

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
чл.-корр. РАН, профессор,
д.х.н. Цетлин Виктор Ионович

Москва, 2019

Оглавление

1. Введение	4
1.1 Актуальность темы исследований.....	4
1.2 Степень разработанности темы исследования.....	5
1.3 Цели и задачи.....	6
1.4 Научная новизна и практическая значимость работы.....	6
1.5 Методология и методы исследования.....	7
1.6 Положения, выносимые на защиту	8
1.7 Степень достоверности и апробация результатов	9
2. Обзор литературы	11
2.1 Введение.....	11
2.2 Принципы организации сус-петельных рецепторов на примере nAХР и ГАМКАР	12
2.2.1 Внеклеточный домен	14
2.2.2 Трансмембранный домен	17
2.2.3 Цитоплазматический домен.....	21
2.2.4 Механизм активации nAХР и ГАМК-А рецепторов.....	22
2.2.5 Десенситизация и цикл nAХР и ГАМК-А рецепторов	23
2.3 Лиганды nAХР.....	26
2.3.1 Оростерические агонисты	26
2.3.2 Неполные агонисты	26
2.3.3 Конкурентные антагонисты	28
2.3.4 Блокаторы канала.....	32
2.3.5 Позитивные аллостерические модуляторы	35
2.3.6 Аллостерические агонисты.....	39
2.3.7 Молчаливые (silent) агонисты	41
2.4 Участие nAХР в патогенезе, фармакология nAХР.....	42
2.4.1 nAХР и табачная зависимость	42
2.4.2 nAХР и онкогенез	43
2.4.3 Таргетная доставка к $\alpha 7$ nAХР экспрессирующим клеткам	48
2.4.4 nAХР, воспаление и боль	48

2.5 Заключение	54
3. Материалы и методы.....	55
3.1 Материалы	55
3.2 Методы	57
3.2.1 Экстракция компонентов цельного лиофилизованного яда серой жабы <i>Bufo bufo</i> , гель-проникающая и обращённо-фазовые хроматографии	57
3.2.2 Электрофизиологическое исследование методом локальной фиксации потенциала («Patch-clamp») в конфигурации «Whole-cell».....	57
3.2.4 Трансформация компетентных клеток <i>E. Coli</i> и выделение плазмид	59
3.2.5 Культивирование клеток	60
3.2.6 Трансфекция клеток линий Neuro2a и HEK293.....	60
3.2.7 Кальциевый имиджинг на клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP.....	61
4. Результаты и обсуждение	63
4.1 Введение.....	63
4.2 Выделение агонистов ГАМКАР из секрета паротидных желёз серой жабы <i>Bufo bufo</i>	63
4.3 Исследование свойств $\alpha\delta$ -бунгаротоксина – нового трёхпетельного токсина из яда малайского крайта <i>Bungarus candidus</i>	66
4.4 Анализ активности фрагментов петли II белков семейства L γ 6/uPAR.....	71
4.5 Изучение электрофизиологических свойств йодированных производных конотоксинов GeXIVA и RgIA	75
4.6 Олигоаргининовые пептиды – новое семейство ингибиторов nAHP	77
4.7 Катионные полимеры – ингибиторы nAHP	94
5. Выводы	98
6. Заключение	99
7. Список сокращений	102
8. Список литературы	103

1. Введение

Необходимость своевременного реагирования на изменение условий внешней среды поставила многоклеточных животных перед потребностью в развитии единой структуры, выполняющей функции регуляции и сигналинга внутри организма. Место такой структуры заняла нервная система, взявшая на себя роль центрального регулятора чувствительности и двигательной активности организмов. Напрямую, а также через тесную ассоциацию с эндокринной и иммунной системами, нервная система управляет работой большинства внутренних органов, участвует в поддержании постоянства внутренней среды организма и его ответа на внешние угрозы.

Передача сигнала между клетками в рамках нервной системы происходит преимущественно с помощью химических синапсов, центральным компонентом которых являются лиганд-управляемые ионные каналы. Активность этих белков, открывающих ион-селективный канал в ответ на связывание со специфическим нейромедиатором, позволяет гибко управлять изменением мембранного потенциала клетки-эффектора, резко расширяя разнообразие синаптических взаимодействий между клетками.

1.1 Актуальность темы исследований

Крупнейшим и наиболее изученным семейством лиганд-управляемых ионных каналов позвоночных является семейство *cys*-петельных рецепторов. Оно 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 (5HT3Р) и слабо изученное семейство цинк-активируемых ионных каналов. Наличие катионных каналов позволяет реализовать возбуждающую синаптическую передачу, а благодаря анион-селективным каналам становится возможна тормозная синаптическая передача. Отдельные возможности для расширения разнообразия

архитектуры нейронных сетей даёт возможность пресинаптической локализации Cys-петельных рецепторов, например, таких как никотиновые ацетилхолиновые рецепторы $\alpha 7$ -типа, активность которых модулирует интенсивность выброса ряда нейромедиаторов из синаптических окончаний.

На сегодняшний день никотиновый ацетилхолиновый и ГАМК-А рецепторы остаются востребованными фармакологическими мишенями. Мышечные nAChR – мишень действия миорелаксантов, а нейрональные подтипы nAChR – препаратов для терапии деменции и нейродегенеративных заболеваний. Связыванием же с ГАМК-А рецептором в свою очередь обусловлено действие транквилизаторов-бензодиазепинов и таких известных анестетиков как пропофол и тиопентанал натрия.

1.2 Степень разработанности темы исследования

Без сомнения никотиновые ацетилхолиновые и ГАМК-А рецепторы являются одними из наиболее важных и изученных семейств рецепторов, входящих в суперсемейство Cys-петельных лиганд-управляемых ионных каналов. Исключительная роль nAChR в нейромышечной передаче с самого начала поставила их в фокус внимания исследователей, занимающихся феноменом нейрорецепции. Нахождение подходящих модельных объектов (электрический орган рыб) и инструментов выделения (трёхпетельные токсины змей) позволили исследователям уже в середине 70-х выделить и охарактеризовать первый представитель данного класса – никотиновый ацетилхолиновый рецептор мышечного типа, ставший также первым выделенным и охарактеризованным нейрорецептором в истории. Более поздние работы по клонированию рецепторов и их изучению методами электрофизиологии привели к разносторонней характеристике всего множества подтипов ГАМКАР и nAChR и глубокому пониманию фундаментальных биохимических основ синаптической передачи.

Особо стоит выделить вклад структурной биологии в понимание принципов работы nAChR и ГАМКАР. В начале 2000-х кристаллизация ацетилхолин-

связывающих белков - структурных аналогов внеклеточного домена nAChR, дала представление о механизмах связывания ортостерических лигандов и открыла путь к их направленному созданию. В последние годы исследования в области Cys-петельных рецепторов получили мощный импульс со стороны структурной биологии. Был опубликован ряд кристаллических структур nAChR и ГАМК-А рецепторов, а также их аналогов прокариотического происхождения (GLIC и ELIC) с высоким разрешением. Эти работы позволили лучше понять механизм активации рецепторов, конфигурацию сайтов связывания лиганда, а также приоткрыли биохимические основы явления десенситизации, особенно интересного в контексте направленного создания аллостерических модуляторов данных рецепторов.

1.3 Цели и задачи

Цель настоящей работы – поиск и изучение новых лигандов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) 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 nAChR и ГАМК-А рецепторам, выделены действующие вещества и установлена их структура.
- 2) Сконструированы и синтезированы новые лиганды nAChR и ГАМК-А рецепторов, проведена оценка их функциональной активности и установлен механизм действия.

1.4 Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе настоящей работы впервые выделен и исследован широкий спектр лигандов nAChR 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 nAХР, а также сделаны выводы о структурных детерминантах его уникальной кинетики и специфичности в отношении различных подтипов nAХР.

Впервые изучены свойства синтетических фрагментов петли II белков семейства Lуб/uPAR и продемонстрирован их потенциал в качестве селективных ингибиторов nAХР $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ типов. Сделаны выводы о возможных структурных предпосылках их селективности. Следующим шагом на пути исследования пептидных лигандов nAХР 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 nAХР.

Главным достижением данной работы является открытие нового класса ингибиторов nAХР – 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.

1.5 Методология и методы исследования

Методы работы представляют собой комбинация классических методов биохимии природных соединений (гель-фильтрация, обращённо-фазовая хроматография) с методами электрофизиологии (локальная фиксация потенциала на клетках НЕК293, двухэлектродная фиксация потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*) и флуоресцентного имиджинга (кальциевый имиджинг на клетках линии Neuro2a), требующих широкого вовлечения исследователя в клеточные и молекулярно-биологические работы. Выбор такого широкого набора методов

позволил дать разностороннюю характеристику исследованным веществам, оценить их возможный функциональный эффект и сделать выводы о возможностях их практического применения.

1.6 Положения, выносимые на защиту

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 $\alpha3\beta2$ типа, так и мышечный nAHP.

3) Показано, что синтетические фрагменты центральной петли II белков Lynx1 и SLURP1 семейства Ly6/uPAR, проявляют свойства антагонистов $\alpha3\beta2$ и $\alpha9\alpha10$ 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 $\alpha7$, $\alpha9\alpha10$, $\alpha3\beta2$ и мышечного типов.

5) Сочетанием методов радиолигандного анализа и электрофизиологии выявлен неконкурентный механизм ингибирования $\alpha7$ nAHP пептидом W2R4 и смешанный механизм ингибирования $\alpha9\alpha10$ nAHP пептидом R8.

6) Установлено, что клинически перспективные векторы доставки нуклеиновых кислот – катионные полимеры, содержащие гуанидино- и/или дизамещенные аминокислотные группы, являются ингибиторами nAHP $\alpha7$ и мышечного типов.

1.7 Степень достоверности и апробация результатов

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Lebedev D. S., Ivanov, I. A., Kryukova, E. V., Starkov, V. G., Tsetlin, V. I., & Utkin, Y. N. (2017). 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* 474(1): 178-182.

Utkin, Y. N., Kuch, U., Kasheverov, I. E., Lebedev, D. S., Cederlund, E., Molles, B. E., ... & Jornvall, H. (2019). Novel long-chain neurotoxins from *Bungarus candidus* distinguish the two binding sites in muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Journal*, 476(8), 1285-1302.

Kryukova E.V., Egorova N. V., Kudryavtsev D.S., Lebedev D.S. ... & Utkin Y. N. & Tsetlin (2019) From Synthetic Fragments of Endogenous Three-Finger Proteins to Potential Drugs. *Frontiers in Pharmacology* 10, 748.

Kryukova, E., Ivanov, I., Lebedev D., Spirova, E., Egorova, N., Zouridakis, M., ... & Tsetlin, V. (2018). Orthosteric and/or Allosteric Binding of α -Conotoxins to Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Models. *Marine drugs*, 16(12): 460.

Kryukova, E. V., Ivanov, I. A., Lebedev, D. S., Spirova, E. N., Senko, D. A., Egorova, N. S., ... & Tsetlin, V. I. (2018). Polyarginine Peptides As a New Class of Ligands of Nicotinic Acetylcholine Receptors. In *Doklady Biochemistry and Biophysics* 483(1): 313-315.

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. (2019) Oligoarginine Peptides, a New Family of nAChR Inhibitors. *Molecular Pharmacology* 96 (5): 664-673.

Результаты диссертации были доложены 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.

2. Обзор литературы

2.1 Введение

Число нейронов в среднем мозге человека приближается к ста миллиардам, а количество связей между ними исчисляется триллионами [1]. Основным способом обмена информацией между нервными клетками является синаптическая передача. Особое значение имеют быстрые химические синапсы, передающие сигнал на субмикрометровом расстоянии во временном масштабе миллисекунд [2]. Именно эти характеристики позволили химическим синапсам стать важнейшим компонентом межнейрональной и нервно-мышечной сигнализации.

В основе работы химического синапса лежит процесс выброса нейромедиатора и его последующего распознавания нейрорецептором - лиганд-зависимым ионным каналом. Спустя миллисекунды после выброса нейромедиатора в синаптическую щель, лиганд-зависимые ионные каналы связываются с ним, что приводит к открыванию их ион-селективных пор. По открытому каналу каждого подобного рецептора внутрь клетки заходят ионы, изменяя значение потенциала на мембране, что может привести к возбуждению или ингибированию постсинаптического потенциала действия.

Центральное место среди лиганд-управляемых ионных каналов занимают рецепторы *cys*-петельного типа. В это обширное семейство входят такие известные рецепторы как никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), рецептор γ -аминомасляной кислоты типа A (ГАМКАР), глициновый рецептор (ГлиР), серотониновый 5-гидрокситриптаминовый рецептор типа 3 (5HT₃R) и некоторые другие. Упомянутые выше рецепторы вовлечены во множество важнейших физиологических процессов. В частности, различные подтипы nAChR являются ключевыми участниками нервно-мышечной передачи, играют важную роль в регуляции воспалительного ответа, болевой чувствительности, а также пролиферации клеток и апоптоза. Всё это ставит их в число важнейших мишеней для создания лекарственных препаратов.

В данном обзоре литературы приводятся сведения о строении cys-петельных рецепторов на примере nAХР и ГАМКАР, так же разбирается вопрос клинической значимости различных подтипов nAХР. Отдельная глава посвящена лигандам различных подтипов nAХР и их фармакологическому потенциалу.

2.2 Принципы организации cys-петельных рецепторов на примере nAХР и ГАМКАР

Структурно, nAХР и ГАМКАР разделяют черты строения общие для всего семейства cys-петельных рецепторов. Рецептор состоит из пяти субъединиц, образующих центральную ион-селективную пору. Каждая из субъединиц сформирована одной аминокислотной последовательностью длиной 440-490 (для разных субъединиц) аминокислотных остатков.

Всего известно 17 видов субъединиц nAХР: $\alpha 1-10$, $\beta 1-4$, γ , δ и ε (у млекопитающих отсутствует $\alpha 8$) [3]. Субъединицы способны к образованию гетеро- и гомопентамерных рецепторов различной стехиометрии. Наиболее известным типом гетеромерных рецепторов является мышечный nAХР, состава $\alpha 1\beta 1\alpha 1\delta\varepsilon$ (взрослый) и $\alpha 1\beta 1\alpha 1\delta\gamma$ (эмбриональный) и нейрональный nAХР $\alpha 4\beta 2$ -типа. Самым известным типом гомомерных nAХР является nAХР $\alpha 7$ -типа (См. **Рисунок 1**). GABA A рецептор ещё более разнообразен и включает 19 субъединиц: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, ε , δ , θ , π типов [4]. Так же в это число включены субъединицы $\rho 1-3$ типа, хотя многие авторы и выделяют их в виде отдельного подсемейства ГАМК-С рецепторов [5]. Сборка этих субъединиц в различных комбинациях порождает значительное разнообразие ГАМКАР [6].

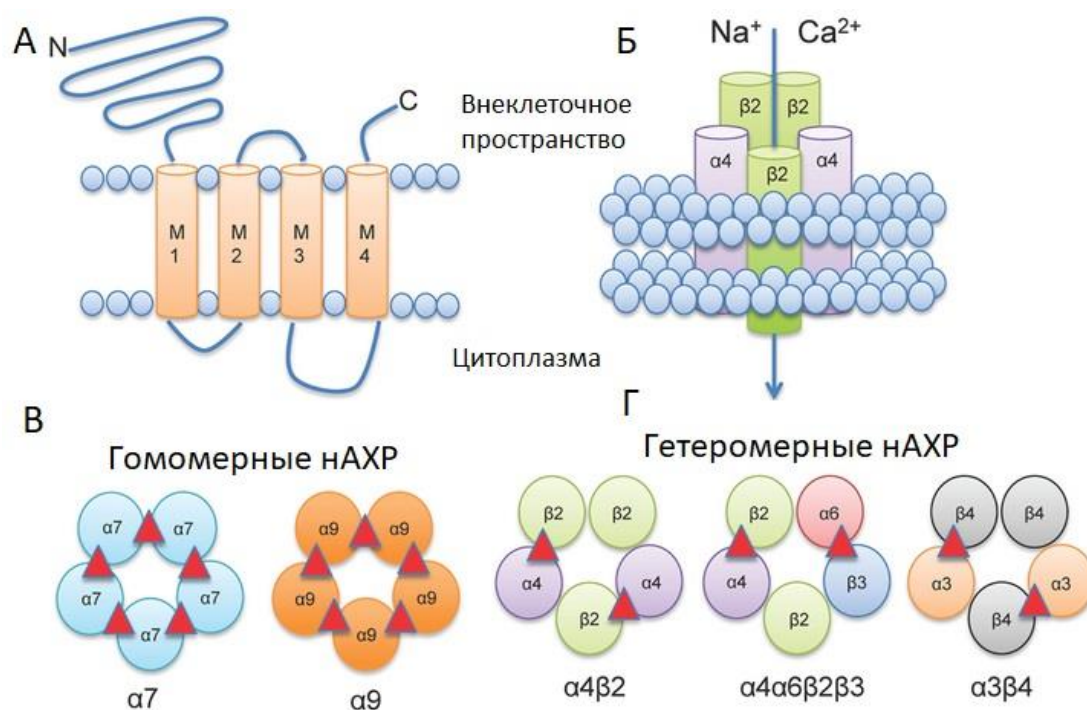


Рисунок 1. (А) Общий вид организации субъединицы nAChR, видны внеклеточный N-концевой домен, четыре трансмембранных α -спирали и внутриклеточная петля M3-M4. (Б) Общий план организации nAChR. Пять субъединиц, сгруппированных вокруг центральной поры, формируют лиганд-управляемый катионный канал. (В) Примеры гомомерных nAChR: на стыке пяти одинаковых субъединиц образуются пять идентичных ортостерических сайтов связывания агониста. (Г) Примеры гетеромерных nAChR: на стыке субъединиц образуются неравнозначные сайты, лишь часть из которых функциональна (По [8] с изм.).

У обоих рецепторов сайт связывания агониста (ортостерический сайт рецептора) расположен во внеклеточном домене рецептора в месте контакта двух субъединиц и имеет ассиметричную структуру (+- интерфейс). У nAChR функциональный сайт связывания формируется лишь на стыке α - α или α - β / γ / δ / ϵ субъединиц, при этом $\alpha 5$ и $\beta 3$ субъединицы не способны к формированию функционального сайта связывания. У ГАМКАР функциональный сайт связывания ГАМК находится на стыке β - α субъединиц [7].

Основной принцип работы как nАХР, так и ГАМКАР основан на том, что в момент активации рецептора происходит открывание селективного ионного канала и проход через него потока ионов. При этом nАХР представляет собой селективный катионный канал, а ГАМКАР – анионный.

N-концевая последовательность каждой из субъединиц образует внеклеточный домен (ВД), после чего последовательность белковой цепи четыре раза проходит через мембрану, образуя четыре альфа-спирали трансмембранного домена (ТМ1-4). При этом внутриклеточная петля между доменами ТМ3-ТМ4 формирует альфа-спираль внутриклеточного домена, а короткий С-конец последовательности после спирали ТМ4 обращён во внеклеточное пространство.

2.2.1 Внеклеточный домен

АХР является наиболее изученным членом семейства cys-петельных рецепторов. Внеклеточный домен nАХР сформирован β -тяжами и имеет иммуноглобулиноподобный фолд. Его единственный короткий α -спиральный фрагмент расположен в районе N-конца, экспонирован в сторону внеклеточного пространства и содержит главный иммуногенный участок рецептора. β -структура домена сформирована 10 β -тяжами (β 1-10), а также свободными петлями между ними (L1-10). Важнейшее значение имеют петли β 6- β 7 и β 9- β 10. Первая из них (β 6- β 7) известна как cys-петля, благодаря дисульфидному мостику в её основании. Она консервативна для всех членов семейства cys-петельных рецепторов и играет важнейшую роль в конформационных изменениях, связанных со связыванием агониста и открытием ионного канала. Так же примечательна выступающая сбоку петля β 9- β 10, известная как С-петля. У субъединиц α -типа она содержит дисульфидный мостик между рядом расположенными цистеинами (вицинальный дисульфид) на своём конце.

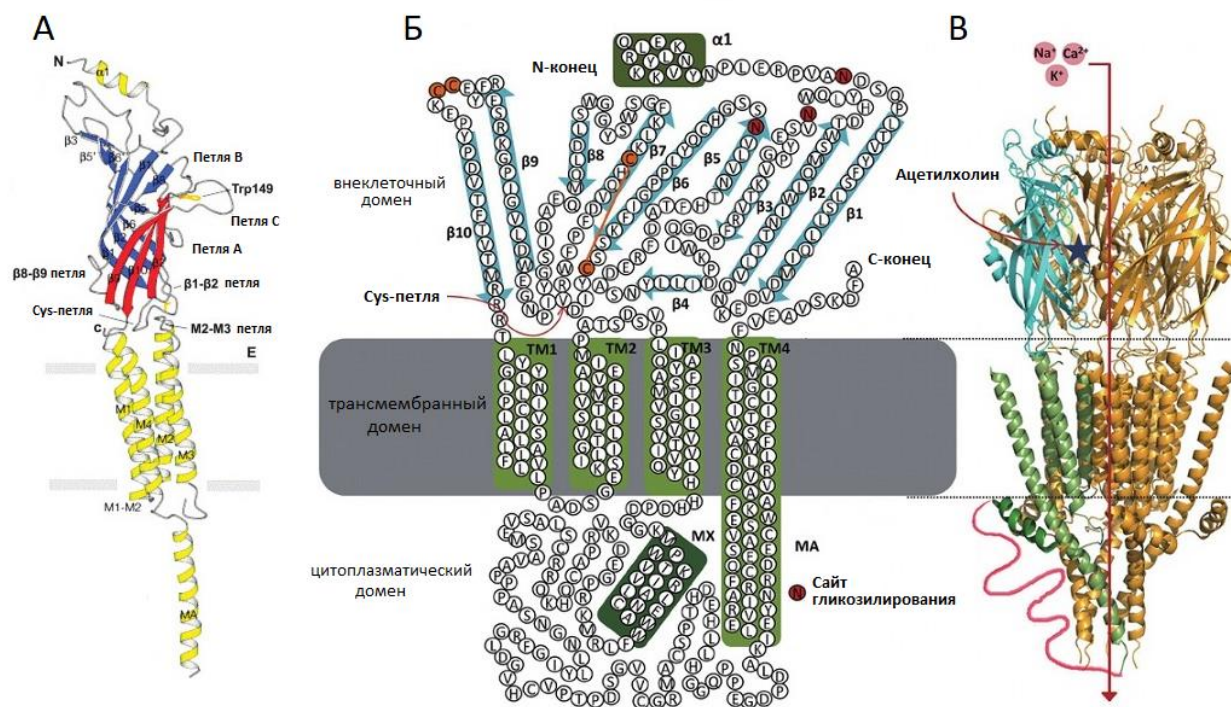


Рисунок 2. (А) Субъединица мышечного nAChR α-типа. (Б) Топология укладки полипептидной цепи nAChR на примере α1-субъединицы, выделены наиболее значимые черты структуры. Общий вид nAChR (По [9] и [10] с изм.)

Важнейшие данные о структуре внеклеточного домена nAChR были получены методом гомологичного моделирования по кристаллической структуре его ближайшего структурного аналога – гомопентамерного ацетилхолинсвязывающего белка из моллюска *Lymnaea stagnalis* [11]. Этот водорастворимый белок служит моллюску для точного управления концентрацией ацетилхолина в синаптической щели и разделяет все основные структурные черты внеклеточного домена nAChR.

Ортостерический сайт расположен на стыке внеклеточных доменов двух соседних субъединиц и образован аминокислотными остатками шести петель: трёх с (+), «главной» стороны – петли А, В и С и трёх с (-), «комплиментарной» стороны – петли D, E и F (см. **Рисунок 2**). Петли А, В и С соответствуют тяжу β4 и петлям β7-β8 и β9-β10, а петли D, E и F в свою очередь – тяжу β2, петлям β5-β6 и β8-β9. Сам сайт представляет собой карман между двумя субъединицами, имеющий доступ сверху и покрытый сбоку относительно подвижной С-петлём.

Первостепенное значение в связывании ортостерических лигандов имеют ароматические остатки лиганд-связывающего кармана, формирующие его внутреннюю поверхность: Tyr 89 петли А, Trp 143 петли В, Tyr 182 и Tyr 192 петли С, а также Trp 53 и Tyr 164 со стороны петель D и F (нумерация по последовательности АХСБ из *Lymnaea stagnalis*). Особенно важна роль остатка Trp 143, консервативного для некоторых других членов семейства сус-петельных рецепторов, таких как 5HT₃R [12].

Для ацетилхолина и никотина, а также ряда других ортостерических лигандов nAChR характерен четвертичный атом азота, несущий положительный заряд. Сегодня считается, что основным фактором, обеспечивающим связывание ортостерических лигандов, являются π -катионные взаимодействия, между четвертичным азотом и богатыми электронами ароматическими системами окружающих аминокислотных остатков, формирующих так называемый «ароматический бокс». На сегодняшний день максимально полное представление о структуре ортостерического сайта nAChR дают кристаллическая и криоэлектронная структуры гетеромерного nAChR $\alpha 4\beta 2$ -типа в комплексе с никотином, полученные в 2016-м и 2018-м годах [13, 14].

Связывание ортостерического лиганда приводит к движению С-петли, при этом сравнение структур АХСБ с агонистами и антагонистами nAChR наводят на мысль о том, что связывание агониста способствует стабилизации положения С-петли в приведённом, приближенном к оси рецептора состоянии, в то время как связывание ряда ортостерических антагонистов наоборот фиксирует петлю в отведённом состоянии. Эти данные указывают на важную роль движения С-петли в механизме лиганд-индуцированной активации nAChR.

Долгое время основным источником структурной информации по ГАМКАР рецептору были его гомологичные модели, построенные по образцу структуры nAChR, а также с учётом рентгеновских структур его близких аналогов, катионных каналов GLIC, ELIC, а также анионного GluCl. Однако в 2014-м году была

получена кристаллическая структура гомопентамера ГАМКАР, состоящего из $\beta 3$ субъединиц в комплексе с безодиазепином [15]. Данная структура не содержит функциональных сайтов связывания ГАМК, но тем не менее даёт представление о принципах организации ортостерического сайта ГАМКАР. Укладка внеклеточного домена ГАМКАР повторяет черты нАХР. Ортостерический сайт ГАМКАР так же сформирован аминокислотными остатками уже знакомых нам петель А, В и С с «главной» стороны, и остатками петель D, E и F с «комплиментарной» стороны. Сам ортостерический сайт так же богат ароматическими остатками. В связывании бензильного кольца бензодиазепина принимают участие остатки Phe 200 и Tyr 62, а атомы азота формируют π -катионное взаимодействие с остатками Tyr 157 и Tyr 205, замыкая параллельно водородные связи с боковой цепью Glu 155 и карбонильными группами основной цепи Ser 156 и Tyr 157.

2.2.2 Трансмембранный домен

Трансмембранный домен нАХР состоит из четырёх α -спиралей - TM1-4. Из четырёх спиралей, только M2 одной своей стороной примыкает к ионному каналу, формируя его стенку, остальные спирали обращены друг к другу либо к гидрофобному слою мембраны. Трансмембранные спирали (домены) соединены внеклеточными петлями. Петли M1-M2 и M2-M3 - сравнительно коротки и имеют длину 4-5 аминокислотных остатков, в то время как спирали M3 и M4 разделяет протяжённая цитоплазматическая петля, образующая внутриклеточный домен рецептора [16].

Главная роль трансмембранного домена – селективное проведение катионов через мембрану во время активации рецептора. Для её выполнения, трансмембранный домен включает структуры селективного фильтра ионов, а также имеет воротный механизм, блокирующий проход ионов по каналу в неактивном состоянии рецептора. Огромный вклад в понимание принципов построения этих структур внесла модель нАХР мышечного типа, полученная методом криоэлектронной микроскопии в 2003-м году [16].

Внутренняя, обращённая к поре сторона спирали M2 имеет значительное число гидрофильных аминокислотных остатков, что обеспечивает гидрофильное наполнение ионного канала и возможность транспорта по нему заряженных частиц. Длина ионселективной поры составляет порядка 30 Å, а диаметр у внеклеточного вестибюля составляет 8 Å и сужается до 3 Å в районе алифатических остатков Leu 251 и Val 255. На данный момент считается, что именно в этой области расположен воротный механизм рецептора. В закрытом состоянии рецептора проникновение гидратированных катионов через эту область затруднено и энергетически невыгодно из-за сближенных алифатических остатков, в то же время при активации рецептора, спирали M2 расходятся, увеличивая диаметр канала в этом месте до 10-11 Å. Это делает возможным проникновение через пору гидратированных катионов натрия, калия и кальция без энергетически затратного нарушения их гидратной оболочки. Обращённая к поре сторона домена M2 так же содержит ряд заряженных аминокислотных остатков, формирующих селективный фильтр ионного канала.

Для удобства идентификации этих остатков в разных субъединицах рецептора была введена система обозначений, распространяющаяся также на другие виды сус-петельных рецепторов. За точку отсчёта (ноль) в ней принимается высококонсервативный остаток лизина в петле M1-M2, примыкающий к началу спирали M2 (например, у nAHP α1-типа это - K242). Этот остаток не экспонирован в просвет канала, однако, по-видимому, является важным элементом структуры селективного фильтра.

Селективный фильтр сформирован аминокислотными остатками смежных субъединиц, экспонированных в просвет поры и формирующих в канале кольцевые области. Эти кольца взаимодействуют с проходящим через канал катионом и обеспечивают его избирательный перенос. Традиционно в селективном фильтре nAHP выделяют четыре таких кольца. В положении -1 и -5 от K0 находится промежуточное и цитоплазматическое кольца, содержащие соответственно остатки глутаминовой и аспаргиновой кислот (см. **Рисунок 3 А**). В положении +2

находится так называемое полярное кольцо, в которое входят гидрофильные остатки полярных аминокислот. Так же в положении +20, вблизи внеклеточного вестибюля ион-селективной поры находится «цитоплазматическое» кольцо, включающее остатки аспаргина, глутамата или даже положительно-заряженного лизина (у некоторых субъединиц). Именно создаваемый этими кольцами паттерн распределения электростатических зарядов по поверхности поры способствует накоплению вблизи вестибюля и избирательному проникновению через пору положительно заряженных ионов [17, 18, 19].

Несмотря на то, что в этом разделе мы говорим о структурах трансмембранного домена, нужно сказать, что формально кольца -1 и -5 селективного фильтра расположены уже за его пределами в петле M1-M2. Так же необходимо упомянуть о вкладе в ионную селективность аминокислотных остатков вестибюльной части канала, расположенных в последовательности внеклеточного домена. Отрицательно-заряженный остаток D97 внеклеточного домена консервативен для всех катионных каналов, а его мутация D97K резко снижает проводимость канала, что свидетельствует о его вовлечении в работу селективного фильтра [20].

К интересным результатам привела работа, призванная идентифицировать минимальное количество аминокислотных замен, необходимых для превращения катион-проницаемого nAHP $\alpha 7$ типа в анионный канал (См. **Рисунок 3 Б**). Оказалось, что для этого достаточно всего лишь трёх точечных мутаций: замены E237A (позиция -1), V251T и вставка R236 превращает $\alpha 7$ nAHP в анионный канал [19]. Аналогичные замены понадобились для конверсии катионной селективности серотонинового 5HT3A-рецептора в анионную [21]. Любопытно, что позднее данные упомянутых работ были подтверждены обратным превращением анионных каналов глицинового и ГАМК А рецепторов в катионные каналы с помощью замен A251E, T265V и делеции R250 для ГлиР, а также мутации A291E и делеции R290 для ГАМК А рецептора [18, 22]. Все эти данные говорят о критической значимости остатка глутамата\аланина в положении (-1) и наличия\отсутствия пролина в

обладают уже знакомые нам аминокислотные остатки спирали M2 – L255, L254, V251 и E237 [23] (**Рисунок 3 Б**).

