Lynx1 и Lypd6 в процессах, формирования памяти и обучения. Возможно, Lynx1 и Lypd6, оба со-локализованные с $\alpha 7$ -nAChR на мембране нейронов, представляют собой пару положительных и отрицательных модуляторов, необходимых для тонкой настройки холинергической передачи сигналов. Методами компьютерного моделирования были выявлены участки молекул Lynx1 и Lypd6, формирующие сайты взаимодействия с $\alpha 7$ -nAChR: центральная и первая петли, соответственно (Рис. 4.31 и Рис. 4.54).

В настоящей работе впервые показано, что ws-Lynx1 конкурирует с β -амилоидным пептидом(1-42) за связывание с $\alpha 7$ -nAChR, и была исследована активность ws-Lynx1 *in vivo*. Полученные результаты демонстрируют, 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. Таким образом, Lynx1 можно рассматривать в качестве естественного защитника холинергической системы мозга. Принимая во внимание, что эффекты ws-Lynx1 становятся очевидными уже после 2-3 недель приема, этот белок, а также фрагмент его центральной петли (п.4.3.1.5), являются многообещающими кандидатами для

разработки новых препаратов для терапии когнитивных нарушений, а также нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера.

Кератиноциты и другие 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. Разработка систем рекомбинантной продукции для трехпетельных белков человека SLURP-1 и SLURP-2, секретируемых клетками эпителия, позволила нам впервые исследовать фармакологические свойства и структуру этих белков. Как оказалось, 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 на мембране клетки. Возможно, трехпетельный белок SLURP-2 является универсальным регулятором гомеостаза эпителия, участвующим на разных стадиях развития клеток.

Согласно данным, полученным в настоящей диссертационной работе, SLURP-1 и SLURP-2 также могут контролировать рост эпителиальных опухолевых клеток. Все изученные нами клетки карцином экспрессировали функциональные $\alpha 7$ -nAChR на клеточной мембране, и аппликация rSLURP-1 в наномолярной концентрации приводила к значительному ингибированию роста клеток. Напротив, rSLURP-2 демонстрировал разнонаправленные эффекты на различных клеточных линиях, что, видимо, было связано с отличиями в репертуаре рецепторов ацетилхолина на клетках.

Использование рекомбинантного аналога rSLURP-1 позволило охарактеризовать сигнальные каскады, запускаемые этим белком в раковых и нормальных клетках. Показано, что взаимодействие rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR запускает внутриклеточные каскады по метаботропному механизму. Кроме того, нами впервые был описан механизм положительной обратной связи, лежащий в основе ауто-паракринной сигнализации между клетками эпителия с помощью белка SLURP-1. Было показано, что действие экзогенного SLURP-1 на клетки стимулирует 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, указывает на перспективы использования этого белка в качестве прототипа для разработки новых противоопухолевых препаратов.

Несмотря на то, что впервые Lynx1 был обнаружен в мозге и ЦНС, в последствии экспрессия этого белка также была продемонстрирована в здоровой и трансформированной ткани легких. При этом в случае онкогенной трансформации происходило снижение экспрессии Lynx1 [365]. В представленной работе мы, используя водорастворимый домен белка, впервые показали, что Lynx1 ингибирует рост клеток немелкоклеточного рака легких линии A549, отменяет никотин-индуцированную стимуляцию роста опухолевых клеток, а также вызывает их апоптоз. Все эти эффекты, также как и в случае SLURP-1, были опосредованы взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR. Изучение сигнальных каскадов, запускаемых ws-Lynx1 в раковых клетках, позволило предложить двухстадийную модель действия, имеющую существенные отличия от модели, предложенной для SLURP-1.

Таким образом, в ходе выполнения настоящей диссертационной работы был получен ряд новых фундаментальных знаний о функционировании трехпетельных нейротоксинов змей и трехпетельных белков человека, и показана перспективность последних с точки зрения разработки на их основе инновационных препаратов, нацеленных на лечение онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Результаты диссертационной работы также указывают на возможность создания новых пептидных молекул, селективно действующих на отдельные подтипы nAChR и mAChR, и способных выступать в роли как положительных, так и отрицательных аллостерических модуляторов мембранных рецепторов, что имеет важное практическое значение для современной медицины и фармакологии.

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*. 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мне хотелось бы выразить глубокую благодарность и искреннюю признательность своему научному консультанту академику РАН, д.б.н. Михаилу Петровичу Кирпичникову, который всегда оказывает своевременную помощь и всестороннюю поддержку и проявляет неустанное благожелательное внимание к моей работе.

Особую благодарность выражаю сотрудникам Отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН член-корреспонденту РАН, профессору Виктору Ионовичу Цетлину, профессору Юрию Николаевичу Уткину, Игорю Евгеньевичу Кашеверову и Денису Сергеевичу Кудрявцеву за огромную помощь в тестировании полученных трехпетельных белков методами электрофизиологии и в исследовании их взаимодействия с nAChR.

Благодарю руководителя Отдела структурной биологии ИБХ РАН профессора Александра Сергеевича Арсеньева и его сотрудников Александра Парамонова, Константина Минеева, Дмитрия Лесового, Эдуарда Бочарова и профессора РАН Захара Шенкарева за неоценимую помощь в исследовании полученных белков методами ЯМР-спектроскопии, а также Павла Волынского, Антона Чугунова и профессора Романа Гербертовича Ефремова, сотрудников лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН за помощь в построении молекулярных моделей комплексов трехпетельных белков с их мишенями.

Выражаю искреннюю признательность сотрудникам лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН Алексею Валерьевичу Феофанову, Георгию Шаронову, Анастасии Ефременко и Марии Вячеславовне Астаповой за помощь в проведении экспериментов на клеточных культурах.

Искренне благодарю Сергея Александровича Козлова и Сергея Геннадьевича Кошелева из лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН за помощь в характеристике мишеней действия трехпетельных белков.

Выражаю глубокую признательность член-корреспонденту РАН, профессору Скребицкому Владимиру Георгиевичу, профессору Шароновой Ирине Николаевне и Игорю Поварову из Научного центра неврологии РАН, член-корреспонденту РАН, профессору Павлу Милославовичу Балабану и Наталье Васильевой из Института высшей нервной деятельности человека РАН, а также член-корреспонденту РАН, профессору Алексею Васильевичу Семьянову и Александру Попову из лаборатории внесинаптической передачи ИБХ РАН за помощь в проведении электрофизиологических экспериментов на срезах мозга животных.

Благодарю Вячеслава Николаевича Азеева, руководителя группы химии пептидов ИБХ РАН, за помощь в синтезе пептидного фрагмента центральной петли Lynx1.

Искренне благодарю Александра Андреева-Андриевского, Анфису Попову и Евгению Лагереву из Института медико-биологических проблем РАН за помощь в проведении когнитивных тестов.

Благодарю всех зарубежных коллабораторов, без участия которых эта работа не могла бы состояться: профессора Владимира Долежала из Института физиологии Чешской академии наук, профессора Даниэля Бертрана из HiQScreen Sàrl, Женева, профессора Мортена Томсена из Университета Копенгагена, профессора Петра Брежестовского из Университета Aix-Marseille, а также Стива Пеньёра и профессора Яна Титгата из Университета KU Leuven.

Отдельную благодарность хочу выразить всем сотрудникам лаборатории инженерии белка за поддержку и дружелюбие, неизменно помогавшее мне на всем пути выполнения диссертационной работы, а также всему коллективу группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов за высокий профессионализм и создание благоприятной рабочей обстановки, в особенности Михаила Шулепко, Дмитрия Кульбацкого и Максима Бычкова.

Благодарю членов своей семьи и в особенности Захара Шенкарева за терпение, внимание и заботу, а также незаменимые советы и плодотворное обсуждение полученных результатов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] E.X. Albuquerque, E.F.R. Pereira, M. Alkondon, S.W. Rogers, Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 73–120. doi:10.1152/physrev.00015.2008.
- [2] F. Koukouli, U. Maskos, The multiple roles of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system, *Biochem. Pharmacol.* 97 (2015) 378–387. doi:10.1016/j.bcp.2015.07.018.
- [3] S.A. Grando, M.R. Pittelkow, K.U. Schallreuter, Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance, *J. Invest. Dermatol.* 126 (2006) 1948–1965. doi:10.1038/sj.jid.5700151.
- [4] K.J. Tracey, Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 289–296. doi:10.1172/JCI30555.
- [5] K. Uspenska, O. Lykhmus, M. Obolenskaya, S. Pons, U. Maskos, S. Komisarenko, M. Skok, Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors Support Liver Cells Viability After Partial Hepatectomy, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 626. doi:10.3389/fphar.2018.00626.
- [6] T.L. Wallace, T.M. Ballard, B. Pouzet, W.J. Riedel, J.G. Wettstein, Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (2011) 130–145. doi:10.1016/j.pbb.2011.03.022.
- [7] S.N. Haydar, J. Dunlop, Neuronal nicotinic acetylcholine receptors - targets for the development of drugs to treat cognitive impairment associated with schizophrenia and Alzheimer's disease, *Curr. Top. Med. Chem.* 10 (2010) 144–152.
- [8] J.P. Overington, B. Al-Lazikani, A.L. Hopkins, How many drug targets are there?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 993–996.
- [9] J.A. Lieberman, G. Dunbar, A.C. Segreti, R.R. Girgis, F. Seoane, J.S. Beaver, N. Duan, D.A. Hosford, A randomized exploratory trial of an α -7 nicotinic receptor agonist (TC-5619) for cognitive enhancement in schizophrenia, *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38 (2013) 968–975. doi:10.1038/npp.2012.259.
- [10] J. a. J. Martyn, M.J. Fagerlund, L.I. Eriksson, Basic principles of neuromuscular transmission, *Anaesthesia.* 64 Suppl 1 (2009) 1–9. doi:10.1111/j.1365-2044.2008.05865.x.
- [11] I. Wessler, H. Kilbinger, F. Bittinger, R. Unger, C.J. Kirkpatrick, The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology, *Life Sci.* 72 (2003) 2055–2061.
- [12] T. Fujii, M. Mashimo, Y. Moriwaki, H. Misawa, S. Ono, K. Horiguchi, K. Kawashima, Physiological functions of the cholinergic system in immune cells, *J. Pharmacol. Sci.* 134 (2017) 1–21. doi:10.1016/j.jphs.2017.05.002.
- [13] W. Kummer, G. Krasteva-Christ, Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology, *Curr. Opin. Pharmacol.* 16 (2014) 43–49. doi:10.1016/j.coph.2014.03.001.
- [14] I. Posadas, B. López-Hernández, V. Ceña, Nicotinic receptors in neurodegeneration, *Curr. Neuropharmacol.* 11 (2013) 298–314. doi:10.2174/1570159X11311030005.
- [15] E.D. Levin, Complex relationships of nicotinic receptor actions and cognitive functions, *Biochem. Pharmacol.* 86 (2013) 1145–1152. doi:10.1016/j.bcp.2013.07.021.
- [16] J. Lindstrom, Autoimmune diseases involving nicotinic receptors, *J. Neurobiol.* 53 (2002) 656–665. doi:10.1002/neu.10106.
- [17] S.A. Grando, Connections of nicotine to cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 14 (2014) 419–429. doi:10.1038/nrc3725.
- [18] V.I. Tsetlin, F. Hucho, Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications, *FEBS Lett.* 557 (2004) 9–13.
- [19] Y. Yao, J. Wang, N. Viroonchatapan, A. Samson, J. Chill, E. Rothe, J. Anglister, Z.-Z. Wang, Yeast Expression and NMR Analysis of the Extracellular Domain of Muscle Nicotinic

- Acetylcholine Receptor α Subunit, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12613–12621. doi:10.1074/jbc.M108845200.
- [20] T. Alexeev, A. Krivoshein, A. Shevalier, I. Kudelina, O. Telyakova, A. Vincent, Y. Utkin, F. Hucho, V. Tsetlin, Physicochemical and immunological studies of the N-terminal domain of the Torpedo acetylcholine receptor alpha-subunit expressed in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 310–319.
- [21] V.I. Tsetlin, N.I. Dergousova, E.A. Azeeva, E.V. Kryukova, I.A. Kudelina, E.D. Shibanova, I.E. Kasheverov, C. Methfessel, Refolding of the *Escherichia coli* expressed extracellular domain of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2801–2809.
- [22] M. Fischer, P.J. Corringer, K. Schott, A. Bacher, J.P. Changeux, A method for soluble overexpression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor extracellular domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3567–3570. doi:10.1073/pnas.041594798.
- [23] A. Schratzenholz, S. Pfeiffer, V. Pejovic, R. Rudolph, J. Godovac-Zimmermann, A. Maelicke, Expression and renaturation of the N-terminal extracellular domain of torpedo nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32393–32399.
- [24] V. Avramopoulou, A. Mamalaki, S.J. Tzartos, Soluble, oligomeric, and ligand-binding extracellular domain of the human alpha7 acetylcholine receptor expressed in yeast: replacement of the hydrophobic cysteine loop by the hydrophilic loop of the ACh-binding protein enhances protein solubility, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 38287–38293. doi:10.1074/jbc.M402533200.
- [25] S. Gu, J.A. Matta, B. Lord, A.W. Harrington, S.W. Sutton, W.B. Davini, D.S. Bredt, Brain α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO, *Neuron.* 89 (2016) 948–955. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.018.
- [26] R.C. Hogg, M. Raggenbass, D. Bertrand, Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147 (2003) 1–46. doi:10.1007/s10254-003-0005-1.
- [27] C. Hammond, The ionotropic nicotinic acetylcholine receptors, in: *Cell. Mol. Neurophysiol.*, Elsevier, 2015: pp. 173–197. doi:10.1016/B978-0-12-397032-9.00008-X.
- [28] V.I. Tsetlin, K.A. Pluzhnikov, A.A. Karelin, E. Karlsson, V.T. Ivanov, [Relative localization of the bound acetylcholine receptor subunits and neurotoxin], *Bioorg. Khim.* 10 (1984) 176–187.
- [29] C.J.B. daCosta, C.R. Free, S.M. Sine, Stoichiometry for α -bungarotoxin block of α 7 acetylcholine receptors, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8057. doi:10.1038/ncomms9057.
- [30] N. Unwin, Acetylcholine receptor channel imaged in the open state, *Nature.* 373 (1995) 37–43. doi:10.1038/373037a0.
- [31] J.A. Dani, Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine, *Int. Rev. Neurobiol.* 124 (2015) 3–19. doi:10.1016/bs.irn.2015.07.001.
- [32] N. Unwin, Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from Torpedo postsynaptic membranes, *Q. Rev. Biophys.* 46 (2013) 283–322. doi:10.1017/S0033583513000061.
- [33] C. Stokes, M. Treinin, R.L. Papke, Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 36 (2015) 514–523. doi:10.1016/j.tips.2015.05.002.
- [34] S. Kracun, P.C. Harkness, A.J. Gibb, N.S. Millar, Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 1474–1484. doi:10.1038/sj.bjp.0707676.
- [35] B.M. Williams, M.K. Temburni, M.S. Levey, S. Bertrand, D. Bertrand, M.H. Jacob, The long internal loop of the alpha 3 subunit targets nAChRs to subdomains within individual synapses on neurons in vivo, *Nat. Neurosci.* 1 (1998) 557–562. doi:10.1038/2792.
- [36] L.S. Borges, S. Yechikhov, Y.I. Lee, J.B. Rudell, M.B. Friese, S.J. Burden, M.J. Ferns, Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28 (2008) 11468–11476. doi:10.1523/JNEUROSCI.2508-08.2008.

