

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
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**

Специальность 03.01.03 Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Шелухина Ирина Валерьевна

Москва

2019

Оглавление

Введение	4
Цель и задачи	6
1. Обзор литературы	7
1.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR)	7
1.1.1. Исследование структуры nAChR и других Cys-петельных рецепторов: от AЦХСБ до гетеромерного $\alpha 4\beta 2$ nAChR	8
1.1.2. Функциональные состояния nAChR	13
1.1.3. Биосинтез и сборка nAChR	14
1.1.4. Лиганды nAChR	17
1.1.5. Кальциевый имиджинг – удобный метод тестирования специфичности nAChR	25
1.2. Отдельные представители nAChR	28
1.2.1. Мышечный nAChR	28
1.2.2. Гомопентамерный $\alpha 7$ nAChR	30
1.2.3. Гомопентамерный $\alpha 9$ и гетеропентамерный $\alpha 9\alpha 10$ nAChR	35
2. Материалы и методы	39
2.1. Материалы и оборудование	39
2.2. Методы	44
2.2.1. Общие молекулярно-биологические методы	44
2.2.2. Сайт-направленный мутагенез	46
2.2.3. Электрофизиология	47
2.2.4. Цитохимия и кальциевый имиджинг	49
2.2.5. Статистический анализ данных	56
3. Результаты и обсуждение	57
3.1. Метод кальциевого имиджинга с Case12 для изучения специфичности $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAChR	57
3.2. Аминокислотные остатки лиганд-связывающих сайтов $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAChR, определяющие различия в их фармакологических свойствах	63
3.3. Новые низкомолекулярные и пептидно-белковые лиганды nAChR	70
3.3.1. Природные аналоги <i>d</i> -тубокурарина (<i>d</i> -ТС)	70
3.3.2. Компоненты змеиных ядов	77
3.3.3. Новые синтетические низкомолекулярные лиганды nAChR	81

Заключение.....	86
Выводы.....	89
Список сокращений.....	90
Список литературы.....	92

Введение

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) наряду с рецепторами γ -аминомасляной кислоты (ГАМК_AR) и серотониновыми рецепторами (5-HT₃R) входят в число представителей Cys-петельных рецепторов, вследствие общности происхождения и особенностей строения. Рецепторы представляют собой комплексы из пяти субъединиц, расположенных симметрично вокруг центральной оси – селективного ионного канала в плазматической мембране. Каждая субъединица состоит из трех доменов: экстрацеллюлярного, трансмембранного и цитоплазматического. Свое название семейство получило благодаря высоко консервативной дисульфидной связи, расположенной в экстрацеллюлярном домене рецептора. Функциональное состояние nAChR, ГАМК_AR и 5-HT₃R зависит от связанного лиганда, поэтому эти рецепторы относят к группе лиганд-управляемых ионных каналов. Все лиганды можно разделить на три большие группы: агонисты – лиганды, которые активируют рецепторы; антагонисты – блокируют, и модуляторы – тонко регулируют работу канала. Представители семейства Cys-петельных рецепторов широко распространены в центральной и периферической нервной системах, где они участвуют в работе синапса (как нервного, так и нервно-мышечного) и проведении нервного сигнала, располагаясь на пре- и постсинаптических мембранах. Свое название рецепторы получили из-за соответствующих эндогенных лигандов или нейромедиаторов, под действием которых происходит их активация: ацетилхолин (АЦХ), γ -аминомасляная кислота (ГАМК) и серотонин (5-НТ). В названии nAChR отражен также экзогенный лиганд, никотин, который активирует большинство представителей nAChR, за исключением $\alpha 9^*$. Экспрессию Cys-петельных рецепторов можно обнаружить и в множестве ненейрональных клеток и тканей, например, клетках иммунной системы и различных эпителиальных клетках, где рецепторы вовлечены в протекание различных клеточных сигнальных каскадов. Вследствие достаточно обширного паттерна экспрессии в организме и вовлеченности в множество клеточных процессов, nAChR рассматриваются как перспективные терапевтические мишени при различных патологических состояниях. В настоящее время огромное внимание уделяется изучению структурных и функциональных особенностей рецепторов. При этом также ведется активный поиск новых природных и синтетических лигандов nAChR, как из числа низкомолекулярных, так и пептидно-белковых соединений. В дальнейшем новые лиганды могут служить основой для разработки лекарственных соединений при направленной терапии.

Изучение функционирования рецепторов *in vivo* затруднено, т.к. при формировании пентамерных комплексов возникает множество различных комбинаций субъединиц, что приводит к огромному разнообразию рецепторов, представленных в одной ткани. Поэтому, для

изучения работы рецепторов и поиска новых лигандов используют методики с гетерологической экспрессией рецепторов в ооцитах *Xenopus laevis* или в клеточных линиях млекопитающих, и дальнейшим проведением электрофизиологических тестов, в число которых входят двухэлектродная фиксация потенциала ооцитов *X. laevis* или метод локальной фиксации потенциала клеток (patch-clamp). В данной работе предлагается использовать дополнительный метод кальциевого имиджинга с генетически кодируемым кальциевым сенсором Case12, главное преимущество данного метода заключается в быстром получении большого объема данных, что облегчает проведение анализа потенциальных лигандов. Эффективность альтернативного метода кальциевого имиджинга будет продемонстрирована в первой части работы для $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHR и ряда их мутантных форм. Однако, до сих пор не удалось получить эффективную экспрессию всех подтипов nAHR и других представителей Cys-петельных рецепторов в клеточных линиях млекопитающих, поэтому метод двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*, в которых возможна гетерологическая экспрессия большинства рецепторов данного семейства, по-прежнему остается широко востребованным. И вторая часть настоящей работы посвящена тестированию новых соединений в качестве потенциальных лигандов с помощью двух методов анализа: кальциевого имиджинга и двухэлектродной фиксации потенциала.

Цель и задачи

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

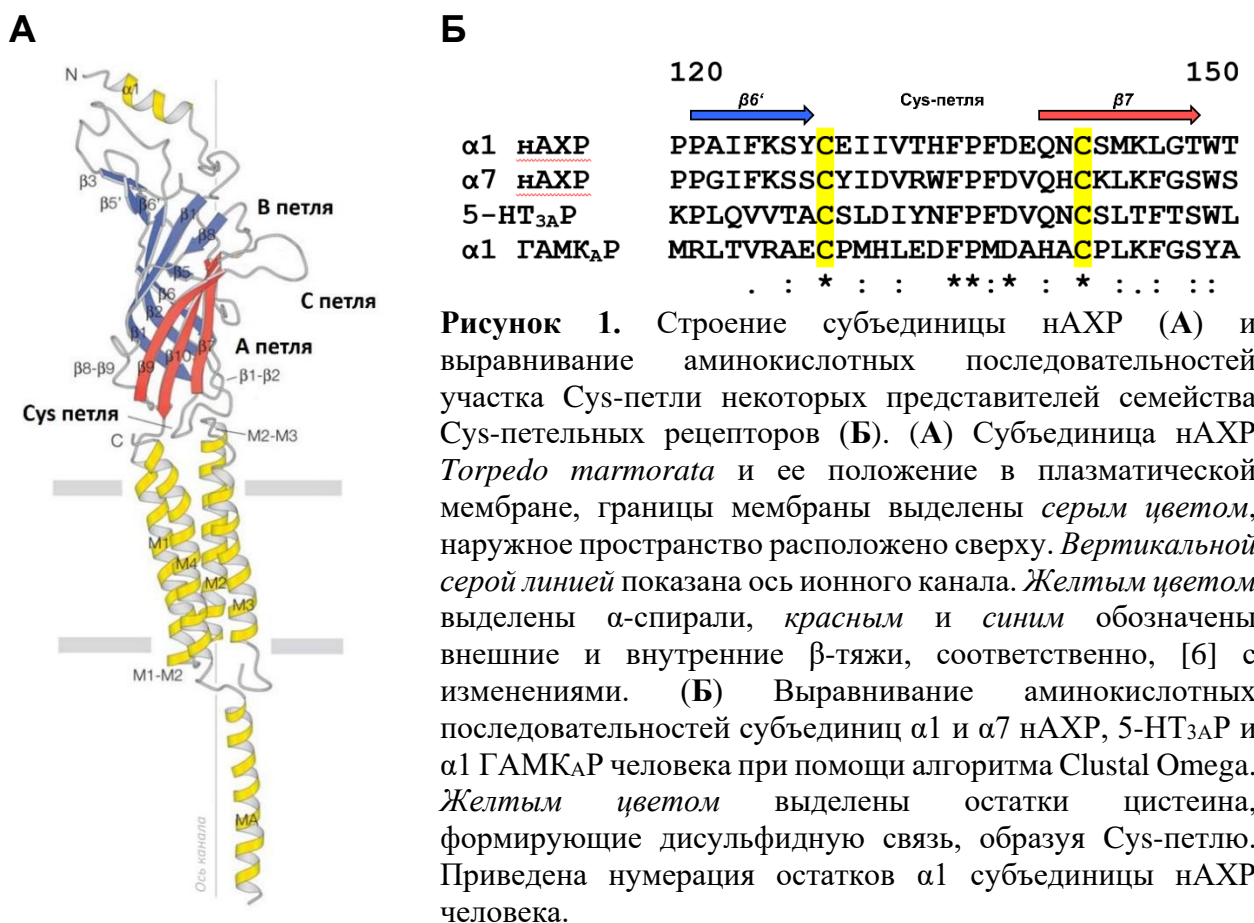
Для выполнения сформулированной цели были поставлены и реализованы следующие задачи:

1. Разработать метод кальциевого имиджинга с использованием одноволнового генетически кодируемого кальциевого сенсора Case12 для изучения специфичности $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAChR и их мутантных форм;
2. Выявить аминокислотные остатки лиганд-связывающего сайта $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAChR, 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 nAChR разных подтипов;
4. Установить характер взаимодействия новых пептидно-белковых лигандов с nAChR: баптида 2, пептидного компонента яда *Bitis arietans*, с $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAChR и панкреатической фосфолипазы A₂ с мышечным, $\alpha 7$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAChR;
5. Идентифицировать лиганды nAChR среди новых синтетических низкомолекулярных соединений: производных хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-аминов.

1. Обзор литературы

1.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР)

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) принадлежат семейству Cys-петельных рецепторов лиганд-управляемых ионных каналов. Помимо нАХР данное семейство также включает серотониновые 5-НТ₃ рецепторы (5-НТ₃Р), рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК_AР), глициновые рецепторы (ГлиР), а также многие другие [1; 2; 3; 4]. Все представители имеют общие черты строения: рецепторы состоят из пяти субъединиц, которые расположены симметрично вокруг центральной оси – ион-селективного канала в плазматической мембране клетки. В случае нАХР и 5-НТ₃Р канал проницаем для катионов Na⁺, K⁺, Ca²⁺, в то время как ГАМК_AР и ГлиР – для анионов Cl⁻. Каждая из пяти субъединиц содержит три топологических домена: N-концевой экстрацеллюлярный домен (состоящий преимущественно из β -складчатых слоев), трансмембранный домен (состоит из четырех α -спиралей (M1-4) и цитоплазматический домен, который представлен петлей, расположенной между сегментами M3 и M4 (Рисунок 1А) [5; 6].



В составе экстрацеллюлярного домена на границе с трансмембранным доменом выделяют консервативную аминокислотную последовательность из 13 остатков, которые ограничены двумя остатками цистеина, формирующими дисульфидную связь, именно эта особенность строения отражена в названии семейства Cys-петельных рецепторов (Рисунок 1Б). Cys-петля играет важную роль для сборки рецепторов [7] и участвует в механизме открытия канала [8].

В организме существует огромное разнообразие nAХР, это является следствием того, что субъединицы nAХР способны формировать пентамерные комплексы с различной комбинацией субъединиц в составе рецептора (Рисунок 2) [1]. Всего известно десять α субъединиц ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), четыре β субъединицы ($\beta 1$ - $\beta 4$), γ , δ , и ϵ субъединицы, всех их объединяет общее происхождение [9].

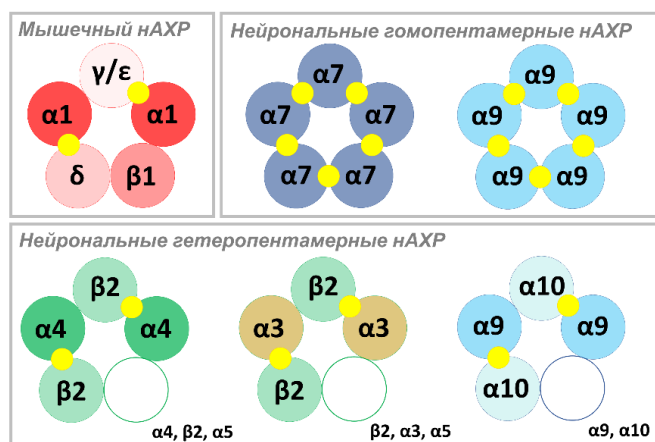


Рисунок 2. Схематическое изображение некоторых представителей nAХР. Большое разнообразие nAХР достигается благодаря комбинации различных субъединиц. На месте незакрашенных субъединиц может присутствовать любая из указанных рядом. Желтыми кружочками показаны положения ацетилхолин-связывающих сайтов.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы подразделяют на два типа: мышечные и нейрональные (Рисунок 2). Мышечный тип nAХР присутствует в постсинаптических мембранах скелетных мышц и принимает участие в мышечном сокращении. Мышечные nAХР являются гетеропентамерными, состоящими из $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ (эмбриональной) или ϵ (взрослой) субъединиц в соотношении 2:1:1:1 (Рисунок 2) [10]. Нейрональные nAХР широко представлены в центральной и периферической нервной системе, где они участвуют в холинергической нервной передаче, регулируют процессы высвобождения медиатора, возбудимости нейронов. Среди нейрональных nAХР встречаются как гомопентамерные, так и гетеропентамерные рецепторы с различной комбинацией субъединиц двух типов: α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) и β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Рисунок 2) [11].

1.1.1. Исследование структуры nAХР и других Cys-петельных рецепторов: от АЦХСБ до гетеромерного $\alpha 4\beta 2$ nAХР

Представления о структуре Cys-петельных рецепторов и механизмах связывания лиганда берут свое начало с исследований ацетилхолин-связывающего белка (АЦХСБ) моллюсков [12; 13]. АЦХСБ – это секретируемый глиальными клетками белок, который гомологичен экстрацеллюлярному лиганд-связывающему домену nAХР, при этом в АЦХСБ отсутствуют

трансмембранный и цитоплазматический домены. АЦХСБ *Lymnaea stagnalis*, *Bulinus truncatus* и *Aplysia californica* имеют только 20 – 24% сходных последовательностей с нАХР, но при этом демонстрируют высокое структурное сходство с лиганд-связывающим доменом нАХР электрического органа *Torpedo* [13; 14; 15]. Связывание агониста этими АЦХСБ изучалась различными методами, в их число входят радиолигандный анализ вытеснения ^{125}I -бунгаротоксина, поверхностный плазмонный резонанс и изотермическая калометрия титрования, при этом разные АЦХСБ демонстрировали фармакологические свойства, сходные с гомопентамерным $\alpha 7$ нАХР [14; 16]. Таким образом, АЦХСБ служит хорошей моделью для изучения лиганд-связывающих характеристик нАХР.

Прорывной работой в исследовании структуры нАХР стала работа N. Unwin, в которой удалось установить структуру нАХР электрического органа *Torpedo marmorata* с разрешением 4Å методом электронной микроскопии с дополнительной математической обработкой для увеличения разрешения (Рисунок 1А) [6]. Атомная модель позволила подробно изучить структуру целого рецептора в закрытом состоянии, впервые с такой точностью было показано строение лиганд-связывающего и внутриклеточного доменов, а также были описаны локальные перегруппировки, происходящие при связывании молекулы ацетилхолина, включающие закрытие петель В и С и поворот М2 сегмента [6; 17]. При этом на мембранносвязанном рецепторе *T. marmorata*, в отличие от АЦХСБ, было показано, что изменения в структуре рецептора при связывании агониста инициируют вращательные движения субъединиц, приводящие к открытию канала [12].

В течение долгого времени считалось, что лиганд-управляемые ионные каналы присущи только многоклеточным эукариотическим организмам, однако, благодаря анализу множества геномных последовательностей, были обнаружены гомологи лиганд-управляемых ионных каналов у некоторых представителей бактерий и у одного из родов архей – *Methanosarcina* [18]. Это открытие спровоцировало бурный интерес к изучению лиганд-управляемых каналов бактерий, и вскоре был клонирован один из гомологов цианобактерии *Gloeobacter violaceus* – GLIC, который представляет собой трансмембранный катионный канал с гомопентамерной организацией субъединиц, который открывается под действием внеклеточных протонов. Для него характерна медленная кинетика активации и отсутствие десенситизации. Сравнение его нуклеотидной последовательности с последовательностями представителей лиганд-управляемых ионных каналов эукариот показало, что у гомолога *G. violaceus* отсутствуют N-концевая спираль, типичный дисульфидный мостик и цитоплазматический домен, т.к., по всей видимости, эти структуры не играют ключевой роли в передаче сигнала у бактерий. *G. violaceus* способен к фотосинтезу и транспорту протона через цитоплазматическую мембрану, таким образом, протон-управляемый ионный канал может принимать участие в адаптации организма к

изменению pH [19]. За этим открытием быстро последовало следующее: впервые удалось получить кристаллическую структуру лиганд-управляемого ионного канала бактерии *Erwinia chrysanthemi*, ELIC, с разрешением 3,3 Å [20]. На основе знаний о пространственных структурах GLIC, ELIC и nAChR электрического органа *Torpedo* были высказаны предположения о возможных механизмах открытия ионного канала Cys-петельных рецепторов эукариот [17]. В 2007 году была опубликована кристаллическая структура экстрацеллюлярного домена $\alpha 1$ субъединицы nAChR мыши в комплексе с α -бунгаротоксином (α Bgt) с разрешением 1,94 Å. На атомарном уровне были впервые представлены важные рецепторные структуры: главный иммуногенный участок (MIR, main immunogenic region), Cys-петля и N-концевая углеводная цепь, а также было показано, что связывание молекулы α Bgt происходит с помощью обширных белок-белковых, а также белок-углеводных взаимодействий [21]. Затем была выявлена структура экстрацеллюлярного домена $\alpha 7$ химеры, в которой скомбинированы последовательности $\alpha 7$ nAChR и АЦХСБ *Lymnaea stagnalis* таким образом, чтобы последовательности, важные с точки зрения функционирования рецептора, были именно $\alpha 7$ рецептора. Структура данной химеры была разрешена в комплексе с эпibatидином (PDB 3SQ6), и были продемонстрированы молекулярные перестройки, происходящие при связывании рецептором агониста. На основании полученной структурной информации были высказаны предположения о механизме катионной селективности канала, связанной с кольцом отрицательных зарядов, располагающихся у входа в канал [22].

Следующим шагом стала идентификация структуры гомопентамерного глутамат-управляемого хлорного канала GluCl *Caenorhabditis elegans* с разрешением 3,3 Å. GluCl был кристаллизован в комплексе с ивермектином, аллостерическим агонистом, который связывается с трансмембранным доменом рецептора [23]. В данной работе впервые были продемонстрированы механизмы аллостерической регуляции работы рецептора. К сожалению, ни GLIC, ни ELIC и ни GluCl не содержат внутриклеточного домена, который присутствует в Cys-петельных рецепторах высших многоклеточных организмов. И первая кристаллическая структура рецептора, состоящего из всех трех доменов, включая внутриклеточный, была получена для гомопентамерного 5-HT_{3A}R мыши [24]. За этим открытием вскоре последовал ряд работ по выяснению структуры других представителей семейства Cys-петельных рецепторов: ГАМК_AR и ГлиR [25; 26]. ГАМК_AR человека был кристаллизован в виде $\beta 3$ гомопентамера в комплексе с агонистом бензамидином. Кристаллическая структура комплекса рецептора и агониста имела закрытое положение петли $\beta 9$ - $\beta 10$, при этом канал находился в закрытом состоянии, это был случай, когда впервые была получена кристаллическая структура лиганд-управляемого ионного канала в состоянии десенситизации [26]. Глициновый рецептор был кристаллизован как $\alpha 3$ гомопентамерный рецептор человека в комплексе со

стрихнином, впервые была получена структура лиганд-управляемого канала со связанной молекулой конкурентного антагониста: молекула стрихнина связывается в ортостерической участке, происходит смещение петли между М2 и М3, после чего М2 сегмент движется в противоположное открытому состоянию направлении, и пора закрывается, переводя рецептор в неактивное состояние [25]. Примерно в это же время (2014 г) была получена кристаллическая структура для экстрацеллюлярного домена $\alpha 9$ рецептора человека, первая атомарная структура домена нейронального nAХР. Мономер экстрацеллюлярного домена был кристаллизован в свободном и в связанном с антагонистом состоянии. Связывание мономером метилликаонитина и α Vgt проходит так же, как и в случае пентамерного рецептора, где главную роль играет основная «+» сторона ортостерического лиганд-связывающего участка. У $\alpha 9^*$ nAХР уникальным моментом в связывании агониста является взаимодействие между тяжами $\beta 7$ и $\beta 10$ с участием аминокислотных остатков T147 (присутствует только у $\alpha 9$ и $\alpha 10$) и T203 (присутствует у всех α субъединиц) [27]. И одним из последних достижений рентгенструктурного анализа в изучении представителей Cys-петельных рецепторов лиганд-управляемых ионных каналов является определение структуры $\alpha 4\beta 2$ nAХР человека, т.е. гетеропентамерного рецептора [28].

$\alpha 4\beta 2$ nAХР состоит из 5 субъединиц, расположенных в порядке α - β - β - α - β вокруг центральной оси (Рисунок 3). Для $\alpha 4\beta 2$ рецептора известно, что он может существовать в двух стехиометрических вариантах, в которых соотношение числа субъединиц $\alpha 4:\beta 2$ равно 3:2 или 2:3. $2(\alpha 4)3(\beta 2)$ nAХР в ~ 100 раз более чувствителен к ацетилхолину и никотину и менее проницаем для ионов кальция [29; 30]. Для рентгеноструктурного анализа использовался рецептор с удаленной цитоплазматической петлей между сегментами М3 и М4, при этом измененный рецептор оставался функционально-активным. $\alpha 4\beta 2$ nAХР был кристаллизован в комплексе с никотином и аналогом холестерина с разрешением 3,9 Å.

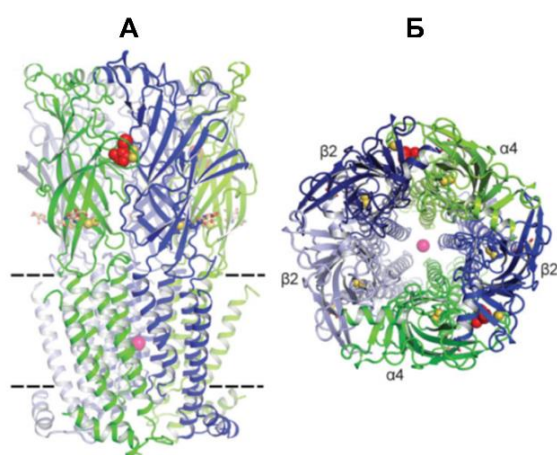


Рисунок 3. Пространственная структура $\alpha 4\beta 2$ nAХР. (А) Положение $\alpha 4\beta 2$ nAХР в плазматической мембране (пунктирная линия), вверху находится внеклеточное пространство; $\alpha 4$ субъединица окрашена в *зеленый*, $\beta 2$ – в *синий*. Шариками представлены связанный никотин (*красный*) и Na^+ (*розовый*). Дисульфидные связи в Cys-петле и петле С показаны *желтым*. (Б) вид со стороны внеклеточного пространства на пентамерный рецепторный комплекс [28].

Каждая субъединица состоит из большого экстрацеллюлярного домена, начинающегося с N-концевой α -спирали и десяти β -тяжей, формирующих сэндвич. С-концевой участок включает

в себя три трансмембранные α -спирали (M1–M3), амфипатическую внутриклеточную спираль МХ, а также последнюю трансмембранную α -спираль (M4). Спираль МХ напоминает схожую структуру в 5-НТ₃R, для которого также известна кристаллическая структура [24]. Характерная для всех представителей Cys-петельных рецепторов консервативная дисульфидная связь соединяет тяжи $\beta 6$ и $\beta 7$. Еще одна дисульфидная связь между соседними остатками цистеина находится на конце петли С $\alpha 4$ субъединицы, эта дисульфидная связь является отличительной чертой α субъединиц nAChR и отсутствует у других Cys-петельных рецепторов [10]. Молекула никотина связывается в классическом сайте связывания нейротрансмиттеров в области контакта соседних субъединиц α - β , где $\alpha 4$ субъединица формирует основную или «+» сторону участка связывания, а $\beta 2$ субъединица – комплементарную или «-» сторону. (Рисунок 3Б). В свою очередь с каждой из сторон ортостерического лиганд-связывающего участка участвуют по три петли: А, В и С с «+» стороны, и D, Е и F с «-» стороны. Аминокислотные остатки петель А–Е формируют ароматический карман вокруг молекулы никотина, где с нижней стороны участвуют остатки Y100 петли А и W57 тяжа $\beta 2$ петли D; сзади – W156 петли В и L121 тяжа $\beta 6$ петли Е; в закрытии кармана спереди участвует петля С, которая плотно прижимает лиганд, причем на конце петли С находится пара цистеиновых остатков, а остатки Y197 и Y204 непосредственно прилегают к молекуле никотина. И, наконец, сверху в образовании кармана принимают участие остатки V111 и F119 петли Е. Дополнительно к гидрофобным взаимодействиям с боковыми цепями аминокислотных остатков, молекула никотина образует водородную связь между электроположительным азотом пирролидинового кольца и карбонильным кислородом триптофанового остатка в положении 156 (W156). Атом азота пирролидинового кольца формирует катионное π взаимодействие с индольным кольцом W156. Остатки аминокислот петли F непосредственно не участвуют в связывании молекулы никотина, однако, остаток D170 петли F вероятно стабилизирует петлю С посредством водородной связи с атомом азота, образующим пептидную связь остатка C199 (Рисунок 4) [28].

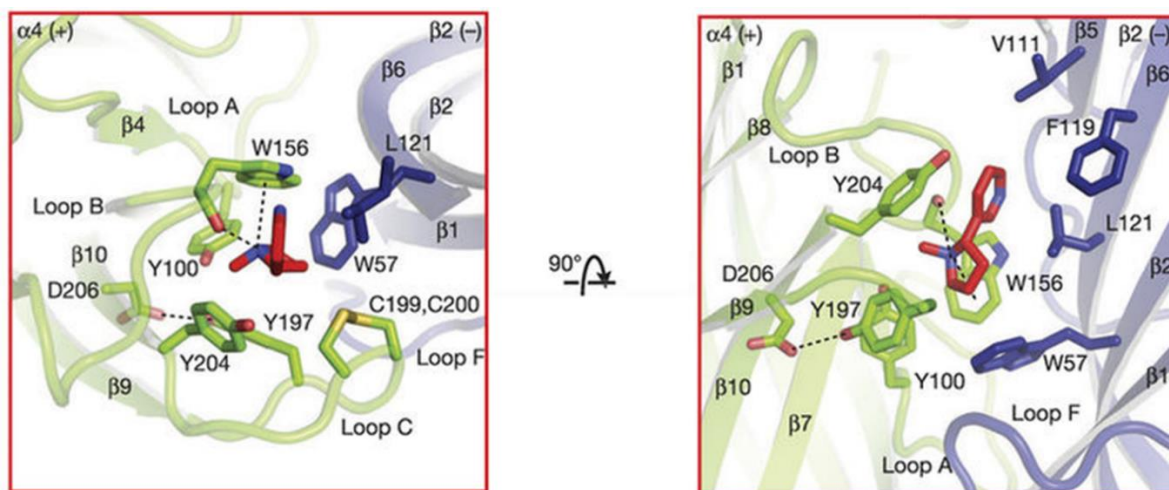


Рисунок 4. Детальная структура кармана связывания никотина $\alpha 4\beta 2$ nAChR [28].

В отличие от всех предыдущих структурных моделей Cys-петельных рецепторов рентгеноструктурный анализ $\alpha 4\beta 2$ nAХР впервые показал особенности расположения аминокислотных остатков смежных экстрацеллюлярных участков субъединиц $\beta\text{-}\beta$ и $\beta\text{-}\alpha$. Оказалось, что нестандартная ориентация остатков R149 (петля В) и Y95 (петля А), а также присутствие только одного остатка тирозина в петле С определяют невозможность связывания молекулы никотина в карманах, где «+» стороной участка связывания выступает $\beta 2$ субъединица. В то же время «-» сторона $\beta 2$ субъединицы содержит три аминокислотных остатка с гидрофобными боковыми группами в петле Е (V111, F119 и L121), если же в качестве «-» стороны служит $\alpha 4$ субъединица, то в ее петле Е остатки в этих положениях являются полярными (H111, Q119 и T121), возможно, именно это и определяет более низкое сродство к никотину рецептора со стехиометрическим составом $3(\alpha 4):2(\beta 2)$ [31]. Примечательно, что гомопентамерный $\alpha 7$ nAХР имеет два гидрофобных остатка в этих аминокислотных положениях петли Е (L111, Q119 и L121) и при этом сохраняет способность связывать молекулу никотина, хотя и с меньшей аффинностью [28].

1.1.2. Функциональные состояния nAХР

Для любого представителя nAХР известно, что рецептор может существовать в трех различных функциональных состояниях: состоянии покоя, активном и десенситизированном. В состоянии покоя ионный канал рецептора закрыт и гидрофобное кольцо препятствует прохождению катионов через канал. Связывание экстрацеллюлярным доменом рецептора молекулы агониста приводит к вращению трансмембранных сегментов M2, диаметр входа в ионный канал увеличивается и становится возможным прохождение ионов через канал [6]. После открытия канала происходит быстрая активация рецептора, продолжительность этой стадии составляет менее 1 мс. При этом происходит деполяризация плазматической мембраны и в случае нейрональных nAХР также запуск Ca^{2+} -опосредованных процессов [11]. При взаимодействии nAХР с агонистом происходят два ключевых события: 1) локальное движение в области сайта связывания; 2) ротация внутренних β -тяжей α субъединиц, движение которых передается на внутренние спирали, что вызывает открытие ворот канала [6; 32]. При длительном действии агонистов рецептор десенситизируется, т.е. продолжает связывать лиганд, но ионный канал рецептора при этом закрыт [33]. Примечательно, что для $\alpha 4\beta 2$ nAХР была получена кристаллическая структура в десенситизированном состоянии, в котором трансмембранный канал рецептора выглядит как сужающийся в направлении к цитозолю конус (Рисунок 5) [28; 34].