Замена алифатических остатков L255, L254 на полярные и нейтральные (Ser, Tre, Gly) практически исключала кальциевую проводимость рецептора, как и замена E237A на аланин. В то же время замена V255T улучшала кальциевую проводимость примерно на порядок, доводя соотношение PCa/Na до 100 [23]. Как и в случае с катионной селективностью, в формировании селективности рецептора к ионам кальция участвуют аминокислотные остатки внеклеточного домена. Направленный мутагенез показал участие аспаргатов D42 и D44 $\alpha 7$ nAHP крысы в формировании его специфичности к кальцию [24]. При этом D44 (гомологичен остатку D42 $\alpha 7$ nAHP человека) критически важен, его мутация D44A несколько снижает ионный ток, и практически полностью устраняет кальциевую проницаемость рецептора. Одним из последних достижений в данной области, стала опубликованная в 2017-м году модель, позволяющая предсказать кальциевую проницаемость nAHP на основе его субъединичного состава [25].

2.2.3 Цитоплазматический домен

Цитоплазматический домен nAHP и ГАМКАР рецепторов представляет собой корзиноподобную структуру из α -спиралей удлинённой внутриклеточной петли M3-M4. Спадаясь на концах, эти спирали образуют пять «окон», связывающих пору рецептора с внутриклеточной средой [26]. Распределение электростатических зарядов на поверхности внутриклеточного домена nAHP позволяет предположить его участие в формировании ионной селективности канала рецептора [27].

Цитоплазматическая петля играет важное значение в сборке и экспрессии nAHP [28]. Так мутации аминокислотных остатков 335–343 nAHP $\alpha 7$ типа нарушали или вообще блокировали экспрессию функционального рецептора на мембрану [29]. При этом мечение путём встраивания в цитоплазматическую петлю последовательностей флуоресцентных белков заметно не отразилось ни на

экспрессии, ни на функциональной активности nAHR $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\beta 3$ -типов [30]. Именно через внутриклеточный домен происходит ассоциация мышечных nAHR с белком рапсином, способствующая их концентрации в плотные (около 10 000 рецепторов/ μM^2) кластеры в постсинаптической области мембраны мышцы [31]. Важнейшую роль в этом взаимодействии играет остаток Y390 β субъединицы [32]. Судя по данным протеомного анализа, нейрональные nAHR также имеют широкий спектр межбелковых взаимодействий, большая часть из которых опосредована внутриклеточным доменом [33].

В последние годы накопился большой объём материала, свидетельствующий о том, nAHR $\alpha 7$ типа является рецептором смешанного типа и способен к передаче сигнала не только по инотропному, но и по метаботропному механизму, что предполагает его взаимодействие с G-белками [34, 35]. Было установлено, что ключевую роль в этом взаимодействии имеет мотив R345–R348 внутриклеточного домена, характерный так же для других cys-петельных рецепторов, способных к метаботропному сигналингу [36]. Делеция этой последовательности приводит к неспособности рецептора взаимодействовать с G - белками $G_{\alpha q}$ и $G_{\beta\gamma}$. Мутация не влияет на экспрессию рецептора, а также его способность к связыванию α -бунгаротоксина, но блокирует высвобождение кальция из внутриклеточных депо, деактивируя фосфолипазу C- β .

Исследования показывают, что ГАМКА-А рецепторы так же имеют тенденцию к организации в плотные кластеры на постсинаптической мембране. Значимую, хотя и не совсем понятную роль в этом процессе занимает ГАМКАР-ассоциированный белок (ГАМКАРАБ), связывающийся с внутриклеточной петлёй M3-M4 ГАМКАР $\gamma 1$ и $\gamma 2$ типов и белком гефирином [37, 38].

2.2.4 Механизм активации nAHR и ГАМК-А рецепторов

На сегодняшний день сложилось понимание того, что движения C-петли и ароматических остатков ортостерического сайта, сопровождающие связывание молекулы агониста, играют важнейшую роль в активации рецептора.

Кристаллические структуры АХСБ с различными лигандами показали, что связывание агониста переводит ортостерический центр в более закрытое состояние, приводя плоскость С-петли к оси рецептора [26, 39]. Иногда это, закрывающее лиганд-связывающий карман движение называют «кэппингом» (capping) С-петли [40]. При этом В-петля наоборот, приближается к центру лиганд связывающего кармана с внутренней стороны, совершая движение по часовой стрелке (вид сверху). Эти движения вовлекают внешний β -слой ($\beta 9$ - $\beta 10$), при этом он сдвигается по часовой стрелке [41]. Конформационное напряжение, возникающее при этом, приводит к вращательному движению петель $\beta 1$ - $\beta 2$ (примерно на 15 градусов) и $\beta 6$ - $\beta 7$ (cys-петля), примыкающих к линкеру М2-М3 [16]. Всё это приводит к движению спиралей М2 против часовой стрелки. Это ведёт к их выпрямлению из напряжённой согнутой конформации со сближенными центральными участками в релаксированную, прямую конформацию [42]. Как результат, происходит расхождение алифатических остатков воротного механизма в их центральной части от оси канала [43]. Всё это снижает энергетический барьер прохождения катиона через канал и делает возможным прохождение через него ионного тока.

Сравнение структур ГАМКАР и нАХР говорит о большом сходстве в механизмах их активации [13, 15]. Крайне интересные данные, касающиеся десенситизации и работы воротных механизмов, были получены в последние годы, благодаря сравнению структур ГАМКАР, нАХР, а также ряда других разрешенных к этому моменту структур cys-петельных рецепторов.

2.2.5 Десенситизация и цикл нАХР и ГАМК-А рецепторов

Десенситизация – это свойство рецептора, выражающееся в быстром затухании лиганд-индуцированного ионного тока, развивающегося на фоне потери чувствительности рецептора к агонисту. Десенситизации ярко выражена у большинства нАХР, в особенности у $\alpha 7$ нАХР. У этого подтипа рецептора, десенситизация наступает так быстро, что в некоторых случаях создаёт проблемы

для наблюдения ионного тока, вынуждая использовать аллостерические модуляторы [44, 45]. Среди ГАМКАР к десенситизации наиболее склонны рецепторы $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ и в несколько меньшей степени $\alpha 1\beta 3\delta$ -типа [45]. В то же время сам механизм десенситизации долгое время оставался непонятным.

Значительный шаг в его понимании позволило сделать недавнее сравнение между собой структур десенситизированного $\alpha 4\beta 2$ и закрытого мышечного нАХР [13]. В отличие от закрытого нАХР, наиболее узкая область трансмембранного канала десенситизированного рецептора находится не в его средней части, а в районе консервативного остатка глутамата в положении -1 селективного фильтра. По-видимому, именно это сужение блокирует канал, приводя к затуханию лиганд-индуцированного ионного тока. То есть речь идёт уже о сразу двух воротах – воротах активации, расположенных в центральной части спирали M2 (L9, V13) и воротах десенситизации, локализованных в её нижней части (E-1).

Дополнительное сравнение с установленными структурами десенситизированного $\beta 3$ ГАМКАР, открытого и закрытого ГлиР подтверждает это предположение и наводит на мысль о том, что двухворотная схема является общей чертой, присущей всем пентамерным лиганд-управляемым ионным каналам [47]. (См. **Рисунок 4 А**)

Таким образом в упрощённом виде можно говорить о как минимум трёх основных состояниях нАХР\ГАМКАР – *закрытое, открытое и десенситизированное*. (см. **Рисунок 4 В**) Переход рецептора из закрытого в открытое состояние обусловлен связыванием агониста в ортостерическом сайте, а переход в десенситизированное – изменением конформации самого рецептора. Одной из логичных гипотез выглядит восстановление закрытой конформации рецептора через открытое лиганд-связанное состояние, хотя точный механизм этого перехода остаётся дискуссионным.

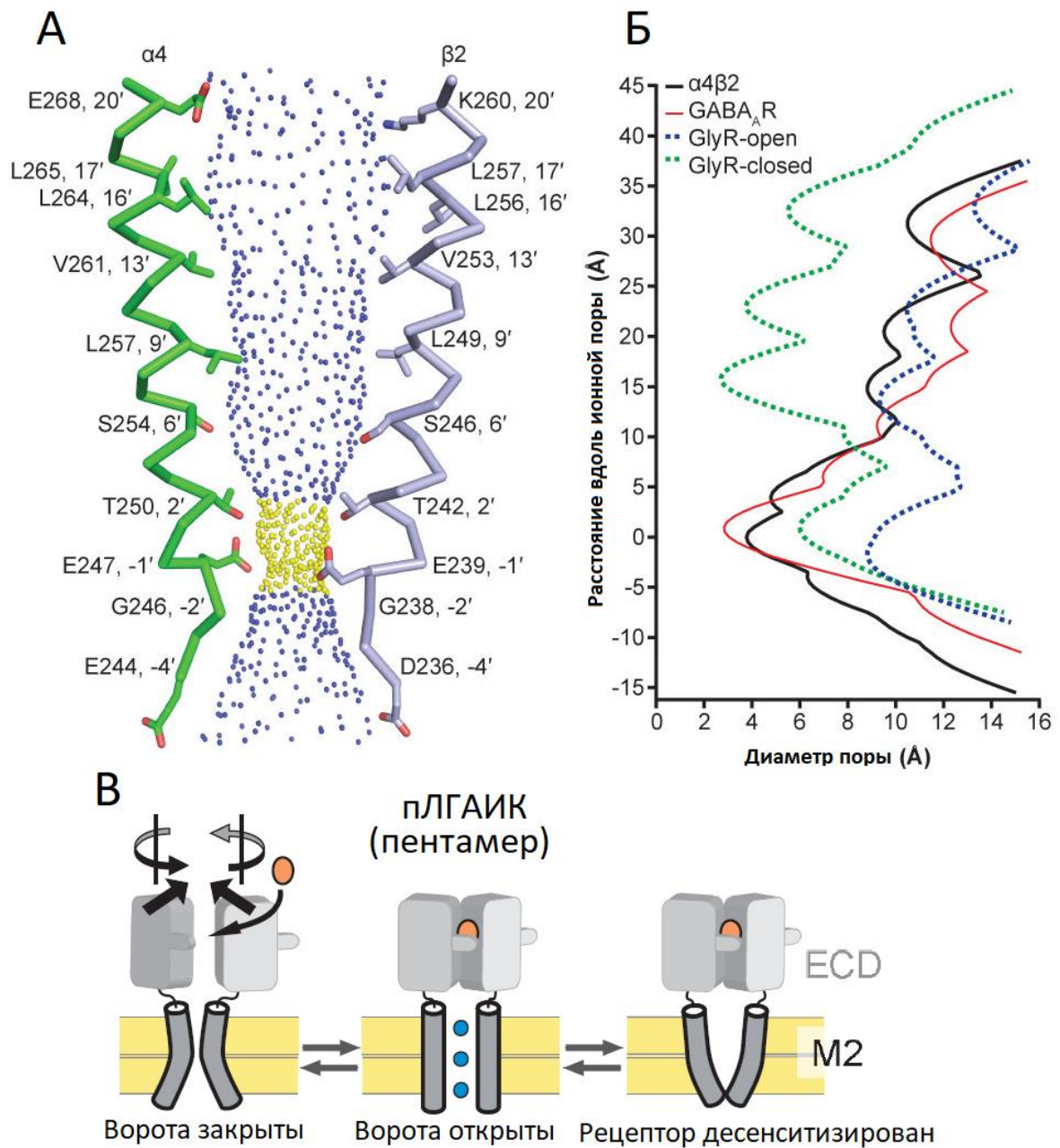


Рисунок 4. (А) Вид на α -спирали домена M2 $\alpha 4$ и $\beta 2$ -субъединиц nAChR, выделены аминокислотные остатки, экспонированные в просвет поры. Синие сферы показывают область поры с диаметром $>5.6 \text{ \AA}$; жёлтые $>2.8 \text{ \AA}$ и $<5.6 \text{ \AA}$. (Б) Сравнения диаметра поры nAChR $\alpha 4\beta 2$ -типа и других *cys*-петельных рецепторов с разрешённой структурой в разных функциональных состояниях: десенситизированный закрытый (ГАМКАР + бензамидин; PDB:4COF), активированный открытый (ГлиР + глицин; PDB:3JAE) и покоящийся закрытый (ГлиР + стрихнин; PDB:3JAD) (По [13] с изм.) (В) Гипотетический минимальный трёхстадийный цикл пентамерного лиганд-управляемого ионного канала, характерный для nAChR и ГАМКАР (По [47] с изм.).

2.3 Лиганды nAChR

2.3.1 Ортостерические агонисты

Ортостерические агонисты nAChR связываются с тем же самым лиганд-связывающим карманом, что и ацетилхолин. Как уже упоминалось, большая часть ортостерических агонистов содержит заряженный атом азота, способный формировать π -катионные взаимодействия с ароматическими аминокислотными остатками (ароматический бокс) лиганд-связывающего сайта. К наиболее известным соединениям данной группы относятся собственно ацетилхолин, никотин, карбамоилхолин и холин. Для nAChR $\alpha 4\beta 2$ -типа уже получена упоминавшаяся ранее рентгеновская структура с молекулой никотина, связанной в ортостерическом сайте [13]. Кроме того, получены кристаллические структуры АХСБ в комплексе с никотином и карбамилхолином, так же указывающие на крайне близкий характер связывания этих лигандов в ортостерическом сайте [48]

Ортостерическим агонистом является и сукцинилхолин, известный так же в качестве деполяризующего миорелаксанта [49]. Активируя мышечный nAChR, он не расщепляется холинэстеразой и приводит к стойкой деполяризации мембраны мышечного волокна и временному блокированию нервно-мышечной передачи.

Отличия в структуре ортостерического сайта nAChR разных типов допускают существование селективных ортостерических агонистов, так, например, холин является избирательным агонистом nAChR $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ -типов [50]. Анализ действия различных четвертичных аминов позволил установить минимальный фармакофор обладающий селективностью в отношении нейрональных nAChR – тетраметиламмоний. Аналогично был установлен минимальный фармакофор, необходимый для селективного действия на $\alpha 7$ nAChR – диэтилдиметиламмоний [51].

2.3.2 Неполные агонисты

Неполные (частичные) агонисты вызывают индукцию тока через рецептор, как и в случае активации обычным агонистом. Однако какая бы концентрация

частичного агониста не была использована, амплитуда индуцированного им тока никогда не достигает максимальной амплитуды ответа на агонист.

Пожалуй, самыми изученными неполными агонистами nAХР являются варениклин и цитизин, широко известные в качестве препаратов для лечения табачной зависимости. Оба вещества, как и большинство традиционных агонистов nAХР, содержат положительно-заряженный атом азота, воспроизводящий расположение заряженного пирролидинового атома азота в никотине. И цитизин, и варениклин занимают очень похожее друг на друга положение в ортостерическом сайте, что было продемонстрировано на кристаллической структуре АХСБ [52]. В целом ориентация их молекулы в активном центре воспроизводит посадку никотина, однако есть и отличия, по-видимому, приводящие к различию их функционального действия на рецептор. При сравнении структур различных АХСБ с агонистом никотином С-петля оказалась значительно ближе к ядру рецептора, чем в случае связывания с частичным агонистом варениклином. Связывание же антагониста конотоксина ImI приводило к максимальному отдалению С-петли [53]. Это наблюдение отлично коррелирует с обсуждавшимися нами ранее выводами о важности движения С-петли для функционального ответа рецептора.

Вместе с тем, при сравнении аналогичных комплексов АХСБ *Aplysia californica* с никотином, цитизином и варениклином, значимой разницы в положении С-петли между структурой с никотином и варениклином/цитизином заметить не удалось, что без сомнения, оставляет много вопросов по механизму их действия. Интересно, что мутация остатка W57A в D-петле ортостерического сайта убирает различия между действием никотина и варениклина на рецептор $\alpha 4\beta 2$ типа, превращая варениклин в традиционный агонист [53]. Нужно заметить, что варениклин, являясь частичным агонистом $\alpha 4\beta 2$ (EC50 2,3 μM) в более высоких концентрация является полным агонистом $\alpha 7$ nAХР (EC50 18 μM) [54]. Эксперименты по докингу и молекулярной динамике предсказывают существование нескольких аллостерических сайтов связывания варениклина в $\alpha 4\beta 2$ nAХР [55]. Один из этих возможных сайтов локализован внутри $\alpha 4$

субъединицы, а другой на стыке $\alpha 4$ и $\beta 2$ субъединиц. Моделирование предсказывает затруднение движения С-петли при связывании варениклина в ортостерическом и одном из аллостерических сайтов, что может объяснить его свойства неполного агониста в отношении $\alpha 4\beta 2$ nAХР. Другой пример неполного агониста – GTS-21, селективный к $\alpha 7$ nAХР и долгое время рассматривающийся в качестве фармакологически-перспективной молекулы для лечения шизофрении [56].

2.3.3 Конкурентные антагонисты

Конкурентные антагонисты связываются с ацетилхолин-связывающим (ортостерическим) сайтом nAХР, препятствуя конформационному переходу рецептора в открытое состояние. При этом они способны конкурировать за сайт связывания с ацетилхолином, что подчёркнуто в их названии [57].

К конкурентным антагонистам относятся метилкакконитин, мекамиламин, лобелин, а также дигидро- β -эритроидин и ещё целый ряд соединений [57, 58, 59]. Среди широкого спектра низкомолекулярных конкурентных антагонистов особое значение имеют d-тубокурарин и его производные. d-тубокурарин имеет наибольшее сродство в отношении nAХР мышечного типа. Он начал применяться в качестве миорелаксанта ещё в середине 20-го века, став прототипом целого семейства – *недеполяризующих нейро-мышечных блокаторов* [61, 62].

С химической точки зрения, молекулы этих соединений имеют различный структурный каркас. Однако все они объединены общей структурной чертой – они имеют два заряженный четвертичных атома азота, разделённых фиксированной дистанцией (*interonium distance*) [62]. Структурные данные по связыванию нейромышечных блокаторов с nAХР довольно бедны и, насколько известно автору, представлены лишь кристаллической структурой d-тубокурарина с АХСБ [39]. Эта структура демонстрирует несколько альтернативных вариантов ориентации молекулы d-тубокурарина в ортостерическом сайте. При этом сама молекула, связываясь в лиганд-связывающем кармане под С-петлёй стабилизирует эту петлю

в отведённом состоянии, что подтверждает выводы исследователей о важности движения С-петли в конформационных перестройках, вызывающих блокирование и активацию nAХР. Любопытно, что результаты электрофизиологического анализа действия d-тубокурарина на nAХР говорят о смешанном, лишь частично конкурентном характере ингибирования, что может свидетельствовать о дополнительном, ещё не открытом аллостерическом сайте связывания данного антагониста [61] (См. **Рисунок 5**).

Крайне своеобразным набором антагонистов обладает $\alpha 9$ nAХР. Эпипатидин, алкалоид из кожи лягушки *Epipedobates anthonyi*, выступает в роли ортостерического агониста всех подтипов nAХР, кроме $\alpha 9$ -типа, для которого он является антагонистом [63, 64]. Аналогична история повторяется для никотина и цитизина – агонистов всех nAХР, кроме $\alpha 9$, для которого они являются антагонистами [50].

Отдельного рассказа заслуживают пептидно-белковые конкурентные антагонисты nAХР. Самые известные белковые антагонисты nAХР – трёхпетельные α -нейротоксины из яда змей [65]. Их последовательность, состоящая из 60-74 аминокислотных остатков, образует три β -тяжа (петли), стабилизированных в своём основании дисульфидными мостиками. Короткие α -нейротоксины (60-62 аминокислотных остатка и четыре дисульфида) являются селективными высокоафинными блокаторами nAХР мышечного типа, в то время как длинные α -нейротоксины (66-74 остатка и пять дисульфидов) имеют примерно одинаковую афинность как к мышечному, так и нейрональному $\alpha 7$ nAХР. Обе этих группы токсинов связываются с nAХР в одном и том же сайте, конкурируя друг с другом. Кристаллические структуры $\alpha 1$ -субъединицы nAХР с α -бунгаротоксином, а также α -кобротоксина с АХСБ указывают, что данная группа токсинов связывается с верхней внутренней частью С-петли nAХР [66, 67]. Возможность конкуренции с ортостерическими лигандами, высокая специфичность, а также удобство внедрения радиоактивных и флуоресцентных меток сделали трёхпетельные α -нейротоксины удобными инструментами для радиолигандного

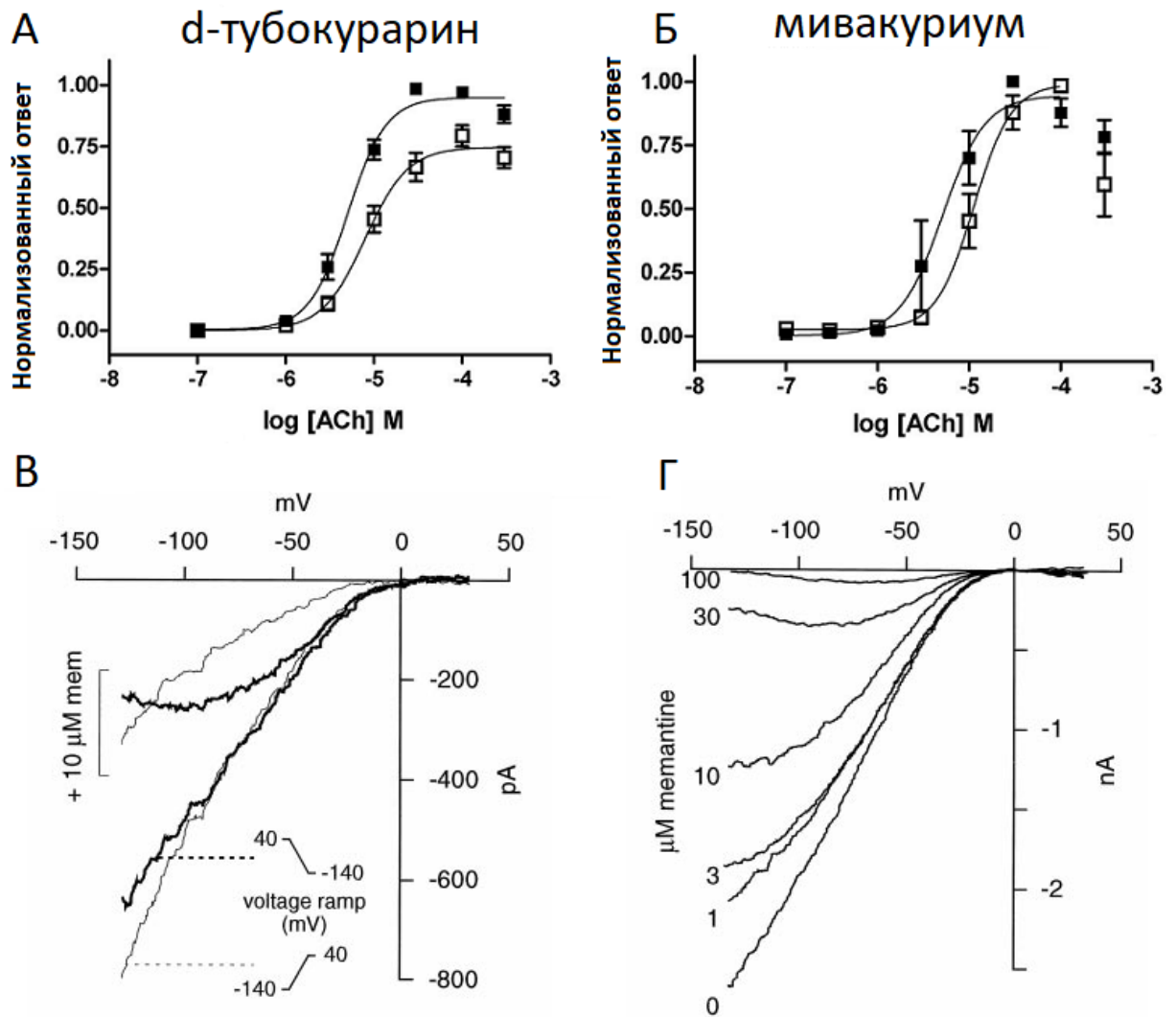


Рисунок 5. Примеры записи потенциала методом двухэлектродной фиксации на ооцитах *Xenopus laevis*, позволяющие установить природу антагониста. Смещение кривой зависимости амплитуды ионного тока от концентрации ацетилхолина под действием фиксированной концентрации (10 нМ) *d*-тубокурарина (А) и мивакуриума (Б) на мышечном *nAChR*. В случае тубокурарина наблюдается сдвиг кривой вправо и вниз, соответствующий смешанному характеру ингибирования, мивакуриум же демонстрирует конкурентное ингибирование (сдвиг кривой вправо), подавляемое увеличением концентрации ацетилхолина (По [61] с изм.). (В) Вольт-амперная характеристика *nAChR* $\alpha 4\beta 2$ -типа под действием ацетилхолина и под действием ацетилхолина и порового блокатора мемантина (10 μM). Ингибирование усиливается при уменьшении потенциала, а сила ингибирования зависит от направления изменения потенциала, что говорит о блокировании им ионселективной поры *nAChR*. (Г) Зависимость вольт-амперной характеристики *nAChR* $\alpha 4\beta 2$ -типа от концентрации порового блокатора мемантина. При увеличении его концентрации до 30-100 μM увеличение разницы потенциалов приводит к усилению ингибирования и уменьшению тока, что свидетельствует о блокировании ионной поры канала. (По [77] с изм.)

анализа и флуоресцентного окрашивания нАХР. Именно α -токсин из *Naja nigricollis* позволил группе Жана-Пьера Шанжэ в середине 70-х впервые выделить нАХР мышечного типа из электрического органа угря *Electrophorus electricus* [68].

Ещё одна важнейшая группа пептидных ингибиторов нАХР – α -конотоксины из яда моллюсков семейства *Conus*. Это пептиды, содержащие 12-30 аминокислотных остатков. Традиционно выделяют три семейства конотоксинов, действующих на нАХРы: α -, αA - и ψ - конотоксины, из которых лишь первые два являются конкурентными антагонистами. α -конотоксины содержат четыре остатка цистеина, образующих два дисульфидных мостика, замкнутых по формуле C1-C3, C2-C4 [69, 70]. К наиболее известным токсинам этой группы относятся ImI и ImII, имеющие максимальное сродство в отношении $\alpha 7$ нАХР [71, 72]. Так же в эту группу входят PnIA ($\alpha 3\beta 2$ нАХР), PnIB ($\alpha 7$ нАХР) и MII, имеющий константу IC50 наномолярного порядка для $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 6\backslash\alpha 3\beta 2$ и $\beta 3$ рецепторов и ряд других соединений [71]. αA -конотоксины содержат шесть цистеинов, образующих три дисульфида, замкнутых двумя разными способами, к ним относятся, например, конотоксины PIVA, OIVA EIVA [70].

Конотоксины отличаются сравнительно не большим молекулярным весом, простотой синтеза и модификации, высокой специфичностью, что делает их крайне перспективными, как с точки зрения фармакологии, так и с точки зрения фундаментальных исследований. Среди α -конотоксинов в контексте фармакологии крайне интересны антагонисты $\alpha 9\alpha 10$ нАХР. Так, конкурентный антагонист $\alpha 9\alpha 10$ нАХР - конотоксин Rg1A проявил антиболевогой эффект на крысах в модели нейропатической боли, индуцированной оксалиплатином, при этом его низкая активность в отношении человеческого $\alpha 9\alpha 10$ была увеличена введением аминокислотной замены [73]. Аналогичную противоболевую активность проявляет другой конкурентный антагонист $\alpha 9\alpha 10$ – конотоксин Vc1.1 [74].

Результаты мутагенеза $\alpha 9\alpha 10$ рецептора и последующее молекулярное моделирование связывания показывают, что критическую важность для

связывания RgIA играют солевые мостики между положительно заряженными аргининовыми остатками R9, R11 и R13 конотоксина и отрицательно заряженными остатками E197 и D121 $\alpha 10$ -субъединицы рецептора, что говорит о высокой вероятности связывания RgIA с ортостерическим сайтом nAChR на стыке $\alpha 10^+/\alpha 9^-$ [75]. В то же время, не для всех конотоксинов удаётся идентифицировать однозначный сайт связывания. Другой антагонист $\alpha 9\alpha 10$ nAChR, конотоксин GeXIVA, имеющий в своей последовательности целых девять положительно-заряженных остатков аргинина, не конкурирует с аналогом RgIA за связывание с $\alpha 9\alpha 10$ nAChR, а значение его константы IC50, измеренной методом двухэлектродной записи на ооцитах *Xenopus laevis*, зависит от поддерживаемого потенциала (holding potential) на мембране ооцита [76]. Эти данные, вместе с результатами молекулярного моделирования позволяют предположить наличие двух различных сайтов связывания – один из которых находится в отрицательно-заряженной области ортостерического сайта на стыке $\alpha 9^+/\alpha 10^-$, а второй – в области вестибуля ионселективной поры. Эти особенности предположительно сближают GEIVA с полиаргининовыми пептидами, исследованными в рамках данной диссертационной работы.

2.3.4 Блокаторы канала

Ионный канал nAChR и cys-петельных рецепторов в целом, представляет собой довольно узкую пору с рядом заряженных остатков. Отрицательный заряд остатков, экспонированных в просвет поры катион-селективного канала nAChR делает возможным связывание в нём положительно заряженных молекул, обладающих подходящей геометрией. Войдя в канал, такие молекулы заблокируют ион-селективную пору, сделав прохождение ионного тока невозможным. К группе поровых блокаторов относятся мемантин, амантадин (более известный в роли противовирусного средства), гексаметониум (являющийся так же конкурентным антагонистом nAChR), МК-801 и ТМВ-8 [77, 78].

Сила ингибирования поровыми блокаторами как правило зависит от мембранного потенциала и направления ионного тока. Так как поровые блокаторы нАХР являются катионами, блокирующими канал с внеклеточной стороны, отрицательные значения потенциала мембраны, соответствующие входящему ионному току, способствуют их прочному удержанию в поре и ингибированию нАХР. При снижении разницы потенциалов ниже потенциала реверсии (reverse potential) и обращении ионного тока наружу, молекулы поровых блокаторов сравнительно легко выбиваются выходящим током катионов. Данный эффект значительно усиливается при росте потенциала в положительную сторону, делая блокирование канала практически невозможным [77].

Терапевтический потенциал канальных блокаторов невелик, из-за их сравнительно низкой селективности. Например, упомянутый МК-801 кроме нАХР блокирует глутаматный NMDA-рецептор, как и мемантин, помимо этого, блокирующий ещё и 5HT₃-рецептор [79, 80]. В то же время, возможный побочный эффект ряда терапевтических препаратов в качестве поровых блокаторов стоит принимать во внимание. Так, например, аминогликозидные антибиотики, являются канальными блокаторами $\alpha 7$ и $\alpha 9$ нАХР, что отчасти объясняет их широко известные нейро- и ото- токсические побочные эффекты [81, 82].

Продемонстрировано, что катионы магния способны блокировать ионную пору нАХР с внутренней стороны рецептора, подавляя выходящий ионный ток через гомомерный $\alpha 7$ нАХР [83]. Похожий эффект оказывают спермин и ряд других полиаминов, блокирующих выходящий ионный ток через пору гетеромерных нАХР $\alpha 3\beta 4$ и $\alpha 4\beta 2$ -типов [84].