- [37] N. Kabbani, R.A. Nichols, Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 39 (2018) 354–366. doi:10.1016/j.tips.2018.01.002.
- [38] S.M. Sine, The nicotinic receptor ligand binding domain, *J. Neurobiol.* 53 (2002) 431–446. doi:10.1002/neu.10139.
- [39] K. Brejc, W.J. van Dijk, R.V. Klaassen, M. Schuurmans, Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors, *Nature.* 411 (2001) 8.
- [40] A.B. Smit, N.I. Syed, D. Schaap, J. van Minnen, J. Klumperman, K.S. Kits, H. Lodder, R.C. van der Schors, R. van Elk, B. Sorgedragger, K. Brejc, T.K. Sixma, W.P. Geraerts, A gliaderived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission, *Nature.* 411 (2001) 261–268. doi:10.1038/35077000.
- [41] S.-X. Li, S. Huang, N. Bren, K. Noridomi, C.D. Dellisanti, S.M. Sine, L. Chen, Ligand-binding domain of an $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist, *Nat. Neurosci.* 14 (2011) 1253–1259. doi:10.1038/nn.2908.
- [42] R. Spurny, S. Debaveye, A. Farinha, K. Veys, A.M. Vos, T. Gossas, J. Atack, S. Bertrand, D. Bertrand, U.H. Danielson, G. Tresadern, C. Ulens, Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E2543–E2552. doi:10.1073/pnas.1418289112.
- [43] M. Zouridakis, P. Giastas, E. Zarkadas, D. Chroni-Tzartou, P. Bregestovski, S.J. Tzartos, Crystal structures of free and antagonist-bound states of human $\alpha 9$ nicotinic receptor extracellular domain, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 976–980. doi:10.1038/nsmb.2900.
- [44] C.D. Dellisanti, Y. Yao, J.C. Stroud, Z.-Z. Wang, L. Chen, Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 953–962. doi:10.1038/nn1942.
- [45] C.L. Morales-Perez, C.M. Noviello, R.E. Hibbs, X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor, *Nature.* 538 (2016) 411–415. doi:10.1038/nature19785.
- [46] R.M. Walsh, S.-H. Roh, A. Gharpure, C.L. Morales-Perez, J. Teng, R.E. Hibbs, Structural principles of distinct assemblies of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor, *Nature.* 557 (2018) 261–265. doi:10.1038/s41586-018-0081-7.
- [47] R. Lape, D. Colquhoun, L.G. Sivilotti, On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily, *Nature.* 454 (2008) 722–727. doi:10.1038/nature07139.
- [48] N. Mukhtasimova, C.J.B. daCosta, S.M. Sine, Improved resolution of single channel dwell times reveals mechanisms of binding, priming, and gating in muscle AChR, *J. Gen. Physiol.* 148 (2016) 43–63. doi:10.1085/jgp.201611584.
- [49] A.B. Cachelin, D. Colquhoun, Desensitization of the acetylcholine receptor of frog endplates measured in a Vaseline-gap voltage clamp, *J. Physiol.* 415 (1989) 159–188.
- [50] C. Bouzat, S.M. Sine, Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level, *Br. J. Pharmacol.* 175 (2018) 1789–1804. doi:10.1111/bph.13770.
- [51] J.R. King, J.C. Nordman, S.P. Bridges, M.-K. Lin, N. Kabbani, Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 20060–20070. doi:10.1074/jbc.M115.647040.
- [52] M.S. Guzman, X. De Jaeger, S. Raulic, I.A. Souza, A.X. Li, S. Schmid, R.S. Menon, R.R. Gainetdinov, M.G. Caron, R. Bartha, V.F. Prado, M.A.M. Prado, Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the striatum reveals regulation of behaviour by cholinergic-glutamatergic co-transmission, *PLoS Biol.* 9 (2011) e1001194. doi:10.1371/journal.pbio.1001194.
- [53] A. Saunders, A.J. Granger, B.L. Sabatini, Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons, *ELife.* 4 (2015). doi:10.7554/eLife.06412.
- [54] A.N. Placzek, T.A. Zhang, J.A. Dani, Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus, *Acta Pharmacol. Sin.* 30 (2009) 752–760. doi:10.1038/aps.2009.39.
- [55] M.A. Lynch, Long-term potentiation and memory, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 87–136. doi:10.1152/physrev.00014.2003.

- [56] F.A. Dajas-Bailador, A.J. Mogg, S. Wonnacott, Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores, *J. Neurochem.* 81 (2002) 606–614.
- [57] J.W. Young, N. Crawford, J.S. Kelly, L.E. Kerr, H.M. Marston, C. Spratt, K. Finlayson, J. Sharkey, Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice, *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 17 (2007) 145–155. doi:10.1016/j.euroneuro.2006.03.008.
- [58] E. Andriambeloson, B. Huyard, E. Poiraud, S. Wagner, Methyllycaconitine- and scopolamine-induced cognitive dysfunction: differential reversal effect by cognition-enhancing drugs, *Pharmacol. Res. Perspect.* 2 (2014) e00048. doi:10.1002/prp2.48.
- [59] D. Ji, J.A. Dani, Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons, *J. Neurophysiol.* 83 (2000) 2682–2690. doi:10.1152/jn.2000.83.5.2682.
- [60] E.L. Newman, K. Gupta, J.R. Climer, C.K. Monaghan, M.E. Hasselmo, Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models, *Front. Behav. Neurosci.* 6 (2012). doi:10.3389/fnbeh.2012.00024.
- [61] M. Trivisano, A. Terracciano, T. Milano, S. Cappelletti, N. Pietrafusa, E.S. Bertini, F. Vigeveno, N. Specchio, Mutation of CHRNA2 in a family with benign familial infantile seizures: Potential role of nicotinic acetylcholine receptor in various phenotypes of epilepsy, *Epilepsia.* 56 (2015) e53-57. doi:10.1111/epi.12967.
- [62] Y.S. Mineur, M.R. Picciotto, Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis, *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (2010) 580–586. doi:10.1016/j.tips.2010.09.004.
- [63] A. Olincy, A. Blakeley-Smith, L. Johnson, W.R. Kem, R. Freedman, Brief Report: Initial Trial of Alpha7-Nicotinic Receptor Stimulation in Two Adult Patients with Autism Spectrum Disorder, *J. Autism Dev. Disord.* 46 (2016) 3812–3817. doi:10.1007/s10803-016-2890-6.
- [64] S.D. Buckingham, A.K. Jones, L.A. Brown, D.B. Sattelle, Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer’s disease and amyloid neuroprotection, *Pharmacol. Rev.* 61 (2009) 39–61. doi:10.1124/pr.108.000562.
- [65] R. Yarza, S. Vela, M. Solas, M.J. Ramirez, c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 321. doi:10.3389/fphar.2015.00321.
- [66] P.T. Francis, C.G. Parsons, R.W. Jones, Rationale for combining glutamatergic and cholinergic approaches in the symptomatic treatment of Alzheimer’s disease, *Expert Rev. Neurother.* 12 (2012) 1351–1365. doi:10.1586/ern.12.124.
- [67] T.L. Wallace, D. Bertrand, Neuronal $\alpha 7$ Nicotinic Receptors as a Target for the Treatment of Schizophrenia, *Int. Rev. Neurobiol.* 124 (2015) 79–111. doi:10.1016/bs.irn.2015.08.003.
- [68] Z. Bencan, E.D. Levin, The role of alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish, *Physiol. Behav.* 95 (2008) 408–412. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.009.
- [69] M.R. Picciotto, A.S. Lewis, G.I. van Schalkwyk, Y.S. Mineur, Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: A potential pathway to modulate aggression and related behavioral states, *Neuropharmacology.* 96 (2015) 235–243. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.12.028.
- [70] J. Yin, W. Chen, H. Yang, M. Xue, C.P. Schaaf, Chrna7 deficient mice manifest no consistent neuropsychiatric and behavioral phenotypes, *Sci. Rep.* 7 (2017) 39941. doi:10.1038/srep39941.
- [71] M. Israël, Y. Dunant, Acetylcholine release. Reconstitution of the elementary quantal mechanism, *J. Physiol. Paris.* 92 (1998) 123–128. doi:10.1016/S0928-4257(98)80149-6.
- [72] J. Beckmann, K.S. Lips, The non-neuronal cholinergic system in health and disease, *Pharmacology.* 92 (2013) 286–302. doi:10.1159/000355835.

- [73] U. Andersson, K.J. Tracey, Neural reflexes in inflammation and immunity, *J. Exp. Med.* 209 (2012) 1057–1068. doi:10.1084/jem.20120571.
- [74] J. Qian, V. Galitovskiy, A.I. Chernyavsky, S. Marchenko, S.A. Grando, Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages, *Genes Immun.* 12 (2011) 222–230. doi:10.1038/gene.2010.72.
- [75] H. Wang, H. Liao, M. Ochani, M. Justiniani, X. Lin, L. Yang, Y. Al-Abed, H. Wang, C. Metz, E.J. Miller, K.J. Tracey, L. Ulloa, Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis, *Nat. Med.* 10 (2004) 1216–1221. doi:10.1038/nm1124.
- [76] M. Rosas-Ballina, P.S. Olofsson, M. Ochani, S.I. Valdés-Ferrer, Y.A. Levine, C. Reardon, M.W. Tusche, V.A. Pavlov, U. Andersson, S. Chavan, T.W. Mak, K.J. Tracey, Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit, *Science.* 334 (2011) 98–101. doi:10.1126/science.1209985.
- [77] Y.X. Fujii, A. Tashiro, K. Arimoto, H. Fujigaya, Y. Moriwaki, H. Misawa, T. Fujii, M. Matsui, T. Kasahara, K. Kawashima, Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice, *J. Neuroimmunol.* 188 (2007) 80–85. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.05.017.
- [78] R. Kimura, N. Ushiyama, T. Fujii, K. Kawashima, Nicotine-induced Ca²⁺ signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line, *Life Sci.* 72 (2003) 2155–2158.
- [79] W.J. de Jonge, E.P. van der Zanden, F.O. The, M.F. Bijlsma, D.J. van Westerloo, R.J. Bennink, H.-R. Berthoud, S. Uematsu, S. Akira, R.M. van den Wijngaard, G.E. Boeckstaens, Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 844–851. doi:10.1038/ni1229.
- [80] P. Mina-Osorio, M. Rosas-Ballina, S.I. Valdes-Ferrer, Y. Al-Abed, K.J. Tracey, B. Diamond, Neural signaling in the spleen controls B-cell responses to blood-borne antigen, *Mol. Med. Camb. Mass.* 18 (2012) 618–627. doi:10.2119/molmed.2012.00027.
- [81] P. Li, H. Liu, P. Sun, X. Wang, C. Wang, L. Wang, T. Wang, Chronic vagus nerve stimulation attenuates vascular endothelial impairments and reduces the inflammatory profile via inhibition of the NF- κ B signaling pathway in ovariectomized rats, *Exp. Gerontol.* 74 (2016) 43–55. doi:10.1016/j.exger.2015.12.005.
- [82] M.V. Skok, R. Grailhe, F. Agenes, J.-P. Changeux, The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation, *Life Sci.* 80 (2007) 2334–2336. doi:10.1016/j.lfs.2007.02.005.
- [83] S. Razani-Boroujerdi, R.T. Boyd, M.I. Dávila-García, J.S. Nandi, N.C. Mishra, S.P. Singh, J.C. Pena-Philippides, R. Langley, M.L. Sopori, T cells express α 7-nicotinic acetylcholine receptor subunits that require a functional TCR and leukocyte-specific protein tyrosine kinase for nicotine-induced Ca²⁺ response, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 179 (2007) 2889–2898.
- [84] J. Corradi, C. Bouzat, Understanding the Bases of Function and Modulation of α 7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery, *Mol. Pharmacol.* 90 (2016) 288–299. doi:10.1124/mol.116.104240.
- [85] W.J. de Jonge, L. Ulloa, The α 7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 915–929. doi:10.1038/sj.bjp.0707264.
- [86] X.W. Fu, S.S. Rekow, E.R. Spindel, The *ly-6* protein, *lynx1*, is an endogenous inhibitor of nicotinic signaling in airway epithelium, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 303 (2012) L661–668. doi:10.1152/ajplung.00075.2012.
- [87] H. Kurzen, H. Berger, C. Jäger, W. Hartschuh, H. Näher, A. Gratchev, S. Goerdts, M. Deichmann, Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 937–949. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23425.x.

