

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

на правах рукописи

Спирова Екатерина Николаевна

**АНАЛИЗ МЫШЕЧНЫХ И НЕЙРОНАЛЬНЫХ
НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ
СОЧЕТАНИЕМ КАЛЬЦИЕВОГО ИМИДЖИНГА И
ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИИ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории Молекулярной токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Шелухина Ирина Валерьевна, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

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

Сергиев Петр Владимирович, д.х.н., профессор РАН, профессор химического факультета и директор института функциональной геномики Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное учреждение "Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «9» октября 2019 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
Олейников В.А.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР), рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК_AР), глициновые (ГлиР) и серотониновые (5-НТ₃Р) рецепторы входят в семейство Cys-петельных рецепторов лиганд-управляемых ионных каналов. Они имеют сходную пространственную структуру: пять субъединиц формируют симметричный пентамер, образуя селективный ионный канал. В случае нАХР этот канал проницаем для катионов Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} . Вследствие разнообразия входящих в пентамер субъединиц и различной стехиометрии существует целое множество представителей нАХР: мышечные $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon/\gamma\delta$ и нейрональные $(\alpha 7)_5$, $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, $(\alpha 3)_2(\beta 2)_3$, $(\alpha 3)_3(\beta 2)_2$, $(\alpha 9)_3(\alpha 10)_2$, $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ и др.

нАХР широко представлены в нервной системе: располагаясь на пре- и постсинаптических мембранах нервных и нервно-мышечных контактов, они участвуют в передаче и модуляции нервного сигнала. Экспрессия нАХР наблюдается также за пределами нервной системы, например, в эпителиальных и иммунных клетках, где рецепторы вовлечены в протекание различных клеточных сигнальных каскадов. Нарушения в функционировании нАХР приводят к развитию нейродегенеративных (болезни Альцгеймера и Паркинсона) и психических (шизофрения, аутизм, депрессия) заболеваний, миастений, хронической боли и др., поэтому эти рецепторы рассматриваются в качестве перспективных мишеней при направленной терапии.

Совместно с исследованием структурных и функциональных особенностей самих нАХР ведется активный поиск их новых лигандов. Особое внимание уделяется таким свойствам соединений, как специфичность действия и сродство к рецептору. Структуры высокоспецифичных и достаточно аффинных лигандов используются в качестве основы при разработке эффективных лекарственных соединений.

В настоящее время изучение механизмов функционирования нАХР, а также тестирование их потенциальных лигандов осуществляется при

гетерологической экспрессии рецепторов в ооцитах *Xenopus laevis* или клеточных линиях млекопитающих (например, НЕК293). Наиболее популярны электрофизиологические методы анализа, но они являются весьма трудоёмкими, поэтому разработка альтернативных методов тестирования для скрининга лигандов nАХР также является актуальной.

Цель работы и основные задачи исследования

Цель настоящей работы состояла в сравнении лиганд-связывающих механизмов мышечных, гомо- и гетеропентамерных нейрональных nАХР с помощью предложенного варианта метода кальциевого имиджинга в комбинации с электрофизиологическим анализом.

Для выполнения сформулированной цели были поставлены и реализованы следующие задачи:

1. Разработать метод кальциевого имиджинга с использованием одноволнового генетически кодируемого кальциевого сенсора Case12 для изучения специфичности $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nАХР и их мутантных форм;
2. Выявить аминокислотные остатки лиганд-связывающего сайта $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nАХР, определяющие различия в их фармакологических свойствах;
3. Охарактеризовать действие новых природных алкалоидов – структурных аналогов *d*-тубокурарина (*d*-ТС), выделенных из стрельного яда индейского племени Матис, на nАХР разных подтипов;
4. Установить характер взаимодействия новых пептидно-белковых лигандов с nАХР: баптида 2, пептидного компонента яда *Bitis arietans*, с $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nАХР и панкреатической фосфолипазы A_2 с мышечным, $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ nАХР;
5. Идентифицировать лиганды nАХР среди новых синтетических низкомолекулярных соединений: производных хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-аминов.

Научная новизна и практическая значимость работы

В данной диссертации впервые представлен метод кальциевого имиджинга с использованием одноволнового генетически кодируемого кальциевого сенсора Case12 для изучения функционирования $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP, а также их мутантных форм. Как и в электрофизиологических методах, в ходе кальциевого имиджинга детектируется функциональный ответ никотиновых рецепторов. Это позволяет использовать кальциевый имиджинг, в отличие от радиолигандного анализа, для исследования механизмов активации или ингибирования никотиновых рецепторов под действием различных лигандов. Также кальциевый имиджинг с Case12 обладает рядом преимуществ в сравнении с электрофизиологией и кальциевым имиджингом с использованием низкомолекулярных индикаторов или генетически кодируемых сенсоров на основе FRET.

Сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков в лиганд-связывающем участке $\alpha 7$ nAHP и дальнейший анализ специфичности мутантных форм позволил выявить важные для связывания ацетилхолина и эпибатицина аминокислотные остатки. Различие аминокислотных последовательностей $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединиц nAHP в положении 119 может быть одним из факторов, объясняющих их сильно различающиеся фармакологические свойства.

Сочетание метода кальциевого имиджинга и электрофизиологического анализа позволило расширить круг исследуемых Cys-петельных рецепторов в отделе Молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН. Теперь скрининг новых перспективных лигандов и изучение характера их взаимодействия с nAHP возможен для следующих подтипов рецепторов: мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и нейрональных $\alpha 7$, $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3\beta 2$ nAHP и др., а также ГАМК_AР и 5-НТ_{3A}Р. В ходе исследования был выявлен характер взаимодействия новых лигандов как из числа низкомолекулярных соединений (природные алкалоиды, структурные аналоги *d*-ТС; синтетические производные хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин, так и

соединений пептидно-белковой природы (компонент яда гадюки баптид 2; панкреатическая фосфолипаза A₂) с нАХР. Знания о новых агонистах и антагонистах, а также механизмах их действия на нАХР могут найти применение при разработке лекарственных средств на их основе.

Публикация и апробация работы

Результаты данной работы были представлены в виде устных и постерных докладов на Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти акад. Овчинникова Ю.А.» и VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, 2017); XXVIII и XXXI Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016 и 2019, соответственно). Основные научные результаты диссертации опубликованы в 6 статьях в рецензируемых зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 293 наименования. Работа изложена на 118 страницах и содержит 40 рисунков и 11 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Кальциевый имиджинг для изучения специфичности $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ нАХР

В основе метода кальциевого имиджинга лежит гетерологическая экспрессия $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ или $\alpha 7$ нАХР совместно с одноволновым флуоресцентным кальциевым сенсором Case12 в клетках линии мышинной нейробластомы Neuro2a (Рисунок 1). Мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР эффективно экспрессировался в клетках Neuro2a: 76,5% клеток окрашивались флуоресцентно-меченым α -бунгаротоксином, AlexaFluor555 α Bgt, эффективным конкурентным блокатором $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ нАХР (Рисунок 1Б, В).

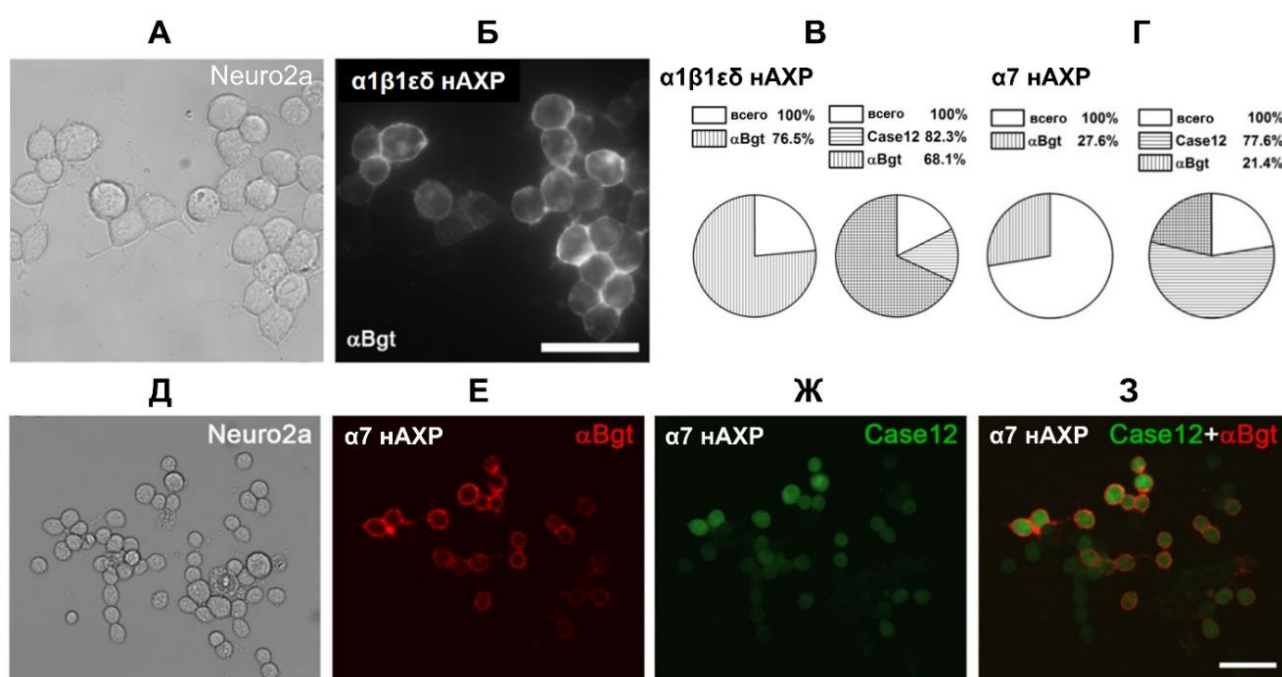


Рисунок 1. Функциональная экспрессия мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ нАХР в клетках линии мышинной нейробластомы Neuro2a. Цитохимическая детекция (А, Б) $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и (Д, Е) $\alpha 7$ нАХР с помощью 50 нМ AlexaFluor555 α Bgt (α Bgt). (Ж, З) Коэкспрессия $\alpha 7$ нАХР (красный цвет) с сенсором Case12 (зелёный цвет) в клетках линии Neuro2a. Масштаб 50 мкм. Круговые диаграммы отражают процент клеток Neuro2a, экспрессирующих (В) $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР или (Г) $\alpha 7$ нАХР (окраска AlexaFluor555 α Bgt (α Bgt)) при отсутствии или в присутствии сенсора Case12.

