

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

Лебедев Дмитрий Сергеевич

**ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ЛИГАНДЫ
НИКОТИНОВЫХ И ГАМК-А РЕЦЕПТОРОВ**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Цетлин Виктор Иванович, д.х.н., профессор, чл.-корр. РАН.

Официальные оппоненты:

Тихонов Денис Борисович, д.б.н., чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН);

Сурин Александр Михайлович, д.б.н., заведующий лабораторией нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова».

Защита состоится «25» марта 2020 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор физико-математических наук

Олейников В.А.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Крупнейшее и наиболее изученное семейство лиганд-управляемых ионных каналов позвоночных – семейство Cys-петельных рецепторов включает в себя анион-селективные каналы: рецепторы γ -аминомасляной кислоты типа А (ГАМКАР) и глициновые рецепторы (ГлиР), а также три вида катион-проницаемых ионных каналов: ацетилхолиновый рецептор (нАХР), серотониновый 5-гидрокситриптаминовый рецептор типа 3 (5НТЗР) и слабо изученное подсемейство цинк-активируемых ионных каналов. На сегодняшний день никотиновый ацетилхолиновый и ГАМКА рецепторы остаются востребованными фармакологическими мишенями. Мышечные нАХР – мишень действия миорелаксантов, а нейрональные подтипы нАХР – препаратов для терапии деменции и нейродегенеративных заболеваний. Связыванием же с ГАМКА рецептором в свою очередь обусловлено действие транквилизаторов-бензодиазепинов и таких известных анестетиков как пропофол и тиопентанал натрия.

Цели и задачи

Цель настоящей работы – поиск и изучение новых лигандов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) и рецепторов гамма-аминомасляной кислоты типа А (ГАМК-А).

В ходе работы были решены следующие задачи:

- 1) Исследована биологическая активность природных ядов по отношению к нАХР и ГАМК-А рецепторам, выделены действующие вещества и установлена их структура.
- 2) Сконструированы и синтезированы новые лиганды нАХР и ГАМК-А рецепторов, проведена оценка их функциональной активности и установлен механизм действия.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе настоящей работы впервые выделен и исследован широкий спектр лигандов нАХР и ГАМКАР. Впервые продемонстрировано наличие агонистов ГАМКАР в секрете паротидных желёз земноводных, а также установлена их химическая структура. Охарактеризован неклассический $\alpha\delta$ -бунгаротоксин-1 из яда малайского крайта *Bungarus candidus*, исследован его функциональный эффект в отношении нАХР, а также сделаны выводы о структурных детерминантах его уникальной кинетики и специфичности в отношении различных подтипов нАХР. Изучены свойства синтетических фрагментов

петли II белков семейства Lуб/uPAR и продемонстрирован их потенциал в качестве селективных ингибиторов nAXP $\alpha\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ типов. Сделаны выводы о возможных структурных предпосылках их селективности. Следующим шагом на пути исследования пептидных лигандов nAXP стало изучение йодированных синтетических производных α -конотоксина RgIA и α O-конотоксина GeXIVA и демонстрация их функциональной идентичности с нейодированными аналогами, что предоставило важную методическую информацию и позволило рассматривать ^{125}I -меченные синтетические аналоги RgIA и GeXIVA в качестве перспективного инструмента исследования nAXP. Главным же достижением данной работы является открытие нового класса ингибиторов nAXP – полиаргининовых пептидов. Дополнительным практически значимым результатом исследования является открытие холинергических свойств катионных полимеров, содержащих гуанидино- и/или дизамещенные аминокгруппы. Эти соединения рассматриваются в качестве перспективных векторов доставки нуклеиновых кислот и анионных терапевтических субстанций, а результаты настоящей работы позволяют предсказать возможные побочные эффекты применения этих веществ в клинической практике.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 6 научных статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций.

Результаты диссертации также были представлены на следующих научных конференциях и школах: XXVIII научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" Москва, Россия, 2016; The 19th EU-IST Congress, Yerevan, Armenia, 2018; The 44th FEBS Congress, Krakow, Poland, 2019; IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи, Дагомыс, 2019.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и включает в себя 3 таблицы и 25 рисунков. Работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список сокращений и список литературы, включающий 217 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выделение агонистов ГАМКАР из секрета паротидных желёз серой жабы *Bufo bufo*.

Экстракт цельного лиофилизованного секрета паротидных желёз серой жабы *Bufo bufo* был подвергнут электрофизиологическому исследованию методом локальной фиксации потенциала и продемонстрировал индукцию ионного тока через ГАМКАР $\alpha 1\beta 3$ -типа, экспрессированного в клетках НЕК293 (**Рисунок 1 В**). Он был подвергнут гель-фильтрации с последующим электрофизиологическим анализом фракций. Фракции №1 и №2 (см. **Рисунок 1 А**) проявили активность агонистов ГАМКАР и были подвергнуты обращённо-фазовой хроматографии. Активность полученных фракций (№1, 2, 3) также была проанализирована электрофизиологически (**Рисунок 1 Б, В**). Высокоточная масс-спектрометрия и ЯМР-спектроскопия материала фракций позволили установить, что они представлены тремя производными аргинина и дикарбоновых кислот: N-адипиларгинином, N-пимелоиларгинином и N-субериларгинином (**Рисунок 1 Г**).

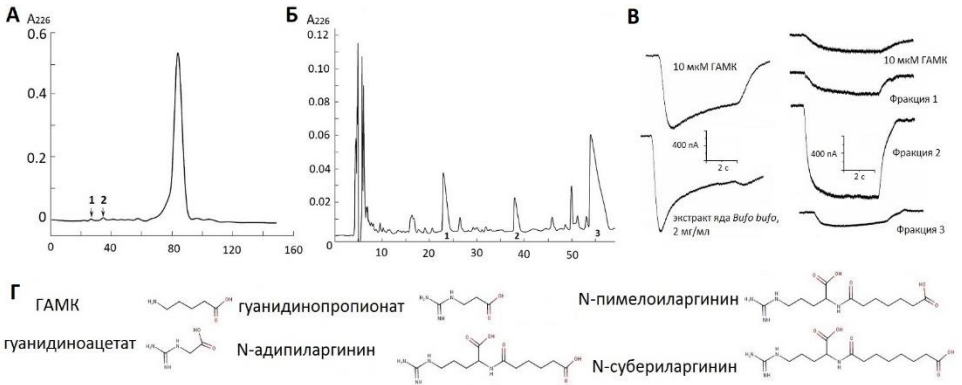


Рисунок 1. (А) Гель-фильтрация секрета паротидных желёз *Bufo bufo*. 1 и 2 - фракции, проявившие свойства агонистов ГАМКАР $\alpha 1\beta 3$ -типа. (Б) Хроматография фракции 1. Фракция 2 давала аналогичную картину поглощения. Фракции 1, 2, 3 проявили активность агонистов $\alpha 1\beta 3$ ГАМКАР (В) Кривые лиганд-индуцированных ионных токов, записанные методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp в конфигурации whole-cell) на клетках линии НЕК293, экспрессирующих ГАМКАР $\alpha 1\beta 3$ типа. (Г) Структурные формулы изученных соединений, установленные методом ЯМР-спектроскопии. Фракции соответствуют 1 – N-адипиларгинин, 2 - N-пимелоиларгинин, 3 - N-субериларгинин. Приведены формулы других агонистов ГАМКАР, имеющих общие структурные черты с исследованными соединениями.

Исследование свойств $\alpha\delta$ -бунгаротоксина – нового трёхпетельного токсина из яда малайского крайта *Bungarus candidus*

Нами было проведено выделение и электрофизиологическое исследование близкого структурного аналога α -бунгаротоксина – $\alpha\delta$ -бунгаротоксина из яда малайского крайта *Bungarus candidus*. Он представляет собой белок из 73 аминокислотных остатков и имеет высокую степень гомологии с широко известным α -бунгаротоксином из *Bungarus multicinctus*. Для изучения функционального эффекта $\alpha\delta$ -бунгаротоксина на мышечный и нейрональный $\alpha\beta\gamma$ 2 nAHP методами электрофизиологии была выбрана изоформа-1 ($\alpha\delta$ -бунгаротоксин-1). Аминокислотная последовательность данной изоформы токсина, а также её выравнивание с последовательностью традиционного α -бунгаротоксина приведены ниже (см. **Рисунок 4 А**).

При изучении электрофизиологических свойств $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 был использован метод двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Функциональный эффект токсина был изучен на мышечном nAHP мышцы (состав $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$), представляющим основную физиологическую мишень действия трёхпетельных α -нейротоксинов в организме млекопитающих. Другой моделью был выбран человеческий nAHP $\alpha\beta\gamma$ 2 типа – типичный представитель нейрональных гетеромерных nAHP, не чувствительных к действию классического α -бунгаротоксина.