- [88] B.J. Curtis, K.A. Radek, Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 28–42. doi:10.1038/jid.2011.264.
- [89] A.I. Chernyavsky, J. Arredondo, L.M. Marubio, S.A. Grando, Differential regulation of keratinocyte chemokinesis and chemotaxis through distinct nicotinic receptor subtypes, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 5665–5679. doi:10.1242/jcs.01492.
- [90] V.T. Nguyen, A.I. Chernyavsky, J. Arredondo, D. Bercovich, A. Orr-Urtreger, D.E. Vetter, J. Wess, A.L. Beaudet, Y. Kitajima, S.A. Grando, Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes, *Exp. Cell Res.* 294 (2004) 534–549. doi:10.1016/j.yexcr.2003.12.010.
- [91] J. Arredondo, V.T. Nguyen, A.I. Chernyavsky, D. Bercovich, A. Orr-Urtreger, W. Kummer, K. Lips, D.E. Vetter, S.A. Grando, Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium, *J. Cell Biol.* 159 (2002) 325–336. doi:10.1083/jcb.200206096.
- [92] V.T. Nguyen, A. Ndoeye, L.L. Hall, S. Zia, J. Arredondo, A.I. Chernyavsky, D.A. Kist, B.D. Zelickson, M.A. Lawry, S.A. Grando, Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 1189–1204.
- [93] K.A. Radek, P.M. Elias, L. Taupenot, S.K. Mahata, D.T. O'Connor, R.L. Gallo, Neuroendocrine nicotinic receptor activation increases susceptibility to bacterial infections by suppressing antimicrobial peptide production, *Cell Host Microbe.* 7 (2010) 277–289. doi:10.1016/j.chom.2010.03.009.
- [94] J. Arredondo, L.L. Hall, A. Ndoeye, V.T. Nguyen, A.I. Chernyavsky, D. Bercovich, A. Orr-Urtreger, A.L. Beaudet, S.A. Grando, Central role of fibroblast alpha3 nicotinic acetylcholine receptor in mediating cutaneous effects of nicotine, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 83 (2003) 207–225.
- [95] A.I. Chernyavsky, J. Arredondo, E. Karlsson, I. Wessler, S.A. Grando, The Ras/Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway coupled to integrin expression mediates cholinergic regulation of keratinocyte directional migration, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39220–39228. doi:10.1074/jbc.M504407200.
- [96] C. Schaal, S.P. Chellappan, Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers, *Mol. Cancer Res. MCR.* 12 (2014) 14–23. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0541.
- [97] S.A. Grando, Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors, *J. Pharmacol. Sci.* 106 (2008) 174–179.
- [98] J. Arredondo, A.I. Chernyavsky, D.L. Jolkovsky, K.E. Pinkerton, S.A. Grando, Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of 5 and 7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke, *FASEB J.* (2007). doi:10.1096/fj.07-9965com.
- [99] S. Trombino, A. Cesario, S. Margaritora, P. Granone, G. Motta, C. Falugi, P. Russo, α 7-Nicotinic Acetylcholine Receptors Affect Growth Regulation of Human Mesothelioma Cells: Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway, (n.d.) 13.
- [100] P. Dasgupta, Nicotine induces cell proliferation by -arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2208–2217. doi:10.1172/JCI28164.
- [101] B.A. Jull, H.K. Plummer, H.M. Schuller, Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco-specific nitrosamine NNK of a Raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127 (2001) 707–717.
- [102] N. Momi, M.P. Ponnusamy, S. Kaur, S. Rachagani, S.S. Kunigal, S. Chellappan, M.M. Ouellette, S.K. Batra, Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through

- $\alpha 7$ nAChR-mediated MUC4 upregulation, *Oncogene*. 32 (2013) 1384–1395. doi:10.1038/onc.2012.163.
- [103] K.C. Brown, H.E. Perry, J.K. Lau, D.V. Jones, J.F. Pulliam, B.A. Thornhill, C.M. Crabtree, H. Luo, Y.C. Chen, P. Dasgupta, Nicotine induces the up-regulation of the $\alpha 7$ -nicotinic receptor ($\alpha 7$ -nAChR) in human squamous cell lung cancer cells via the Sp1/GATA protein pathway, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 33049–33059. doi:10.1074/jbc.M113.501601.
- [104] P. Dasgupta, R. Kinkade, B. Joshi, C. Decook, E. Haura, S. Chellappan, Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 6332–6337. doi:10.1073/pnas.0509313103.
- [105] O. Dobrovinskaya, G. Valencia-Cruz, L. Castro-Sánchez, E.O. Bonales-Alatorre, L. Liñan-Rico, I. Pottosin, Cholinergic Machinery as Relevant Target in Acute Lymphoblastic T Leukemia, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 290. doi:10.3389/fphar.2016.00290.
- [106] P. Dasgupta, W. Rizwani, S. Pillai, R. Kinkade, M. Kovacs, S. Rastogi, S. Banerjee, M. Carless, E. Kim, D. Coppola, E. Haura, S. Chellappan, Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines, *Int. J. Cancer.* 124 (2009) 36–45. doi:10.1002/ijc.23894.
- [107] Y. Zhao, W. Zhou, L. Xue, W. Zhang, Q. Zhan, Nicotine activates YAP1 through nAChRs mediated signaling in esophageal squamous cell cancer (ESCC), *PloS One*. 9 (2014) e90836. doi:10.1371/journal.pone.0090836.
- [108] R. Fei, Y. Zhang, S. Wang, T. Xiang, W. Chen, $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in tumor-associated macrophages inhibits colorectal cancer metastasis through the JAK2/STAT3 signaling pathway, *Oncol. Rep.* 38 (2017) 2619–2628. doi:10.3892/or.2017.5935.
- [109] T. Xiang, R. Fei, Z. Wang, Z. Shen, J. Qian, W. Chen, Nicotine enhances invasion and metastasis of human colorectal cancer cells through the nicotinic acetylcholine receptor downstream p38 MAPK signaling pathway, *Oncol. Rep.* 35 (2016) 205–210. doi:10.3892/or.2015.4363.
- [110] V.Y. Shin, W.K.K. Wu, Y.-N. Ye, W.H.L. So, M.W.L. Koo, E.S.L. Liu, J.-C. Luo, C.-H. Cho, Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2, *Carcinogenesis*. 25 (2004) 2487–2495. doi:10.1093/carcin/bgh266.
- [111] H.P.S. Wong, L. Yu, E.K.Y. Lam, E.K.K. Tai, W.K.K. Wu, C.-H. Cho, Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation, *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 97 (2007) 279–287. doi:10.1093/toxsci/kfm060.
- [112] X.W. Fu, P.F. Song, E.R. Spindel, Role of Lynx1 and related Ly6 proteins as modulators of cholinergic signaling in normal and neoplastic bronchial epithelium, *Int. Immunopharmacol.* 29 (2015) 93–98. doi:10.1016/j.intimp.2015.05.022.
- [113] M.P. Caulfield, N.J. Birdsall, International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 279–290.
- [114] E. Scarr, B. Dean, Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia?, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1188–1195. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05711.x.
- [115] E. Reiter, S. Ahn, A.K. Shukla, R.J. Lefkowitz, Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52 (2012) 179–197. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105800.
- [116] V. Katritch, V. Cherezov, R.C. Stevens, Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53 (2013) 531–556. doi:10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923.
- [117] V. Katritch, V. Cherezov, R.C. Stevens, Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures, *Trends Pharmacol. Sci.* 33 (2012) 17–27. doi:10.1016/j.tips.2011.09.003.
- [118] R. Nygaard, T.M. Frimurer, B. Holst, M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz, Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 249–259. doi:10.1016/j.tips.2009.02.006.

- [119] S.G.F. Rasmussen, B.T. DeVree, Y. Zou, A.C. Kruse, K.Y. Chung, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J.M. Mathiesen, S.T.A. Shah, J.A. Lyons, M. Caffrey, S.H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W.I. Weis, R.K. Sunahara, B.K. Kobilka, Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature*. 477 (2011) 549–555. doi:10.1038/nature10361.
- [120] M.A. Hanson, C.B. Roth, E. Jo, M.T. Griffith, F.L. Scott, G. Reinhart, H. Desale, B. Clemons, S.M. Cahalan, S.C. Schuerer, M.G. Sanna, G.W. Han, P. Kuhn, H. Rosen, R.C. Stevens, Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor, *Science*. 335 (2012) 851–855. doi:10.1126/science.1215904.
- [121] E.C. Hulme, Z.L. Lu, J.W. Saldanha, M.S. Bee, Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 29–34. doi:10.1042/.
- [122] K. Haga, A.C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W.I. Weis, T. Okada, B.K. Kobilka, T. Haga, T. Kobayashi, Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist, *Nature*. 482 (2012) 547–551. doi:10.1038/nature10753.
- [123] A.C. Kruse, J. Hu, A.C. Pan, D.H. Arlow, D.M. Rosenbaum, E. Rosemond, H.F. Green, T. Liu, P.S. Chae, R.O. Dror, D.E. Shaw, W.I. Weis, J. Wess, B.K. Kobilka, Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor, *Nature*. 482 (2012) 552–556. doi:10.1038/nature10867.
- [124] C.J. Langmead, J. Watson, C. Reavill, Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets, *Pharmacol. Ther.* 117 (2008) 232–243. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.09.009.
- [125] G. Swaminath, Y. Xiang, T.W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot, B.K. Kobilka, Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 686–691. doi:10.1074/jbc.M310888200.
- [126] D.M. Rosenbaum, S.G.F. Rasmussen, B.K. Kobilka, The structure and function of G-protein-coupled receptors, *Nature*. 459 (2009) 356–363. doi:10.1038/nature08144.
- [127] D. Servent, C. Fruchart-Gaillard, Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors, *J. Neurochem.* 109 (2009) 1193–1202. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06092.x.
- [128] S.V. Shabelnikov, D.E. Bobkov, N.S. Sharlaimova, O.A. Petukhova, Injury affects coelomic fluid proteome of the common starfish, *Asterias rubens*, *J. Exp. Biol.* 222 (2019). doi:10.1242/jeb.198556.
- [129] K. Koh, W.J. Joiner, M.N. Wu, Z. Yue, C.J. Smith, A. Sehgal, Identification of SLEEPLESS, a sleep-promoting factor, *Science*. 321 (2008) 372–376. doi:10.1126/science.1155942.
- [130] G. Özhan, E. Sezgin, D. Wehner, A.S. Pfister, S.J. Köhl, B. Kagermeier-Schenk, M. Köhl, P. Schwille, G. Weidinger, Lypd6 enhances Wnt/ β -catenin signaling by promoting Lrp6 phosphorylation in raft plasma membrane domains, *Dev. Cell*. 26 (2013) 331–345. doi:10.1016/j.devcel.2013.07.020.
- [131] S.M. da Silva, P.B. Gates, J.P. Brockes, The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration, *Dev. Cell*. 3 (2002) 547–555.
- [132] B.G. Fry, W. Wüster, R.M. Kini, V. Brusica, A. Khan, D. Venkataraman, A.P. Rooney, Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins, *J. Mol. Evol.* 57 (2003) 110–129. doi:10.1007/s00239-003-2461-2.
- [133] M. Hruska, J. Keefe, D. Wert, A.B. Tekinay, J.J. Hulce, I. Ibañez-Tallon, R. Nishi, Prostate stem cell antigen is an endogenous lynx1-like prototoxin that antagonizes alpha7-containing nicotinic receptors and prevents programmed cell death of parasympathetic neurons, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29 (2009) 14847–14854. doi:10.1523/JNEUROSCI.2271-09.2009.
- [134] J.M. Miwa, I. Ibanez-Tallon, G.W. Crabtree, R. Sánchez, A. Sali, L.W. Role, N. Heintz, lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS, *Neuron*. 23 (1999) 105–114.