Блокирование исходящего ионного тока через нАХР эндогенными полиаминами приводит к явлению внутреннего выпрямления, по-видимому, важному для модуляции амплитуды потенциала действия в нейронах *in vivo* [85]. Важнейшую роль в связывании положительно-заряженных молекул полиаминов с внутренней стороны ионной поры играют отрицательно-заряженные остатки

глутамата в промежуточном (intermediate) кольце селективного фильтра. Их замена на аланин в рецепторах $\alpha 3\beta 4$ и $\alpha 4\beta 2$ -типов полностью исключает эффект внутреннего выпрямления и резко ухудшает кальциевую проводимость мутантного канала nAHP [86]. Всё это наводит на мысль о функциональном сопряжении кальциевой проводимости и внутреннего выпрямления nAHP $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$ -типов. Учитывая частую пресинаптическую локализацию этих рецепторов, оба этих свойства могут играть значимую роль при модуляции выброса нейромедиатора из пресинаптического окончания.

2.3.5 Позитивные аллостерические модуляторы

Специфичной и очень перспективной для клинического применения группой лигандов нАХРов являются позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ), способные усиливать ответ рецептора на связывание агониста в ортостерическом сайте [87].

Изначально термин «аллостерический» был введён при ранних работах по биохимии ферментов [88]. Было обнаружено, что конечный продукт ферментативного пути ингибирует ферменты предыдущих стадий, не имея сходства с субстратом активного центра. Было выдвинуто предположение что молекула-регулятор связывается с другим участком фермента и индуцирует конформационные изменения белка, модулирующие его активность. Подобное не прямое влияние молекулы-регулятора на фермент и назвали «аллостерическим» [89]. Исходя из этой общей логики, любой лиганд рецептора, кроме, поровых блокаторов, можно было бы назвать «аллостерическим» так как он приводит к каким-либо конформационным изменениям рецептора. Однако традиционно аллостерическими лигандами рецепторов, в том числе и нАХР, называют лиганды, изменяющие активность рецептора, связываясь где-либо, кроме основного, «ортостерического» лиганд-связывающего сайта [87].

Известно несколько ионов и низкомолекулярных веществ, аллостерически потенцирующих различные подтипы нАХР. Ионы Ca^{2+} в микромолярных концентрациях модулируют ответ различных гетеромерных нАХР [90]. Ионы Zn^{2+} в близких концентрациях потенцируют $\alpha 2$, $\alpha 3$ - и $\alpha 4$ -содержащие гетеромерные нАХР (в случае $\alpha 4\beta 4$ амплитуда тока увеличивается в пять раз), однако скорее подавляют ответ нАХР $\alpha 3\beta 2$ -типа и $\alpha 7$ -типа [91, 92]. Стероидные гормоны (прогестерон, тестостерон, эстрадиол, кортикостерон) оказывают аллостерический, в основном ингибирующий эффект в низких микромолярных концентрациях на гетеромерные $\alpha 3$ - и $\alpha 4$ -содержащие нАХР [93]. Эксперименты по направленному мутагенезу позволили установить на С-конце рецептора последовательность, формирующую сайт связывания эстрадиола [94]. Запись тока через

индивидуальные каналы (single-channel) методом пэтч-кламп позволила установить, что 17β -эстрадиол увеличивает частоту открывания канала $\alpha 4\beta 2$ нАХР, практически не оказывая эффекта на проводимость ионного канала [95].

Антигельминтные препараты левамизол и морантел, будучи агонистами нАХР нематод, проявляют свойства аллостерических модуляторов человеческих нАХР. Морантел и левамизол в микромолярных концентрациях потенцируют $\alpha 3$ -содержащие нАХР, хотя в миллимолярных концентрациях левамизол ингибирует ответ рецептора [96, 97].

Данные мутагенеза указывают на их возможный, отличный от ортостерического сайт связывания в районе межсубъединичного интерфейса во внеклеточном домене рецептора [97]. Другой известный антигельминтный препарат – ивермектин потенцирует гомомерный нАХР $\alpha 7$ -типа, связываясь с ним в районе трансмембранного домена M2 [98].

Ингибитор ацетилхолинэстеразы галантамин потенцирует $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, и $\alpha 6\beta 4$ нАХР в концентрациях 0.1–1 μM , однако в концентрациях $>10 \mu\text{M}$ галантамин проявляет свойства ингибитора нАХР [99]. В то же время, сообщалось что для потенцирующего действия галантамина на $\alpha 4\beta 2^*$ нАХР необходимо присутствие $\alpha 5$ субъединицы [100]. Эффект действия низких концентраций галантамина на нАХР проявляется в увеличении частоты открывания ионного канала, что было показано на рецепторах временно экспрессированных в клетках линии РС12 [101].

Упомянутые выше аллостерические модуляторы обладают сравнительно низкой селективностью. По этим причинам был создан набор позитивных аллостерических модуляторов (ПАМ), обладающих большей селективностью в отношении $\alpha 7$ нАХР, являющегося значимой фармакологической мишенью.

В число данных соединений входят: PNU-120596, LY-2087101, NS-1738, ССМІ или вещество 6, TQS, SB-206553, A-867744, JNJ-1930942 [102 - 109]. По характеру действия на рецептор ПАМ принято разделять на две группы. ПАМ I (первого типа) увеличивают амплитуду лиганд-индуцированного тока, однако не меняют форму ответа и не снижают десенситизацию. Так же ПАМ I не способны к реактивации рецептора после его десенситизации. ПАМ II (второго типа) так же увеличивают амплитуду тока, но способны уменьшать десенситизацию вплоть до её полного исчезновения, а также реактивируют рецептор после его десенситизации (см. **Рисунок 6**).

Точные сайты связывания ПАМ с nAХР не установлены, однако эксперименты по точечному мутагенезу позволяют сделать некоторые выводы об участии отдельных аминокислотных остатков в действии ПАМ на рецептор. Методом цистеинового скрининга показано, что связывание PNU-120596 с nAХР индуцирует конформационные изменения во внеклеточном домене, близкие к тем, что происходят при связывании ацетилхолина [110]. Так же показано, что замены остатков трансмембранного домена: S222 и A225 в петле M1, M253 в петле M2, F455 и C459 в петле M4 – значительно снижают потенцирующий эффект PNU-120596 на $\alpha 7$ nAХР. Из них наиболее критичны остатки A225 и M253, их замена уменьшает значение EC_{20} для ацетилхолина под влиянием PNU-120596 до 10 раз в сравнении с $\alpha 7$ дикого типа. Гомологичное моделирование показало, что цепи всех пяти остатков экспонированы в межспиральную полость трансмембранного домена, а молекулярный докинг предсказывает посадку PNU-120596 в верхней части этой полости [111]. Интересно, что в этой же полости находится сайт связывания летучих анестетиков и нейростероидов у ГАМКАР и ГлиР [112].

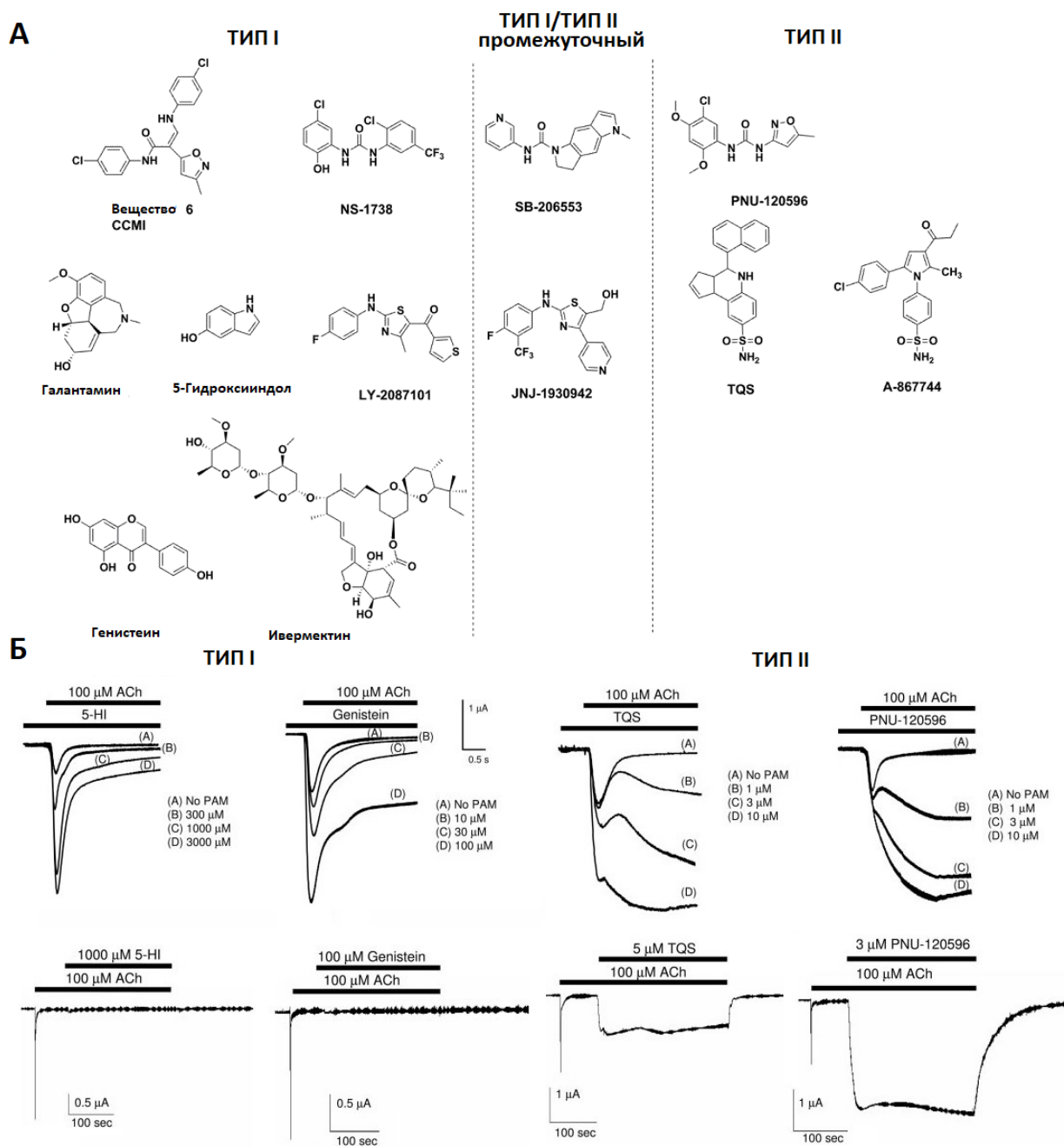


Рисунок 6. (А) Формулы ПАМ I и ПАМ II, а также соединений, сочетающих свойства обоих типов (По [87] с изм.). (Б) Примеры действия ПАМ I и ПАМ II на лиганд-индуцированные ионные токи. (Верхний ряд) ПАМ I увеличивают амплитуду лиганд-индуцированного тока, но не меняют форму ответа и не устраняют десенситизацию nAChR, тогда как ПАМ II увеличивают амплитуду тока и способны устранять десенситизацию. (Нижний ряд) ПАМ I неспособны к реактивации рецептора, в то время как ПАМ II реактивируют рецептор после его десенситизации. (По [106] с изм.)

2.3.6 Аллостерические агонисты

Вещества этой группы имеют близкое структурное сходство с позитивными аллостерическими модуляторами nAХР, однако в отличие от них способны вызывать активацию рецептора независимо от связывания агониста в ортостерическом сайте. Другое распространённое название аллостерических агонистов – аго-ПАМ. Детальное электрофизиологическое исследование аллостерического агониста $\alpha 7$ nAХР 4BP-TQS (GAT107) продемонстрировало его смешанную природу: он способен как потенцировать ток, индуцированный ацетилхолином, так и самостоятельно индуцировать ионный ток [113].

При этом индуцированный 4BP-TQS ионный ток практически не подвержен десенситизации, что сближает данное соединение с ПАМ II. Ортостерический антагонист метикаконитин действовал на индуцированный 4BP-TQS ток в качестве неконкурентного антагониста. Направленный мутагенез показал, что замена M253L в домене TM2 прекращала агонистическое действие 4BP-TQS на $\alpha 7$ nAХР и в то же время не оказывала заметного эффекта на действие ацетилхолина на рецептор. Между тем замена W148F, уменьшающая эффект ацетилхолина на рецептор и изменяющая EC₅₀ в 200 раз, не оказала никакого эффекта на действие 4BP-TQS. Эти данные позволяют предполагать, что местом связывания 4BP-TQS является межспиральная полость трансмембранного домена nAХР (см. **Рисунок 7**), как и в случае с ПАМ II.

Позднейшее исследование позволило прийти к выводу о существовании второго сайта связывания 4BP-TQS, вблизи ортостерического сайта рецептора [114]. Мутагенез остатка W55 увеличивал прямую активацию nAХР 4BP-TQS, но в то же время уменьшал эффект функционального взаимодействия между ортостерическим и аллостерическим сайтами, превращая другие аллостерические модуляторы (TQS, PNU-120596) в аллостерические агонисты. При этом мутация Y93C приводила к нечувствительности мутанта к ортостерическим агонистам, однако никак не влияла на действие самого 4BP-TQS (GAT107). Стоит вспомнить, что остатки W55 и Y93 находятся во внеклеточной части рецептора, на

межсубъединичном интерфейсе с комплиментарной и основной стороны соответственно. Всё это говорит о важной роли этих ароматических остатков интерфейса в функциональном сопряжении ортостерического и аллостерического сайтов. В свете практического применения, интересно, что в тестах *in vivo* вещество показало заметный эффект на мышцах моделях воспаления и нейропатической боли, к чему мы ещё вернёмся впоследствии [115].

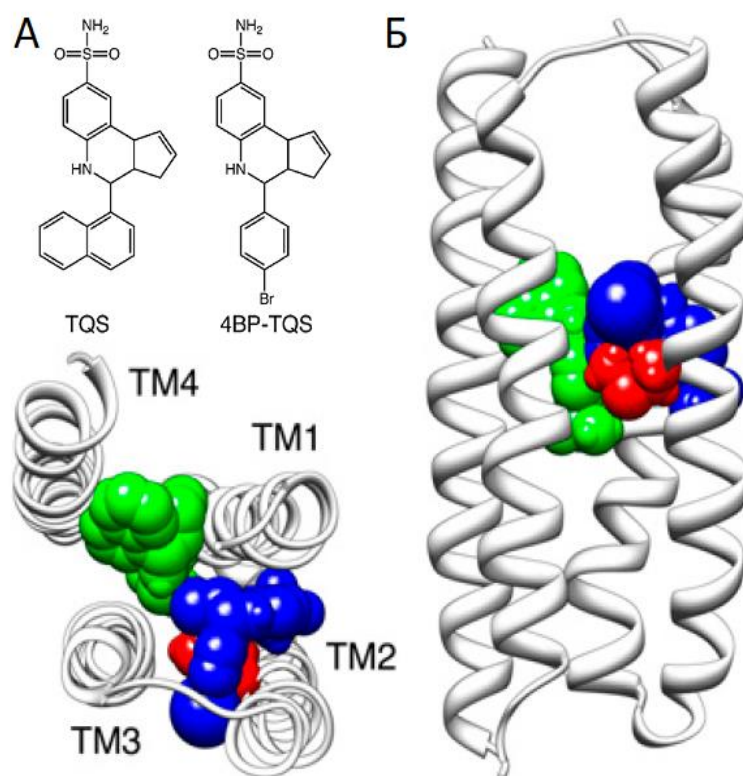


Рисунок 7. (А) Структурная формула ПАМ II TQS и его аналога 4BP-TQS, являющегося аллостерическим агонистом. (Б) Молекулярный докинг посадки TQS (зелёный) и 4BP-TQS (синий) в межспиральную полость трансмембранного домена α7 nAChR. Остаток M253 выделен красным. (По [113] с изм.)

2.3.7 Молчаливые (silent) агонисты

Отдельная и крайне перспективная с точки зрения фармакологии группа лигандов nAChR – молчаливые или бесшумные агонисты [116]. Эта группа лигандов связывается с nAChR, переводя его в десенситизированное состояние и не приводя к открыванию ионного канала или открывая его на крайне незначительное время. После этого рецептор, связанный с бесшумным агонистом, может быть активирован ПАМ II, как и в случае с обычной десенситизацией. Бесшумные агонисты были описаны для $\alpha 7$ nAChR [117]. Их важнейшей чертой является то, что не открывая канал рецептора, они тем не менее индуцируют конформационные изменения внутриклеточного домена, приводящие к активации каскадов внутриклеточного сигналинга. Эта черта делает их крайне привлекательными в качестве перспективных фармакологических агентов для терапии воспаления и нейропатической боли, в частности вызванной химиотерапией рака (см. Раздел nAChR и воспаление) [118].

Поскольку молчаливые агонисты связываются с ортостерическим сайтом nAChR, они так же конкурируют с ацетилхолином и другими ортостерическими агонистами [119]. К соединениям этого класса относится NS-6740 – не влияющий на когнитивные функции мышей, однако эффективно модулирующий высвобождение провоспалительных цитокинов клетками микроглии, а также оказывающий антиболевого эффект в различных моделях [44, 120, 117].

Любопытные результаты дало исследование библиотеки лигандов, содержащих заряженный четвертичный атом азота. Оно показало, что молекулы молчаливых агонистов, содержащие четвертичный атом азота, имеют объём молекулы в диапазоне 130-180 Å³ (кубических ангстрем), и занимают промежуточное положение между размерами молекул агонистов и антагонистов $\alpha 7$ nAChR [121]. В этом же исследовании был идентифицирован минимальный фармакофор для молчаливого агониста $\alpha 7$ nAChR - тетраэтиламин.

2.4 Участие nAХР в патогенезе, фармакология nAХР

Тема участия $\alpha 4\beta 2$ -петельных рецепторов в патогенезе – крайне широка. Поэтому в данной главе будут затронуты лишь некоторые вопросы, связанные с участием nAХР в развитии патологических состояний, а также роль nAХР в качестве терапевтической мишени.

2.4.1 nAХР и табачная зависимость

Развитие табачной зависимости, как и большинство физиологических эффектов потребления табака, связано с действием содержащегося в табаке алкалоида никотина на различные подтипы nAХР. Крайне важное место среди них занимают $\beta 2$ -содержащие nAХР. Мыши, нокаутные по этому подтипу отказываются от самостоятельного введения никотина, в то время как индукция экспрессии $\beta 2$ субъединицы возвращает им удовольствие от введения никотина [122]. Данный подтип рецептора широко представлен в дофаминергических структурах мозга – стриатуме, чёрной субстанции среднего мозга, а также вентральной области покрышки [123, 124]. Считается, что именно рецепторы $\alpha 4\beta 2$ -типа, обладая максимальной чувствительностью к никотину среди всех nAХР, ответственны за активацию дофаминергических нейронов и стимуляцию системы положительного подкрепления, ведущую к появлению табачной зависимости [125 - 127].

По этой причине, в качестве перспективных средств терапии табачной зависимости рассматриваются частичные агонисты nAХР $\alpha 4\beta 2$ -типа [128]. С одной стороны, они обеспечивают некоторый уровень активации рецепторов, помогая купировать синдром отмены, но не вызывая амплитуды ответа достаточной для развития привыкания. Одновременно они конкурируют с никотином за ортостерический сайт связывания, что лишает курильщика удовольствия от курения. К данной группе относятся уже упомянутые нами препараты цитизин и варениклин [129, 130].

2.4.2 nAХР и онкогенез

Регулярное потребление табака значительно увеличивает риск развития онкологических заболеваний лёгких и дыхательных путей [131]. На сегодняшний день, ярко выраженный канцерогенный эффект табака связывают с хроническим воздействием никотина и некоторых его производных. При этом nAХР оказывается тесно вовлечён в процессы онкогенеза. Показано, что $\alpha 7$ nAХР экспрессируется в клетках немелкоклеточного рака лёгких, а его активация приводит к усилению пролиферации клеток, а также имеет антиапоптозный эффект [132]. Аналогично, запуск PI3K/AKT-пути никотином приводит к пролиферации клеток рака мочевого пузыря линии T24 [133]. В другом исследовании оральное введение никотина крысам заметно ускоряло развитие опухоли мочевого пузыря *in vivo* [134].

Ещё одно исследование демонстрирует индукцию клеточной пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода никотином сразу в нескольких клеточных линиях, включая клетки MCF-7 - модель рака груди. Во всех этих случаях nAХР выглядят наиболее вероятными медиаторами эффекта никотина. Дополнительный аспект участия nAХР в онкогенезе – это их роль в регуляции межклеточных контактов и усилении метастазирования. Так, действуя через nAХР $\alpha 7$ -типа, никотин снижает экспрессию E-кадгерина в клетках аденокарциномы желудка, усиливая их миграцию и становясь фактором эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования [135].

В поздних исследованиях было установлено, что этот эффект достигается за счёт того, что nAХР (преимущественно $\alpha 7$ типа) запускают митоген-активируемый киназный путь (MAPK/ERK), а также фосфоинозитид-3/AKT-путь (PI3K/AKT-путь), янус-киназу 1 и STAT-сигналинг (JAK/STAT-путь) [136]. Важную роль в этом событии играет β -аррестин-1, белок скаффолда, структурно ассоциированный (впрочем, до конца не понятно как) с $\alpha 7$ nAХР [137]. Каскады внутриклеточного сигналинга приводят к активации транскрипционных факторов NF- κ B и E2F [138, 139]. Параллельно, запуск Ras-сигналинга и активация им Raf/MAPK-пути приводит к связыванию комплекса AP-1 с промотором циклина-D и его индукции

[140]. Совокупность этих событий активирует клеточный цикл и оказывает антиапоптотический эффект, способствуя онкогенезу и пролиферации уже существующих раковых клеток (см. **Рисунок 8 А**).

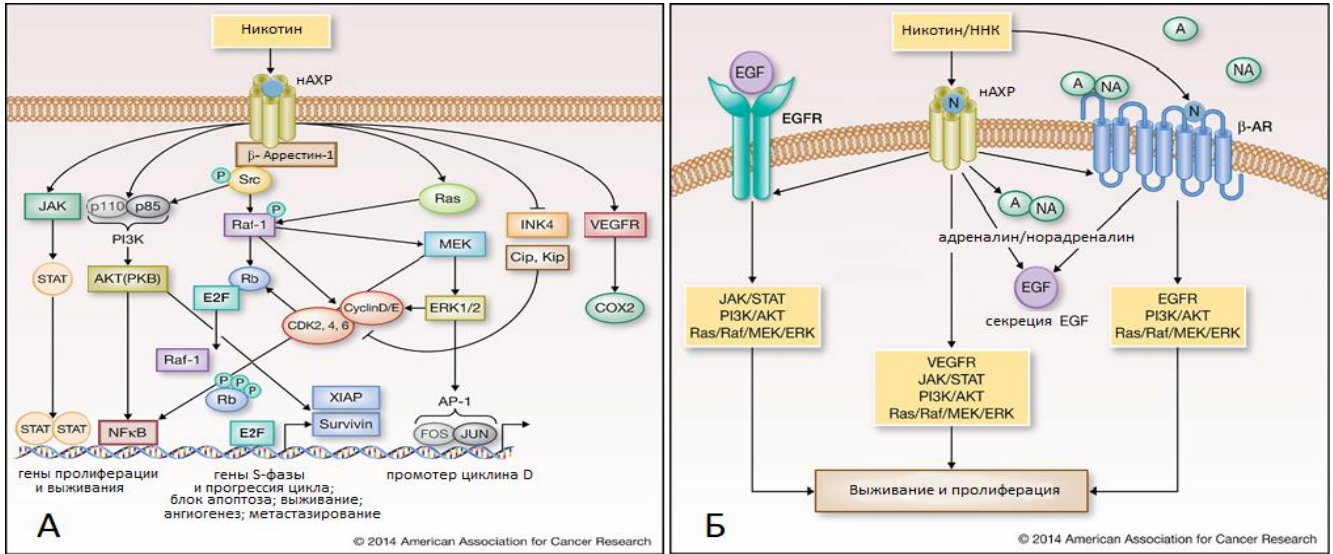


Рисунок 8. (А) Схема внутриклеточного сигналинга при индукции рака лёгких никотином. Активация $\alpha 7$ nAChR запускает несколько регуляторных каскадов (PI3K/AKT, JAK/STAT и Ras/Raf/MAPK). Вместе они активируют митогенные и антиапоптотические факторы NF- κ B, E2F, AP-1 и понижают концентрацию ингибиторов клеточного цикла (p16INK4 и Cip/Kip), блокируя апоптоз, усиливая пролиферацию и ангиогенез. (Б) Схема взаимодействия nAChR с EGFR и β -AR при развитии рака лёгких. Никотин и его производные индуцируют nAChR сигналинг, усиливают выброс EGF и адреналина/норадреналина, трансактивируя EGFR и β -адренорецепторы. Сопряжённая активация трёх рецепторов приводит к запуску митогенных каскадов пролиферации и блоку апоптоза. (По [136] с изм.)

Так же есть основания предполагать, что при прогрессии немелкоклеточного рака лёгких $\alpha 7$ nAChR взаимодействуют с β -адренорецепторами (β -AR) и рецепторами эпидермального фактора роста (EGFR), с которыми они сосуществуют на поверхности клеток рака лёгкого, клеток эндотелия и эпителия дыхательных путей [141 - 143]. Связываясь с $\alpha 7$ nAChR, никотин активирует секрецию клетками эпителиального фактора роста, а также адреналина и норадреналина, трансактивируя оба упомянутых рецептора [142]. Активация β -адренорецепторов также приводит к усилению выброса EGF и перекрёстному эффекту на EGFR. Как

итог, кооперативное действие трёх рецепторов приводит к запуску каскадов пролиферации и блокированию апоптоза (см. **Рисунок 8 Б**).

Гораздо хуже изучена роль других типов nAChR в процессах онкогенеза. Исследования говорят, о вовлечении $\alpha 3$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$ -типов субъединиц в развитие рака поджелудочной железы [144]. Но всё-таки, как и в случае с немелкоклеточным раком лёгких, центральную роль здесь играет рецептор $\alpha 7$ -типа, обладающий сравнительно большой проницаемостью к ионам Ca^{2+} , и потому вносящий основной вклад в запуск кальций-зависимых регуляторных каскадов пролиферации [145]. Другие работы свидетельствуют, что субъединицы $\alpha 5$ -типа вовлечены в процесс онкогенеза. Их экспрессия в клетках линий немелкоклеточного рака лёгких возрастала под действием никотина, а миРНК-сайленсинг заметно ингибировал индуцированную никотином пролиферацию клеток [146].

Также показана роль индуцированной никотином активации $\alpha 9$ nAChR в злокачественной трансформации клеток эпителия молочной железы [147]. Интересно, что усиление экспрессии этого типа рецептора тесно связано с активностью рецептора эстрогена, что отчасти объясняет специфическую ассоциацию гиперэкспрессии $\alpha 9$ nAChR с раком груди [148].

Если активация $\alpha 7$, а также $\alpha 5$ и $\alpha 9$ nAChR запускает пролиферацию и миграцию во многих раковых линиях, то активация $\alpha 4\beta 2$ рецепторов, по-видимому, наоборот – супрессирует рост опухоли [149]. Функциональный ответ этого подтипа рецепторов приводит к выбросу в цитоплазму ГАМК, который, действуя цитоплазматически, уменьшает активность фермента аденилатциклазы, снижая концентрацию цАМФ и прерывая регуляторные каскады пролиферации, ангиогенеза и блокирования апоптоза.

Изучен и ряд мутаций nAChR, ассоциированных с онкологическими заболеваниями. Сразу несколько исследований указывают на ассоциацию некоторых однонуклеотидных полиморфизмов в районе 15q24-15q.1 15-й хромосомы с подверженностью раку лёгких [150, 151, 152]. Как раз в этом локусе

15-й хромосомы расположены гены сразу трёх субъединиц холинорецепторов *CHRNA5*, *CHRNA3* и *CHRNB4*. Полиморфизм rs16969968 гена *CHRNA5*, приводящий к аминокислотной замене D398N в цитоплазматической петле $\alpha 5$ nAХР приводит к более чем 30% увеличению риска развития рака лёгких [153]. Сам $\alpha 5$ nAХР способен образовывать функциональные nAХР лишь с двумя другими типами α - и β - субъединиц. Вероятно, влияние полиморфизма D398N связано со снижением функциональной активности рецептора $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ -вида, по сравнению с его каноническим вариантом, что может отразиться на интенсивности входа кальция в клетку и внутриклеточном сигналинге [154, 155].

Подводя итог, можно сказать, что активация nAХР $\alpha 7$ типа способствует пролиферации клеток, их миграции и предотвращению апоптоза. С меньшей уверенностью это можно сказать об $\alpha 9$ nAХР. В то же время роль остальных субъединиц рецептора в онкогенезе заслуживает дальнейшего изучения.

Эти данные наводят на мысль о возможности использования селективных антагонистов/модуляторов $\alpha 7$ nAХР в качестве потенциальных противораковых средств. Возможными кандидатами на роль подобных терапевтических агентов долгое время выглядели трёхпетельные нейротоксины змей. Казалось, что результаты работы 2009-го года показывали блокирование роста человеческих ксенографтов рака лёгкого α -кобротоксином на мышах [156]. Однако, через год статья была отозвана, а дальнейшие исследования продемонстрировали отсутствие ингибирующего эффекта α -кобротоксина как на модельные клеточные линии опухолевого происхождения, так и на ксенографты опухолей *in vivo* [157, 158]. Более того, у получающих α -кобротоксин мышей, опухоли росли даже чуть быстрее, чем в контрольной группе, хотя эта разница и не достигла статистической значимости. В целом результаты по ингибированию пролиферации клеток с помощью nAХР блокирующих токсинов в том числе и туборкураринов, оказались не однозначными, а их применение в медицине осложнено их высокой токсичностью [159].

Большой интерес вызывают работы по изучению эндогенных модуляторов nAChR, таких как секретируемые эпителиальные белки SLURP-1 и SLURP-2 [160]. Являясь аллостерическими модуляторами nAChR рецепторов, эти белки структурно близки к трёхпетельным нейротоксинам. Продемонстрировано, что действуя на nAChR $\alpha 7$ -типа SLURP-1 и SLURP-2 ингибируют рост и дифференциацию клеток колоректальной карциномы HT-29 в наномолярных концентрациях [161]. Позднее аналогичные результаты были получены для линий A431, SKBR3 и MCF-7, а в линии альвеолярной карциномы SLURP-2 так же подавлял и пролиферацию клеток [162].

Ещё одно исследование, касающееся потенциала эндогенных модуляторов nAChR в онкологии, связано с пептидом T-14, происходящим из С-конца ацетилхолинэстеразы E. Этот 14 аминокислотный пептид, потенцирует ответ $\alpha 7$ nAChR, выступая в роли аллостерического модулятора и стимулирует метастатическое поведение клеток линии MDA-MB-231 (рак груди) [163, 164]. В то же время его циклический вариант – NBP-14 оказывает слабый антипролиферативный и антиметастатический эффект на шесть различных клеточных линий, одновременно снижая экспрессию $\alpha 7$ nAChR [165].