Для повышения уровня экспрессии $\alpha 7$ нАХР проводилась совместная экспрессия рецептора с одним из шаперонов – NACHO или Ric3, что позволяло детектировать флуоресценцию AlexaFluor555 α Bgt в 27,6% клеток (Рисунок 1Г, Е). Совместная экспрессия с геном кальциевого сенсора Case12 не приводила к

значительному уменьшению уровня экспрессии $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP (Рисунок 1В, Г, 3). Специфичность цитохимической окраски подтверждалась в контрольных экспериментах с вытеснением AlexaFluor555 α Bgt из комплекса с рецептором немеченым α -кобратоксином α Ctx (100х избыток), другим эффективным конкурентным блокатором nAHP. Уровень флуоресценции Case12 использовался для оценки жизнеспособности клеток, т.к. 93,5% Case12-экспрессирующих клеток окрашивались маркером живых клеток – этиловым эфиром тетраметилродамина и не окрашивались маркером мертвых клеток – йодистым пропидием.

В ходе кальциевого имиджнга при помощи флуоресцентного микроскопа или планшетного флуориметра в клетках, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ или $\alpha 7$ nAHP, проводилась регистрация увеличения интенсивности флуоресценции Case12, вызванная повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция вследствие добавления агониста (Рисунок 2). Для уменьшения скорости десенситизации $\alpha 7$ рецептора использовался селективный позитивный аллостерический модулятор PNU120596, который в насыщающей концентрации (10 мкМ) добавлялся во все растворы лигандов (Рисунок 2Б). Специфичность клеточных ответов подтверждалась в контрольных опытах, где они полностью ингибировались под действием 4 мкМ α Ctx. В результате тестирования агонистов вычислялась эффективная действующая концентрация EC_{50} , которая индуцирует клеточный ответ с амплитудой, равной половине максимального значения, а в случае антагонистов – эффективная действующая концентрация IC_{50} , при которой достигалось 50% ингибирование клеточных ответов на агонист.

Вычисленные значения EC_{50} агонистов для $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP хорошо согласуются с литературными данными, а также были подтверждены в контрольных экспериментах по кальциевому имиджингу с коммерчески доступным низкомолекулярным индикатором Fluo-4 (Таблица 1, 2).

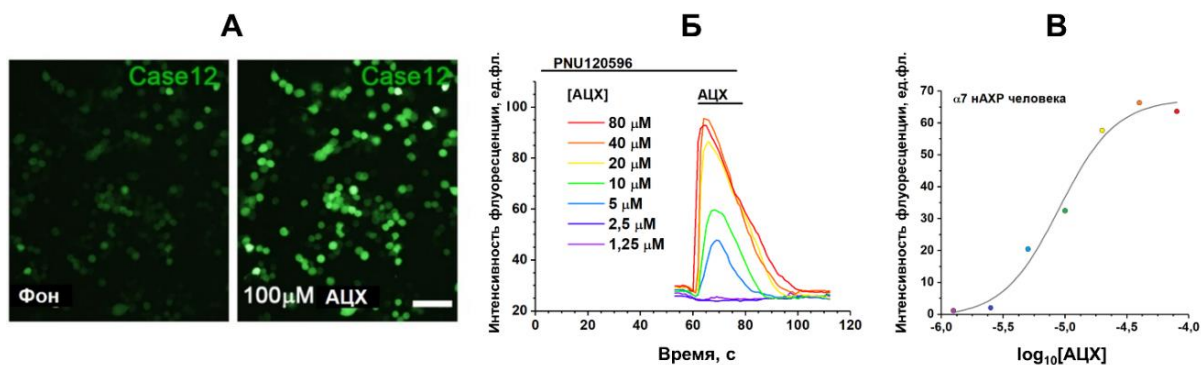


Рисунок 2. Кальциевый имиджинг $\alpha 7$ nAChR. (А) Фотографии клеток (масштаб 100 мкм) и (Б) график изменения интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12 в клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAChR человека, шаперон NACHO и Case12, в ответ на добавление ацетилхолина (АЦХ) в различных концентрациях, а также (В) соответствующая концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции сенсора Case12. Эксперименты проводились с использованием 10 мкМ PNU120596. ед.фл. – единицы флуоресценции.

Для проверки применимости кальциевого имиджинга с Case12 для исследования специфичности мутантных форм рецепторов были получены мутации в $\alpha 1$ субъединице nAChR – G153S, Y190F, S352I (в экстрацеллюлярном домене) и N217K (в трансмембранном домене), которые были обнаружены у пациентов, страдающих врожденной миастенией. Согласно результатам цитохимического окрашивания с применением AlexaFluor555 α Bgt, большинство трансфицированных клеток Neuro2a экспрессировали мутантные формы $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAChR на сопоставимом с рецептором дикого типа уровне. Методом кальциевого имиджинга с Case12 была протестирована специфичность мутантов $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ рецептора, результаты экспериментов подтвердили ранее опубликованные данные электрофизиологического анализа гетерологически экспрессированных мутантных рецепторов в клетках линии HEK293 или ооцитах *X. laevis* (Рисунок 3 и Таблица 1).

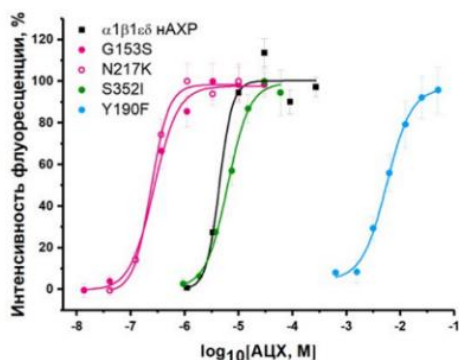


Рисунок 3. Концентрационные зависимости ацетилхолин-индуцированного увеличения интенсивности флуоресценции Case12 в клетках Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAChR дикого типа или мутантные формы G153S, Y190F, N217K или S352I. Среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), $n=4$.

Таблица 1. Значения EC_{50} ацетилхолина для мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP и его мутантных форм, полученные методом кальциевого имиджинга с использованием Case12 или Fluo-4.

Рецептор	Кальциевый имиджинг	
	Ацетилхолин EC_{50} , мкМ (95% ДИ)	
	Case12	Fluo-4
$\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP	4,39 (3,18 – 6,06)	8,47 (6,24 – 11,51)
$\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP[G153S]	0,27 (0,19 – 0,39)	0,23 (0,08 – 0,62)
$\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP[Y190F]	5580 (3800 – 8200)	
$\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP[N217K]	0,24 (0,17 – 0,32)	
$\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ nAHP[S352I]	6,27 (5,00 – 8,13)	

Представлены средние значения EC_{50} и 95% доверительные интервалы (ДИ), $n=4$.

Таким образом, было показано, что кальциевый имиджинг с Case12 является эффективным методом тестирования специфичности $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ и $\alpha 7$ nAHP дикого типа, а также мутантных форм рецепторов.

2. Аминокислотные остатки лиганд-связывающего сайта $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAHP, определяющие некоторые различия в их фармакологических свойствах

$\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединицы nAHP достаточно близки филогенетически и, в отличие от большинства других субъединиц, способны формировать гомопентамерные рецепторы. Однако фармакологические свойства данных рецепторов сильно различаются. Никотин и эпibatидин, классические агонисты большинства nAHP, способны активировать $\alpha 7$, но не $\alpha 9$ рецепторы, для которых они являются антагонистами. Возможно, причина разных фармакологических свойств $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAHP кроется в различии аминокислотных остатков ортостерического лиганд-связывающего сайта экстрацеллюлярного домена, что изучалось в представленной диссертационной работе. Идентификация наиболее перспективных для проведения сайт-направленного мутагенеза аминокислотных остатков проводилась на основе данных о кристаллическом комплексе эпibatидина с химерным белком, содержащим остатки ацетилхолин-связывающего белка (АЦХСБ, модели экстрацеллюлярного домена nAHP) и лиганд-связывающего сайта $\alpha 7$ nAHP (PDB 3SQ6; Рисунок 4).