- [135] R.M. Kini, R. Doley, Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets, *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology*. 56 (2010) 855–867. doi:10.1016/j.toxicon.2010.07.010.
- [136] I.F. McKenzie, J. Gardiner, M. Cherry, G.D. Snell, Lymphocyte antigens: Ly-4, Ly-6, and Ly-7, *Transplant. Proc.* 9 (1977) 667–669.
- [137] C.M. Fletcher, R.A. Harrison, P.J. Lachmann, D. Neuhaus, Structure of a soluble, glycosylated form of the human complement regulatory protein CD59, *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2 (1994) 185–199.
- [138] C.L. Loughner, E.A. Bruford, M.S. McAndrews, E.E. Delp, S. Swamynathan, S.K. Swamynathan, Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes, *Hum. Genomics*. 10 (2016) 10. doi:10.1186/s40246-016-0074-2.
- [139] D. Servent, V. Winckler-Dietrich, H.Y. Hu, P. Kessler, P. Drevet, D. Bertrand, A. Ménez, Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24279–24286.
- [140] Y. Bourne, T.T. Talley, S.B. Hansen, P. Taylor, P. Marchot, Crystal structure of a Cbtx–AChBP complex reveals essential interactions between snake α -neurotoxins and nicotinic receptors, *EMBO J.* 24 (2005) 1512–1522. doi:10.1038/sj.emboj.7600620.
- [141] S. Huang, S.-X. Li, N. Bren, K. Cheng, R. Gomoto, L. Chen, S.M. Sine, Complex between α -bungarotoxin and an $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand-binding domain chimera, *Biochem. J.* 454 (2013) 303–310. doi:10.1042/BJ20130636.
- [142] D. Servent, G. Blanchet, G. Mourier, C. Marquer, E. Marcon, C. Fruchart-Gaillard, Muscarinic toxins, *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology*. 58 (2011) 455–463. doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.004.
- [143] C. Marquer, C. Fruchart-Gaillard, G. Letellier, E. Marcon, G. Mourier, S. Zinn-Justin, A. Ménez, D. Servent, B. Gilquin, Structural Model of Ligand-G Protein-coupled Receptor (GPCR) Complex Based on Experimental Double Mutant Cycle Data: MT7 SNAKE TOXIN BOUND TO DIMERIC hM1 MUSCARINIC RECEPTOR, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 31661–31675. doi:10.1074/jbc.M111.261404.
- [144] S. Nirthanan, P. Gopalakrishnakone, M.C.E. Gwee, H.E. Khoo, R.M. Kini, Non-conventional toxins from Elapid venoms, *Toxicon*. 41 (2003) 397–407. doi:10.1016/S0041-0101(02)00388-4.
- [145] S. Nirthanan, E. Charpantier, P. Gopalakrishnakone, M.C.E. Gwee, H.-E. Khoo, L.-S. Cheah, D. Bertrand, R.M. Kini, Candoxin, a Novel Toxin from *Bungarus candidus*, Is a Reversible Antagonist of Muscle () but a Poorly Reversible Antagonist of Neuronal 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17811–17820. doi:10.1074/jbc.M111152200.
- [146] S.D. Aird, G.C. Womble, J.R. Yates, P.R. Griffin, Primary structure of gamma-bungarotoxin, a new postsynaptic neurotoxin from venom of *Bungarus multicinctus*, *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology*. 37 (1999) 609–625.
- [147] D.Y. Mordvintsev, Y.L. Polyak, D.I. Rodionov, J. Jakubik, V. Dolezal, E. Karlsson, V.I. Tsetlin, Y.N. Utkin, Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors: Weak toxin binds two acetylcholine receptor types, *FEBS J.* 276 (2009) 5065–5075. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07203.x.
- [148] J.-P. Rosso, J.R. Schwarz, M. Diaz-Bustamante, B. Céard, J.M. Gutiérrez, M. Kneussel, O. Pongs, F. Bosmans, P.E. Bougis, MmTX1 and MmTX2 from coral snake venom potently modulate GABAA receptor activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E891-900. doi:10.1073/pnas.1415488112.
- [149] S. Hannan, M. Mortensen, T.G. Smart, Snake neurotoxin α -bungarotoxin is an antagonist at native GABA(A) receptors, *Neuropharmacology*. 93 (2015) 28–40. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.01.001.

- [150] N.G. Jones, R. Slater, H. Cadiou, P. McNaughton, S.B. McMahon, Acid-induced pain and its modulation in humans, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24 (2004) 10974–10979. doi:10.1523/JNEUROSCI.2619-04.2004.
- [151] S. Diochot, A. Baron, M. Salinas, D. Douguet, S. Scarzello, A.-S. Dabert-Gay, D. Debayle, V. Friend, A. Alloui, M. Lazdunski, E. Lingueglia, Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain, *Nature*. 490 (2012) 552–555. doi:10.1038/nature11494.
- [152] G. Mourier, M. Salinas, P. Kessler, E.A. Stura, M. Leblanc, L. Tepshi, T. Besson, S. Diochot, A. Baron, D. Douguet, E. Lingueglia, D. Servent, Mambalgin-1 Pain-relieving Peptide, Stepwise Solid-phase Synthesis, Crystal Structure, and Functional Domain for Acid-sensing Ion Channel 1a Inhibition, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 2616–2629. doi:10.1074/jbc.M115.702373.
- [153] R.G. Efremov, P.E. Volynsky, D.E. Nolde, P.V. Dubovskii, A.S. Arseniev, Interaction of cardiotoxins with membranes: a molecular modeling study, *Biophys. J.* 83 (2002) 144–153. doi:10.1016/S0006-3495(02)75156-4.
- [154] P.V. Dubovskii, A.G. Konshina, R.G. Efremov, Cobra cardiotoxins: membrane interactions and pharmacological potential, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 270–287.
- [155] P.V. Dubovskii, Y.N. Utkin, Cobra cytotoxins: structural organization and antibacterial activity, *Acta Naturae*. 6 (2014) 11–18.
- [156] P.V. Dubovskii, Y.N. Utkin, Antiproliferative activity of cobra venom cytotoxins, *Curr. Top. Med. Chem.* 15 (2015) 638–648.
- [157] A.V. Feofanov, G.V. Sharonov, M.V. Astapova, D.I. Rodionov, Y.N. Utkin, A.S. Arseniev, Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage, *Biochem. J.* 390 (2005) 11–18. doi:10.1042/BJ20041892.
- [158] Y. Bourne, P. Taylor, P. Marchot, Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex, *Cell*. 83 (1995) 503–512.
- [159] M. Wu, J.E. Robinson, W.J. Joiner, SLEEPLESS Is a Bifunctional Regulator of Excitability and Cholinergic Synaptic Transmission, *Curr. Biol.* 24 (2014) 621–629. doi:10.1016/j.cub.2014.02.026.
- [160] M. Wu, C.Z. Liu, W.J. Joiner, Structural Analysis and Deletion Mutagenesis Define Regions of QUIVER/SLEEPLESS that Are Responsible for Interactions with Shaker-Type Potassium Channels and Nicotinic Acetylcholine Receptors, *PloS One*. 11 (2016) e0148215. doi:10.1371/journal.pone.0148215.
- [161] Z. Liu, G. Cao, J. Li, H. Bao, Y. Zhang, Identification of two Lynx proteins in *Nilaparvata lugens* and the modulation on insect nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.* 110 (2009) 1707–1714. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06274.x.
- [162] B. Yang, X. Yao, S. Gu, Y. Zhang, Z. Liu, Y. Zhang, Selectivity of lynx proteins on insect nicotinic acetylcholine receptors in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, *Insect Mol. Biol.* 19 (2010) 283–289. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00981.x.
- [163] J.D. McNally, S.-B. Wu, C.M. Sturgeon, K.B. Storey, Identification and characterization of a novel freezing inducible gene, *li16*, in the wood frog *Rana sylvatica*, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16 (2002) 902–904. doi:10.1096/fj.02-0017fje.
- [164] A. Garza-Garcia, R. Harris, D. Esposito, P.B. Gates, P.C. Driscoll, Solution Structure and Phylogenetics of Prod1, a Member of the Three-Finger Protein Superfamily Implicated in Salamander Limb Regeneration, *PLoS ONE*. 4 (2009) e7123. doi:10.1371/journal.pone.0007123.
- [165] A. Kumar, P.B. Gates, A. Czarkwiani, J.P. Brockes, An orphan gene is necessary for preaxial digit formation during salamander limb development, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8684. doi:10.1038/ncomms9684.
- [166] K. Nomura, Y. Tanimoto, F. Hayashi, E. Harada, X.-Y. Shan, M. Shionyu, A. Hijikata, T. Shirai, K. Morigaki, K. Shimamoto, The Role of the Prod1 Membrane Anchor in Newt Limb Regeneration, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 56 (2017) 270–274. doi:10.1002/anie.201609703.

- [167] M. Wang, L. Li, Q. Guo, S. Zhang, D. Ji, H. Li, Identification and expression of a new Ly6 gene cluster in zebrafish *Danio rerio*, with implications of being involved in embryonic immunity, *Fish Shellfish Immunol.* 54 (2016) 230–240. doi:10.1016/j.fsi.2016.04.005.
- [168] C. Parker, M. Omine, S. Richards, J.-I. Nishimura, M. Bessler, R. Ware, P. Hillmen, L. Luzzatto, N. Young, T. Kinoshita, W. Rosse, G. Socié, International PNH Interest Group, Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Blood.* 106 (2005) 3699–3709. doi:10.1182/blood-2005-04-1717.
- [169] F. Blasi, P. Carmeliet, uPAR: a versatile signalling orchestrator, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 932–943. doi:10.1038/nrm977.
- [170] S.-C. Su, C.-W. Lin, W.-E. Yang, W.-L. Fan, S.-F. Yang, The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies, *Expert Opin. Ther. Targets.* 20 (2016) 551–566. doi:10.1517/14728222.2016.1113260.
- [171] Q. Huai, A.P. Mazar, A. Kuo, G.C. Parry, D.E. Shaw, J. Callahan, Y. Li, C. Yuan, C. Bian, L. Chen, B. Furie, B.C. Furie, D.B. Cines, M. Huang, Structure of Human Urokinase Plasminogen Activator in Complex with Its Receptor, *Science.* 311 (2006) 656–659. doi:10.1126/science.1121143.
- [172] I. Ibañez-Tallon, J.M. Miwa, H.L. Wang, N.C. Adams, G.W. Crabtree, S.M. Sine, N. Heintz, Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1, *Neuron.* 33 (2002) 893–903.
- [173] M.P. Demars, H. Morishita, Cortical parvalbumin and somatostatin GABA neurons express distinct endogenous modulators of nicotinic acetylcholine receptors, *Mol. Brain.* 7 (2014) 75. doi:10.1186/s13041-014-0075-9.
- [174] W.A. Nichols, B.J. Henderson, C. Yu, R.L. Parker, C.I. Richards, H.A. Lester, J.M. Miwa, Lynx1 shifts $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor subunit stoichiometry by affecting assembly in the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 31423–31432. doi:10.1074/jbc.M114.573667.
- [175] J.M. Miwa, T.R. Stevens, S.L. King, B.J. Caldarone, I. Ibañez-Tallon, C. Xiao, R.M. Fitzsimonds, C. Pavlides, H.A. Lester, M.R. Picciotto, N. Heintz, The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo, *Neuron.* 51 (2006) 587–600. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.025.
- [176] J.M. Miwa, A. Walz, Enhancement in motor learning through genetic manipulation of the Lynx1 gene, *PloS One.* 7 (2012) e43302. doi:10.1371/journal.pone.0043302.
- [177] A. Kobayashi, R.L. Parker, A.P. Wright, H. Brahem, P. Ku, K.M. Oliver, A. Walz, H.A. Lester, J.M. Miwa, Lynx1 supports neuronal health in the mouse dorsal striatum during aging: an ultrastructural investigation, *J. Mol. Neurosci. MN.* 53 (2014) 525–536. doi:10.1007/s12031-014-0352-1.
- [178] H. Morishita, J.M. Miwa, N. Heintz, T.K. Hensch, Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex, *Science.* 330 (2010) 1238–1240. doi:10.1126/science.1195320.
- [179] N. Bukhari, P.N. Burman, A. Hussein, M.P. Demars, M. Sadahiro, D.M. Brady, S.E. Tsirka, S.J. Russo, H. Morishita, Unmasking Proteolytic Activity for Adult Visual Cortex Plasticity by the Removal of Lynx1, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35 (2015) 12693–12702. doi:10.1523/JNEUROSCI.4315-14.2015.
- [180] M. Sajo, G. Ellis-Davies, H. Morishita, Lynx1 Limits Dendritic Spine Turnover in the Adult Visual Cortex, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36 (2016) 9472–9478. doi:10.1523/JNEUROSCI.0580-16.2016.
- [181] H.S. Sekhon, P. Song, Y. Jia, J. Lindstrom, E.R. Spindel, Expression of lynx1 in developing lung and its modulation by prenatal nicotine exposure, *Cell Tissue Res.* 320 (2005) 287–297. doi:10.1007/s00441-005-1077-9.
- [182] E. Dessaud, D. Salaün, O. Gayet, M. Chabbert, O. deLapeyrière, Identification of lynx2, a novel member of the ly-6/neurotoxin superfamily, expressed in neuronal subpopulations during mouse development, *Mol. Cell. Neurosci.* 31 (2006) 232–242. doi:10.1016/j.mcn.2005.09.010.