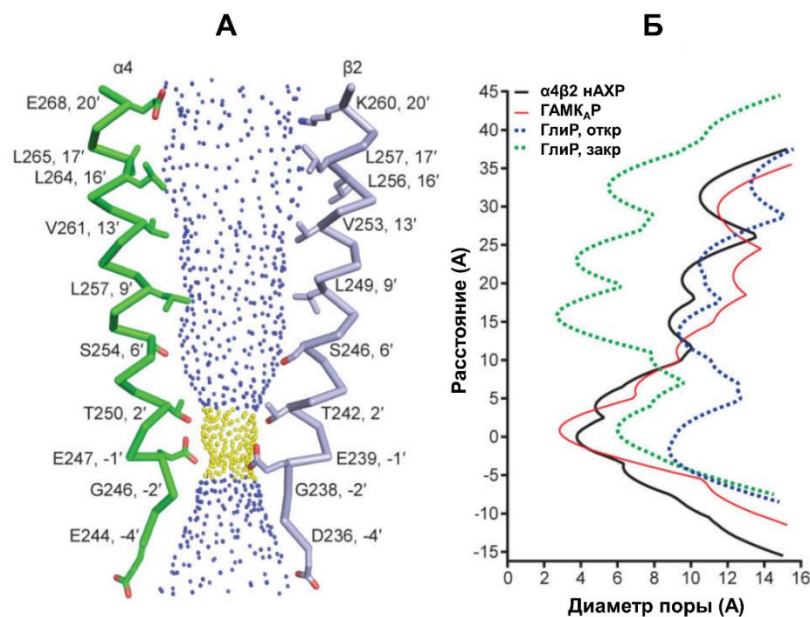


Рисунок 5. Структура ионного канала $\alpha 4\beta 2$ nAChR. (А) α -спирали М2 противоположных $\alpha 4$ и $\beta 2$ субъединиц. Показаны боковые группы аминокислотных остатков, обращенных во внутреннее пространство ионного канала. В областях, заполненных синими точками диаметр канала более 5.6 Å; желтыми – более 2.8 Å, но менее 5.6 Å. (Б) Диаметр канала $\alpha 4\beta 2$ nAChR (в десенситизированном состоянии) и других представителей семейства Cys-петельных рецепторов ГАМК_AР (в десенситизированном состоянии, PDB:4COF), ГлиР в открытом состоянии (откр) и состоянии покоя (закр) (PDB:3JAE и PDB:3JAD, соответственно) [28].

Самая узкая часть этого конуса заключена между боковыми группами остатка глутамата в положении $-1'$ α -спиралей сегментов М2, причем диаметр самого узкого участка равен 3,8 Å (Рисунок 5). $\alpha 4\beta 2$ nAChR – это неселективный катионный канал, который проницаем для ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Поверхность входа в ионный канал со стороны экстрацеллюлярной части электроотрицательна, что создает благоприятные условия для нахождения в этой области катионов. При движении вдоль канала в направлении трансмембранной части поверхность, выстилающая канал принимает нейтральный заряд. В положении 20' ионного канала боковые группы остатков глутамата $\alpha 4$ субъединиц вытесняются боковыми группами лизиновых остатков $\beta 2$ субъединиц. Именно поэтому соотношение $\alpha 4$ и $\beta 2$ субъединиц влияет на ион-селективные характеристики рецептора (рецептор с субъединичным составом 3 α :2 β более проницаем для ионов кальция [30]). Приближаясь к самому узкому участку канала, его поверхность становится все более электроотрицательной и достигается селективный фильтр рецептора, образованный боковыми группами пяти остатков глутаминовой кислоты [28].

1.1.3. Биосинтез и сборка nAChR

Сборка ионных каналов, в том числе и nAChR – это медленный и низкоэффективный процесс, в котором только 30% только что синтезированных субъединиц подвергаются

необходимым посттрансляционным модификациям, принимают правильное трансмембранное положение и, следовательно, формируют функционально активный рецептор [35; 36]. Относительно много известно о синтезе и шаперонинге мышечного nAХР. Субъединицы мышечного рецептора транслируются на рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и котрансляционно при участии транслокатора помещаются в мембрану ЭПР. Затем у новосинтезированных субъединиц отрезается сигнальная последовательность, происходит окисление дисульфидных связей и сайт-специфическое N-гликозилирование. Общие белковые шапероны ЭПР (BiP, ERp57, калнексин) принимают участие в упаковке отдельных субъединиц, сборке целого рецептора и выводе его на поверхность плазматической мембраны [36; 37; 38]. Время жизни отдельных субъединиц составляет 30 – 77 минут, оно меньше времени жизни пентамерного рецептора и продолжительности его транспортировки из ЭПР на плазматическую мембрану (90 – 120 мин). Не вошедшие в состав пентамера субъединицы не накапливаются в ЭПР, а удаляются протеолитическим комплексом – до 70% новосинтезированных субъединиц подвергаются ЭПР-ассоциированной деградации [39].

Субъединичный состав рецепторов определяет высокое разнообразие среди представителей nAХР (Рисунок 2), но механизм формирования различных типов рецепторов до конца не изучен. В свою очередь при гетерологической экспрессии достаточно легко получить функционально активные гетеромерные подтипы nAХР, но в большинстве клеточных линий невозможна правильная олигомеризация и функциональная экспрессия гомомерного $\alpha 7$ nAХР [40; 41; 42]. Выходом в этом случае является использование шаперонов, повышающих эффективную экспрессию $\alpha 7$ рецептора. У нематоды *Caenorhabditis elegans* был обнаружен белок устойчивости к ингибированию холинэстеразой-3 (Ric3, resistance to inhibitors of cholinesterase-3), который является необходимым для успешного синтеза и функционирования nAХР [43; 44; 45]. Белок Ric3 локализуется в ЭПР, в его составе выделяют N-концевой участок, трансмембранный домен и цитоплазматический C-концевой участок, содержащий один или два сверхспиральных (coiled-coil) домена [46]. Утрата белком Ric3 консервативного сверхспирального домена не влияет на его связывание с $\alpha 7$ субъединицей. Вероятно, сверхспиральные домены необходимы прежде всего для самоассоциации Ric3, такое агрегирование шаперона облегчает сборку функционально активных пентамеров $\alpha 7$ nAХР (Рисунок 6) [46].

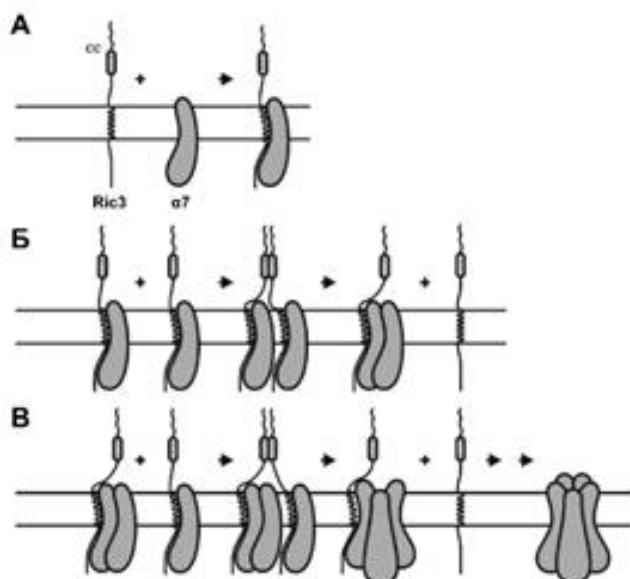


Рисунок 6. Модель сборки $\alpha 7$ nAХР при участии белка Ric3. (А) Белок Ric3 связывается с субъединицей $\alpha 7$. (Б) Ассоциация молекул Ric3 с помощью сверхспиральных доменов (CC, coiled-coil) сближает субъединицы $\alpha 7$ nAХР, облегчая их димеризацию. Затем одна из двух молекул Ric3 уходит из комплекса. (В) Формирование тримера $\alpha 7$ субъединиц путем объединения комплекса димера $\alpha 7$ субъединиц и Ric3 с другой субъединицей $\alpha 7$, связанной с Ric3. Повторение этих циклов приводит к формированию пентамерного рецептора [46].

Для эффективной сборки рецептора шаперон Ric3 должен присутствовать в количестве одной молекулы на каждую субъединицу $\alpha 7$ [46]. При высоком уровне экспрессии Ric3 способен к самоагрегации через взаимодействия сверхспиральных доменов, в таких случаях затруднено эффективное взаимодействие между Ric3 и $\alpha 7$ субъединицей, и, следовательно, эффективность сборки пентамерных рецепторов в ЭПР снижается [47]. Было показано, что при трансфекции клеток соотношение 1:1 (ДНК Ric3 и $\alpha 7$ субъединицы) является оптимальным [48]. Ric3 увеличивает экспрессию $\alpha 7$ субъединицы в ооцитах *X. laevis* и в линиях клеток млекопитающих HEK293, CHO и SHE-P1 [49].

В головном мозге распределение $\alpha 7$ субъединиц коррелирует с распределением белка Ric3. Но эта взаимосвязь не наблюдается в мозжечковых клетках Пуркинье, в которых присутствует экспрессия $\alpha 7$ рецептора, но экспрессия белка Ric3 находится на достаточно низком уровне. Помимо этого, белок Ric3 детектируется в мозолистом теле и гипофизе, где не наблюдается высокая экспрессия $\alpha 7$ nAХР. Эти противоречия, возможно, свидетельствуют о существовании альтернативного механизма созревания $\alpha 7$ nAХР в организме [50]. Присутствие белка Ric3 не является необходимым и достаточным условием для эффективной сборки $\alpha 7$ nAХР в клетках млекопитающих [42; 51]. Другой трансмембранный белок, NASНО, был обнаружен у человека, он является резидентом ЭПР, и также обладает способностью усиливать сборку функциональных $\alpha 7$ рецепторов. Удаление NASНО-кодирующего гена приводит к отсутствию функциональной экспрессии $\alpha 7$ nAХР во всех областях головного мозга. При гетерологической экспрессии NASНО в клетках линии HEK293 было показано, что он не влияет на общее количество $\alpha 7$ рецепторов в клетках, но, в отличие от белка Ric3, значительно повышает успешную транспортировку рецептора на плазматическую мембрану [52].

1.1.4. Лиганды nAХР

Агонисты

Агонисты связываются в ортостерическом участке лиганд-связывающего домена, инициируя серию небольших конформационных перестроек, которые переводят рецептор из состояния покоя в состояние открытого канала. С точки зрения одного рецептора, полными агонистами являются соединения, которые в насыщающей концентрации активируют рецептор, индуцируя полное открытие канала (P_{open} , 100% вероятность открытого канала = канал находится в открытом состоянии в течение всего времени измерения). Ацетилхолин и никотин активируют $\alpha 4\beta 2$ nAХР с величиной P_{open} больше, чем 80% [53]. В отличие от полных агонистов, частичные агонисты в максимальной эффективной концентрации способны активировать рецептор в меньшей степени. И поскольку частичные агонисты связываются с тем же участком рецептора, что и полные агонисты, они способны конкурентно ингибировать ответы рецептора на действие молекул полных агонистов [54]. Ключевое различие между частичными и полными агонистами заключается в том, что частичные агонисты не способны самостоятельно инициировать открытие канала в той же степени, что и полные агонисты [55]. Стоит иметь в виду, что поведение лиганда как полного или частичного агониста зависит также от вида рецептора: существует несколько примеров таких соединений, которые являются полными агонистами для одного подтипа nAХР и выступают в роли частичного агониста для другого подтипа.

Агонисты nAХР довольно разнообразная группа соединений, в их число входят как природные соединения растительного и животного происхождения, а также синтетические молекулы. Ниже представлены известные лиганды nAХР, которые были использованы в данном исследовании. Функциональную активность новых лигандов тестируют при помощи регистрации электрических токов ооцитов *X. laevis* или клеток млекопитающих, в которых экспрессируют рекомбинантные субъединицы nAХР. Тестирование новых соединений в нативных системах затруднено в связи с тем, что в состав nAХР могут входить разные субъединицы и субъединичный состав рецептора скорее всего неизвестен. Сложность анализа также заключается в том, что приходится детектировать ионный ток через быстродесенситизирующийся рецептор, эта проблема наиболее остра для $\alpha 7$ nAХР. Для вычисления действующего диапазона концентраций вещества используют данные об амплитуде ионных токов в ответ на действие агониста (в присутствии или отсутствии антагониста или модулятора) в различных концентрациях. Величина EC_{50} отражает эффективную концентрацию агониста, при которой достигается амплитуда ответа, равная половине (50%) от максимального значения. Иногда (особенно в случае очень быстродесенситизирующихся рецепторов) значение EC_{50} вычисляют не на основе данных об амплитуде пикового тока, а подсчитывают площадь

участка графика, расположенного под кривой тока [56]. Для медленно десенситизирующихся рецепторов (например, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3\beta 4$) эти два метода подсчета, приводят к приблизительно одинаковым значениям EC_{50} и коэффициентам Хилла [57].

Большинство известных классических агонистов не являются специфичными в отношении разных типов nAХР: они способны активировать (с некоторыми исключениями в случае $\alpha 9^*$ nAХР), рецепторы с разной степенью эффективности. Если обобщить данные о способности активации агонистов различных типов nAХР, то можно расположить их в порядке от наибольшей активности к наименьшей: Эпibatидин > Анатоксин А > Никотин = Цитизин \geq Ацетилхолин > Карбамоилхолин [11].

Ацетилхолин (АЦХ) – эндогенный агонист, которых активировать все подтипы nAХР (Рисунок 7). В опытах с nAХР этот лиганд используется очень часто (рабочая концентрация порядка 100 μ М). Молекула АЦХ может подвергаться гидролизу, в результате чего образуется молекула холина. Интересно, что холин является селективным агонистом $\alpha 7$ nAХР ($EC_{50} = 1,6$ мМ; это меньше, чем EC_{50} АЦХ (130 μ М)). Дополнительно, холин является частичным агонистом для $\alpha 3\beta 4^*$, а также антагонистом некоторых гетеромерных nAХР [58; 59].



Рисунок 7. Классические агонисты nAХР.

Интересно, что АЦХ синтезируется практически всеми клетками млекопитающих, большинство из которых не имеет отношения к нейрональным клеткам, также АЦХ вырабатывается у организмов, у которых нервная система отсутствует вовсе, например, у растений, простейших и бактерий. Таким образом, АЦХ является чрезвычайно древней сигнальной молекулой [60]. Одним из примеров роли АЦХ вне центральной нервной системы, является АЦХ, синтезируемый эндотелиальными клетками, который способен связываться с мускариновыми рецепторами М1 и М3 и активировать эндотелиальную синтазу оксида азота, которая увеличивает выброс NO в полость кровеносного сосуда [61].

Сайт связывания АЦХ (как классического агониста) расположен в экстрацеллюлярном домене в области контакта соседних субъединиц (Рисунок 2; Рисунок 3Б), где в образовании основной стороны сайта принимает участие α субъединица, а в формировании комплементарной – другая α или β субъединица. Таким образом, гомопентамерный рецептор $\alpha 7$ имеет пять ацетилхолин-связывающих сайтов, а гетеромерные рецепторы, как правило, имеют два сайта связывания. В последствии были идентифицированы дополнительные сайты связывания АЦХ,

которые назвали неклассическими сайтами (unorthodox sites), в их число входят сайты, образованные $\alpha 4/\alpha 4$, $\alpha 5/\alpha 4$, $\beta 3/\alpha 4$ и $\alpha 4/\alpha 5$ субъединицами [62].

(±)-Эпибатидин (ЭПИ) – высокоэффективный неселективный агонист nAХР. Впервые ЭПИ был выделен из кожных экстрактов амазонских лягушек *Epidobates tricolor*, и, как агонист nAХР, является высокоэффективным неопиоидным анальгетиком при нейропатической боли. ЭПИ имеет большую аффинность к гетеромерным nAХР, включая $\alpha 4\beta 2$. Этот бициклический алкалоид (состоящий из азабициклопептановой структуры, объединенной с хлоропиридиловым мотивом) является наиболее активным никотиновым агонистом. Оба энантиомера одинаково активны. ЭПИ связывается с различными nAХР (кроме $\alpha 9$ и $\alpha 9\alpha 10$) в субмикромольном диапазоне концентраций [63]. ЭПИ способен связываться и с другими рецепторными мишенями, такими как опиоидные, мускариновые, адренергические, дофаминовые рецепторы и ГАМК_AР, однако в отношении этих рецепторов его агонистическая активность крайне низка [64; 65; 66]. Анальгетические свойства *in vivo*, объясняются эффектом ЭПИ, наблюдаемом в области голубого пятна (*locus coeruleus*) ствола мозга [67].

(-)-Никотин (НИК) – агонист, который активирует все подтипы nAХР, за исключением рецепторов, содержащих $\alpha 9$ субъединицу ($\alpha 9^*$ nAХР блокируются под действием никотина) [68]. Это природный алкалоид, синтезируемый некоторыми растениями Семейства Пасленовые (*Solanaceae*). Он является мощным природным репеллентом и инсектицидом, содержание никотина в растениях табака достаточно высоко и составляет 0,6 – 3,0% от сухого веса растения [69]. НИК связывается с высокой аффинностью с $\alpha 4\beta 2$ nAХР ($K_i \sim 0.6-10$ нМ) [70] и активирует другие нейрональные nAХР (значение EC_{50} лежит в микромолярном диапазоне концентраций) [63]. Никотин легко проходит через гематоэнцефалический барьер, и его фармакокинетика и метаболизм хорошо изучены [71; 72; 73]. Первичный метаболит НИК – (-)-котинин имеет более длительный период полураспада (15 – 19 часов), чем НИК (2 – 3 часа) [74], демонстрирует слабую агонистическую активность в отношении некоторых подтипов nAХР ($\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 3/\alpha 6\beta 2^*$) [75], а также стимулирует высвобождение дофамина в стриатуме [76] и норадреналина в хромаффинных клетках [77].

Антагонисты

Антагонисты – это вещества, блокирующие работу рецептора. Ряд антагонистов связываются в области ацетилхолин-связывающих сайтов, такие антагонисты называются конкурентными. В свою очередь, неконкурентные антагонисты связываются с рецептором в любом другом участке. Множество известных антагонистов nAХР являются природными токсинами, как растительного так и животного происхождения [78]. Большинство этих природных соединений – неконкурентные антагонисты, а среди ограниченного числа природных

конкурентных антагонистов хотелось бы выделить ряд соединений, используемых в качестве инструментов для детекции нАХР: α -бунгаротоксин (α Bgt, антагонист $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$), α -кобротоксин (α Ctx, антагонист $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$) и множество конотоксинов (например, α -конотоксины ImI, MII, PnIA, BuIA, ArIV и т.д.), которые селективны в отношении $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ или $\alpha 7$ нАХР [79].

В связи с тем, что конкурентные агонисты взаимодействует с ортостерическим участком или с участком в непосредственной близости от него, то, в теории, высокие концентрации агониста должны предотвращать связывание рецептором конкурентных антагонистов. Поэтому, в присутствии конкурентного антагониста концентрационная кривая ответов рецептора на агонист должна параллельно смещаться вправо (если на оси абсцисс представлены значения $\log_{10}(C, M)$, где C – это концентрация вещества в молях (M)) (Рисунок 8А). Также судить о конкурентном характере связывания антагониста можно по увеличению значения IC_{50} (эффективной концентрацией антагониста, способной ингибировать агонист-индуцированный ответ на 50%) при увеличении концентрации агониста.

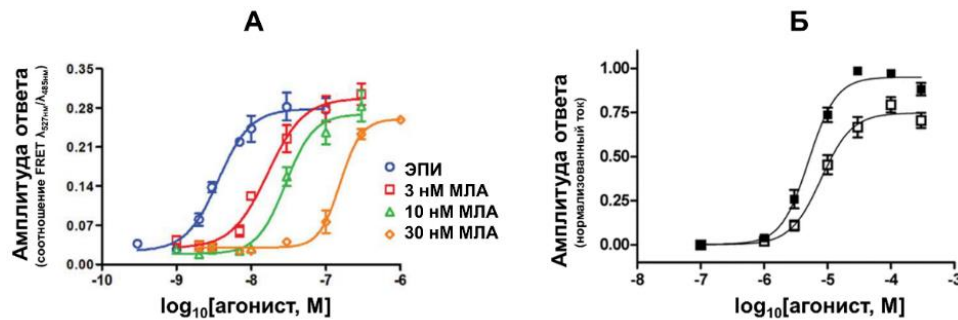


Рисунок 8. Конкурентный (А) и смешанный (Б) механизмы ингибирования агонист-индуцированных ответов под действием антагонистов. (А) Ингибирование эпилептидин (ЭПИ)-индуцированных ответов, опосредованных активацией $\alpha 7$ нАХР, под действием различных концентраций метилликаконитина (МЛА) [80]. (Б) Ингибирование ацетилхолин-индуцированных ответов (■), опосредованных активацией $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР, под действием 10 μ M *d*-тубокурарина (□) [81].

В последнее время для все большего числа соединений становится известно, что их взаимодействие с рецептором может не ограничивается только связыванием с ортостерическим участком, также некоторые лиганды могут атаковать другие сайты (аллостерические). Например, *d*-тубокурарин и некоторые другие недеполяризующие нервно-мышечные блокирующие агенты способны связываться и с орто-, и с аллостерическими участками [81; 82]. В присутствии такого антагониста концентрационная кривая для агониста также смещается вправо, но при этом наблюдается снижение амплитуды максимального ответа (Рисунок 8Б).

α -Нейротоксины ядов змей относятся к числу трехпетельных токсинов, они являются конкурентными антагонистами нАХР, т.е. они связываются с ортостерическими участками рецептора. В структуре всех представителей трехпетельных токсинов ядов змей можно

обозначить следующие особенности: это небольшие β -структурные белки, состоящие из трех петель, выступающих из компактного ядра, стабилизированного дисульфидными связями (Рисунок 9А).

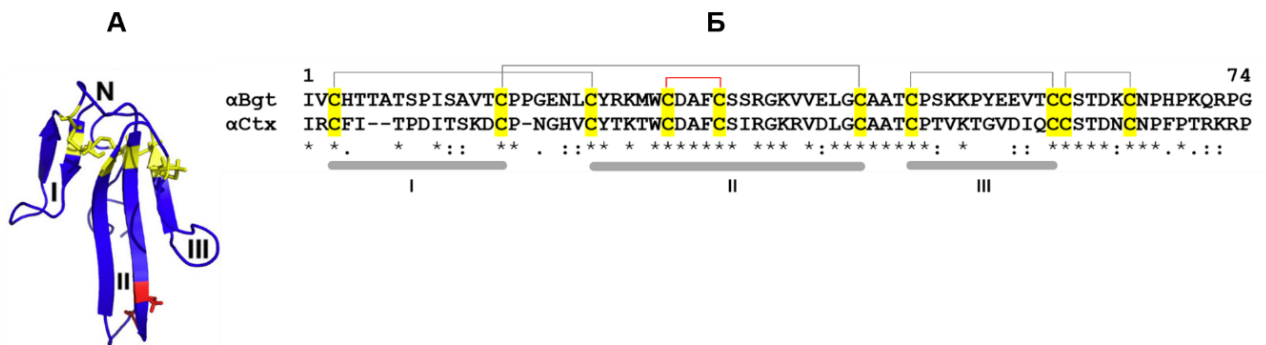


Рисунок 9. Особенности структуры α -нейротоксинов яда змей. (А) Пространственная структура α -бунгаротоксина, α Bgt (PDB 1KFH) [83]. (Б) Выравнивание аминокислотных последовательностей α -бунгаротоксина, α Bgt (PDB 1KFH) и α -кобратоксина, α Ctx (PDB 1CTX) при помощи алгоритма Clustal Omega. Нумерация остатков по α Bgt (PDB 1KFH). Петли пронумерованы римскими цифрами. Желтым указаны остатки цистеина, формирующие дисульфидные связи, дополнительная дисульфидная связь, характерная для длинноцепочечных α -нейротоксинов, обозначена красным.

Трехпетельные токсины разделяются на короткоцепочечные (содержат 60 – 62 аминокислотных остатков и 4 дисульфидные связи) и длинноцепочечные (содержат 66 – 75 аминокислотных остатков и 5 дисульфидных связей), они способны атаковать множество мишеней, в том числе nAHP [84]. И α Bgt, выделенный из яда южнокитайского многополосного крайта, *Bungarus multicinctus*, и α Ctx, компонент яда тайландской кобры *Naja naja kaouthia*, как типичные представители длинноцепочечных нейротоксинов трехпетельных белков, содержат дополнительную дисульфидную связь в петле II (Рисунок 9, красный), именно эта особенность обуславливает способность токсинов связываться с нейрональными nAHP [83].

В экспериментах по ядерно-магнитному резонансу, рентгенструктурному анализу и компьютерному моделированию было показано, что главную роль в связывании α Bgt рецептором играет рецепторная петля С, которая взаимодействует с петлями α Bgt I и II, при этом петля С принимает открытое положение. α Bgt формирует катионное π взаимодействие с Y190 или Y184 петли С (нумерация субъединицы $\alpha 1$ *Torpedo* или $\alpha 7$ nAHP, соответственно) [85]. Взаимодействие α Bgt с рецептором характеризуется очень медленной кинетикой связывания и диссоциации, поэтому в лабораторной практике для достижения полной блокады рецептора под действием наномолярных концентраций α Bgt (например, 10 нМ) необходима продолжительная стадия преинкубации длительностью до часа, но увеличив концентрацию антагониста в 10 или даже 100 раз, время преинкубации можно сократить. При этом, даже при использовании высоких концентраций α Bgt сохраняется специфичность его действия: т.к. токсин в микромолярном диапазоне концентраций не блокирует другие nAHP, в частности нейрональные гетеромерные

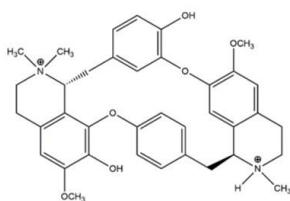
подтипы. Очень медленная кинетика диссоциации (особенно в случае мышечного рецептора) означает, что в течение отмывки рецептора блокирующий эффект сохраняется на определенное время [11]. Флуоресцентно меченные производные α Bgt и α Ctx широко используются для детекции экспрессии nAХР [86].

Использование α -нейротоксинов не ограничивается только лабораторной практикой, так, например, действуя на $\alpha 7$ рецептор, α Ctx рассматривается в качестве лекарственного соединения при легочной карциноме [87] и препарата при множественном склерозе [88], а также α Ctx имеет антиноцицептивный эффект у крыс с нейропатической болью [89; 90]. Причем эффект α Ctx более длительный по сравнению с морфином и обусловлен действием α Ctx не только на холинергическую, но и на серотонергическую системы [91].

d-Тубокурарин (*d*-ТС) – классический неселективный антагонист nAХР (Рисунок 10), продукт растительного происхождения, синтезируется южноамериканским кустарником *Chondodendron tomentosum*.

***d*-тубокурарин**

Рисунок 10. Структура *d*-тубокурарина, антагониста nAХР.



История исследования *d*-ТС начинается с обнаружения его, как главного действующего компонента яда, используемого южноамериканскими племенами для обработки наконечников стрел для эффективной охоты [92]. Это открытие спровоцировало поиск рецепторных мишеней действия *d*-ТС. Впервые *d*-ТС был выделен Гарольдом Кингом в 1935 г [93], и в дальнейшем, в середине XX века широко использовался в хирургической практике в качестве мышечного релаксанта. Однако, использование *d*-ТС в операциях приводило к развитию у пациентов большого числа побочных эффектов, в число которых входят неблагоприятное действие на кровяное давление и сердечно-сосудистую систему [94].

У мышечного nAХР существует два ортостерических сайта, которые различаются способностью связывать *d*-ТС: аффинность к сайту α - ϵ (или α - γ) выше, чем к α - δ [95]. *d*-ТС в наномолярном диапазоне концентраций способен блокировать мышечный nAХР ($IC_{50} = 19$ нМ), в то время как нейрональные nAХР он ингибирует в микромолярных концентрациях (значение IC_{50} лежит в диапазоне 2 и 20 μ М). Интересно, что *d*-ТС блокирует разные типы nAХР различным способом: ингибирование $\alpha 4\beta 2$ рецепторов происходит конкурентным способом, в то же время для мышечного и $\alpha 3\beta 4$ наряду со связываем с ортостерическим участком возможно связывание и с другими участками, и механизм ингибирования более сложный [57]. *d*-ТС с высокой аффинностью связывается с АЦХСБ, и методом рентгеноструктурного анализа была получена

структура этого комплекса: *d*-ТС способен принять три различные ориентации в процессе связывания с ортостерическим участком рецептора [96]. Возможно, такая гибкость молекулы *d*-ТС позволяет ему также связываться с другими мишенями из числа Cys-петельных рецепторов: *d*-ТС является эффективным антагонистом серотониновых 5-HT₃ рецепторов (IC₅₀ равно 13 нМ или 1,8 мМ для рецепторов мыши или человека, соответственно) [97; 98]. Более высокие концентрации *d*-ТС также блокируют ГАМК_A рецептор [99].

Аллостерические модуляторы

Переходы между состояниями покоя и активации рецептора могут происходить спонтанно, однако, это происходит крайне редко, т.к. для осуществления этого перехода необходимо преодолеть энергетический барьер. Аллостерические модуляторы представляют класс молекул, которые связываются вне классического лиганд-связывающего участка и изменяют энергетические характеристики перехода между функциональными состояниями рецептора. При связывании молекулы позитивного аллостерического модулятора (ПАМ) происходит снижение энергетического барьера перехода от состояния покоя в состояние активации, при этом также возможно повышение энергетического барьера перехода от активации к десенситизации. Связывание молекулы модулятора в аллостерическом участке также может повышать энергетический барьер между состояниями покоя и активации, следовательно, уменьшать величину агонист-индуцированного ответа. Такие молекулы называют негативными аллостерическими модуляторами (НАМ) [69].

Присутствие ПАМ изменяет форму концентрационной кривой: ее наклон и максимальную амплитуду ответа. Существует два механизма действия ПАМ, обозначаемые как ПАМ I и II типа (Рисунок 11), в качестве примеров таких ПАМ для $\alpha 7$ nAHP могут служить NS-1738 [100] и PNU120596 [101], соответственно. PNU120596 является наиболее хорошо изученным ПАМ, подробная информация о нем будет представлена в разделе 1.2.2. Известны ПАМ и для других nAHP: например, для галантамина, ингибитора ацетилхолинэстеразы, известно, что он модулирует $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 4$ и $\alpha 7$ рецепторы [102; 103]. Эндогенный стероид 17 β -эстрадиол также усиливает ответ $\alpha 4\beta 2$ nAHP путем прямого связывания с рецептором [104].

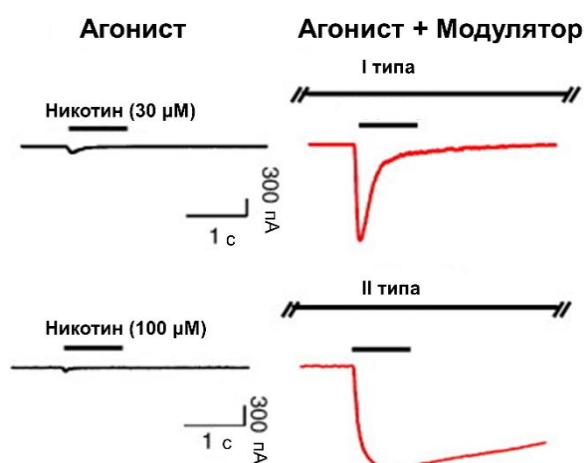


Рисунок 11. Действие ПАМ I и II типа. В качестве примера представлено действие на $\alpha 7$ нАХР: ПАМ I типа увеличивает амплитуду агонист-индуцированного ответа, ПАМ II также уменьшает десенситизацию рецептора [69].