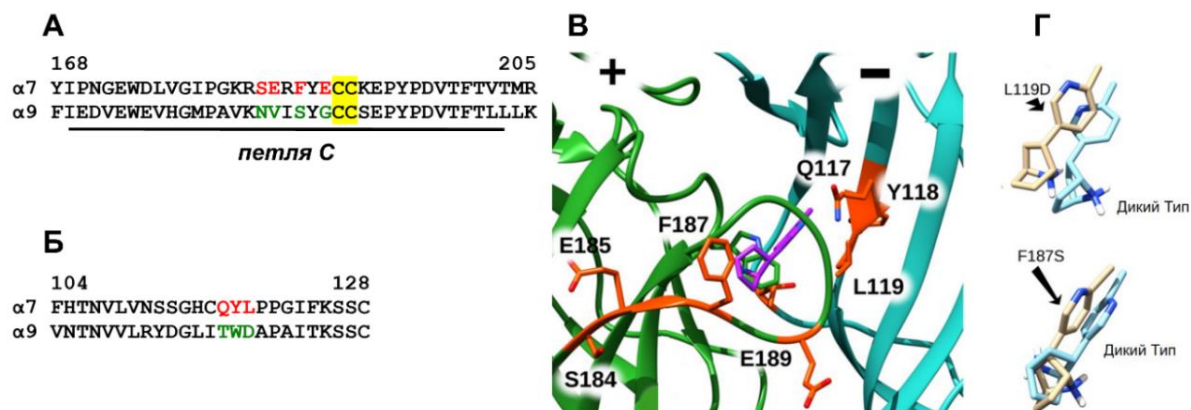


Рисунок 4. Выбор аминокислотных остатков для проведения точечного мутагенеза. Выравнивание аминокислотных последовательностей (А) основных «+» и (Б) комплементарных «-» субъединиц лиганд-связывающего участка $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAChR. Выбранные остатки $\alpha 7$ субъединицы обозначены красным цветом, соответствующие остатки $\alpha 9$ субъединицы – зелёным. Жёлтым цветом выделены консервативные остатки Cys 190, 191 в петле С. (В) Положение молекулы эпибатидина (фиолетовый цвет) в лиганд-связывающем сайте, находящимся в области контакта соседних субъединиц $\alpha 7$ nAChR, обозначенных зелёным и голубым цветом, соответственно. (Г) Изменения в положении эпибатидина в лиганд-связывающем участке, происходящие при заменах аминокислотных остатков L119D и F187S, согласно результатам молекулярной динамики комплекса эпибатидина и химерного белка $\alpha 7$ -АЦХСБ (PDB 3SQ6).

Аминокислотные остатки $\alpha 7$ nAChR в положениях 184, 185, 187, 189 («+» стороны лиганд-связывающего участка, Рисунок 4А, В) и 117, 118, 119 («-» стороны, Рисунок 4Б, В) находятся в непосредственной близости от связанной молекулы эпибатидина и данные положения были выбраны для проведения точечного мутагенеза, в результате которого аминокислотные остатки $\alpha 7$ субъединицы nAChR были заменены на соответствующие им остатки в последовательности $\alpha 9$ субъединицы: мутанты Q117T, Y118W, L119D, S184N, E185V, F187S и E189G (Рисунок 4А, Б).

Согласно результатам цитохимического окрашивания трансфицированных клеток Neuro2a с применением AlexaFluor555 α Bgt, уровень экспрессии мутантных форм Q117T, Y118W, L119D, S184N, E185V был сравним с экспрессией $\alpha 7$ nAChR дикого типа. Однако мутант F187S экспрессировался только в ~5% клеток, эффективной же экспрессии мутантной формы E189G в клетках нейробластомы получить не удалось. По этой причине была получена аналогичная мутация E189A последовательности химерной

субъединицы $\alpha 7$ /ГлиР (содержит экстрацеллюлярный домен $\alpha 7$ нАХР и трансмембранный и цитоплазматический домены ГлиР). Химерный рецептор $\alpha 7$ /ГлиР хорошо экспрессируется в ооцитах *X. laevis*, поэтому специфичность мутанта E189A изучалась электрофизиологическим методом. Методом двухэлектродной фиксации потенциала не было обнаружено статистически достоверной разницы в EC_{50} ацетилхолина и никотина для мутанта E189A и $\alpha 7$ /ГлиР дикого типа. Таким образом, мутация в положении 189 не оказывала заметного влияния на способность рецептора связывать выбранные агонисты (Таблица 2).

В ходе кальциевого имиджинга были зарегистрированы агонист-индуцированные ответы клеток Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР человека и крысы, а также их мутантные формы Q117T, Y118W, L119D, S184N, E185V и F187S. Для всех вышеперечисленных рецепторов были вычислены значения EC_{50} двух агонистов: ацетилхолина и эпибатицина (Рисунок 5, Таблица 2).

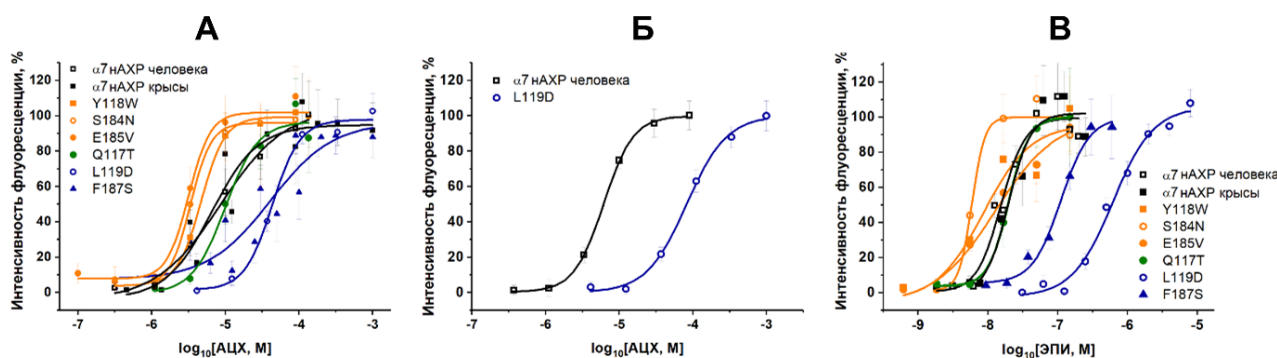


Рисунок 5. Концентрационные зависимости агонист ((А, Б) ацетилхолин и (В) эпибатицин)-индуцированного повышения интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора в клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР дикого типа или мутантные формы рецептора. Для регистрации повышения внутриклеточного содержания ионов кальция использовался (А, В) Case12 или (Б) Flio-4. Все эксперименты проводились с использованием 10 мкМ PNU120596. Среднее \pm SEM, $n=4$.

Методом кальциевого имиджинга не было обнаружено различий в способности связывать ацетилхолин и эпибатицин между $\alpha 7$ нАХР человека и крысы (Рисунок 5А, В и Таблица 2). Мутантная форма Q117T не отличалась по своей аффинности к агонистам от рецептора дикого типа (Рисунок 5А, В и Таблица 2). Мутантные формы Y118W, S184N и E185V продемонстрировали небольшое увеличение аффинности к ацетилхолину и эпибатицину, но 95%

доверительные интервалы средних значений EC_{50} перекрывались с таковыми для $\alpha 7$ nAHP дикого типа (Рисунок 5А, В и Таблица 2).

Таблица 2. Значения EC_{50} агонистов для $\alpha 7$ nAHP и его мутантных форм, полученные методом кальциевого имиджинга и двухэлектродной фиксации мембранного потенциала ооцитов *X. laevis*.

Рецептор	Кальциевый имиджинг*	
	Ацетилхолин EC_{50} , мкМ (95% ДИ)	Эпibatидин EC_{50} , нМ (95% ДИ)
$\alpha 7$ nAHP человека	8,69 (4,79 – 15,8)	15,42 (10,54 – 22,56)
$\alpha 7$ nAHP [Q117T] человека	9,95 (5,13 – 19,28)	19,86 (10,95 – 36,03)
$\alpha 7$ nAHP [Y118W] человека	4,69 (2,53 – 8,71)	8,63 (2,9 – 25,7)
$\alpha 7$ nAHP [S184N] человека	3,36 (2,23 – 5,08)	5,86 (3,45 – 10,04)
$\alpha 7$ nAHP [E185V] человека	3,18 (2,09 – 4,83)	12,17 (4,96 – 29,88)
$\alpha 7$ nAHP [F187S] человека	40,85 (15,04 – 110,95)	111,03 (57,78 – 213,38)
$\alpha 7$ nAHP крысы	6,54 (3,32 – 12,89)	19,64 (10,26 – 36,62)
$\alpha 7$ nAHP [L119D] крысы	43,36 (24,75 – 67,25)	617,89 (389,06 – 981,3)
$\alpha 7$ nAHP человека	6,12 (5,64 – 6,64)**	
$\alpha 7$ nAHP [L119D] крысы	82,4 (74,46 – 91,09)**	
Рецептор	Электрофизиология	
	Ацетилхолин EC_{50} , мкМ (95% ДИ)	Эпibatидин EC_{50} , мкМ (95% ДИ)
$\alpha 7$ nAHP крысы	192,7 (149,2 – 248,8)	1,56 (1,38 – 1,78)
$\alpha 7$ nAHP [L119D] крысы	2125,9 (1489,9 – 3033,3)	31,79 (24,35 – 41,5)
Рецептор	Ацетилхолин EC_{50} , мкМ (95% ДИ)	Никотин EC_{50} , мкМ (95% ДИ)
$\alpha 7$ /ГлиР	247,8 (158,1 – 388,6)	34,3 (20,4 – 57,7)
$\alpha 7$ /ГлиР [E189A]	123,3 (86,7 – 175,4)	19,7 (18,2 – 21,4)

Представлены средние значения EC_{50} и 95% доверительные интервалы (ДИ), $n=3-7$.