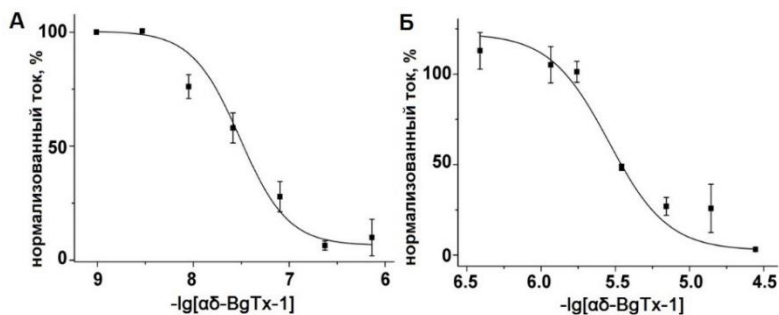


Рисунок 2. Ингибирование $\alpha\delta$ -бунгаротоксином-1 ионного тока через nAHP мышечного (A) и $\alpha\beta\gamma$ 2 (B) типов, индуцированного 30 мкМ ацетилхолина. Запись проведена методом двухэлектродной фиксации потенциала (voltage clamp) на ооцитах *X. laevis*, после аппликации токсина длительностью 10 минут. Величины IC_{50} составили 30 нМ (CI 95 15.7- 57.2) для мышечного nAHP и 2.9 мкМ (CI 95 2.1- 3.9) для нейронального $\alpha\beta\gamma$ 2 nAHP.

Кривые концентрационных зависимостей (см. **Рисунок 2**) показывают сравнимую с классическим α -бунгаротоксином эффективность ингибирования нАХР мышечного типа с IC_{50} в 30 нМ. В то же время, крайне неожиданным является действие $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 на нейрональный нАХР $\alpha\beta_2$ типа. Для данного подтипа рецептора величина IC_{50} составила 3 мкМ. Для сравнения α -бунгаротоксин лишь незначительно (менее 30%) ингибирует данный тип рецептора в концентрации 270 мкМ.

Для изучения особенностей кинетики действия $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 на нАХР нами были построены кривые восстановления амплитуды лиганд-индуцированных ионных токов после аппликации токсина. Было продемонстрировано, что на оба исследованных рецептора (мышечный нАХР мыши и нейрональный $\alpha\beta_2$ нАХР человека) $\alpha\delta$ -бунгаротоксин-1 действует обратимо. После полного ингибирования мышечного рецептора, амплитуда лиганд-индуцированного ионного тока восстанавливается на 40% после получасовой интенсивной отмывки (см. **Рисунок 3 А**).

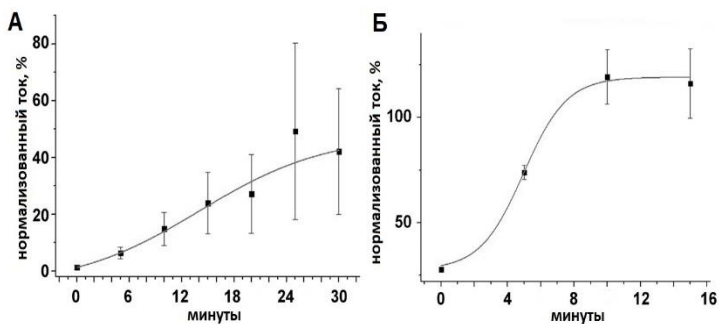


Рисунок 3. Кинетика восстановления функциональной активности мышечного (А) и нейронального нАХР $\alpha\beta_2$ -типа (Б) после аппликации 15 мкМ $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1, длительностью 10 минут. Индукция тока вызывалась аппликацией 30 мкМ ацетилхолина с периодичностью в 5 минут. За каждой аппликацией ацетилхолина следовала отмывка не менее чем 2 мл. буфера в течении 5 минут.

По данному параметру новый токсин проявляет значительное отличие от классического α -бунгаротоксина, необратимо блокирующего мышечный нАХР. Ещё быстрее восстановление амплитуды лиганд-индуцированного ионного тока происходит для нейронального $\alpha\beta_2$ нАХР – амплитуда полностью восстанавливается менее чем за 15 минут интенсивной отмывки буфером. Для выяснения причин различий в эффекте двух структурно близких токсинов нами было проведено выравнивание их последовательностей

и гомологичное моделирование $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 на основе структуры α -бунгаротоксина (см. **Рисунок 4**). Сравнение последовательностей показало, что различия между α -бунгаротоксином и $\alpha\delta$ -бунгаротоксином-1 включают аминокислотные замены I1L, V2L, H4Y, T5K, делецию A7 Δ , замены T8P, S12N, V14E, R25T, F32W и V40I. Известно, что критически важными для связывания с районом С-петли nAXP являются положительно-заряженные остатки R36 и K38 на вершине петли II, консервативные для всех α -бунгаротоксинов. Замены R25T, F32W и V40I локализованы вблизи упомянутого участка. Однако, из перечисленных мутаций, лишь замены R25T и F32W могут заметным образом повлиять на свойства петли II. Делеция A7 Δ в петле I, возможно, приводит к сокращению площади контакта токсина с рецептором, уменьшая надёжность его связывания в ортостерическом сайте. Также, по-видимому, на специфичность действия $\alpha\delta$ -

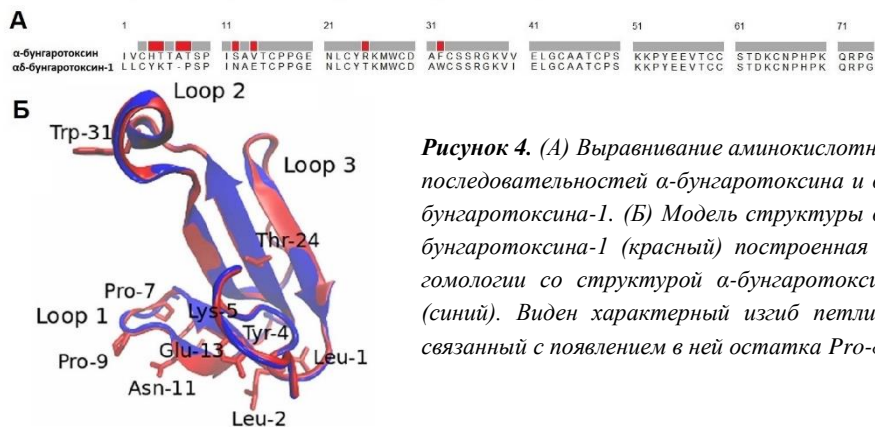


Рисунок 4. (А) Выравнивание аминокислотных последовательностей α -бунгаротоксина и $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1. (Б) Модель структуры $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 (красный) построенная по гомологии со структурой α -бунгаротоксина (синий). Виден характерный изгиб петли I, связанный с появлением в ней остатка Pro-8.

бунгаротоксина-1 серьёзным образом влияет замена консервативного среди «длинных» трёхпетельных нейротоксинов остатка треонин 8 на пролин (T8P), искажающая геометрию конца петли I.

Анализ активности фрагментов петли II белков семейства Lуб/uPAR

Белок Lynx1, а также родственные белки SLURP1 и SLURP2, относящиеся к семейству белков Lуб/uPAR, модулируют активность nAXP и играют заметную роль в регуляции механизмов роста и пролиферации эпителиев и клеток нервной ткани. Структурно, перечисленные белки близки к трёхпетельным нейротоксином из яда змей. Белок SLEEPLESS или SSS *Drosophila melanogaster* - другой пример белка семейства Lуб.

Он так же имеет трёхпетельный способ укладки и является модулятором nAHP нервной системы насекомого. Согласно нашей гипотезе, синтетические пептиды, повторяющие структуру центральной петли данных белков, могли бы в какой-то степени сохранить холинергическую активность своих полноразмерных прототипов. Одновременно, обладая меньшим молекулярным весом, они обладают большей, по сравнению с полноразмерными аналогами биодоступностью и сравнительной лёгкостью синтеза. В случае успеха, эти качества позволили бы рассматривать их в качестве фармакологически-перспективных модуляторов нейрональных nAHP.