Обнаружение эндогенного белка Lunx1, который структурно напоминает трехпетельные α -нейротоксины змей и способен взаимодействовать с нейрональными нАХР [105], подтолкнуло ученых к поиску других эндогенных соединений, которые бы выступали в роли лигандов, регулирующих передачу нервного сигнала в центральной нервной системе. Вскоре был обнаружен другой эндогенный пептид, также структурно напоминающий α -нейротоксины, SLURP-1, он секретируется кератиноцитами и действует как аллостерический модулятор для нАХР [106]. Одной из возможных ролей SLURP-1 является поддержание эпидермального гомеостаза, и мутация в последовательности этого пептида приводит к развитию кожного заболевания Mal de Meleda [107].

Критерии поиска новых лигандов нАХР

Одновременно с прогрессом в понимании фармакологии нАХР и роли нАХР при развитии заболеваний наблюдается растущий интерес к нАХР в качестве молекулярных мишеней целого ряда заболеваний. Однако, несмотря на столь пристальное внимание со стороны научного сообщества в течение последних лет, с 1950-х годов, когда было утверждено применение антагониста нАХР, мекамиламина, для лечения гипертонии [108], единственное соединение – варениклин, частичный агонист $\alpha 4\beta 2$ нАХР, используется на практике для отказа от курения [109]. Главная причина столь малочисленного списка лигандов нАХР, используемых для лечения различных заболеваний – высокий риск появления побочных эффектов и низкая клиническая эффективность, которые могут быть следствием того, что нАХР, не является единственной мишенью для лечения заболеваний, а также исследуемые лиганды могут обладать недостаточной активностью или селективностью в отношении различных подтипов нАХР. Наиболее часто среди побочных эффектов, возникающий при терапии лигандами нАХР, встречаются нежелательные действия на пищеварительную и центральную нервную системы, а также, в случае никотиноподобных соединений, и на сердечно-сосудистую систему. Также, если препарат подвергается

метаболизму, необходимо учитывать возможное влияние и эффективность промежуточных соединений [69].

Активность, селективность и фармакокинетический профиль соединения определяют его эффективность и возможные побочные эффекты. Терапевтические дозы напрямую зависят от активности вещества и его фармакокинетических характеристик. Оценить селективность соединения можно, сравнив его способность связываться (значение K_i) с целевым рецептором и с другими подтипами рецепторов. Значения K_i обычно варьируют от нМ до μ М концентраций. Но для функциональной активации рецептора необходимо определенное количество соединения, чаще из микромолярного диапазона концентраций. Эффективную концентрацию соединения отражает величина EC_{50} или IC_{50} [69]. В экспериментах по связыванию необходимо учитывать, что высокое сродство к рецептору фиксируется в его десенситизированном состоянии, т.к. в ходе эксперимента происходит продолжительная инкубация рецептора с агонистом. Поэтому, как правило, значение EC_{50} на 1 – 3 порядка выше, чем значение K_i . Эта разница наибольшая для $\alpha 4\beta 2$ nAХР. Значения EC_{50} для разных подтипов nAХР могут быть более одинаковыми, в отличие от K_i . И поиск высокоселективных агонистов для различных представителей nAХР является особенно актуальным [11].

Тестирование потенциальных лигандов nAХР осуществляется на гетерологически экспрессированных рецепторах в ооцитах *X. laevis* или клеточных линиях млекопитающих (например, HEK293). Наиболее популярны электрофизиологические методы анализа, но они являются весьма трудоёмкими, поэтому разработка альтернативных методов тестирования для скрининга лигандов nAХР также является актуальной.

1.1.5. Кальциевый имиджинг – удобный метод тестирования специфичности nAХР

nAХР являются лиганд-управляемыми ионными каналами, проницаемыми для ионов кальция, поэтому метод кальциевого имиджинга, в котором проводится регистрация изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция, вызванного действием агонистов, рассматривается как альтернатива электрофизиологическим методам анализа специфичности nAХР. В основе кальциевого имиджинга лежит использование кальциевых сенсоров различной природы. Исторически первым в этой роли использовался белок экворин, связывание ионов кальция приводит к люминесценции этого белка [110]. Очищенный белок, выделенный из медузы *Aequorea aequorea*, напрямую инъецировался в мышечное волокно усонного рака *Balanus nubilus* для регистрации изменений концентрации ионов кальция при сокращении *in vivo* [111; 112].

В настоящее время для регистрации изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция в клеточных линиях с гетерологической экспрессией кальций-проводящих рецепторов используются как низкомолекулярные сенсоры (Fura-2, Fluo-3, Fluo-4), так и генетически-кодируемые кальциевые индикаторы (GECIs, genetically encoded calcium indicators) двух типов. В основе GECIs I типа лежит Фёрстеровский перенос энергии (FRET) между двумя хромофорами (например, CFP/YFP и BFP/GFP), соединенными с кальмодулином (CaM) и CaM-связывающим пептидом M13 киназы легкой цепи миозина. В число таких сенсоров входят Cameleon и FIP-SB_{SM}. Существует также группа сенсоров, например, сенсоры TN-L15, TN-XL, TN-XXL, у которых чувствительный к ионам кальция мотив CaM заменен на тропонин С. GECIs II типа представляют собой флуоресцентные белки с измененной последовательностью структурных элементов (cpFP, circular permuted fluorescent protein), к N- и C-концу которых присоединены пептид M13 и CaM. Примерами одноволновых GECIs являются Pericam, GCaMP, Case12, Case16 [112; 113; 114; 115].

Наиболее популярным соединением среди низкомолекулярных индикаторов, используемых при кальциевом имиджинге для тестирования специфичности гетерологически экспрессированных nAHP в клеточных линиях млекопитающих, является Fluo-4 [116; 117]. Также была показана применимость метода кальциевого имиджинга с Fluo-4 для тестирования специфичности мутантных форм мышечного $\alpha 1\beta\epsilon\delta$ nAHP [117]. Однако, высокая стоимость кальциевых индикаторов, ограниченный срок хранения, необходимость добавления цитотоксического агента пробенецида, а также длительный этап загрузки клеток перед проведением кальциевого имиджиги являются существенными недостатками использования Fluo-4, как и других низкомолекулярных индикаторов. Обойти данные проблемы в кальциевом имиджинге можно используя GECIs. Один из GECIs, TN-XXL лег в основу создания детекторных систем CNiFER (cell-based neurotransmitter fluorescent engineered reporter), заключающихся в получении клеточных линий со стабильной экспрессией различных рецепторов (мускариновых АХР, nAHP и 5-HT₃P) и вышеупомянутого кальциевого индикатора [80; 118; 119]. Создание таких клеточных линий со стабильной экспрессией отдельных nAHP, в том числе и их мутантных форм, весьма трудоемкий процесс. К тому же, лабораторное оборудование для детекции флуоресценции должно быть приспособлено к работе с кальциевыми индикаторами на основе FRET. Поэтому при разработке кальциевого имиджинга для скрининга специфичности мышечного $\alpha 1\beta\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP, а также их мутантных форм нами было решено использовать одноволновый коммерчески доступный GECI на основе cpFP – сенсор Case12. Детектировать флуоресценцию Case12 при изменениях внутриклеточной концентрации ионов кальция можно на микроскопе или планшетном флуориметре со стандартной комбинацией фильтров для детекции флуоресценции GFP. На момент создания сенсор Case12 имел ряд преимуществ перед

другими существующими одноволновыми генетически-кодируемыми кальциевыми сенсорами, такими как GCaMP1.6, GCaMP2 и Flash-Pericam: Case12 обладает высокой интенсивностью свечения при связывании ионов кальция, имеет широкий динамический диапазон и высокую рН стабильность ($pK_a = 7,2$ (рН, при котором интенсивность флуоресценции сенсора составляет 50%). Аффинность сенсора Case12 к ионам кальция ($K_d = 1 \mu M$) удовлетворяет требованиям к тестированию в физиологических условиях: в большинстве эукариотических клеток концентрация ионов кальция варьирует от $0,1 - 0,2 \mu M$ до единиц μM [114]. В ранее опубликованных работах представлено применение сенсора Case12 для изучения кальциевого сигналинга и метаболической активности клеток [120; 121], в том числе и раковых [122]; исследования функций астроцитов в регуляции дыхания и кровяного давления [123; 124; 125]; а также изучения процесса движения митохондрий в нейронах [126; 127].

Использование GECIs на основе *srFP* – это одна из последних тенденций в тестировании лиганд-управляемых ионных каналов, гетерологически экспрессированных в клеточных линиях мелкопитающих. Ранее уже было показано успешное применение модифицированного сенсора GCaMP3 ($pK_a = 6,97$; $K_d = 0,41 \mu M$) для тестирования потенциальных лигандов глутаматных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), экспрессированных в клетках линии НЕК293 [128]. Представленный в данной диссертации метод кальциевого имиджинга с Case12 фактически является первым методом кальциевого имиджинга с использованием GECI на основе *srFP* для скрининга специфичности мышечного $\alpha 1\beta\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP. Также в работе показана применимость метода для тестирования мутантных форм этих рецепторов. Усовершенствование сенсоров из группы GCaMP путем направленного мутагенеза привело к созданию целой группы новых сенсоров, объединенных в семейства GCaMP5 и GCaMP6, у которых расширен динамический диапазон по сравнению с предыдущими GCaMP [129; 130]. В 2018 году была опубликована работа [131], в которой используется сенсор GCaMP5G ($pK_a = 6,96$; $K_d = 0,46 \mu M$ [129]) для регистрации динамики концентрации ионов кальция в клетках PC12 при модуляции $\alpha 7$ nAHP. В наших экспериментах мы не заметили каких-либо недостатков использования Case12 для регистрации изменения концентрации ионов кальция в клетках, а коммерческая доступность и низкая стоимость сенсора (вектор для экспрессии Case12 в клетках млекопитающих), Евроген, Россия; <http://evrogen.ru/products/Case12/Case12.shtml>) по сравнению с конкурентами (например, GCaMP5 и GCaMP6; аденоассоциированный вирусный вектор, Vigene Biosciences, США; <https://www.vigenebio.com/product/AAV-biosensors/GCaMP/>) является несомненным преимуществом Case12.

1.2. Отдельные представители nAChR

1.2.1. Мышечный nAChR

Строение мышечного nAChR

Мышечный nAChR млекопитающих состоит из двух $\alpha 1$, одной $\beta 1$, одной δ и одной ϵ (взрослая форма рецептора) или γ (эмбриональная форма) субъединиц. Два ортостерических сайта связывания располагаются между субъединицами $\alpha 1$ - ϵ и $\alpha 1$ - δ (Рисунок 2) [6]. В норме γ субъединица экспрессируется в эмбриональной и неонатальной стадиях, а затем она замещается ϵ субъединицей в течение первых двух недель после рождения [132; 133]. Физиологическая роль этой замены не до конца ясна. Удаление гена ϵ субъединицы у мышей приводит к нарушению нервно-мышечной передачи и смерти в возрасте 2 – 3 месяцев [134; 135]. Экспрессия гена γ субъединицы человека у таких мышей снижает их смертность, но у выживших особей развивается фенотип, сходный с врожденным синдромом миастении у человека [136]. В свою очередь, мутации в человеческом гене γ субъединицы вызывают тяжелые формы пренатальной миастении [137]. Делеция гена γ субъединицы у мышей приводит к нарушениям в кластеризации nAChR на постсинаптической мембране нервно-мышечного синапса [138]. В экспериментах по замене $\beta 1$ субъединицы на $\beta 2$ при экспрессии в ооцитах *X. laevis* было показано, что $\beta 1$ субъединица вовлечена в процесс кластеризации nAChR [139]. Для эффективной сборки пентамерных рецепторов необходимы фосфорилирование отдельных γ субъединиц и гликозилирование δ субъединиц [140].

Локализация мышечного nAChR и болезни, обусловленные нарушениями функционирования мышечного рецептора

nAChR мышечного типа являются важными участниками нервно-мышечного контакта, они опосредуют быструю передачу сигнала от спинальных мотонейронов к мышечным клеткам. Во взрослых мышцах на постсинаптических мембранах нервно-мышечных контактов nAChR присутствуют в достаточно большой концентрации ($10^4 \mu\text{m}^{-2}$), и практически отсутствуют на остальной поверхности мышечного волокна [140]. Наряду со специфической мышечной тирозиновой киназой эти рецепторы являются мишенью для аутоиммунных антител у больных миастенией (*myasthenia gravis*). Аутоиммунные антитела связываются в определенном участке $\alpha 1$ (67 – 76 аминокислотные положения), который носит название главный иммуногенный участок [141]. Миастения проявляется как хроническая мышечная слабость, она встречается у ~20 людей на каждые 100000 человек, и, к сожалению, эта статистика растет в связи с правильной диагностикой заболевания [142]. Современное лечение направлено на облегчение симптомов

миастении и имеет временный эффект, поэтому мировое научное и медицинское сообщество крайне заинтересовано в разработке эффективного вида терапии этого заболевания [143]. Связывание антител с мышечным nAChR инициирует лизис постсинаптической мембраны (с участием системы комплемента) и интернализацию рецепторов, следствием чего является нарушение нервно-мышечной передачи [144]. Один из вариантов симптоматического лечения миастении заключается в возобновлении нормальной нервно-мышечной передачи путем увеличения концентрации доступного ацетилхолина в синаптической щели, компенсируя таким образом эффект от снижения общего числа nAChR. Это достигается благодаря использованию ингибиторов ацетилхолинэстеразы. С другой стороны, лечение может заключаться в удалении анти-nAChR антител из плазмы крови методом иммунноадсорбции. Также многие пациенты нуждаются в дополнительной неспецифической иммуннодепрессивной терапии [145]. У молодых пациентов с общей миастенией иногда прибегают к удалению тимуса – тимэктомию, но эта процедура вызывает множество вопросов с точки зрения клинической эффективности [146]. Последним достижением в области выяснения молекулярных механизмов развития миастении стала работа, освещающая кристаллическую структуру комплекса $\alpha 1$ субъединицы и Fab-фрагмента моноклонального антитела. Знания о механизмах связывания позволят разработать новые эффективные пути лечения на основе блокирования этого связывания [147].

В отличие от $\alpha 7$ nAChR, участника холинергического противовоспалительного пути [148], $\alpha 1$ -содержащие nAChR вовлечены в провоспалительного пути [149]. К настоящему времени показано, что $\alpha 1$ nAChR могут быть альтернативными рецепторами для урокиназы (uPA, urokinase plasminogen activator), таким образом, они участвуют в активации легочных нейтрофилов после стимуляции липополисахаридом и в нейтрофил-опосредованном воспалительном ответе [150] или же, например, в почечном фиброзе, где $\alpha 1$ nAChR задействован в сигнальном пути, который регулирует экспрессию ряда генов, трансформирующих почечные фибробласты в миофибробласты с высокой пролиферативной способностью [151]. Поэтому, блокируя мышечный nAChR, возможно регулировать протекание некоторых воспалительных реакций, при помощи недеполяризующих нервно-мышечных блокаторов, в число которых входят цисатракурий и панкуроний [152].

Наряду с субъединицами $\alpha 5$ и $\alpha 7$, субъединица $\alpha 1$ nAChR экспрессируется в бронхиальных эпителиальных клетках легких, причем все эти субъединицы могут быть вовлечены в развитии рака легких, в частности индуцированного никотиновой зависимостью [153]. Ученым уже удалось синтезировать пептид (его аминокислотная последовательность: **EASF \overline{W} LGS \overline{W} TWENGK \overline{W} TWK \overline{G} K \overline{G} T \overline{L} NR**), обладающий высоким сродством к $\alpha 1$ nAChR, при этом пептид способен на достаточное время задерживаться в ткани легких, что вызывает особый интерес к этому пептиду с точки зрения доставки активных фармацевтических препаратов [154].

Интересно, что в волосковых клетках улитки наряду с $\alpha 9^*$ нАХР были обнаружены мРНК $\alpha 1$ и γ субъединиц нАХР [155]. Также в волосковых клетках идентифицируется ряд белков, принимающих участие в сборе и кластеризации нАХР, в их число входят Ric3, рапсин и мышечная тирозинкиназа [156]. Однако, вполне вероятно, что в волосковых клетках не происходит функциональная экспрессия нАХР мышечного типа, т.к. для этих клеток не были зафиксированы ответы на агонисты рецептора, а также у $\alpha 1$ -дефектных мышей не обнаружены изменения в эфферентной иннервации волосковых клеток [157].

1.2.2. Гомопентамерный $\alpha 7$ нАХР

$\alpha 7$ рецепторы центральной нервной системы

$\alpha 7$ нАХР один из наиболее хорошо представленных подтипов нАХР, встречающихся в центральной нервной системе. $\alpha 7$ рецептор широко представлен в участках мозга, отвечающих за когнитивные функции и память, а именно в гиппокампе, коре и части подкорковых лимбических участков [158; 159; 160]. Помимо этого, $\alpha 7$ нАХР экспрессируется и в ненейронных клетках: астроцитах, микроглии, предшественниках олигодендроцитов и эндотелиальных клетках, где рецептор вовлечен в протекании воспалительных реакций и нейропротекции [161; 162]. В нейронах гиппокампа, $\alpha 7$ рецептор локализуется на пресинаптических мембранах ГАМКэргических и глутаматэргических терминалей и других участков, усиливая высвобождение нейротрансмиттеров (Рисунок 12). $\alpha 7$ рецепторы постсинаптических мембран опосредует быструю синаптическую передачу, а перисинаптически локализованные рецепторы участвуют в модуляции под действием внесинаптического ацетилхолина [163].

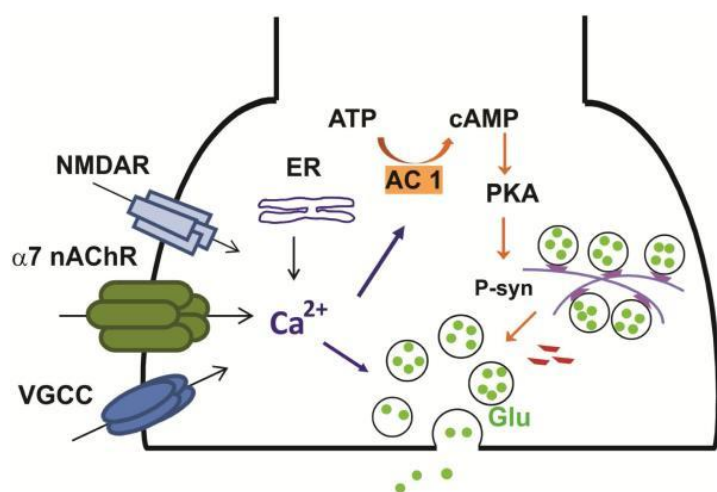


Рисунок 12. Механизм $\alpha 7$ -опосредованной регуляции высвобождения глутамата в терминали нейрона. Внутриклеточная концентрация ионов кальция повышается благодаря активации $\alpha 7$ нАХР, потенциал-управляемых кальциевых каналов (VGCC) и рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), сопровождающейся входом ионов в клетку, а также посредством выхода ионов кальция из внутриклеточного депо. Повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция напрямую или косвенно,

посредством сАМР-РКА-каскада, приводит к увеличению доли высвобождаемого глутамата из синаптических везикул. Протеинкиназа А (РКА) фосфорилирует молекулы синапсина (нефосфорилированные молекулы обозначены фиолетовым, фосфорилированные – красным), происходит мобилизация синаптических везикул и увеличивается выброс глутамата в синаптическую щель. сАМР, циклический аденозинмонофосфат [163].

$\alpha 7$ принимает участие в механизмах мышления, обработки информации, внимания, памяти. У пациентов с болезнью Альцгеймера, а также у больных шизофренией происходит значительное уменьшение числа $\alpha 7$ рецепторов в головном мозге, и в частности в гиппокампе. Ген $\alpha 7$ субъединицы, *CHRNA7* располагается в хромосоме 15. Множество болезней, таких как шизофрения, биполярные расстройства, аутизмы, когнитивные нарушения, дефицит внимания, эпилепсия, болезнь Альцгеймера являются генетически-обусловленными [164]. Частичная дупликация гена *CHRNA7* у человека приводит к формированию химерного гена *CHRFAM7A* и ассоциирована с развитием шизофрении. У белкового продукта дублированного гена (*dup $\alpha 7$*) отсутствует часть N-концевого домена, при этом *dup $\alpha 7$* субъединицы наряду с нормальными $\alpha 7$ субъединицами формируют пентамерные рецепторы, которые затем транспортируются на плазматическую мембрану. У таких рецепторов меняется чувствительность к лигандам рецептора, в том числе к ацетилхолину [165]. У пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера, происходит накопление неправильно свернутого амилоидного пептида $A\beta$ и формирование бляшек, это приводит к нейродегенерации и смерти нейронов. При этом $A\beta$ преимущественно накапливается в областях мозга, в которых высок уровень экспрессии $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ nAHP. Амилоидный пептид $A\beta$ высокоаффинен к $\alpha 7$ рецептору (связывается с рецептором в пикомолярном диапазоне концентраций), что также может влиять на синаптическую передачу [166].

Помимо $\alpha 7$ гомопентамерного рецептора, $\alpha 7$ субъединица может формировать гетеропентамерный рецептор $\alpha 7\beta 2$ nAHP, который детектируется в некоторых областях головного мозга [167; 168]. $\alpha 7\beta 2$ рецепторы также являются высокочувствительными к блокированию под действием $A\beta$, поэтому, вероятно, они тоже принимают участие в развитии болезни Альцгеймера [167]. $\alpha 7\beta 2$ nAHP высокочувствителен к действию летучих анестетиков, в отличие от гомопентамерного $\alpha 7$ рецептора [169].

$\alpha 7$ nAHP вне центральной нервной системы

$\alpha 7$ рецепторы широко представлены в ненейрональных тканях, в том числе в клетках глии, клетках крови, кератиноцитах, эпителиальных клетках и фибробластах, эндотелиальных клетках, сперматогонимальных клетках, сперматоцитах и клетках Сертоли [170; 171; 172; 173]. Функциональная роль $\alpha 7$ рецепторов в этих клетках заключается в участии в процессах дифференцировки, миграции, адгезии, формировании клеточных контактов, апоптозе и ангиогенезе [174; 175; 176]. $\alpha 7$ nAHP экспрессируется во всех типах иммунных клетках, включая лимфоциты Т и В, дендритические клетки и макрофаги [177]. $\alpha 7$ рецепторы иммунных клеток представляют особый интерес для изучения, т.к. эти рецепторы участвуют в процессе воспаления, также являются главным участником «холинергического противовоспалительного

пути» от эфферентных волокон блуждающего нерва к клеткам врожденной иммунной системы [178]. В иммунных клетках $\alpha 7$ рецептор активирует внутриклеточный JAK2/STAT3 путь и вовлечен в ингибирование перемещения фактора NF- κ B из цитоплазмы в ядро, таким образом опосредует противовоспалительные эффекты через подавление синтеза цитокинов и усиления экспрессии гемоксигеназы 1 (Рисунок 13) [172; 177; 179].

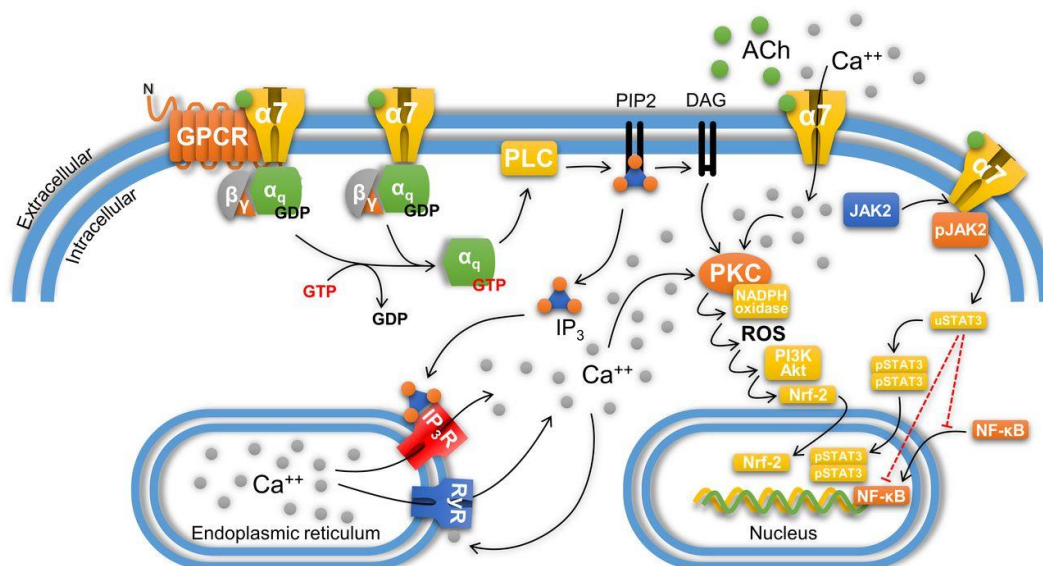


Рисунок 13. Участие $\alpha 7$ нАХР в сигнальных клеточных каскадах. Активация $\alpha 7$ рецептора под действием ацетилхолина (ACh) приводит к открытию ионного канала и запуску ионов Ca^{2+} , Na^+ , K^+ в клетку. Посредством риаудиновых рецепторов (RyR) запускается Ca^{2+} -индуцированный выброс ионов Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (Endoplasmic reticulum) в цитоплазму клетки. Как метаботропный рецептор, $\alpha 7$ нАХР участвует во внутриклеточной передаче сигнала благодаря связыванию с субъединицами $G\alpha$ и $G\beta\gamma$. В иммунных клетках $\alpha 7$ рецептор участвует в противовоспалительных эффектах через запуск JAK2/STAT3 каскада, который приводит к блокированию транспорта транскрипционного фактора NF- κ B из цитоплазмы в ядро (Nucleus), предотвращая синтез провоспалительных цитокинов. Также $\alpha 7$ рецептор активирует PI3K/Akt сигнальный путь, вследствие которого происходит перемещение фактора Nrf-2 в ядро и запуск экспрессии гемоксигеназы 1 (HO-1), что также приводит к противовоспалительным эффектам. DAG, диацилглицерол; GPCR, рецептор, сопряженный с G-белком; PKC, протеинкиназа C; ROS, активные формы кислорода [173].

В головном мозге $\alpha 7$ также задействован в особом холинергическом пути, который регулирует активацию клеток микроглии [180]. Этот регуляторный путь имеет решающее значение в процессах нейропротекции, например, при болезни Паркинсона [181], кислородном и глюкозном голодании [182], и церебральной ишемии [183]. Поэтому, $\alpha 7$ рецептор рассматривается в роли мишени при воспалении в патологических состояниях, включая сепсис, ишемию и реперфузию, ревматоидный артрит и панкреатит.

Особенности функционирования $\alpha 7$ нАХР

$\alpha 7$ нАХР является гомопентамерным рецептором и имеет пять ортостерических лиганд-связывающих сайтов (Рисунок 2). Интересно, что связывание сразу пяти молекул АЦХ не

является обязательным условием для активации рецептора: так, достаточно одной молекулы АЦХ, чтобы канал перешел в открытое состояние, при этом время существования открытого канала такое же, как в случае связывания рецептором сразу пяти молекул АЦХ [184]. Таким образом, чувствительность $\alpha 7$ нАХР обуславливает его способность к высококачественному проведению нервного сигнала. Более того, связывание только одной молекулы антагониста (МЛА [185] или α Vgt [186]) приводит к ингибированию $\alpha 7$ рецептора.

В дополнение к ортостерическим сайтам связывания агонистов и антагонистов, существует множество аллостерических сайтов, где связываются различные модуляторы. Среди таких соединений выделяют: 1) позитивные аллостерические модуляторы (ПАМы), они потенцируют ответы рецептора только в присутствии агониста; 2) аллостерические агонисты; 3) негативные аллостерические модуляторы, которые действуют в роли блокаторов, связывающихся в не ортостерических участках; и 4) молчащие аллостерические модуляторы, которые никак не влияют на ответ рецептора на агонист, но предотвращают аллостерическую модуляцию [173].

Одним из отличительных признаков $\alpha 7$ нАХР является высокая проницаемость канала для ионов кальция, но помимо ионов Ca^{2+} , $\alpha 7$ рецептор проницаем также для одновалентных ионов Na^+ и K^+ , при этом проницаемость для ионов кальция выше проницаемости для ионов натрия ($\text{PCa}^{2+}/\text{PNa}^+$) в $\sim 10 - 20$ раз, соотношение $\text{PCa}^{2+}/\text{PNa}^+$ для $\alpha 7$ выше, чем для других представителей нАХР (например, для мышечного нАХР оно равно 0,2 [187]), и больше, чем для NMDA рецепторов [188]. Высокая проницаемость для ионов кальция $\alpha 7$ рецептора обуславливает многие его функции: усиление выброса нейротрансмиттеров, деполяризацию постсинаптической мембраны, а также влияние на многие клеточные процессы, в которых ионы Ca^{2+} выступают в роли вторичных мессенджеров. Также повышение концентрации кальциевых ионов в цитоплазме стимулирует посредством инозитолтрифосфата (IP_3) и рианодиновых рецепторов (RyR) выход ионов кальция из клеточного депо (Рисунок 13) [189]. Помимо того, что $\alpha 7$ нАХР является проницаемым для ионов кальция, он содержит участки связывания дивалентных ионов в экстрацеллюлярном домене [190]. Внеклеточные ионы кальция модулируют аффинность рецептора к ацетилхолину [191].

В течение длительного времени нАХР рассматривались только как ионные каналы, проницаемые для ионов Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , но в последнее время появились доказательства того, что $\alpha 7$ рецептор может функционировать как метаботропный рецептор. Существует целый G-белок-связывающий кластер аминокислот рецептора (GPBC, G protein-binding cluster), располагающийся в районе М3-М4 петли, причем мутации в этом участке приводят к неспособности рецептора связывать G-белки, и, следовательно, сниженной способности

рецептора активировать фосфолипазу С (PLC) и инозитолтрифосфат (IP₃) посредством диссоциированной G α_q субъединицы (Рисунок 13) [192; 193].

Метаботропная передача сигнала через $\alpha 7$ рецептор происходит в макрофагах при воспалительных процессах [194], в кератиноцитах при связывании $\alpha 7$ рецептором SLURP-1 [195] (в обоих случаях выше активация $\alpha 7$ запускает клеточные каскады активации фактора транскрипции NF- κ B), а также при росте нейритов, где $\alpha 7$ рецептор вовлечен в сложную сеть белковых взаимодействий, приводящих к полимеризации или деполимеризации белка цитоскелета, α -тубулина [196].

Кинетика канала $\alpha 7$

Агонист-индуцированные токи, опосредованные активацией $\alpha 7$ nAХР, быстро идут на спад (Рисунок 14), т.к. для данного типа рецептора характерна быстрая и полная десенситизация при высоких концентрациях агонистов [56; 197].