- [183] A.B. Tekinay, Y. Nong, J.M. Miwa, I. Lieberam, I. Ibanez-Tallon, P. Greengard, N. Heintz, A role for LYNX2 in anxiety-related behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 4477–4482. doi:10.1073/pnas.0813109106.
- [184] M. Wu, C.A. Puddifoot, P. Taylor, W.J. Joiner, Mechanisms of inhibition and potentiation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by members of the Ly6 protein family, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 24509–24518. doi:10.1074/jbc.M115.647248.
- [185] M. Darvas, M. Morsch, I. Racz, S. Ahmadi, D. Swandulla, A. Zimmer, Modulation of the Ca²⁺ conductance of nicotinic acetylcholine receptors by Lypd6, *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 19 (2009) 670–681. doi:10.1016/j.euroneuro.2009.03.007.
- [186] M. Arvaniti, M.M. Jensen, N. Soni, H. Wang, A.B. Klein, N. Thiriet, L.H. Pinborg, P.P. Muldoon, J. Wienecke, M. Imad Damaj, K.A. Kohlmeier, M.C. Gondré-Lewis, J.D. Mikkelsen, M.S. Thomsen, Functional interaction between Lypd6 and nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.* 138 (2016) 806–820. doi:10.1111/jnc.13718.
- [187] Y. Zhang, Q. Lang, J. Li, F. Xie, B. Wan, L. Yu, Identification and characterization of human LYPD6, a new member of the Ly-6 superfamily, *Mol. Biol. Rep.* 37 (2010) 2055–2062. doi:10.1007/s11033-009-9663-7.
- [188] Y. Zhao, J. Ren, W. Lu, K. Harlos, E.Y. Jones, Structure of the Wnt signaling enhancer LYPD6 and its interactions with the Wnt coreceptor LRP6, *FEBS Lett.* (2018). doi:10.1002/1873-3468.13212.
- [189] J. Ni, Q. Lang, M. Bai, C. Zhong, X. Chen, B. Wan, L. Yu, Cloning and characterization of a human LYPD7, a new member of the Ly-6 superfamily, *Mol. Biol. Rep.* 36 (2009) 697–703. doi:10.1007/s11033-008-9231-6.
- [190] V. Ochoa, A.A. George, R. Nishi, P. Whiteaker, The prototoxin LYPD6B modulates heteromeric $\alpha 3\beta 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptors, but not $\alpha 7$ homomers, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30 (2016) 1109–1119. doi:10.1096/fj.15-274548.
- [191] R.E. Reiter, Z. Gu, T. Watabe, G. Thomas, K. Szigeti, E. Davis, M. Wahl, S. Nisitani, J. Yamashiro, M.M. Le Beau, M. Loda, O.N. Witte, Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 1735–1740.
- [192] M.M. Jensen, M. Arvaniti, J.D. Mikkelsen, D. Michalski, L.H. Pinborg, W. Härtig, M.S. Thomsen, Prostate stem cell antigen interacts with nicotinic acetylcholine receptors and is affected in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging.* 36 (2015) 1629–1638. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.001.
- [193] S. Ross, S.D. Spencer, L.A. Lasky, H. Koeppen, Selective expression of murine prostate stem cell antigen in fetal and adult tissues and the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model of prostate carcinogenesis, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 809–816. doi:10.1016/S0002-9440(10)64028-X.
- [194] H. Ono, N. Hiraoka, Y.-S. Lee, S.M. Woo, W.J. Lee, I.J. Choi, A. Saito, K. Yanagihara, Y. Kanai, S. Ohnami, F. Chiwaki, H. Sasaki, H. Sakamoto, T. Yoshida, N. Saeki, Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis, *Genes. Chromosomes Cancer.* 51 (2012) 30–41. doi:10.1002/gcc.20928.
- [195] M.L. Moore, M.A. Teitell, Y. Kim, T. Watabe, R.E. Reiter, O.N. Witte, P. Dubey, Deletion of PSCA increases metastasis of TRAMP-induced prostate tumors without altering primary tumor formation, *The Prostate.* 68 (2008) 139–151. doi:10.1002/pros.20686.
- [196] Study Group of Millennium Genome Project for Cancer, H. Sakamoto, K. Yoshimura, N. Saeki, H. Katai, T. Shimoda, Y. Matsuno, D. Saito, H. Sugimura, F. Tanioka, S. Kato, N. Matsukura, N. Matsuda, T. Nakamura, I. Hyodo, T. Nishina, W. Yasui, H. Hirose, M. Hayashi, E. Toshiro, S. Ohnami, A. Sekine, Y. Sato, H. Totsuka, M. Ando, R. Takemura, Y. Takahashi, M. Ohdaira, K. Aoki, I. Honmyo, S. Chiku, K. Aoyagi, H. Sasaki, S. Ohnami, K. Yanagihara, K.-A. Yoon, M.-C. Kook, Y.-S. Lee, S.R. Park, C.G. Kim, I.J. Choi, T. Yoshida, Y. Nakamura, S. Hirohashi, Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer, *Nat. Genet.* 40 (2008) 730–740. doi:10.1038/ng.152.

- [197] P. Lochhead, B. Frank, G.L. Hold, C.S. Rabkin, M.T.H. Ng, T.L. Vaughan, H.A. Risch, M.D. Gammon, J. Lissowska, M.N. Weck, E. Raum, H. Müller, T. Illig, N. Klopp, A. Dawson, K.E. McColl, H. Brenner, W.-H. Chow, E.M. El-Omar, Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene and upper gastrointestinal cancer in white individuals, *Gastroenterology*. 140 (2011) 435–441. doi:10.1053/j.gastro.2010.11.001.
- [198] E. Marra, P. Uva, V. Viti, V. Simonelli, E. Dogliotti, E. De Rinaldis, A. Lahm, N. La Monica, A. Nicosia, G. Ciliberto, F. Palombo, Growth delay of human bladder cancer cells by Prostate Stem Cell Antigen downregulation is associated with activation of immune signaling pathways, *BMC Cancer*. 10 (2010) 129. doi:10.1186/1471-2407-10-129.
- [199] J. Arredondo, A.I. Chernyavsky, S.A. Grando, SLURP-1 and -2 in normal, immortalized and malignant oral keratinocytes, *Life Sci*. 80 (2007) 2243–2247. doi:10.1016/j.lfs.2007.01.003.
- [200] J. Arredondo, A.I. Chernyavsky, R.J. Webber, S.A. Grando, Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol*. 125 (2005) 1236–1241. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23973.x.
- [201] J. Arredondo, A.I. Chernyavsky, D.L. Jolkovsky, R.J. Webber, S.A. Grando, SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium, *J. Cell. Physiol*. 208 (2006) 238–245. doi:10.1002/jcp.20661.
- [202] A.I. Chernyavsky, M. Kalantari-Dehaghi, C. Phillips, S. Marchenko, S.A. Grando, Novel cholinergic peptides SLURP-1 and -2 regulate epithelialization of cutaneous and oral wounds, *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc*. 20 (2012) 103–113. doi:10.1111/j.1524-475X.2011.00753.x.
- [203] C. Perez, A. Khachemoune, Mal de Meleda: A Focused Review, *Am. J. Clin. Dermatol*. 17 (2016) 63–70. doi:10.1007/s40257-015-0157-1.
- [204] H. Tsuji, K. Okamoto, Y. Matsuzaka, H. Iizuka, G. Tamiya, H. Inoko, SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris, *Genomics*. 81 (2003) 26–33.
- [205] C.M. Allan, S. Procaccia, D. Tran, Y. Tu, R.H. Barnes, M. Larsson, B.B. Allan, L.C. Young, C. Hong, P. Tontonoz, L.G. Fong, S.G. Young, A.P. Beigneux, Palmoplantar Keratoderma in Slurp2-Deficient Mice, *J. Invest. Dermatol*. 136 (2016) 436–443. doi:10.1016/j.jid.2015.11.003.
- [206] C. Bergqvist, H. Kadara, L. Hamie, G. Nemer, R. Safi, M. Karouni, N. Marrouche, O. Abbas, D.J. Hasbani, A.G. Kibbi, D. Nassar, Y. Shimomura, M. Kurban, SLURP-1 is mutated in Mal de Meleda, a potential molecular signature for melanoma and a putative squamous lineage tumor suppressor gene, *Int. J. Dermatol*. 57 (2018) 162–170. doi:10.1111/ijd.13850.
- [207] A. Pettersson, G. Nylund, A. Khorram-Manesh, S. Nordgren, D.S. Delbro, Nicotine induced modulation of SLURP-1 expression in human colon cancer cells, *Auton. Neurosci. Basic Clin*. 148 (2009) 97–100. doi:10.1016/j.autneu.2009.03.002.
- [208] P. Russo, A. Cardinale, S. Margaritora, A. Cesario, Nicotinic receptor and tobacco-related cancer, *Life Sci*. 91 (2012) 1087–1092. doi:10.1016/j.lfs.2012.05.003.
- [209] M. Kalantari-Dehaghi, E.A. Parnell, T. Armand, H.-U. Bernard, S.A. Grando, The nicotinic acetylcholine receptor-mediated reciprocal effects of the tobacco nitrosamine NNK and SLURP-1 on human mammary epithelial cells, *Int. Immunopharmacol*. 29 (2015) 99–104. doi:10.1016/j.intimp.2015.04.041.
- [210] M. Kalantari-Dehaghi, H.-U. Bernard, S.A. Grando, Reciprocal effects of NNK and SLURP-1 on oncogene expression in target epithelial cells, *Life Sci*. 91 (2012) 1122–1125. doi:10.1016/j.lfs.2012.02.004.
- [211] V.M. Throm, D. Männle, T. Giese, A.S. Bauer, M.M. Gaida, J. Kopitz, T. Bruckner, K. Plaschke, S.P. Grekova, K. Felix, T. Hackert, N.A. Giese, O. Strobel, Endogenous CHRNA7-ligand SLURP1 as a potential tumor suppressor and anti-nicotinic factor in pancreatic cancer, *Oncotarget*. 9 (2018). doi:10.18632/oncotarget.24312.
- [212] A.I. Chernyavsky, J. Arredondo, V. Galitovskiy, J. Qian, S.A. Grando, Upregulation of nuclear factor- κ B expression by SLURP-1 is mediated by γ 7-nicotinic acetylcholine receptor and

- involves both ionic events and activation of protein kinases, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 299 (2010) C903–C911. doi:10.1152/ajpcell.00216.2010.
- [213] C.P. da Silva, A.H. Guse, Intracellular Ca(2+) release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type?, *Biochim. Biophys. Acta.* 1498 (2000) 122–133.
- [214] E.D. del Toro, J.M. Juiz, X. Peng, J. Lindstrom, M. Criado, Immunocytochemical localization of the $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 349 (1994) 325–342. doi:10.1002/cne.903490302.
- [215] R.C. Hogg, F. Bandelier, A. Benoit, R. Dosch, D. Bertrand, An automated system for intracellular and intranuclear injection, *J. Neurosci. Methods.* 169 (2008) 65–75. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.028.
- [216] D.I. Osmakov, S.G. Koshelev, Y.A. Andreev, M.A. Dubinnyi, V.S. Kublitski, R.G. Efremov, A.I. Sobolevsky, S.A. Kozlov, Proton-independent activation of acid-sensing ion channel 3 by an alkaloid, lindoldhamine, from *Laurus nobilis*: Proton-independent activation of ASIC3, *Br. J. Pharmacol.* 175 (2018) 924–937. doi:10.1111/bph.14134.
- [217] I. Bonner, Antagonist Binding Properties of Five Cloned Muscarinic Receptors Expressed in CHO-Ki Cells, (n.d.) 8.
- [218] W. Schiebler, L. Lauffer, F. Hucho, Acetylcholine receptor enriched membranes: acetylcholine binding and excitability after reduction in vitro, *FEBS Lett.* 81 (1977) 39–42.
- [219] M. Suntsova, E.V. Gogvadze, S. Salozhin, N. Gaifullin, F. Eroshkin, S.E. Dmitriev, N. Martynova, K. Kulikov, G. Malakhova, G. Tukhatova, A.P. Bolshakov, D. Ghilarov, A. Garazha, A. Aliper, C.R. Cantor, Y. Solokhin, S. Roumiantsev, P. Balaban, A. Zhavoronkov, A. Buzdin, Human-specific endogenous retroviral insert serves as an enhancer for the schizophrenia-linked gene *PRODH*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 19472–19477. doi:10.1073/pnas.1318172110.
- [220] A.V. Efremenko, A.A. Ignatova, A.A. Borsheva, M.A. Grin, V.I. Bregadze, I.B. Sivaev, A.F. Mironov, A.V. Feofanov, Cobalt bis(dicarbollide) versus closo-dodecaborate in boronated chlorin e6 conjugates: implications for photodynamic and boron-neutron capture therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 645. doi:10.1039/c2pp05237g.
- [221] G.S. Rule, T.K. Hitchens, *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*, Springer Netherlands, 2006. //www.springer.com/gp/book/9781402034992 (accessed January 20, 2019).
- [222] Y. Shen, A. Bax, Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks, *J. Biomol. NMR.* 56 (2013) 227–241. doi:10.1007/s10858-013-9741-y.
- [223] P. Guntert, Automated NMR structure calculation with CYANA, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 278 (2004) 353–378. doi:10.1385/1-59259-809-9:353.
- [224] M.A. Martí-Renom, A.C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo, *Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes*, (2000) 37.
- [225] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX.* 1–2 (2015) 19–25. doi:10.1016/j.softx.2015.06.001.
- [226] R. Chen, L. Li, Z. Weng, ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm, *Proteins.* 52 (2003) 80–87. doi:10.1002/prot.10389.
- [227] T.V. Pyrkov, A.O. Chugunov, N.A. Krylov, D.E. Nolde, R.G. Efremov, PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes, *Bioinformatics.* 25 (2009) 1201–1202. doi:10.1093/bioinformatics/btp111.
- [228] N.N. Khechinashvili, V.I. Tsetlin, [Calorimetric study of heat denaturation of toxins], *Mol. Biol. (Mosk.).* 18 (1984) 786–791.
- [229] N. Takahashi, T.E. Creighton, On the reactivity and ionization of the active site cysteine residues of *Escherichia coli* thioredoxin, *Biochemistry.* 35 (1996) 8342–8353. doi:10.1021/bi960465v.