Снижение экспрессии $\alpha 7$ nAChR в раковых клетках также может рассматриваться в качестве терапевтической стратегии. Так есть данные, что каротиноид β -криптоксантин снижает экспрессию $\alpha 7$ nAChR и его мРНК в иммортализованных клетках легкого BEAS-2B, а также в линии клеток аденокарциномы A549. Схожий эффект действия β -криптоксантина был обнаружен в опытах *in vivo* на мышях с опухолями лёгких, индуцированными введением животным производного никотина - 4-[метилнитрозоамин]-1-[3-пиридил]-1-бутанона. Оральное введение β -криптоксантина уменьшило количество опухолей (в пересчёте на животное), а также уменьшило экспрессию $\alpha 7$ nAChR на уровне белка и мРНК [166].

2.4.3 Таргетная доставка к $\alpha 7$ nAХР экспрессирующим клеткам

Существование высокоселективных лигандов nAХР, таких как α -конотоксины, делает возможным целевую доставку препаратов к мишеням, экспрессирующим различные подтипы nAХР. Наиболее перспективной мишенью для подобного таргетинга мог бы выступать nAХР $\alpha 7$ -типа, экспрессируемый рядом раковых линий. К сожалению, работы в этом направлении пока не многочисленны. Так в исследовании 2014-го года, конотоксин ImI, являющийся селективным ингибитором $\alpha 7$ nAХР, был конъюгирован с PEG-DSPE мицеллами, наполненными химиотерапевтическим препаратом паклитакселом [167]. При введении полученных наночастиц мышам - носителям ксенографтов линии MCF-7, была показана сравнительно низкая системная токсичность наночастиц в сравнении с обычным паклитакселом и выраженный противоопухолевый эффект. Работа показывает, что наличие на поверхности наноносителя специфического селективного фактора таргетинга, направляющего доставку, такого как ImI, может дополнительно усилить эффект повышенной проницаемости и удержания, ответственный за накопление наночастиц в опухоли [168].

2.4.4 nAХР, воспаление и боль

Ещё одной практически важной особенностью nAХР является их участие в регуляции воспалительных процессов. Активация $\alpha 7$ nAХР связана с подавлением продукции провоспалительных цитокинов и сдерживанием воспалительного ответа [119]. По-всей видимости, этот процесс связан с выделением ацетилхолина в органах ретикулярно-эндотелиальной системы – легких, печени, селезёнке и желудочно-кишечном тракте. Продемонстрировано, что $\alpha 7$ nAХР участвует в модуляции выброса фактора некроза опухолей (TNF- α), интерлейкина-1, интерлейкина-6, интерлейкина-18, HMGB-1 и некоторых других провоспалительных цитокинов, при этом не влияя на противовоспалительный цитокин интерлейкин-10. Критическая роль $\alpha 7$ в качестве периферического компонента холинергических противовоспалительных путей была продемонстрирована на

мышях, нокаутных по $\alpha 7$ субъединице [169]. В моделях воспаления, индуцированного введением адьюванта Фрейнда и инактивированных микобактерий, нокаутные мыши демонстрировали больший отёк и гиперчувствительность в сравнении с мышами дикого типа [170]. Другое исследование показало, что преинкубация с ацетилхолином ингибирует индукцию липополисахаридом выработки металлопротеиназы 9 и миграцию макрофагов *in vitro* [171].

Другое исследование показало, что активация $\alpha 7$ специфическим агонистом GTS-21 угнетает выброс TNF- α и интерлейкина IL-1 β в цельной крови и моноцитах, стимулированных эндотоксином [172]. Аналогичное снижение выработки TNF- α сопровождало активацию $\alpha 7$ в клетках микроглии, однако снижения выброса IL-1 β при этом зарегистрировать не удалось [173]. А введение крысам в очаг индуцированного воспаления цитидин-5-дифосфохолина, метаболизирующегося до холина, значительно сократило его симптомы – отёк и гиперчувствительность [174].

Так же было показано, что активация $\alpha 7$ nAХР снижает активность (блокирует фосфорилирование) NF- κ B – одного из основных провоспалительных транскрипционных факторов, уменьшая воспалительный ответ [175]. Интересно, что происходит это подавление сразу по двум путям – через киназу I κ B α и через Jak2-STAT3 сигнальный путь [175, 176]. Другой возможный механизм включает взаимодействие между $\alpha 7$ nAХР и толл-подобным рецептором TLR4 через миелоидный фактор дифференциации 88 (MyD88), также индуцирующий активацию NF- κ B [177].

Физиологически, всё это позволяет $\alpha 7$ nAХР выполнять важнейшую роль в функционировании холинергического противовоспалительного пути [178, 179]. Данный рефлекторный цикл представляет собой интересный пример взаимодействия нервной и иммунной систем: афферентные волокна блуждающего нерва воспринимают и передают сигналы о инфекции или ранении, при этом на

уровне ядер ствола мозга сигнал переключается на эфферентные волокна блуждающего нерва, сигнал от которых через несколько промежуточных посредников (см. **Рисунок 9**) доходит до Т-клеток селезёнки, выбрасывающих ацетилхолин [180]. Именно он распознаётся $\alpha 7$ нАХР макрофагов, приводя к подавлению синтеза цитокинов и снижению воспалительного ответа. Недавнее исследование показало, что уровень экспрессии $\alpha 7$ нАХР в периферических мононуклеарах крови возрастает при развитии сепсиса. При этом, у пациентов с менее выраженным воспалением, уровень его экспрессии оказался значительно выше, чем у пациентов с тяжело протекающим септическим заболеванием. Это позволяет рассматривать уровень экспрессии данного подтипа нАХР в мононуклеарах для прогноза тяжести воспаления [181]. В моделях нейропатической боли, индуцированной химиотерапевтическим препаратом оксалиплатином, $\alpha 7$ нАХР демонстрирует снижение экспрессии в дорсальных ганглиях и спинном мозге, что может говорить об его модуляторной роли в химиотерапевтически-индуцированной нейропатической боли [182].

Все перечисленные данные делают $\alpha 7$ нАХР возможной перспективной мишенью для создания противовоспалительных препаратов. Исследования на моделях воспаления и нейропатической боли на грызунах показали эффективность ряда специфических агонистов $\alpha 7$ нАХР, таких как холин, JN403, PNA-543613 и AR-R17779 [119]. Однако, есть значительные ограничения для развития агонистов $\alpha 7$ нАХР в качестве обезболивающих\противовоспалительных препаратов. В первую очередь – это неизбежность действия, связанная с перекрёстной активацией высокомолекулярного 5HT₃ рецептора, а также возможная сверхактивация $\alpha 7$ и его десенситизация. В связи с этим, использование позитивных аллостерических модуляторов (ПАМ) выглядит более перспективным подходом. Как уже обсуждалось выше, эти соединения увеличивают силу\максимальную эффективность агонистов, не влияя напрямую на активацию рецептора. Важной чертой модуляторов является то, что они, как предполагается, усиливают не только ионную проницаемость канала, но также и независимый от

состояния канала метаболитный сигналинг [183]. Кроме того, в отличие от агонистов, ПАМ не влияют на экспрессию $\alpha 7$ nAChR в мозге *in vivo* [184].

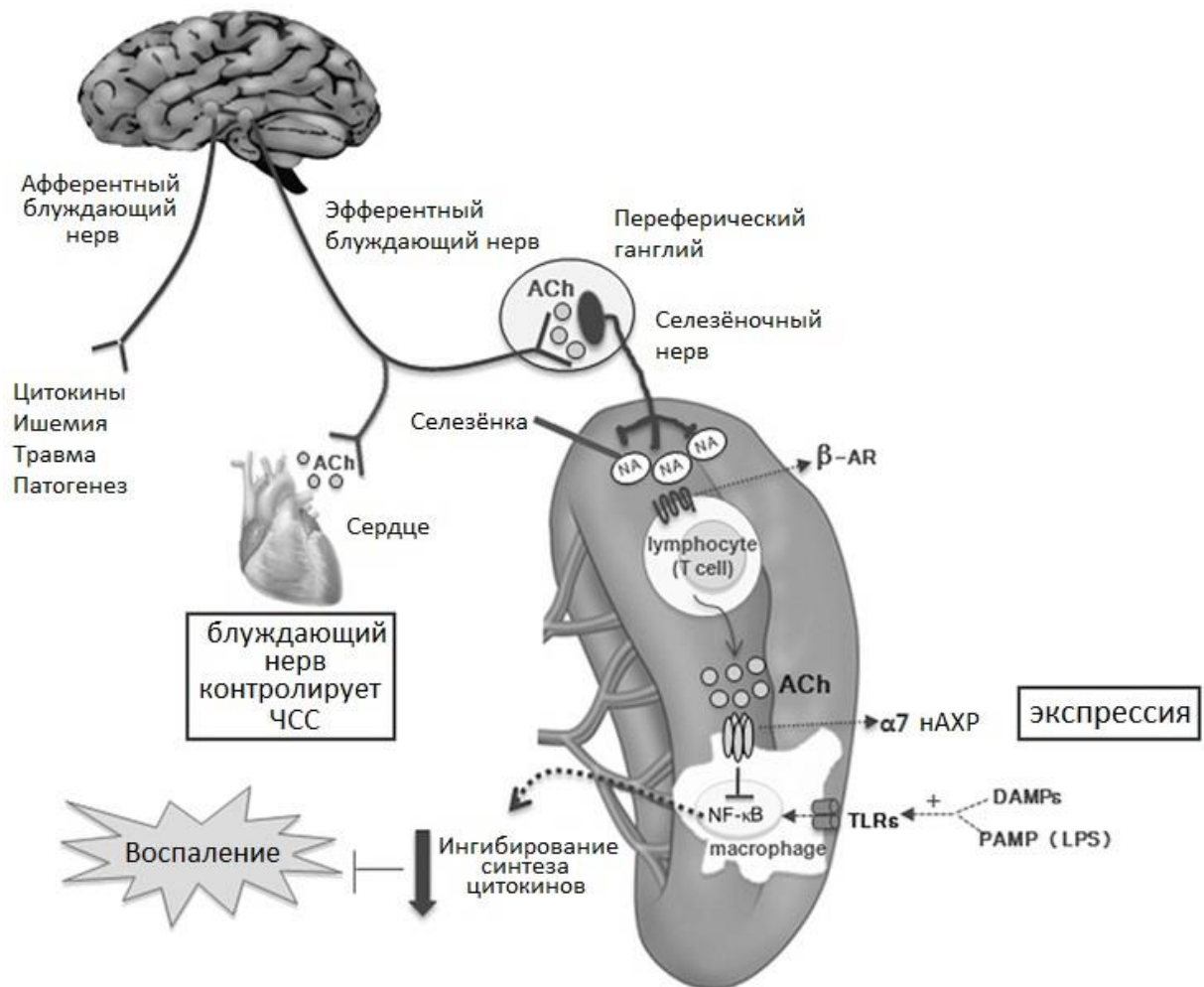


Рисунок 9. Цикл холинергического противовоспалительного пути. Сенсорные волокна блуждающего нерва, возбуждающиеся под действием молекулярных маркеров инфекционного воспаления, несут сигнал к ядру среднего мозга, запускающего «холинергический противовоспалительный ответ» через эфферентные (моторные) волокна блуждающего нерва. Их активация приводит к выбросу из окончаний селезёночного нерва адреналина, распознающегося β -адренорецепторами T-лимфоцитов селезёнки, отвечающих выбросом ацетилхолина. Он в свою очередь возбуждает $\alpha 7$ рецепторы макрофагов, отвечающие подавлением выработки цитокинов. Данный иммунный рефлекс считается важным барьером на пути развития сепсиса. (По [181] с изм.)

ПАМ II проявили эффективность в тестах на животных моделях воспаления и нейропатической боли, в то время как ПАМ I ожиданий не оправдали. Заметный эффект на различных моделях воспаления и хронической боли проявили уже знакомый нам PNU-120596, 2,4,2',5'-тетрагидроксиалкон, 3-фуран-2-ил-N-*p*-толил-акриламид [185, 186, 187]. Ещё одной перспективной альтернативой классическим агонистам могут стать аллостерические агонисты\аллостерические модуляторы, известные как «аго-ПАМ», уже упомянутые нами выше. Одно из подобных соединений – GAT107 в испытаниях на нескольких мышинных моделях хронического воспаления и нейропатической боли подавляло болевое поведение и демонстрировало противовоспалительный эффект. Интересно, что вещество проявило активность при интратекальном введении (в спинномозговой канал), но не проявило эффекта при местном интраплантарном введении (в лапу), что говорит о спинальном механизме его действия [115].

Наконец, нельзя забывать об уже упомянутых нами «молчаливых агонистах», связывающихся в ортостерическом сайте, но сразу вызывающих десенситизацию рецептора. Соединением этой группы является NS6740, модулирующий воспалительный ответ в клетках микроглии *in vitro* и проявляющий антиболевой и противовоспалительный эффект на мышинных моделях нейропатической боли и локального воспаления, индуцированного введением формалина [116, 117, 188]. Другой «тихий агонист» - PMP-072 проявил противовоспалительные свойства на мышинной модели коллаген-индуцированного артрита [189]. По-видимому, в обоих случаях механизм действия препаратов сводится к индукции конформационных изменений nAHR, запускающих каскады внутриклеточного сигналинга, независимые от состояния ионного канала [189].

Отдельного рассказа заслуживает участие $\alpha 9\alpha 10$ nAHR в развитии хронической боли. Было обнаружено, что на крысиных моделях хронической боли внутримышечное введение селективных блокаторов $\alpha 9\alpha 10$ nAHR, конотоксинов Rg1A и Vc1.1 вызывало анальгетический эффект [50]. В данной модели, хроническая боль выражается в появлении аллоидинии (болевого ответа на в

норме неболезненные раздражители) и гипералгезии. Так же для обоих токсинов продемонстрирован пролонгированный эффект, когда однократное введение конотоксина в течение недели снижало аллодинию и гипералгезию на 7-10 дней после отмены [190, 191]. Так же введение Rg1A уменьшало количество лимфоцитов и макрофагов в месте травмы, а инъекция Vc1.1 ещё и ускоряла функциональное восстановление нерва, ниже места повреждения, в то время как блокатор кальциевых каналов N-типа, конотоксин MVII подобного эффекта не вызывал [192, 191, 190]. Более поздние исследования показали также эффект Rg1A против аллоидинии, вызванной применением химиотерапевтического препарата оксалиплатина, которая не развивается у мышей, нокаутных по $\alpha 9$ -субъединице. Всё это (как уже говорилось ранее) привело к разработке модифицированного синтетического токсина Rg1A4 [73].

Кажется, что $\alpha 9\alpha 10$ nAHP выступает медиатором хронической нейропатической боли и воспаления, по-крайней мере на животных моделях. Но не всё так просто – оказывается, что и Rg1A, и Vc1.1 также опосредованно, через взаимодействие с метаботропным ГАМКБ рецептором, блокируют, крайне важные для болевой чувствительности, кальциевые каналы N-типа [193]. При этом есть данные, что модифицированный Vc1.1, сохраняя активность в отношении $\alpha 9\alpha 10$ nAHP, перестаёт проявлять свои анальгезирующие свойства [194]. Это, а также ряд других возражений до сих пор оставляют факт участия данного вида рецепторов в развитии болевой чувствительности под вопросом [195].

2.5 Заключение

На сегодняшний день никотиновый ацетилхолиновый рецептор является самым изученным членом семейства cys-петельных рецепторов и одним из самых изученных лиганд-управляемых ионных каналов. В первой главе литобзора мы собрали актуальные данные по его устройству и особенностям работы, а также сравнили их с аналогичными данными для ГАМКАР, исследования которого так же входят в материалы текущей диссертационной работы. Как мы видим, понимание принципов работы nAChR всё ещё далеко от идеального и этот объект несомненно заслуживает дальнейшего изучения.

Две отдельных главы посвящены лигандам nAChR и наиболее значимым патологическим процессам, в которые вовлечён этот рецептор. В них раскрывается потенциальное многообразие веществ, с помощью которых мы можем влиять на функциональную активность рецептора, а также необходимость изменения этой активности при терапии тех или иных патологических состояний. Отдельные подтипы nAChR участвуют в регуляции пролиферации клеток, а их гиперстимуляция ассоциируется с развитием онкологических заболеваний. В тоже время, активация nAChR в клетках иммунной системы является значимым сдерживающим фактором для развития воспаления и сепсиса, а также, вероятно, играет роль в развитии нейропатической боли. Все эти данные делают крайне актуальной задачу поиска новых селективных лигандов различных подтипов nAChR.

3. Материалы и методы

3.1 Материалы

В ходе работы были использованы следующие материалы:

- Деионизированная вода mQ
- Аммиачная вода, уксусная кислота, глицерин, этиловый спирт, сахароза, NaCl, KCl, MgCl₂, NaOH (Реахим, Россия)
- HEPES, ЭДТА, CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, глюкоза, ацетонитрил (Химмед, Россия)
- Трис-HCl, Ca(NO₃)₂ (Helicon, Россия)
- CsCl, ВАРТА, MgATP, Na₂GTP, CsOH (Sigma-Aldrich, USA)
- Триптон, дрожжевой экстракт, бактоагар (Difco, Netherlands)
- Ампициллин, амфоптерицин В (Биосинтез, Россия), гентамицин (ПанЭко, Россия).
- Среды DMEM и DMEM/F12 (Gibco, USA)
- Липофектамин 2000 (Thermo Scientific, USA)
- Эмбриональная телячья сыворотка (Sigma-Aldrich, USA)
- Раствор версена стерильный (ПанЭко, Россия)
- Агароза для гель-электрофореза, бромистый этидий (AppliChem, Germany)
- Буфер для нанесения ДНК на форец (6x DNA loading dye), маркёр (low range DNA ladder) (Thermo Scientific, USA)

Некоммерческие буферы, использованные в работе:

- Буфер ТАЕ: 40 mM Трис-ацетата, 1 mM ЭДТА, pH 7,8.
- Электрофизиологический «внеклеточный буфер»: 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2,8 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM глюкозы, 20 mM HEPES, pH 7,4
- Электрофизиологический буфер Барта: 88 mM NaCl, 1,1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 0,8 mM MgSO₄, 0,3 mM Ca(NO₃)₂, 0,4 mM CaCl₂ и 15 mM HEPES-NaOH at pH 7,6.

- Внутриклеточный буфер: 140 mM CsCl, 20 mM ВАРТА, 2 mM MgCl₂, 2 mM MgATP, Na₂GTP, HEPES/CsOH, pH 7,4.

Среды для культивирования E.Coli:

- среда SOB: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl; pH 7,0
- среда LB-агар: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl, 20 г/л бактериологического агара;
- среда LB: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

Наборы реактивов для выделения и очистки плазмидной ДНК, синтеза и очистки РНК:

- ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия).
- T7 mMESSAGEmMachine™ (Ambion, USA)
- SP6 mMESSAGEmMACHINE high yield capped RNA transcription kits (Ambion, USA).
- poly-A tailing kit (Ambion, USA)

В ходе исследования были использованы плазмидные конструкции, содержащие: ген человеческого $\alpha 7$ НАХР в векторе pСЕР4, гены мышино-мышечного НАХР (α , β , δ и ϵ субъединицы) в векторе pRBG4, а также последовательности человеческих $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 3$ и $\beta 2$ НАХР в векторе pT7TS. Последовательности генов $\alpha 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$ субъединиц ГАМКАР содержались в векторе Lab-PCI. Кроме того, в работе использованы плазида pCMV6 с геном шаперона НАСНО и коммерческий вектор с геном флуоресцентного сенсора Case12-cyto (Евроген, Россия).

3.2 Методы

3.2.1 Экстракция компонентов цельного лиофилизованного яда серой жабы *Bufo bufo*, гель-проникающая и обращённо-фазовые хроматографии

Для получения пригодного для гель-фильтрации раствора активных компонентов нерастворимого в воде секрета паротидных желёз (яда) серой жабы, была проведена его трёхкратная экстракция в этаноле и последующая экстракция нерастворимого в спирте остатка в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (pH = 6,2). После осаждения экстракта на центрифуге и его фильтрации от взвешенных частиц через шприцевый гидрофильный фильтр 0,45 мкм (Merck, USA), он был подвергнут гель-фильтрации на колонке Superdex 75 (10 * 300 мм, GE Healthcare Life Science, USA). Элюция происходила на скорости потока 5 мл/мин. Полученные компоненты были лиофилизованы и растворены в воде, а их активность проанализирована методами электрофизиологии. Регистрация оптической плотности элюата проводилась с помощью оптического детектора на длине волны 226 нм.

Фракции, проявившие активность в электрофизиологических тестах, были подвергнуты разделению методом обращённо-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (Phenomenex Inc., USA). Для элюции был использован линейный градиент ацетонитрила от 2 до 17% в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты на скорости потока 1 мл/мин. Регистрация оптической плотности элюата проводилась на длинах волн 280 и 226 нм. Полученные в ходе разделения фракции были лиофилизованы и растворены в воде для электрофизиологических тестов.

3.2.2 Электрофизиологическое исследование методом локальной фиксации потенциала («Patch-clamp») в конфигурации «Whole-cell»

Электрофизиологическое исследование активности фракций яда *Bufo bufo* было проведено в отношении ГАМКАР состава $\alpha 1\beta 3$. Рецептор временно экспрессировался в клетках линии НЕК293, в течении 48 часов после трансфекции. Для детекции трансфецированных клеток, проводилась котрансфекция плазмид

содержащих гены $\alpha 1$ и $\beta 3$ субъединиц и плазмидной конструкцией, содержащей ген GFP. Для измерения отбирались лишь светящиеся клетки.

Регистрация трансфицированных клеток с помощью флуоресценции, проводилась на флуоресцентном микроскопе Olympus CKX53 (Olympus, Япония), на базе которого была смонтирована электрофизиологическая установка. Электрофизиологические изменения проводились в постоянном токе «внеклеточного» буфера (см. Раздел Материалы). Микропипетка, вытянутая с помощью пуллера PC-100 (Narishige, Япония), с сопротивлением не менее 5 М Ω была заполнена «внутриклеточным» буфером (см. Раздел Материалы). Регистрации токов проводили с помощью усилителя EPC-9 и пакета программного обеспечения PATCHMASTER (HEKA Electronics Inc., Canada). Растворы лигандов подавались с помощью автоматической системы SF 77A Perfusion Fast-step system (Warner Instruments, United States). Ионные токи записывали с периодичностью в 5 минут, на клетках, показавших входное сопротивление не менее 2 Г Ω и поддерживающем потенциале -30 mV.

3.2.3 Двухэлектродная запись потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*

Ооциты *Xenopus laevis* получали при операции на анестезированных лягушках и дефолликулизовали с помощью коллагеназы типа I (Life Technologies, USA) в концентрации не менее 4 мг/мл при комнатной температуре (21–24 °C) в течение 2 часов в буфере Барта (см. раздел Материалы). Далее ооциты промывали буфером Барта от лизата соединительной ткани и вводили в них раствор РНК или плазмидной ДНК в деионизированной и очищенной от нуклеаз воде с помощью инъектора NanoInject (WPI, USA). Общее количество нуклеиновых кислот варировалось от 9 до 12 ng на ооцит, в случае экспрессии рецепторов сложного субъединичного состава (например, $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМКАР) соотношение РНК или ДНК с генами разных субъединиц подбирались из расчёта 1:1:1.

Для экспрессии рецепторов ооциты инкубировали в буфере Барта с добавлением гентамицина в концентрации 40 мг/мл от 48 до 72 часов. Запись

проводили в буфере Барта с помощью усилителя TEC-03X (Npi electronic, Germany) и программного обеспечения WinWCP (University of Strathclyde, UK). В записи использовали стеклянные электроды, содержащие 3 М КСl с входным сопротивлением $\sim 0.1\text{M}\Omega$. В экспериментах с постоянным значением потенциала мембраны, потенциал фиксировался на отметке -60 mV .

3.2.4 Трансформация компетентных клеток E. Coli и выделение плазмид

Компетентные клетки XL1-Blue (Евроген, Россия) трансформировали согласно стандартному протоколу трансформации тепловым шоком, после чего высевали на чашки Петри с твёрдой средой LB с добавлением соответствующего вектору антибиотика и помещали в инкубатор ($37\text{ }^\circ\text{C}$) на ночь (12 часов). Материал выросшей колонии скалывали стерильным носиком пипетки и переносили в жидкую LB с добавлением соответствующего антибиотика (ампициллин/гентамицин) и помещали на 12 часов в шейкер-инкубатор (Biosan, Латвия) на $37\text{ }^\circ\text{C}/200\text{ об/мин}$.

Плазмиды выделяли с помощью набора ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) по прилагаемому протоколу выделения. Элюцию ДНК с колонки проводили деионизированной, очищенной от нуклеаз водой. Концентрацию выделенной плазмидной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра UV-2450 (SHIMADZU, Япония) по поглощению при длине волны 260 нм. Так же измеряли соотношение поглощений D_{260}/D_{280} для определения качества образца. Молекулярную массу выделенного образца анализировали с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мл. Электрофорез проводили в 1x TAE буфере при напряжении 80 мВ в течении 20 минут в камере Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad, USA), подключённой к источнику тока Эльф-4 (ДНК-технологии, Россия).

3.2.5 Культивирование клеток

Клетки линий HEK293 и Neuro2a культивировали в 25 см² культуральных флаконах в среде DMEM или DMEM/F12 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 4 mM L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина и 10 ЕД/мл амфоптерицина В при 37 °С в инкубаторе (МСО-17АИС, Sanyo, Япония) в атмосфере 5% CO₂. Клетки пересеивали два раза в неделю, снимая их с флакона с помощью раствора Версена. Для электрофизиологических исследований методом локальной фиксации потенциала, клетки высаживали на покрытые полилизинном покровные стёкла из расчёта 10⁴ клеток на стекло. Для кальциевого имиджинга клетки высаживали в чёрные или прозрачные пластиковые 96-ти луночные планшеты (Corning, USA).

3.2.6 Трансфекция клеток линий Neuro2a и HEK293.

Трансфекцию клеточных линий проводили с помощью реагента Липофектамин 2000 (Thermo Scientific, USA). Трансфекционную смесь готовили в соответствии со стандартным протоколом трансфекции на основе чистой среды DMEM, липофектамина и плазмидной ДНК и инкубировали в течении 15 минут при комнатной температуре. Для трансфекции клеток линии HEK293 плазмидами, оптимальное соотношение ДНК/липофектамин 1 мкг/4 мкл в 0,125 мл DMEM. В то же время для более толерантных к трансфецирующему агенту клеток линии Neuro2a оптимальное соотношение составило 1 мкг/8 мкл в 0,125 мл DMEM. При коэкспрессии GFP, $\alpha 1$ и $\beta 3$ субъединиц ГАМКАР в HEK293 плазмиды смешивались в массовом отношении 0,5 : 1 : 1. Для увеличения эффективности экспрессии $\alpha 7$ nAHP с ним коэкспрессировался шаперон NACHO. При коэкспрессии $\alpha 7$ nAHP, сенсора Case12 и шаперона NACHO в клетках Neuro2a, оптимальное массовое соотношение плазмидной ДНК составило 1 : 1 : 0,5.

После добавления трансфецирующей смеси к среде, клетки помещали в инкубатор, меняя среду через 4 часа в случае клеток HEK293 и 16 часов – в случае

Neuro2a. Оптимальное время инкубации клеток для временной экспрессии рецепторов и сенсора составляло от 48 до 72 часов.

3.2.7 Кальциевый имиджинг на клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAХР

Активация $\alpha 7$ nAХР приводит к входу в клетку ионов Ca^{2+} , вызывающих подъем концентрации $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитоплазме, который можно детектировать в реальном времени с помощью флуоресцентного сенсора Case12 с пиками поглощения/флуоресценции 491/516 нм. Первичный скрининг активности исследуемых соединений проводили методом кальциевого имиджинга на флуоресцентном микроскопе Olympus IX 71 (Olympus, Япония) с необходимой комбинацией фильтров. Перед экспериментом, клетки, извлечённые из инкубатора, тоекратно промывали «внеклеточным» буфером.

Перед нанесением лиганда клетки инкубировали во «внеклеточном» буфере с добавлением 10 мкМ позитивного аллостерического модулятора $\alpha 7$ nAХР PNU 120596 (Tokris, UK) не менее 10 минут, в целях снижения влияния эффекта десенситизации, ярко выраженного у nAХР $\alpha 7$ -типа. Так же 10 мкМ PNU 120596 содержался во всех растворах тестируемых лигандов и ацетилхолина. В качестве положительного контроля выступало изменение флуоресценции, опосредованное входом ионов кальция, через активированные $\alpha 7$ nAХР в ответ на аппликацию 30 мкМ ацетилхолина. Отрицательный контроль снимался в присутствии 4 μM α -кобратоксина, селективного блокатора $\alpha 7$ nAХР, выделенного из яда кобры *Naja kaouthia*.

Изменение яркости флуоресценции детектировалось с помощью фото- и видеорегистрации на цифровую камеру CAM-XM10 (Olympus, Япония). Для обработки записей использовали программное обеспечение Cella Imaging Software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany) и пакет программ OriginPro 8 (OriginLab, USA). Для скрининга активности, соединение апплицировали в лунку 96-ти луночного планшета и инкубировали в течении 5 минут для связывания с

рецептором. После этого следовала аппликация 30 мкМ ацетилхолина и видеорегистрация изменения флуоресценции. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Построение кривых концентрационной зависимости силы ингибирования от концентрации соединений-ингибиторов проводилось с помощью кальциевого имиджинга на 96-ти луночных чёрных планшетах на мультипланшетном ридере Hidex Sence (Hidex, Finland) при соотношении длин волн возбуждения/регистрации флуоресценции 485/535 нм. Флуоресценция детектировалась в течении 3 минут после аппликации агониста с интервалом в 2 секунды. Контроли записывали в присутствии 4 мкМ α -кобратоксина. Анализ полученных данных проводили с помощью пакета программного обеспечения OriginPro 8 (OriginLab, USA).

4. Результаты и обсуждение

4.1 Введение

Поиск новых лигандов *cys*-петельных рецепторов имеет важность как с точки зрения практического применения, так и с точки зрения фундаментальной науки. Неизвестные ранее соединения, выделенные из природных источников или синтезированные искусственно, проявившие активность и специфичность в отношении определённого вида рецептора, могут стать отправной точкой для создания новых классов терапевтически значимых молекул. На основе установленного «каркаса» новой молекулы, возможно создание библиотеки аналогов, скрининга их структур *in silico*, с последующим отбором в «мокрых» экспериментах. Особенно значимые перспективы открываются перед аллостерическими лигандами *cys*-петельных рецепторов, способными выступать в качестве модуляторов и «молчаливых» агонистов (см. Литобзор).

С другой стороны, изучение новых лигандов нАХР расширяет наши представления о возможных путях и механизмах фармакологического воздействия на рецептор. В этом контексте важнейшее значение имеет вопрос понимания механизмов действия лиганда на рецептор – установления его сайта/сайтов связывания, кинетики действия и электрофизиологических свойств. В рамках диссертационной работы был изучен широкий спектр лигандов *cys*-петельных рецепторов, как выделенных из естественных источников, так и синтезированных химически.

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

В целях поиска новых лигандов *cys*-петельных рецепторов нами был исследован секрет паротидных желёз серой жабы *Bufo bufo*. Экстракт цельного лиофилизованного яда был подвергнут электрофизиологическому исследованию методом локальной фиксации потенциала и продемонстрировал индукцию ионного тока через ГАМКАР $\alpha 1\beta 3$ -типа, временно экспрессированного в клетках линии

НЕК293 (см. **Рисунок 10 В**). Полученный экстракт был подвергнут гель-фильтрации с последующим анализом фракций методом локальной фиксации потенциала. Фракции №1 и №2 (см. **Рисунок 10 А**) проявили активность агонистов ГАМКАР. Данные фракции были подвергнуты обращённо-фазовой хроматографии, а активность полученных фракций (№1, 2, 3) проанализирована электрофизиологически (**Рисунок 10 Б, В**).