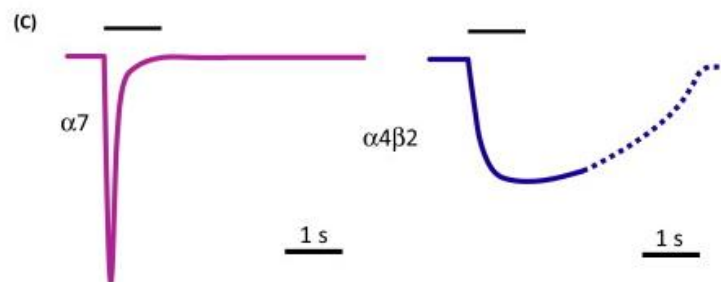


Рисунок 14. Функциональные особенности $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$ nAХР. $\alpha 7$ рецептор, в отличие от $\alpha 4\beta 2$, характеризуется быстрой кинетикой активации и десенситизации. Чертой обозначена аппликация агониста [166].

При гетерологической экспрессии $\alpha 7$ nAХР в клетках линии НЕК293 полное восстановление рецептора после десенситизации занимает около 1 секунды [198], в то время как в гиппокампе это на это требуется 15 – 30 секунд (значения для АЦХ) [199]. После этого времени амплитуда тока, вызванная действием высокой концентрации АЦХ, восстанавливается до исходных значений. В противном случае, если апплицировать агонист повторно раньше установленного времени, амплитуда ответа снижается. Интересно, что для НИК период восстановления рецептора после состояния десенситизации занимает больше времени, при этом в течение этого срока рецептор становится менее чувствительным к обоим агонистам: НИК и АЦХ [199]. Возможной ролью быстрой десенситизации $\alpha 7$ рецептора в живых клетках является предотвращение негативных последствий повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция при чрезмерной активации $\alpha 7$ nAХР. Явление десенситизации сильно осложняет измерение амплитуд ответов $\alpha 7$ рецепторов, т.к. детектирующие системы должны быть способны регистрировать быстрые изменения, происходящие в миллисекундном масштабе. Одним из выходов является использование ПАМов $\alpha 7$ nAХР II типа, они увеличивают амплитуду и

продолжительность ответа на агонист. Одним из таких соединений является PNU120596 (1-(5-хлор-2,4-диметоксифенил)-3-(5-метил-оксазол-3-ил)мочевина) (Рисунок 15) [101].

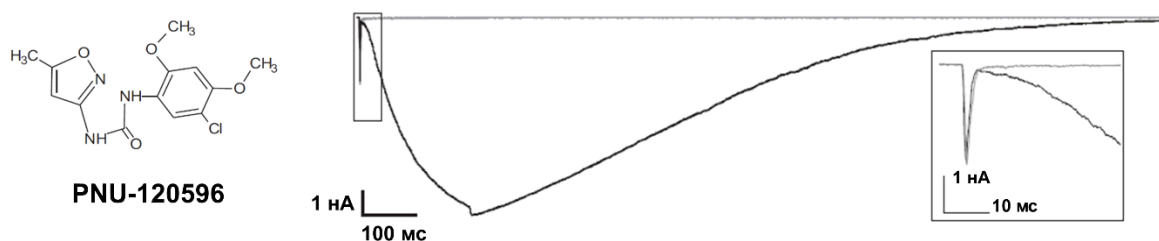


Рисунок 15. Строение молекулы PNU120596 и модулирующий эффект 10 мкМ PNU120596 на $\alpha 7$ нАХР. Электрофизиологическая запись тока, индуцированного действием 10 мМ холина (*серая линия*). При ко-апликации агониста и модулятора PNU120596 амплитуда и продолжительность клеточного ответа увеличивается (*черная линия*) [200].

Модулирующий эффект PNU120596 на $\alpha 7$ нАХР заключается в следующем: сначала наблюдается быстрое нарастание амплитуды тока и последующий за ним резкий спад, в течение этой стадии рецептор активируется под действием агониста и переходит в состояние десенситизации, при котором рецептор не способен больше связывать агонист, при этом его канал находится в открытом состоянии и модулятор получает возможность связаться с рецептором в трансмембранном участке [201]. Далее происходят конформационные перестройки, в которых открытие канала становится энергетически выгодным и агонист попадает в «ловушку», находясь длительное время в лиганд-связывающем участке. Эффект действия агониста при этом удлиняется и возрастает (Рисунок 15) [200].

1.2.3. Гомопентамерный $\alpha 9$ и гетеропентамерный $\alpha 9\alpha 10$ нАХР

Строение $\alpha 9$ и $\alpha 9\alpha 10$ нАХР

Субъединицы $\alpha 9$ и $\alpha 10$ вместе формируют высокопроницаемый для ионов кальция гетеромерный пентамерный рецептор, который может быть гетерологически экспрессирован в ооцитах *X. laevis*, а также *in vivo* в волосковых клетках улитки [202]. $\alpha 9\alpha 10$ рецептор – нетипичный представитель нАХР, т.к. содержит сразу две разные α субъединицы, одна из которых ($\alpha 10$), по видимому, выступает в роли структурной и самостоятельно, без участия $\alpha 9$ субъединицы, не может формировать функционально активный рецептор как в гетерологических системах экспрессии, так и в волосковых клетках [203; 204].

Интересно, что при гетерологической экспрессии $\alpha 10$ субъединица птиц (в отличие от млекопитающих) способна образовывать функциональный гомопентамерный рецептор, возможная причина этого заключается в том, что ген $\alpha 10$ субъединицы (*CHRNA10*) млекопитающих подвергся дополнительному давлению со стороны направленного естественного отбора [205; 206]. А в свою очередь, в последовательности $\alpha 9$ субъединицы

произошли три аминокислотные замены (в областях входа и выхода канала), которые привели к увеличению проницаемости для ионов кальция у рецептора млекопитающих, в отличие от птиц [207].

Вклад $\alpha 9$ и $\alpha 10$ субъединиц в формирование сайтов связывания лигандов не одинаков, именно поэтому достаточно логичной кажется неспособность $\alpha 10$ субъединицы формировать активный рецептор. Однако в одном из последних исследований ученые показали, что и $\alpha 9$, и $\alpha 10$ субъединица принимает участие в формировании основной стороны лиганд-связывающего участка: это противоречит гипотезе о структурной роли $\alpha 10$ субъединицы, но подтверждает факт необходимости обеих субъединиц для образования функционального гетеропентамерного рецептора у млекопитающих [208; 209].

Существует доказательство того, что *in vivo* $\alpha 9\alpha 10$ нАХР существует как минимум в двух вариантах с разной стехиометрией субъединиц: $(\alpha 9)_3(\alpha 10)_2$ и $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$, при этом в области контакта субъединиц $\alpha 9$ - $\alpha 9$ существует дополнительный сайт связывания АЦХ и α -конотоксина Vc1.1, аффинность этого сайта к агонисту ниже, но при этом выше к антагонисту [210].

Локализация $\alpha 9$ и $\alpha 9\alpha 10$ нАХР

Субъединицы $\alpha 9$ и $\alpha 10$ впервые были обнаружены в обонятельном эпителии и в волосковых клетках внутреннего уха [211; 212]. $\alpha 9\alpha 10$ нАХР вовлечены в процесс передачи эфферентного сигнала по медиальным нейронам от оливы продолговатого мозга к улитке, который регулирует афферентную передачу слухового сигнала от волосковых клеток для повышения качества звукового сигнала на фоне шума, и такой механизм регуляции служит защитой от акустической травмы [213]. нАХР, содержащие субъединицы $\alpha 9$ и $\alpha 10$ также были обнаружены в спинномозговых ганглиях [214] и множестве невозбудимых тканей. Так, их экспрессия детектируется в надпочечниках и гипофизе, где рецептор вовлечен в нормальное протекание стрессовых реакций [215], сетчатке [216], ганглии преддверно-улиткового нерва [217; 218], иммунных клетках [219; 220; 221; 222], опухолевых тканях мозга, молочных желез и легких [223; 224; 225], кожных кератиноцитах [226], эпителии толстой кишки ($\alpha 10$) [227], остеобластах и хондроцитах [228]. Достаточно длительный период времени не было никаких данных об экспрессии $\alpha 9$ и $\alpha 10$ субъединиц в центральной нервной системе. В работе 2017 года впервые представлено, что мРНК $\alpha 9$ и $\alpha 10$ субъединиц нАХР обнаруживаются в продолговатом мозге, таламусе, скорпуде, соматосенсорной коре, фронтальной коре и гиппокампе. При этом сами субъединицы рецептора представлены в митохондриях, а их присутствие в плазматической мембране подтвердить не удалось [229].

Очень часто если в ткани детектируется $\alpha 9$ субъединица, то в этой же ткани скорее всего будет обнаружена и субъединица $\alpha 10$, т.к. они обе задействованы в формировании рецептора.

Также $\alpha 10$ субъединица способна образовывать рецептор совместно с $\alpha 7$ субъединицей как например в постганглионарных симпатических нейронах [230]. Интересно, что множество данных свидетельствует о том, что существует функциональная взаимосвязь между $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединицами nAChR: при сниженном уровне экспрессии $\alpha 7$ или у нокаутных по гену $\alpha 7$ мышей, экспрессия $\alpha 9$ увеличивается [229; 231; 232]. Возможно, между $\alpha 7$ и $\alpha 9$ содержащими nAChR существует компенсаторная связь, обусловленная сходными функциями рецепторов [229].

Хотя $\alpha 9^*$ nAChR являются ионотропными рецепторами, они могут также быть посредниками в метаболической передаче сигнала, уже несколько работ посвящены изучению роли nAChR, преимущественно $\alpha 7$, $\alpha 9$ или $\alpha 10$ содержащих рецепторов, в ингибировании АТФ-зависимого высвобождения провоспалительного цитокина IL-1 β в моноцитах [233; 234].

Экспрессия $\alpha 9\alpha 10$ nAChR в иммунных клетках может говорить о том, что этот подтип рецепторов может участвовать в некоторых иммунологических реакциях. Доказательством этому служит вовлеченность в патогенез аутоиммунного заболевания пемфигус (*Pemphigus vulgaris*), в котором $\alpha 9^*$ nAChR, регулирующие нормальную адгезию кератиноцитов, являются мишенями для аутоиммунных антител [235], а также рассеянного склероза, где $\alpha 9^*$ рецепторы участвуют в рекрутинге макрофагов и развитии воспалительной реакции [236].

Фармакологические свойства $\alpha 9$ и $\alpha 9\alpha 10$ nAChR

Хотя $\alpha 9$ относят к семейству nAChR, этот подтип сильно отличается от других представителей семейства по гомологии аминокислотных последовательностей и совместно с субъединицей $\alpha 10$ формирует отстоящую, рано отделившуюся ветвь в эволюционном древе семейства nAChR, и является самым близким подтипом к предковой форме рецептора, давшей начало всем представителям семейства nAChR (Рисунок 16) [9].

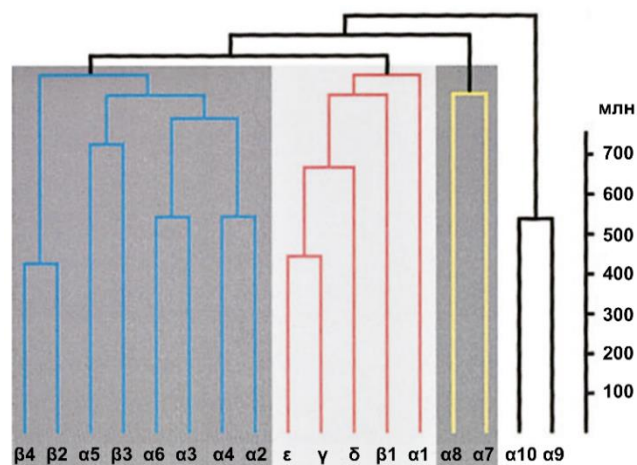


Рисунок 16. Кладограмма субъединиц nAChR позвоночных. Субъединицы $\alpha 9$ и $\alpha 10$ представлены рано отделившейся ветвью древа nAChR. Серым выделены нейрональные субъединицы nAChR, из которых голубым показаны субъединицы, формирующие гетеропентамерные рецепторы, а желтым – гомопентамерные. Светло-серым и красным обозначены субъединицы nAChR мышечного типа. млн – миллионы лет назад [9].

Вероятно, что именно по этой причине $\alpha 9$ нАХР имеет некоторые фармакологические свойства, сходные с ГАМК_AР, ГлиР и 5-НТ₃Р [237]. В большинстве случаев изучение фармакологических свойств $\alpha 9\alpha 10$ нАХР проходило на нокаутных животных [202].

При экспрессии в ооцитах *X. laevis* $\alpha 9$ рецептор формирует гомопентамерный канал, проницаемый для ионов кальция [238]. Классический агонист нАХР, АЦХ, также активирует $\alpha 9$ данный подтип, но другие агонисты – НИК, ЭПИ и цитизин блокируют $\alpha 9$ нАХР, конкурируя с АЦХ за связывание с рецептором [68]. Также в роли блокаторов $\alpha 9$ нАХР выступают мускарин, кураре и α Bgt, правда блокирование α Bgt является обратимым, в отличие от других нАХР. Некоторые антагонисты других рецепторов (не из числа нАХР) также способны блокировать $\alpha 9$ нАХР: атропин (блокатор мускариновых рецепторов), стрихнин (блокатор ГлиР), бикикулин (блокатор ГАМК_AР), ICS 205-930 и ондансетрон (блокаторы 5-НТ₃Р) [68; 237]. Помимо этого некоторые соединения способны модулировать работу $\alpha 9^*$ нАХР: опиоидные соединения [239; 240], рианодин [228], ототоксические препараты (например хинин) [241], аминогликозидные антибиотики (неомицин, гентамицин, стрептомицин, амикацин, канамицин) [242] и нерамексан (препарат, назначаемый при тиннитусе) [243; 244]. Для НИК и ЭПИ в различных доклинических моделях было показано, что они обладают антиболевым эффектом [245]. Некоторые α -конотоксины (компоненты ядов моллюсков рода *Conus* – короткие пептиды, длиной 12 – 18 аминокислотных остатков, различающиеся между собой паттерном дисульфидных связей), имеют высокое сродство с $\alpha 9^*$ нАХР; RgIA, выделенный из *Conus regius* [246], Vc1.1, полученный из *Conus victoriae* [247], GeXIVA, полученный из *Conus generalis* и PeIA, выделенный из *Conus pergrandis* [248], могут использоваться в качестве молекулярного инструмента для детекции данного подтипа нАХР, и, более того, использоваться в качестве антиболевых препаратов [249]. Например, α -конотоксин Vc1.1 дошел до второй стадии клинических исследований, но вскоре было показано, что данный антагонист гораздо более активен в отношении $\alpha 9\alpha 10$ нАХР крысы, чем человека [250]. Фармакологические свойства рекомбинантных $\alpha 9$ нАХР воспроизводят свойства нативных рецепторов волосковых клеток, но вольтамперные характеристики, чувствительность к ионам кальция и параметры десенситизации гомопентамерного $\alpha 9$ рецептора не соответствуют таковым изолированных волосковых клеток [202]. Клонирование $\alpha 10$ субъединицы нАХР улитки крысы и коэкспрессия $\alpha 9$ и $\alpha 10$ субъединиц в ооцитах *X. laevis* показали, что $\alpha 9\alpha 10$ нАХР повторяет фармакологические и биофизические характеристики рецепторов волосковых клеток [212].

2. Материалы и методы

2.1. Материалы и оборудование

Плазмиды

Использованные в работе плазмидные конструкции и их источники указаны в Таблице 1.

Таблица 1. Перечень используемых в работе плазмидных конструкций.

Плаزمида	Ген, Вектор	Кем предоставлена
Субъединицы nAHP человека		
h α 7-pCER4	α 7 субъединица nAHP, pCER4	проф. Лукас Р.Д., Манчестерский университет, Великобритания
h α 7[Q117T]-pCER4	Мутантная форма α 7 субъединицы nAHP, pCER4	Мерцалов Г.В., ИБХ РАН, Россия
h α 7[Y118W]-pCER4	Мутантная форма α 7 субъединицы nAHP, pCER4	Оджомоко Л.О., ИБХ РАН, Россия
h α 7[S184N]-pCER4	Мутантная форма α 7 субъединицы nAHP, pCER4	
h α 7[E185V]-pCER4	Мутантная форма α 7 субъединицы nAHP, pCER4	
h α 7[F187S]-pCER4	Мутантная форма α 7 субъединицы nAHP, pCER4	
h α 3-pT7TS	α 3 субъединица nAHP, pT7TS	Дюрек Т., Институт молекулярной биологии, Австралия
h α 4-pSP64	α 4 субъединица nAHP, pSP64	
h α 9-pT7TS	α 9 субъединица nAHP, pT7TS	
h α 10-pT7TS	α 10 субъединица nAHP, pT7TS	
h β 2-pT7TS	β 2 субъединица nAHP, pT7TS	
Субъединицы nAHP крысы		
r α 7-pcDNA3	α 7 субъединица nAHP, pcDNA3	проф. Метфессель К., Рурский университет, Германия
r α 4-pcDNA3.1	α 4 субъединица nAHP, pcDNA3.1	
r β 2-pcDNA3.1	β 2 субъединица nAHP, pcDNA3.1	
Субъединицы nAHP мыши		
m α 1-pRBG4	α 1 субъединица nAHP, pRBG4	проф. Витцманн В., Институт медицинских исследований им. Макса Планка, Германия
m β 1-pRBG4	β 1 субъединица nAHP, pRBG4	
m ϵ -pRBG4	ϵ субъединица nAHP, pRBG4	
m δ -pRBG4	δ субъединица nAHP, pRBG4	
Субъединица химерного α7/Гли рецептора		
α 7/Gly-pMT3	Химерная субъединица α 7/ГлиР курицы, pMT3	проф. Бржестовский П.Д., Нейробиологический институт медицины, Научный парк Люмини, Марсель, Франция
Субъединица 5-HT_{3A} рецептора		
m5-HT _{3A} -pGEMHE	Субъединица 5-HT _{3A} Р мыши, pGEMHE	проф. Ламмис С., Оксфордский университет, Великобритания
Субъединицы ГАМК_A рецептора		
m α 3-pCI	α 3 субъединица ГАМК _A Р мыши, pCI	Эрнст М., Венский медицинский университет, Австрия
m β 2-pCI	β 2 субъединица ГАМК _A Р мыши, pCI	
m γ 2-pCI	γ 2 субъединица ГАМК _A Р мыши, pCI	
Шапероны α7 nAHP		
NACHO-pCMV6-XL5	Шаперон NACHO человека, pCMV6-XL5	OriGene Technologies, США
RIC-3-pCMV6-XL5	Шаперон Ric3 человека, pCMV6-XL5	к.б.н. Свирищевская Е.В., ИБХ РАН, Россия
Кальциевый сенсор		
pCase12-cyto	Генетически кодируемый кальциевый сенсор Case12	Евроген, Россия

Праймеры

Последовательности праймеров для сайт-направленного мутагенеза (Евроген, Россия) приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Последовательности прямых (F) и обратных (R) праймеров.

Праймер	Последовательность праймера
Субъединица химерного $\alpha 7$/ГлиР	
E189A – F	5' -cttttatgctgctgtaaagaac-3'
E189A – R	5' -cttgactctcgaaaatacgcacgac-3'
Субъединица $\alpha 7$ НАХР крысы	
L119D – F	5' -cagtacgatcctccaggcatattc-3'
L119D – R	5' -ggaggatcgtactggcaatg-3'
Субъединица $\alpha 1$ НАХР мыши	
G153S – F	5' -ctatgacagctctgtggtggc-3'
G153S – R	5' -cacagagctgtcataggccag-3'
Y190F – F	5' -gtgttcttctcctgctgcc-3'
Y190F – R	5' -gcaggagaagaacaccagtg-3'
N217K – F	5' -cattgtcaaggatcatcattccc-3'
N217K – R	5' -gatgaccttgacaatgaagtagagg-3'
S352I – F	5' -gacatcattgggaagccg-3'
S352I – R	5' -gcttcccaatgatgtcagatatatc-3'

Ферменты

ДНК-полимераза Phusion Hot Start в комплекте с 5X Phusion GC-буфером (New England Biolabs, Канада); эндонуклеазы рестрикции *Dpn* I, *Xba* I, *Bam*H I, и *Nhe* I в комплекте с 10X буфером (New England Biolabs, Канада); коллагеназа I типа (Life Technologies, USA).

Реактивы

Агароза (Helicon, Россия); Ампициллин (Ф-Синтез, Россия); Амфотерицин В (Ф-Синтез, Россия); Ацетилхолинсвязывающий белок (АЦХСБ) *Aplysia californica* (предоставлен проф. Смит А.Б., Институт рака, Нидерланды); Бензокаин (Sigma-Aldrich, США); Бромид этидия (Pharmacia, Швеция); БСА, бычий сывороточный альбумин (MP Biomedicals Inc, Франция); Гентамицин, 4% раствор (КРКА, Россия); иодистый пропиций (BD Biosciences, США); Канамицин (Биосинтез, Россия); Полиэтиленимин (Sigma-Aldrich, США); Пробенецид (Thermo Fisher Scientific, США); Липофектамин (Invitrogen, США); этиловый эфир тетраметилпродамина (TMRE, Invitrogen, США); Tween-20 (Helicon, Россия); Fluo-4 (AM) (Thermo Fisher Scientific, США); 50X смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов dNTP по 10 мМ каждого (Promega, США).

Наборы реактивов

Набор реактивов для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия); набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей CleanupMini (Евроген, Россия), наборы для синтеза мРНК T7 и SP6 mMessagemMachine transcription kit (AMBION, США), набор для очистки мРНК RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, Нидерланды).

Маркеры молекулярных масс

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва); 1 kb Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs, Канада).

Лиганды

Агонисты α ХР: АЦХ, ацетилхолина иодид (Sigma-Aldrich, США); НИК, никотин (Sigma-Aldrich, США); ЭПИ, эпibatидина дигидрохлорид (Tocris Bioscience, Великобритания);

Агонист 5-НТ_{3A}Р: 5-НТ, серотонин гидроксихлорид (Tocris Bioscience, Великобритания);

Агонист ГАМК_AР: ГАМК, γ -аминомасляная кислота (Sigma-Aldrich, США);

Антагонисты α ХР: α Стх, α -кобратоксин (предоставлен проф. Уткиным Ю.Н., ИБХ РАН, Россия); AlexaFluor555- α Bgt, α -бунгаротоксин флуоресцентно-меченый (Invitrogen, США); [¹²⁵I]- α Bgt, α -бунгаротоксин радиоактивно меченный (предоставлен Кашеверовым И.Е., ИБХ РАН, Россия); *d*-ТС, *d*-тубокурарин (Tocris Bioscience, Великобритания);

Модулятор α 7 α ХР: PNU120596 (Tocris Bioscience, Великобритания);

Исследуемые соединения: баптид 2 (предоставлен проф. Уткиным Ю.Н., ИБХ РАН, Россия); пФЛА₂, панкреатическая фосфолипаза А₂ свиньи (предоставлен проф. Уткиным Ю.Н., ИБХ РАН, Россия); производные хинолина **q1-4** и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-аминов **a1-4** (предоставлены проф. Романелли М.Н., Флорентийский университет, Италия); бисбензилтетрагидроизохинолиновые алкалоиды ВВІQA1 и ВВІQA2 (предоставлен проф. Гианнис А., Лейпцигский университет, Германия).

Буферные растворы для молекулярно-биологических методов

6X буфер для нанесения образца при гель-электрофорезе в агарозе (Thermo Scientific, Литва); 50X ТАЕ-буфер: 40 мМ Трис; 20 мМ уксусная кислота; 1 мМ ЭДТА (Thermo Scientific, Литва).

Буферные растворы для электрофизиологии

Буфер для инкубации ооцитов *X. laevis*: буфер Barth's solution с добавлением 40 μ г/мл гентамицина и 100 μ г/мл ампициллина;

Буфер Barth's solution: 88 мМ NaCl, 1.1 мМ KCl, 2.4 мМ NaHCO₃, 0.3 мМ Ca(NO₃)₂, 0.4 мМ CaCl₂, 0.8 мМ MgSO₄ и 15 мМ HEPES-NaOH; pH 7.6;

Буфер Ba²⁺Ringer's solution: 115 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES; pH 7.2;

Буфер NFR: 90 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1.5 мМ BaCl₂, 10 мМ HEPES; pH 7.2.

Буферный раствор для радиолигандного анализа

Связывающий буфер: 20 нМ Трис-HCl, 1 мг/мл БСА, pH 8.0.

Растворы и среды для клеточной работы

Буфер PBS: 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 10 мМ Na₂HPO₄; 1,76 мМ KH₂PO₄; pH 7,4;

Наружный электрофизиологический раствор: 140 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 2 мМ CaCl₂; 2 мМ MgCl₂; 10 мМ HEPES; 10 мМ глюкоза, pH 7,4 – 7,5;

Натрий – фосфатный буфер 0,1 М, pH 8,3;

Раствор Версена (ПанЭко, Россия);

Ростовая среда для клеток: среда DMEM с аланил-глутамином с добавлением 10% FBS (эмбриональная телячья сыворотка (РАА Laboratories GE, Австрия)), 50 мкг/мл гентамицина и 2,5 мкг/мл амфотерицина В;

Среда DMEM с аланил-глутамином (ПанЭко, Россия).

Микробиологические среды

Агаризованная среда LB с ампициллином: 1,5% раствор агара в среде LB с добавлением ампициллина до концентрации 100 мкг/мл;

Среда LB: 1,5% бакто-триптон; 0,5% бакто-дрожжевой экстракт; 1% NaCl;

Среда SOC: 2% бакто-триптон; 0,5% бакто-дрожжевой экстракт; 10 мМ NaCl; 2,5 мМ KCl; 10 мМ MgCl₂; 10 мМ MgSO₄ и 20 мМ глюкозы.

Бактериальные штаммы

Штамм *E. coli* XL1-Blue, генотип: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]* (Евроген, Россия).

Эукариотические клетки, организмы и препараты

Клеточная линия мышинной нейробластомы Neuro2a (Институт цитологии РАН, Россия); клетки линии GH4C1 (суспензия мертвых клеток; предоставлены EliLilly, Великобритания); мембраны электрического органа *Torpedo californica* (предоставлены проф. Хухо Ф., Свободный университет Берлина, Германия); самки шпорцевых лягушек *X. laevis* (NASCO, США).

Оборудование

Автоматические пипетки (Eppendorf, Германия); автоматический ПЦР-амплификатор Master cycler nexus (Eppendorf, Германия); автоматический γ -счетчик Wallac Wizard 1470 (GMI Inc., США); бактериальный шейкер (CertomatRH, Германия); видеокамера XM10 (Olympus, Япония); водяная баня (BioSan, Россия), воздушный термостат (Biokom, Россия); вортекс Vortex V-1 plus (BioSan, Латвия); высокочувствительная черно-белая видеокамера KPC-650BH (KT&C, Южная Корея); двухэлектродная пэтч-кламп система TURBO TEC-03X (Drummond, Германия); источник питания Эльф-4 (ДНК-Технология, Россия); камера для горизонтального электрофореза нуклеиновых кислот (Helicon, Россия); микроинжектор Nanoject II (Drummond, Германия); микроцентрифуга CM-6 (ELMI, Латвия); микроцентрифуга Mini Spin 5415C (Eppendorf, Германия); планшетный флуориметр Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Финляндия); приборы для горизонтального электрофореза Model QHV (Helicon, Россия); спектрофотометр DU-65 (Beckman, США); спектрофотометрическая кювета (Hellma, США); УФ-трансиллюминатор (Ultra Violet Products, США); флуоресцентный микроскоп отраженного света на основе инвертированного микроскопа IX71 (Olympus, Япония); шкаф сушильно-стерилизационный (BINDER, США); электрический дозатор Powerpette Plus (Jencons, Япония); электронные весы Gottingen E 5500 S (Sartorius, Германия); CO₂-инкубатор MCO-15AC (Sanyo, Япония).

Расходные материалы

Пластиковые наконечники для автоматических пипеток (UL Plast, Польша); пластиковые пробирки 0,6; 1,5 и 2 мл (Eppendorf, Германия); пробирки 15 и 50 мл (Falcon, США); чашки Петри диаметром 35, 60 и 90 мм (SPL Lifesciences, Корея); круглые покровные стекла диаметром 12 мм (Menzel Glaser, Германия); стеклянные капилляры №4878 для инъекции ооцитов *X. laevis* (WPI, США); стеклянные капилляры №1404501 для двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis* (Hilgenberg, Германия); фильтры GF/C (Whatman, Великобритания); 24-луночные планшеты (SPL Lifesciences, Корея); 96-луночные планшеты с черными стенками (Corning, США), культуральные флаконы площадью 25 см² (Corning, США), пластиковые пипетки 5 и 10 мл (Corning, США).

Программное обеспечение

Autodock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu/>); BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; NCBI, США); Cella (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия); CellX (<http://www.csb.ethz.ch/tools/software/cellx.html> Department of Biosystems Science and Engineering, Швейцария); Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Австралия), Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> ; EMBL-EBI, Великобритания); ImageJ (National

Institutes of Health, США); QuikChange Primer Design (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>; Agilent Technologies, США); Microsoft Office Excel (Microsoft, США); OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, США); UCSF Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>; University of California, США).

2.2. Методы

2.2.1. Общие молекулярно-биологические методы

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле

Образцы нуклеиновых кислот смешивали с буфером для нанесения образцов (6X Mass Ruler DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Литва), 3 – 10 мкл смеси наносили в лунки 1%-ного агарозного геля (Helicon, Россия) приготовленного на основе 1X TAE буфера (Thermo Scientific, Литва) с добавлением 0,4 мкг/мл бромистого этидия (Pharmacia, Швеция). Далее гель переносили в камеру для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия), заполненную 1X TAE буфером и проводили электрофоретическое разделение при 105 В и 250 мА в течение 20 – 30 мин. Нуклеиновые кислоты в геле визуализировали в ультрафиолетовом свете, используя УФ-трансиллюминатор (Ultra Violet Products, США), и фиксировали результаты с помощью высокочувствительной черно-белой видеокамеры КРС-650ВН (КТ&С, Южная Корея).

Выделение и очистка нуклеиновых кислот

Выделение ДНК из агарозного геля и реакционных смесей: использовался набор реактивов CleanupMini, выделение проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Евроген, Россия).

Выделение плазмидной ДНК из культуры бактериальных клеток: использовались наборы реактивов для выделения и очистки ДНК Plasmid Miniprep и Midiprep, выделение проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Евроген, Россия).

Выделение РНК из реакционных смесей: использовался набор реактивов для выделения и очистки РНК из реакционных смесей RNeasy MinElute Cleanup Kit, выделение проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Qiagen, Нидерланды). Все манипуляции с пробами проводили в отдельном ламинарном боксе. При всех работах с РНК использовались перчатки.