*Эксперименты проводились с использованием 10 мкМ PNU120596.

**В экспериментах вместо Case12 использовался Fluo-4.

Мутации в положениях 187 и 119 (мутантные формы F187S и L119D) привели к значительному снижению аффинности рецептора к агонистам (Рисунок 5 и Таблица 2). Значение EC_{50} ацетилхолина и эпibatидина для мутанта F187S оказалось выше в 5- и 7-раз, а для L119D – в 5- и 40-раз, чем соответствующие значения для $\alpha 7$ nAHP дикого типа (Таблица 2). Снижение аффинности к агонистам у мутанта L119D было подтверждено в экспериментах по кальциевому имиджингу с Fluo-4 (Таблица 2). Дополнительно были проведены электрофизиологические эксперименты с ооцитами *X. laevis*, экспрессирующими $\alpha 7$ nAHP или мутантную форму L119D, в которых

возможно детектировать агонист-индуцированный ионный ток через $\alpha 7$ рецептор в отсутствии PNU120596 (Таблица 2 и Рисунок 6).

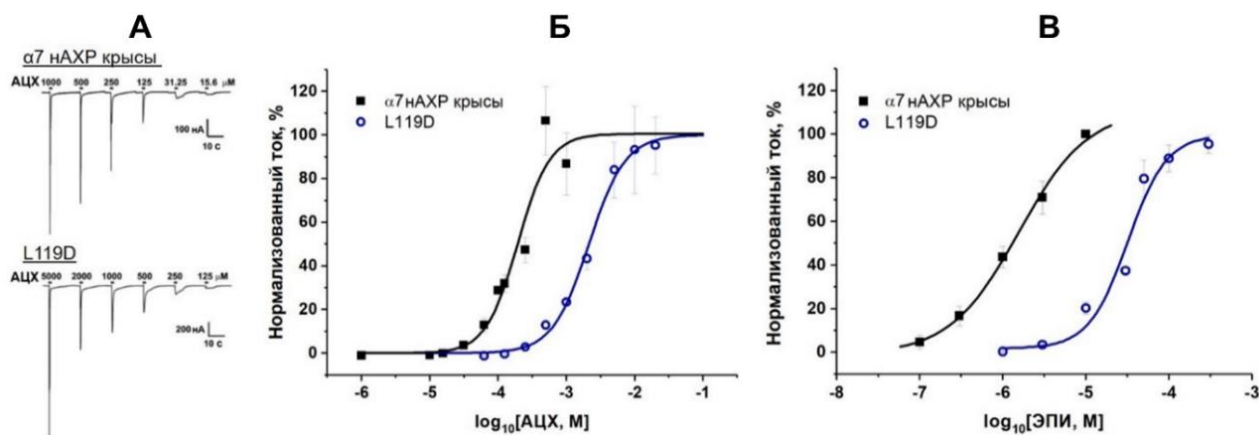


Рисунок 6. Электрофизиологический анализ аффинности $\alpha 7$ nAChR дикого типа и мутантной формы L119D к (А, Б) ацетилхолину и (В) эпибатидину. (А) Запись ацетилхолин-индуцированных токов ооцитов, экспрессирующих $\alpha 7$ nAChR дикого типа или мутантную форму L119D, и (Б, В) концентрационная зависимость амплитуды ионных токов. Среднее \pm SEM, $n=5-6$.

Результаты, полученные методом двухэлектродной фиксации мембранного потенциала, подтвердили значительное ухудшение сродства мутантной формы L119D к ацетилхолину (Рисунок 6А, Б) и особенно к эпибатидину (Рисунок 6В) по сравнению со свойствами $\alpha 7$ nAChR дикого типа.

Значения EC_{50} ацетилхолина и эпибатидина, вычисленные по результатам кальциевого имиджинга и двухэлектродной фиксации мембранного потенциала различаются, причиной этого является использование в кальциевом имиджинге PNU120596, сильно изменяющего количественные параметры лиганд-рецепторного взаимодействия. Однако ухудшение аффинности мутанта L119D к обоим агонистам по сравнению с $\alpha 7$ nAChR дикого типа проявилось в равной степени в обоих методах, поэтому изменение фармакологических свойств мутантного рецептора L119D по сравнению с $\alpha 7$ nAChR дикого типа не зависит от использования PNU120596.

Для мутантной формы L119D показано наибольшее ухудшение способности активироваться под действием эпибатидина по сравнению с ацетилхолин-индуцируемой активацией, что позволяет утверждать, что различие аминокислотных последовательностей $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединиц в

положении 119 может вносить существенный вклад в их принципиально отличающиеся фармакологические свойства.

3. Новые низкомолекулярные и пептидно-белковые лиганды nAHP

Природные аналоги *d*-тубокурарина (*d*-ТС)

Для охоты индейцы племени Матис используют экстракты стеблей *Chondrodendron tomentosum*, которыми покрывают наконечники охотничьих дротиков. Ученые Лейпцигского университета показали, что в состав данного растительного яда входят бисбензилтетрагидроизохинолиновые алкалоиды ВВІQА1, ВВІQА2 и ВВІQА3, структурно сходные с *d*-ТС (Рисунок 7).

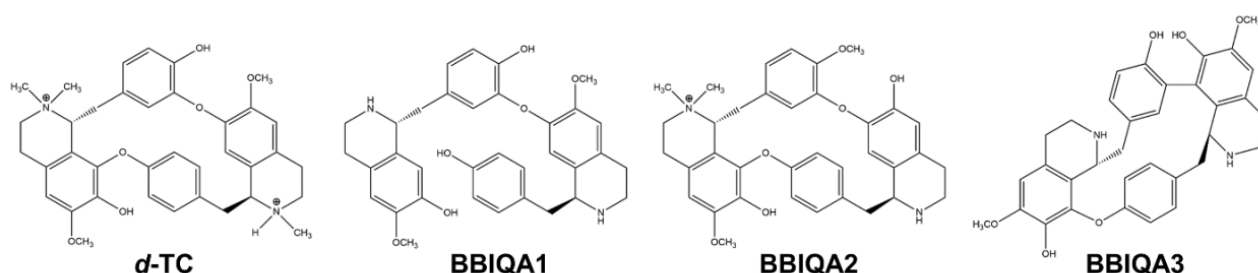


Рисунок 7. Структурные формулы *d*-ТС и ВВІQА1, ВВІQА2 и ВВІQА3.

Ранее в отделе Молекулярной нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН была показана способность этих соединений ингибировать ацетилхолин-индуцированные токи в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP. Наблюдаемый эффект природных аналогов *d*-ТС на nAHP мышечного типа интересен с точки зрения разработки новых эффективных мышечных релаксантов. Данная работа посвящена более детальному изучению механизма действия ВВІQА1 и ВВІQА2 на мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP и исследованию эффектов этих алкалоидов на нейрональные nAHP, а также ГАМК_AР и 5-НТ_{3A}Р.

Компьютерное моделирование комплекса АЦХСБ *Aplysia californica* (PDB 2XYT), с соединениями ВВІQА1 и ВВІQА2 показало, что они, как и *d*-ТС, способны с высокой аффинностью связываться с ортостерическими сайтами АЦХСБ. Результаты радиолигандного анализа, проведенного с АЦХСБ *A. californica* подтвердило сходную с *d*-ТС способность ВВІQА1 и ВВІQА2 конкурировать с радиоактивно-меченным α -бунгаротоксином [¹²⁵I]- α Bgt за связывание в ортостерических сайтах АЦХСБ (Таблица 3).

Таблица 3. Значения параметров IC_{50} *d*-ТС и его аналогов ВВІQА1 и ВВІQА2 для АЦХСБ *A. californica*, нАХР *T. californica*, $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР и $\alpha 7$ нАХР, полученные методами радиолигандного анализа, кальциевого имиджинга и электрофизиологии.

Соединение	Радиолигандный анализ		
	АЦХСБ <i>A. californica</i>	нАХР <i>T. californica</i>	$\alpha 7$ нАХР
	IC_{50} , мкМ (95% ДИ)		
<i>d</i>-ТС	2,41 (2,26 – 2,56)	0,39 (0,31 – 0,47)	7,77 (6,72 – 8,81)
ВВІQА1	3,80 (3,47 – 4,13)	26,3 (24,7 – 27,8)	162 (148 – 191)
ВВІQА2	7,63 (5,28 – 9,97)	8,75 (7,22 – 10,27)	5,52 (4,50 – 6,55)
Соединение	Кальциевый имиджинг		Электрофизиология
	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР	$\alpha 7$ нАХР*	5-НТ _{3A} Р
	IC_{50} , мкМ (95% ДИ)		IC_{50} , нМ (95% ДИ)
<i>d</i>-ТС	0,81 (0,50 – 1,12)	2,03 (1,31 – 2,76)	22,63 (10,49 – 34,78)
ВВІQА1	0,75 (0,28 – 1,21)	1,70 (1,11 – 2,61)	119,4 (74,4 – 164,4)
ВВІQА2	1,75 (0,88 – 2,61)	3,08 (1,47 – 4,68)	1975 (1861 – 2090)

Представлены средние значения EC_{50} и 95% доверительные интервалы (ДИ), $n=2-6$.