Нами была исследована функциональная активность пептидов, воспроизводящих последовательность центральной петли эндогенных трёхпетельных белков Lynx1, SLURP1, SLURP2 человека, а также белка SSS дрозофилы. Аминокислотные последовательности центральной петли II белков Lynx1, SLURP1, SLURP2 и SSS, а также синтезированных пептидов приведены на **Рисунке 5 А**. Два пептида (**2, 3**) были синтезированы в виде линейных незамкнутых структур, прочие же имели замкнутую конфигурацию «шпильки», стабилизированной дисульфидным мостиком между N- и C-концевыми цистеинами. Двухэлектродная запись потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки, экспрессирующих $\alpha 9\alpha 10$ nAHP крысы и человека, не показала активности для пептидов **6 и 7** (фрагментов SLURP1 и SLURP2) в концентрации до 50 мкМ. В то же время, было установлено, что пептид **1** (фрагмент Lynx1) ингибирует крысиный $\alpha 9\alpha 10$ с

Lynx1	CPAMVAYCMTTTRTY-----YTPTRMKVSKSC
SSS	C---NGCCVKMVRH-----QRSPYEVVRRMC
SLURP1	CKPEDTACMTTLVTVEAEYPFNQSPVVTRSC
SLURP2	CLRDSTHCVTATRVLS--NTEDLPLVTRVC
Lynx1 (1)	CTTRTY-----YTPTRMKVSKC
Lynx1 linear (2)	TTRTY-----YTPTRMKVSK
Lynx1 short (3,4)	CTR TY-----YTPTRMC
SSS (5)	CVKMVRH-----QRSPYEVVRRMC
SLURP1 (6)	CTLVTVEAEYPFNQSPVVTC
SLURP2 (7)	CTATRVLS--NTEDLPLVTC

Рисунок 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей петли II белков семейства Луб. Выбранные для синтеза пептидов фрагменты петли II выделены соответствующим цветом и пронумерованы от 1 до 7. Для стабилизации структуры на их концах добавлены остатки цистеина, способные к замыканию дисульфидных мостиков (выделены серым).

константой IC₅₀ 27 мкМ (CI 95% 14.55–41.26 мкМ), n = 3. Несколько меньшая активность была обнаружена для пептида **2** (линейный фрагмент Lynx1) и составила 32 мкМ (CI 95% 14.70–70.99 мкМ), n = 3, (**Рисунок 6 Б**). Пептид **5** (петля SSS) проявил лишь менее 50% ингибирования человеческого α9α10 в концентрации 100 мкМ (**Рисунок 6 А**).

Также нами было исследовано действие синтезированных пептидов на гетеромерный нейрональный nAHP α3β2 типа. При 30 мкМ, фрагмент Lynx1 (пептид **1**) продемонстрировал примерно 30% ингибирование ионного тока через α3β2 nAHP (**Рисунок 6 В**). Аналогичный эффект был установлен для фрагмента SLURP1 (пептид **6**),

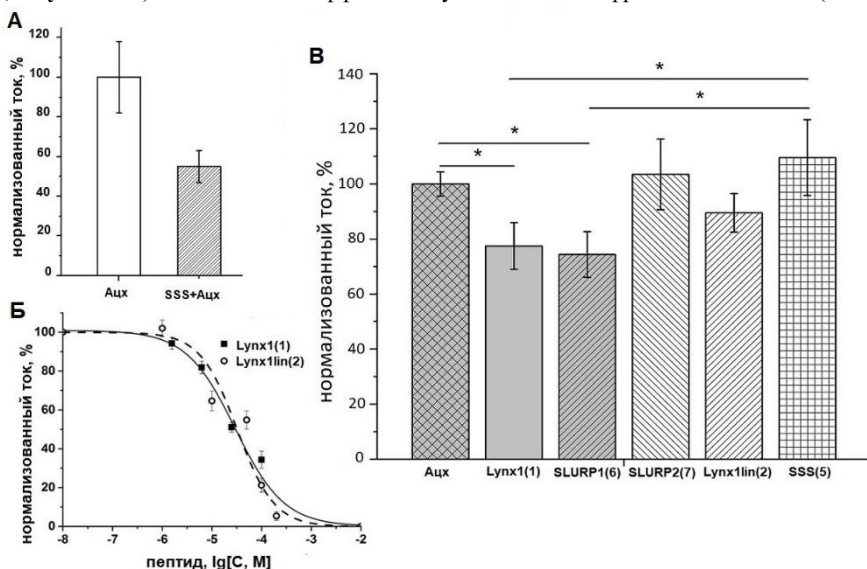


Рисунок 6. Активность аналогов белков семейства Луб в отношении nAHP α9α10 и α3β2 типов, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. (А) Ингибирование тока, индуцированного 25 мкМ Ацх через α9α10 nAHP человека под действием 100 мкМ пептида SSS (**5**). (Б) Ингибирование токов, индуцированных 30 мкМ Ацх пептидом Lynx1 (**1**) на крысином (■) α9α10 nAHP или пептидом Lynx1lin (**2**) на человеческом (○) α9α10 nAHP. Для Lynx1 (**1**) значение константы IC₅₀ составило 27.00 мкМ (CI 95% 14.55–41.26 мкМ). Для пептида Lynx1lin (**2**) - 32.30 мкМ (CI 95% 14.70–70.99 мкМ) (В) Ингибирование ионного тока через nAHP α3β2 типа аналогами белков семейства Луб. Эффект пептидов Lynx1 (**1**), SLURP1 (**6**), SLURP2 (**7**), Lynx1lin (**2**) и SSS (**5**) протестирован для концентрации 50 мкМ. Нормализованные токи представлены как среднее ± стандартная ошибка, Значения относительной амплитуды для Lynx1 (**1**) и SLURP1 (**6**) 77 ± 8% и 74 ± 8%, соответственно.

однако линейный пептид Lypx1 lin (2), фрагмент SLURP2 (7) и фрагмент SSS (5) не проявили статистически значимой активности в отношении $\alpha 3\beta 2$ nAHP в концентрации 30 мкМ, и ни один из пептидов не проявил активности на nAHP $\alpha 4\beta 2$ типа в концентрации до 30 мкМ.

Анализ зависимости активности пептидов от расчётного значения их изоэлектрической точки (pI) привёл к любопытным результатам. Вычисление значений pI для Lypx1 (1, 2) и SSS (5), показавших ингибирующий эффект в отношении nAHP $\alpha 9\alpha 10$ -типа, даёт результат в 9.7 и 10.0, соответственно. Близкие значения pI наблюдаются для фрагментов петли II короткого нейротоксина II и слабого токсина из *N. kaouthia*. В то же время, значения pI для фрагментов SLURP1 (6) и SLURP2 (7) значительно ниже - 3.80 и 4.37. Такая разница в заряде молекул может иметь значение для их различной активности к nAHP $\alpha 9\alpha 10$ -типа. В то же время, очевидной связи между зарядом пептида и его активностью в отношении $\alpha 3\beta 2$ nAHP не прослеживается.

Изучение электрофизиологических свойств йодированных производных конотоксинов GEXIVA и RgIA

α -Конотоксины – пептиды из яда моллюсков рода *Conus*, являются перспективными инструментами изучения nAHP. Они обладают сравнительно небольшим молекулярным весом, что делает доступным их химический синтез, а их высокая специфичность делает возможным различение с их помощью разных подтипов nAHP. Так α -конотоксин RgIA, содержащий 13 аминокислотных остатков имеет высокую специфичность к $\alpha 9\alpha 10$ nAHP крысы, а его аналоги, оптимизированные для действия на $\alpha 9\alpha 10$ nAHP человека, рассматриваются в качестве перспективных анальгетиков. Другой недавно охарактеризованный конотоксин, имеющий высокую селективность к $\alpha 9\alpha 10$ nAHP - α O-конотоксин GeXIVA. Использование радиомеченных производных двух упомянутых конотоксинов для радиолигандного анализа могло бы помочь установить их сайты связывания, а также дать новый инструмент для изучения лигандов $\alpha 9\alpha 10$ nAHP. Однако, радиоактивная метка (^{125}I), связанная с остатком/остатками тирозинов, может непредсказуемым образом изменить ингибирующие свойства токсинов и их параметры связывания с рецептором. Для подтверждения корректности использования йодированных производных α -конотоксина RgIA и α O-конотоксина GeXIVA для радиолигандного анализа, нами была проведена серия электрофизиологических экспериментов с оцитатами

Xenopus laevis, экспрессирующими $\alpha 9\alpha 10$ nAHP. Для анализа активности йодированного производного RgIA был выбран $\alpha 9\alpha 10$ nAHP крысы, так как активность RgIA в отношении крысиного nAHP примерно в 100 раз выше, чем в отношении человеческого.

Монойодированный нерадиоактивный ^{127}I -RgIA показал сходную со своим нейодированным синтетическим аналогом активность на крысином $\alpha 9\alpha 10$ nAHP в диапазоне концентраций от 5 до 300 нМ (см. Рисунок 7 А). Электрофизиологическое исследование трийодированного ^{127}I -GeXIVA также показало близкую с нейодированным синтетическим GeXIVA активность меченого аналога (см. Рисунок 7 Б). Из полученных результатов, можно сделать вывод, что йодирование не влияет кардинальным образом на ингибирующие свойства и специфичность конотоксинов RgIA и GeXIVA, а их йодированные производные могут выступать в качестве инструментов радиолигандного анализа на моделях $\alpha 9\alpha 10$ nAHP.