Трансформация бактериальной культуры компетентных клеток E. coli штамма XL1-Blue

Трансформация проводилась методом теплового шока, в котором бактериальные клетки подвергаются воздействию резких перепадов температур. К 50 μ л суспензии компетентных

клеток *E. coli* штамма XL1-Blue добавляли 1 – 5 нг и помещали смесь на 20 мин в лёд. После инкубировались при температуре 42°C в течение 40 сек в воздушном термостате (Biokom, Россия) и далее снова переносились в лёд для охлаждения в течение 3 – 5 мин. Добавляли 150-250 μ л питательной среды SOC и помещали образец в бактериальный шейкер (CertomatRN, Германия) на 45 мин при 37°C. Весь объем полученной смеси наносили на чашку Петри, где находилась агаризованная среда LB, содержащая ампициллин (Ф-Синтез, Россия) в концентрации 100 μ г/мл или канамицин (Биосинтез, Россия) в концентрации 50 μ г/мл. Чашки Петри ставили на сутки в термостат при 37°C. На следующий день переносили один из выросших на чашке Петри клонов в жидкую среду LB (объема 5 – 50 мл), содержащую необходимый антибиотик (селективный маркер) и помещали в бактериальный шейкер на 10 – 20 часов при 37°C. Далее проводили выделение плазмидной ДНК из культуры бактериальных клеток.

Спектрофотометрическое измерение концентрации

Измерение концентрации нуклеиновых кислот в растворе

Концентрацию ДНК или РНК в образцах рассчитывали по закону Бугера-Ламберта-Бера, для чего 1 – 2 мкл образца помещали в спектрофотометрическую кювету (Hellma, США) и проводили измерение оптической плотности (при $\lambda = 260$ нм (OD_{260}) и $\lambda = 340$ нм (OD_{340})) с помощью спектрофотометра DU-65 (Beckman, США). В качестве контроля использовали данные спектроскопического измерения поглощения растворителя. Затем, учитывая коэффициент пересчета для двуцепочечной ДНК (1 единица $OD_{260}-OD_{340}$ соответствует концентрации ДНК равной 50 μ г/мл) и одноцепочечной РНК (1 единица $OD_{260}-OD_{340}$ соответствует концентрации РНК равной 40 μ г/мл), рассчитывали концентрацию нуклеиновых кислот в растворе.

Измерение концентрации белка в растворе

Концентрацию пептидов и белков (если это возможно) в образцах рассчитывали по закону Бугера-Ламберта-Бера, для чего 1 – 2 мкл образца помещали в спектрофотометрическую кювету (Hellma, США) и проводили измерение оптической плотности при $\lambda = 280$ нм (OD_{280}) и $\lambda = 340$ нм (OD_{340}) с помощью спектрофотометра DU-65 (Beckman, США). В качестве контроля использовали данные спектроскопического измерения поглощения растворителя. Затем, получив значение $OD_{280}-OD_{340}$ и учитывая коэффициент молярного поглощения для определенных белков или коэффициенты молярного поглощения тирозиновых, триптофановых или цистеиновых остатков при $\lambda = 280$ нм (1490, 5500 или 125, соответственно), рассчитывали концентрацию пептидов и белков в растворе.

Секвенирование

Секвенирование проводили в компании Евроген (Россия). Подготовку образцов для секвенирования проводили согласно инструкциям на сайте компании. Необходимые праймеры

предоставлялись компанией Евроген. Анализ хроматограмм осуществлялся при помощи программы Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Австралия) и онлайн-ресурса BLAST, Basic Local Alignment Search Tool (NCBI, США).

2.2.2. Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили методом кольцевого синтеза. Мутации в последовательность гена субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 7$ или $\alpha 7$ /ГлиР вносили с помощью праймеров, содержащих необходимые нуклеотидные замены (Таблица 2). Подбор праймеров осуществляли с помощью онлайн-программы QuikChange Primer Design (Agilent Technologies, США), с дальнейшей оптимизацией их структуры для повышения эффективности прохождения ПЦР [251]. Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР указаны в Таблице 3.

Таблица 3. Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР

Состав смеси ПЦР		Условия ПЦР			
Компонент	Конечная(-ое) концентрация/ количество	Стадия	Количество циклов	Температура	Время инкубации
Стерильная вода	до 25 μ л	Предварительная денатурация	1	98 °C	1 мин
5X Phusion GC буфер	1X				
Смесь dNTP	200 μ M каждого	Денатурация		98 °C	10 – 30 с
ДНК-матрица*	100 нг	Отжиг	25	55 – 72 °C	1 мин
Праймер – F**	0,5 μ M	Элонгация		72 °C	3 – 4 мин
Праймер – R**	0,5 μ M	Заключительный этап	1	72 °C	7 мин
Phusion Hot Start ДНК полимеразы	0,02 ед./ μ л				

*ДНК-матрица: h α 7-pSEP4, r α 7-pcDNA3, α 7/GlyR-pMT3 или m α 1-pRBG4;

**Праймеры – F и R указаны в Таблице 2.

В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме ДНК полимеразы. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе с градиентом температур и с нагреваемой крышкой (Eppendorf, Германия). После проведения ПЦР и выделения и очистки продуктов реакции для удаления метилированной материнской ДНК пробы обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Dpn* I (10 ед. фермента для 1 μ г ДНК) в соответствующем буфере CutSmart (New England Biolabs, Канада). Образцы инкубировали минимум 2 часа при температуре 37°C. Затем проводили трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамма XL1-Blue (Евроген, Россия) *Dpn* I-обработанными продуктами и далее проводили выделение плазмидной ДНК. Для подтверждения результатов сайт-направленного мутагенеза полученные плазмидные ДНК секвенировали.

2.2.3. Электрофизиология

Получение мРНК

Линеаризация плазмид

Плазмидные конструкции (по 10 $\mu\text{г}$) $\text{h}\alpha 3\text{-pT7TS}$, $\text{h}\alpha 9\text{-pT7TS}$, $\text{h}\alpha 10\text{-pT7TS}$, $\text{h}\beta 2\text{-pT7TS}$, $\text{r}\alpha 7\text{-pcDNA3}$ и $\text{r}\alpha 7[\text{L119D}]\text{-pcDNA3}$ обрабатывались эндонуклеазой рестрикции *Xba* I, конструкция $\text{h}\alpha 4\text{-pSP64}$ – *Bam*H I, и конструкция $\text{m5-NT}_{3\text{A}}\text{-pGEMHE}$ – *Nhe* I (100 единиц фермента, New England Biolabs, Канада) в присутствии соответствующих буферов (в конечной концентрации 1X) в конечном объеме 50 $\mu\text{л}$. Успешность стадии линеаризации проверялась электрофоретическим разделением ДНК в 1%-ном агарозном геле. Затем выделяли линеаризованные продукты при помощи набора для очистки ДНК из реакционных смесей CleanupMini (Евроген, Россия) и проводили спектрофотометрическое измерение концентрации ДНК в растворе.

Синтез мРНК

Синтез мРНК проводился с помощью наборов для синтеза мРНК T7 и SP6 mMessageMachine transcription kit (AMBION, США). Состав реакционной смеси указан в Таблице 4. Образцы инкубировали при 37°C в водяной бане (BioSan, Россия) в течение 2 часов.

Таблица 4. Состав реакционной смеси для синтеза мРНК

<i>Компонент</i>	<i>Конечная(-ое) концентрация/ количество</i>
Вода, не содержащая РНКаз	до 10 $\mu\text{л}$
10X буфер	1X (1 $\mu\text{л}$)
2X NTP/CAP	1X (5 $\mu\text{л}$)
ДНК-матрица*	650 нг
Ферментная смесь	1 $\mu\text{л}$

*Линеаризованные плазмидные конструкции $\text{h}\alpha 3\text{-pT7TS}$, $\text{h}\alpha 9\text{-pT7TS}$, $\text{h}\alpha 4\text{-pSP64}$, $\text{h}\alpha 10\text{-pT7TS}$, $\text{h}\beta 2\text{-pT7TS}$, $\text{r}\alpha 7\text{-pcDNA3}$, $\text{r}\alpha 7[\text{L119D}]\text{-pcDNA3}$ и $\text{m5-NT}_{3\text{A}}\text{-pGEMHE}$

Обработка проб ДНКазой

К реакционной смеси добавляли 0,5 $\mu\text{л}$ раствора TURBO DNase из набора для синтеза мРНК T7 или SP6 mMessageMachine transcription kit (AMBION, США) и инкубировали при 37°C в водяной бане (BioSan, Россия) в течение 15 мин. После проводили выделение синтезированной РНК из реакционных смесей при помощи RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Нидерланды) и проверяли успешность синтеза РНК электрофоретическим разделением РНК в 1%-ном агарозном геле. Затем рассчитывали концентрацию РНК в растворе спектрофотометрическим методом.

Выделение ооцитов *Xenopus laevis*

Взрослая самка *X. laevis* помещалась в холодный раствор бензокаина 0,5 г/л (Sigma-Aldrich, США) на 15 – 30 мин до полного обездвиживания лягушки. Путем прямой диссекции брюшной полости самки, находящейся на льду, извлекали фрагмент яичника, который затем помещали в бес-кальциевый буфер Barth's solution и обрабатывали раствором 4 мг/мл коллагеназы I типа (Life Technologies, USA) в течение 1,5 – 2 часов при комнатной температуре. После отдельные ооциты IV и V стадии переносились в буфер для инкубации ооцитов.

Инъекция ооцитов *Xenopus laevis*

Водные растворы плазмидных ДНК ($\alpha 4$ -pDNA3.1 и $\beta 2$ -pDNA3.1 в соотношении 1:1, $\alpha 7$ /Gly-pMT3 или $\alpha 7$ /Gly[E189A]-pMT3, а также $m\alpha 3$ -pCI, $m\beta 2$ -pCI и $m\gamma 2$ -pCI в соотношении 1:1:1) инъецировались в районе анимального полюса ооцита при помощи вакуумного наноинжектора NanoJect-2 (“Drummond”, Германия) в количестве 2,3 нг (23 нл раствора плазмид с концентрацией 100 нг/мкл). Водные растворы мРНК (содержащие гены $\alpha 3$ и $\beta 2$ субъединиц человека (в соотношении 1:1); содержащие гены $\alpha 4$ и $\beta 2$ субъединиц человека (в соотношении 1:1); и содержащие гены $\alpha 9$ и $\alpha 10$ субъединиц человека (в соотношении 1:1), а также $\alpha 7$ субъединицы крысы или мутантной формы $\alpha 7$ субъединицы крысы [L119D]) инъецировались в ооцит в количестве 9,2 нг (23 нл раствора мРНК с концентрацией 400 нг/мкл). Перед электрофизиологическими измерениями инъецированные ооциты содержались в буфере для инкубации ооцитов в течение 48-120 часов при постоянной температуре +18°C, а в некоторых случаях дополнительно выдерживались в холодильнике следующие 24 часа. Смена буфера осуществлялась каждые 24 часа.

Электрофизиологический анализ

Измерения проводились при помощи дифференциального усилителя TURBO TEC-03X (Drummond, Германия) методом двухэлектродной фиксации потенциала (TEVC, two-electrode voltage clamp). В данном методе внутрь ооцита вводятся два стеклянных микроэлектрода, заполненных раствором 3М KCl (Рисунок 17). Один из электродов (токовый) постоянно генерирует электрический ток, устанавливая мембранный потенциал на заданном уровне –60 мВ. Второй электрод (регистрирующий) используется для регистрации изменения тока через мембрану под действием лигандов. Затем при помощи токового электрода текущий мембранный потенциал снова приводится к величине, равной –60 мВ. Компьютер регистрирует ток, необходимый для возобновления заданного мембранного потенциала, и значения этого тока используются для оценки эффективности действия агонистов.

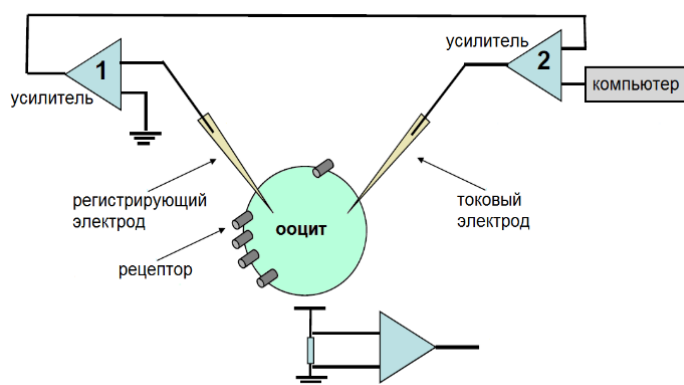


Рисунок 17. Принцип устройства установки для регистрации мембранных токов методом двухэлектродной фиксации потенциала.

Объем камеры, в которой находился ооцит, составлял 50 $\mu\text{л}$. Растворы лигандов различных концентраций готовились на основе буфера Barth's solution или буфера NFR (в случае регистрации токов $\alpha 7$ nAHP и мутантной формы L119D, $\alpha 7$ /ГлиР и мутантной формы E189A, $\alpha 3\beta 2$ nAHP, $\alpha 4\beta 2$ nAHP, 5-HT₃AP), или буфере Ba^{2+} Ringer's solution (в случае $\alpha 9\alpha 10$ nAHP). Тестировании соединений на $\alpha 9\alpha 10$ nAHP проводилось в буфере, не содержащем ионы кальция, в данной работе был использован Ba^{2+} Ringer's solution. Эта методическая особенность связана с тем, что при активации $\alpha 9\alpha 10$ рецепторов происходит открытие ионного канала и в клетку проходят ионы не только одновалентные ионы (калий и натрий), но и ионы кальция, которые запускают ток калиевых ионов посредством внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов. Амплитуда ацетилхолин-индуцированного тока через $\alpha 9\alpha 10$ nAHP гораздо меньше, чем последующего тока, обусловленного выходом ионов калия, поэтому содержание ионов Ca^{2+} снаружи клетки должно быть минимальным, что достигается сменой буфера на другой, не содержащий ионов кальция, или инкубацией клеток с ВАРТА [252].

Объем раствора вносимого раствора лиганда составлял 100 $\mu\text{л}$, промывка буфером (от 1000 $\mu\text{л}$) происходила в течение 5 мин между аппликациями лигандов. В экспериментах по тестированию различных антагонистов и модуляторов, проводилась стадия преинкубации (5 мин), в которой растворы исследуемых лигандов добавлялись к ооциту до аппликации раствора агониста, также содержащего антагонист/модулятор. Амплитуда агонист-индуцированных ответов после преинкубации с антагонистом/модулятором сравнивалась с амплитудой ответов до преинкубации, и разница в амплитудах использовалась для оценки эффекта антагониста/модулятора.

2.2.4. Цитохимия и кальциевый имиджинг

Культивирование клеточной линии мышинной нейробластомы Neuro2a

Культивирование и субкультивирование клеток проводилось в стерильных условиях. Клетки линии мышинной нейробластомы Neuro2a содержались в культуральных флаконах 25 cm^2

(Corning, США), наполненных ростовой средой, состоящей из среды DMEM (ПанЭко, Россия), эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, PAA Laboratories GE, Австрия) в количестве 10%, антибиотика гентамицина (КРКА, Россия) в концентрации 50 мкг/мл и антимикотика амфотерицина В (Ф-Синтез, Россия) в концентрации 2,5 мкг/мл при 37°C в CO₂-инкубаторе MCO-15AC (Sanyo, Япония) с 5%-ным содержанием CO₂. При достижении плотности клеток во флаконе равной 400000 клеток/мл проводилось субкультивирование клеток с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия) в новый флакон в концентрации 50000 клеток/мл.

Выращивание клеток линии мышинной нейробластомы Neuro2a на стеклах и в 96-луночных культуральных планшетах

Все манипуляции проводились в стерильных условиях.

Приготовление стекол, покрытых полилизинном. На стекло диаметром 12 мм, (Menzel Glaser, Германия) наносили каплю стерильного раствора полилизина с концентрацией 10 мг/л таким образом, чтобы капля покрывала всю поверхность стекла, оставляли при комнатной температуре на 1 час. После промывали стекла стерильной водой.

Посев клеток линии мышинной нейробластомы Neuro2a на стекла. Стекло, обработанное полилизинном помещали в лунку 24-луночного планшета (Corning, США). Затем наносили на него суспензию клеток в количестве 25000 клеток/стекло в ростовой среде. Оставляли при комнатной температуре на 20 мин, позволяя клеткам суспензии осесть на поверхность стекла, и добавляли дополнительный объем ростовой среды до конечного объема 500 мкл в лунке, и планшет со стеклами помещали в CO₂-инкубатор. Спустя 24 часа проводили трансфекцию клеток.

Посев клеток линии мышинной нейробластомы Neuro2a в планшеты. В каждую лунку 96-луночного планшета с черными стенками (Corning, США) вносили 100 мкл раствора клеток с концентрацией 50000 клеток/мл в ростовой среде, затем планшет помещали в CO₂-инкубатор. Спустя 24 часа проводили трансфекцию клеток.

Трансфекция клеток линии мышинной нейробластомы Neuro2a смесью плазмидных ДНК

Все манипуляции с клетками проводились в стерильных условиях. В качестве трансфецирующего агента использовался липофектамин (Invitrogen, США). В каждую лунку, где находилось стекло, или ячейку 96-луночного планшета добавляли смесь плазмид с липофектамином, составляющую 1/10 часть от объема ростовой среды в лунке. Конечные концентрации липофектамина и плазмид в лунках указаны в Таблице 5. Сначала проводили инкубацию смеси плазмид с липофектамином в бессывороточной среде DMEM при комнатной температуре в течение 15 мин, предварительно хорошо перемешав содержимое. Потом смесь плазмид с липофектамином добавляли к клеткам и оставляли на 16-20 часов, планшет при этом переносили в CO₂-инкубатор. После отбирали клеточную среду, содержащую остатки смеси

липофектамина и плазмид, и заменяли свежей ростовой средой. Планшет помещали в CO₂-инкубатор на 48 – 72 часа, замену среды проводили каждые 24 часа. Через 48 – 72 часа анализировали экспрессию рецептора на поверхности клеток окраской флуоресцентно-меченым α -бунгаротоксином AlexaFluor555- α -Bgt (Invitrogen, США) или методом кальциевого имиджинга.

Таблица 5. Состав смеси для трансфекции клеток линии Neuro2a

α7 нАХР и мутантные формы		Мышечный α1β1ϵд нАХР и мутантные формы	
<i>Трансфецирующий агент</i>	<i>Конечная концентрация, μл/мл</i>	<i>Трансфецирующий агент</i>	<i>Конечная концентрация, μл/мл</i>
Липофектамин	2,4	Липофектамин	2,4
<i>Плазмиды</i>	<i>Конечная концентрация, μг/мл</i>	<i>Плазмиды</i>	<i>Конечная концентрация, μг/мл</i>
h α 7-рСЕР4*	0,4	m α 1-рRBG4*	0,1
h α 7[Q117T]-рСЕР4*		m α 1[G153S]-рRBG4*	
h α 7[Y118W]-рСЕР4*		m α 1[Y190F]-рRBG4*	
h α 7[S184N]-рСЕР4*		m α 1[N217K]-рRBG4*	
h α 7[E185V]-рСЕР4*		m α 1[S352I]-рRBG4*	
h α 7[F187S]-рСЕР4*		m β 1-рRBG4	0,1
r α 7-рсDNA3*		m ϵ -рRBG4	0,1
r α 7[L119D]-рсDNA3*		m δ -рRBG4	0,1
NACHO-рCMV6-XL5**	0,1 – 0,2	рCase12-cyto**	0,2
RIC-3-рCMV6-XL5**			
рCase12-cyto**	0,1	* В трансфецирующей смеси присутствует плаزمида с геном дикого типа или одна из мутантных форм; ** Присутствие плазмиды в составе трансфецирующей смеси необязательно и определяется целями эксперимента.	

Окраска клеток флуоресцентно-меченым α -бунгаротоксином

Стекло с клетками, экспрессирующими α 7 или мышечный нАХР или их мутантные формы, однократно промывали буфером PBS. Фиксацию клеток проводили в темноте 4% раствором параформальдегида в течение 15 мин. Отмыв буфером PBS в объеме 500 μ л от фиксирующего раствора проводили три раза в течение 5 мин. Для блокирования неспецифической сорбции и пермеабиллизации клеток их инкубировали с буфером PBS, содержащим 0,5% Tween-20 и 1% БСА, в течение 30 мин при комнатной температуре. После отбирали пермеабиллизующую смесь и вносили 300 μ л 45 нМ раствора флуоресцентно-меченого α -бунгаротоксина (AlexaFluor555- α Bgt, Invitrogen, США), стекла инкубировали в течение ночи в темноте при комнатной температуре. На следующий день отмывали клетки буфером PBS три раза в течение 5 мин. Стекла ополаскивали дистиллированной водой и затем обрабатывали 50%-ным раствором глицерина, приготовленным на основе 0,1 М натрий-фосфатного буфера, рН 8,3. Преинкубация клеток со 100-кратным молярным избытком

немеченого α -кобратоксина (предоставлен проф. Уткиным Ю.Н., ИБХ РАН, Россия) предотвращала их окрашивание с помощью Alexa Fluor555- α Bgt, что служило доказательством специфичности связывания флуоресцентно-меченого токсина. Другим отрицательным контролем служило окрашивание клеток, трансфицированных смесью только двух плазмид, содержащих гены шаперона NACHO или Ric3 и кальциевого сенсора Case12. Связывание флуоресцентно-меченого α -бунгаротоксина с рецептором детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа IX71 (Olympus, Япония) с соответствующим набором светофильтров. Анализ флуоресценции клеток проводили с помощью программного обеспечения Cella (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия), CellX (Department of Biosystems Science and Engineering, Швейцария) и Image J (National Institutes of Health, США).

Окраска клеток этиловым эфиром тетраметилпродамина и иодистым пропидием

Для анализа жизнеспособности спустя 48-72 часа после трансфекции, клетки линии Neuro2a инкубировались с 20 нМ раствором этилового эфира тетраметилпродамина (TMRE, Invitrogen, США) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Затем клетки промывались наружным электрофизиологическим буфером. Мертвые клетки идентифицировались в ходе окраски иодистым пропидием (50 нг/мл, BD Biosciences, США) в течение 5 мин, затем клетки также промывались наружным электрофизиологическим буфером. Флуоресценция клеток после окраски детектировалась при помощи флуоресцентного микроскопа (Olympus, Япония), дальнейший анализ проходил с использованием программного обеспечения Cella (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия) и Image J (National Institutes of Health, США).

Кальциевый имиджинг

Для определения внутриклеточного содержания ионов кальция использовался генетически кодируемый сенсор Case12 (Евроген, Россия). Сенсор позволяет напрямую оценивать изменения концентрации Ca^{2+} в диапазоне от нано- до микромолей/л с высоким отношением сигнала к шуму. Быстрое и обратимое связывание Case12 с ионами кальция позволяет использовать сенсор для мониторинга уровня кальциевых осцилляций в клетке. В ответ на повышение концентрации Ca^{2+} происходит увеличение интенсивности флуоресценции сенсора. Длина волны возбуждающего света для Case12 лежит в синей области спектра (491 нм), эмиссия происходит в зеленой области (516 нм) [114].

Кальциевый имиджинг отдельных клеток

Для детектирования флуоресценции кальциевого сенсора Case12, экспрессируемого в клетках линии Neuro2a, использовался флуоресцентный микроскоп IX71 (Olympus, Япония) с соответствующим набором светофильтров и объективом с увеличением 20X. Стекло с клетками

помещалось в камеру, объемом 400 μ л, куда подавались исследуемые растворы с помощью автоматической пипетки, отвод растворов осуществлялся вакуумным насосом. Растворы лигандов $\alpha 7$ нАХР готовились на основе наружного электрофизиологического раствора для клеток. Все растворы подавались в камеру в объеме 1 мл. Последовательность стадий кальциевого имиджинга $\alpha 7$ рецептора и его мутантных форм включала стадию преинкубации (1 мин) с раствором PNU120596 в концентрации 10 μ М (Tocris, Великобритания); затем стадию аппликации агониста (15 сек), растворы агониста также содержали 10 μ М PNU120596; и, наконец, стадию отмыва 5 мл наружного электрофизиологического раствора (10-15 мин). В случае рецептора мышечного типа позитивный аллостерический модулятор PNU120596 не использовался. Преинкубация клеток с 3 μ М раствором α -кобратоксина подавляла действие тестируемых агонистов, подтверждая их специфическое связывание с $\alpha 7$ или $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР или их мутантными формами.

Изменения интенсивности флуоресценции клеток фиксировались видеокамерой XM10 (Olympus, Япония) при выдержке 250-500 мс. Обработка видеозаписей и последующий анализ данных проводились с использованием программ ImageJ (National Institutes of Health, США), OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Office Excel (Microsoft, США).

Кальциевый имиджинг популяции клеток

Во всех лунках 96-луночного планшета с трансфицированной клеточной культурой проводили замену ростовой среды на наружный электрофизиологический буфер. Последовательность стадий кальциевого имиджинга $\alpha 7$ рецептора и его мутантных форм включала стадию преинкубации (20 мин) с раствором PNU120596 в концентрации 10 μ М (Tocris, Великобритания); затем стадию аппликации агониста, растворы агониста также содержали 10 μ М PNU120596. Подачу растворов агонистов проводили многоканальной пипеткой непосредственно перед измерением интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12. В кальциевом имиджинге популяции клеток отсутствовала стадия отмыва буфером после аппликации раствора агониста. В случае рецептора мышечного типа позитивный аллостерический модулятор PNU120596 не использовался. Преинкубация клеток с 3 μ М раствором α -кобратоксина подавляла действие тестируемых агонистов, подтверждая их специфическое связывание с $\alpha 7$ или $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР или их мутантными формами. При изучении действия антагонистов или модуляторов использовался преинкубационный раствор, содержащий лиганд в определенной концентрации, также антагонисты могут подаваться наряду с аппликацией агониста, минуя стадию преинкубации.

Изменения флуоресценции сенсора детектировались с помощью планшетного флуориметра Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Финляндия) в режиме Kinetics GFP, число циклов измерения составляло 80, время одного цикла – 2 сек. Анализ изменений интенсивности

флуоресценции проводили с использованием программ OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Office Excel (Microsoft, США).

Кальциевый имиджинг популяции клеток с использованием красителя Fluo-4

Для определения внутриклеточного содержания ионов кальция использовался флуоресцентный краситель Fluo-4 (Thermo Fisher Scientific, США). Непосредственно перед экспериментом по кальциевому имиджингу во всех лунках 96-луночного планшета с трансфецированной клеточной культурой проводили замену ростовой среды на наружный электрофизиологический буфер, содержащий 0,92 мМ красителя Fluo-4 и 1,25 мМ пробенецида (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки инкубировались с такой смесью в темноте в течении 30 мин при 37°C, а затем еще 30 мин при комнатной температуре. Преинкубацию и добавление растворов агонистов проводили аналогично, как описано в выше. Изменения флуоресценции красителя Fluo-4 детектировались, как и в случае использования генетически кодируемого сенсора Case12, с помощью планшетного флуориметра Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Финляндия) в режиме Kinetics GFP, число циклов измерения составляло 80, время одного цикла – 2 сек. Анализ изменений интенсивности флуоресценции проводили с использованием программ OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Office Excel (Microsoft, США).

2.2.5. Радиолигандный анализ

В конкурентном радиолигандном анализе оценивается способность исследуемых соединений вытеснять радиоактивно меченный α -бунгаротоксин ($[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$) с ортостерических участков его связывания на АЦХСБ или nАХР. Сначала *Aplysia californica* АЦХСБ (в конечной концентрации 140 нМ), мембраны электрического органа ската *Torpedo californica*, содержащие $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ nАХР мышечного типа (с конечной концентрацией токсин-связывающих сайтов 1,25 нМ) или клетки линии GN4C₁, экспрессирующие нейрональный $\alpha 7$ nАХР человека (в которых конечная концентрация токсин-связывающих сайтов равна 0,4 нМ), преинкубируются с исследуемыми соединениями в различных концентрациях в объеме 50 $\mu\text{л}$ связывающего буфера (20 мМ Трис-НСl, 1 мг/мл БСА, pH 8,0) в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем к образцам добавляется $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ в конечной концентрации 0,1 – 0,2 нМ и инкубируется в течение 5 мин. Процесс удаления несвязавшегося $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ осуществлением быстрой трехкратной фильтрацией (по 3 мл) реакционной смеси связывающим буфером через GF/C фильтры (Whatman, Великобритания), предварительно обработанные 0,25% полиэтиленимином. В качестве контрольного эксперимента служит аналогичный опыт с преинкубацией (3 ч) АЦХСБ или nАХР с 30 μM α -кобратоксином (αCtx). Количество связавшегося $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{Bgt}$ определяется на

γ-счетчике Wallac Wizard 1470 (GMI Inc., США). Результаты анализируются с получением параметров взаимодействия исследуемых соединений с соответствующими мишенями (в виде значений IC₅₀) при помощи программы OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, USA).

2.2.6. Биоинформатические методы

Выравнивание аминокислотных последовательностей

Выравнивание аминокислотных последовательностей субъединиц nAHP проводилось при помощи онлайн-программы Clustal Omega (EMBL-EBI, Великобритания).

Молекулярная динамика

Для изучения молекулярной динамики комплекса эписбатидина и α7 nAHP (или его мутантных форм) использовалась известная кристаллическая структура химеры α7/АЦХСБ со связанной молекулой эписбатидина (PDB 3SQ6). Аминокислотные остатки в выбранных положениях были заменены при помощи программного обеспечения UCSF Chimera. Параметры силового поля молекулы эписбатидина были получены с помощью инструмента Swissparam. Для всех моделей производилась минимизация энергии, после чего проводилась 100 пс молекулярная динамика при постоянном объеме и температуре (NVT) и постоянных давлении и температуре (NPT) с применением гармонических стабилизирующих сил, приложенных к тяжелым атомам. Затем проводилось молекулярно-динамическое моделирование длительностью 10 нс. Все операции проводились с помощью стандартного набора инструментов из пакета GROMACS 5.0. Использовались следующие параметры: силовое поле Charmm 27, электростатические Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия отсекались на 1,0 нм. Использовалась ромбододекаэдрическая периодическая ячейка с характерным расстоянием 1,2 нм.

Компьютерное моделирование

Докинг комплексов *Aplysia californica* АЦХСБ с антагонистами был выполнен и при помощи программного обеспечения Autodock 4.2. Его результаты были проанализированы с помощью программы MGL Tools 1.5.6 со следующими установленными параметрами: размер популяции генетического алгоритма – 150, количество оценок – 25000000 и количество запусков – 100. В основу моделирования легла известная структура комплекса *Aplysia californica* АЦХСБ и *d*-ТС, в которой связанная молекула *d*-ТС способна принимать три различных положения (PDB 2XYT) [96]. Для исследуемых антагонистов (ВВІQA1 и ВВІQA2) был осуществлен докинг с тремя возможными конформациями лиганд-связывающих сайтов. Результаты были сгруппированы и проанализированы с помощью MGL Tools 1.5.6 и визуализированы в программе UCSF Chimera [253] (University of California, США).