Высокоточная масс-спектрометрия и ЯМР-спектрометрия материала фракций позволили установить, что они представлены тремя производными аргинина и дикарбоновых кислот: N-адипиларгинином, N-пимелоиларгинином и N-субериларгинином (**Рисунок 10 Г**). Сравнение структур найденных соединений со структурой ГАМК, а также со структурами известных частичных агонистов ГАМКАР – гуанидиноацетата и гуанидинопропионата позволяет заметить общие структурные черты этих молекул [196, 197]. В частности, расстояние между первичной аминогруппой и карбоксильной группой в ГАМК-А сопоставимо с расстоянием между гуанидиновой и карбоксильной группой в других упомянутых молекулах, что может иметь значение в механизме функционального действия данных лигандов на ГАМКАР. В то же время, нужно сказать, что аргинин, также имеющий в своей структуре гуанидиновую группу, не проявил какой-либо активности в отношении ГАМКАР до концентрации 1 мМ.

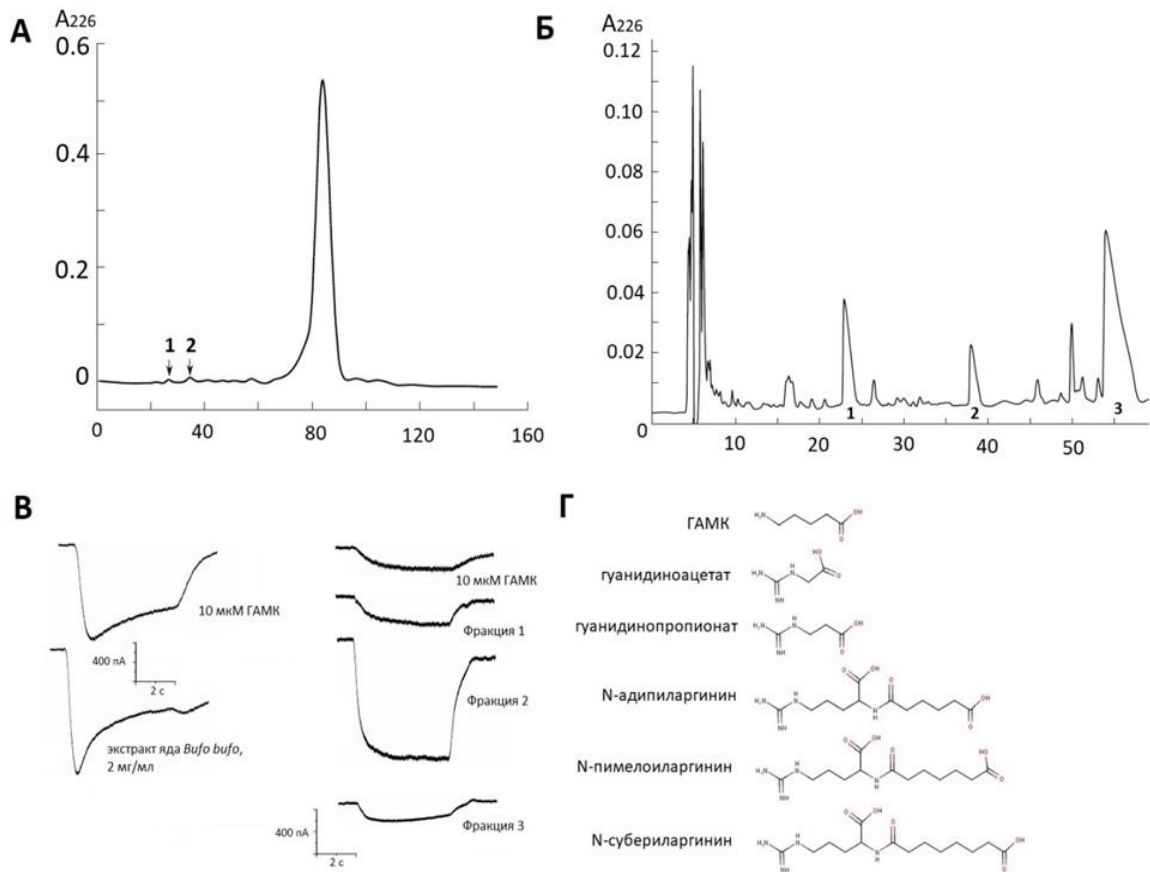


Рисунок 10. (А) Гель-фильтрация экстракта секрета паротидных желёз серой жабы *Bufo bufo*. Цифрами 1 и 2 выделены фракции, проявившие свойства агонистов ГАМКАР $\alpha 1\beta 3$ -типа. (Б) Обращённо-фазовая хроматография фракции 1, полученной в ходе гель-фильтрации. Фракция 2 давала аналогичную картину поглощения. Фракции 1, 2, 3 проявили активность агонистов в отношении $\alpha 1\beta 3$ ГАМКАР (В) Кривые лиганд-индуцированных ионных токов, записанные методом локальной фиксации потенциала (*patch-clamp* в конфигурации *whole-cell*) на клетках линии HEK293, 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. Также на рисунке приведены формулы некоторых других известных агонистов ГАМКР рецептора, имеющих общие структурные черты с исследованными соединениями.

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

Самые известные представители семейства трёхпетельных α -нейротоксинов – α -кобротоксин и α -бунгаротоксин являются широко распространёнными инструментами исследования сус-петельных рецепторов. В то же время, большая часть трёхпетельных токсинов, составляющих основу яда змей семейства *Elapidae*, всё ещё остаются неохарактеризованными. Нами было проведено выделение и электрофизиологическое исследование близкого структурного аналога α -бунгаротоксина - $\alpha\delta$ -бунгаротоксина, из яда малайского крайта *Bungarus candidus*. Являясь типичным представителем «длинных» трёхпетельных токсинов, он представляет собой белок в 73 аминокислотных остатка, а его структура стабилизирована 5 дисульфидными мостиками. $\alpha\delta$ -бунгаротоксин имеет высокую степень гомологии с последовательностью широко известного α -бунгаротоксина (упомянут нами выше) из *Bungarus multicinctus*, однако его аминокислотная последовательность также содержит ряд отличий. Для изучения функционального эффекта $\alpha\delta$ -бунгаротоксина на мышечный и нейрональный $\alpha 3\beta 2$ 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 13 А**).

При изучении электрофизиологических свойств $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 был использован метод двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Нами были построены концентрационные зависимости амплитуды ионных токов, индуцированных 30 мкМ ацетилхолина, от концентрации антагониста - $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1. Учитывая сравнительно большой молекулярный вес токсина и его ожидаемую медленную кинетику, было выбрано продолжительное время преинкубации ооцита с токсином до нанесения ацетилхолина - 10 минут.

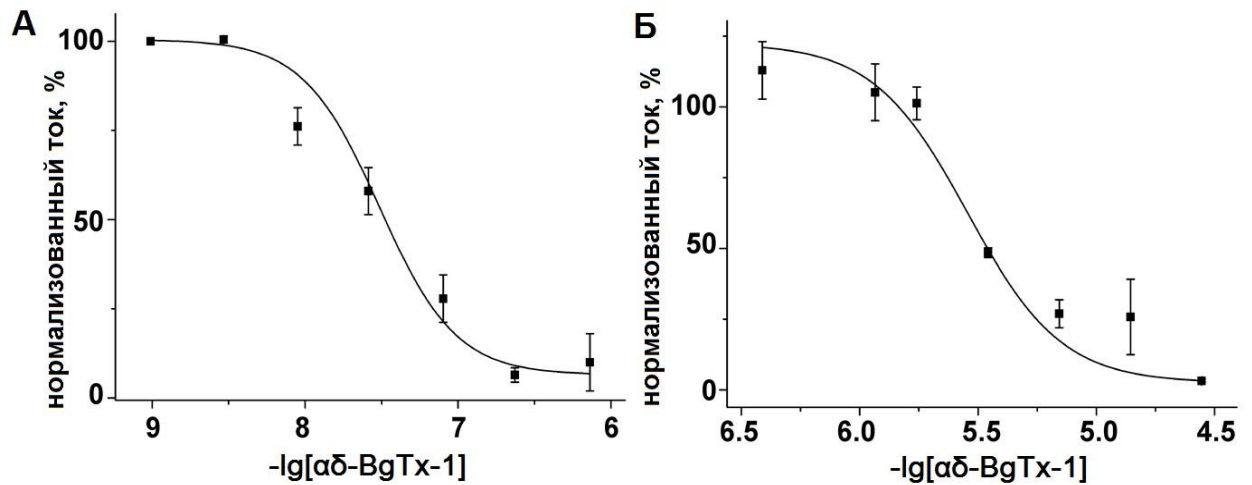


Рисунок 11. Ингибирование $\alpha\delta$ -бунгаротоксином-1 ионного тока через нАХР мышечного (А) и $\alpha\beta 2$ типа, индуцированного 30 мкМ ацетилхолина. Запись тока проведена методом двухэлектродной фиксации потенциала (voltage clamp) на ооцитах *X. laevis*, после аппликации токсина длительностью 10 минут. Величины IC_{50} составили 30 нМ (СІ 95 15.7, 57.2) для мышечного нАХР и 2.9 мкМ (СІ 95 2.1, 3.9) для нейронального $\alpha\beta 2$ нАХР.

Функциональный эффект токсина был изучен на мышечном нАХР мышцы (состав $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$), представляющем основную физиологическую мишень действия трёхпетельных α -нейротоксинов в организме млекопитающих. Другой моделью был выбран человеческий нАХР $\alpha\beta 2$ типа – типичный представитель нейрональных гетеромерных нАХР, не чувствительных к действию классического α -бунгаротоксина. Кривые концентрационных зависимостей (см. **Рисунок 11**) 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 гетеромерный нейрональный нАХР $\alpha\beta 2$ типа. Для данного подтипа рецептора величина IC_{50} составила 3 мкМ. Для сравнения классический α -бунгаротоксин из *Bungarus multicinctus* лишь незначительно (менее 30%) ингибирует данный тип рецептора лишь в концентрации 270 мкМ.

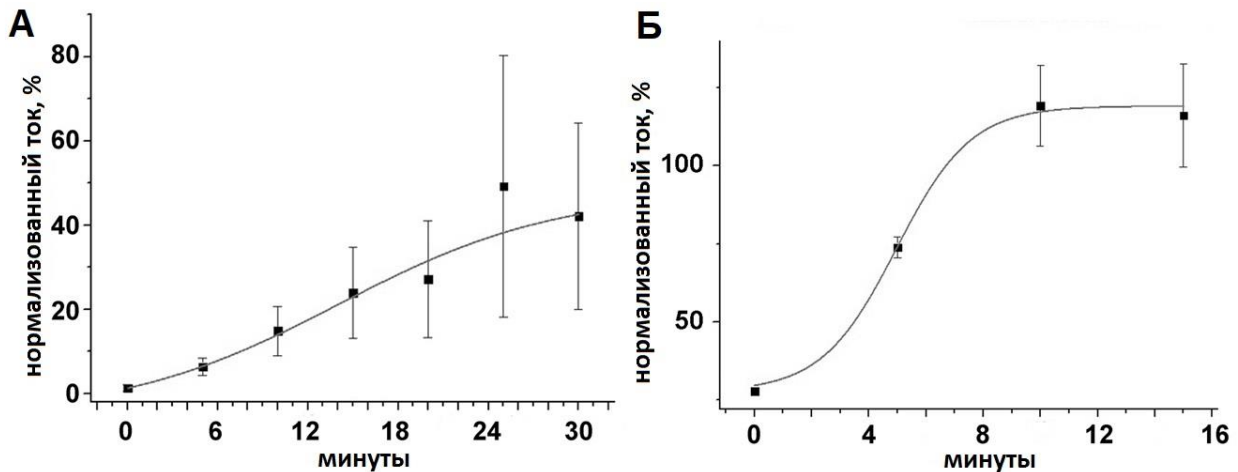


Рисунок 12. Кинетика восстановления функциональной активности мышечного (А) и нейронального нАХР $\alpha 3\beta 2$ -типа (Б) после аппликации 15 мкМ α -бунгаротоксина-1 длительностью 10 минут. Индукция тока вызывалась аппликацией 30 мкМ ацетилхолина с периодичностью в 5 минут. За каждой аппликацией ацетилхолина следовала отмывка не менее чем 2 мл. буфера в течении 5 минут.

Для изучения других возможных особенностей кинетики действия α -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 $\alpha 3\beta 2$ нАХР человека) α -бунгаротоксин-1 действует обратимо. После полного ингибирования мышечного рецептора, амплитуда лиганд-индуцированного ионного тока восстанавливается на 40% после получасовой интенсивной отмывки (см. **Рисунок 12 А**). Здесь новый токсин так же проявляет значительное отличие от классического α -бунгаротоксина, практически необратимо блокирующего мышечный нАХР. Ещё быстрее восстановление амплитуды лиганд-индуцированного ионного тока происходит для нейронального $\alpha 3\beta 2$ нАХР – амплитуда полностью восстанавливается менее чем за 15 минут интенсивной отмывки буфером (см. **Рисунок 12 Б**).

Для выяснения причин столь значительных различий в функциональном эффекте двух структурно близких токсинов нами было произведено выравнивание их последовательностей, а также гомологичное моделирование структуры $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 на основе известной структуры α -бунгаротоксина (см. **Рисунок 13 А, Б**). Сравнение последовательностей показало, что значительные 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. Критически важными для связывания с районом C-петли nAChR являются положительно-заряженные остатки R36 и K38, расположенные на вершине петли II и высококонсервативные для всех α -бунгаротоксинов. Замены R25T, F32W и V40I локализованы вблизи упомянутого участка.

Однако, из всех перечисленных мутаций, лишь замены R25T и F32W могут заметным образом повлиять на топологию и электростатические свойства петли II, в то время как мутация V40I, едва ли может иметь значения для функционального эффекта белка. Делеция A7 Δ в петле I, возможно, приводит к сокращению площади контакта токсина с рецептором, уменьшая его сродство и надёжность связывания в ортостерическом сайте. Также, по-видимому, на специфичность действия $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 серьёзным образом влияет замена консервативного среди «длинных» трёхпетельных нейротоксинов остатка треонин 8 на пролин (T8P). Внесение в данную структуру пролина заметно искажает геометрию конца петли I, вовлечённого в связи с остатками ортостерического сайта nAChR [198].

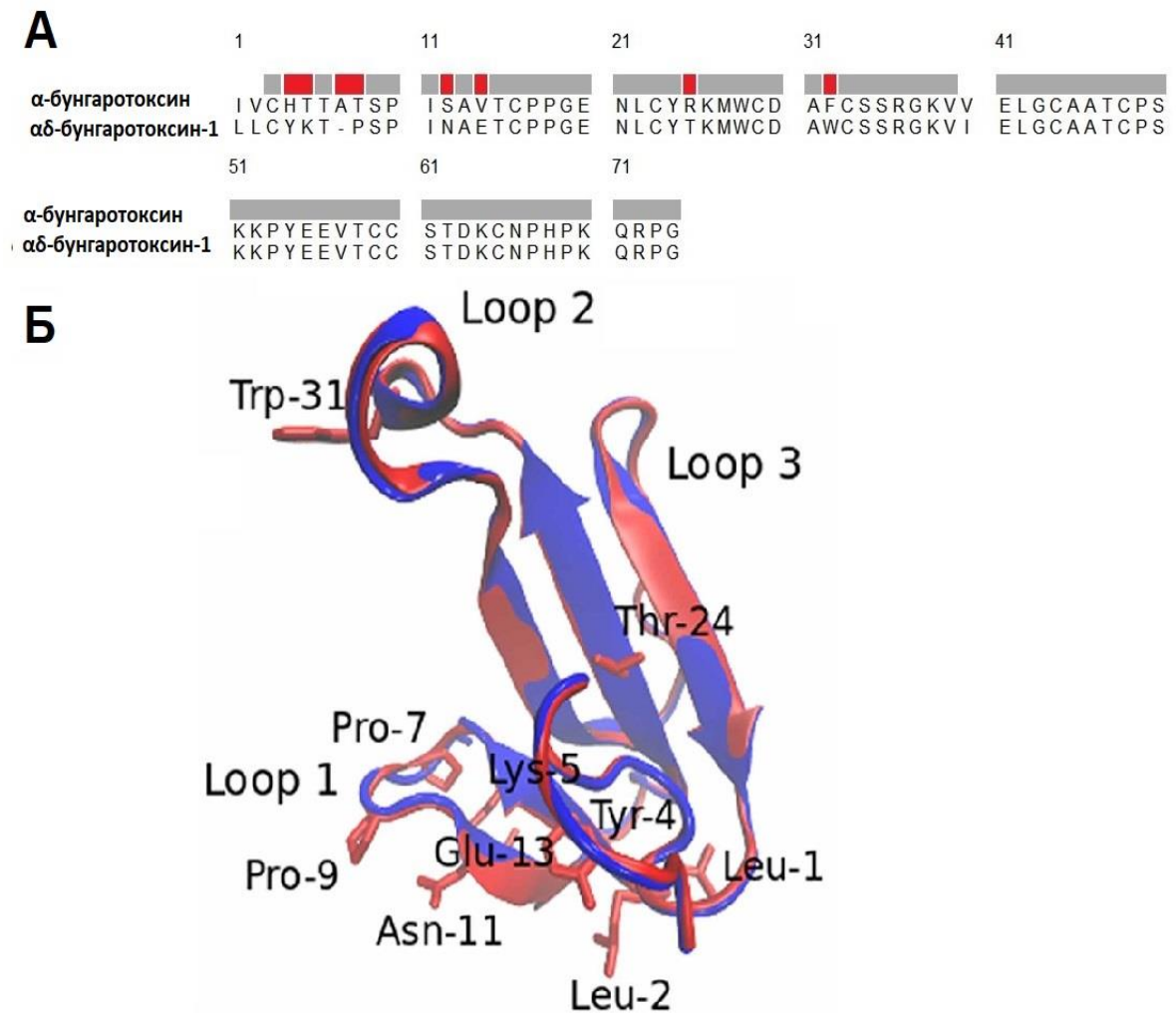


Рисунок 13. (А) Выравнивание аминокислотных последовательностей α -бунгаротоксина и $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1. Значимые замены аминокислотных остатков выделены красным. (Б) Модель структуры $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 (красный), построенная по гомологии со структурой α -бунгаротоксина (синий) [66]. Виден характерный изгиб петли I, связанный с появлением в ней остатка пролина.

4.4 Анализ активности фрагментов петли II белков семейства Lуб/uPAR

Как уже обсуждалось в соответствующем разделе литобзора, мембрансвязанный белок Lynx1, а также родственные растворимые белки SLURP1 и SLURP2, относящиеся к семейству белков Lуб, модулируют активность nAXP и играют заметную роль в регуляции механизмов роста и пролиферации эпителиев и клеток нервной ткани [199]. Структурно, перечисленные белки близки к трёхпетельным нейротоксинам из яда змей. Белок SLEEPLESS или SSS *Drosophila melanogaster* - другой пример белка семейства Lуб. Он так же имеет трёхпетельный способ укладки и является модулятором nAXP нервной системы мухи, подавляя их активность и регулируя общий уровень возбуждения в нервной системе насекомого [200, 201]. Согласно нашей гипотезе, синтетические пептиды, повторяющие структуру центральной петли данных белков, могли бы в какой-то степени сохранить холинергическую активность своих полноразмерных прототипов. Одновременно, имея меньший молекулярный вес, они обладали бы большей по сравнению с полноразмерными аналогами биодоступностью и сравнительной лёгкостью синтеза. В случае успеха, эти качества позволили бы рассматривать их как молекулы-модуляторы нейрональных nAXP, имеющие широкие фармакологические перспективы.

В ходе работы нами была исследована функциональная активность пептидов, воспроизводящих последовательность центральной петли эндогенных трёхпетельных белков Lynx1, SLURP1, SLURP2 человека, а также структурно близкого к ним трёхпетельного белка SSS мухи *Drosophila melanogaster*. Аминокислотные последовательности центральной петли II белков Lynx1, SLURP1, SLURP2 и SSS, а также синтезированных пептидов приведены на **Рисунке 14 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. Положение добавленных нами концевых аминокислот (цистеинов) подбиралось таким образом, чтобы их радикалы были экспонированы по одну

стороны плоскости «шпильки» (β -листа) и замыкание дисульфидной связи не вызывало конформационного напряжения шпильки.

Поскольку для полноразмерного синтетического SLURP1 с аминокислотной последовательностью природного белка было описано ингибирование $\alpha 9\alpha 10$ nAHP [203], в первую очередь нами был исследован эффект синтезированных пептидов на $\alpha 9\alpha 10$ nAHP крысы и человека. Двухэлектродная запись потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки 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 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 15 Б**). Пептид **5** (петля SSS) проявил лишь менее 50% ингибирования человеческого $\alpha 9\alpha 10$ в концентрации 100 мкМ (**Рисунок 15 А**).

Ряд работ продемонстрировал действие полноразмерного Lynx1 и вариантов SLURP1 на нейрональные nAHP, содержащие различные комбинации α - и β -субъединиц [202, 203]. Принимая во внимание эти данные, мы исследовали действие синтезированных пептидов на гетеромерный нейрональный nAHP $\alpha 3\beta 2$ типа. При концентрации 30 мкМ фрагмент Lynx1 (**1**) продемонстрировал примерно 30% ингибирование ионного тока через $\alpha 3\beta 2$ nAHP (**Рисунок 15 В**). Аналогичный по характеру и амплитуде эффект был установлен для фрагмента SLURP1 (**6**), в то же время линейный пептид Lynx1 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. Ни один из пептидов не проявил активности на nAHP $\alpha 4\beta 2$ типа в концентрации до 30 мкМ.

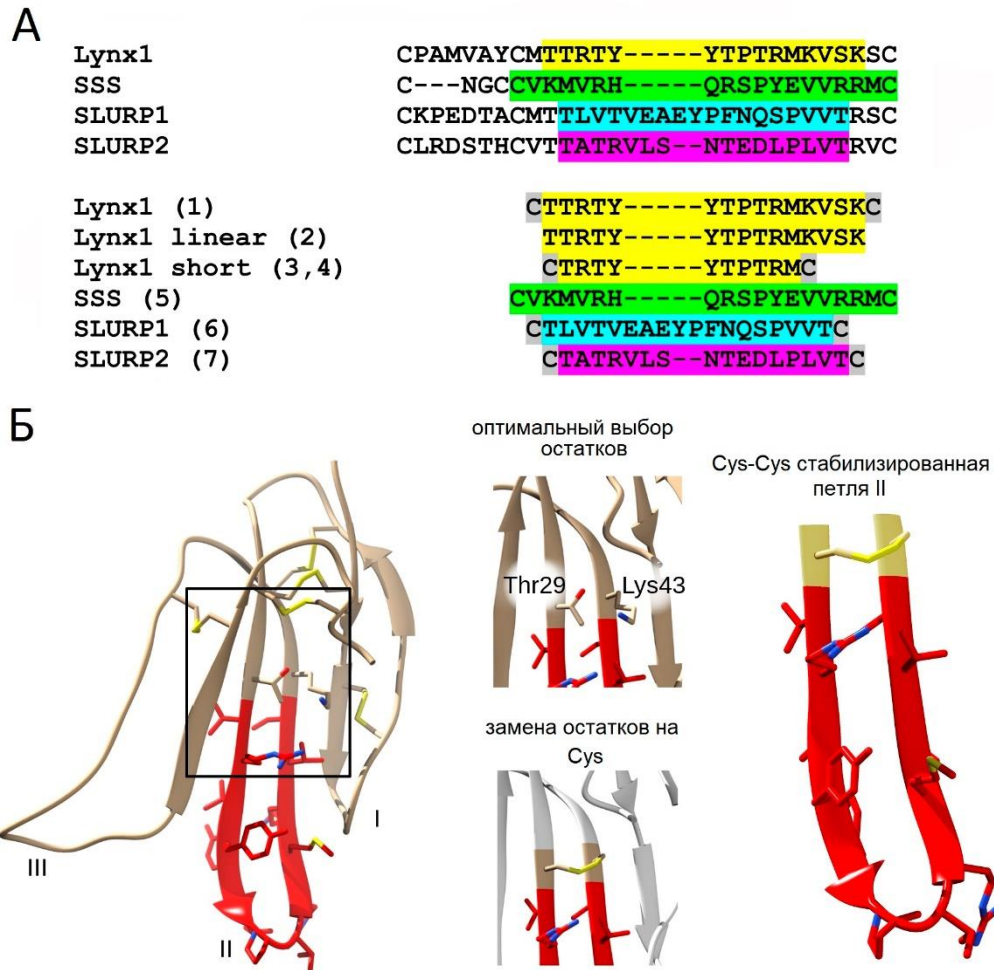


Рисунок 14. Выбор последовательности петель II для синтеза пептидов-аналогов. (А) Выравнивание аминокислотных последовательностей петли II белков семейства Луб. Выбранные для синтеза пептидов фрагменты петли II выделены соответствующим цветом и пронумерованы от 1 до 7. (Б) Для стабилизации структуры искусственным дисульфидным мостиком в последовательность пептидов были добавлены остатки цистеинов, фланкирующие крайние аминокислоты пептидной цепи. Для пептидов 1 и 2, это - Thr29 and Lys43. На рисунке использована структура Lynx1 (PDB 2L03).

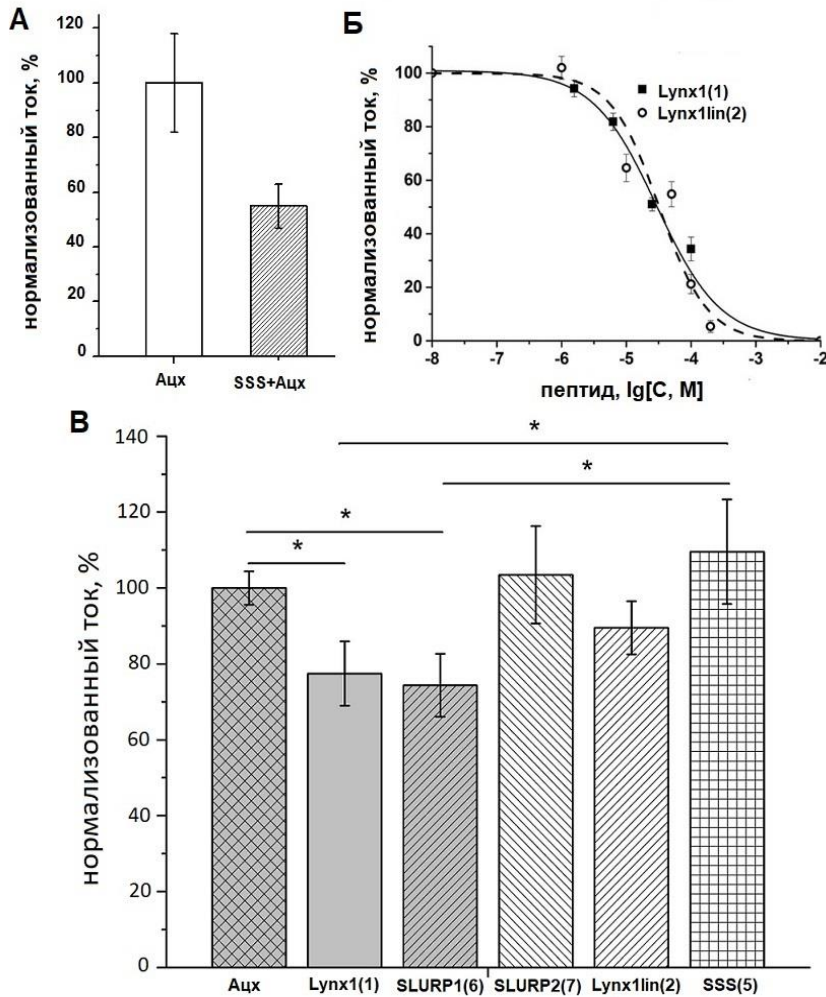


Рисунок 15. Активность синтетических аналогов белков семейства Луб в отношении нАХР $\alpha 9\alpha 10$ и $\alpha 3\beta 2$ типов, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. (А) – Гистограмма ингибирования ионного тока, индуцированного 25 мкМ Ачх через человеческий $\alpha 9\alpha 10$ нАХР под действием 100 мкМ пептида SSS (5). (Б) Ингибирование ионных токов, индуцированных 30 мкМ Ачх, пептидом Lynx1 (1) на крысином (■, сплошная линия) $\alpha 9\alpha 10$ нАХР или пептидом Lynx1lin (2) на человеческом (○, прерывистая линия) $\alpha 9\alpha 10$ нАХР. Для Lynx1 (1) значение константы IC₅₀ составило 27.00 мкМ (CI 95% 14.55 - 41.26 мкМ), n = 3. Для пептида Lynx1lin (2) IC₅₀ составила 32.30 мкМ (CI 95% 14.70 - 70.99 мкМ), n = 3 (В) Гистограмма ингибирования ацетилхолин-индуцированного ионного тока через нАХР $\alpha 3\beta 2$ типа человека, экспрессированный в ооцитах *X. laevis*, пептидами - аналогами белков семейства Луб. Эффект пептидов Lynx1 (1), SLURP1 (6), SLURP2 (7), Lynx1 lin (2) и SSS (5) протестирован для концентрации 50 мкМ. Ингибирование вызывалось 5 минутной аппликацией антагониста. Ионный ток индуцировали аппликацией смеси 30 мкМ ацетилхолина с 50 мкМ исследуемого пептида. Нормализованные токи представлены как среднее \pm стандартная ошибка, n=3-5. Значения относительной амплитуды для Lynx1 (1) и SLURP1 (6) $77 \pm 8\%$ и $74 \pm 8\%$, соответственно. Столбики, отмеченные попарно звёздочкой показали достоверные различия друг от друга при статистической обработке тестом Стьюдента ($p < 0,05$).

Анализ зависимости активности изученных пептидов от расчётного значения их изоэлектрической точки (pI) привёл к любопытным результатам. Вычисление значений pI для Lpx1 (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 тоже время, значения pI для фрагментов SLURP1 (6) и SLURP2 (7) значительно ниже - 3.80 и 4.37, соответственно. Такая разница в заряде молекул может иметь значение в 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.

4.5 Изучение электрофизиологических свойств йодированных производных конотоксинов GeXIVA и RgIA

α -конотоксины – пептиды из яда моллюсков рода *Conus*, а также их аналоги, 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 [204, 73]. Другой недавно охарактеризованный конотоксин, имеющий высокую селективность к данному подтипу nAHP - αO -конотоксин GeXIVA [76].

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 (в первую очередь на модели растворимого $\alpha 9$ лиганд-связывающего домена). В то же время, 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 ооцитами *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. Моноидированный 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 16 А**).