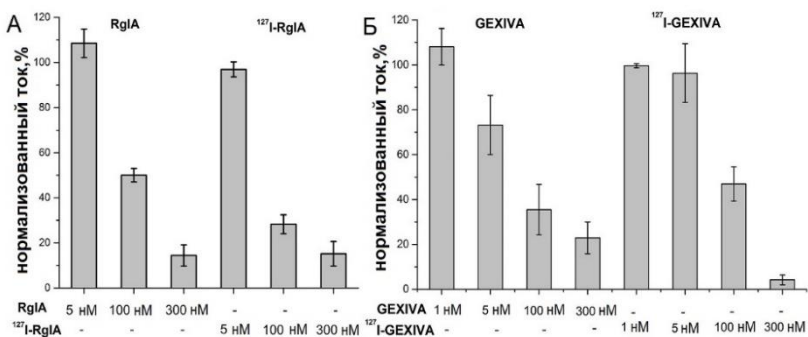


Рисунок 7. Ингибирование ионных токов, индуцированных 10 мкМ ацетилхолина через (А) $\alpha 9\alpha 10$ nAHP крысы, синтетическим аналогом конотоксина RgIA и его ^{127}I -производным в концентрациях 5, 100, 300 нМ, $n = 3$ и через (Б) человеческий $\alpha 9\alpha 10$ nAHP, синтетическим аналогом конотоксина GeXIVA и его ^{127}I -производным в концентрации 1, 5, 100, 300 нМ, $n = 2$. Столбчики гистограммы представляют среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Олигоаргининовые пептиды – новое семейство ингибиторов nAHP

Работа по изучению «трёхпетельных» нейротоксинов, белков семейства Lуб/uPAR, а также конотоксинов RgIA и GeXIVA привела нас к предположению о том, что общая величина положительного заряда полипептида и высокое содержание остатков аргинина может иметь значение в формировании специфического сродства пептидных токсинов к $\alpha 9\alpha 10$ nAHP. Так значения pI для RgIA и GeXIVA равны 8.97 и 10.31. Этот избыточный положительный заряд во многом определяется остатками аргинина, в RgIA их

содержится 4 (44%), а в GeXIVA – целых 9 (32%). Характерной чертой остатков аргинина является то, что положительный заряд несёт гуанидиновая группа, находящаяся на конце относительно длинного радикала и доступная для широкого спектра межмолекулярных взаимодействий. Наиболее консервативный и критичный для блокирующего действия на nAHP остаток «коротких» нейротоксинов – Arg33 находится на вершине петли II, аналогичную роль в «длинном» α -бунгаротоксине выполняют остатки Arg36 и Lys38, образующие катионный кластер на вершине петли II. Благодаря тому, что положительный заряд гуанидиновой группы этих остатков экспонирован на сравнительно длинных радикалах на конце петли II, он способен к проникновению в лиганд-связывающий карман nAHP и взаимодействию с «ароматическим боксом» рецептора, составленным из остатков тирозина и триптофана (π -катионные взаимодействия). Стоит обратить внимание, что nAHP являются катионными каналами, то есть структуры канала nAHP несут отрицательный заряд, поэтому устье ионной поры также является потенциальным сайтом связывания положительно-заряженных пептидных лигандов. Все перечисленные данные привели нас к предположению о том, что полиаргинин-содержащие пептиды могут являться потенциальными лигандами nAHP.

Предварительные опыты показали, что чистый аргинин не конкурирует с α -бунгаротоксином на моделях nAHP и не вызывает функционального ответа/подавления ответа в доступных нам экспериментальных системах nAHP (двухэлектродная запись потенциала на ооцитах, экспрессирующих мышечный рецептор мыши, $\alpha\beta 2$ или $\alpha 9a10$ nAHP человека, кальциевый имиджинг на клетках Neuro2a, экспрессирующих человеческий nAHP $\alpha 7$ -типа) до концентрации 500 мкМ.

В продолжении работы, нами был синтезирован набор из четырёх поли-/олигоаргининовых пептидов (R3, R6, R8 и R16) и двух пептидов смешанного состава WR2 и W2R4. Стоит сказать, что пептиды R8 и R16 широко известны в качестве «проникающих пептидов» – молекул, способных к связыванию нуклеиновых кислот и других анионных соединений и их эффективному переносу через клеточную мембрану. Известны и «проникающие» пептиды, содержащие остатки ароматических аминокислот, что привело нас к мысли о необходимости синтеза дополнительных триптофаносодержащих пептидов. Последовательности синтезированных пептидов перечислены на **Рисунке 8 А**.

Для изучения возможного связывания исследуемых пептидов в районе ортостерического сайта, нами был проведён конкурентный радиолигандный анализ с использованием радиоактивно-меченного ^{125}I -бунгаротоксина. В качестве модельных объектов выступили водорастворимый лиганд-связывающий домен нАХР $\alpha 9$ -типа человека, присоединённый к никель-агарозе, мембраны электрического органа ската *Torpedo californica*, содержащие нАХР мышечного типа, клетки линии GH4C1 (гипофиз крысы), экспрессирующие $\alpha 7$ нАХР человека, а также АХСБ из моллюсков *Limnaea*

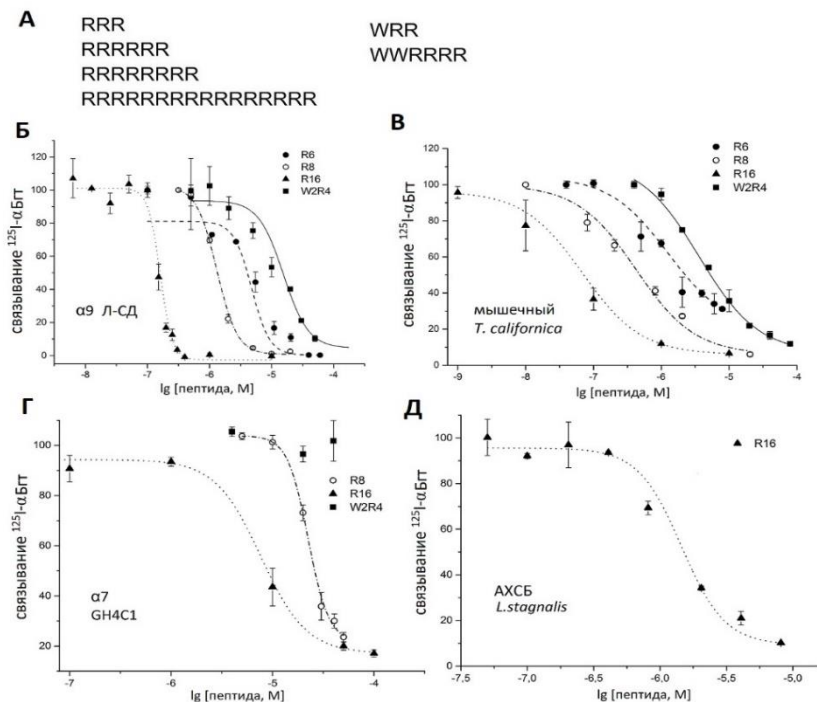


Рисунок 8. (А) Структуры изученных аргинин-содержащих пептидов. Результаты конкурентного радиолигандного анализа: конкуренция ^{125}I - α БгТ с пептидом R6 (●), R8(○), R16 (▲) и W2R4 (■) за связывание с (Б) $\alpha 9$ лиганд-связывающим доменом, (В) мышечным нАХР на мембранах электрического органа ската *T. californica*. (Г) Конкуренция ^{125}I - α БгТ с пептидами R8(○), R16 (▲) и W2R4 (■) за связывание с человеческим $\alpha 7$ нАХР на клетках линии GH4C1. (Д) Конкуренция ^{125}I - α БгТ с пептидом R16 (▲) за связывание с АХСБ из *L. stagnalis*. Величины IC_{50} представлены в **Таблице 1**.

stagnalis и *Aplysia californica*. Константы вытеснения для исследованных пептидов приведены в **Таблице 1**, а кривые IC50 для пептидов, проявивших активность приведены на **Рисунке 8 Б-Д**.

Таблица 1. Значения констант IC50 для изученных пептидов, полученные методом конкуренции с радиоактивным ¹²⁵I- α -бунгаротоксином за связывание с различными моделями НАХР.

Пептид	IC ₅₀ , мкМ (CI 95%)				
	<i>T. californica</i>	$\alpha 7$	$\alpha 9$ Л-СД	<i>L. stagnalis</i> АХСБ	<i>A. californica</i> АХСБ
R3	>40	>40	>60	>40	>40
R6	1.21 (0.94-1.56)	>40	4.75 (3.31- 6.82)	>40	>40
WR2	> 20	>40	>60	>40	>40
W2R4	4.18 (3.32 - 5.26)	>40	15.52 (12.56 – 19.18)	>40	>40
R8	0.401 (0.376 – 0.442)	22.43 (20.74 -24.26)	1.31 (1.20- 1.43)	>20	>40
R16	0.036 (0.028 – 0.045)	7.66 (5.44 - 10.79)	0.16 (0.14 – 18.26)	1.44 (1.21-1.74)	>40

Как видно из приведённых цифр, прослеживается зависимость активности олигоаргининовых пептидов от их длины: специфическое связывание с мишенями показали лишь олигоаргининовые пептиды с числом остатков аргинина больше 6, при этом лишь R16 конкурировал с АХСБ из *L. stagnalis*. Аналогичная тенденция наблюдается и для триптофаносодержащих пептидов: WR2 - не активен, а W2R4 проявляет активность на $\alpha 9$ -домене и мышечном НАХР.