*В экспериментах использовался 10 мкМ PNU120596.

Результаты радиолигандного анализа свидетельствуют о достаточно низком сродстве аналогов ВВІQА1 и ВВІQА2 к ортостерическим сайтам нАХР мышечного типа ската *Torpedo californica*. В то же время эксперименты с клетками линии GH₄C₁, в которых гетерологически экспрессирован $\alpha 7$ нАХР человека, показали, что аналог ВВІQА1 хуже вытесняет [¹²⁵I]- α Bgt из лиганд-связывающего сайта $\alpha 7$ рецептора по сравнению с ВВІQА2 и *d*-ТС. Все полученные значения IC_{50} соединений представлены в Таблице 3. Методом кальциевого имиджинга было показано, что ВВІQА1 и ВВІQА2 обладают приблизительно такой же способностью ингибировать агонист-индуцированные ответы $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ нАХР, что и *d*-ТС (Таблица 3).

Некоторое противоречие результатов радиолигандного анализа нАХР мышечного типа ската *T. californica* и кальциевого имиджинга ответов мышечного нАХР мышцы, возможно, объясняется видоспецифичностью и разным субъединичным составом рецепторов – $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$, соответственно. Также представляло интерес выяснить, связываются ли аналоги *d*-ТС и вне ортостерических участков рецептора, для этого были проведены дополнительные эксперименты по кальциевому имиджингу клеток Neuro2a, экспрессирующих мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР, с различными

концентрациями антагонистов (IC_{50} и $3 \times IC_{50}$; Рисунок 8). В присутствии *d*-ТС или его аналогов происходит параллельный сдвиг концентрационных кривых ацетилхолина (значение EC_{50} ацетилхолина увеличивается), сопровождающийся снижением амплитуды максимальных ответов (Рисунок 8). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ВВІQА1, ВВІQА2 и *d*-ТС, связываясь как с орто-, так и с аллостерическими участками, ингибируют мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР по смешанному механизму.

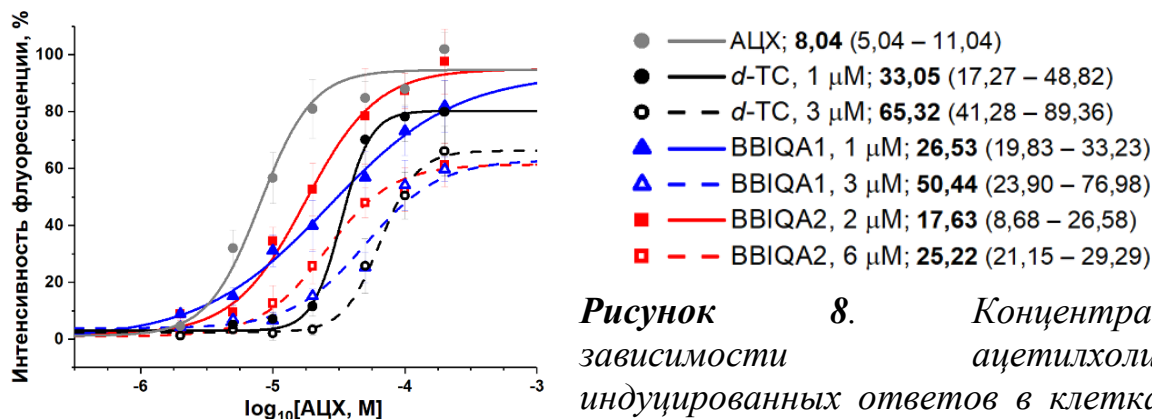


Рисунок 8. Концентрационные зависимости ацетилхолин(АЦХ)-индуцированных ответов в клетках линии *Neuro2a*, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР,

при отсутствии (●) и в присутствии *d*-ТС (●, ○) или его аналогов: ВВІQА1 (▲, △) и ВВІQА2 (■, □) в концентрациях IC_{50} и $3 \times IC_{50}$. Среднее \pm SEM, $n=3-4$. Справа, рядом с условными обозначениями приведены соответствующие средние значения EC_{50} ацетилхолина и 95% доверительные интервалы.

Результаты электрофизиологического анализа показывают, что ВВІQА1, ВВІQА2 и *d*-ТС имеют сходную ингибирующую активность в отношении нейрональных $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAХР, экспрессированных в ооцитах *X. laevis* (Рисунок 9А, Б). Ингибирование агонист-индуцированных токов, опосредованных активацией ГАМК_AР ($\alpha 3\beta 2\gamma 2$), под действием *d*-ТС наблюдалось только при относительно высокой концентрации антагониста (100 μ M; около 90% ингибирования). В то же время ингибирование токов под действием ВВІQА1 или ВВІQА2 в той же концентрации было меньшим и составляло около 50-60%. (Рисунок 9В).

Соединения ВВІQА1 и ВВІQА2 менее эффективно, чем *d*-ТС, блокируют агонист-индуцированные ответы, опосредованные активацией 5-НТ_{3A}Р (Таблица 3 и Рисунок 9Г, Д): значения IC_{50} ВВІQА1 и ВВІQА2 в 5- и 87- раз больше, чем значение IC_{50} *d*-ТС, соответственно.