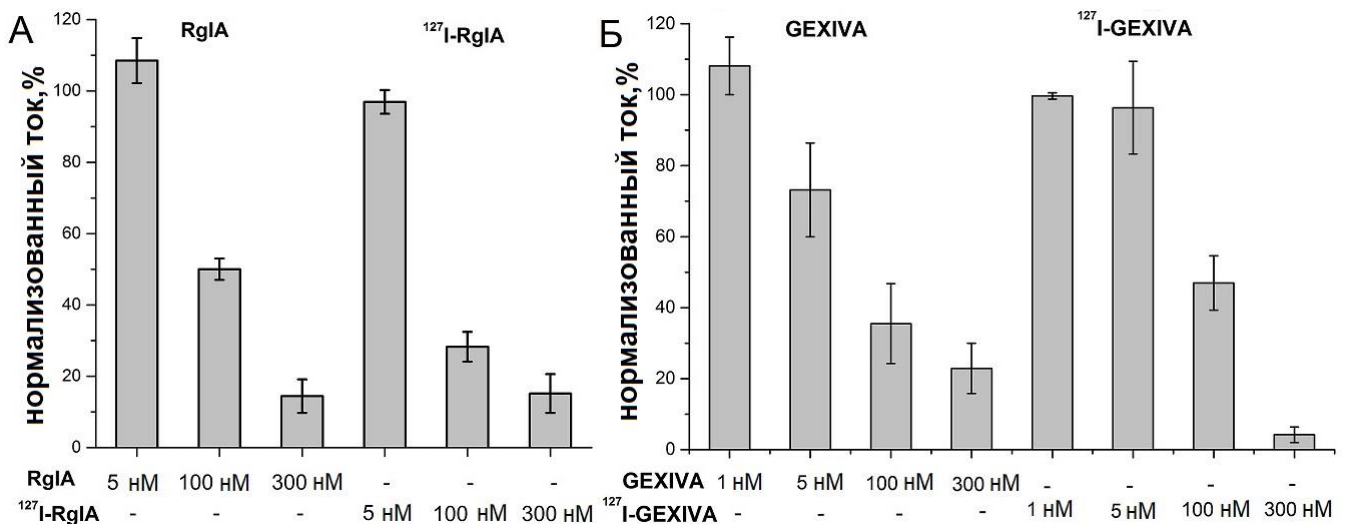


Рисунок 16. Ингибирование ионных токов, индуцированных 10 мкМ ацетилхолина через (А) $\alpha 9\alpha 10$ nAHP крысы, синтетическим аналогом конотоксина RgIA и его [^{127}I]-производным в концентрациях 5, 100, 300 нМ, $n = 3$ и через (Б) человеческий $\alpha 9\alpha 10$ nAHP, синтетическим аналогом конотоксина GeXIVA и его [^{127}I]-производным в концентрации 1, 5, 100, 300 нМ, $n = 2$. Столбики гистограммы представляют среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Электрофизиологическое исследование трийодированного $^{127}\text{I-GeXIVA}$ также показало близкую с нейодированным синтетическим GeXIVA активность йодированного аналога (см. **Рисунок 16 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.

4.6 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 [205]. 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 nAХР являются катионными каналами и (см. раздел «Ион-селективный фильтр» обзора литературы), то есть структуры канала nAХР несут отрицательный заряд, поэтому устье ионной поры также является потенциальным сайтом связывания положительно-заряженных пептидных лигандов. В частности, предположительно в этом районе расположен дополнительный неортостерический сайт связывания богатого аргининами конотоксина GeXIVA [76]. Все перечисленные данные привели нас к предположению о том, что полиаргинин-содержащие пептиды могут являться потенциальными лигандами nAХР.

Предварительные опыты показали, что чистый аргинин не проявляет какой-либо активности по конкуренции с α -бунгаротоксином на моделях nAХР и не вызывает функционального ответа\подавления ответа в доступных нам экспериментальных системах nAХР (двухэлектродная запись потенциала на ооцитах, экспрессирующих мышечный рецептор мыши, $\alpha 3\beta 2$ или $\alpha 9\alpha 10$ nAХР человека, кальциевый имиджинг на клетках Neuro2a, экспрессирующих человеческий nAХР $\alpha 7$ -типа) до концентрации 500 мкМ.

Нами был синтезирован набор из четырёх поли-/олигоаргининовых пептидов (R3, R6, R8 и R16) и двух пептидов смешанного состава WR2 и W2R4. Данный диапазон структур был выбран, во-первых, с целью изучения возможного влияния длины цепи на активность пептида. Во-вторых, из-за функциональной значимости и хорошей изученности соединений R8, R16. Эти типы соединений широко известны в качестве «проникающих пептидов» – молекул, способных к связыванию нуклеиновых кислот и других анионных соединений и их эффективному переносу через клеточную мембрану [206, 207]. Так же известны «проникающие» пептиды более сложного состава, содержащие в числе прочего, остатки ароматических аминокислот [208], что привело нас к мысли о необходимости синтеза дополнительных триптофансодержащих пептидов (WR2 и W2R4). Аминокислотные последовательности синтезированных пептидов перечислены на **Рисунке 17 А**.

Для изучения возможного связывания исследуемых пептидов в районе ортостерического сайта, был проведён конкурентный радиолигандный анализ с использованием радиоактивно-меченного ^{125}I -бунгаротоксина. В качестве модельных объектов выступили водорастворимый лиганд-связывающий домен nAHR $\alpha 9$ -типа человека, присоединённый к никель-агарозе, мембраны электрического органа ската *Torpedo californica*, содержащие nAHR мышечного типа, клетки линии GH4C1 (гипофиз крысы), экспрессирующие $\alpha 7$ nAHR человека, а также АХСБ из моллюсков *Limnaea stagnalis* и *Aplysia californica*. Константы вытеснения для исследованных пептидов приведены в **Таблице 1**, а кривые IC50 для пептидов, проявивших активность приведены на **Рисунке 17 Б-Д**.

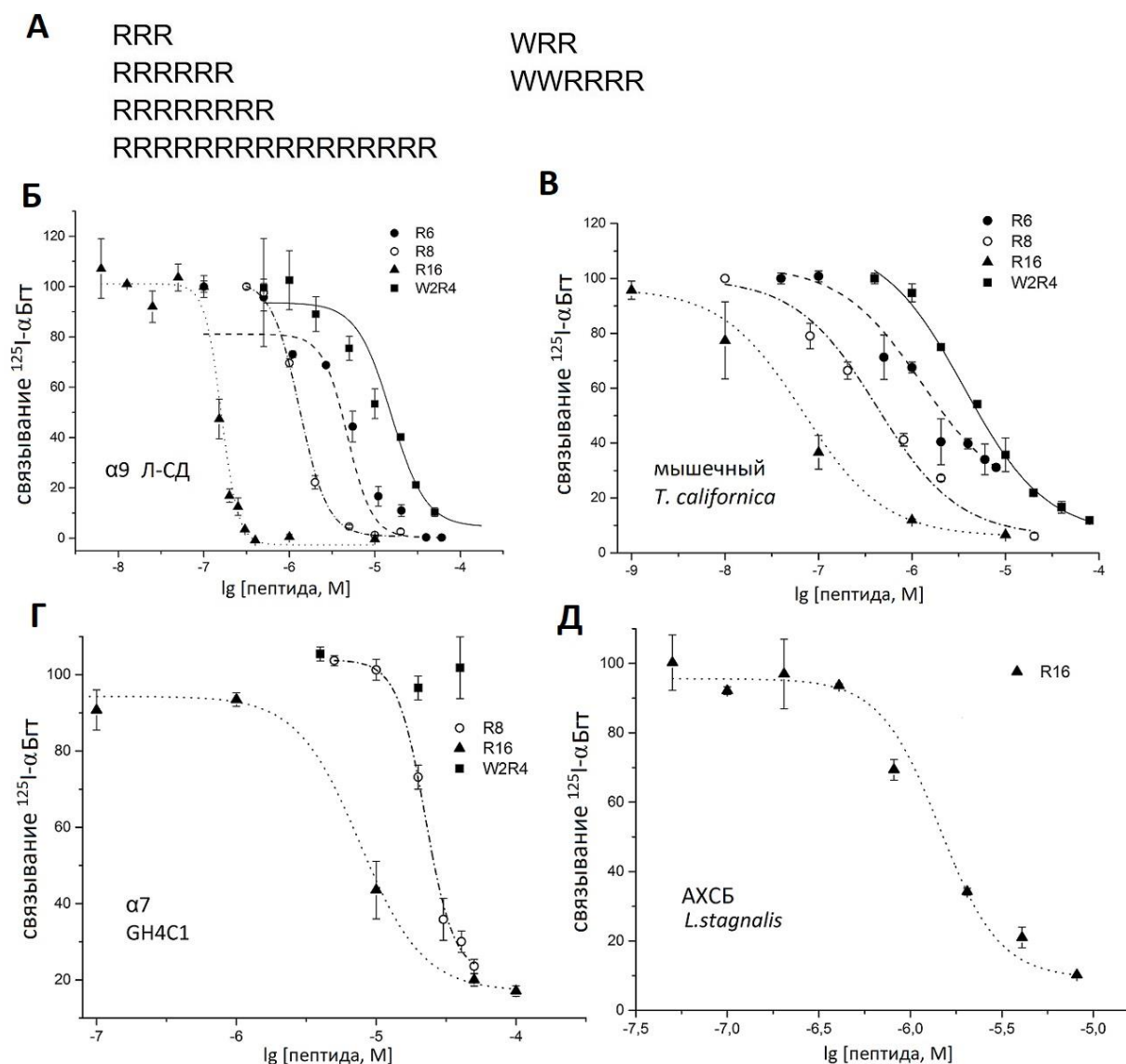


Рисунок 17. (А) Структуры изученных аргинин-содержащих пептидов. Результаты конкурентного радиолигандного анализа: конкуренция ^{125}I - α БГТ с пептидом R6 (●), R8(○), R16 (▲) и W2R4 (■) за связывание с (Б) $\alpha 9$ лиганд-связывающим доменом, (В) мышечным nAChR на мембранах электрического органа ската *T. californica*. (Г) Конкуренция ^{125}I - α БГТ с пептидами R8(○), R16 (▲) и W2R4 (■) за связывание с человеческим $\alpha 7$ nAChR 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**.

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

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 триптофансодержащих пептидов WR2 - не активен, в то время как W2R4 проявляет активность на $\alpha 9$ -домене и мышечном nAХР.

По результатам радиолигандного анализа, было принято решение исследовать функциональную активность изучаемых пептидов 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 nAХР мыши ($\alpha 1\beta 1\delta \epsilon$ состава), $\alpha 9\alpha 10$ или $\alpha 3\beta 2$ nAХР человека. Метод кальциевого имиджинга был использован для изучения лиганд-индуцированного ионного тока через хорошо проницаемый для ионов кальция $\alpha 7$ nAХР 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.

Соединения состава R6, R8, R16 и W2R4 проявили активность антагонистов на всех исследованных моделях. Кривые зависимости подавления ионного тока от концентрации антагониста приведены на **Рисунке 18**, а константы IC50 перечислены в **Таблице 2**. Наибольшую активность проявил пептид R16, имеющий величину IC50 0,16 мкМ на мышечном nAХР мыши, а также пептиды R6, R8 и R16, имеющие IC50 на $\alpha 9\alpha 10$ nAХР человека равные 320, 40 и 120 нМ соответственно. Прочие значения IC50 находятся в диапазоне 1-20 мкМ, что позволяет говорить о некоторой селективности антагониста R8 в отношении nAХР $\alpha 9\alpha 10$ типа. Одновременно, хуже, по сравнению с радиолигандным анализом, прослеживается корреляция активности соединения с длиной его цепи – данная закономерность однозначно наблюдается лишь для действия соединений ряда R6, R8, R16 на мышечный nAХР. Ни один из коротких пептидов (R3, WR2) активность не проявил, как и в случае радиолигандного анализа.

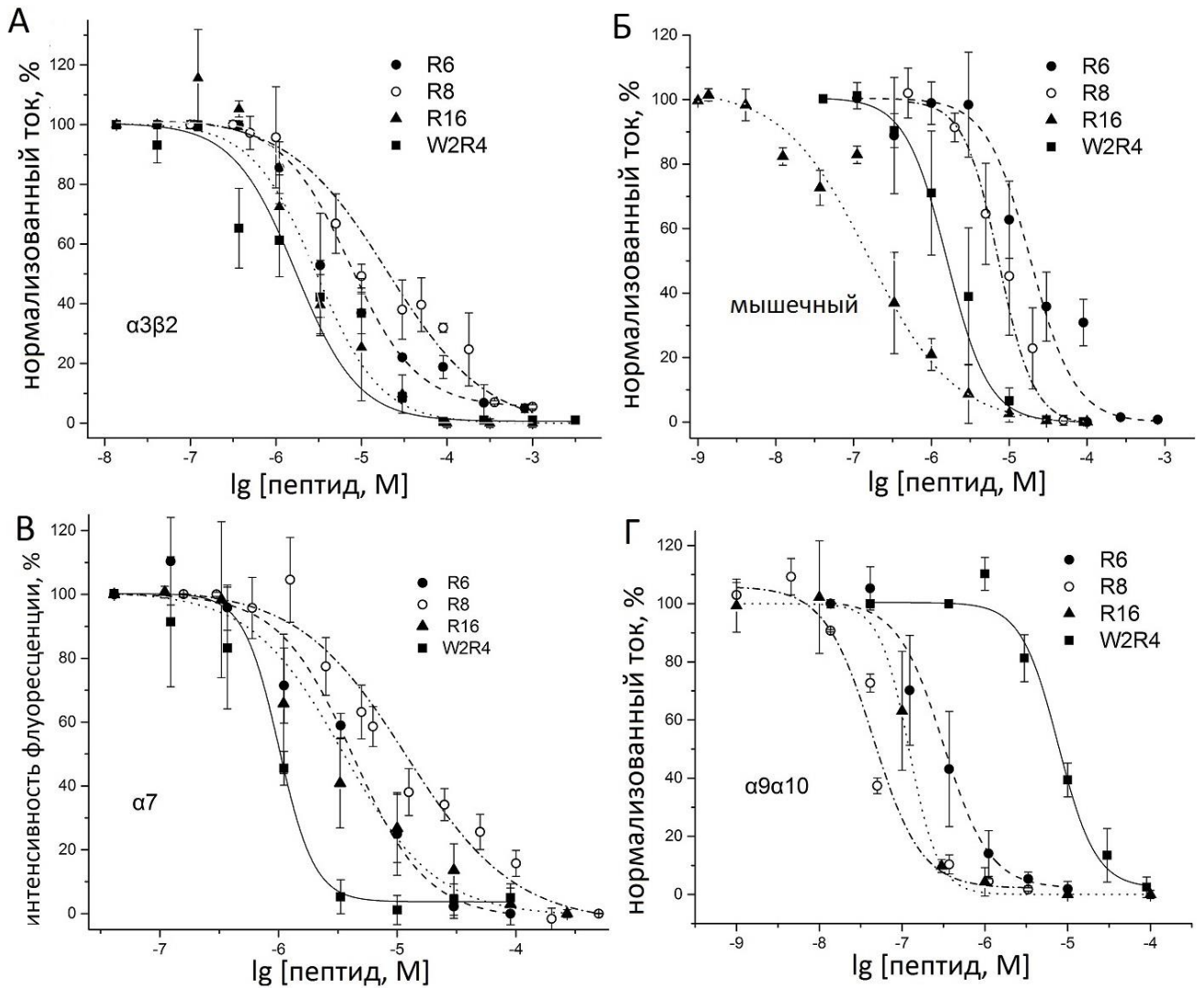


Рисунок 18. Анализ ингибирования ионных токов через nAChP аргинин-содержащими пептидами R6 (●), R8(○), R16 (▲) и W2R4 (■). Токи индуцированы аппликацией 30 мкМ Ацх на ооциты *Xenopus*, экспрессирующие человеческий $\alpha 3\beta 2$ (А), мышечный $\alpha 12\beta 1\epsilon\delta$ мышечный (Б) и человеческий $\alpha 9\alpha 10$ (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.

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 IC_{50} , полученных методом радиолигандного связывания и кальциевого имиджинга обращает внимание, что пептид W2R4 не конкурирует с радиоактивным бунгаротоксином за связывание с $\alpha 7$ nAХР на клетках GH4C1 и обоими АХСБ. Тем не менее W2R4 ингибирует вход кальция через $\alpha 7$ nAХР с величиной IC_{50} 1 мкМ. Эти данные позволяют предположить неконкурентный механизм ингибирования, опосредованный связыванием пептида за пределами ортостерического сайта nAХР и, как следствие, отсутствие 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 19 А).

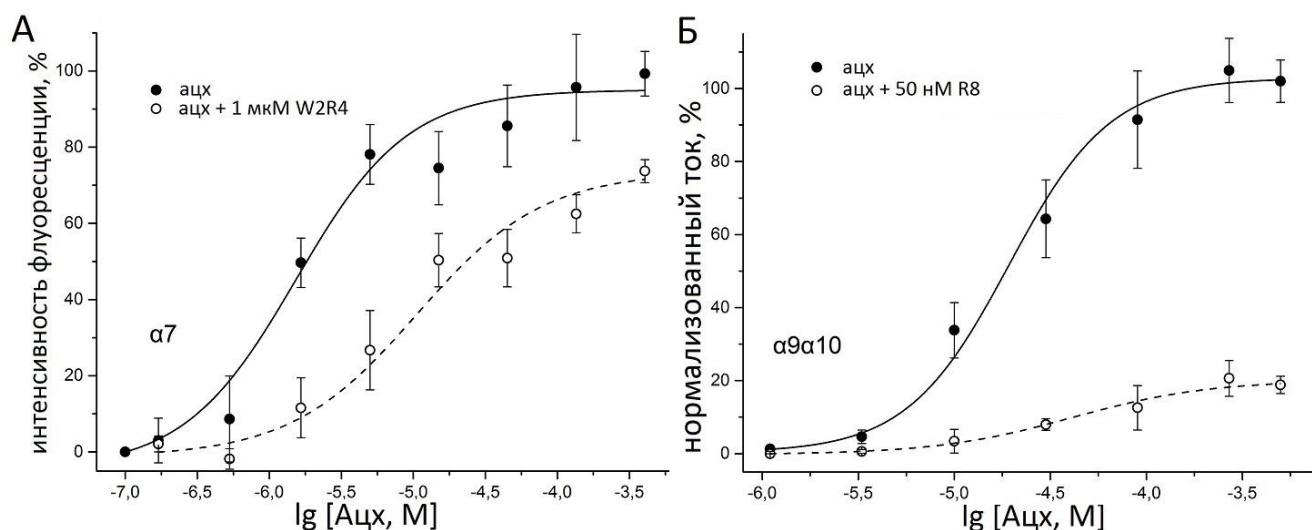


Рисунок 19. (А) Зависимость интенсивности флуоресценции клеток Neuro2a, индуцированной входом Ca^{2+} , от концентрации Ацх в отсутствии (●, сплошная линия) и в присутствии (○, прерывистая линия) 1 мкМ W2R4. (Б) Концентрационные кривые зависимости амплитуды индуцированного Ацх ионного тока через экспрессированный в ооцитах $\alpha 9\alpha 10$ nAХР 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 $\alpha 7$ nAХР приводит к сдвигу кривой ответа на дозу вправо: значение EC50 изменяется от 1,53 мкМ (CI 95 1.21, 2.46 до 10.06 мкМ (CI 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 $\alpha 7$ nAХР пептидом W2R4.

Наиболее вероятным неортостерическим сайтом связывания W2R4 на поверхности nAХР является нижняя часть внеклеточного вестибюля ионселективной поры, сформированного внеклеточными доменами nAХР. В своей нижней части вестибюль поры имеет диаметр порядка 20 Å и содержит отрицательно заряженные аминокислотные остатки, такие как D97 в $\alpha 7$ nAХР человека [20]. Так же 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 ион-селективной поры [209, 210]. При этом одиночный аргининовый радикал вызвал бы непосредственное блокирование ионного канала на уровне верхней части ТМ домена, а остальная часть пептида стабилизировала это взаимодействие, связываясь с нижней частью внеклеточного вестибюля поры. Аналогичная схема связывания характерна, например, для тетродотоксина в устье натриевого потенциал-зависимого канала [211]. Несмотря на конкуренцию олигоаргининовых пептидов (R6, R8 и R16) с радиоактивным бунгаротоксином за ортостерический сайт, аналогичная 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 nAХР $\alpha 9\alpha 10$ типа, экспрессированном в ооцитах *Xenopus laevis*. На данном подтипе рецептора пептид R8 показал максимальную активность и селективность среди всех изученных соединений (IC50 44 нМ, см. Таблица 2). Эксперимент по построению кривой

ответа на АХР $\alpha 9\alpha 10$ типа на различную концентрацию ацетилхолина в отсутствии и в присутствии 50 нМ R8 (см. **Рисунок 19 Б**) показал значительное понижение максимальной амплитуды ионного тока с $102.9 \pm 3.9\%$ до $18.8 \pm 2.6\%$ и незначительный сдвиг значения EC50 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 $\alpha 9\alpha 10$ на АХР.

Непосредственный анализ кривых, полученных во время электрофизиологических экспериментов с пептидом R8 и $\alpha 9\alpha 10$ на АХР, приводит к ряду выводов. Одновременное 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 20 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 20 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 20 А, Б**), так и в случае 5 минутной преинкубации пептида (см. **Рисунок 20 В, Г**). Это наблюдение хорошо согласуется с предположением о преимущественно неконкурентном механизме ингибирования.

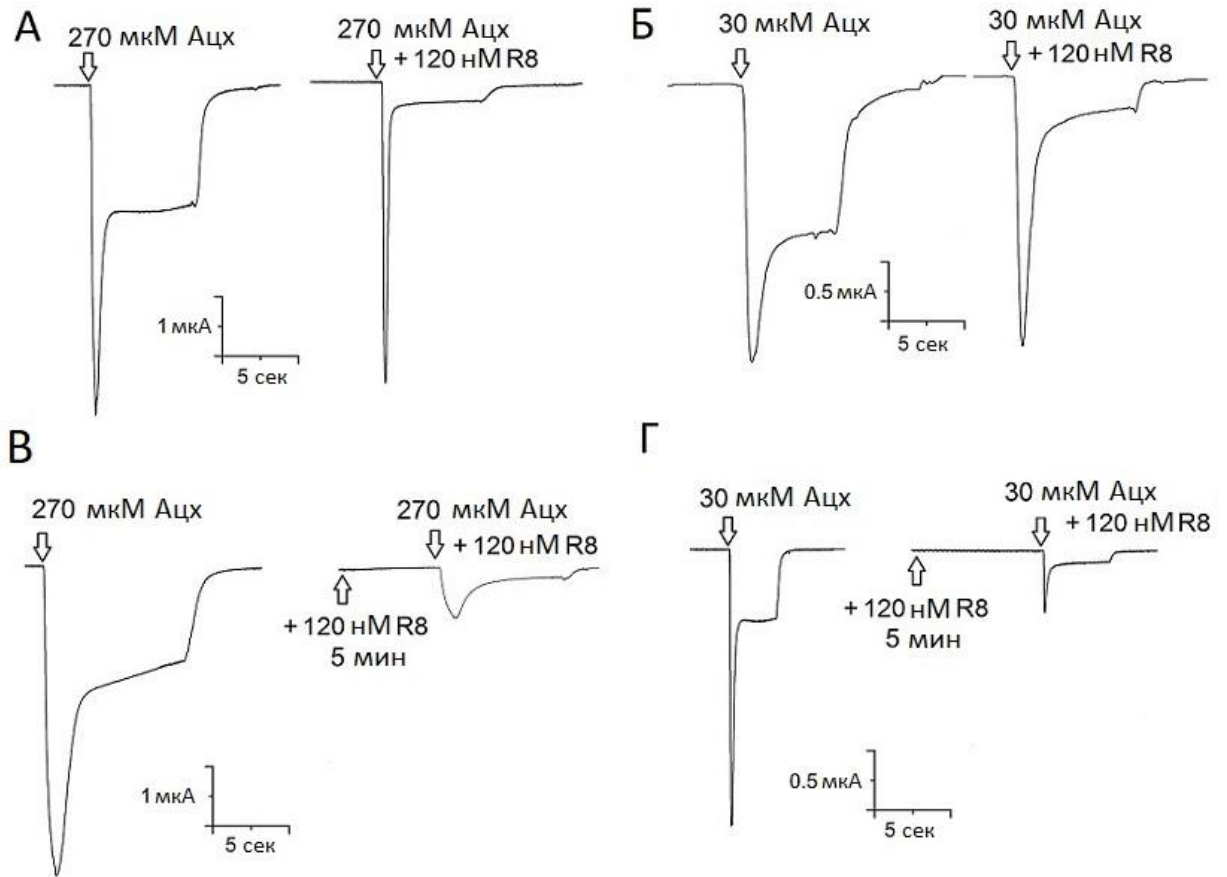


Рисунок 20. Кривые ионных токов, через мембраны ооцитов *Xenopus*, экспрессирующих $\alpha 9\alpha 10$ nAHP. Токи индуцированы аппликацией смеси (А) 270 и 30 мкМ Ацх со 120 нМ пептида R8, рядом представлены кривые контрольных токов, индуцированных чистым Ацх. R8 практически не влияет на амплитуду тока, но значительно 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. Рядом приведены кривые контрольных токов, индуцированных чистым Ацх. Как амплитуда ионного тока, так и количество тока, прошедшего через мембрану, заметно снижается под действием пептида. Отсутствие мгновенного эффекта R8 может быть объяснено его медленной кинетикой связывания, а независимость силы ингибирования от концентрации Ацх свидетельствует о преимущественно неконкурентной природе ингибирования ионного тока.

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 21 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. Одновременно, при

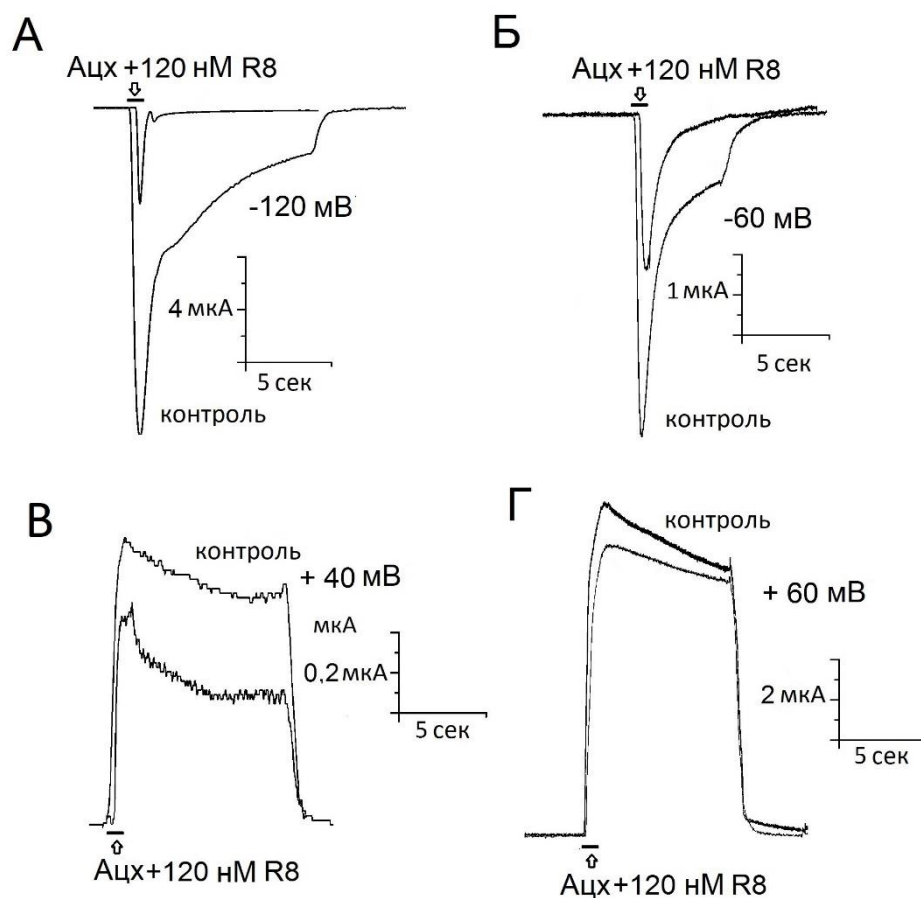


Рисунок 21. Сила ингибирования $\alpha 9\alpha 10$ nAChR, экспрессированного в ооцитах *Xenopus laevis*, пептидом R8, зависит от поддерживаемого потенциала на мембране (holding potential). Ток, индуцированный 30 мкМ Ацх в отсутствии пептида (контроль) и в присутствии 120 нМ пептида R8 после 5 минутной преинкубации, при поддерживаемом потенциале (А) -120, (Б) -60, (В) +40, (Г) +60 мВ соответственно.

увеличении потенциала в положительную сторону эффективность ингибирования заметно снижается (лишь около 10% ингибирования при +60 мВ).

Данный эффект может быть объяснён связыванием пептида R8 в районе внеклеточного вестибюля 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. Кроме того, само вхождение положительно заряженной молекулы в вестибюль или даже верхнюю часть канала и удержание там при положительном значении потенциала кажется гораздо менее вероятным. 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 $\alpha 9\alpha 10$ нАХР – 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 получена вольт-амперная характеристика рецептора под действием 1 мкМ α -кобратоксина. По виду кривых вольт-амперных характеристик заметно (см **Рисунок 22 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). В то же время, преинкубация ооцита со 120 нМ R8 уменьшает амплитуду лиганд-индуцированного тока при отрицательных значениях и сдвигает вольт-амперную характеристику вправо, изменяя значение потенциала реверсии с -22 мВ до +5 мВ.

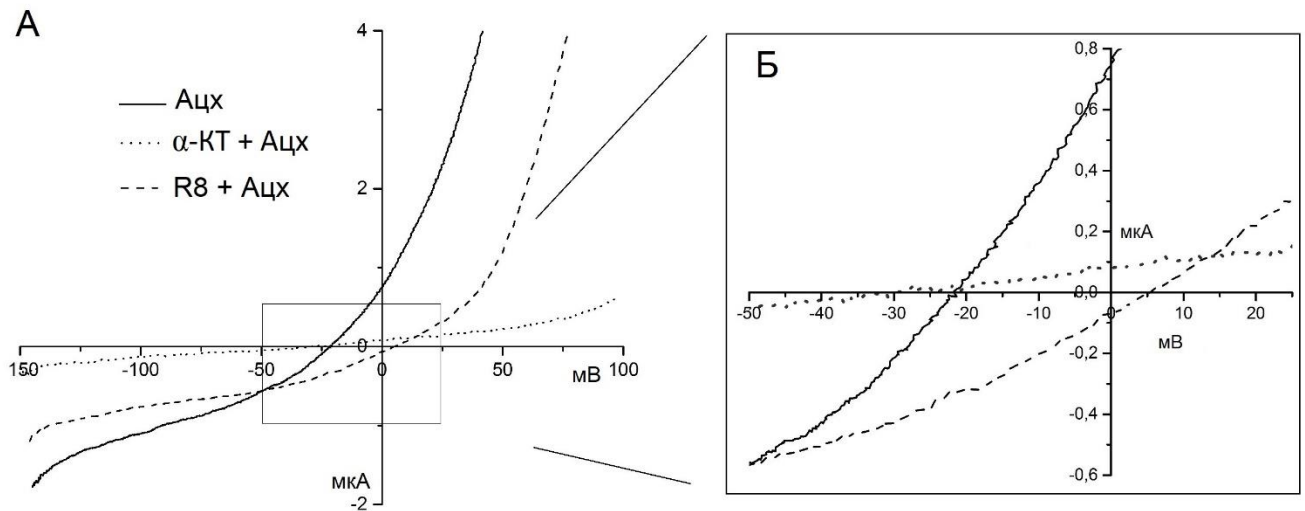


Рисунок 22. (А). Вольт-амперная характеристика $\alpha 9\alpha 10$ nAChR, экспрессированного в ооцитах *Xenopus laevis*. Ионный ток индуцирован 10 мкМ ацетилхолина и записан в фазе плато (3 сек после аппликации) в отсутствие антагонистов (непрерывная линия), после 5 мин инкубации с 1 мкМ α -кобратоксина (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 nAChR под действием пептида R8 с -22 до +5 мВ, в то время как классический конкурентный антагонист α -кобратоксин не оказывает влияния на значение потенциала реверсии.