Исследование функциональной активности изучаемых пептидов было проведено методом двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*, а также кальциевого имиджинга на клетках линии Neuro2a. Электрофизиологические тесты всех изучаемых пептидов были проведены на ооцитах, временно экспрессирующих мышечный НАХР мыши ($\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ состава), $\alpha 9\alpha 10$ или $\alpha 3\beta 2$ НАХР человека. Метод кальциевого имиджинга был использован для изучения лиганд-индуцированного ионного тока через хорошо проницаемый для ионов кальция $\alpha 7$ НАХР человека, экспрессия которого в ооцитах

затруднена. Учитывая сравнительно большой молекулярный вес исследуемых пептидов, был выбран дизайн эксперимента, применённый нами также при электрофизиологическом исследовании конотоксинов. Сначала измерялась амплитуда тока, вызываемого 30 мкМ ацетилхолина, затем ооцит инкубировали в растворе пептида в течение 5 минут, после чего апплицировали смесь 30 мкМ ацетилхолина с исследуемым пептидом в соответствующей концентрации. Процент ингибирования высчитывался как отношение амплитуды тока после преинкубации с пептидом к амплитуде контрольного тока до нанесения пептида.

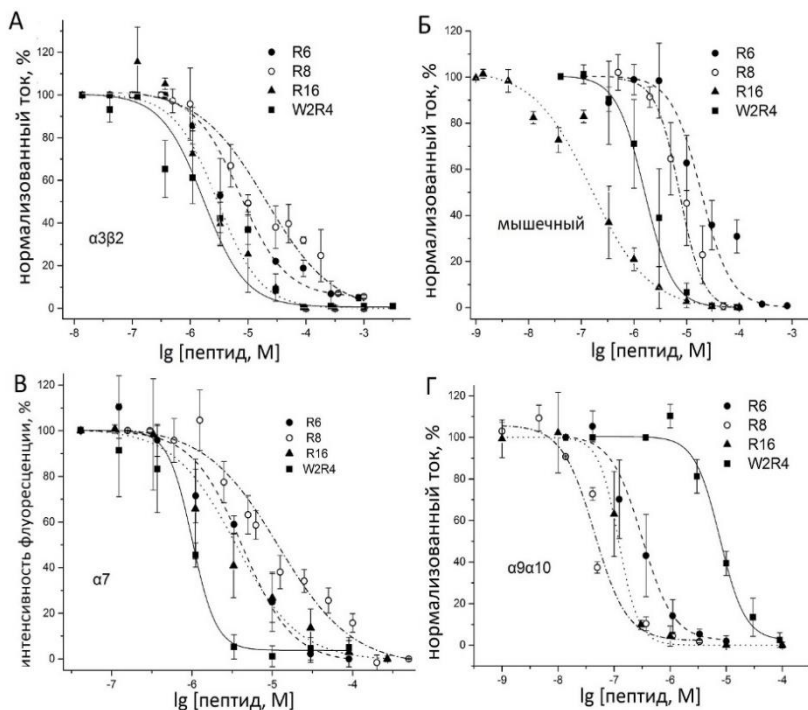


Рисунок 9. Анализ ингибирования ионных токов через nAChP аргинин-содержащими пептидами R6 (●), R8(○), R16 (▲) и W2R4 (■). Токи индуцированы аппликацией 30 мкМ Ацх на ооциты *Xenopus*, экспрессирующие человеческий $\alpha 3 \beta 2$ (А), мышечный $\alpha 12 \beta 1 \gamma$ (Б) и человеческий $\alpha 9 \alpha 10$ (Г) nAChP. (В) Олигоаргининовые пептиды ингибируют внутриклеточный вход кальция через $\alpha 7$ nAChP экспрессированный в клетках *Neuro2a*. Вход кальция индуцирован аппликацией 30 мкМ Ацх. Каждая точка соответствует среднему значению по 2-4 независимым экспериментам \pm стандартное отклонение. Соответствующие значения IC_{50} приведены в **Таблице 2**.

Пептиды R6, R8, R16 и W2R4 проявили активность антагонистов на всех исследованных моделях. Кривые зависимости ионного тока от концентрации антагониста приведены на **Рисунке 9**, а константы IC50 перечислены в **Таблице 2**. Наибольшую активность проявил пептид R16, имеющий величину IC50 160 нМ на мышечном nAHP мыши, а также пептиды R6, R8 и R16, имеющие IC50 на $\alpha 9\alpha 10$ nAHP человека равные 320, 40 и 120 нМ соответственно. Хуже, по сравнению с радиолигандным анализом, прослеживается корреляция активности соединения с длиной его цепи – она однозначно наблюдается лишь для действия соединений ряда R6, R8, R16 на мышечный nAHP.

Таблица 2. Значения констант IC50 для олигоаргининовых пептидов, полученные методами электрофизиологии и кальциевого имиджинга.

Пептид	IC50, мкМ (CI 95%)			
	Мышечный	$\alpha 7$	$\alpha 3\beta 2$	$\alpha 9\alpha 10$
R3	> 50	> 50	> 50	> 50
R6	19.13 (9.16, 40.00)	4.24 (3.45, 5.22)	7.59 (5.25, 10.97)	0.316 (0.181, 0.552)
WR2	> 50	> 50	> 50	> 50
W2R4	1.60 (1.22, 2.11)	1.01 (0.91, 1.12)	1.71 (0.688-4.24)	7.71 (5.46, 10.90)
R8	7.37 (4.87, 11.20)	11.94 (8.45, 16.87)	20.31 (9.08, 45.51)	0.044 (0.026, 0.075)
R16	0.157 (0.085-0.284)	3.53 (2.17, 5.72)	2.61 (1.58, 4.34)	0.12 (0.093, 0.159)

При сравнении значений IC50, полученных методом радиолигандного связывания и кальциевого имиджинга обращает внимание, что пептид W2R4 не конкурирует с радиоактивным бунгаротоксином за связывание с $\alpha 7$ nAHP на клетках GN4C1 и обоими АХСБ. Тем не менее W2R4 ингибирует вход кальция через $\alpha 7$ nAHP с величиной IC50 1 мкМ. Эти данные позволяют предположить неконкурентный механизм ингибирования, опосредованный связыванием пептида за пределами ортостерического сайта nAHP и, как следствие, отсутствием конкуренции с α -бунгаротоксином. Для проверки этой гипотезы были построены кривые зависимости интенсивности Ca^{2+} -индуцированной флуоресценции клеток Neuro2a от концентрации ацетилхолина в отсутствии и в присутствии 1 мкМ W2R4 (см. **Рисунок 10 А**).

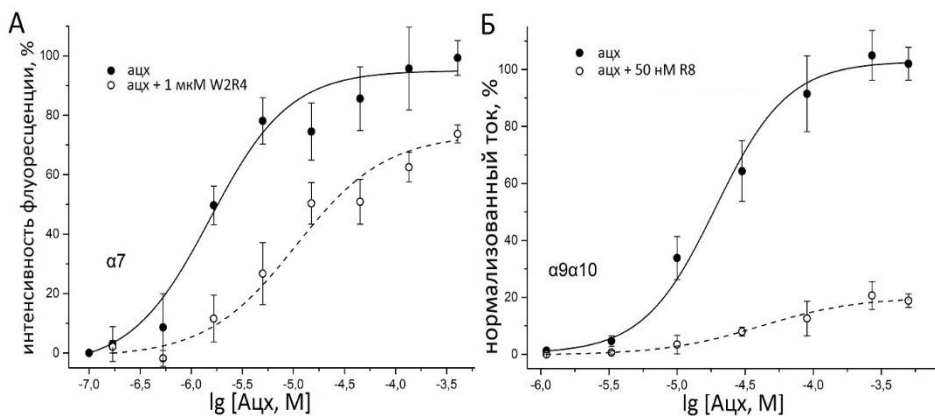


Рисунок 10. (А) Зависимость интенсивности флуоресценции клеток *Neuro2a*, индуцированной входом Ca^{2+} , от концентрации Ацх в отсутствии (●, сплошная линия) и в присутствии (○, прерывистая линия) 1 мкМ W2R4. (Б) Концентрационные кривые зависимости амплитуды индуцированного Ацх ионного тока через экспрессированный в ооцитах $\alpha 9\alpha 10$ nAChR в отсутствии (●, сплошная линия) и в присутствии (○, прерывистая линия) 50 нМ антагониста R8. Каждая точка соответствует среднему значению по 2-4 независимым экспериментам \pm стандартное отклонение.