- [230] P. Drevet, C. Lemaire, S. Gasparini, S. Zinn-Justin, E. Lajeunesse, F. Ducancel, S. Pinkasfeld, M. Courçon, O. Tremeau, J.C. Boulain, A. Ménez, High-level production and isotope labeling of snake neurotoxins, disulfide-rich proteins, *Protein Expr. Purif.* 10 (1997) 293–300. doi:10.1006/prev.1997.0740.
- [231] S. Antil, D. Servent, A. Ménez, Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of alpha-cobratoxin, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 34851–34858.
- [232] M.M. Levandoski, P.M. Caffery, R.S. Rogowski, Y. Lin, Q.L. Shi, E. Hawrot, Recombinant expression of alpha-bungarotoxin in *Pichia pastoris* facilitates identification of mutant toxins engineered to recognize neuronal nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.* 74 (2000) 1279–1289.
- [233] Y. Wang, L. Jing, K. Xu, A unique approach for high level expression and production of a recombinant cobra neurotoxin in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 94 (2002) 235–244.
- [234] A.P. Golovanov, G.M. Hautbergue, S.A. Wilson, L.-Y. Lian, A simple method for improving protein solubility and long-term stability, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 8933–8939. doi:10.1021/ja049297h.
- [235] M. Ruoppolo, M. Moutiez, M.F. Mazzeo, P. Pucci, A. Ménez, G. Marino, E. Quéménéur, The length of a single turn controls the overall folding rate of “three-fingered” snake toxins, *Biochemistry.* 37 (1998) 16060–16068. doi:10.1021/bi981492j.
- [236] T. Sivaraman, T.K. Kumar, D.K. Chang, W.Y. Lin, C. Yu, Events in the kinetic folding pathway of a small, all beta-sheet protein, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10181–10189.
- [237] M.W. MacArthur, J.M. Thornton, Influence of proline residues on protein conformation, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 397–412. doi:10.1016/0022-2836(91)90721-H.
- [238] G.D. Rose, A.R. Geselowitz, G.J. Lesser, R.H. Lee, M.H. Zehfus, Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins, *Science.* 229 (1985) 834–838.
- [239] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105–132.
- [240] A. Ikai, Thermostability and aliphatic index of globular proteins, *J. Biochem. (Tokyo).* 88 (1980) 1895–1898.
- [241] C.I. Schroeder, L.D. Rash, X. Vila-Farrés, K.J. Rosengren, M. Mobli, G.F. King, P.F. Alewood, D.J. Craik, T. Durek, Chemical Synthesis, 3D Structure, and ASIC Binding Site of the Toxin Mambalgin-2, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* (2013). doi:10.1002/anie.201308898.
- [242] D. Frishman, P. Argos, Knowledge-based protein secondary structure assignment, *Proteins.* 23 (1995) 566–579.
- [243] R. Koradi, M. Billeter, K. Wuthrich, MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J.Mol.Graph.* 14 (1996) 51–55.
- [244] J.E. Baenziger, S.E. Ryan, M.M. Goodreid, N.Q. Vuong, R.M. Sturgeon, C.J.B. daCosta, Lipid composition alters drug action at the nicotinic acetylcholine receptor, *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 880–890. doi:10.1124/mol.107.039008.
- [245] C.J.B. daCosta, I.D. Wagg, M.E. McKay, J.E. Baenziger, Phosphatidic acid and phosphatidylserine have distinct structural and functional interactions with the nicotinic acetylcholine receptor, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14967–14974. doi:10.1074/jbc.M310037200.
- [246] C. Sunshine, M.G. McNamee, Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of neutral and negatively charged lipids, *Biochim. Biophys. Acta.* 1108 (1992) 240–246.
- [247] M.R.R. de Planque, D.T.S. Rijkers, J.I. Fletcher, R.M.J. Liskamp, F. Separovic, The alphaM1 segment of the nicotinic acetylcholine receptor exhibits conformational flexibility in a membrane environment, *Biochim. Biophys. Acta.* 1665 (2004) 40–47. doi:10.1016/j.bbamem.2004.06.021.
- [248] M.R.R. De Planque, D.T.S. Rijkers, R.M.J. Liskamp, F. Separovic, The alphaM1 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor interacts strongly with model membranes, *Magn. Reson. Chem. MRC.* 42 (2004) 148–154. doi:10.1002/mrc.1326.

- [249] F.J. Barrantes, Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 47 (2004) 71–95. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.06.008.
- [250] P. Sáez-Briones, M. Krauss, M. Dreger, A. Herrmann, V.I. Tsetlin, F. Hucho, How do acetylcholine receptor ligands reach their binding sites?, *Eur. J. Biochem.* 265 (1999) 902–910.
- [251] H.S. Young, L.G. Herbette, V. Skita, Alpha-bungarotoxin binding to acetylcholine receptor membranes studied by low angle X-ray diffraction, *Biophys. J.* 85 (2003) 943–953. doi:10.1016/S0006-3495(03)74533-0.
- [252] P.V. Dubovskii, D.M. Lesovoy, M.A. Dubinnyi, A.G. Konshina, Y.N. Utkin, R.G. Efremov, A.S. Arseniev, Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins, *Biochem. J.* 387 (2005) 807–815. doi:10.1042/BJ20041814.
- [253] M.A. Dubinnyi, D.M. Lesovoy, P.V. Dubovskii, V.V. Chupin, A.S. Arseniev, Modeling of ³¹P-NMR spectra of magnetically oriented phospholipid liposomes: A new analytical solution, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 29 (2006) 305–311. doi:10.1016/j.ssnmr.2005.10.009.
- [254] W. Schiebler, F. Hucho, Membranes rich in acetylcholine receptor: characterization and reconstitution to excitable membranes from exogenous lipids, *Eur. J. Biochem.* 85 (1978) 55–63.
- [255] J. Santiago, G.R. Guzmán, L.V. Rojas, R. Martí, G.A. Asmar-Rovira, L.F. Santana, M. McNamee, J.A. Lasalde-Dominicci, Probing the effects of membrane cholesterol in the Torpedo californica acetylcholine receptor and the novel lipid-exposed mutation alpha C418W in *Xenopus* oocytes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 46523–46532. doi:10.1074/jbc.M104563200.
- [256] F. Teixeira-Clerc, A. Ménez, P. Kessler, How do short neurotoxins bind to a muscular-type nicotinic acetylcholine receptor?, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25741–25747. doi:10.1074/jbc.M200534200.
- [257] R. Schwyzer, 100 years lock-and-key concept: are peptide keys shaped and guided to their receptors by the target cell membrane?, *Biopolymers.* 37 (1995) 5–16. doi:10.1002/bip.360370104.
- [258] S. Antil-Delbeke, C. Gaillard, T. Tamiya, P.-J. Corringer, J.-P. Changeux, D. Servent, A. Ménez, Molecular Determinants by Which a Long Chain Toxin from Snake Venom Interacts with the Neuronal $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29594–29601. doi:10.1074/jbc.M909746199.
- [259] D. Servent, S. Antil-Delbeke, C. Gaillard, P.-J. Corringer, J.P. Changeux, A. Ménez, Molecular characterization of the specificity of interactions of various neurotoxins on two distinct nicotinic acetylcholine receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 393 (2000) 197–204. doi:10.1016/S0014-2999(00)00095-9.
- [260] G.A. Grant, C.W. Luetje, R. Summers, X.L. Xu, Differential roles for disulfide bonds in the structural integrity and biological activity of kappa-Bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist, *Biochemistry.* 37 (1998) 12166–12171. doi:10.1021/bi981227y.
- [261] D. Servent, G. Mourier, S. Antil, A. Ménez, How do snake curaremimetic toxins discriminate between nicotinic acetylcholine receptor subtypes, *Toxicol. Lett.* 102–103 (1998) 199–203.
- [262] G. Mourier, D. Servent, S. Zinn-Justin, A. Ménez, Chemical engineering of a three-fingered toxin with anti- $\alpha 7$ neuronal acetylcholine receptor activity, *Protein Eng. Des. Sel.* 13 (2000) 217–225. doi:10.1093/protein/13.3.217.
- [263] G.A. Grant, R. Al-Rabee, X.L. Xu, Y. Zhang, Critical interactions at the dimer interface of kappa-bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist, *Biochemistry.* 36 (1997) 3353–3358. doi:10.1021/bi9629687.
- [264] Y.N. Utkin, V.V. Kukhtina, E.V. Kryukova, F. Chiodini, D. Bertrand, C. Methfessel, V.I. Tsetlin, “Weak toxin” from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of alpha 7 and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15810–15815. doi:10.1074/jbc.M100788200.

- [265] T.L. Oustitch, L.E. Peters, Y.N. Utkin, V.I. Tsetlin, Direct cloning of a target gene from a pool of homologous sequences: complete cDNA sequence of a weak neurotoxin from cobra *Naja kaouthia*, *IUBMB Life*. 55 (2003) 43–47. doi:10.1080/1521654021000061664.
- [266] A.V. Eletsky, I.V. Maslennikov, V.V. Kukhtina, Y.N. Utkin, V.I. Tsetlin, A.S. Arseniev, Structure and Conformational Heterogeneity of a Weak Toxin from the Cobra *Naja kaouthia* Venom, *Russ. J. Bioorganic Chem.* 27 (2001) 72–83.
- [267] Y.N. Utkin, V.V. Kukhtina, I.V. Maslennikov, A.V. Eletsky, V.G. Starkov, C. Weise, P. Franke, F. Hucho, V.I. Tsetlin, First tryptophan-containing weak neurotoxin from cobra venom, *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology*. 39 (2001) 921–927.
- [268] J. Jakubík, E.E. El-Fakahany, Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors, *Pharmaceuticals*. 3 (2010) 2838–2860. doi:10.3390/ph3092838.
- [269] S. Lazareno, P. Gharagozloo, D. Kuonen, A. Popham, N.J. Birdsall, Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies, *Mol. Pharmacol.* 53 (1998) 573–589.
- [270] T.V. Pyrkov, Y.A. Kosinsky, A.S. Arseniev, J.P. Priestle, E. Jacoby, R.G. Efremov, Complementarity of hydrophobic properties in ATP-protein binding: a new criterion to rank docking solutions, *Proteins*. 66 (2007) 388–398. doi:10.1002/prot.21122.
- [271] R.G. Efremov, A.O. Chugunov, T.V. Pyrkov, J.P. Priestle, A.S. Arseniev, E. Jacoby, Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 393–415.
- [272] R.O. Dror, H.F. Green, C. Valant, D.W. Borhani, J.R. Valcourt, A.C. Pan, D.H. Arlow, M. Canals, J.R. Lane, R. Rahmani, J.B. Baell, P.M. Sexton, A. Christopoulos, D.E. Shaw, Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs, *Nature*. (2013). doi:10.1038/nature12595.
- [273] J. Hu, K. Hu, T. Liu, M.K. Stern, R. Mistry, R.A.J. Challiss, S. Costanzi, J. Wess, Novel structural and functional insights into M3 muscarinic receptor dimer/oligomer formation, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 34777–34790. doi:10.1074/jbc.M113.503714.
- [274] D.S. Redka, T. Morizumi, G. Elmslie, P. Paranthaman, R.V. Shivnaraine, J. Ellis, O.P. Ernst, J.W. Wells, Coupling of G Proteins to Reconstituted Monomers and Tetramers of the M2 Muscarinic Receptor, *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M114.559294.
- [275] A.C. Kruse, A.M. Ring, A. Manglik, J. Hu, K. Hu, K. Eitel, H. Hübner, E. Pardon, C. Valant, P.M. Sexton, A. Christopoulos, C.C. Felder, P. Gmeiner, J. Steyaert, W.I. Weis, K.C. Garcia, J. Wess, B.K. Kobilka, Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor, *Nature*. 504 (2013) 101–106. doi:10.1038/nature12735.
- [276] D.Y. Mordvitsev, Y.L. Polyak, D.A. Kuzmin, O.V. Levtsova, Y.V. Tourleigh, Y.N. Utkin, K.V. Shaitan, V.I. Tsetlin, Computer modeling of binding of diverse weak toxins to nicotinic acetylcholine receptors, *Comput. Biol. Chem.* 31 (2007) 72–81. doi:10.1016/j.compbiolchem.2007.02.011.
- [277] S.B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor, Y. Bourne, Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations, *EMBO J.* 24 (2005) 3635–3646. doi:10.1038/sj.emboj.7600828.
- [278] H. Park, H. Lee, C. Seok, High-resolution protein-protein docking by global optimization: recent advances and future challenges, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 35 (2015) 24–31. doi:10.1016/j.sbi.2015.08.001.
- [279] E.N. Lyukmanova, Z.O. Shenkarev, A.S. Paramonov, A.G. Sobol, T.V. Ovchinnikova, V.V. Chupin, M.P. Kirpichnikov, M.J. Blommers, A.S. Arseniev, Lipid-protein nanoscale bilayers: a versatile medium for NMR investigations of membrane proteins and membrane-active peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 2140–2141.
- [280] L. Pillet, O. Trémeau, F. Ducancel, P. Drevet, S. Zinn-Justin, S. Pinkasfeld, J.C. Boulain, A. Ménez, Genetic engineering of snake toxins. Role of invariant residues in the structural and functional properties of a curaremimetic toxin, as probed by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 909–916.