2.2.7. Статистический анализ данных

Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), среднее \pm стандартное отклонение (SD) или среднее с 95% доверительным интервалом для указанного числа независимых экспериментов (n). Статистический анализ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим тестом Тьюки) выполнялся в программе OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, USA). Во всех анализах за статистически значимые различия принималось $p < 0,05$.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Метод кальциевого имиджинга с Case12 для изучения специфичности $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP

Метод кальциевого имиджинга основан на временной трансфекции клеток линии мышины нейробластомы Neuro2a плазмидами, содержащими гены рецептора ($\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ или $\alpha 7$ nAHP) и генетически-кодированного одноволнового кальциевого сенсора Case12. В ходе кальциевого имиджинга происходит регистрация увеличения интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12 в ответ на агонист-индуцированное повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ или $\alpha 7$ nAHP. Метод кальциевого имиджинга имеет две модификации. В первой регистрация интенсивности флуоресценции Case12 происходит с помощью микроскопа, такая техника позволяет напрямую регистрировать ответы единичных клеток, и в такой модификации возможно зафиксировать ответы одной и той же клетки на действие различных лигандов в нескольких концентрациях. Однако такой метод анализа достаточно трудоемок, в связи с чем была предложена другая модификация метода – кальциевый имиджинг клеточной популяции. Для целой популяции клеток одной лунки 96-луночного планшета проводится оценка интенсивности флуоресценции посредством планшетного флуориметра. Главное преимущество данной модификации – это высокая скорость получения данных, т.к. регистрация интенсивности флуоресценции возможна одновременно в нескольких лунках.

Гетерологическая экспрессия $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP

Для подтверждения экспрессии $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP в клетках линии мышины нейробластомы Neuro2a проводили окраску клеток флуоресцентно-меченым α -бунгаротоксином AlexaFluor555- α Bgt в соответствии с ранее опубликованной методикой [86]. Согласно результатам цитохимического окрашивания с использованием AlexaFluor555- α Bgt, большинство трансфицированных клеток Neuro2a экспрессировали $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP: $76,5 \pm 2,1\%$ и $68,1 \pm 4,2\%$ от общего числа клеток были окрашены AlexaFluor555- α Bgt в отсутствие или при коэкспрессии с Case12, соответственно (среднее \pm SEM, Рисунок 18Б, В).

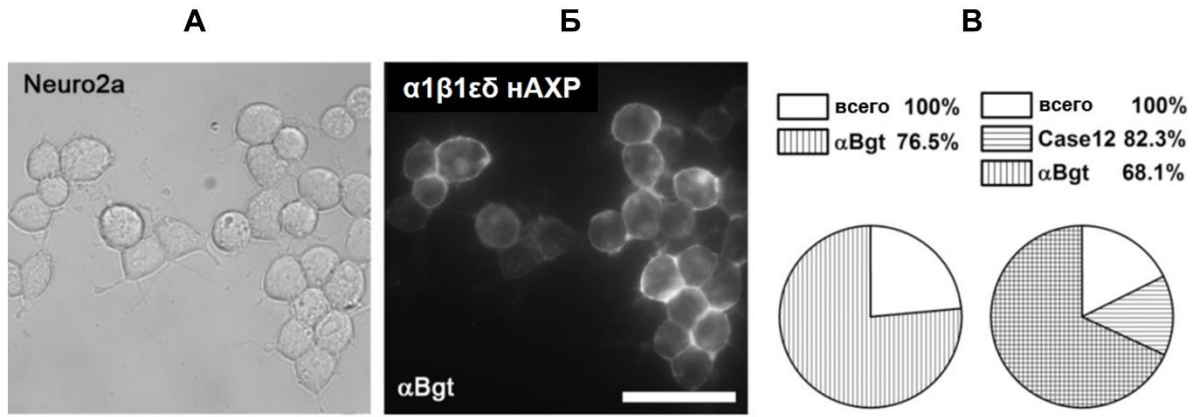


Рисунок 18. Функциональная экспрессия $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР и генетически-кодируемого флуоресцентного кальциевого сенсора Case12 в клетках линии мышинной нейробластомы Neuro2a. (А, Б) Цитохимическая детекция $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР с помощью Alexa Fluor 555- α Bgt (50 нМ, α Bgt) в клетках Neuro2a. Масштаб 50 μ м. (В) Круговые диаграммы отражают процент трансфицированных клеток линии Neuro2a, окрашенных с помощью Alexa Fluor 555- α Bgt в отсутствие ($n = 3$, всего 413, из них 311 клеток окрашены Alexa Fluor 555- α Bgt) или при ко-экспрессии с сенсором Case12 ($n = 3$, всего 1233 клетки, из них 1005 клетки экспрессируют Case12 (Case12) и 834 клеток окрашены Alexa Fluor 555- α Bgt).

Для получения высокого уровня экспрессии $\alpha 7$ nAХР проводили временную трансфекцию клеток мышинной нейробластомы Neuro2a плазмидами, кодирующими $\alpha 7$ nAХР и один из шаперонов NACHO или Ric3. Несмотря на то, что $\alpha 7$ nAХР взаимодействует с множеством клеточных белков в процессе своего биосинтеза, упаковки, сборки и транспорта в плазматическую мембрану, именно шапероны NACHO или Ric3 чрезвычайно важны для функциональной экспрессии $\alpha 7$ рецептора в клетках млекопитающих [45; 49; 52; 254]. Коэкспрессия $\alpha 7$ рецептора с любым из шаперонов приводит к увеличению уровня экспрессии $\alpha 7$ nAХР человека и крысы, причем становится возможным детектировать $\alpha 7$ nAХР, локализованный на плазматической мембране, посредством окраски AlexaFluor555- α Bgt (Рисунок 19А, Б и Г) у значительного числа клеток ($27,6 \pm 0,4\%$, среднее \pm SEM, Рисунок 19Д). Интенсивность окраски AlexaFluor555- α Bgt у клеток различается, но у 95% клеток превышает фоновый уровень окраски (Рисунок 19Е, Ж). В отсутствие шаперона уровень связывания Alexa Fluor 555- α Bgt чрезвычайно низок и практически недетектируем. Специфичность окраски флуоресцентно-меченным α Bgt подтверждается в контрольных экспериментах с использованием 100-кратного избытка немеченого α -кобратоксина (α Ctx), другого α -нейротоксина, эффективного блокатора $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР [255]. Коэкспрессия с геном кальциевого сенсора Case12 не привела к значительному уменьшению уровня экспрессии $\alpha 7$ nAХР (Рисунок 19Д). Интенсивность флуоресценции кальциевого сенсора Case12 в окрашенных AlexaFluor555- α Bgt клетках была выше фоновой, и помимо этого значительно превосходила среднюю интенсивность флуоресценции общего числа клеток линии Neuro2a (Рисунок 19Ж). Однако уровень корреляции между интенсивностями флуоресценции AlexaFluor555- α Bgt и Case12 был достаточно низким (r

= 0,4; корреляционный тест Пирсона, $p = 2,2e-16$; Рисунок 193), что может быть объяснено тем, что уровень флуоресценции Case12 зависит не только от эффективности его экспрессии, а также и от внутриклеточной концентрации ионов кальция.

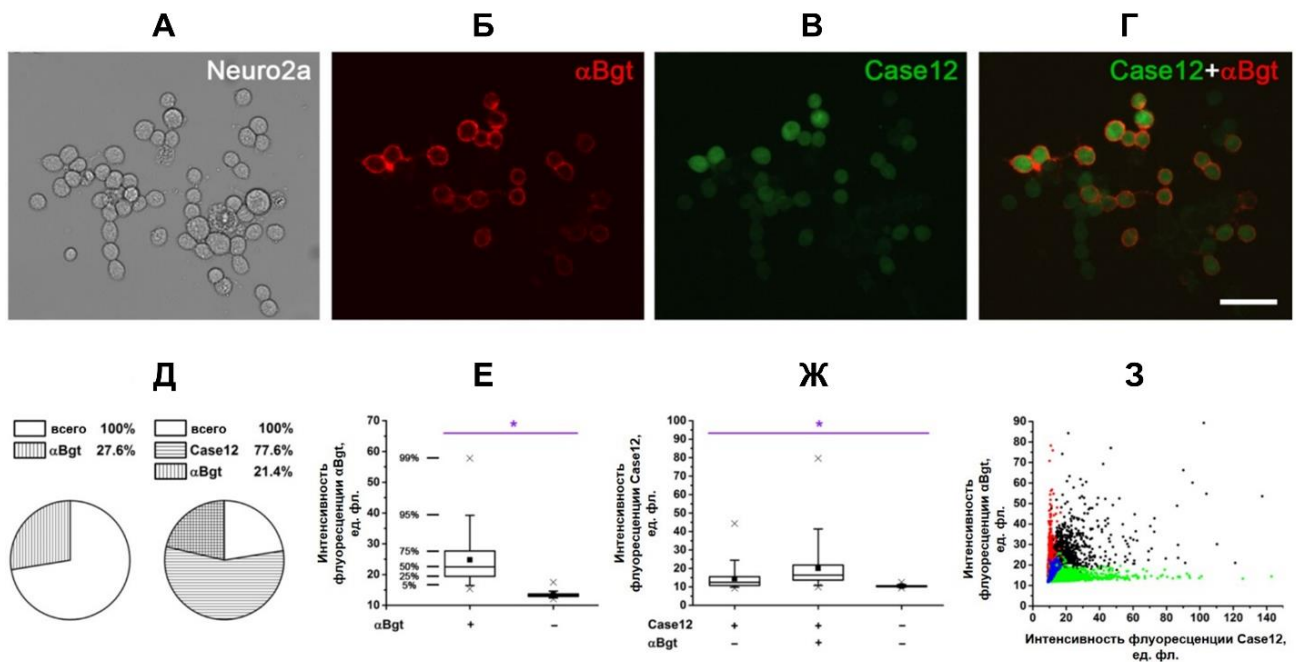


Рисунок 19. Функциональная экспрессия $\alpha 7$ nAChR человека в присутствии шаперона NACHO и генетически-кодируемого флуоресцентного кальциевого сенсора Case12 в клетках линии мышинной нейробластомы Neuro2a. (А, Б) Цитохимическая детекция $\alpha 7$ nAChR с помощью 50 нМ AlexaFluor555- α -бунгаротоксина (α Bgt, красный) и (В, Г) коэкспрессия рецептора с сенсором Case12 (зеленый) в клетках линии Neuro2a. Масштаб 50 μ m. (Д) Круговые диаграммы отражают процент трансфицированных клеток линии Neuro2a окрашенных с помощью AlexaFluor555- α Bgt в отсутствие ($n = 3$, всего 2521, из них 696 клеток окрашены AlexaFluor555- α Bgt) или при коэкспрессии с сенсором Case12 ($n = 3$, всего 3141 клетки, из них 2464 клетки экспрессируют Case12 (Case12) и 745 клеток окрашены AlexaFluor555- α Bgt). (Е) Диаграммы размаха интенсивности флуоресценции AlexaFluor555- α Bgt-окрашенных клеток по сравнению с фоновым уровнем флуоресценции ($n = 3$, 1215 и 7641 клеток, соответственно, t -критерий Стьюдента, $*p < 0,05$). (Ж) Диаграммы размаха интенсивности флуоресценции сенсора Case12 во всей клеточной популяции и у клеток, окрашенных Alexa Fluor 555- α Bgt, а также интенсивность фоновой флуоресценции клеток ($n = 3$, 8315, 1217 и 7643 клетки, соответственно, однофакторный дисперсионный анализ, $*p < 0,05$). (З) Корреляция между интенсивностями флуоресценции AlexaFluor555- α Bgt и Case12 в клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAChR человека, NACHO и Case12 и окрашенных с помощью AlexaFluor555- α Bgt (черные точки, слабая корреляция, $r = 0.4$, корреляционный тест Пирсона, $p = 2,2e-16$, $n = 3$, 1217 клетки). Красные и зеленые точки показывают интенсивности флуоресценции AlexaFluor555- α Bgt и сенсора Case12 у клеток, которые либо были окрашены Alexa Fluor 555- α Bgt и не экспрессировали Case12, либо не окрашены AlexaFluor555- α Bgt, но экспрессировали Case12, соответственно ($n = 3$, 1209 и 8315 клеток, соответственно). Синие точки отражают фоновый уровень интенсивностей флуоресценции ($n = 3$, 7643 клетки).

Уровень жизнеспособности клеток после трансфекции был достаточно высоким, $93,5 \pm 0,7\%$ Case12-экспрессирующих клеток были живыми согласно результатам окрашивания специфическим маркером – этиловым эфиром тетраметилродамина (TMRE, Рисунок 20, верхний ряд). Более того, клетки, экспрессирующие Case12 не окрашивались йодистым пропидием (PI),

маркером мертвых клеток (Рисунок 20, нижний ряд). Поэтому уровень флуоресценции Case12 является удобным индикатором для оценки жизнеспособности клеток.

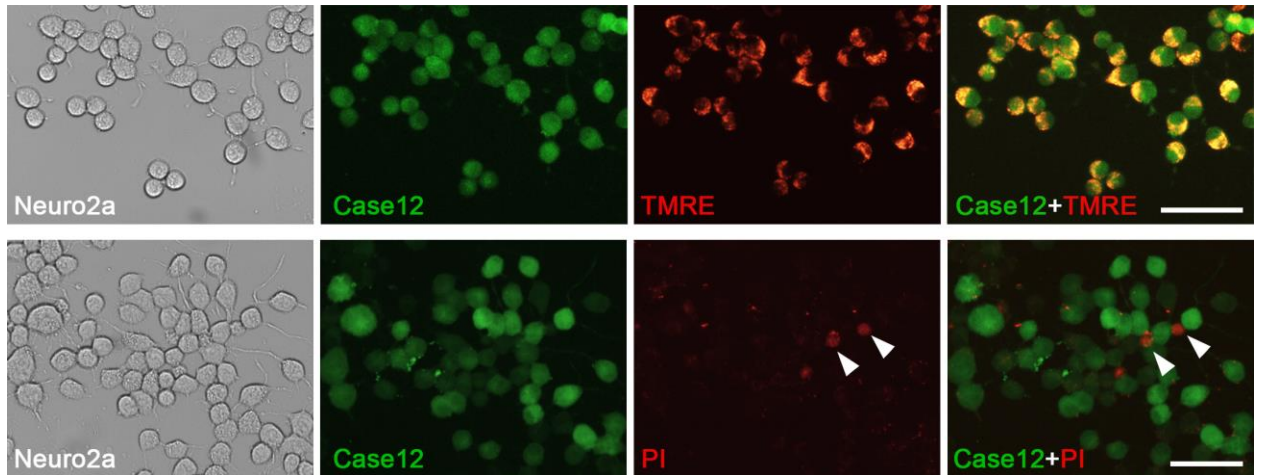


Рисунок 20. Фотографии Case12-экспрессирующих клеток линии Neuro2a (зеленый), окрашенных с помощью специфических маркеров: этилового эфира тетраметилпродамина (TMRE, красный, верхний ряд) и иодистого пропидия (PI, красный, нижний ряд). $93,5 \pm 0,7\%$ (среднее \pm SEM) Case12-экспрессирующих клеток окрашиваются маркером живых клеток, TMRE в концентрации 20 нМ ($n = 3$, всего 1240 клеток). В нежизнеспособных клетках, окрашенных иодистым пропидием, 50 нг/мл, не была обнаружена экспрессия флуоресцентного сенсора Case12 ($n = 3$, всего 1561 клеток). Масштаб 60 μ м.

Кальциевый имиджинг $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP

В экспериментах по кальциевому имиджингу у большинства трансфицированных $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAHP клеток линии Neuro2a происходило увеличение интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12 в ответ на аппликацию растворов агонистов разной концентрации (Рисунок 21А, Б и В). В качестве отрицательного контроля был проведен эксперимент с использованием 2 μ М α Ctx, в присутствии α Ctx не наблюдалось агонист-индуцированного увеличения интенсивности флуоресценции Case12, что свидетельствует о том, что повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция вызвано именно активацией никотиновых рецепторов.

В экспериментах по кальциевому имиджингу с $\alpha 7$ рецептором, экспрессируемым в клетках линии Neuro2a, для снижения скорости десенситизации использовался позитивный аллостерический модулятор PNU120596. В ходе эксперимента клетки преинкубировались с PNU120596 в насыщающей концентрации 10 μ М [80]. Это позволило детектировать агонист-индуцированное увеличение флуоресценции Case12 в $73,5 \pm 1,0\%$ клеток, (среднее \pm SEM), в то время как $77,6 \pm 1,5\%$ клеток (среднее \pm SEM) экспрессировали флуоресцентный кальциевый сенсор Case12 (Рисунок 21А).

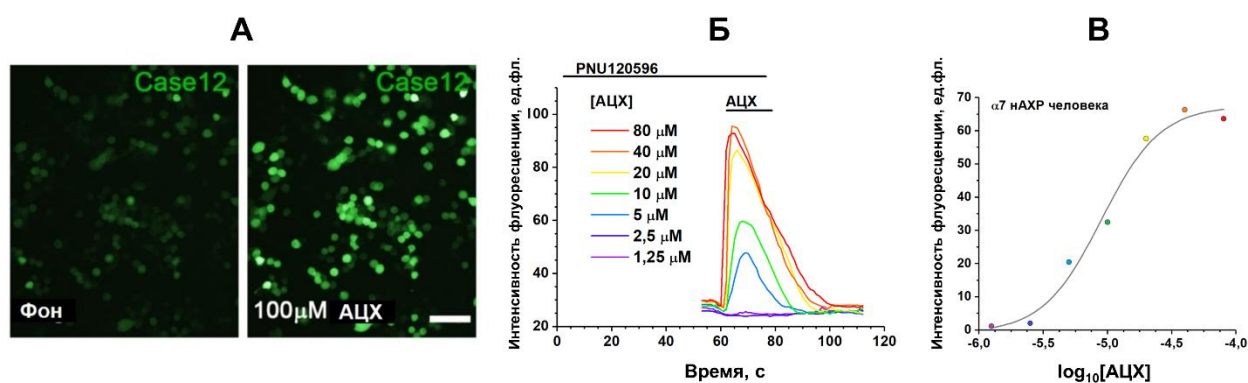


Рисунок 21. Кальциевый имиджинг $\alpha 7$ нАХР. (А) Фотографии клеток линии Neuro 2a, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР человека (масштаб, 100 μM); фотографии демонстрируют увеличение интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12 в ответ на аппликацию 100 μM раствора ацетилхолина (АЦХ). Всего $73,5 \pm 1,0\%$ Case12-экспрессирующих клеток отвечали на аппликацию 100 μM ацетилхолина ($n = 3$, среднее \pm SEM, всего 1191 клетки и 880 клеток, отвечающих на АЦХ). Масштаб 50 μM . (Б) График изменения интенсивности флуоресценции сенсора Case12 в клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР человека, шаперон NACNO и флуоресцентный кальциевый сенсор Case12, в ответ на аппликации АЦХ в различных концентрациях, и (В) соответствующая концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции сенсора Case12. Перед добавлением АЦХ клетки Neuro2a преинкубировались с 10 μM PNU120596, позитивным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ нАХР. ед.фл. – единицы флуоресценции.

В результате кальциевого имиджинга было вычислено значение EC_{50} ацетилхолина для $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ рецептора мыши (Рисунок 22А, Таблица 6), оно подтверждает ранее опубликованные данные электрофизиологических измерений клеток линии НЕК293, гетерологически экспрессирующих мышечный никотиновый рецептор [256]. Также было показано, что $\alpha 7$ нАХР человека и крысы не отличаются по своей аффинности к ацетилхолину и эпибатидину (Рисунок 24А и В, Таблица 8), что также хорошо согласуется со значениями, найденными в литературе [56; 80].

Результаты кальциевого имиджинга с Case12 дополнительно были подтверждены экспериментально в опытах с использованием низкомолекулярного кальциевого индикатора Fluo-4. Результаты, полученные методами кальциевого имиджинга с использованием Case12 и Fluo-4, хорошо согласуются между собой (Рисунки 22Б и 24Б, Таблицы 6 и 8). Таким образом, разработанный метод кальциевого имиджинга с Case12 был впервые использован для тестирования специфичности $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ нАХР. Далее нами была доказана применимость нового метода для исследования специфичности мутантных форм этих рецепторов на примере известных мутантов $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ рецептора.

Кальциевый имиджинг мутантных форм $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР

Сайт-направленный мутагенез проводился по четырем выбранным аминокислотным положениям G153, Y190, N217 и S352 в последовательности $\alpha 1$ субъединицы нАХР, поскольку

важность этих остатков уже была показана ранее при изучении миастений. У пациентов, страдающих от врожденной миастении, детектируется мутация G153S в последовательности экстрацеллюлярного домена $\alpha 1$ субъединицы мышечного nAHP. При экспрессии мутантного рецептора в клеточной линии НЕК293 и в ходе дальнейшего электрофизиологического анализа была показано, что данная мутантная форма рецептора характеризуется повышенной чувствительностью к ацетилхолину [256]. Другая мутация в экстрацеллюлярном домене Y190F приводит к значительному ухудшению аффинности к ацетилхолину [257]. Мутации N217K и S352I также связаны с развитием врожденной миастении, причем остаток N217 располагается в M1 сегменте трансмембранного домена, в то время как остаток S352 в экстрацеллюлярном домене между M2 и M3 сегментами. Мутантный рецептор N217K, экспрессируемый в клетках линии НЕК293, показал большую аффинность к ацетилхолину, по сравнению с рецептором дикого типа [258], а мутация S352I влияет на совмещение процессов связывания агониста и открытия канала [259].

Согласно результатам окрашивания AlexaFluor555- α Bgt, большинство трансфицированных клеток Neuro2a экспрессировали мутантные формы мышечного рецептора, содержащие следующие замены аминокислотных остатков в $\alpha 1$ субъединице: G153S, Y190F, N217K или S352I. В ходе кальциевого имиджинга с Case12 для уже известных мутантных форм подтвердились результаты электрофизиологического анализа: для мутантов G153S и N217K по улучшению, а для Y190F – по ухудшению сродства к ацетилхолину, по сравнению с мышечным рецептором дикого типа [256; 257; 258]. Мутация в положении 352 $\alpha 1$ субъединицы (мутант S352I) не привела к каким-либо значительным изменениям в способности связывать ацетилхолин (Рисунок 22А, Таблица 6).

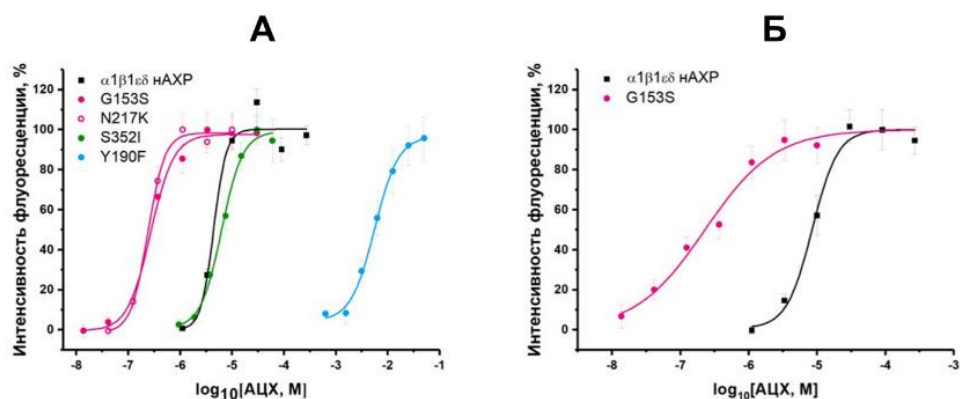


Рисунок 22. Концентрационные зависимости ацетилхолин-индуцированного увеличения интенсивности флуоресценции у клеток линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP дикого типа или мутантные формы G153S, Y190F, N217K и S352I. Для регистрации повышения внутриклеточного содержания кальция использовался (А) генетически-кодируемый сенсор Case12 или (Б) флуоресцентный краситель Fluo-4. n = 4, Среднее \pm SEM.

Таблица 6. Значения EC_{50} ацетилхолина для $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAHP и его мутантных форм, полученные методом кальциевого имиджинга клеточных популяций с использованием генетически-кодированного сенсора Case12 или красителя Fluo-4.

Рецептор	Кальциевый имиджинг	
	Ацетилхолин	
	Среднее EC_{50} (95% ДИ)	
	Case12	Fluo-4
мышечный nAHP	4,39 (3,18 – 6,06) μ M	8,47 (6,24 – 11,51) μ M
мышечный nAHP[G153S]	0,27 (0,19 – 0,39) μ M	0,23 (0,08 – 0,62) μ M
мышечный nAHP[Y190F]	5,58 (3,8 – 8,2) мМ	
мышечный nAHP[N217K]	0,24 (0,17 – 0,32) μ M	
мышечный nAHP[S352I]	6,27 (5,00 – 8,13) μ M	

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

В опытах по кальциевому имиджингу с красителем Fluo-4 были подтверждены фармакологические свойства мутантного рецептора G153S (Рисунок 22Б, Таблица 6). Таким образом, впервые было продемонстрировано успешное использование метода кальциевого имиджинга с применением одноволнового генетически кодированного сенсора Case12 для исследования специфичности мутантных форм nAHP.

3.2. Аминокислотные остатки лиганд-связывающих сайтов $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAHP, определяющие различия в их фармакологических свойствах

Сайт-направленный мутагенез лиганд-связывающего участка $\alpha 7$ nAHP

Субъединица $\alpha 7$, по сравнению с другими субъединицами nAHP, наиболее близка к $\alpha 9$ субъединице на филогенетическом древе (Рисунок 16). Также $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединицы объединяет сходство в их способности формировать гомопентамерные рецепторы [11]. Поэтому кажется довольно интересным, что классические агонисты nAHP, никотин и эпibatидин, действуют совершенно по-разному на $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAHP: они активируют $\alpha 7$ рецептор и блокируют $\alpha 9$. Возможно, такое различие в фармакологических свойствах объясняется различиями в аминокислотных остатках в лиганд-связывающем участке $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAHP (Рисунок 23А).

Для оценки вклада отдельных неконсервативных аминокислотных остатков в уникальные фармакологические свойства $\alpha 9$ nAHP был получен ряд $\alpha 7/\alpha 9$ мутантных форм nAHP, в которых единичные аминокислотные остатки лиганд-связывающего участка $\alpha 7$ nAHP (Рисунок 23А, *красный*) были заменены на соответствующие остатки $\alpha 9$ nAHP (Рисунок 23А, *зеленый*).

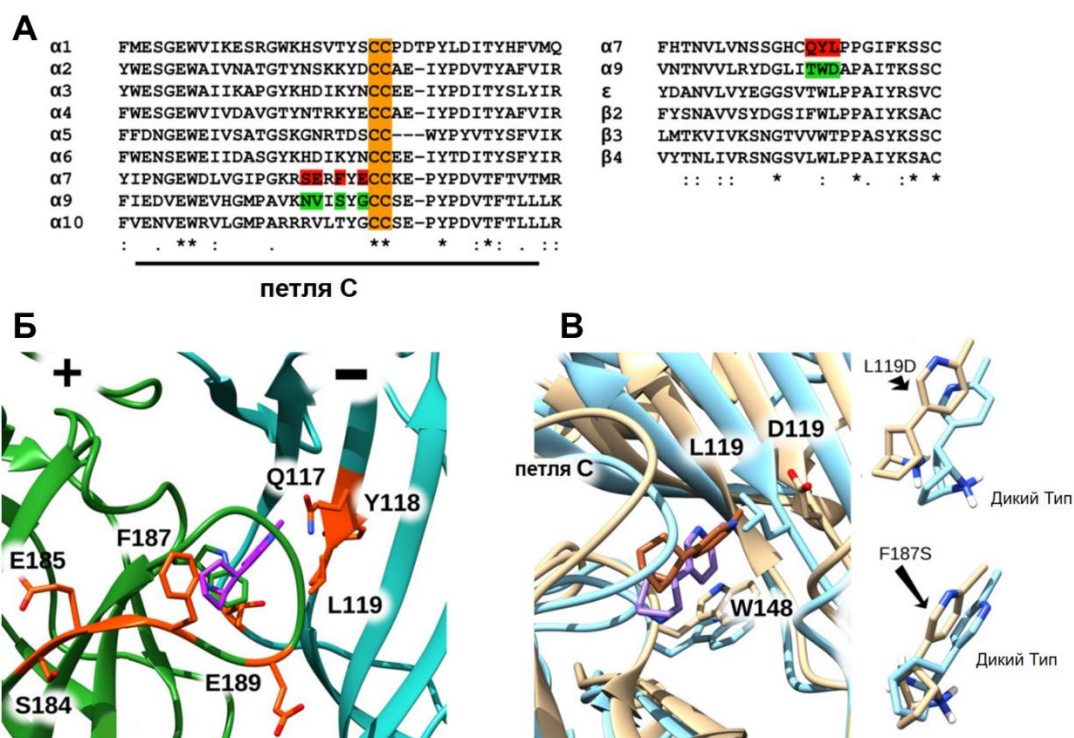


Рисунок 23. Выбор аминокислотных остатков для точечного мутагенеза. **(А)** Выравнивание аминокислотных последовательностей С-петлевого участка основных α субъединиц («+» субъединиц лиганд-связывающего участка) и участков комплементарных $\alpha 7$, $\alpha 9$, β и ϵ субъединиц (или «-» субъединиц). Выбранные для мутагенеза аминокислотные положения $\alpha 7$ субъединицы выделены красным цветом, соответствующие положения в последовательности $\alpha 9$ субъединицы – зеленым, пара консервативных остатков Cys 190, 191 в петле С обозначены оранжевым. **(Б)** Положение молекулы эпibatидина (фиолетовый цвет) в лиганд-связывающем сайте, находящимся в области контакта соседних субъединиц $\alpha 7$ nAChR. Основная («+») субъединица лиганд-связывающего сайта обозначена зеленым цветом, комплементарная («-») субъединица – голубым, выбранные для дальнейшего мутагенеза аминокислотные остатки выделены оранжевым. Структуры построены в программе UCSF Chimera на основе структуры комплекса эпibatидина и химерного белка $\alpha 7$ -АЦХСБ (PDB 3SQ6). **(В)** Изучение молекулярной динамики возможного влияния мутированных аминокислотных остатков на структуру комплекса эпibatидина и химерного белка $\alpha 7$ -АЦХСБ (PDB 3SQ6). К наиболее существенным изменениям в положении эпibatидина в лиганд-связывающем участке приводит замена аминокислотного остатка L119D. Другие мутации не сильно влияют на положение эпibatидина, однако замена аминокислотного остатка F187S приводит к необычному повороту аминокислотной группы молекулы эпibatидина.

Выбор положений аминокислотных остатков для мутагенеза осуществлялся на основе знаний о структуре кристаллического комплекса PDB 3SQ6 химерного белка, содержащего остатки АЦХСБ (модели экстрацеллюлярного домена nAChR) и $\alpha 7$ nAChR, и агониста эпibatидина [22] (Рисунок 23Б), а также изучения молекулярной динамики этого комплекса (Рисунок 23В). Аминокислотные остатки в положениях 117, 118, 119, 184, 185, 187 и 189 (Рисунок 23Б, оранжевый цвет) оказались интересными для мутагенеза с точки зрения их близости к связанной молекуле эпibatидина (Рисунок 23Б, фиолетовый цвет). Исследование молекулярной динамики позволило оценить степень влияния выбранных точечных мутаций на положение и стабильность

комплекса химерного белка и эписбатидина, вследствие чего наиболее перспективными оказались две мутантные формы $\alpha 7$ nAХР: L119D и F187S (Рисунок 23В). Замена остатка лейцина в 119 положении на остаток аспарагиновой кислоты приводит к серьезным изменениям в положении эписбатидина в кармане связывания, а при замене остатка фенилаланина на остаток серина в положении 187 наблюдается необычный поворот аминокислотной группы эписбатидина (Рисунок 23В). Таким образом, остатки L119 и F187 могут играть ключевую роль в связывании эписбатидина с $\alpha 7$ nAХР, т.к. напрямую влияют на структуру комплекса, при этом эти остатки, возможно, также определяют различия в фармакологических свойствах $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAХР. Мутации в других аминокислотных положениях не приводят к значительным изменениям в положении связанной молекулы эписбатидина и, вероятно, не сильно изменяют способность $\alpha 7$ рецептора связывать агонист.