Опыт показал, что воздействие пептида W2R4 на $\alpha 7$ nAChR приводит к сдвигу кривой ответа на дозу вправо: значение EC_{50} изменяется от 1,53 мкМ (СІ 95 1.21, 2.46 до 10.06 мкМ (СІ 4.09, 27.32). Одновременно заметно снижается максимальная амплитуда ответа в фазе плато: с $95 \pm 4.7\%$ до $73.5 \pm 4.7\%$. Подобная картина хорошо коррелирует с предположением о неконкурентном характере ингибирования $\alpha 7$ nAChR пептидом W2R4.

Наиболее вероятным неортогостерическим сайтом связывания W2R4 на поверхности nAChR является нижняя часть внеклеточного вестибуля ионселективной поры, сформированного внеклеточными доменами nAChR. В своей нижней части вестибуль поры имеет диаметр порядка 20 Å и содержит отрицательно заряженные аминокислотные остатки, такие как D97 в $\alpha 7$ nAChR человека. Геометрические размеры одиночной гуанидиновой группы, порядка 2 Å и приблизительное совпадение этого показателя с ионным радиусом натрия, позволяют предположить возможность проникновения одиночного аргининового остатка пептида в верхнюю часть ионселективной поры. При этом одиночный аргининовый радикал вызвал бы непосредственное блокирование ионного канала на уровне верхней части ТМ домена, а

остальная часть пептида стабилизировала бы это взаимодействие, связываясь с нижней частью внеклеточного вестибюля поры. Аналогичная схема связывания характерна, например, для тетродотоксина в устье натриевого потенциал-зависимого канала. Несмотря на конкуренцию олигоаргининовых пептидов (R6, R8 и R16) с радиоактивным α -бунгаротоксином за ортостерический сайт, похожая схема посадки на уже дополнительный неортостерический сайт в устье ионной поры, так же вероятна и для них.

Для подтверждения этой гипотезы, нами была проведена серия электрофизиологических опытов с пептидом R8 и nAHP $\alpha 9\alpha 10$ типа, экспрессированном в ооцитах *Xenopus laevis*. На данном подтипе рецептора пептид R8 показал максимальную активность и селективность среди всех изученных соединений (IC_{50} 44 нМ, см. **Таблица 2**). Эксперимент по построению кривой ответа nAHP $\alpha 9\alpha 10$ типа на различную концентрацию ацетилхолина в отсутствии и в присутствии 50 нМ R8 (см. **Рисунок 10 Б**) показал значительное понижение максимальной амплитуды ионного тока с $102,9 \pm 3,9\%$ до $18,8 \pm 2,6\%$ и незначительный сдвиг значения EC_{50} вправо с 19,22 мкМ (CI 95 14,02; 26,35) до 36,95 мкМ (CI 95 21,17; 64,51). Подобная картина (понижение максимальной амплитуды ответа) характерна для неконкурентного механизма ингибирования. Таким образом, данный эксперимент подтверждает предположение о том, что несмотря на конкуренцию с радиоактивным α -бунгаротоксином за ортостерический сайт, ингибирующий эффект R8 связан, главным образом, с его эффектом на дополнительный, неортостерический сайт $\alpha 9\alpha 10$ nAHP.

Анализ кривых, полученных во время электрофизиологических экспериментов с пептидом R8 и $\alpha 9\alpha 10$ nAHP, приводит к ряду выводов. Одномоментное нанесение ацетилхолина в концентрации 30 или 270 мкМ в смеси со 120 нМ R8 практически не изменяет амплитуду ионного тока через рецептор в сравнении с контрольным нанесением чистого ацетилхолина, однако значительно снижает суммарное «количество» тока (**Рисунок 11 А, Б**). Эта величина, называемая в англоязычной литературе «net charge» или общий заряд, пропорциональна площади над кривой ионного тока и характеризует количество ионов, прошедших через рецепторы за единицу времени. Подобный эффект можно объяснить сравнительно медленной кинетикой действия R8. Преинкубация пептида R8 в течении 5 минут с последующим нанесением на ооцит смеси R8 с ацетилхолином наоборот значительно снижает и максимальную амплитуду, и количество тока (см.

Рисунок 11 В, Г). Следует заметить, что увеличение концентрации ацетилхолина с 30 до 270 мкМ не влияет на относительную силу ингибирования, как в случае одномоментной аппликации смеси пептида с ацетилхолином (**Рисунок 11 А, Б**), так и в случае 5 минутной преинкубации пептида (см. **Рисунок 11 В, Г**). Это наблюдение хорошо согласуется с предположением о преимущественно неконкурентном механизме ингибирования.

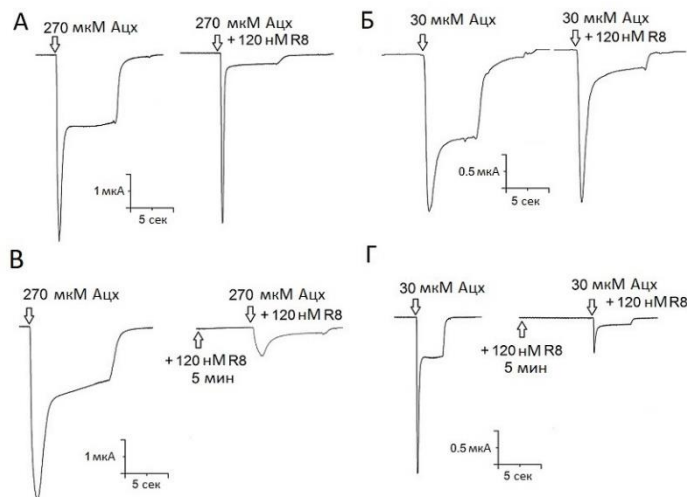


Рисунок 11. Кривые ионных токов, через мембраны ооцитов *Xenopus*, экспрессирующих $\alpha 9\alpha 10$ nAHP. Токи индуцированы аппликацией смеси (А) 270 и 30 мкМ Ацх со 120 нМ пептида R8. Рядом представлены кривые контрольных токов, индуцированных чистым Ацх. R8 практически не влияет на амплитуду тока, но сокращает количество тока, прошедшего через мембрану. Кривые токов, индуцированных смесью (В) 270 и (Г) 30 мкМ Ацх с пептидом R8 после 5 минутной преинкубации со 120 нМ R8. Как амплитуда ионного тока, так и количество тока, прошедшего через мембрану, заметно снижается под действием пептида.

Характерным признаком непосредственного блокирования ингибитором ионной поры рецептора служит зависимость силы ингибирования от разности потенциалов на мембране. В ходе следующего опыта нами были получены кривые лиганд-индуцированного ионного тока для различных значений потенциала в отсутствии и в присутствии 120 нМ R8 (см. **Рисунок 12 А-Г**). Хорошо заметно, что относительная сила ингибирования зависит от величины мембранного потенциала – чем отрицательнее он, тем

эффективнее ингибирование тока (более 75% ингибирования при -120 мВ и около 50% при -60 мВ), при увеличении потенциала в положительную сторону эффективность ингибирования заметно снижается (лишь около 10% ингибирования при +60 мВ).

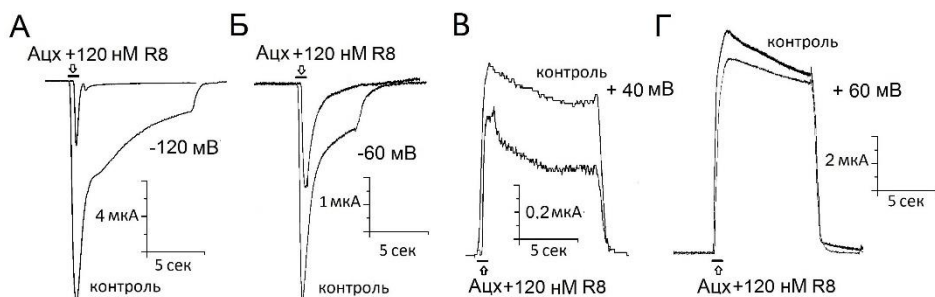


Рисунок 12. Сила ингибирования $\alpha 9\alpha 10$ nAChR, экспрессированного в ооцитах *Xenopus laevis*, пептидом R8, зависит от поддерживаемого потенциала на мембране (holding potential). Ток, индуцированный 30 мкМ Ацх в отсутствие пептида (контроль) и в присутствии 120 нМ пептида R8 после 5 минутной преинкубации, при поддерживаемом потенциале (А) -120, (Б) -60, (В) +40, (Г) +60 мВ соответственно.