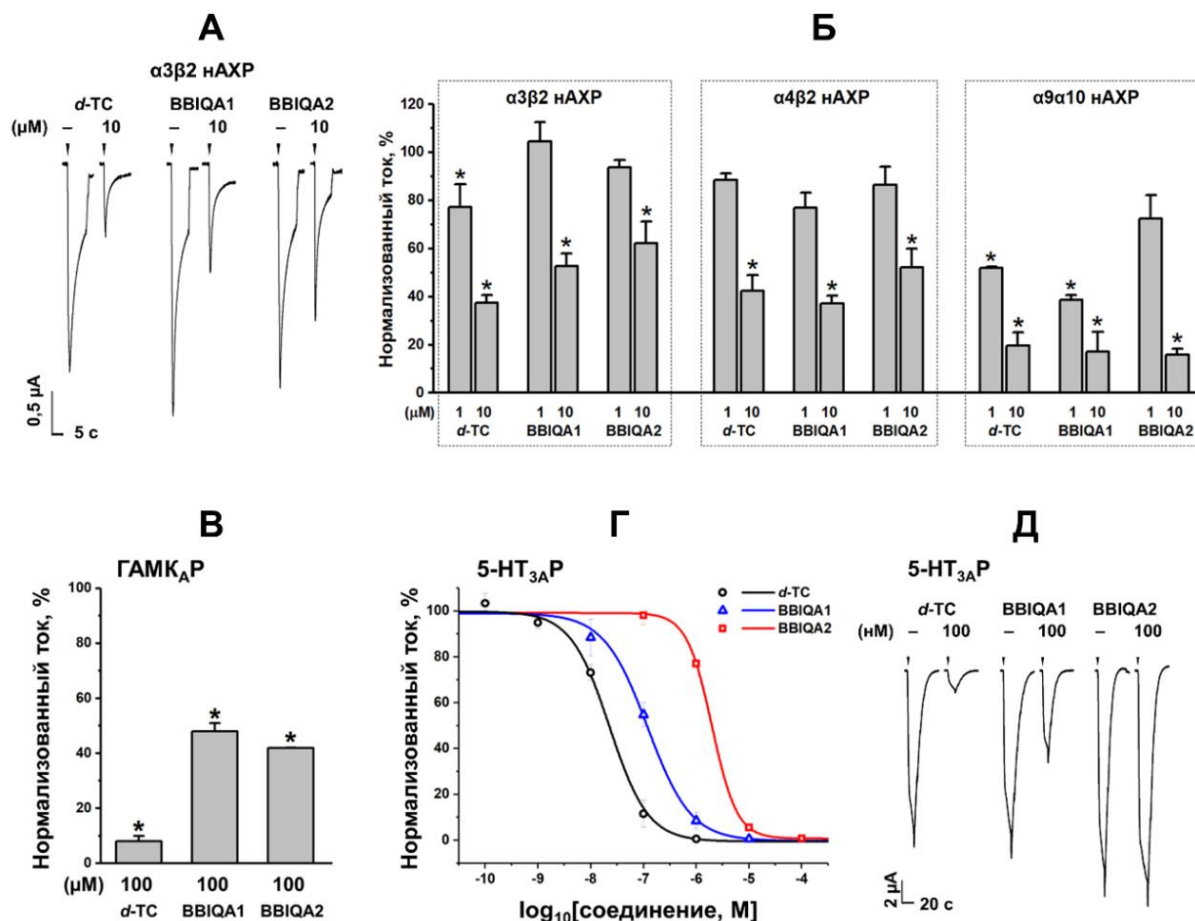


Рисунок 9. Ингибирующая активность *d*-тубокурарина (*d*-ТС), BBIQA1 и BBIQA2 в отношении нейрональных nAChR, ГАМК_AR и 5-HT_{3A}R. (А) Пример ингибирования никотин(50 мкМ)-индуцированных ионных токов ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 3\beta 2$ nAChR человека, под действием 10 мкМ *d*-ТС, BBIQA1 и BBIQA2 (момент добавления лигандов указан стрелкой). (Б) Ингибирование под действием различных концентраций (1, 10 мкМ) *d*-ТС, BBIQA1 и BBIQA2 агонист-индуцированных токов ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 3\beta 2$ nAChR человека (50 мкМ никотин), $\alpha 4\beta 2$ nAChR крысы (10 мкМ никотин) или $\alpha 9\alpha 10$ nAChR человека (25 мкМ ацетилхолин). (В) Ингибирование под действием 100 мкМ *d*-ТС, BBIQA1 и BBIQA2 ГАМК(100 мкМ)-индуцированных токов ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ ГАМК_AR мыши. (Б, В) * обозначает статистически достоверную разницу ($p < 0,05$) между нормализованными значениями амплитуды токов в отсутствии или присутствии *d*-ТС, BBIQA1 и BBIQA2 (однопараметрический дисперсионный анализ с тестом Тьюки). Среднее \pm SEM, $n = 3-5$. (Г) Концентрационная зависимость ингибирования серотонин(1 мкМ)-индуцированных токов ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих 5-HT_{3A}R мыши под действием *d*-ТС (○), BBIQA1 (▲) и BBIQA2 (□). Вычисленные значения IC₅₀ антагонистов представлены в Таблице 3. Среднее \pm SEM, $n = 3$. (Д) Пример записи серотонин(1 мкМ)-индуцированных токов, демонстрирующих ингибирование под действием 100 нМ *d*-ТС, BBIQA1 и BBIQA2 (момент добавления лигандов указан стрелкой).

Таким образом, результаты, полученные методами кальциевого имиджинга, электрофизиологии и радиолигандного анализа для разных представителей Cys-петельных рецепторов свидетельствуют о более высокой специфичности действия VBIQA1 и VBIQA2 в отношении nAХР, по сравнению с *d*-ТС, т.к. новые соединения значительно хуже ингибируют ГАМК_AР и 5-НТ_{3A}Р.

Баптид 2

Помимо белковых α -нейротоксинов в яде змей идентифицируется множество пептидов, которые также блокируют nAХР. В отличие от α -нейротоксинов, их химический синтез является относительно простым, т.к. они содержат меньшее число аминокислотных остатков и дисульфидных связей. В нашем отделе из яда гадюки *Bitis arietans* был выделен баптид 2, который состоит из десяти аминокислотных остатков **PPRHLMHNLHG** и не содержит дисульфидных связей. Ранее в исследовании под руководством д.х.н. Уткина Ю.Н. (зав. лаб. Молекулярной токсикологии ИБХ РАН), выполненным совместно с к.б.н. Вульфус Е.А. (Институт биофизики клетки РАН, Пущино), было показано, что баптид 2 блокирует ионные токи, вызванные действием ацетилхолина, в нейронах *Lymnaea stagnalis*, а также токи, опосредованные активацией мышечного рецептора мышцы, экспрессированного в ооцитах *X. laevis*. Однако баптид 2 не конкурирует с [¹²⁵I]- α Bgt за связывание с nAХР *T. californica* и слабо конкурирует за связывание с $\alpha 7$ nAХР.

Чтобы установить характер взаимодействия баптида 2 с $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР были проведены эксперименты по кальциевому имиджингу. В результате было показано, что баптид 2 ингибирует ацетилхолин-индуцированное повышение уровня концентрации ионов кальция в клетках Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAХР человека, при этом вычисленное значение IC₅₀ баптида 2 составляет $20,6 \pm 3,93$ мкМ (Рисунок 10А). У клеток Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ или $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР, в присутствии баптида 2 (25 мкМ) наблюдалось значительное снижение максимальной амплитуды клеточных ответов, индуцированных действием высокой концентрации ацетилхолина, при

этом значение EC_{50} ацетилхолина оставалось практически неизменным ($5,24 \pm 1,2$ мкМ для $\alpha 7$ nAHP; $9,75 \pm 2,1$ мкМ для $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP; Рисунок 10Б, В).

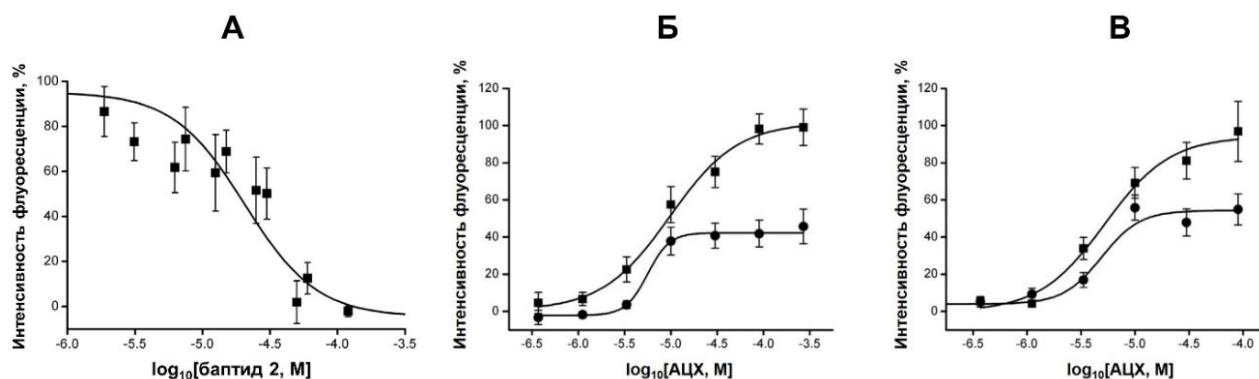


Рисунок 10. Ингибирующий эффект баптида 2 на $\alpha 7$ (А, В) и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ (Б) nAHP. (А) Концентрационная зависимость ингибирования под действием баптида 2 ацетилхолин (90 мкМ)-индуцированных кальциевых ответов клеток линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAHP человека. (Б, В) Концентрационные кривые ацетилхолин-индуцированных кальциевых ответов клеток линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP мыши (Б) или $\alpha 7$ nAHP человека (В) в отсутствии (■) или присутствии 25 мкМ баптида 2 (●). В экспериментах А и В использовался 10 мкМ PNU120596. Среднее \pm SEM, $n=3-4$.

Полученные результаты свидетельствуют о неконкурентном механизме ингибирования $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP под действием баптида 2. Ранее уже было известно о некоторых пептидных токсинах, действующих на nAHP в качестве неконкурентных ингибиторов, в их число входят α -конотоксины ImII и AuIB. Особенность баптида 2 заключается в отсутствии в его структуре дисульфидных связей.

Панкреатическая фосфолипаза A_2

Фосфолипаза A_2 (ФЛА $_2$, ЕС 3.1.1.4) является одним многочисленных компонентов ядов змей. Этот фермент гидролизует фосфолипиды в положении *sn*-2 с образованием лизофосфолипидов и жирных кислот, повреждающих плазматическую мембрану. Многие ФЛА $_2$ также ингибируют нервно-мышечную передачу: ФЛА $_2$ ядов змей из семейств *Viperidae* и *Elapidae* (их относят к группам IIА и IА, соответственно) блокируют мышечный и $\alpha 7$ nAHP.

Результаты радиолигандного анализа свидетельствуют о том, что панкреатическая ФЛА $_2$ свиньи (пФЛА $_2$, группа IV) ингибирует связывание радиоактивно-меченного α -бунгаротоксина [125 I]- α Bgt с ортостерическими

участками nAHP мышечного типа ската *T. californica*, а также нейронального $\alpha 7$ nAHP человека, гетерологически экспрессированного в клетках линии GH₄C₁ (Рисунок 11).

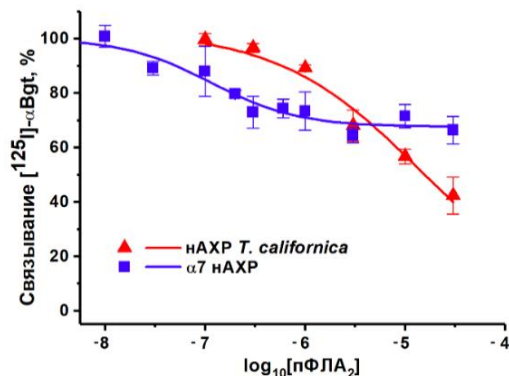


Рисунок 11. Ингибирование связывания радиоактивно-меченного α -бунгаротоксина $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ с (▲) nAHP мышечного типа ската *T. californica* и с (■) $\alpha 7$ nAHP, экспрессируемым в клетках GH₄C₁, под действием панкреатической фосфолипазы A₂ свиньи (пФЛА₂). Вычисленные значения IC₅₀ пФЛА₂ составляют 15 ± 3 мкМ и 120 ± 30 нМ, соответственно. Среднее \pm SEM. $n=4$.