Экспрессия мутантных форм $\alpha 7$ nAХР

Согласно результатам окраски AlexaFluor555- α Bgt, уровень экспрессии мутантных форм $\alpha 7$ nAХР Q117T, Y118W, L119D, S184N, E185V был сопоставим с уровнем экспрессии рецептора дикого типа $\alpha 7$ nAХР. Уровень экспрессии мутантной формы F187S был значительно ниже (приблизительно у 5% клеток), в то время как для мутантной формы E189G связывание Alexa Fluor 555- α Bgt не было обнаружено вовсе. Таким образом, большинство мутантных форм экспрессируются в клетках линии Neuro2a и детектируются при помощи окраски AlexaFluor555- α Bgt. Вместо мутантной формы E189G была получена аналогичная ей мутация E189A последовательности химерной субъединицы $\alpha 7$ /ГлиР. Химерная субъединица состоит из экстрацеллюлярного домена $\alpha 7$ nAХР и трансмембранного и цитоплазматического доменов $\alpha 1$ глицинового рецептора [260]. Получить эффективную экспрессию данной конструкции в ооцитах *X. laevis* достаточно просто, поэтому анализ специфичности мутантной формы E189A проводился электрофизиологическим методом.

Кальциевый имиджинг отдельных клеток

Интенсивность флуоресценции кальциевого сенсора у отдельных клеток линии Neuro2a детектировалась при помощи флуоресцентного микроскопа и компьютерной программы Image J. Использование позитивного аллостерического модулятора PNU120596 не должно отразиться на способности $\alpha 7$ nAХР или его мутантных форм связывать классические агонисты (ацетилхолин и эписбатидин), т.к. сайт связывания PNU120596 находится в трансмембранном участке, который отдален от ортостерических сайтов экстрацеллюлярного домена [201]. На основе амплитуд кальциевых ответов были построены концентрационные кривые для отдельных клеток, экспрессирующих человеческий $\alpha 7$ nAХР дикого типа или мутантные формы Q117T и Y118W, и рассчитаны соответствующие значения EC_{50} ацетилхолина (Таблица 7). Согласно полученным

результатам $\alpha 7$ рецептор дикого типа и мутантные формы Q117T и Y118W практически не отличаются сильно по способности связывать агонист. Эти результаты были подтверждены результатами электрофизиологической записи методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp в конфигурации целой клетки (Таблица 7)).

Таблица 7. Значения параметра EC_{50} ацетилхолина для $\alpha 7$ nAХР и его мутантных форм Q117T и Y118W, полученные методами кальциевого имиджинга отдельных клеток и локальной фиксации потенциала клеток.

Рецептор	Кальциевый имиджинг	Электрофизиология
	Ацетилхолин EC_{50} (сред. \pm SEM), μM	Ацетилхолин EC_{50} (сред. \pm SD), μM
$\alpha 7$ nAХР человека	$8,17 \pm 0,56$	19 ± 4
$\alpha 7$ nAХР [Q117T] человека	$10,19 \pm 0,72$	14 ± 1
$\alpha 7$ nAХР [Y118W] человека	$5,96 \pm 0,34$	11 ± 3

Все растворы лигандов содержали $10 \mu M$ PNU120596. Представлены средние значения EC_{50} ацетилхолина для 76-199 отдельных клеток Neuro2a в 4 – 7 независимых экспериментах по кальциевому имиджингу (среднее \pm SEM), и для 6 – 7 клеток в 3 независимых электрофизиологических экспериментах (среднее \pm SD).

Оставшиеся мутантные формы $\alpha 7$ nAХР были протестированы методом кальциевого имиджинга отдельных клеток только при использовании высокой концентрации ($100 \mu M$) ацетилхолина. Были зарегистрированы ответы клеток, экспрессирующих мутантные формы L119D, S184N, E185V и F187S, но не было обнаружено ответов клеток, экспрессирующих мутантную форму E189G. Интересно, что экспрессия этого мутанта не подтверждалась в ходе окрашивания AlexaFluor555- α Bgt. Поэтому мутантная форма E189G была исключена из дальнейшего исследования и вместо нее был получен мутант E189A химерного $\alpha 7$ /ГлиР, который хорошо экспрессировался в ооцитах *X. laevis*.

Кальциевый имиджинг популяции клеток

Интенсивность флуоресценции кальциевого сенсора у популяции клеток линии Neuro2a, выращенных в лунках черного 96-луночного планшета, детектировалась при помощи планшетного флуориметра. Время преинкубации с позитивным модулятором PNU120596 было увеличено до 20 мин, но это никак не отразилось на амплитуде кальциевых ответов. В результате эксперимента были получены концентрационные кривые ответов клеток, экспрессирующих $\alpha 7$ nAХР человека или крысы, или же мутантные формы, в ответ на аппликацию агонистов (ацетилхолин и эпибатидин), и для всех рецепторов были вычислены значения EC_{50} каждого из агонистов (Таблица 8). Мутантная форма Q117T не отличается по своей аффинности к ацетилхолину и эпибатидину по сравнению с рецептором дикого типа (Рисунок 24А и В; Таблица 8). Интересно, что ранее уже было показано, что остаток 117 $\alpha 7$ рецептора участвует в

связывании α -коконотоксина ImI, но он не вовлечен во взаимодействие с α -коконотоксином PnIV или α Bgt [261; 262].

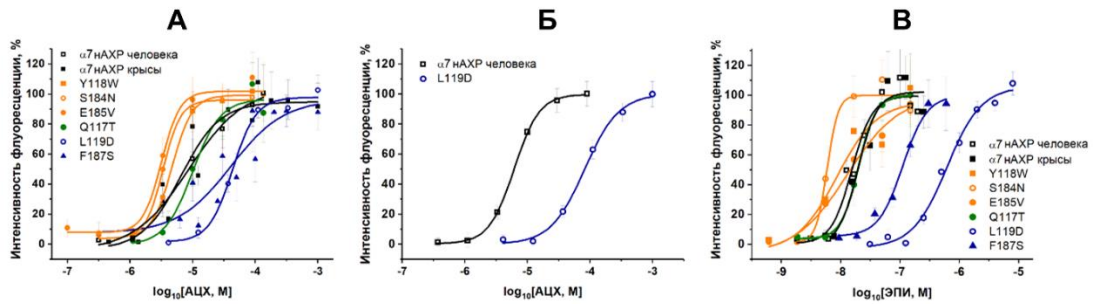


Рисунок 24. Концентрационные зависимости агонист ((А, Б) ацетилхолин и (В) эпибатидин)-индуцированного повышения интенсивности флуоресценции в клетках линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAChR дикого типа или мутантные формы. Для регистрации повышения внутриклеточного содержания кальция использовался (А, В) генетически-кодируемый сенсор Case12 или (Б) флуоресцентный краситель Fluor-4. Перед добавлением агонистов клетки преинкубировали в течение 20 мин с 10 μ M PNU120596, позитивным аллостерическим модулятором $\alpha 7$ nAChR. $n = 4$, среднее \pm SEM.

Таблица 8. Значения EC_{50} агонистов для $\alpha 7$ nAChR и его мутантных форм, полученные методом кальциевого имиджинга клеточных популяций и двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*.

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

В экспериментах по кальциевому имиджингу все растворы лигандов содержали 10 μ M PNU120596. Представлены средние значения EC_{50} и 95% доверительные интервалы (ДИ), $n = 4 - 6$.

* В экспериментах вместо генетически кодируемого кальциевого сенсора Case12 использовался химический краситель Fluor-4.

Мутантные формы Y118W, S184N и E185V продемонстрировали небольшое увеличение аффинности к обоим агонистам, но 95% доверительные интервалы средних значений EC₅₀ перекрываются с таковыми для $\alpha 7$ рецептора дикого типа (Рисунок 24А и В; Таблица 8). Причем ранее уже было продемонстрировано, что при замене E181S (или E185S в используемой нами нумерации) в АЦХСБ- $\alpha 7$ химерном белке происходит увеличение аффинности рецептора к ацетилхолину [22].

В то же время мутации в положениях 187 и 119 (мутантные формы F187S и L119D) привели к значительному снижению аффинности к ацетилхолину и эпибатидину (Рисунок 24А и В; Таблица 8). Вычисленные значения EC₅₀ ацетилхолина и эпибатидина для $\alpha 7$ nAХР [F187S] больше в 5- и 7-раз, а для $\alpha 7$ nAХР [L119D] больше в 5- и 40-раз, соответственно, по сравнению с рецептором дикого типа (Таблица 8). Результаты кальциевого имиджинга с использованием низкомолекулярного индикатора Fluo-4 подтвердили фармакологические свойства мутантной формы рецептора L119D (Рисунок 24Б и Таблица 8). При этом в экспериментах с Fluo-4 также необходимо использовать 10 μ M PNU120596 для того, чтобы стала возможной детекция агонист-индуцированного повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция у клеток Neuro2a.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа комплекса химерного белка АЦХСБ- $\alpha 7$ и эпибатидина [22] и результатам исследования молекулярной динамики, аминокислотный остаток F187 формирует контакт с остатком R194, находящимся в рецепторной С-петле. Взаимодействия ароматического кольца с пролиновым остатком играют важную роль в стабильности белка [263], и F187 может участвовать с движением С-петли при открытии ионного канала. Интересно, что только в $\alpha 7$ nAХР имеет место такое взаимодействие ароматического кольца и пролинового остатка, в отличие от других субъединиц nAХР (Рисунок 23А). Аминокислотный остаток L119, находящийся на комплементарной стороне ортостерического лиганд-связывающего участка, участвует во взаимодействии с агонистом не только у $\alpha 7$ nAХР, но также и $\beta 2$ - и, возможно, $\beta 4$ -содержащих рецепторов [264]. Наибольшее различие в способности связывать эпибатидин по сравнению со способностью связывать ацетилхолин было засвидетельствовано для мутантной формы L119D. Таким образом, различие аминокислотных остатков в положении 119 $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединиц может приводить к наблюдаемому различию в фармакологических свойствах. Причем в работе Tsartos et al [265] было показано, что обратный мутант D119L $\alpha 9$ субъединицы nAХР терял способность связывать специфический антагонист $\alpha 9$ nAХР, α -конотоксин RgIA.

Электрофизиологический анализ $\alpha 7$ nAХР и некоторых мутантных форм

Для изучения функциональной активности мутантной формы рецептора L119D и $\alpha 7$ nAХР дикого типа при отсутствии позитивного модулятора PNU120596 были проведены

электрофизиологические эксперименты с ооцитами *X. laevis*, в которых гетерологически экспрессировали $\alpha 7$ рецептор крысы или его мутантную форму L119D (Рисунок 25). Результаты, полученные в ходе двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов, подтвердили значительное ухудшение сродства $\alpha 7$ нАХР [L119D] к ацетилхолину (Рисунок 25Б) и особенно к эпибатидину (Рисунок 25В), по сравнению с $\alpha 7$ рецептором дикого типа (Таблица 8). В Таблице 8 представлены значения EC_{50} ацетилхолина и эпибатидина, вычисленные как по результатам кальциевого имиджинга, так и электрофизиологии. Значения параметров различаются, причиной тому служит использование PNU120596, который способен в значительной степени изменять количественные характеристики лиганд-рецепторного взаимодействия [101], но ухудшение аффинности мутанта $\alpha 7$ нАХР [L119D] по сравнению с рецептором дикого типа проявилось в равной степени в обоих методах.

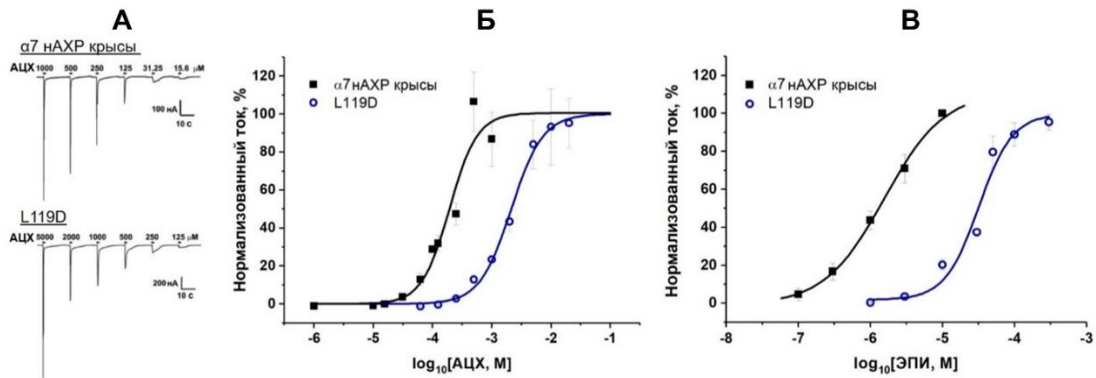


Рисунок 25. Электрофизиологический анализ аффинности $\alpha 7$ нАХР дикого типа и мутантной формы L119D к (А, Б) ацетилхолину (АЦХ) и (В) эпибатидину (ЭПИ) в ооцитах *X. laevis*. (А) Запись ацетилхолин-индуцированных токов ооцитов, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР дикого типа или мутантную форму L119D и (Б, В) концентрационная зависимость ионных токов. $n = 5 - 6$, среднее \pm SEM.

Также электрофизиологическим методом была протестирована аффинность $\alpha 7$ /ГлиР и его мутантной формы E189A к ацетилхолину и никотину, мутация в положении 189 привела к небольшому увеличению аффинности химерного рецептора к обоим агонистам, однако 95% доверительные интервалы вычисленных значений EC_{50} для обоих рецепторов пересекаются (Таблица 8). Интересно, что в литературных источниках есть данные о том, что мутация E185Q (или E189Q согласно нашей нумерации) в последовательности АЦХСБ- $\alpha 7$ химерного белка приводит к увеличению аффинности рецептора к ацетилхолину [22].

Таким образом, при помощи различных методов (кальциевого имиджинга с Case12 или Fiuo-4 и электрофизиологии) было подтверждено значительное ухудшение способности мутантного $\alpha 7$ нАХР L119D активироваться под действием ацетилхолина и, особенно, эпибатидина по сравнению с $\alpha 7$ рецептором дикого типа. Наличие остатка аспарагиновой кислоты в положении 119 (нумерация по $\alpha 7$) лиганд-связывающего сайта $\alpha 9$ субъединицы является одной из возможных причин, объясняющих существенные различия в

фармакологических свойствах $\alpha 7$ и $\alpha 9$ nAХР. Стоит отметить, что в последовательности $\alpha 10$ субъединицы (участвует в формировании гетеромерных $\alpha 9\alpha 10$ nAХР, неактивирующихся под действием эпибатидина) в положении 119 (нумерация $\alpha 7$) также представлен остаток аспартата (D).

3.3. Новые низкомолекулярные и пептидно-белковые лиганды nAХР

В природе существует множество источников новых лигандов nAХР, эти соединения могут быть обнаружены в растениях, животных и даже микроорганизмах, в том числе цианобактериях [78; 266]. В настоящее время не угасает интерес к поиску новых природных лигандов nAХР, т.к. они рассматриваются как основополагающие молекулы для разработки лекарственных препаратов. Растительные экстракты, используемые южноамериканскими племенами индейцев для охоты, а также животные яды, вырабатываемые железами некоторых змей, по-прежнему являются популярными биоресурсами новых лигандов nAХР.

3.3.1. Природные аналоги *d*-тубокуарина (*d*-ТС)

Среди семейства *Menispermaceae* (Луносемянниковые) встречаются несколько родов растений (*Abuta*, *Chondrodendron*, *Curarea*, *Sciadotenia* и *Telitoxicum*), представители которых широко используются южноамериканскими племенами индейцев для изготовления ядов, которыми покрывают охотничьи дротики. Индейцы племени Матис используют стебли *Chondrodendron tomentosum*, фрагменты которых кипятят в течение двух недель. Получаемый растительный экстракт представляет собой смесь D-(-) изомера хинной кислоты, L-изомера яблочной кислоты, этилдиметиламина, магнофлорина и бисбензилтетрагидроизохинолиновых алкалоидов (BBIQAs, bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids), структура которых напоминает структуру *d*-тубокуарина (*d*-ТС) (Рисунок 26).

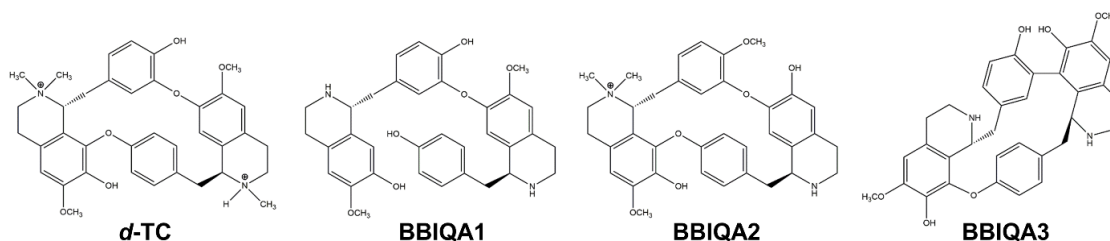


Рисунок 26. Структурные формулы *d*-тубокуарина (*d*-ТС) и новых соединений BBIQA1, BBIQA2 и BBIQA3.

Интересно, что сам *d*-ТС не является компонентом данного яда. Ранее уже было показано, что три алкалоида, выделенных из яда наконечников стрел индейцев племени Матис (BBIQA1,

ВВІQA2 и ВВІQA3) как и *d*-ТС, способны ингибировать ацетилхолин-индуцированные токи в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР [92].

Интерес научного сообщества к новым мышечным релаксантам, как препаратам, используемым при анестезии, не угасает до сих пор. Исторически первым в этой роли рассматривался *d*-ТС, однако вследствие большого числа побочных эффектов (в т.ч. со стороны сердечно-сосудистой системы), его использование прекратили [267]. В настоящее время в анестезиологической практике используются как бензилизохинолиновые алкалоиды (например, цисатракуриум в комплексе с неостигмином, ингибитором ацетилхолинэстеразы [268]), так и стероидные соединения (например, рокуроний в комплексе с сугаммадексом [269]). Высокая специфичность действия новых соединений является одним из важных требований, предъявляемых к потенциальным мышечным релаксантам, поэтому данная работа посвящена более детальному изучению биологического эффекта ВВІQA1 и ВВІQA2 на nAХР, а также на ГАМК_AР и 5-НТ_{3A}Р.

Компьютерное моделирование

Компьютерное моделирование комплекса *Aplysia californica* АЦХСБ (модели экстрацеллюлярного домена nAХР) с соединениями ВВІQA1, ВВІQA2 показало, что новые алкалоиды, как и *d*-ТС, способны связываться с ортостерическим сайтом АЦХСБ (Рисунок 27А и В). Моделирование проводилось на основе уже известной структуры комплекса *A. californica* АЦХСБ и *d*-ТС (PDB 2ХУТ), в которой *d*-ТС может принимать три различных положения в лиганд-связывающем сайте [96].

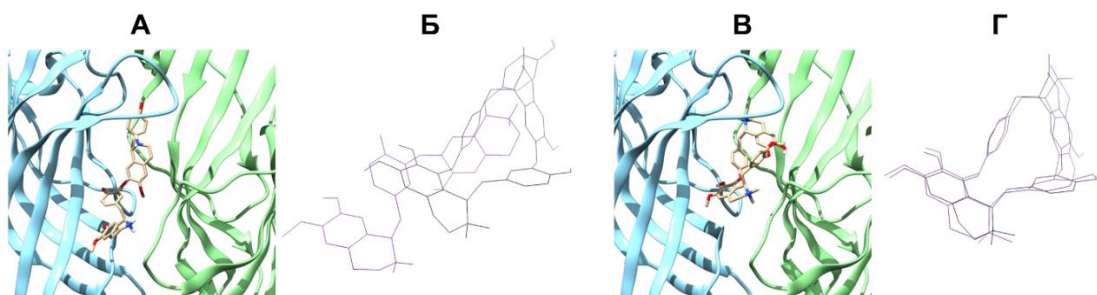


Рисунок 27. Компьютерное моделирование комплексов *Aplysia californica* АЦХСБ с соединениями ВВІQA1 и ВВІQA2. ВВІQA1 (А) и ВВІQA2 (В) занимают классический ортостерический сайт АЦХСБ, располагающийся ниже петли С. Наложение полученных структур ВВІQA1 и ВВІQA2 на структуру *d*-ТС (Б и Г, соответственно), связанного *Aplysia californica* АЦХСБ, демонстрирует существенные структурные отличия для ВВІQA1 (Б), но не для ВВІQA2 (Г).

Из-за довольно гибкой структуры «разомкнутой» молекулы положение ВВІQA1 в лиганд-связывающем участке существенно отличается от положения связанного *d*-ТС (Рисунок 27Б). В свою очередь для ВВІQA2 в ходе моделирования были предсказаны некоторые положения, сходные с *d*-ТС (Рисунок 27Г), представленные в [96]. Расчетные значения K_i для всех

предсказанных положений представлены в наномолярном диапазоне концентраций (Таблица 9), т.е. связывание антагонистов с АЦХСБ *Aplysia californica* должно быть высокоаффинным.

Таблица 9. Предсказанная аффинность (значения K_i) алкалоидов ВВИQA1, ВВИQA2 и *d*-ТС к *Aplysia californica* АЦХСБ, вычисленная с помощью компьютерного моделирования соответствующих комплексов с тремя различными вариантами положения антагонистов.

Соединение	Расчетные значения K_i		
	Положение 1	Положение 2	Положение 3
	K_i , нМ	K_i , нМ	K_i , нМ
<i>d</i> -ТС	39	135	98
ВВИQA1	33	10	<1
ВВИQA2	120	12	94

Примечательно, что во всех полученных расчетных комплексах и ВВИQA1 (Рисунок 27А), и ВВИQA2 (Рисунок 27В) связываются с классическим ортостерическим сайтом, расположенным под петлей С *Aplysia californica* АЦХСБ.

Радиолигандный анализ

Согласно результатам радиолигандного анализа, проведенного с АЦХСБ *Aplysia californica*, и ВВИQA1, и ВВИQA2 продемонстрировали сходную с *d*-ТС способность вытеснять радиоактивно-меченный α -бунгаротоксин [125 I]- α Bgt из лиганд-белкового комплекса (Таблица 10).

Таблица 10. Значения IC_{50} *d*-тубокурарина (*d*-ТС) и его аналогов ВВИQA1 и ВВИQA2 и коэффициенты Хилла (nH) для АЦХСБ *A. californica*, nАХР мышечного типа *T. californica*, $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nАХР и $\alpha 7$ nАХР, полученные методами радиолигандного анализа, кальциевого имиджинга и электрофизиологии.

Соединение	Радиолигандный анализ					
	АЦХСБ <i>A. californica</i>		nАХР <i>T. californica</i>		$\alpha 7$ nАХР	
	IC_{50} , μ М (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)	IC_{50} , μ М (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)	IC_{50} , μ М (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)
<i>d</i> -ТС	2,41 (2,26 – 2,56)	-1,05 \pm 0,02	0,39 (0,31 – 0,47)	-1,28 \pm 0,11	7,77 (6,72 – 8,81)	-1,02 \pm 0,05
ВВИQA1	3,80 (3,47 – 4,13)	-1,39 \pm 0,09	26,3 (24,7 – 27,8)	-1,13 \pm 0,02	162 (148 – 191)	-1,19 \pm 0,10
ВВИQA2	7,63 (5,28 – 9,97)	-1,16 \pm 0,11	8,75 (7,22 – 10,27)	-0,69 \pm 0,05	5,52 (4,50 – 6,55)	-0,82 \pm 0,05
Соединение	Кальциевый имиджинг				Электрофизиология	
	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nАХР		$\alpha 7$ nАХР*		5-НТ ₃ АР	
	IC_{50} , μ М (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)	IC_{50} , μ М (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)	IC_{50} , нМ (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)
<i>d</i> -ТС	0,81 (0,50 – 1,12)	-1,87 \pm 0,41	2,03 (1,31 – 2,76)	-1,39 \pm 0,21	22,63 (10,49 – 34,78)	-1,19 \pm 0,21
ВВИQA1	0,75 (0,28 – 1,21)	-0,96 \pm 0,16	1,70 (1,11 – 2,61)	-0,83 \pm 0,17	119,4 (74,4 – 164,4)	-1,06 \pm 0,09
ВВИQA2	1,75 (0,88 – 2,61)	-1,04 \pm 0,21	3,08 (1,47 – 4,68)	-0,94 \pm 0,29	1975 (1861 – 2090)	-1,83 \pm 0,01

*в экспериментах все растворы лигандов содержали 10 μ М PNU120596; 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

В результате радиолигандного анализа с нАХР мышечного типа ската *Torpedo californica* наименьшая активность была выявлена для ВВІQА1 ($IC_{50} = 26,3 \mu M$), в то же время активность ВВІQА2 была выше ($IC_{50} = 8,75 \mu M$), но все же она была в 22 раза меньше, чем активность *d*-ТС ($IC_{50} = 0,39 \mu M$). Также радиолигандный анализ был проведен на клетках линии GH4C₁, в которых гетерологически экспрессирован $\alpha 7$ нАХР человека. Результаты этого эксперимента показали, что аналог ВВІQА1 обладает худшей способностью вытеснить [¹²⁵I]- α Bgt из комплекса с $\alpha 7$ нАХР $\alpha 7$ рецептора ($IC_{50} = 162 \mu M$), но другой аналог ВВІQА2 обладает активностью сходной с *d*-ТС ($IC_{50} = 5,52 \mu M$ и $7,77 \mu M$, соответственно). Для α -бунгаротоксина известно, что он связывается с сайтом посадки агонистов и конкурентных антагонистов, другими словами, он связывается в ортостерическом участке рецептора [85; 186], в то время как результаты радиолигандного анализа свидетельствуют о достаточно низкой аффинности аналогов ВВІQА1 и ВВІQА2 к этим участкам.

Кальциевый имиджинг

Методом кальциевого имиджинга было показано, что аналоги *d*-ТС ВВІQА1 и ВВІQА2 ингибируют агонист-индуцированные ответы клеток Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ или $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР. На Рисунке 28 и в Таблице 10 представлены значения IC_{50} *d*-ТС и его аналогов: соединение ВВІQА2 ингибирует клеточные ответы немного хуже, чем ВВІQА1 и *d*-ТС, в то время как значения параметра IC_{50} ВВІQА1 и *d*-ТС практически одинаковы.

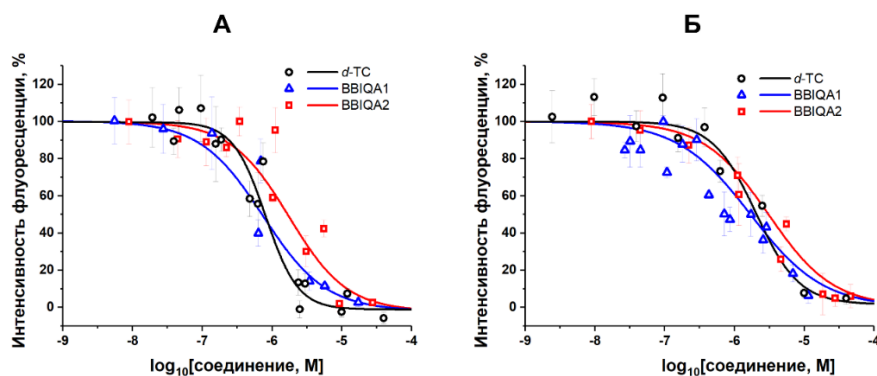


Рисунок 28. Концентрационные зависимости ингибирующей активности *d*-тубокурарина (*d*-ТС, ○), ВВІQА1 (△) и ВВІQА2 (□) в отношении (А) $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР и (Б) $\alpha 7$ нАХР. (А) Ингибирование ответов клеток, экспрессирующих мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР, вызванных действием 30 μM ацетилхолина. (Б) Ингибирование ответов клеток, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР, вызванных действием 10 μM ацетилхолина (все растворы лигандов содержали 10 μM PNU120596). Среднее \pm SEM, $n = 3$. Значения IC_{50} антагонистов представлены в Таблице 10.

Значения IC_{50} новых соединений для мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ рецептора располагаются в микромолярном диапазоне концентраций, свидетельствуя, что ВВІQА1 и ВВІQА2 не могут рассматриваться как высокоактивные антагонисты. Однако, анализ взаимосвязи между эффективной концентрацией миорелаксанта и длительностью его действия показал, что при использовании соединений с достаточно невысокой активностью наблюдается быстрая блокада

нервно-мышечной передачи, а продолжительность этого эффекта сокращается [270; 271; 272]. Поэтому низкая активность ВВ1QA1 и ВВ1QA2, как и *d*-ТС, может служить положительной характеристикой этих соединений с точки зрения разработки лекарственных препаратов на основе их структур.

Некоторое противоречие результатов радиолигандного анализа и кальциевого имиджинга в отношении взаимодействия исследуемых соединений с нАХР мышечного типа *Torpedo californica* и с мышечным нАХР, соответственно, может объясняться разным субъединичным составом этих рецепторов мышечного типа. Так, в мембранах электрического органа ската *Torpedo* представлена эмбриональная форма рецептора $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ [95], в то время как в клетках Neuro2a гетерологически была экспрессирована взрослая форма $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$. В дополнение к этому, вполне возможно, что аналоги *d*-ТС связываются в отличном от ортостерического участка месте, и для проверки этого предположения была проведена серия дополнительных экспериментов по кальциевому имиджингу клеток Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР, с различными концентрациями антагонистов (IC_{50} и $3xIC_{50}$) (Рисунок 29 и Таблица 11)).

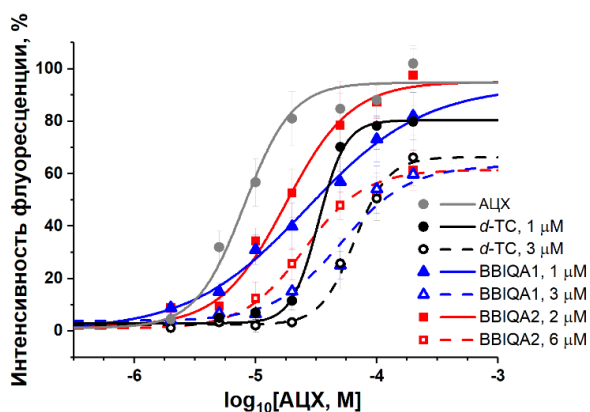


Рисунок 29. Концентрационные зависимости ацетилхолин(АЦХ)-индуцированных ответов при отсутствии (●) и в присутствии *d*-тубокуарина (*d*-ТС; ● и ○) или его аналогов: ВВ1QA1 (▲ и △) и ВВ1QA2 (■ и □) в различных концентрациях у клеток линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР. Среднее \pm SEM, $n = 3$. Соответствующие значение EC_{50} представлены в Таблице 11.