- [281] P.H.N. Celie, I.E. Kasheverov, D.Y. Mordvintsev, R.C. Hogg, P. van Nierop, R. van Elk, S.E. van Rossum-Fikkert, M.N. Zhmak, D. Bertrand, V. Tsetlin, T.K. Sixma, A.B. Smit, Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (2005) 582–588. doi:10.1038/nsmb951.
- [282] P. Rucktooa, A.B. Smit, T.K. Sixma, Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 777–787. doi:10.1016/j.bcp.2009.06.098.
- [283] S. Dutertre, C. Ulens, R. Büttner, A. Fish, R. van Elk, Y. Kendel, G. Hopping, P.F. Alewood, C. Schroeder, A. Nicke, A.B. Smit, T.K. Sixma, R.J. Lewis, AChBP-targeted alpha-conotoxin correlates distinct binding orientations with nAChR subtype selectivity, *EMBO J.* 26 (2007) 3858–3867. doi:10.1038/sj.emboj.7601785.
- [284] M. Ellison, J.M. McIntosh, B.M. Olivera, Alpha-conotoxins ImI and ImII. Similar alpha 7 nicotinic receptor antagonists act at different sites, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 757–764. doi:10.1074/jbc.M204565200.
- [285] I.E. Kasheverov, M.N. Zhmak, A. Fish, P. Rucktooa, A.Y. Khruschov, A.V. Osipov, R.H. Ziganshin, D. D'hoedt, D. Bertrand, T.K. Sixma, A.B. Smit, V.I. Tsetlin, Interaction of alpha-conotoxin ImII and its analogs with nicotinic receptors and acetylcholine-binding proteins: additional binding sites on Torpedo receptor, *J. Neurochem.* 111 (2009) 934–944. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06359.x.
- [286] P.H.N. Celie, S.E. van Rossum-Fikkert, W.J. van Dijk, K. Brejc, A.B. Smit, T.K. Sixma, Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures, *Neuron.* 41 (2004) 907–914.
- [287] T. Grutter, L. Prado de Carvalho, D. Virginie, A. Taly, M. Fischer, J.-P. Changeux, A chimera encoding the fusion of an acetylcholine-binding protein to an ion channel is stabilized in a state close to the desensitized form of ligand-gated ion channels, *C. R. Biol.* 328 (2005) 223–234.
- [288] S. Luo, J.M. Kulak, G.E. Cartier, R.B. Jacobsen, D. Yoshikami, B.M. Olivera, J.M. McIntosh, alpha-conotoxin AuIB selectively blocks alpha3 beta4 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18 (1998) 8571–8579.
- [289] G.E. Cartier, D. Yoshikami, W.R. Gray, S. Luo, B.M. Olivera, J.M. McIntosh, A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7522–7528.
- [290] C. Dowell, B.M. Olivera, J.E. Garrett, S.T. Staheli, M. Watkins, A. Kuryatov, D. Yoshikami, J.M. Lindstrom, J.M. McIntosh, Alpha-conotoxin PIA is selective for alpha6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (2003) 8445–8452.
- [291] H. Nakayama, K. Shimoke, M. Isosaki, H. Satoh, M. Yoshizumi, T. Ikeuchi, Subtypes of neuronal nicotinic acetylcholine receptors involved in nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in PC12h cells, *Neurosci. Lett.* 392 (2006) 101–104. doi:10.1016/j.neulet.2005.09.003.
- [292] J.P. Adams, J.D. Sweatt, Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 135–163. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.082701.145401.
- [293] C. Gotti, M. Zoli, F. Clementi, Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 482–491. doi:10.1016/j.tips.2006.07.004.
- [294] H.W. Querfurth, F.M. LaFerla, Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 329–344. doi:10.1056/NEJMra0909142.
- [295] L.F. Lue, Y.M. Kuo, A.E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J.H. Kurth, R.E. Rydel, J. Rogers, Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 853–862.
- [296] D.M. Walsh, D.J. Selkoe, A beta oligomers - a decade of discovery, *J. Neurochem.* 101 (2007) 1172–1184. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x.

- [297] S.D. Buckingham, A.K. Jones, L.A. Brown, D.B. Sattelle, Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection, *Pharmacol. Rev.* 61 (2009) 39–61. doi:10.1124/pr.108.000562.
- [298] R.H. Parri, T.K. Dineley, Nicotinic acetylcholine receptor interaction with beta-amyloid: molecular, cellular, and physiological consequences, *Curr. Alzheimer Res.* 7 (2010) 27–39.
- [299] T. Kihara, S. Shimohama, H. Sawada, J. Kimura, T. Kume, H. Kochiyama, T. Maeda, A. Akaike, Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 159–163. doi:10.1002/ana.410420205.
- [300] T. Kihara, S. Shimohama, H. Sawada, K. Honda, T. Nakamizo, H. Shibasaki, T. Kume, A. Akaike, alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13541–13546. doi:10.1074/jbc.M008035200.
- [301] Y. Takada-Takatori, T. Kume, M. Sugimoto, H. Katsuki, H. Sugimoto, A. Akaike, Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade, *Neuropharmacology.* 51 (2006) 474–486. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.04.007.
- [302] H.-Y. Wang, K. Bakshi, C. Shen, M. Frankfurt, C. Trocmé-Thibierge, P. Morain, S 24795 limits beta-amyloid-alpha7 nicotinic receptor interaction and reduces Alzheimer's disease-like pathologies, *Biol. Psychiatry.* 67 (2010) 522–530. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.031.
- [303] G. Dziejczapolski, C.M. Glogowski, E. Masliah, S.F. Heinemann, Deletion of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29 (2009) 8805–8815. doi:10.1523/JNEUROSCI.6159-08.2009.
- [304] C.M. Hernandez, R. Kaye, H. Zheng, J.D. Sweatt, K.T. Dineley, Loss of alpha7 nicotinic receptors enhances beta-amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30 (2010) 2442–2453. doi:10.1523/JNEUROSCI.5038-09.2010.
- [305] D.S. Auld, T.J. Kornecook, S. Bastianetto, R. Quirion, Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies, *Prog. Neurobiol.* 68 (2002) 209–245.
- [306] A. Marutle, P.-G. Gillberg, A. Bergfors, W. Yu, R. Ni, I. Nennesmo, L. Voytenko, A. Nordberg, ³H-deprenyl and ³H-PIB autoradiography show different laminar distributions of astroglia and fibrillar β -amyloid in Alzheimer brain, *J. Neuroinflammation.* 10 (2013) 90. doi:10.1186/1742-2094-10-90.
- [307] H. Okada, Y. Ouchi, M. Ogawa, M. Futatsubashi, Y. Saito, E. Yoshikawa, T. Terada, Y. Oboshi, H. Tsukada, T. Ueki, M. Watanabe, T. Yamashita, Y. Magata, Alterations in α 4 β 2 nicotinic receptors in cognitive decline in Alzheimer's aetiopathology, *Brain J. Neurol.* 136 (2013) 3004–3017. doi:10.1093/brain/awt195.
- [308] J.J. Dougherty, J. Wu, R.A. Nichols, Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23 (2003) 6740–6747.
- [309] P.W. Lamb, M.A. Melton, J.L. Yakel, Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes by beta-amyloid1-42 peptide, *J. Mol. Neurosci.* MN. 27 (2005) 13–21. doi:10.1385/JMN:27:1:013.
- [310] D.L. Pettit, Z. Shao, J.L. Yakel, beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21 (2001) RC120.
- [311] J. Wu, Y.-P. Kuo, A.A. George, L. Xu, J. Hu, R.J. Lukas, beta-Amyloid directly inhibits human alpha4beta2-nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in human SH-EP1 cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 37842–37851. doi:10.1074/jbc.M400335200.

- [312] H.Y. Wang, D.H. Lee, C.B. Davis, R.P. Shank, Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.* 75 (2000) 1155–1161.
- [313] S. Oddo, A. Caccamo, J.D. Shepherd, M.P. Murphy, T.E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M.P. Mattson, Y. Akbari, F.M. LaFerla, Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction, *Neuron.* 39 (2003) 409–421.
- [314] P. Yenki, F. Khodagholi, F. Shaerzadeh, Inhibition of phosphorylation of JNK suppresses A β -induced ER stress and upregulates prosurvival mitochondrial proteins in rat hippocampus, *J. Mol. Neurosci. MN.* 49 (2013) 262–269. doi:10.1007/s12031-012-9837-y.
- [315] D.M. Walsh, I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, D.J. Selkoe, Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, *Nature.* 416 (2002) 535–539. doi:10.1038/416535a.
- [316] Q. Wang, D.M. Walsh, M.J. Rowan, D.J. Selkoe, R. Anwyl, Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24 (2004) 3370–3378. doi:10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004.
- [317] S.L. Rushforth, C. Allison, S. Wonnacott, M. Shoaib, Subtype-selective nicotinic agonists enhance olfactory working memory in normal rats: A novel use of the odour span task, *Neurosci. Lett.* 471 (2010) 114–118. doi:10.1016/j.neulet.2010.01.022.
- [318] E. Christophe, A. Roebuck, J.F. Staiger, D.J. Lavery, S. Charpak, E. Audinat, Two Types of Nicotinic Receptors Mediate an Excitation of Neocortical Layer I Interneurons, *J. Neurophysiol.* 88 (2002) 1318–1327. doi:10.1152/jn.2002.88.3.1318.
- [319] M.-E. Lafaille-Magnan, J. Poirier, P. Etienne, J. Tremblay-Mercier, J. Frenette, P. Rosa-Neto, J.C.S. Breitner, PREVENT-AD Research Group, Odor identification as a biomarker of preclinical AD in older adults at risk, *Neurology.* 89 (2017) 327–335. doi:10.1212/WNL.0000000000004159.
- [320] P. Schulz, E. Cook, D. Johnston, Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation, *J. Neurosci.* 14 (1994) 5325–5337. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-09-05325.1994.
- [321] M. Buttini, E. Masliah, R. Barbour, H. Grajeda, R. Motter, K. Johnson-Wood, K. Khan, P. Seubert, S. Freedman, D. Schenk, D. Games, Beta-amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25 (2005) 9096–9101. doi:10.1523/JNEUROSCI.1697-05.2005.
- [322] L. Mucke, E. Masliah, G.Q. Yu, M. Mallory, E.M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, L. McConlogue, High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20 (2000) 4050–4058.
- [323] M. Hu, Nicotinic Regulation of CREB Activation in Hippocampal Neurons by Glutamatergic and Nonglutamatergic Pathways, *Mol. Cell. Neurosci.* 21 (2002) 616–625. doi:10.1006/mcne.2002.1202.
- [324] A. Barco, J.M. Alarcon, E.R. Kandel, Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture, *Cell.* 108 (2002) 689–703.
- [325] A. Taly, P.-J. Corringer, D. Guedin, P. Lestage, J.-P. Changeux, Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 733–750. doi:10.1038/nrd2927.
- [326] P.J. Welsby, M.J. Rowan, R. Anwyl, Intracellular mechanisms underlying the nicotinic enhancement of LTP in the rat dentate gyrus, *Eur. J. Neurosci.* 29 (2009) 65–75. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06562.x.
- [327] M.C. Richter, S. Ludewig, A. Winschel, T. Abel, C. Bold, L.R. Salzburger, S. Klein, K. Han, S.W. Weyer, A. Fritz, B. Laube, D.P. Wolfer, C.J. Buchholz, M. Korte, U.C. Müller,

- Distinct *in vivo* roles of secreted APP ectodomain variants APPs α and APPs β in regulation of spine density, synaptic plasticity, and cognition, *EMBO J.* 37 (2018) e98335. doi:10.15252/embj.201798335.
- [328] K. Adermann, F. Wattler, S. Wattler, G. Heine, M. Meyer, W.G. Forssmann, M. Nehls, Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8 (1999) 810–819. doi:10.1110/ps.8.4.810.
- [329] F. Chimienti, Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 3017–3024. doi:10.1093/hmg/ddg320.
- [330] C.A. Belmokhtar, J. Hillion, E. Ségal-Bendirdjian, Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Oncogene.* 20 (2001) 3354–3362. doi:10.1038/sj.onc.1204436.
- [331] S.A. Grando, Biological Functions of Keratinocyte Cholinergic Receptors, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2 (1997) 41–48. doi:10.1038/jidsymp.1997.10.
- [332] A.I. Chernyavsky, I.B. Shchepotin, S.A. Grando, Mechanisms of growth-promoting and tumor-protecting effects of epithelial nicotinic acetylcholine receptors, *Int. Immunopharmacol.* (2015). doi:10.1016/j.intimp.2015.05.033.
- [333] N. Kabbani, J.C. Nordman, B.A. Corgiat, D.P. Veltri, A. Shehu, V.A. Seymour, D.J. Adams, Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins?, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35 (2013) 1025–1034. doi:10.1002/bies.201300082.
- [334] L.M. Iakoucheva, C.J. Brown, J.D. Lawson, Z. Obradović, A.K. Dunker, Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins, *J. Mol. Biol.* 323 (2002) 573–584.
- [335] T.L. Wallace, P.M. Callahan, A. Tehim, D. Bertrand, G. Tombaugh, S. Wang, W. Xie, W.B. Rowe, V. Ong, E. Graham, A.V. Terry, J.S. Rodefer, B. Herbert, M. Murray, R. Porter, L. Santarelli, D.A. Lowe, RG3487, a Novel Nicotinic $\alpha 7$ Receptor Partial Agonist, Improves Cognition and Sensorimotor Gating in Rodents, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336 (2011) 242–253. doi:10.1124/jpet.110.171892.
- [336] J. Prickaerts, N.P. van Goethem, R. Chesworth, G. Shapiro, F.G. Boess, C. Methfessel, O.A.H. Reneerkens, D.G. Flood, D. Hilt, M. Gawryl, S. Bertrand, D. Bertrand, G. König, EVP-6124, a novel and selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, *Neuropharmacology.* 62 (2012) 1099–1110. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.10.024.
- [337] Y. Moriwaki, K. Takada, S. Tsuji, K. Kawashima, H. Misawa, Transcriptional regulation of SLURP2, a psoriasis-associated gene, is under control of IL-22 in the skin: A special reference to the nested gene LYNX1, *Int. Immunopharmacol.* 29 (2015) 71–75. doi:10.1016/j.intimp.2015.05.030.
- [338] I. Wessler, C.J. Kirkpatrick, Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans: Non-neuronal cholinergic system in humans, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2009) 1558–1571. doi:10.1038/bjp.2008.185.
- [339] R.D. Egleton, K.C. Brown, P. Dasgupta, Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 151–158. doi:10.1016/j.tips.2007.12.006.
- [340] A. Grozio, L. Paleari, A. Catassi, D. Servent, M. Cilli, F. Piccardi, M. Paganuzzi, A. Cesario, P. Granone, G. Mourier, P. Russo, Natural agents targeting the alpha7-nicotinic-receptor in NSCLC: a promising prospective in anti-cancer drug development, *Int. J. Cancer.* 122 (2008) 1911–1915. doi:10.1002/ijc.23298.
- [341] C. Zhang, X.-P. Ding, Q.-N. Zhao, X.-J. Yang, S.-M. An, H. Wang, L. Xu, L. Zhu, H.-Z. Chen, Role of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in nicotine-induced invasion and epithelial-to-mesenchymal transition in human non-small cell lung cancer cells, *Oncotarget.* 7 (2016) 59199–59208. doi:10.18632/oncotarget.10498.