Также в ходе радиолигандного анализа для пФЛА₂ была показана способность связываться с водорастворимым доменом $\alpha 9$ nAHP человека. Дополнительное функциональное тестирование активности пФЛА₂ свиньи проводили с помощью двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 9\alpha 10$ nAHP человека. В ходе эксперимента было обнаружено, что преинкубация ооцитов с растворами пФЛА₂ разной концентрации в течение 5 минут приводила к дозозависимому снижению амплитуды ацетилхолин-индуцированных токов (Рисунок 12), и вычисленное значение IC₅₀ пФЛА₂ составляет 190 ± 30 нМ (среднее \pm SEM, $n = 3$).

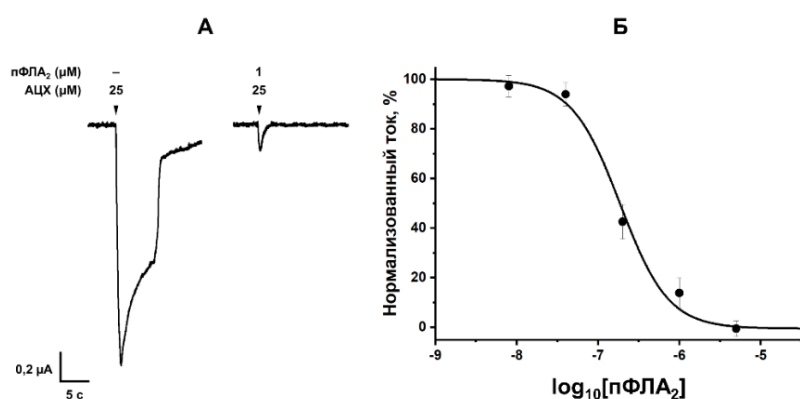


Рисунок 12. Ингибирующая активность пФЛА₂ в отношении агонист-индуцированных ионных токов ооцитов *X. laevis*, опосредованных активацией $\alpha 9\alpha 10$ nAHP человека. (А) Пример записи ацетилхолин(АЦХ, 25 мкМ)-индуцированных

токов, демонстрирующих ингибирование под действием 1 мкМ пФЛА₂ (момент добавления лигандов указан стрелкой). (Б) Концентрационная кривая ингибирующей активности пФЛА₂ в отношении $\alpha 9\alpha 10$ nAHP человека, экспрессированного в ооцитах *X. laevis* (ионные токи вызваны действием 25 мкМ АЦХ). Среднее \pm SEM, $n=3$.

В организме $\alpha 9\alpha 10$ nAХР вовлечены в передачу болевых сигналов, и ингибирование этих рецепторов предотвращает нейропатическую боль. Все эти данные свидетельствуют о возможном применении панкреатической ФЛА₂ или ее фрагментов для подавления болевых сигналов в клинической практике.

Новые синтетические низкомолекулярные лиганды nAХР

Новые лиганды nAХР могут быть идентифицированы не только из числа природных соединений, но также возможен направленный химический синтез новых агонистов, антагонистов или модуляторов. При их разработке учитываются ключевые структурные элементы, необходимые для проявления соединением активности в отношении nAХР: наличие положительно заряженного атома азота и акцептора водородной связи, а также расстояние между ними. Ученые Флорентийского университета предложили несколько новых молекул в качестве потенциальных лигандов nAХР: производные хинолина (**q1-4**) и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин (**a1-4**) (Рисунок 13) и обратились к нам с просьбой изучить их биологические эффекты на $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$ nAХР.

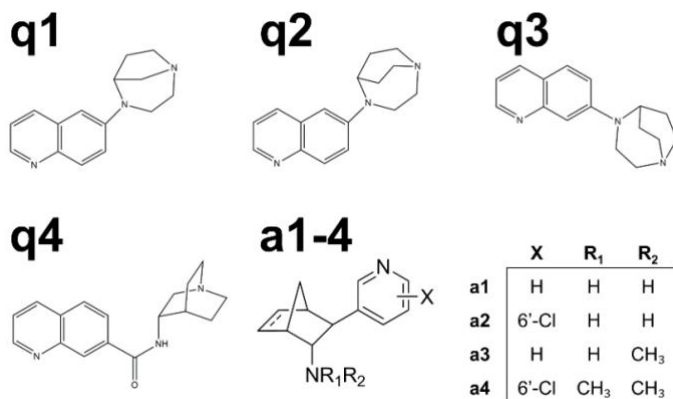


Рисунок 13. Структурные формулы потенциальных лигандов nAХР.

В ходе кальциевого имиджинга было показано, что соединение **q1** способно ингибировать клеточные ответы, опосредованные активацией $\alpha 7$ nAХР человека под действием 100 мкМ ацетилхолина, причем полное ингибирование достигалось лишь при достаточно высокой концентрации антагониста (300 мкМ; Рисунок 14). В то же время **q2**, **q3** и **q4** являются агонистами $\alpha 7$ рецептора человека, добавление их растворов в микромолярном диапазоне концентраций приводило к повышению уровня внутриклеточной концентрации ионов кальция (Рисунок 15). Вычисленные значения EC₅₀ соединений **q2**, **q3** и **q4** составляют $1,41 \pm 0,56$ мкМ; $1,03 \pm 0,38$ мкМ и $1,57 \pm 0,23$ мкМ, соответственно. Все соединения **q1**, **q2**, **q3** и **q4**

проявили ингибирующие свойства в отношении $\alpha 4\beta 2$ нАХР крысы: в концентрации 50 мкМ они полностью блокировали эпибатидин (1 мкМ)-индуцированный ток в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих данный подтип нАХР.

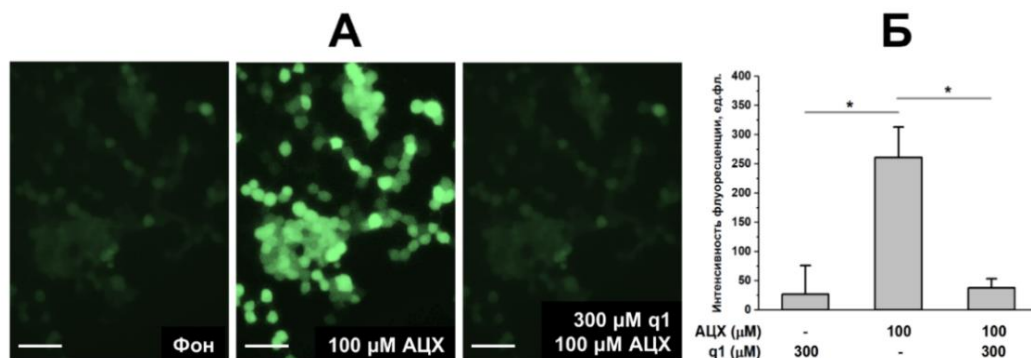


Рисунок 14. Ингибирование под действием соединения **q1** ацетилхолин(100 мкМ)-индуцированных ответов клеток *Neuro2a*, опосредованных активацией $\alpha 7$ нАХР человека. В $\alpha 7$ нАХР-экспрессирующих клетках *Neuro2a* **q1** (300 мкМ) подавлял повышение интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора *Case12*, вызванное действием ацетилхолина (100 мкМ). (А) Фотографии клеток *Neuro2a*, масштаб 50 мкм, и (Б) соответствующая гистограмма ингибирования. * обозначает статистически достоверную разницу ($p < 0,05$) между двумя группами значений, объединенных серой линией (однопараметрический дисперсионный анализ с тестом Тьюки). В экспериментах использовался 10 мкМ PNU120596. ед.фл. – единицы флуоресценции. Среднее \pm SEM, $n=4$.

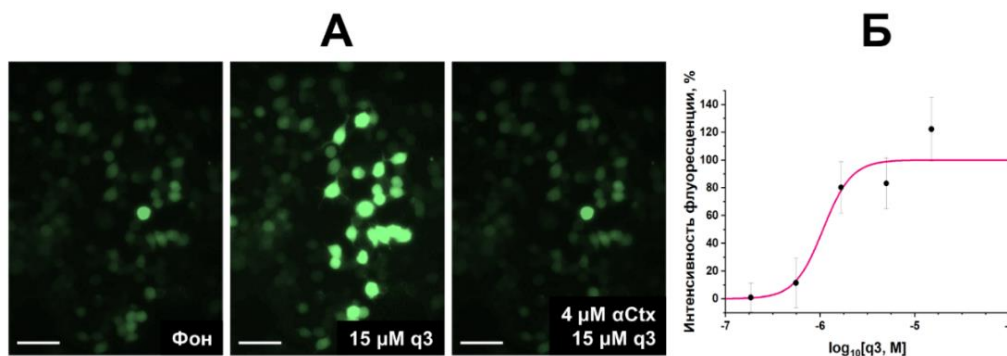


Рисунок 15. Агонистический эффект соединения **q3** в отношении $\alpha 7$ нАХР, экспрессируемого в клетках линии *Neuro2a*. (А) Добавление **q3** (15 мкМ) приводит к повышению интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора *Case12*, экспрессируемого в клетках *Neuro2a* совместно с $\alpha 7$ нАХР человека. Масштаб 50 мкм. (Б) Соответствующая концентрационная зависимость амплитуды ответов, индуцированных соединением **q3** в клетках *Neuro2a*, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР человека. В экспериментах использовался 10 мкМ PNU120596. Среднее \pm SEM, $n=3$.