Данный эффект может быть объяснён связыванием пептида R8 в районе внеклеточного вестибуля ионселективной поры. Отрицательные значения потенциала, соответствующие входящему току катионов, способствуют прочному удержанию молекулы в сайте связывания и эффективной блокаде канала. В случае же положительных значений потенциала, лиганд-индуцированный ионный ток изменяет своё направление со входящего на выходящий и легко выбивает молекулу R8, закрывающую пору с внешней стороны. В тоже время, при положительном значении потенциала R8 всё ещё может взаимодействовать с ортостерическим сайтом рецептора, что и может быть объяснением небольшого, но заметного ингибирования при +60 мВ.

Кроме опытов со ступенчатым изменением потенциала на мембране ооцита, нами была получена вольт-амперная характеристика $\alpha 9\alpha 10$ nAChR – эксперимент по регистрации индуцированного ацетилхолином ионного тока в присутствии и в отсутствии R8 при быстром (50 мс) и непрерывном (протокол «ramp») изменении потенциала от -150 до +100 мВ. В качестве контроля была записана вольт-амперная характеристика рецептора под действием 1 мкМ α -кобратоксина. По виду кривых вольт-амперных характеристик заметно (см **Рисунок 13 А, Б**), что 5 минутная преинкубация ооцита с 1 мкМ α -кобратоксина

значительно сокращает амплитуду как входящего (область отрицательных значений по оси ординат), так и выходящего тока (область положительных значений по оси ординат), индуцированного 10 мкМ ацетилхолина. При этом α -кобратоксин, являясь классическим ортостерическим антагонистом нАХР, не изменяет значение потенциала реверсии – потенциала, при котором ионный ток меняет своё направление (значение абсцисс, соответствующее нулю по оси ординат на графике). Преинкубация ооцита со 120 нМ R8 уменьшает амплитуду лиганд-индуцированного тока при отрицательных значениях и

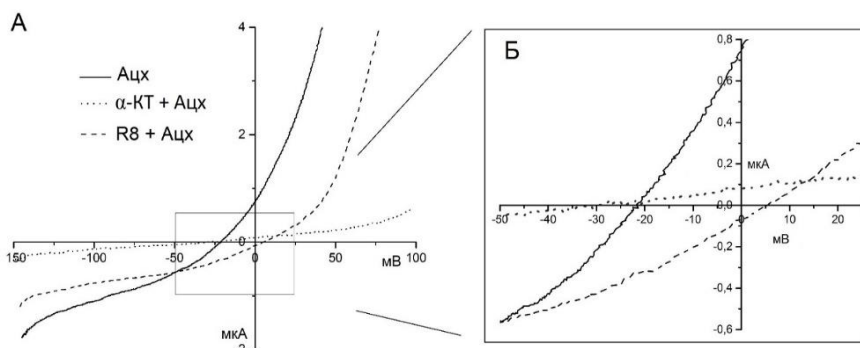


Рисунок 13. (А). Вольт-амперная характеристика $\alpha 9 \alpha 10$ нАХР, экспрессированного в ооцитах *Xenopus laevis*. Ток индуцирован 10 мкМ ацетилхолина и записан в фазе плато (3 сек после аппликации) в отсутствии антагонистов (непрерывная линия), после 5 мин инкубации с 1 мкМ α -кобратоксина (пунктирная линия). Ионный ток, индуцированный аппликацией 30 мкМ Ацх и 120 нМ R8 после 5 минутной преинкубации со 120 нМ пептида R8 (штриховая линия). (Б). Увеличенный масштаб. Виден сдвиг значения потенциала реверсии нАХР под действием пептида R8 с -22 до +5 мВ. Классический конкурентный антагонист α -кобратоксин не оказывает влияния на значение потенциала реверсии.

сдвигает вольт-амперную характеристику вправо, изменяя значение потенциала реверсии с -22 мВ до +5 мВ.

Подобное отличие во влиянии α -кобратоксина и пептида R8 на вид вольт-амперной характеристики $\alpha 9 \alpha 10$ нАХР можно объяснить различными механизмами действия. Несмотря на то, что α -кобратоксин является положительно заряженным белком (рI 8,6), его ингибирующий эффект на нАХР обусловлен исключительно блокированием ортостерического сайта и практически не зависит от значения потенциала мембраны. В то же время, вероятно, что несмотря на способность связываться с ортостерическим сайтом нАХР (результаты радиолигандного анализа), эффект R8 на $\alpha 9 \alpha 10$ нАХР обусловлен в

первую очередь его потенциал-зависимым действием на дополнительный аллостерический сайт. Наиболее логичным расположением такого сайта выглядит внеклеточный вестибулю ион-селективной поры, что и объясняет изменение её ионной проницаемости (сдвиг потенциала реверсии в положительную сторону) под действием пептида R8.

В семейство сус-петельных рецепторов помимо катионных каналов, также входят и анионные, в частности – ГАМКАР, разделяющий с нАХР множество структурных черт. Более того нАХР и ГАМКАР имеют общие ортостерические лиганды, в число которых, как было продемонстрировано в предыдущих работах нашего Отдела, входит α -кобратоксин. Принимая во внимание способность аргинин-содержащих пептидов связываться с ортостерическим сайтом нАХР, мы приняли решение исследовать их возможные взаимодействия и с ГАМКАР. Наши предыдущие исследования действия аргинин-содержащих пептидов на нАХР, продемонстрировали их возможное действие на район ион-селективной поры нАХР. Следуя логике предположения о блокирующем эффекте олигоаргининовых пептидов на канал нАХР, можно ожидать, что эти положительно-заряженные пептиды не будут способны к надёжному связыванию с ион-селективной порой ГАМКА рецептора, имеющей на своей внутренней поверхности ряд положительно-заряженных аминокислотных остатков, обеспечивающих её анионную селективность. В таком случае от олигоаргининовых пептидов стоит ждать значительно менее выраженного ингибирования лиганд-индуцированного ионного тока через ГАМК-А рецептор, обусловленного лишь связыванием пептидов в ортостерическом сайте и их возможной конкуренцией с ГАМК.

Для проверки этой гипотезы была проведена серия опытов по тестированию набора из всех шести пептидов (R3, R6, R8, R16, WR2, W2R4) на предмет активности по отношению к ГАМКАР. В ходе эксперимента нами был использован метод двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК-А рецептор человека. Из всех изученных пептидов лишь W2R4 проявил незначительную активность ингибитора ГАМКАР в концентрации до 50 мкМ (данные не приведены). Согласно нашей гипотезе, подобное различие в действии аргинин-содержащих пептидов на нАХР и ГАМКАР связано с различной ионной селективностью ионных каналов ГАМКАР и нАХР.

Катионные полимеры – ингибиторы НАХР

Катионные полимеры (КП), в том числе содержащие остатки аргинина или алифатических аминов, широко известны в качестве средств внутриклеточной доставки молекул нуклеиновых кислот. Обладая положительным зарядом, эти соединения легко формируют комплексы с отрицательно заряженными молекулами, способствуя их переносу через плазматическую мембрану. Катионные полимеры способны к биодegradации и рассматриваются в качестве векторов доставки нуклеиновых кислот к клеткам *in vivo*. Кроме того, эффект увеличенной проницаемости и удержания делает наночастицы из катионных полимеров перспективными транспортерами для направленной, таргетной доставки в опухоль как традиционных химиотерапевтических препаратов, так и терапевтических субстанций на основе нуклеиновых кислот, в частности siРНК.

Нами была исследована активность ряда катионных полимеров по отношению к различным НАХР и их моделям. Формулы изученных соединений приведены на **Рисунке 14 А**. Стоит обратить внимание, что в отличие от большинства изучаемых нами лигандов НАХР, каждый из катионных полимеров представляет собой сложную смесь фракций разного молекулярного веса, поэтому оценка активности данных соединений в молях не представляется возможной и заставляет оперировать лишь размерностями мг/л. В тоже время, данные соединения рассматриваются как перспективные терапевтические агенты,

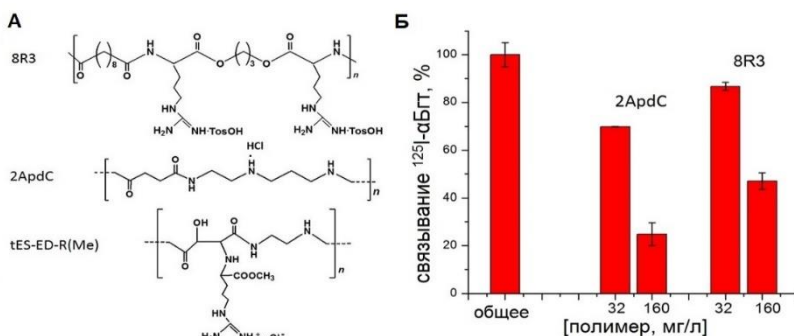


Рисунок 14. (А) Формулы катионных полимеров, исследованных в рамках диссертационной работы. (Б) Конкуренция полимеров 2ApdC и 8R3 с ^{125}I -αБГТ за связывание с человеческим α7 НАХР в клетках GH4C1. tES-ED-R(Me) не проявил ингибирования с ^{125}I -αБГТ до 100 мг/л.