- [342] S. Couturier, D. Bertrand, J.M. Matter, M.C. Hernandez, S. Bertrand, N. Millar, S. Valera, T. Barkas, M. Ballivet, A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX, *Neuron*. 5 (1990) 847–856.
- [343] N.G. Anderson, T. Ahmad, K. Chan, R. Dobson, N.J. Bundred, ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression, *Int. J. Cancer*. 94 (2001) 774–782.
- [344] M. Verbitsky, C.V. Rothlin, E. Katz, A.B. Elgoyhen, Mixed nicotinic-muscarinic properties of the $\alpha 9$ nicotinic cholinergic receptor, *Neuropharmacology*. 39 (2000) 2515–2524.
- [345] H.Q. Lin, A. Katsifis, H. Meriaty, Tumour Response to Gefitinib Is Associated with EGF- and Gefitinib- but not Radiation-modulated EGFR Expression, *ANTICANCER Res.* (2010) 7.
- [346] V. Bondarenko, K.M. Targowska-Duda, K. Jozwiak, P. Tang, H.R. Arias, Molecular interactions between mecamylamine enantiomers and the transmembrane domain of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor, *Biochemistry*. 53 (2014) 908–918. doi:10.1021/bi400969x.
- [347] C. Schaal, S.P. Chellappan, Nicotine-Mediated Cell Proliferation and Tumor Progression in Smoking-Related Cancers, *Mol. Cancer Res.* 12 (2014) 14–23. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0541.
- [348] J. Shen, J.L. Yakel, Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system, *Acta Pharmacol. Sin.* 30 (2009) 673–680. doi:10.1038/aps.2009.64.
- [349] T. Suzuki, I. Hide, A. Matsubara, C. Hama, K. Harada, K. Miyano, M. Andrä, H. Matsubayashi, N. Sakai, S. Kohsaka, K. Inoue, Y. Nakata, Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role, *J. Neurosci. Res.* 83 (2006) 1461–1470. doi:10.1002/jnr.20850.
- [350] B. Ananthanarayanan, R.V. Stahelin, M.A. Digman, W. Cho, Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46886–46894. doi:10.1074/jbc.M307853200.
- [351] F.A. Simard, A. Cloutier, T. Ear, H. Vardhan, P.P. McDonald, MEK-independent ERK activation in human neutrophils and its impact on functional responses, *J. Leukoc. Biol.* 98 (2015) 565–573. doi:10.1189/jlb.2MA1214-599R.
- [352] J.R. King, J.C. Nordman, S.P. Bridges, M.-K. Lin, N. Kabbani, Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 20060–20070. doi:10.1074/jbc.M115.647040.
- [353] H. Tamemoto, T. Kadowaki, K. Tobe, K. Ueki, T. Izumi, Y. Chatani, M. Kohno, M. Kasuga, Y. Yazaki, Y. Akanuma, Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 20293–20297.
- [354] K.J. Buchkovich, E.B. Ziff, Nerve growth factor regulates the expression and activity of p33cdk2 and p34cdc2 kinases in PC12 pheochromocytoma cells., *Mol. Biol. Cell.* 5 (1994) 1225–1241.
- [355] W. Zhang, H.T. Liu, MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, *Cell Res.* 12 (2002) 9–18. doi:10.1038/sj.cr.7290105.
- [356] L.R. Stephens, A. Eguinoa, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, F. Cooke, J. Coadwell, A.S. Smrcka, M. Thelen, K. Cadwallader, P. Tempst, P.T. Hawkins, The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101, *Cell*. 89 (1997) 105–114.
- [357] K.K. Jernigan, C.S. Cselenyi, C.A. Thorne, A.J. Hanson, E. Tahinci, N. Hajicek, W.M. Oldham, L.A. Lee, H.E. Hamm, J.R. Hepler, T. Kozasa, M.E. Linder, E. Lee, Gbetagamma activates GSK3 to promote LRP6-mediated beta-catenin transcriptional activity, *Sci. Signal.* 3 (2010) ra37. doi:10.1126/scisignal.2000647.

- [358] G. Fan, L.M. Ballou, R.Z. Lin, Phospholipase C-independent activation of glycogen synthase kinase-3 β and C-terminal Src kinase by Galphaq, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52432–52436. doi:10.1074/jbc.M310982200.
- [359] M.D. Castellone, H. Teramoto, B.O. Williams, K.M. Druey, J.S. Gutkind, Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis, *Science*. 310 (2005) 1504–1510. doi:10.1126/science.1116221.
- [360] E. Beurel, S.F. Grieco, R.S. Jope, Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases, *Pharmacol. Ther.* 148 (2015) 114–131. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
- [361] D. Kovacs, E. Migliano, L. Muscardin, V. Silipo, C. Catricalà, M. Picardo, B. Bellei, The role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: evidences from patients-derived cell lines, *Oncotarget*. 7 (2016) 43295–43314. doi:10.18632/oncotarget.9232.
- [362] G. Viglietto, M.L. Motti, A. Fusco, Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization, *Cell Cycle Georget. Tex.* 1 (2002) 394–400. doi:10.4161/cc.1.6.263.
- [363] T. Ishii, M. Fujishiro, M. Masuda, Y. Goshima, H. Kitamura, S. Teramoto, T. Matsuse, Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells, *Eur. Respir. J.* 23 (2004) 665–670.
- [364] L. Zannini, D. Delia, G. Buscemi, CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond, *J. Mol. Cell Biol.* 6 (2014) 442–457. doi:10.1093/jmcb/mju045.
- [365] P. Song, H.S. Sekhon, X.W. Fu, M. Maier, Y. Jia, J. Duan, B.J. Proskosil, C. Gravett, J. Lindstrom, G.P. Mark, S. Saha, E.R. Spindel, Activated Cholinergic Signaling Provides a Target in Squamous Cell Lung Carcinoma, *Cancer Res.* 68 (2008) 4693–4700. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0183.
- [366] J. Guo, S. Ibaragi, T. Zhu, L.-Y. Luo, G.-F. Hu, P.S. Huppi, C.Y. Chen, Nicotine Promotes Mammary Tumor Migration via a Signaling Cascade Involving Protein Kinase C and cdc42, *Cancer Res.* 68 (2008) 8473–8481. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0131.
- [367] S.-H. Tu, Y.-C. Lin, C.-C. Huang, P.-S. Yang, H.-W. Chang, C.-H. Chang, C.-H. Wu, L.-C. Chen, Y.-S. Ho, Protein phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1F promotes smoking-induced breast cancer by inactivating phosphorylated-p53-induced signals, *Oncotarget*. 7 (2016). doi:10.18632/oncotarget.12717.
- [368] A.E. Summers, C.J. Whelan, M.E. Parsons, Nicotinic acetylcholine receptor subunits and receptor activity in the epithelial cell line HT29, *Life Sci.* 72 (2003) 2091–2094. doi:10.1016/S0024-3205(03)00089-4.
- [369] S. Trombino, A. Cesario, S. Margaritora, P. Granone, G. Motta, C. Falugi, P. Russo, Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen-activated protein kinase pathway, *Cancer Res.* 64 (2004) 135–145.
- [370] S.G. Kuhar, L. Feng, S. Vidan, M.E. Ross, M.E. Hatten, N. Heintz, Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation, (n.d.) 8.
- [371] A. Cardinale, C. Nastrucci, A. Cesario, P. Russo, Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis, *Crit. Rev. Toxicol.* 42 (2012) 68–89. doi:10.3109/10408444.2011.623150.
- [372] M.H. Al-Wadei, J. Banerjee, H.A.N. Al-Wadei, H.M. Schuller, Nicotine induces self-renewal of pancreatic cancer stem cells via neurotransmitter-driven activation of sonic hedgehog signalling, *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 52 (2016) 188–196. doi:10.1016/j.ejca.2015.10.003.
- [373] X. Wang, J.L. Martindale, N.J. Holbrook, Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39435–39443. doi:10.1074/jbc.M004583200.
- [374] J. Min, K. Huang, H. Tang, X. Ding, C. Qi, X. Qin, Z. Xu, Phloretin induces apoptosis of non-small cell lung carcinoma A549 cells via JNK1/2 and p38 MAPK pathways, *Oncol. Rep.* 34 (2015) 2871–2879. doi:10.3892/or.2015.4325.

- [375] M. Okada, K. Shibuya, A. Sato, S. Seino, E. Watanabe, S. Suzuki, M. Seino, C. Kitanaka, Specific role of JNK in the maintenance of the tumor-initiating capacity of A549 human non-small cell lung cancer cells, *Oncol. Rep.* 30 (2013) 1957–1964. doi:10.3892/or.2013.2655.
- [376] A.K. Greenberg, S. Basu, J. Hu, T. Yie, K.M. Tchou-Wong, W.N. Rom, T.C. Lee, Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (2002) 558–564. doi:10.1165/ajrcmb.26.5.4689.
- [377] Y. Hu, G. Chen, Pathogenic mechanisms of lung adenocarcinoma in smokers and non-smokers determined by gene expression interrogation, *Oncol. Lett.* 10 (2015) 1350–1370. doi:10.3892/ol.2015.3462.
- [378] H.-S. Kim, H.D. Han, G.N. Armaiz-Pena, R.L. Stone, E.J. Nam, J.-W. Lee, M.M.K. Shahzad, A.M. Nick, S.J. Lee, J.-W. Roh, M. Nishimura, L.S. Mangala, J. Bottsford-Miller, G.E. Gallick, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, Functional roles of Src and Fgr in ovarian carcinoma, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17 (2011) 1713–1721. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2081.
- [379] G. Baillat, C. Siret, E. Delamarre, J. Luis, Early adhesion induces interaction of FAK and Fyn in lipid domains and activates raft-dependent Akt signaling in SW480 colon cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1783 (2008) 2323–2331. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.08.008.
- [380] B.D. Manning, A. Toker, AKT/PKB Signaling: Navigating the Network, *Cell.* 169 (2017) 381–405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.
- [381] G. Viglietto, M.L. Motti, A. Fusco, Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization, *Cell Cycle Georget. Tex.* 1 (2002) 394–400. doi:10.4161/cc.1.6.263.
- [382] T. Ishii, M. Fujishiro, M. Masuda, Y. Goshima, H. Kitamura, S. Teramoto, T. Matsuse, Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells, *Eur. Respir. J.* 23 (2004) 665–670.
- [383] X. Cui, L. Zhang, J. Luo, A. Rajasekaran, S. Hazra, N. Cacalano, S.M. Dubinett, Unphosphorylated STAT6 contributes to constitutive cyclooxygenase-2 expression in human non-small cell lung cancer, *Oncogene.* 26 (2007) 4253–4260. doi:10.1038/sj.onc.1210222.
- [384] P.-Y. Lin, J.-W. Lee, M.-H. Liao, H.-Y. Hsu, S.-J. Chiu, H.-J. Liu, W.-L. Shih, Modulation of p53 by mitogen-activated protein kinase pathways and protein kinase C delta during avian reovirus S1133-induced apoptosis, *Virology.* 385 (2009) 323–334. doi:10.1016/j.virol.2008.12.028.
- [385] J.-L. Perfettini, M. Castedo, R. Nardacci, F. Ciccocanti, P. Boya, T. Roumier, N. Larochette, M. Piacentini, G. Kroemer, Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 279–289. doi:10.1084/jem.20041502.
- [386] L. Ji, J. Xu, J. Liu, A. Amjad, K. Zhang, Q. Liu, L. Zhou, J. Xiao, X. Li, Mutant p53 promotes tumor cell malignancy by both positive and negative regulation of the transforming growth factor β (TGF- β) pathway, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 11729–11740. doi:10.1074/jbc.M115.639351.
- [387] V. Betapudi, M. Shukla, R. Alluri, S. Merkulov, K.R. McCrae, Novel role for p56/Lck in regulation of endothelial cell survival and angiogenesis, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30 (2016) 3515–3526. doi:10.1096/fj.201500040.
- [388] S. Kumar, P. Pandey, A. Bharti, S. Jin, R. Weichselbaum, D. Weaver, D. Kufe, S. Kharbanda, Regulation of DNA-dependent protein kinase by the Lyn tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 25654–25658.
- [389] D. Chandra, G. Choy, D.G. Tang, Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 31289–31301. doi:10.1074/jbc.M702777200.

- [390] U. Wenzel, H. Daniel, Early and late apoptosis events in human transformed and non-transformed colonocytes are independent on intracellular acidification, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 14 (2004) 65–76. doi:10.1159/000076928.
- [391] M.P. Maher, J.A. Matta, S. Gu, M. Seierstad, D.S. Bredt, Getting a Handle on Neuropharmacology by Targeting Receptor-Associated Proteins, *Neuron*. 96 (2017) 989–1001. doi:10.1016/j.neuron.2017.10.001.
- [392] N. Montuori, P. Ragno, Multiple activities of a multifaceted receptor: roles of cleaved and soluble uPAR, *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14 (2009) 2494–2503.
- [393] A.F. Lomholt, G. Høyer-Hansen, H.J. Nielsen, I.J. Christensen, Intact and cleaved forms of the urokinase receptor enhance discrimination of cancer from non-malignant conditions in patients presenting with symptoms related to colorectal cancer, *Br. J. Cancer*. 101 (2009) 992–997. doi:10.1038/sj.bjc.6605228.
- [394] M.G. Rasch, I.K. Lund, C.E. Almasi, G. Hoyer-Hansen, Intact and cleaved uPAR forms: diagnostic and prognostic value in cancer, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13 (2008) 6752–6762.