Методом двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР крысы, было показано, что соединения **a1** и **a2**

активировали этот подтип рецептора, их вычисленные значения EC_{50} равны $5,98 \pm 1,50$ мкМ и $2,71 \pm 0,30$ мкМ, соответственно. **a3** тоже демонстрировал агонистические свойства в отношении $\alpha 7$ нАХР, однако его активность значительно ниже, чем у **a1** и **a2**. Соединение **a4** не активировало $\alpha 7$ рецептор даже в высокой концентрации (250 мкМ, Рисунок 16А). В то же время соединения **a1**, **a2**, **a3** и **a4** в концентрации 50 мкМ блокировали никотин-индуцированные ответы ооцитов *X. laevis*, опосредованные активацией $\alpha 4\beta 2$ нАХР человека (Рисунок 16Б). Наиболее эффективным антагонистом $\alpha 4\beta 2$ рецептора был **a1** (91% ингибирования), в то время как ингибирование ответов под действием **a3** было наименьшим и составляло 53%.

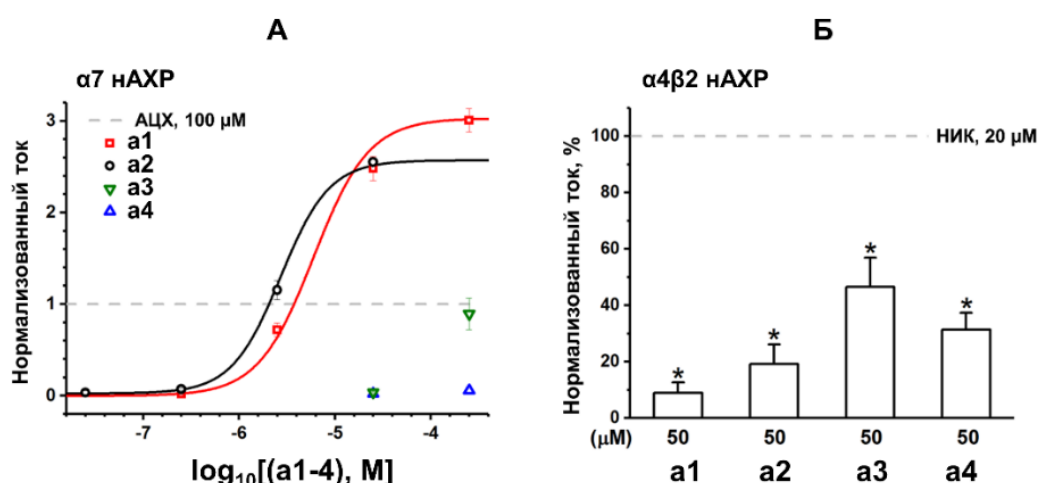


Рисунок 16. (А) Концентрационные зависимости амплитуды ионных токов, индуцированных соединениями **a1** (□), **a2** (○), **a3** (▽) или **a4** (△) в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР крысы. Значения амплитуды токов, вызванных действием новых соединений, нормализовались на значения амплитуды токов, вызванных действием 100 мкМ ацетилхолина (серая пунктирная линия). (Б) Ингибирование никотин(20 мкМ)-индуцированных токов под действием соединений **a1**, **a2**, **a3** и **a4** (50 мкМ) в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 4\beta 2$ нАХР человека. * обозначает статистическую разницу ($p < 0,05$) между нормализованными значениями амплитуды токов в отсутствии или присутствии **a1**, **a2**, **a3** или **a4** (однопараметрический дисперсионный анализ с тестом Тьюки). Среднее \pm SEM, $n = 3-5$.

Таким образом, новые эффективные лиганды нАХР были обнаружены среди химически синтезированных производных хинолина (соединения **q2-4**), и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин (первичные амины **a1** и **a2**): эти соединения обладают выраженными агонистическими свойствами в отношении $\alpha 7$ нАХР и являются конкурентными антагонистами $\alpha 4\beta 2$ рецептора.

ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный метод кальциевого имиджинга для тестирования активности $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAХР с использованием одноволнового генетически кодируемого кальциевого сенсора Case12;
2. При исследовании $\alpha 7/\alpha 9$ мутантных форм nAХР установлено, что замена остатка лейцина на остаток аспарагиновой кислоты в положении 119 экстрацеллюлярного домена $\alpha 7$ nAХР (мутация L119D) вызывает наибольшие изменения в чувствительности рецептора к эпibatидину, что может быть одной из причин неспособности $\alpha 9$ nAХР активироваться под действием эпibatидина, агониста всех других nAХР;
3. Показано, что новые природные алкалоиды ВВIQA1 и ВВIQA2 являются столь же эффективными ингибиторами nAХР, как и *d*-тубокурарин (*d*-ТС), но проявляют к этим рецепторам большую специфичность, значительно хуже ингибируя 5-НТ_{3A}Р и ГАМК_AР по сравнению с *d*-ТС. ВВIQA1 и ВВIQA2 (как и *d*-ТС) ингибируют $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР по смешанному механизму: алкалоиды связываются не только с орто-, но и с аллостерическими участками рецептора;
4. Определен характер взаимодействия новых лигандов пептидно-белковой природы с nAХР: баптид 2, пептидный компонент яда *Bitis arietans*, блокирует $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР по неконкурентному механизму, а панкреатическая фосфолипаза А₂ эффективно связывается с ортостерическими участками nAХР мышечного типа ската *Torpedo californica* и $\alpha 7$ nAХР, а также блокирует $\alpha 9\alpha 10$ nAХР;
5. Выявлены эффективные агонисты $\alpha 7$ nAХР среди новых синтетических производных хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-аминов, со значениями ЕС₅₀ в микромолярном диапазоне. Также соединения обоих классов являются низкоаффинными конкурентными антагонистами $\alpha 4\beta 2$ nAХР.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Spirova E. N.**, Ivanov I. A., Kasheverov I. E., Kudryavtsev D. S., Shelukhina I. V., Garifulina A. I., Son L. V., Lummis S. C. R., Malca-Garcia G. R., Bussmann R. W., Hennig L., Giannis A., Tsetlin V. I. Curare alkaloids from Matis Dart Poison: Comparison with d-tubocurarine in interactions with nicotinic, 5-HT₃ serotonin and GABAA receptors // PLoS One. – 2019 – Т. 14. – № 1. – С. e0210182.
2. Manetti D., Garifulina A., Bartolucci G., Bazzicalupi C., Bellucci C., Chiaramonte N., Dei S., Di Cesare Mannelli L., Ghelardini C., Gratteri P., **Spirova E.**, Shelukhina I., Teodori E., Varani K., Tsetlin V., Romanelli M. N. New Rigid Nicotine Analogues, Carrying a Norbornane Moiety, Are Potent Agonists of $\alpha 7$ and $\alpha 3^*$ Nicotinic Receptors // J Med Chem. – 2019 – Т. 62. – № 4. – С. 1887-1901.
3. Vulfius C. A., Kasheverov I. E., Kryukova E. V., **Spirova E. N.**, Shelukhina I. V., Starkov V. G., Andreeva T. V., Faure G., Zouridakis M., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Pancreatic and snake venom presynaptically active phospholipases A₂ inhibit nicotinic acetylcholine receptors // PLoS One. – 2017 – Т. 12. – № 10. – С. e0186206.
4. Shelukhina I.*, **Spirova E.***, Kudryavtsev D., Ojomoko L., Werner M., Methfessel C., Hollmann M., Tsetlin V. Calcium imaging with genetically encoded sensor Case12: Facile analysis of $\alpha 7/\alpha 9$ nAChR mutants // PLoS One. – 2017 – Т. 12. – № 8. – С. e0181936.
5. Vulfius C. A., **Spirova E. N.**, Serebryakova M. V., Shelukhina I. V., Kudryavtsev D. S., Kryukova E. V., Starkov V. G., Kopylova N. V., Zhmak M. N., Ivanov I. A., Kudryashova K. S., Andreeva T. V., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Peptides from puff adder Bitis arietans venom, novel inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors // Toxicon. – 2016 – Т. 121. – С. 70-76.
6. Manetti D., Bellucci C., Dei S., Teodori E., Varani K., **Spirova E.**, Kudryavtsev D., Shelukhina I., Tsetlin V., Romanelli M. N. New quinoline derivatives as nicotinic receptor modulators // Eur J Med Chem. – 2016 – Т. 110. – С. 246-258.

* Равный вклад авторов в работу

Тезисы докладов на конференциях

1. **Спирова Е.Н.**, Кудрявцев Д.С., Кашеверов И.Е., Иванов И.А., Сон Л.В. Шелухина И.В., Ю.Н., Цетлин В.И. Структурные аналоги d-тубокурарина с большей селективностью действия на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» 2019, Москва.
2. **Спирова Е.Н.**, Шелухина И.В., Кудрявцев Д.С., Иванов И.А., Оджомоко Л.О., Жмак М.Н., Вульфийус Е.А., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И. Кальциевый имиджинг nAChR – простой метод скрининга специфичности мутантных форм и новых холинергических лигандов. Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти акад. Овчинникова Ю.А.» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» 2017, Москва.
3. **Спирова Е.Н.**, Кудрявцев Д.С., Оджомоко Л.О., Шелухина И.В. Тестирование сродства классических и новых лигандов к $\alpha 7$ никотиновому ацетилхолиновому рецептору и его мутантным формам методом кальциевого имиджинга. XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» 2016, Москва.