Подобное отличие во влиянии α -кобратоксина и пептида R8 на вид вольт-амперной характеристики $\alpha 9\alpha 10$ nAChR можно объяснить различными механизмами действия. Несмотря на то, что α -кобратоксин является положительно заряженным белком (pI 8,6), его ингибирующий эффект на nAChR 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 nAHR (результаты радиолигандного анализа), эффект R8 на $\alpha 9\alpha 10$ nAHR обусловлен в первую очередь его потенциал-зависимым действием на дополнительный аллостерический сайт. Наиболее логичным расположением такого сайта выглядит внеклеточный вестибюль ион-селективной поры, что и объясняет изменение её ионной проницаемости (сдвиг потенциала реверсии в положительную сторону) под действием пептида R8.

В семейство cys-петельных рецепторов помимо катионных каналов, также входят и анионные, в частности – ГАМКАР, разделяющий с nAHR множество структурных черт. Более того nAHR и ГАМКАР имеют общие ортостерические лиганды, в число которых, как было продемонстрировано в предыдущих работах нашего Отдела, входит α -кобратоксин [213]. Принимая во внимание способность аргинин-содержащих пептидов связываться с ортостерическим сайтом nAHR, мы приняли решение исследовать их возможные взаимодействия и с ГАМКАР.

В то же время, наши предыдущие исследования аргинин-содержащих пептидов продемонстрировали, их возможное действие на район ион-селективной поры nAHR. Следуя логике предположения о блокирующем эффекте олигоаргининовых пептидов на канал nAHR, 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 данной 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 (см. **Рисунок 23**). Согласно нашей гипотезе, подобное различие в действие аргинин-содержащих пептидов на nAHP и ГАМКАР связано с различной ионной селективностью ионных каналов ГАМКАР и nAHP.

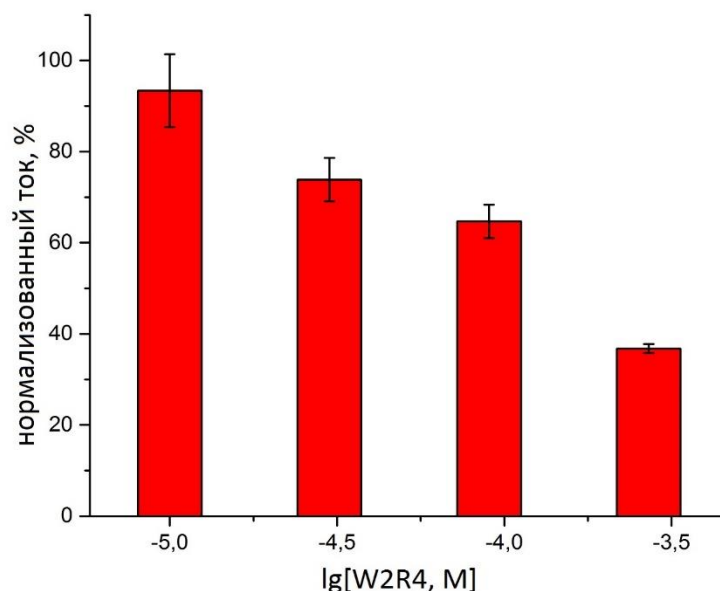


Рисунок 23. Гистограмма подавления лиганд-индуцированного ионного тока через $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМКАР, экспрессированный в ооцитах *X. laevis* различными концентрациями пептида W2R4. Токи индуцированы смесью 30 мкМ ГАМК и пептида W2R4 после 5 минутной преинкубации с соответствующей концентрацией пептида.

4.7 Катионные полимеры – ингибиторы nAHP

На сегодняшний день 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 [213]. Катионные полимеры способны к биодegradации и рассматриваются в качестве векторов доставки нуклеиновых кислот к клеткам *in vivo* [214]. Кроме того, наночастицы, обладающие молекулярным весом в диапазоне 40 – 80000 кДа и размером порядка сотен нанометров способны к эффективному, избирательному накоплению внутри солидных опухолей благодаря эффекту увеличенной проницаемости и удержания [215]. Этот эффект делает наночастицы из катионных полимеров перспективными транспортерами как для таргетной доставки в опухоль традиционных химиотерапевтических препаратов, так и терапевтических субстанций на основе нуклеиновых кислот, в частности siРНК.

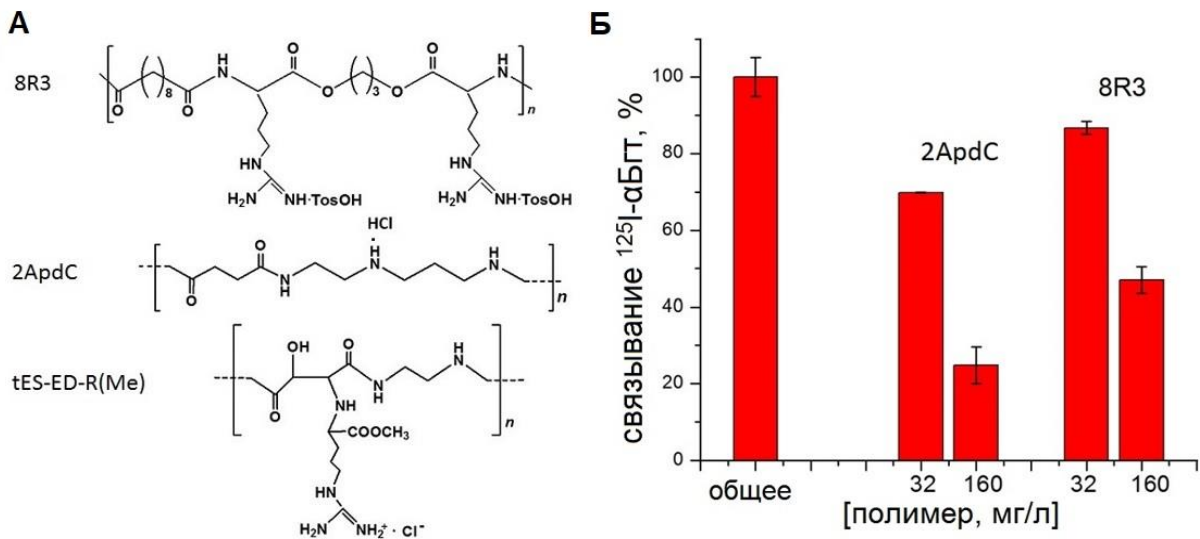


Рисунок 24. (А) Формулы катионных полимеров, исследованных в рамках диссертационной работы. (Б) Конкуренция полимеров 2ApdC и 8R3 с ^{125}I - αБгт за связывание с человеческим α7 nAHP в клетках GH4C1. tES-ED-R(Me) не проявил ингибирования с ^{125}I - αБгт до 100 мг/л.

В свете продемонстрированных нами холинергических свойств олигоаргининовых пептидов, нами была исследована активность ряда катионных полимеров по отношению к различным нАХР и их моделям. Формулы изученных соединений приведены на **Рисунке 24 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, 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 $\alpha 7$ нАХР (см. **Рисунок 24 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 нАХР. 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 $\alpha 7$ нАХР, соединения 2ApdC и 8R3 проявили свойства ингибиторов нАХР в диапазоне концентраций 1-8 мг/л. Соединение tES-ED-R(Me) не проявило активности в отношении нАХР $\alpha 7$ типа до концентрации 100 мг/л. В электрофизиологическом исследовании методом двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах *X.laevis*, экспрессирующих мышечный нАХР, активность антагонистов проявили соединения tES-ED-R(Me) и 2ApdC в диапазоне значений IC50 2 – 7 мг/л (см. **Рисунок 25 А, Б**). Значения IC50 для исследованных соединений приведены в **Таблице 3**.

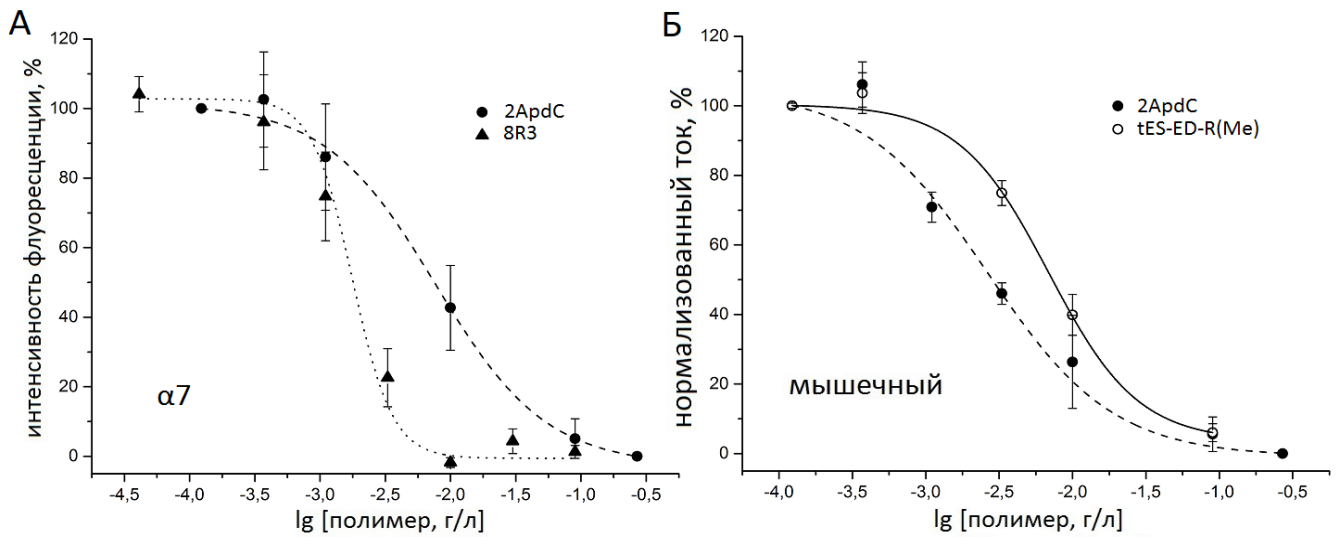


Рисунок 25. (А) Ингибирование входа ионов Ca^{2+} через человеческий $\alpha 7$ nAChR, экспрессированный в клетках Neuro2a. Ионный ток индуцирован 30 мкМ Ацх. Кривая зависимости интенсивности ингибирования для полимеров 2ApdC (●) и 8R3 (▲). (Б) Ингибирование лиганд-индуцированных ионных токов через мышечный nAChR 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 $\alpha 7$ nAChR.

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)

Учитывая полимерную природу исследованных соединений, количественное сравнение их активности не представляется возможным. Однако сама качественная характеристика их активности в отношении различных подтипов nAChR несомненно имеет важный практический аспект. При терапевтическом применении их агонистические свойства в отношении nAChR могут привести к ряду побочных эффектов, самым серьёзным из которых может являться паралич дыхательных мышц, связанный с блокадой мышечного nAChR. С другой стороны, антагонистические свойства полимеров в отношении данного подтипа nAChR могут иметь и положительное значение – это возможный противовоспалительный эффект, тогда как снижение активности сигналинга через $\alpha 7$ nAChR может служить фактором подавления пролиферации и онкогенеза (см. Раздел nAChR и Рак).

5. 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 $\alpha3\beta2$ типа, так и мышечный nAHP.
- 3) Показано, что синтетические фрагменты центральной петли II белков Lynx1 и SLURP1 семейства *Lu6/uPAR*, проявляют свойства антагонистов $\alpha3\beta2$ и $\alpha9\alpha10$ 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 $\alpha7$, $\alpha9\alpha10$, $\alpha3\beta2$ и мышечного типов.
- 5) Сочетанием методов радиолигандного анализа и электрофизиологии выявлен неконкурентный механизм ингибирования $\alpha7$ nAHP пептидом W2R4 и смешанный механизм ингибирования $\alpha9\alpha10$ nAHP пептидом R8.
- 6) Установлено, что клинически перспективные векторы доставки нуклеиновых кислот – катионные полимеры, содержащие гуанидино- и/или дизамещенные аминогруппы, являются ингибиторами nAHP $\alpha7$ и мышечного типов.

6. Заключение

Несмотря на то, что с момента выделения первого представителя сус-петельных рецепторов – nAХР мышечного типа, прошло без малого полвека, это семейство остаётся в фокусе внимания исследователей. В особенности, это касается подсемейств никотиновых ацетилхолиновых и ГАМК-А рецепторов, остающихся на сегодняшний день перспективными фармакологическими мишенями [216]. В немалой степени этому способствовали исследования нейрональных подтипов nAХР. За последние два десятилетия была изучена роль nAХР $\alpha 4\beta 2$ типа в формировании табачной зависимости, исследована связь $\alpha 7$ nAХР с механизмами онкогенеза, регуляции воспаления и болевой чувствительности [52, 53, 136, 141]. Продемонстрирована модулирующая функция различных подтипов нейрональных nAХР, делающая их перспективной мишенью для терапии нейродегенеративных заболеваний [217]. Другие данные говорят о тесном вовлечении нейрональных nAХР $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ типов в регуляцию процессов воспаления и болевой чувствительности [170, 174, 195]. Все эти результаты поддерживают актуальность поиска перспективных лигандов сус-петельных рецепторов и изучения их лиганд-рецепторных взаимодействий.

В работе описано исследование, посвящённое поиску новых лигандов nAХР и ГАМКАР в природных источниках и синтезу их искусственных аналогов. Отличительной чертой работы является комбинация широкого спектра различных методов. Исследуемые вещества получены с использованием классических биохимических методов выделения из природных источников, а также химического синтеза, выполненного коллегами автора. Для функционального тестирования применены методы электрофизиологии и кальциевого имиджинга, требующие молекулярно-биологических работ с рекомбинантными генами рецепторов. Подобный разносторонний, комплексный подход позволил исследовать широкий круг возможных лиганд-рецепторных взаимодействий и дать их наиболее полную характеристику.

Другая особенность работы – широкий подход к выбору объектов исследования: натуральные яды амфибий и змей, синтетические аналоги пептидных токсинов моллюсков, синтетические катионные полимеры. Разнообразные объекты исследования дали достаточный фактический материал, обладающий фундаментальной ценностью. В ходе работы с природными ядами и их компонентами нам удалось выделить первые низкомолекулярные лиганды ГАМК-А рецептора из секрета паротидных желёз серой жабы, а также охарактеризовать неожиданные отличия нового нейротоксина из яда *Bungarus candidus* – $\alpha\delta$ -бунгаротоксина-1 от классического α -бунгаротоксина.

Важным шагом в сторону потенциального фармакологического применения полученных знаний, является исследование синтетических пептидов, сконструированных на основе последовательности петли II белков семейства L_{у6}/uPAR. Пептиды, воспроизводящие структуру петли II белков Lynx1 и SLURP1, частично повторили электрофизиологическую активность своих полноразмерных прототипов, что ставит их в число фармакологически перспективных молекул, ингибиторов nAChR $\alpha3\beta2$ и $\alpha9\alpha10$ типа. Методическое значение имеет часть работы, посвящённая исследованию функциональной активности йодированных производных конотоксинов GeXIVA и RgIA.

Знания и опыт, накопленные во время изучения такого широкого спектра лигандов, привели нас к гипотезе о роли положительно-заряженных аминокислотных остатков аргинина в аффинности пептидных лигандов к nAChR. Предположение, выдвинутое на основе глубокого анализа эмпирического опыта, полностью подтвердилось, позволив нам открыть новый класс лигандов nAChR – поли/олигоаргининовые пептиды. На данный момент, соединения подобной структуры известны в качестве средства внутриклеточной доставки. В последние годы обсуждается использование аргининсодержащих пептидов, а также близких к ним по принципу действия катионных полимеров для терапевтического применения [208, 213, 214]. В свете этого, открытый нами холинергический эффект

этих соединений имеет не только фундаментально-научное, но также и медицинское значение.

7. Список сокращений

АХСБ – ацетилхолинсвязывающий белок

Ацх – ацетилхолин

ВД – внеклеточный домен

ГАМКАР/ГАМК-А рецептор – рецептор γ -аминомасляной кислоты типа А

ГАМКАРАБ – ГАМКАР-ассоциированный белок

ГлиР – глициновый рецептор

КП – катионные полимеры

α -КТ – α -кобротоксин

Л-СД – лиганд-связывающий домен

миРНК – малые интерферирующие РНК

НАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор

ПАМ – позитивный аллостерический модулятор

ТМ – трансмембранный домен

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

5НТ3Р – 5-гидрокситриптаминовый рецептор

^{125}I - α БгТ – ^{125}I -меченый α -бунгаротоксин

CI – confidence interval, доверительный интервал

DMEM – модифицированная по методу Дульбекко минимальная среда Игла

EGFR – epithelial growth factor receptor

ELIC – *Erwinia chrysanthemi* ligand-gated ion channel

FBS – fetal bovine serum

GLIC – *Gloeobacter violaceus* ligand-gated ion channel

GluCl – glutamate-gated Cl(-) channel

JAK – Janus kinase

МАРК – mitogen-activated protein kinase

NMDA-рецептор – рецептор N-метил-D-аспартата

PIP3K – phosphoinositide 3-kinase

8. Список литературы

1. Herculano-Houzel, S. (2017). Numbers of neurons as biological correlates of cognitive capability. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 16, 1-7.
2. Lester, H. A., Dibas, M. I., Dahan, D. S., Leite, J. F., & Dougherty, D. A. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends in neurosciences*, 27(6), 329-336
3. Le Novere, N., Corringer, P. J., & Changeux, J. P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Journal of neurobiology*, 53(4), 447-456.
4. Sigel, E., & Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40224-40231.
5. Bormann, J.R. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 21 1, 16-9.
6. Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2008). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1), 141–148. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.045
7. Richter, L., de Graaf, C., Sieghart, W., Varagic, Z., Mörzinger, M., de Esch, I. J., ... Ernst, M. (2012). Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. *Nature chemical biology*, 8(5), 455–464. doi:10.1038/nchembio.917
8. Hendrickson, L. M., Guildford, M. J., & Tapper, A. R. (2013). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Frontiers in psychiatry*, 4, 29.
9. Zouridakis, M., Zisimopoulou, P., Poulas, K., & Tzartos, S. J. (2009). Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB life*, 61(4), 407-423.
10. Cheng, H., Fan, C., Zhang, S. W., Wu, Z. S., Cui, Z. C., Melcher, K., ... & Xu, H. E. (2015). Crystallization scale purification of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor from mammalian cells using a BacMam expression system. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(8), 1013.
11. Brejc, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van der Oost, J., Smit, A. B., & Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 411(6835), 269.
12. Kesters, D., Thompson, A. J., Brams, M., Van Elk, R., Spurny, R., Geitmann, M., ... & Smit, A. B. (2013). Structural basis of ligand recognition in 5-HT3 receptors. *EMBO reports*, 14(1), 49-56.
13. Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M., & Hibbs, R. E. (2016). X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*, 538(7625), 411.
14. Walsh, R. M., Roh, S. H., Gharpure, A., Morales-Perez, C. L., Teng, J., & Hibbs, R. E. (2018). Structural principles of distinct assemblies of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*, 557(7704), 261.
15. Miller, P. S., & Aricescu, A. R. (2014). Crystal structure of a human GABA A receptor. *Nature*, 512(7514), 270.
16. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 423(6943), 949.
17. Jensen, M. L., Schousboe, A., & Ahring, P. K. (2005). Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *Journal of neurochemistry*, 92(2), 217-225.

18. Keramidas, A., Moorhouse, A. J., French, C. R., Schofield, P. R., & Barry, P. H. (2000). M2 pore mutations convert the glycine receptor channel from being anion-to cation-selective. *Biophysical Journal*, 79(1), 247-259.
19. Corringer, P. J., Bertrand, S., Galzi, J. L., Devillers-Thiéry, A., Changeux, J. P., & Bertrand, D. (1999). Mutational analysis of the charge selectivity filter of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, 22(4), 831-843.
20. Hansen, S. B., Wang, H. L., Taylor, P., & Sine, S. M. (2008). An ion selectivity filter in the extracellular domain of Cys-loop receptors reveals determinants for ion conductance. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36066-36070.
21. Gunthorpe, M. J., & Lummis, S. C. (2001). Conversion of the ion selectivity of the 5-HT₃A receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10977-10983.
22. Wotring, V. E., Miller, T. S., & Weiss, D. S. (2003). Mutations at the GABA receptor selectivity filter: a possible role for effective charges. *The Journal of physiology*, 548(2), 527-540.
23. Bertrand, D., Galzi, J. L., Devillers-Thiéry, A., Bertrand, S., & Changeux, J. P. (1993). Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), 6971-6975.
24. Colón-Sáez, J. O., & Yakel, J. L. (2014). A mutation in the extracellular domain of the $\alpha 7$ nAChR reduces calcium permeability. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 466(8), 1571-1579.
25. Fucile, S. (2017). The Distribution of Charged Amino Acid Residues and the Ca²⁺ Permeability of Nicotinic Acetylcholine Receptors: A Predictive Model. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 155.
26. Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 346(4), 967-989.
27. Song, C., & Corry, B. (2009). Role of acetylcholine receptor domains in ion selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(7), 1466-1473.
28. Tsetlin, V., Kuzmin, D., & Kasheverov, I. (2011). Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *Journal of neurochemistry*, 116(5), 734-741.
29. Mukherjee, J., Kuryatov, A., Moss, S. J., Lindstrom, J. M., & Anand, R. (2009). Mutations of cytosolic loop residues impair assembly and maturation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of neurochemistry*, 110(6), 1885-1894.
30. Drenan, R. M., Nashmi, R., Imoukhuede, P., Just, H., McKinney, S., & Lester, H. A. (2008). Subcellular trafficking, pentameric assembly, and subunit stoichiometry of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing fluorescently labeled $\alpha 6$ and $\beta 3$ subunits. *Molecular pharmacology*, 73(1), 27-41.
31. Jones, A. K., Buckingham, S. D., & Sattelle, D. B. (2010). Proteins interacting with nicotinic acetylcholine receptors: expanding functional and therapeutic horizons. *Trends in pharmacological sciences*, 31(10), 455-462.
32. Borges, L. S., Yechikhov, S., Lee, Y. I., Rudell, J. B., Friese, M. B., Burden, S. J., & Ferns, M. J. (2008). Identification of a motif in the acetylcholine receptor β subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11468-11476.

33. Nordman, J. C., & Kabbani, N. (2012). An interaction between $\alpha 7$ nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells. *J Cell Sci*, 125(22), 5502-5513.
34. Kabbani, N., Nordman, J. C., Corgiat, B. A., Veltri, D. P., Shehu, A., Seymour, V. A., & Adams, D. J. (2013). Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *Bioessays*, 35(12), 1025-1034.
35. Kabbani, N., & Nichols, R. A. (2018). Beyond the channel: metabotropic signaling by nicotinic receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 39(4), 354-366.
36. King, J. R., Nordman, J. C., Bridges, S. P., Lin, M. K., & Kabbani, N. (2015). Identification and characterization of a G protein-binding cluster in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20060-20070.
37. Choi, G., & Ko, J. (2015). Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Experimental & molecular medicine*, 47(4), e158.
38. Coyle, J. E., Qamar, S., Rajashankar, K. R., & Nikolov, D. B. (2002). Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABAA receptor localization and tubulin binding. *Neuron*, 33(1), 63-74.
39. Brams, M., Pandya, A., Kuzmin, D., van Elk, R., Krijnen, L., Yakel, J. L., ... & Ulens, C. (2011). A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cys-loop receptors. *PLoS biology*, 9(3), e1001034.
40. Miller, P. S., & Smart, T. G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 31(4), 161-174.
41. Liu, X., Xu, Y., Li, H., Wang, X., Jiang, H., & Barrantes, F. J. (2008). Mechanics of channel gating of the nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS computational biology*, 4(1), e19.
42. Unwin, N., & Fujiyoshi, Y. (2012). Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *Journal of molecular biology*, 422(5), 617-634.
43. Cederholm, J. M., Schofield, P. R., & Lewis, T. M. (2009). Gating mechanisms in Cys-loop receptors. *European biophysics journal*, 39(1), 37.
44. Briggs, C. A., Grønlien, J. H., Curzon, P., Timmermann, D. B., Ween, H., Thorin-Hagene, K., ... & Olsen, G. M. (2009). Role of channel activation in cognitive enhancement mediated by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *British journal of pharmacology*, 158(6), 1486-1494.
45. Williams, D. K., Wang, J., & Papke, R. L. (2011). Investigation of the molecular mechanism of the $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulator PNU-120596 provides evidence for two distinct desensitized states. *Molecular Pharmacology*, mol-111.
46. Haas, K. F., & Macdonald, R. L. (1999). GABAA receptor subunit $\gamma 2$ and δ subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABAA receptor currents in mouse fibroblasts. *The Journal of Physiology*, 514(1), 27-45.
47. Gielen, M., & Corringer, P. J. (2018). The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *The Journal of physiology*, 596(10), 1873-1902.
48. Celie, P. H., van Rossum-Fikkert, S. E., van Dijk, W. J., Brejc, K., Smit, A. B., & Sixma, T. K. (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron*, 41(6), 907-914.
49. Jonsson, M., Dabrowski, M., Gurley, D. A., Larsson, O., Johnson, E. C., Fredholm, B. B., & Eriksson, L. I. (2006). Activation and inhibition of human muscular and neuronal nicotinic

- acetylcholine receptors by succinylcholine. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 104(4), 724-733.
50. McIntosh, J. M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A. B., & Vincler, M. (2009). Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochemical pharmacology*, 78(7), 693–702. doi:10.1016/j.bcp.2009.05.020
 51. Horenstein, N. A., Leonik, F. M., & Papke, R. L. (2008). Multiple pharmacophores for the selective activation of nicotinic $\alpha 7$ -type acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology*, 74(6), 1496-1511.
 52. Rucktooa, P., Haseler, C. A., van Elk, R., Smit, A. B., Gallagher, T., & Sixma, T. K. (2012). Structural characterization of binding mode of smoking cessation drugs to nicotinic acetylcholine receptors through study of ligand complexes with acetylcholine-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23283-23293.
 53. Billen, B., Spurny, R., Brams, M., van Elk, R., Valera-Kummer, S., Yakel, J. L., ... & Ulens, C. (2012). Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 9173-9178.
 54. Mihalak, K. B., Carroll, F. I., & Luetje, C. W. (2006). Varenicline is a partial agonist at $\alpha 4\beta 2$ and a full agonist at $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptors. *Molecular pharmacology*, 70(3), 801-805.
 55. Arias, H. R., Feuerbach, D., Targowska-Duda, K., Kaczor, A. A., Poso, A., & Jozwiak, K. (2015). Pharmacological and molecular studies on the interaction of varenicline with different nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Potential mechanism underlying partial agonism at human $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(2), 731-741.
 56. Martin, L. F., Kem, W. R., & Freedman, R. (2004). Alpha-7 nicotinic receptor agonists: potential new candidates for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 174(1), 54-64.
 57. Dwoskin, L. P., & Crooks, P. A. (2001). Competitive neuronal nicotinic receptor antagonists: a new direction for drug discovery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(2), 395-402.
 58. Davies, A. R., Hardick, D. J., Blagbrough, I. S., Potter, B. V., Wolstenholme, A. J., & Wonnacott, S. (1999). Characterisation of the binding of [3H] methyllycaconitine: a new radioligand for labelling $\alpha 7$ -type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 38(5), 679-690.
 59. Papke, R. L., Sanberg, P. R., & Shytle, R. D. (2001). Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 297(2), 646-656.
 60. Wilkinson, D. J. (1991). Dr FP de Caux—the first user of curare for anaesthesia in England. *Anaesthesia*, 46(1), 49-51.
 61. Fagerlund, M. J., Dabrowski, M., & Eriksson, L. I. (2009). Pharmacological characteristics of the inhibition of nondepolarizing neuromuscular blocking agents at human adult muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 110(6), 1244-1252.
 62. Bowman, W. C. (2006). Neuromuscular block. *British journal of pharmacology*, 147(S1), S277-S286.

63. Fitch, R. W., Spande, T. F., Garraffo, H. M., Yeh, H. J., & Daly, J. W. (2010). Phantasmidine: an epibatidine congener from the ecuadorian poison frog *Epipedobates anthonyi*. *Journal of natural products*, 73(3), 331–337. doi:10.1021/np900727e
64. Li, S. X., Huang, S., Bren, N., Noridomi, K., Dellisanti, C. D., Sine, S. M., & Chen, L. (2011). Ligand-binding domain of an $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist. *Nature neuroscience*, 14(10), 1253–1259. doi:10.1038/nn.2908
65. Kini, R. M., & Doley, R. (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56(6), 855-867.
66. Dellisanti, C. D., Yao, Y., Stroud, J. C., Wang, Z. Z., & Chen, L. (2007). Crystal structure of the extracellular domain of nAChR $\alpha 1$ bound to α -bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nature neuroscience*, 10(8), 953.
67. Bourne, Y., Talley, T. T., Hansen, S. B., Taylor, P., & Marchot, P. (2005). Crystal structure of a Cbtx–AChBP complex reveals essential interactions between snake α -neurotoxins and nicotinic receptors. *The EMBO journal*, 24(8), 1512-1522.
68. Meunier, J. C., Sealock, R., Olsen, R., & Chanqueux, J. P. (1974). Purification and properties of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* electric tissue. *European journal of biochemistry*, 45(2), 371-394.
69. McIntosh, J. M., Santos, A. D., & Olivera, B. M. (1999). Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 59-88.
70. Peng C, Ye M, Wang Y, Shao X, Yuan D, Liu J, Hawrot E, Wang C, Chi C. A new subfamily of conotoxins belonging to the A-superfamily. *Peptides*. 2010 Nov;31(11):2009-16. doi: 10.1016/j.peptides.2010.07.011. Epub 2010 Aug 4. PubMed PMID: 20691232; PubMed Central PMCID: PMC3721517.
71. Nicke, A., Wonnacott, S., & Lewis, R. J. (2004). α -Conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *European journal of biochemistry*, 271(12), 2305-2319.
72. Ellison, M., McIntosh, J. M., & Olivera, B. M. (2003). α -Conotoxins ImI and ImII similar $\alpha 7$ nicotinic receptor antagonists act at different sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 757-764.
73. Romero, H. K., Christensen, S. B., Mannelli, L. D. C., Gajewiak, J., Ramachandra, R., Elmslie, K. S., ... & Olivera, B. M. (2017). Inhibition of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(10), E1825-E1832.
74. Yu, R., Kompella, S. N., Adams, D. J., Craik, D. J., & Kaas, Q. (2013). Determination of the α -conotoxin Vc1. 1 binding site on the $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of medicinal chemistry*, 56(9), 3557-3567.
75. Azam, L., Papakyriakou, A., Zouridakis, M., Giastas, P., Tzartos, S. J., & McIntosh, J. M. (2015). Molecular interaction of α -conotoxin RgIA with the rat $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular pharmacology*, 87(5), 855-864.
76. Luo, S., Zhangsun, D., Harvey, P. J., Kaas, Q., Wu, Y., Zhu, X., ... & Romero, H. K. (2015). Cloning, synthesis, and characterization of αO -conotoxin GeXIVA, a potent $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), E4026-E4035.