что придаёт важность изучению их возможных холинергических эффектов и делает полезной даже столь грубую оценку их активности.

Радиолигандный анализ на клетках линии GH4C1 показал, что вещества 2ApdC и 8R3 конкурируют с радиомеченным бунгаротоксином за связывание с $\alpha 7$ nAHP (см. **Рисунок 14 Б**), в то время как tES-ED-R(Me) не проявил активности до концентрации 100 мг/л. Результаты связывания свидетельствуют о взаимодействии катионных полимеров 2ApdC и 8R3 с ортостерическим сайтом nAHP. Для выяснения функционального эффекта данных соединений были проведены опыты по кальциевому имиджингу и двухэлектродной записи потенциала на ооцитах. При исследовании методом кальциевого имиджинга на клетках Neuro2a, временно экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP, соединения 2ApdC и 8R3 проявили свойства ингибиторов nAHP в диапазоне концентраций 1-8 мг/л. Соединение tES-ED-R(Me) не проявило активности в отношении nAHP $\alpha 7$ типа до концентрации 100 мг/л. В электрофизиологическом исследовании методом двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих мышечный nAHP, активность антагонистов проявили соединения tES-ED-R(Me) и 2ApdC в диапазоне значений IC50 2 – 7 мг/л (см. **Рисунок 15 А, Б**). Значения IC50 для исследованных соединений приведены в **Таблице 3**.

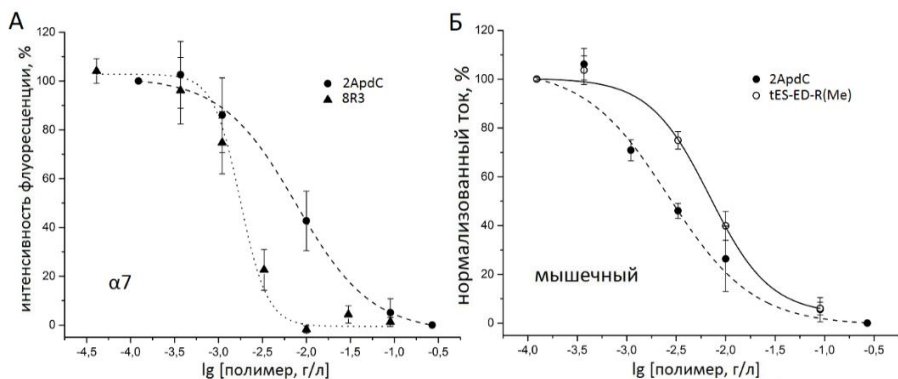


Рисунок 15. (А) Ингибирование входа ионов Ca^{2+} через человеческий $\alpha 7$ nAHP экспрессированный в клетках Neuro2a. Ионный ток индуцирован 30 мкМ Ацх. Кривая зависимости интенсивности ингибирования для полимеров 2ApdC (●) и 8R3 (▲). (Б) Ингибирование лиганд-индуцированных ионных токов через мышечный nAHP мышечного типа, экспрессированный в ооцитах *X. laevis*, катионными полимерами 2ApdC (●) и tES-ED-R(Me) (○).

Таблица 3. Значение констант ингибирования IC50 для действия катионных полимеров на мышечный и $\alpha 7$ nAHP.

Вещество	IC50, мг/л (CI 95%)	
	Мышечный	$\alpha 7$
tES-ED-R(Me)	6.86 (5.34, 8.86)	>100
2ApdC	2.65 (1.88, 3.74)	7.69 (5.83, 10.13)
8R3	Не определена	1.77 (1.04, 3.01)

ВЫВОДЫ

1) Установлено, что новые агонисты ГАМК-А рецептора, выделенные из секрета паротидных желёз жабы *Bufo bufo*, представляют собой аргининовые производные дикарбоновых кислот – N-адипиларгинин, N-пимелоиларгинин и N-субериларгинин.

2) Обнаружено, что $\alpha\delta$ -бунгаротоксин-1 из яда *Bungarus candidus*, новый аналог классического α -бунгаротоксина, обратимо ингибирует как гетеромерный нейрональный nAHP $\alpha 3\beta 2$ типа, так и мышечный nAHP.

3) Показано, что синтетические фрагменты центральной петли II белков Lynx1 и SLURP1 семейства Луб/uPAR проявляют свойства антагонистов $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAHP, частично воспроизводя активность полноразмерных белков.

4) Установлено, что полиаргининовые пептиды представляют собой новое семейство пептидных антагонистов nAHP. Пептиды R6, R8, R16, W2R4 являются ингибиторами nAHP $\alpha 7$, $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 3\beta 2$ и мышечного типов.

5) Сочетанием методов радиолигандного анализа и электрофизиологии выявлен неконкурентный механизм ингибирования $\alpha 7$ nAHP пептидом W2R4 и смешанный механизм ингибирования $\alpha 9\alpha 10$ nAHP пептидом R8.

6) Установлено, что клинически перспективные векторы доставки нуклеиновых кислот – катионные полимеры, содержащие гуанидино- и/или дизаменские аминогруппы, являются ингибиторами nAHP $\alpha 7$ и мышечного типов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Lebedev D. S.**, Ivanov, I. A., Kryukova, E. V., Starkov, V. G., Tsetlin, V. I., Utkin, Y. N. Arginine derivatives of dicarboxylic acids from the parotid gland secretions of common toad *Bufo bufo* - New agonists of ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017 – Т. 474 – №1 – С. 178-182.
2. Utkin Y. N., Kuch U., Kasheverov I. E., **Lebedev D. S.**, Cederlund E., Molles B. E., Jornvall H., Polyak I., Ivanov I. A., Prokopev N.A., Ziganshin R. H., Jornvall H., Alvelius G., Chanhome L., Warrell D. A., Mebs D., Bergman T., Jornvall H. Novel long-chain neurotoxins from *Bungarus candidus* distinguish the two binding sites in muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. Biochemical Journal. – 2019 – Т. 476 – №8 – С. 1285-1302.
3. Kryukova E.V., Egorova N. V., Kudryavtsev D.S., **Lebedev D. S.**, Garifulina A. I., Kasheverov I. E., Utkin Y. N., Tsetlin. From Synthetic Fragments of Endogenous Three-Finger Proteins to Potential Drugs. Frontiers in Pharmacology. – 2019 – Т. 10. – С. 748.
4. Kryukova E. V., Ivanov I., **Lebedev D. S.**, Spirova E. N., Egorova N. S., Zouridakis M., Kasheverov I. E., Tzartos S. J., Tsetlin V. I. Orthosteric and/or Allosteric Binding of α -Conotoxins to Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Models. Marine drugs. – 2018 – Т. 16 – №12 – С. 460.
5. Kryukova E. V., Ivanov, I. A., **Lebedev D. S.**, Spirova E. N., Senko D. A., Egorova N. S., Kasheverov I. E., Tsetlin V. I. Polyarginine Peptides As a New Class of Ligands of Nicotinic Acetylcholine Receptors. In Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2018 – Т. 483 – №1 – С. 313-315.
6. **Lebedev D.S.**, Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N. V., Timofeev N. D., Spirova E. N., Tufanova E. Yu., Kudryavtsev D. S., Kasheverov I. E., Zouridakis M., Katsarava R., Zavrashvili N., Iagorshvili I., Tzartos S. J., Victor I. Tsetlin V. I. Oligoarginine Peptides, a New Family of nAChR Inhibitors. Molecular Pharmacology. – 2019 – Т. 96 – №5 – С. 664-673.

Тезисы докладов на конференциях

1. Крюкова Е.В., Лебедев Д.С., Иванов И.А., Егорова Н.В., Кудрявцев Д.С., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И. Полиаргинины как новый класс ингибиторов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. 2019. IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи, Дагомыс.
2. Kasheverov I.E., Lebedev D.S., Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N.V., Kudryavtsev D.S., Tsetlin V.I. Oligoarginine peptides, a new family of nicotinic acetylcholine receptors' inhibitors. 2019. The 44th FEBS Congress, Krakow, Poland.
3. Lebedev D.S., Ivanov I. A., Kryukova E.V., Starkov V.G., Tsetlin V.I. and Utkin Yu.N. Arginine derivatives of dicarboxylic acids from the parotid gland secretions of common toad *Bufo bufo* – new agonists of ionotropic γ -aminobutyric acid receptors. 2018. The 19th EU-IST Congress, Yerevan, Armenia.

4. Лебедев Д.С., Иванов И.А., Крюкова Е.В., Старков В.Г., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. Лиганды цис-петельных рецепторов из яда серой жабы *Bufo bufo*. 2016. XXVIII научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" Москва, Россия.