77. Buisson, B., & Bertrand, D. (1998). Open-channel blockers at the human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular pharmacology*, 53(3), 555-563.
78. Amador, M., & Dani, J. A. (1991). MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels. *Synapse*, 7(3), 207-215.
79. Danysz, W., Parsons, C. G., & Quack, G. (2000). NMDA channel blockers: memantine and amino-alkylcyclohexanes—in vivo characterization. *Amino acids*, 19(1), 167-17.
80. Rammes, G., Rupprecht, R., Ferrari, U., Zieglgänsberger, W., & Parsons, C. G. (2001). The N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine, MRZ 2/579 and other amino-alkylcyclohexanes antagonise 5-HT₃ receptor currents in cultured HEK-293 and N1E-115 cell systems in a non-competitive manner. *Neuroscience letters*, 306(1-2), 81-84.
81. Hoda, J. C., Krause, R., Bertrand, S., & Bertrand, D. (2006). Unexpected sensitivity of the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor to aminoglycosides. *Neuroreport*, 17(1), 65-70.
82. Rothlin, C. V., Katz, E., Verbitsky, M., Vetter, D. E., Heinemann, S. F., & Elgoyhen, A. B. (2000). Block of the $\alpha 9$ nicotinic receptor by ototoxic aminoglycosides. *Neuropharmacology*, 39(13), 2525-2532.
83. Forster, I., & Bertrand, D. (1995). Inward rectification of neuronal nicotinic acetylcholine receptors investigated by using the homomeric $\alpha 7$ receptor. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 260(1358), 139-148.
84. Haghghi, A. P., & Cooper, E. (1998). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are blocked by intracellular spermine in a voltage-dependent manner. *Journal of Neuroscience*, 18(11), 4050-4062.
85. Alkondon, M., Reinhardt, S., Lobron, C., Hermsen, B., Maelicke, A., & Albuquerque, E. X. (1994). Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. II. The rundown and inward rectification of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by in situ hybridization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(1), 494-506.
86. Haghghi, A. P., & Cooper, E. (2000). A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 2$ receptors. *Journal of Neuroscience*, 20(2), 529-541.
87. Williams, D. K., Wang, J., & Papke, R. L. (2011). Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: advantages and limitations. *Biochemical pharmacology*, 82(8), 915-930.
88. Monod, J., & Jacob, F. (1961, January). General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 26, pp. 389-401). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
89. Monod, J., Changeux, J. P., & Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of molecular biology*, 6(4), 306-329.
90. Mulle, C., Lena, C., & Changeux, J. P. (1992). Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron*, 8(5), 937-945.
91. Hsiao, B., Dweck, D., & Luetje, C. W. (2001). Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *Journal of Neuroscience*, 21(6), 1848-1856.
92. Palma, E., Maggi, L., Miledi, R., & Eusebi, F. (1998). Effects of Zn²⁺ on wild and mutant neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10246-10250.

93. Ke, L., & Lukas, R. J. (1996). Effects of steroid exposure on ligand binding and functional activities of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Journal of neurochemistry*, 67(3), 1100-1112.
94. Paradiso, K., Zhang, J., & Steinbach, J. H. (2001). The C terminus of the human nicotinic $\alpha 4\beta 2$ receptor forms a binding site required for potentiation by an estrogenic steroid. *Journal of Neuroscience*, 21(17), 6561-6568.
95. Curtis, L., Buisson, B., Bertrand, S., & Bertrand, D. (2002). Potentiation of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Molecular pharmacology*, 61(1), 127-135.
96. Wu, T. Y., Smith, C. M., Sine, S. M., & Levandoski, M. M. (2008). Morantel allosterically enhances channel gating of neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3\beta 2$ receptors. *Molecular pharmacology*, 74(2), 466-475.
97. Levandoski, M. M., Piket, B., & Chang, J. (2003). The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *European journal of pharmacology*, 471(1), 9-20.
98. Krause, R. M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P. J., Galzi, J. L., Changeux, J. P., & Bertrand, D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular pharmacology*, 53(2), 283-294.
99. Samochocki, M., Höffle, A., Fehrenbacher, A., Jostock, R., Ludwig, J., Christner, C., ... & Lübbert, H. (2003). Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3), 1024-1036.
100. Kuryatov, A., Berrettini, W., & Lindstrom, J. (2011). Acetylcholine receptor (AChR) $\alpha 5$ subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces ($\alpha 4\beta 2$) $2\alpha 5$ AChR function. *Molecular pharmacology*, 79(1), 119-125.
101. Schrattenholz, A., Pereira, E. F., Roth, U. L. R. I. C. H., Weber, K. H., Albuquerque, E. X., & Maelicke, A. L. F. R. E. D. (1996). Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Molecular pharmacology*, 49(1), 1-6.
102. Hurst, R. S., Hajós, M., Raggenbass, M., Wall, T. M., Higdon, N. R., Lawson, J. A., ... & Groppi, V. E. (2005). A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *Journal of Neuroscience*, 25(17), 4396-4405.
103. Broad, L. M., Zwart, R., Pearson, K. H., Lee, M., Wallace, L., McPhie, G. I., ... & Sher, E. (2006). Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1108-1117.
104. Timmermann, D. B., Grønlien, J. H., Kohlhaas, K. L., Nielsen, E. Ø., Dam, E., Jørgensen, T. D., ... & Malysz, J. (2007). An allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1), 294-307.
105. Ng, H. J., Whittemore, E. R., Tran, M. B., Hogenkamp, D. J., Broide, R. S., Johnstone, T. B., ... & Gee, K. W. (2007). Nootropic $\alpha 7$ nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 8059-8064.
106. Grønlien, J. H., Håkerud, M., Ween, H., Thorin-Hagene, K., Briggs, C. A., Gopalakrishnan, M., & Malysz, J. (2007). Distinct profiles of $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Molecular pharmacology*, 72(3), 715-724.

107. Dunlop, J., Lock, T., Jow, B., Sitzia, F., Grauer, S., Jow, F., ... & Gilbert, A. (2009). Old and new pharmacology: positive allosteric modulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by the 5-hydroxytryptamine2B/C receptor antagonist SB-206553 (3, 5-dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo [1, 2-b: 4, 5-b'] di pyrrole-1 (2H)-carboxamide). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 766-776.
108. Faghieh, R., Gopalakrishnan, S. M., Gronlien, J. H., Malysz, J., Briggs, C. A., Wetterstrand, C., ... & El-Kouhen, R. (2009). Discovery of 4-(5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1 H-pyrrol-1-yl) benzenesulfonamide (A-867744) as a Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Journal of medicinal chemistry*, 52(10), 3377-3384.
109. Dinklo, T., Shaban, H., Thuring, J. W., Lavreysen, H., Stevens, K. E., Zheng, L., ... & Peeters, L. (2011). Characterization of 2-[[4-fluoro-3-(trifluoromethyl) phenyl] amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(2), 560-574.
110. Barron, S. C., McLaughlin, J. T., See, J. A., Richards, V. L., & Rosenberg, R. L. (2009). An allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic receptors, N-(5-chloro-2, 4-dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea (PNU-120596), causes conformational changes in the extracellular ligand binding domain similar to those caused by acetylcholine. *Molecular pharmacology*, 76(2), 253-263.
111. Young, G. T., Zwart, R., Walker, A. S., Sher, E., & Millar, N. S. (2008). Potentiation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14686-14691.
112. Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. D., Finn, S. E., ... & Harris, R. A. (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA A and glycine receptors. *Nature*, 389(6649), 385.
113. Gill, J. K., Savolainen, M., Young, G. T., Zwart, R., Sher, E., & Millar, N. S. (2011). Agonist activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5867-5872.
114. Papke, R. L., Horenstein, N. A., Kulkarni, A. R., Stokes, C., Corrie, L. W., Maeng, C. Y., & Thakur, G. A. (2014). The activity of GAT107, an allosteric activator and positive modulator of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), is regulated by aromatic amino acids that span the subunit interface. *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 4515-4531.
115. Bagdas, D., Wilkerson, J. L., Kulkarni, A., Toma, W., AlSharari, S., Gul, Z., ... & Damaj, M. I. (2016). The $\alpha 7$ nicotinic receptor dual allosteric agonist and positive allosteric modulator GAT107 reverses nociception in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *British journal of pharmacology*, 173(16), 2506-2520.
116. Chojnacka, K., Papke, R. L., & Horenstein, N. A. (2013). Synthesis and evaluation of a conditionally-silent agonist for the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(14), 4145-4149.
117. Papke, R. L., Bagdas, D., Kulkarni, A. R., Gould, T., AlSharari, S. D., Thakur, G. A., & Damaj, M. I. (2015). *Neuropharmacology*, 91, 34-42.
118. Horenstein, N. A., & Papke, R. L. (2017). Anti-inflammatory silent agonists. *ACS Med Chem Lett.* 8(10), 989-991.

119. Bagdas, D., Gurun, M. S., Flood, P., Papke, R. L., & Damaj, M. I. (2018). New insights on neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for pain and inflammation: a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *Current neuropharmacology*, 16(4), 415-425.
120. Thomsen, M. S., & Mikkelsen, J. D. (2012). The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ligands methyllycaconitine, NS6740 and GTS-21 reduce lipopolysaccharide-induced TNF- α release from microglia. *Journal of neuroimmunology*, 251(1-2), 65-72.
121. Papke, R. L., Chojnacka, K., & Horenstein, N. A. (2014). The minimal pharmacophore for silent agonism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(3), 665-680.
122. Picciotto, M. R., Zoli, M., Rimondini, R., Léna, C., Marubio, L. M., Pich, E. M., ... & Changeux, J. P. (1998). Acetylcholine receptors containing the $\beta 2$ subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391(6663), 173.
123. Nashmi, R., & Lester, H. A. (2006). CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Molecular Neuroscience*, 30(1), 181-184.
124. Grady, S. R., Salminen, O., Laverty, D. C., Whiteaker, P., McIntosh, J. M., Collins, A. C., & Marks, M. J. (2007). The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochemical pharmacology*, 74(8), 1235-1246.
125. Doyon, W. M., Thomas, A. M., Ostroumov, A., Dong, Y., & Dani, J. A. (2013). Potential substrates for nicotine and alcohol interactions: a focus on the mesocorticolimbic dopamine system. *Biochemical pharmacology*, 86(8), 1181-1193.
126. Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T. H., Changeux, J. P., & Faure, P. (2006). Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron*, 50(6), 911-921.
127. Watkins, S. S., Koob, G. F., & Markou, A. (2000). Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine & Tobacco Research*, 2(1), 19-37.
128. Rollema, H., Coe, J. W., Chambers, L. K., Hurst, R. S., Stahl, S. M., & Williams, K. E. (2007). Rationale, pharmacology and clinical efficacy of partial agonists of $\alpha 4\beta 2$ nACh receptors for smoking cessation. *Trends in pharmacological sciences*, 28(7), 316-325.
129. Etter, J. F., Lukas, R. J., Benowitz, N. L., West, R., & Dresler, C. M. (2008). Cytisine for smoking cessation: a research agenda. *Drug and alcohol dependence*, 92(1-3), 3-8.
130. Coe, J. W., Brooks, P. R., Vetelino, M. G., Wirtz, M. C., Arnold, E. P., Huang, J., ... & Shrikhande, A. (2005). Varenicline: an $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *Journal of medicinal chemistry*, 48(10), 3474-3477.
131. Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., & Boyle, P. (2008). Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *International journal of cancer*, 122(1), 155-164.
132. Heusch, W. L., & Maneckjee, R. (1998). Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 19(4), 551-556.
133. Yuge, K., Kikuchi, E., Hagiwara, M., Yasumizu, Y., Tanaka, N., Kosaka, T., ... & Oya, M. (2015). Nicotine induces tumor growth and chemoresistance through activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in bladder cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 14(9), 2112-2120.

134. Suzuki, S., Cohen, S. M., Arnold, L. L., Kato, H., Fuji, S., Pennington, K. L., ... & Takahashi, S. (2018). Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology*, 398, 31-40.
135. Lien, Y. C., Wang, W., Kuo, L. J., Liu, J. J., Wei, P. L., Ho, Y. S., ... & Chang, Y. J. (2011). Nicotine promotes cell migration through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in gastric cancer cells. *Annals of surgical oncology*, 18(9), 2671-2679.
136. Schaal, C., & Chellappan, S. P. (2014). Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Molecular Cancer Research*, 12(1), 14-23.
137. Raj, M. K. D., Bora-Singhal, N., & Chellappan, S. (2018). Beta-arrestin-1 function in CAFs is necessary for enhancement of self-renewal of NSCLC stem-like cells. *Cancer Res* 78(13 Suppl):Abstract nr 5063.
138. Ho, Y. S., Chen, C. H., Wang, Y. J., Pestell, R. G., Albanese, C., Chen, R. J., ... & Tseng, H. (2005). Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NF κ B activation and cyclin D1 up-regulation. *Toxicology and applied pharmacology*, 205(2), 133-148.
139. Dasgupta, P., Rizwani, W., Pillai, S., Davis, R., Banerjee, S., Hug, K., ... & Chellappan, S. P. (2011). ARRB1-mediated regulation of E2F target genes in nicotine-induced growth of lung tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(4), 317-333.
140. Chu, M., Guo, J., & Chen, C. Y. (2005). Long-term exposure to nicotine, via ras pathway, induces cyclin D1 to stimulate G1 cell cycle transition. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6369-6379.
141. Al-Wadei, H. A., Al-Wadei, M. H., & Schuller, H. M. (2012). Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma by nicotinic and beta-adrenergic receptors: a novel target for intervention. *PLoS One*, 7(1), e29915.
142. Pillai, S., Rizwani, W., Li, X., Rawal, B., Nair, S., Schell, M. J., ... & Chellappan, S. (2011). ID1 facilitates the growth and metastasis of non-small cell lung cancer in response to nicotinic acetylcholine receptor and epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular and cellular biology*, 31(14), 3052-3067.
143. Pikor, L. A., Ramnarine, V. R., Lam, S., & Lam, W. L. (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung cancer*, 82(2), 179-189.
144. Al-Wadei, M. H., Al-Wadei, H. A., & Schuller, H. M. (2012). Pancreatic cancer cells and normal pancreatic duct epithelial cells express an autocrine catecholamine loop that is activated by nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3$, $\alpha 5$, and $\alpha 7$. *Molecular Cancer Research*, 10(2), 239-249.
145. Schaal, C., Padmanabhan, J., & Chellappan, S. (2015). The role of nAChR and calcium signaling in pancreatic cancer initiation and progression. *Cancers*, 7(3), 1447-1471.
146. Ma, X., Jia, Y., Zu, S., Li, R., Jia, Y., Zhao, Y., ... & Wang, Y. (2014). Alpha5 nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced HIF-1 α and VEGF expression in non-small cell lung cancer. *Toxicology and applied pharmacology*, 278(2), 172-179.
147. Lee, C. H., Huang, C. S., Chen, C. S., Tu, S. H., Wang, Y. J., Chang, Y. J., ... & Chen, L. C. (2010). Overexpression and activation of the $\alpha 9$ -nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(17), 1322-1335.
148. Lee, C. H., Chang, Y. C., Chen, C. S., Tu, S. H., Wang, Y. J., Chen, L. C., ... & Huang, C. S. (2011). Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces $\alpha 9$ -

- nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 129(2), 331-345.
149. Schuller, H. M. (2009). Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 195.
 150. Thorgeirsson, T. E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K. P., ... & Stacey, S. N. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*, 452(7187), 638.
 151. Amos, C. I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I. P., Gu, J., Eisen, T., ... & Sullivan, K. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature genetics*, 40(5), 616.
 152. McKay, J. D., Hung, R. J., Gaborieau, V., Boffetta, P., Chabrier, A., Byrnes, G., ... & Rudnai, P. (2008). Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nature genetics*, 40(12), 1404.
 153. McKay, J. D., Hung, R. J., Gaborieau, V., Boffetta, P., Chabrier, A., Byrnes, G., ... & Rudnai, P. (2008). Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nature genetics*, 40(12), 1404.
 154. George, A. A., Lucero, L. M., Damaj, M. I., Lukas, R. J., Chen, X., & Whiteaker, P. (2012). Function of human $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors is reduced by the $\alpha 5$ (D398N) variant. *Journal of Biological Chemistry*, 287(30), 25151-25162.
 155. Tammimäki, A., Herder, P., Li, P., Esch, C., Laughlin, J. R., Akk, G., & Stitzel, J. A. (2012). Impact of human D398N single nucleotide polymorphism on intracellular calcium response mediated by $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 63(6), 1002–1011. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.07.022
 156. Paleari, L., Negri, E., Catassi, A., Cilli, M., Servent, D., D'angelillo, R., ... & Fini, M. (2009). Inhibition of nonneuronal $\alpha 7$ -nicotinic receptor for lung cancer treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 179(12), 1141-1150.
 157. Paleari, L., Sessa, F., Catassi, A., Servent, D., Mourier, G., Doria-Miglietta, G., ... & Calcaterra, A. (2009). Retracted: Inhibition of non-neuronal $\alpha 7$ -nicotinic receptor reduces tumorigenicity in A549 NSCLC xenografts. *International journal of cancer*, 125(1), 199-211.
 158. Alama, A., Bruzzo, C., Cavalieri, Z., Forlani, A., Utkin, Y., Casciano, I., & Romani, M. (2011). Inhibition of the nicotinic acetylcholine receptors by cobra venom α -neurotoxins: is there a perspective in lung cancer treatment?. *PLoS One*, 6(6), e20695.
 159. Cesario, A., Russo, P., Nastrucci, C., & Granone, P. (2012). Is $\alpha 7$ -nAChR a possible target for lung cancer and malignant pleural mesothelioma treatment?. *Current drug targets*, 13(5), 688-694.
 160. Moriwaki, Y., Yoshikawa, K., Fukuda, H., Fujii, Y. X., Misawa, H., & Kawashima, K. (2007). Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Life sciences*, 80(24-25), 2365-2368. Moriwaki
 161. Lyukmanova, E. N., Shulepko, M. A., Bychkov, M. L., Shenkarev, Z. O., Paramonov, A. S., Chugunov, A. O., ... & Kirpichnikov, M. P. (2014). Human SLURP-1 and SLURP-2 proteins acting on nicotinic acetylcholine receptors reduce proliferation of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 6(4 (23)).
 162. Lyukmanova, E. N., Bychkov, M. L., Sharonov, G. V., Efremenko, A. V., Shulepko, M. A., Kulbatskii, D. S., ... & Kirpichnikov, M. P. (2018). Human secreted proteins SLURP-1 and SLURP-2 control the growth of epithelial cancer cells via interactions with nicotinic acetylcholine receptors. *British journal of pharmacology*, 175(11), 1973-1986.

163. Onganer, P. U., Djamgoz, M. B., Whyte, K., & Greenfield, S. A. (2006). An acetylcholinesterase-derived peptide inhibits endocytic membrane activity in a human metastatic breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(3), 415-420.
164. Greenfield, S. A., Zimmermann, M., & Bond, C. E. (2008). Non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase. *The FEBS journal*, 275(4), 604-611.
165. Pepper, C., Tu, H., Morrill, P., Garcia-Rates, S., Fegan, C., & Greenfield, S. (2017). Tumor cell migration is inhibited by a novel therapeutic strategy antagonizing the alpha-7 receptor. *Oncotarget*, 8(7), 11414–11424. doi:10.18632/oncotarget.14545
166. Iskandar, A. R., Miao, B., Li, X., Hu, K. Q., Liu, C., & Wang, X. D. (2016). β -Cryptoxanthin reduced lung tumor multiplicity and inhibited lung cancer cell motility by downregulating nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ signaling. *Cancer Prevention Research*, 9(11), 875-886.
167. Mei, D., Lin, Z., Fu, J., He, B., Gao, W., Ma, L., ... & Zhang, X. (2015). The use of α -conotoxin ImI to actualize the targeted delivery of paclitaxel micelles to $\alpha 7$ nAChR-overexpressing breast cancer. *Biomaterials*, 42, 52-65.
168. Greish, K. (2010). Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. In *Cancer Nanotechnology* (pp. 25-37). Humana Press.
169. Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., ... & Al-Abed, Y. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), 384.
170. AlSharari, S. D., Freitas, K., & Damaj, M. I. (2013). Functional role of alpha7 nicotinic receptor in chronic neuropathic and inflammatory pain: studies in transgenic mice. *Biochemical pharmacology*, 86(8), 1201-1207.
171. Yang, Y. H., Li, D. L., Bi, X. Y., Sun, L., Yu, X. J., Fang, H. L., ... & Zang, W. J. (2015). Acetylcholine inhibits LPS-induced MMP-9 production and cell migration via the $\alpha 7$ nAChR-JAK2/STAT3 pathway in RAW264. 7 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(5), 2025-2038.
172. Rosas-Ballina, M., Goldstein, R. S., Gallowitsch-Puerta, M., Yang, L., Valdés-Ferrer, S. I., Patel, N. B., ... & Tracey, K. J. (2009). The selective $\alpha 7$ agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE. *Molecular Medicine*, 15(7-8), 195-202.
173. De Simone, R., Ajmone-Cat, M. A., Carnevale, D., & Minghetti, L. (2005). Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E 2 in rat microglial cultures. *Journal of neuroinflammation*, 2(1), 4.
174. Gurun, M. S., Parker, R., Eisenach, J. C., & Vincler, M. (2009). The effect of peripherally administered cdp-choline in an acute inflammatory pain model: The role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Anesthesia & Analgesia*, 108(5), 1680-1687.
175. Yoshikawa, H., Kurokawa, M., Ozaki, N., Nara, K., Atou, K., Takada, E., ... & Suzuki, N. (2006). Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I- κ B phosphorylation and nuclear factor- κ B transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$. *Clinical & Experimental Immunology*, 146(1), 116-123.
176. de Jonge, W. J., van der Zanden, E. P., The, F. O., Bijlsma, M. F., van Westerloo, D. J., Bennink, R. J., ... & Boeckxstaens, G. E. (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nature immunology*, 6(8), 844.

177. O'Neill, L. A. J. (2003). The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochemical Society transaction*, 31(3), 643.
178. Gallowitsch-Puerta, M., Tracey K. (2005). Immunologic Role of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway and the Nicotinic Acetylcholine 7 Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1062, 209-219.
179. Tracey, K. J. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *The Journal of clinical investigation*, 117(2), 289-296.
180. Rosas-Ballina, M., Olofsson, P. S., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S. I., Levine, Y. A., Reardon, C., ... & Mak, T. W. (2011). Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*, 334(6052), 98-101.
181. Cedillo, J. L., Arnalich, F., Martín-Sánchez, C., Quesada, A., Rios, J. J., Maldifassi, M. C., ... & López-Collazo, E. (2014). Usefulness of $\alpha 7$ nicotinic receptor messenger RNA levels in peripheral blood mononuclear cells as a marker for cholinergic antiinflammatory pathway activity in septic patients: results of a pilot study. *The Journal of infectious diseases*, 211(1), 146-155.
182. Mannelli, L. D. C., Pacini, A., Matera, C., Zanardelli, M., Mello, T., De Amici, M., ... & Ghelardini, C. (2014). Involvement of $\alpha 7$ nAChR subtype in rat oxaliplatin-induced neuropathy: effects of selective activation. *Neuropharmacology*, 79, 37-48.
183. Peng, C., Kimbrell, M. R., Tian, C., Pack, T. F., Crooks, P. A., Fifer, E. K., & Papke, R. L. (2013). Multiple modes of $\alpha 7$ nAChR noncompetitive antagonism of control agonist-evoked and allosterically enhanced currents. *Molecular pharmacology*, 84(3), 459-475.
184. Christensen, D. Z., Mikkelsen, J. D., Hansen, H. H., & Thomsen, M. S. (2010). Repeated administration of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists, but not positive allosteric modulators, increases $\alpha 7$ nAChR levels in the brain. *Journal of neurochemistry*, 114(4), 1205-1216.
185. Munro, G., Hansen, R. R., Erichsen, H. K., Timmermann, D. B., Christensen, J. K., & Hansen, H. H. (2012). The $\alpha 7$ nicotinic ACh receptor agonist compound B and positive allosteric modulator PNU-120596 both alleviate inflammatory hyperalgesia and cytokine release in the rat. *British journal of pharmacology*, 167(2), 421-435.
186. Balsera, B., Mulet, J., Fernández-Carvajal, A., de la Torre-Martínez, R., Ferrer-Montiel, A., Hernández-Jiménez, J. G., ... & García-López, M. T. (2014). Chalcones as positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: A new target for a privileged structure. *European journal of medicinal chemistry*, 86, 724-739.
187. Bagdas, D., Targowska-Duda, K. M., López, J. J., Perez, E. G., Arias, H. R., & Damaj, M. I. (2015). The antinociceptive and antiinflammatory properties of 3-furan-2-yl-Np-tolyl-acrylamide, a positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in mice. *Anesthesia and analgesia*, 121(5), 1369.
188. van Maanen, M. A., Papke, R. L., Koopman, F. A., Koepke, J., Bevaart, L., Clark, R., ... & Vervoordeldonk, M. J. (2015). Two novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ligands: in vitro properties and their efficacy in collagen-induced arthritis in mice. *PLoS One*, 10(1), e0116227.
189. Clark, R. B., Lamppu, D., Libertine, L., McDonough, A., Kumar, A., LaRosa, G., ... & Elbaum, D. (2014). Discovery of novel 2-((pyridin-3-yloxy) methyl) piperazines as $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulators for the treatment of inflammatory disorders. *Journal of medicinal chemistry*, 57(10), 3966-3983.

190. Livett, B. G., Khalil, Z., Gayler, K. R., Down, J. G., Sandall, D. W., & Keays, D. A. (2008). U.S. Patent No. 7,348,400. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
191. Satkunanathan, N., Livett, B., Gayler, K., Sandall, D., Down, J., & Khalil, Z. (2005). Alpha-conotoxin Vc1. 1 alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. *Brain research*, 1059(2), 149-158.
192. Vincler, M., Wittenauer, S., Parker, R., Ellison, M., Olivera, B. M., & McIntosh, J. M. (2006). Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 17880-17884.
193. Callaghan, B., Haythornthwaite, A., Berecki, G., Clark, R. J., Craik, D. J., & Adams, D. J. (2008). Analgesic α -conotoxins Vc1. 1 and Rg1A inhibit N-type calcium channels in rat sensory neurons via GABAB receptor activation. *Journal of Neuroscience*, 28(43), 10943-10951.
194. Nevin, S. T., Clark, R. J., Klimis, H., Christie, M. J., Craik, D. J., & Adams, D. J. (2007). Are $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors a pain target for α -conotoxins?. *Molecular pharmacology*, 72(6), 1406-1410.
195. Mohammadi, S., & Christie, M. (2015). Conotoxin interactions with $\alpha 9\alpha 10$ -nAChRs: Is the $\alpha 9\alpha 10$ -nicotinic acetylcholine receptor an important therapeutic target for pain management?. *Toxins*, 7(10), 3916-3932.
196. Neu, A., Neuhoff, H., Trube, G., Fehr, S., Ullrich, K., Roeper, J., & Isbrandt, D. (2002). Activation of GABAA receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. *Neurobiology of disease*, 11(2), 298-307.
197. Cupello, A., Balestrino, M., Gatta, E., Pellistri, F., Siano, S., & Robello, M. (2008). Activation of cerebellar granule cells GABAA receptors by guanidinoacetate. *Neuroscience*, 152(1), 65-69.
198. Samson, A. O., Scherf, T., Eisenstein, M., Chill, J. H., & Anglister, J. (2002). The mechanism for acetylcholine receptor inhibition by α -neurotoxins and species-specific resistance to α -bungarotoxin revealed by NMR. *Neuron*, 35(2), 319-332.
199. Lyukmanova, E. N., Shulepko, M. A., Shenkarev, Z. O., Bychkov, M. L., Paramonov, A. S., Chugunov, A. O., ... & Arseniev, A. S. (2016). Secreted isoform of human Lynx1 (SLURP-2): spatial structure and pharmacology of interactions with different types of acetylcholine receptors. *Scientific reports*, 6, 30698.
200. Wu, M., Robinson, J. E., & Joiner, W. J. (2014). SLEEPLESS is a bifunctional regulator of excitability and cholinergic synaptic transmission. *Current Biology*, 24(6), 621-629.
201. Wu, M., Liu, C. Z., & Joiner, W. J. (2016). 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(2), e0148215.
202. Lyukmanova, E. N., Shulepko, M. A., Buldakova, S. L., Kasheverov, I. E., Shenkarev, Z. O., Reshetnikov, R. V., ... & Dolgikh, D. A. (2013). Water-soluble LYNX1 residues important for interaction with muscle-type and/or neuronal nicotinic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 15888-15899.
203. Durek, T., Shelukhina, I. V., Tae, H. S., Thongyoo, P., Spirova, E. N., Kudryavtsev, D. S., ... & Adams, D. J. (2017). Interaction of synthetic human slurp-1 with the nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports*, 7(1), 16606.

204. Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M. E., Watkins, M., Elgoyhen, A. B., McIntosh, J. M., & Olivera, B. M. (2006). α -RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. *Biochemistry*, 45(5), 1511-1517.
205. Utkin, Y. N., Kuch, U., Kasheverov, I. E., Lebedev, D. S., Cederlund, E., Molles, B. E., ... & Jornvall, H. (2019). Novel long-chain neurotoxins from *Nakase* distinguish the two binding sites in muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Journal*, 476(8), 1285-1302.
206. Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y.,... & Jones, A. T. (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Molecular therapy*, 10(6), 1011-1022.
207. Futaki, S. (2005). Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Advanced drug delivery reviews*, 57(4), 547-558.
208. Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., & Futaki, S. (2008). Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Advanced drug delivery reviews*, 60(4-5), 598-607.
209. Marcus, Y. (1988). Ionic radii in aqueous solutions. *Chemical Reviews*, 88(8), 1475-1498.
210. Marcus, Y. (2012). The guanidinium ion. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 48, 70-74.
211. Fozzard, H. A., & Lipkind, G. M. (2010). The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Marine drugs*, 8(2), 219-234.
212. Kudryavtsev, D. S., Shelukhina, I. V., Son, L. V., Ojomoko, L. O., Kryukova, E. V., Lyukmanova, E. N., ... & Starkov, V. G. (2015). Neurotoxins from snake venoms and α -conotoxin ImI inhibit functionally active ionotropic γ -aminobutyric acid (GABA) receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(37), 22747-22758.
213. Zavrashvili, N., Sarisozen, C., Titvinidze, G., Otinashvili, G., Kantaria, T., Tugushi, D., ... & Katsarava, R. (2019). Library of Cationic Polymers Composed of Polyamines and Arginine as Gene Transfection Agents. *ACS Omega*, 4(1), 2090-2101.
214. Memanishvili, T., Zavrashvili, N., Kupatadze, N., Tugushi, D., Gverdtseteli, M., Torchilin, V. P., ... & Katsarava, R. (2014). Arginine-based biodegradable ether-ester polymers with low cytotoxicity as potential gene carriers. *Biomacromolecules*, 15(8), 2839-2848.
215. Greish, K. (2010). Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. In *Cancer Nanotechnology* (pp. 25-37). Humana Press.
216. Otvos, R. A., Still, K. B., Somsen, G. W., Smit, A. B., & Kool, J. (2019). Drug discovery on natural products: from ion channels to nachrs, from nature to libraries, from analytics to assays. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, 24(3), 362-385.
217. Dineley, K. T., Pandya, A. A., & Yakel, J. L. (2015). Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 36(2), 96-108.