Таблица 11. Значения параметров EC_{50} ацетилхолина и коэффициенты Хилла (nH) при отсутствии всех антагонистов (АЦХ), а также в присутствии *d*-тубокуарина (АЦХ+*d*-ТС), ВВ1QA1 (АЦХ+ВВ1QA1) и ВВ1QA2 (АЦХ+ВВ1QA2) в разных концентрациях, полученные методом кальциевого имиджинга клеток Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР.

Соединение	Кальциевый имиджинг $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР			
	EC_{50} , μM (95% ДИ)		nH (средн \pm SEM)	
АЦХ	8,04 (5,04 – 11,04)		2,19 \pm 0,41	
	В концентрации IC_{50}		В концентрации $3x IC_{50}$	
	EC_{50} , μM (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)	EC_{50} , μM (95% ДИ)	nH (средн \pm SEM)
АЦХ + <i>d</i> -ТС	33,05 (17,27 – 48,82)	3,90 \pm 1,28	65,32 (41,28 – 89,36)	3,11 \pm 0,78
АЦХ + ВВ1QA1	26,53 (19,83 – 33,23)	0,90 \pm 0,05	50,44 (23,90 – 76,98)	1,55 \pm 0,34
АЦХ + ВВ1QA2	17,63 (8,68 – 26,58)	1,60 \pm 0,34	25,22 (21,15 – 29,29)	1,74 \pm 0,14

95% ДИ – 95% доверительный интервал

В результате проведенных экспериментов было показано, что в присутствии *d*-ТС или его аналогов значение EC_{50} ацетилхолина увеличивается (Таблица 11). Дополнительно, при увеличении концентрации антагонистов происходит параллельный сдвиг концентрационных кривых для ацетилхолина, при этом наблюдается снижение амплитуды максимальных клеточных ответов. Такое поведение кривых свидетельствует о том, что ВВІQA1 и ВВІQA2, как и *d*-ТС, ингибируют $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAХР по смешанному механизму, в котором происходит связывание как с орто-, так и с аллостерическими участками рецептора. Смешанный механизм ингибирования для мышечного рецептора под действием *d*-ТС подтверждается литературными данными [81]. Однако, в случае $\alpha 7$ nAХР данные о механизмах связывания весьма противоречивы: некоторые работы свидетельствуют также о смешанном характере ингибирования, в то время как ряд других работ говорит только о связывании с ортостерическими участками [57; 82]. Согласно результатам радиолигандного анализа соединение ВВІQA1 имеет ухудшенное сродство к ортостерическим сайтам по сравнению с *d*-ТС и ВВІQA2. В функциональном же тесте (кальциевом имиджинге) наблюдается примерно равная способность всех соединений ингибировать $\alpha 7$ nAХР, что может быть доказательством того, что наряду со связыванием с ортостерическими участками происходит также связывание и с аллостерическими участками рецептора. Однако, в работе [81] доказали, что при использовании недесенситизирующего агониста ингибирование мышечного рецептора под действием *d*-ТС происходит только конкурентным способом. В данной работе эксперименты по кальциевому имиджингу с $\alpha 7$ nAХР проводились в присутствии PNU120596, который снижает скорость десенситизации рецептора, поэтому, возможное объяснение одинаковой активности всех трех соединений в функциональном тесте заключается в том, что в присутствии PNU120596 *d*-ТС, ВВІQA1 и ВВІQA2 связываются только в ортостерических участках, следовательно, у ВВІQA1 более выражен аллостерический механизм ингибирования (который не детектируется в радиолигандном анализе), по сравнению с *d*-ТС и ВВІQA2.

Электрофизиология

Далее у аналогов *d*-ТС, ВВІQA1 и ВВІQA2 была исследована способность ингибировать агонист-индуцированные ответы других подтипов nAХР: $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ (Рисунки 30 и 31), а также ГАМКАР и 5-НТЗАР (Рисунок 32), экспрессированных в ооцитах *X. laevis*.

Как показывает Рисунок 31, оба аналога ВВІQA1, ВВІQA2 и *d*-ТС имеют сходную ингибирующую активность в отношении всех трех подтипов нейрональных nAХР.

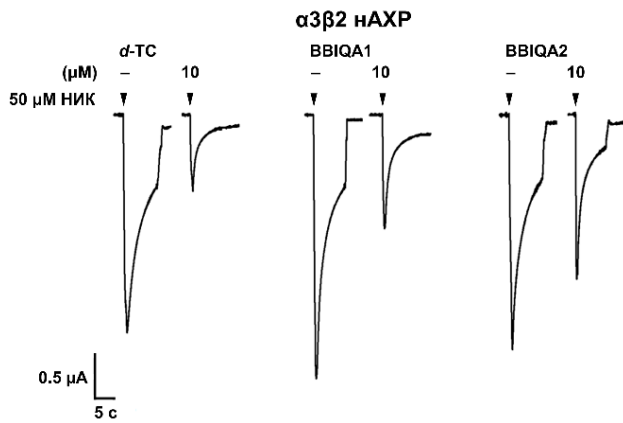


Рисунок 30. Пример ингибирования никотин (НИК, 50 μM)-индуцированных ионных токов ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 3\beta 2$ нАХР человека, демонстрирующего ингибирование под действием 10 μM *d*-тубокурарина (*d*-ТС), ВВІQА1 и ВВІQА2. Момент добавления никотина (совместно с антагонистом или без) указан стрелкой.

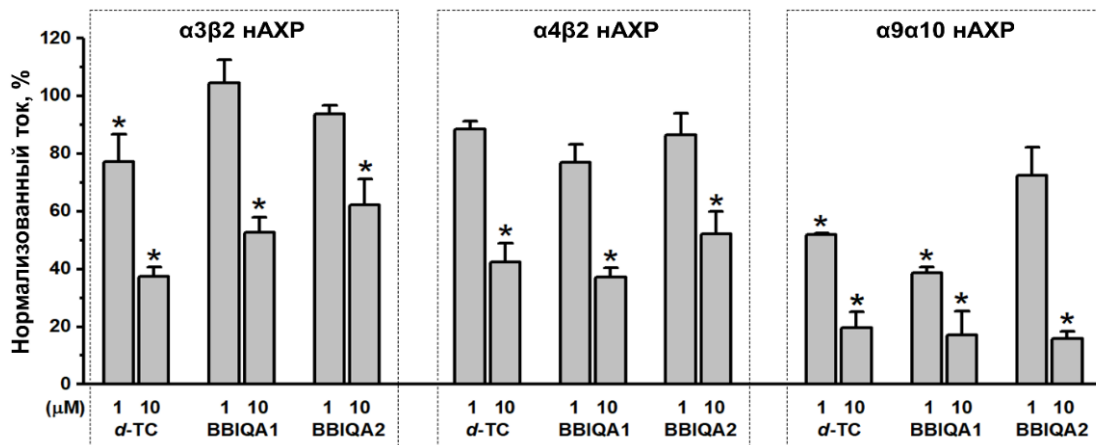


Рисунок 31. Ингибирующая активность *d*-тубокурарина (*d*-ТС), ВВІQА1 и ВВІQА2 в отношении гетеромерных нейрональных нАХР. Гистограммы отражают усредненные показатели степени ингибирования под действием различных концентраций (1 μM и 10 μM) *d*-ТС или его аналогов агонист-индуцированных токов, опосредованных активацией $\alpha 3\beta 2$ нАХР человека (50 μM никотин), $\alpha 4\beta 2$ нАХР крысы (10 μM никотин) или $\alpha 9\alpha 10$ нАХР человека (25 μM ацетилхолин). Черные звездочки обозначают статистически достоверную разницу ($p < 0,05$) между нормализованными значениями амплитуды токов при отсутствии или в присутствии соединений *d*-ТС, ВВІQА1 и ВВІQА2 (однопараметрический дисперсионный анализ с тестом Тьюки). Среднее \pm SEM. $n = 3 - 5$.

В случае другого Суs-петельного рецептора ГАМК_{AR} ($\alpha 3\beta 2\gamma 2$) ингибирующая активность *d*-ТС наблюдалась только при относительно высокой концентрации (100 μM), а ингибирование токов под действием ВВІQА1, ВВІQА2 в той же концентрации было меньшим и составляло около 50 – 60%, в то время как ингибирующий эффект *d*-ТС – около 90%. (Рисунок 32А).

Также для *d*-ТС известно, что он способен блокировать ответы и серотонинового 5-НТ_{3A} рецептора [97; 98], поэтому для обоих аналогов была протестирована их способность ингибировать ионные токи, опосредованные активацией 5-НТ_{3A}Р (Рисунок 32Б).

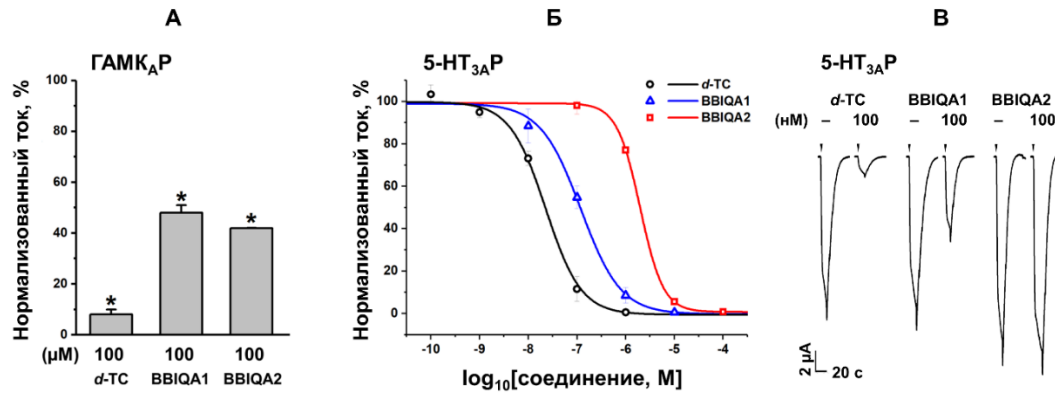


Рисунок 32. Ингибирующая активность *d*-тубокурарина (*d*-ТС), ВБИQA1 и ВБИQA2 в отношении ГАМК_AР (А) и 5-НТ_{3A}Р (Б). (А) Гистограммы отражают усредненные показатели степени ингибирования под действием 100 μM *d*-ТС или его аналогов ГАМК(100 μM)-индуцированных токов, опосредованных активацией α3β2γ2 ГАМК_AР мыши. Черные звездочки обозначают статистическую достоверную разницу ($p < 0,05$) между нормализованными значениями амплитуды токов при отсутствии или в присутствии соединений *d*-ТС, ВБИQA1 и ВБИQA2 (однопараметрический дисперсионный анализ с тестом Тьюки). Среднее ± SEM. $n = 3 - 5$. (Б) Концентрационные кривые ингибирующей активности *d*-ТС (○), ВБИQA1 (△) и ВБИQA2 (□) в отношении 5-НТ_{3A}Р мыши, экспрессированного в ооцитах *X. laevis* (ионные токи вызваны действием 1 μM 5-НТ). Вычисленные значения IC₅₀ антагонистов представлены в Таблице 10. Среднее ± SEM. $n = 3$. (В) Пример записи серотонин(1 μM)-индуцированных токов, демонстрирующих ингибирование под действием 100 нМ *d*-ТС, ВБИQA1 и ВБИQA2 (момент добавления 5-НТ (совместно с антагонистом или без) указан стрелкой).

Несмотря на сходную способность аналогов ингибировать ответы, опосредованные активацией различных подтипов nAХР, по сравнению с *d*-ТС, соединения ВБИQA1 и ВБИQA2 значительно хуже блокируют агонист-индуцированные ответы 5-НТ_{3A}Р (Рисунок 32Б, Таблица 10): значения IC₅₀ ВБИQA1 и ВБИQA2 равны 119,4 нМ и 1975 нМ, соответственно. Эти значения в 5- и 87-раз больше, чем значение IC₅₀ *d*-ТС (22,63 нМ), соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой специфичности действия ВБИQA1 и ВБИQA2 в отношении nAХР, по сравнению с *d*-ТС, т.к. новые соединения значительно хуже ингибируют ГАМК_AР и 5-НТ_{3A}Р.

3.3.2. Компоненты змеиных ядов

Яды змей являются многокомпонентными смесями, у некоторых видов в состав яда могут входить более ста различных токсичных и нетоксичных белков и пептидов, а также небелковые токсины, углеводы, амины и другие низкомолекулярные соединения. Эволюция ядов привела к тому, что компоненты в его составе обладают широким спектром действия и атакуют различные тканевые мишени. Смертельно опасные для человека яды включают соединения, оказывающие воздействие на нервную, сердечно-сосудистую систему, имеющие негативные эффекты на гомеостаз и способные вызвать некроз тканей [273]. Среди белковых компонентов ядов змей

семейства *Elapidae* можно выделить следующие классы соединений: трехпетельные белки (α -нейротоксины, например, α Bgt и α Ctx, известные блокаторы nAHP), фосфолипазы A₂, протеиназные ингибиторы, сериновые протеиназы и металлопротеиназы [274; 275]. Фосфолипазы A₂ (ФЛА₂, фосфатидилхолин 2-ацилгидролазы, ЕС 3.1.1.4) гидролизуют фосфолипиды в положении *sn*-2 с образованием лизофосфолипидов и жирных кислот, повреждающих плазматическую мембрану. В дополнении к свойству разрушать плазматическую мембрану клетки, ФЛА₂ также обладают широким спектром других эффектов, варьирующих от фермента к ферменту. Многие ФЛА₂ демонстрируют нейротоксический эффект, заключающимся в блокировании нервно-мышечной передачи. ФЛА₂, выделенные из ядов змей семейств *Viperidae* и *Elapidae* (их относят к группам ФЛА₂ ПА и IA, соответственно) способны блокировать мышечный, а также α 7 nAHP [276; 277]. Объектом данного исследования является панкреатическая ФЛА₂, она входит в тот же класс, что и ФЛА₂ яда змей из семейства *Elapidae* (класс I), но в ее составе присутствуют 5 дополнительных аминокислотных остатков, называемых «панкреатической петлей», такие фосфолипазы выделяют в отдельный подкласс – IB [278].

Помимо белков в яде змей идентифицируется множество пептидов, интерес к которым достаточно высок, т.к. среди них можно обнаружить избирательно действующие на nAHP, и, в отличие от α -нейротоксинов, их синтез является относительно простым, т.к. они содержат меньшее число аминокислотных остатков и дисульфидных связей. К настоящему времени уже известно о существовании некоторых пептидов, избирательно действующих на мышечный nAHP. Например, пептид из яда *Trimeresurus wagleri* – ваглерин-1 содержит 22 аминокислотных остатка и одну дисульфидную связь [279], а аземиопсин (линейный пептид из 21 аминокислотного остатка, не содержащий дисульфидных связей) из яда *Azemiops feae* в настоящее время рассматривается как недеполяризующий мышечный релаксант [280]. В данной работе мы сфокусировались на изучении биологического эффекта активного пептида из яда *Bitis arietans* (семейство *Viperidae*). Ранее было показано, что низкомолекулярная фракция этого яда ингибирует ацетилхолин-индуцированный ионный ток в нейронах *Lymnaea stagnalis* [281]. Выделенный из этой фракции пептид, баптид 2, состоит из десяти аминокислотных остатков и не содержит дисульфидных связей (**PPPHLMHLHG**).

Баптид 2

В исследовании под руководством д.х.н. Уткина Ю.Н. (зав. лаб. Молекулярной токсикологии ИБХ РАН), выполненным совместно с Вульфус Е.А. (Институт биофизики клетки РАН, Пущино), было показано, что баптид 2 блокировал ионные токи, вызванные действием ацетилхолина, в нейронах *Lymnaea stagnalis*, при этом вычисленное значение IC₅₀ равнялось 250 μ M, в то же время он ингибировал агонист-индуцированные токи, опосредованные активацией

$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР, экспрессированного в ооцитах *X. laevis*, со значением IC_{50} равным приблизительно $3 \mu M$. Однако, баптид 2 не конкурировал с радиоактивно-меченым αBgt за связывание с нАХР мышечного типа *Torpedo* и проявлял очень слабую способность вытеснять αBgt из комплекса с $\alpha 7$ нАХР, что может говорить о возможном неконкурентном механизме ингибирования нАХР под действием баптида 2. Чтобы проверить предположение об аллостерическом механизме связывания была проведена серия экспериментов по кальциевому имиджингу. Методом кальциевого имиджинга было показано, что компонент яда шумящей гадюки *Bitis arietans*, баптид 2, ингибирует ацетилхолин-индуцированное повышение уровня внутриклеточной концентрации ионов кальция, при этом вычисленное значение IC_{50} равно $20,6 \pm 3,93 \mu M$ (Рисунок 33).

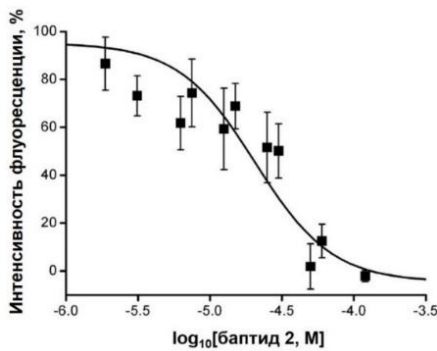


Рисунок 33. Концентрационная зависимость ингибирующей активности баптида 2 на ацетилхолин ($90 \mu M$)-индуцированные кальциевые ответы клеток линии Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР человека. Среднее \pm SEM, $n = 3$.

Затем были построены концентрационные кривые действия ацетилхолина при отсутствии или в присутствии $25 \mu M$ баптида 2 для клеток Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ или $\alpha 7$ нАХР. При этом значение EC_{50} ацетилхолина в отсутствие антагониста было равным $9,75 \pm 2,1 \mu M$ для $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ (Рисунок 34А); и $5,24 \pm 1,2 \mu M$ для $\alpha 7$ рецептора (Рисунок 34Б). В присутствии баптида 2 происходило снижение амплитуды клеточных ответов на высокие концентрации агониста, но значения EC_{50} ацетилхолина практически не изменялись (Рисунок 34).

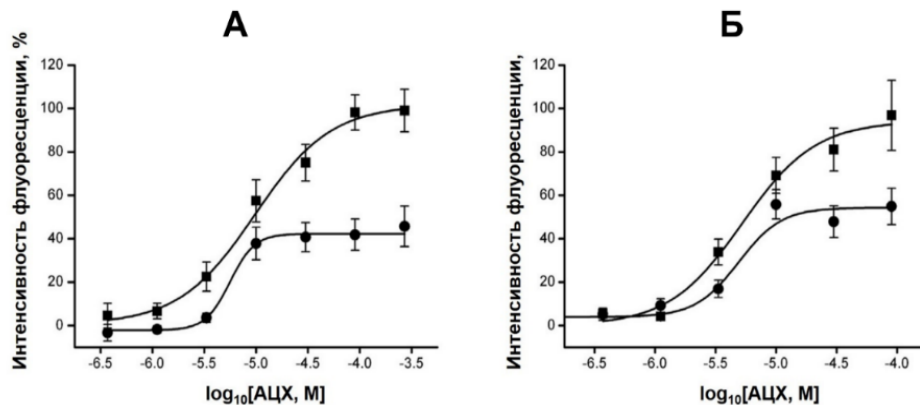


Рисунок 34. Ингибирующий эффект баптида 2 в отношении $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ нАХР. Концентрационные зависимости ацетилхолин-индуцированных ответов клеток линии Neuro2a, экспрессирующих (А) $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ нАХР мыши или (Б) $\alpha 7$ нАХР человека в отсутствии (■) или присутствии $25 \mu M$ баптида 2 (●). Среднее \pm SEM, $n = 3 - 4$.

Полученные результаты свидетельствуют о неконкурентном механизме ингибирования nAХР под действием баптида 2. Ранее уже было известно о некоторых пептидных токсинах, действующих на nAХР в качестве неконкурентных ингибиторов. Например, α -конотоксин ImIII блокирует $\alpha 7$ nAХР [282; 283], а также никотиновые рецепторы мышечного типа *Torpedo californica* по неконкурентному механизму [284], такой же путь ингибирования был показан и для α -конотоксина AuIV, ингибирующего $\alpha 3\beta 4$ nAХР [285]. В свою очередь, короткий природный пептид баптид 2 также является неконкурентным ингибитором nAХР, причем отличительной чертой этого пептида является отсутствие в его структуре дисульфидных связей.

Панкреатическая фосфолипаза A_2 (пФЛА $_2$)

В исследовании под руководством д.х.н. Уткина Ю.Н. (зав. лаб. Молекулярной токсикологии ИБХ РАН), выполненным совместно с Вульфус Е.А. (Институт биофизики клетки РАН, Пущино), было показано, что панкреатическая ФЛА $_2$ с низкой эффективностью ингибирует связывание радиоактивно-меченного α -бунгаротоксина [125 I]- α Bgt с ортостерическими участками nAХР мышечного типа ската *Torpedo californica* со значением IC $_{50}$ 15 ± 3 μ M (среднее \pm SEM, n = 4; Рисунок 35).

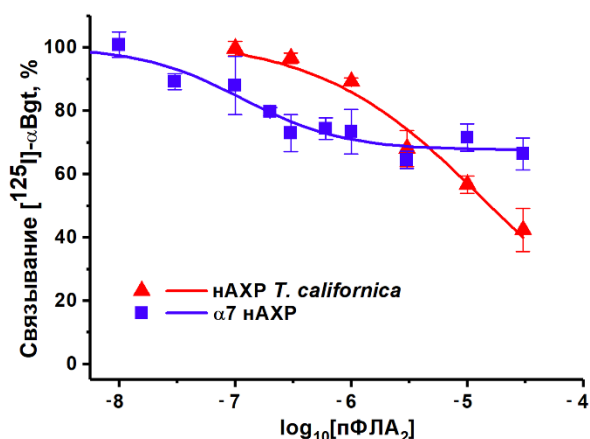


Рисунок 35. Ингибирование связывания радиоактивно-меченного α -бунгаротоксина [125 I]- α Bgt с (\blacktriangle) nAХР мышечного типа ската *Torpedo californica* и с (\blacksquare) $\alpha 7$ nAХР, экспрессируемым в клетках GH $_4$ C $_1$, под действием панкреатической фосфолипазы A_2 свиньи (пФЛА $_2$). Вычисленные значения IC $_{50}$ пФЛА $_2$ составляют 15 ± 3 μ M и 120 ± 30 нМ, соответственно. Среднее \pm SEM. n = 4.

Также радиолигандный анализ был проведен на клетках линии GH $_4$ C $_1$, в которых гетерологически экспрессирован $\alpha 7$ nAХР человека. Результаты этого эксперимента показали, что пФЛА $_2$ конкурирует с [125 I]- α Bgt только за 30% ортостерических сайтов связывания $\alpha 7$ nAХР (Рисунок 35). Аффинность пФЛА $_2$ к этим сайтам достаточно высокая: значение IC $_{50}$ пФЛА $_2$ равно 120 ± 30 нМ (среднее \pm SEM, n = 4). Известно, что $\alpha 7$ nAХР имеет 5 сайтов связывания α Bgt (ортостерические сайты) [286], но связывание молекулы α Bgt с одним сайтом достаточно для блокирования рецептора [186]. пФЛА $_2$ конкурирует с α Bgt и, возможно, связывается с одним или двумя ортостерическими сайтами $\alpha 7$ nAХР.

Ранее для пФЛА $_2$ была показана способность связываться с водорастворимым доменом $\alpha 9$ nAХР человека. Дополнительное функциональное тестирование активности ФЛА $_2$ из поджелудочной железы свиньи проводили с помощью электрофизиологических экспериментов

по двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 9\alpha 10$ nAHR человека. В ходе эксперимента было обнаружено, что преинкубация ооцитов с растворами панкреатической ФЛА₂ разной концентрации в течение 5 минут приводила к дозозависимому снижению амплитуды ацетилхолин-индуцированных токов (Рисунок 36), и вычисленное значение IC₅₀ составляет 190 ± 30 нМ (среднее \pm SEM, n = 3).

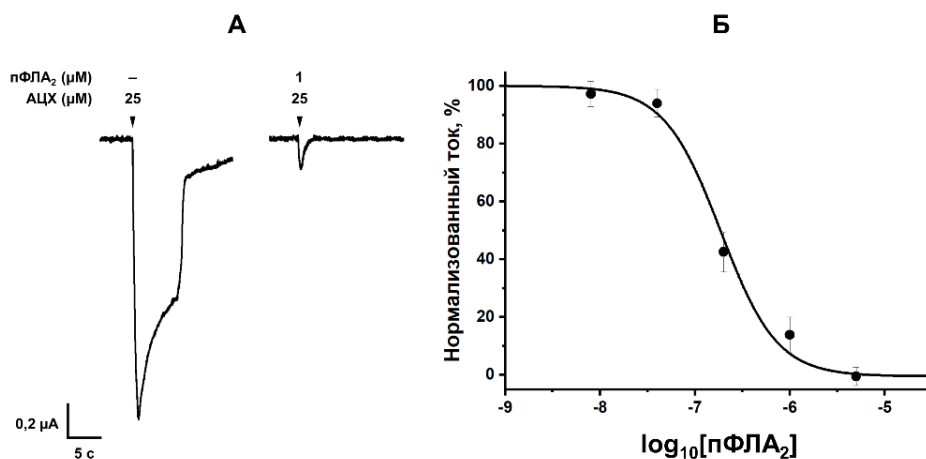


Рисунок 36. Ингибирующая активность фосфолипазы А₂ из поджелудочной железы свиньи (пФЛА₂) в отношении агонист-индуцированных ионных токов ооцитов *X. laevis*, опосредованных активацией $\alpha 9\alpha 10$ nAHR человека. (А) Пример ингибирования ацетилхолин(АЦХ, 25 μМ)-индуцированных токов, демонстрирующих ингибирование под действием 1 μМ пФЛА₂ (момент добавления АЦХ (совместно с пФЛА₂ или без) указан стрелкой). (Б) Концентрационная кривая ингибирующей активности пФЛА₂ в отношении $\alpha 9\alpha 10$ nAHR человека, экспрессированного в ооцитах *X. laevis* (ионные токи вызваны действием 25 μМ АЦХ). Вычисленное значение IC₅₀ пФЛА₂ составляет 190 ± 30 нМ. Среднее \pm SEM. n = 3.

Таким образом, была показана способность панкреатической ФЛА₂ связываться с $\alpha 9\alpha 10$ nAHR и ингибировать $\alpha 9\alpha 10$ рецепторы. Известно, что $\alpha 9\alpha 10$ nAHR вовлечены в передачу болевых сигналов [250] и ингибирование этих рецепторов предотвращает нейропатическую боль [287]. При внутривентрикулярной инъекции ФЛА₂ из пчелиного яда у мышей предотвращала нейропатическую боль, вызванную действием препарата, назначаемого при химиотерапии, оксалиплатина [288]. Все эти данные свидетельствуют о возможном применении панкреатической ФЛА₂ для подавления болевых сигналов в клинической практике.

3.3.3. Новые синтетические низкомолекулярные лиганды nAHR

Новые никотиновые лиганды могут быть идентифицированы не только из числа природных соединений, но также возможен направленный химический синтез агонистов, антагонистов или модуляторов. При разработке новых соединений учитываются знания о ключевых элементах химической структуры, необходимых для проявления соединением активности в отношении nAHR: положительно-заряженный атом азота и акцептор водородной

связи, а также расстояние между ними [289; 290]. В качестве стратегии для дизайна потенциальных лигандов может быть использован так называемый 3D подход, где при помощи компьютерной программы осуществляется поиск среди баз структурных данных (например, Cambridge Structural Database) соединений, отвечающий вводимым параметрам, включающим наличие определенных функциональных групп и пространственные характеристики [291]. Анализ структур селективных агонистов $\alpha 7$ nAHP, таких как PNU-282987, SSR-180711, EVP-6124, TC-1698 показал, что эти соединения содержат азабициклические группы. Также ранее уже было известно о некоторых лигандах $\alpha 7$ и $\alpha 4\beta 2$ nAHP, в структуре которых присутствует хинольное кольцо [292]. Учеными Флорентийского университета были синтезированы новые соединения, у которых азабициклическую или диазабициклическую группа напрямую (**q1-3**) или через амидную связь (**q4**) присоединяли к хинольному кольцу в 6-ом (**q1, q2**) или 7-ом (**q3, q4**) положении (Рисунок 37).

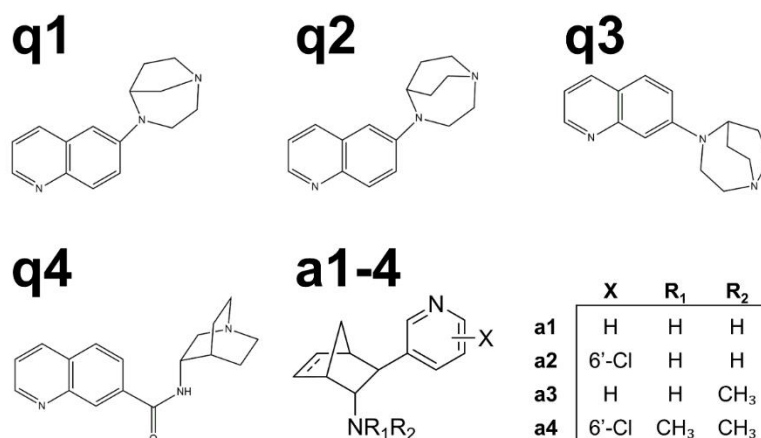


Рисунок 37. Структурные формулы потенциальных лигандов nAHP. **q1** 6-(1,4-диазабицикло[3.2.1]октан-4-ил)хинолин; **q2, q3** 6-(1,4-диазабицикло[3.2.2]нонан-4-ил)хинолин; **q4** N-(хиниклидин-3-ил)хинолин-7-карбоксамид; **a1** 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин; **a2** 3-(6-хлоропиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин; **a3** N-метил-3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин; **a4** N,N-диметил-3-(6-хлоропиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин.

В структуре соединений **a1-4** присутствует пиридиновое кольцо (акцептор водородной связи), соединенное через бицикло[2.2.1]гептановый мотив с алифатической аминогруппой (Рисунок 37). У всех 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-аминов (**a1-4**) аминогруппа представлена в *эндо* расположении, присутствуют заместители в пиридиновом кольце (H, 6-Cl) и варьирует число метильных групп у аминогруппы. В нашем отделе были проведены функциональные тесты новых соединений в качестве перспективных лигандов nAHP.

Активность новых производных хинолина (соединений **q1-4**) в отношении $\alpha 7$ nAHP человека была протестирована методом кальциевого имиджинга с Case12 (тестирование происходило в присутствии 10 μ M PNU120596), а в отношении $\alpha 4\beta 2$ nAHP крысы – методом

двухэлектродной фиксации потенциала. В то же время тестирование активностей новых соединений **a1-4** проводилось методом двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 7$ или $\alpha 4\beta 2$ nAХР.

Соединение **q1**, у которого в положении 6 хинолинового кольца введена 1,4-диазабицикло[3.2.1]октановая группа, способно ингибировать клеточные ответы, опосредованные активацией $\alpha 7$ nAХР, вызванные действием 100 μM ацетилхолина. Полное ингибирование достигалось при достаточно высокой концентрации антагониста (300 μM , Рисунок 38).

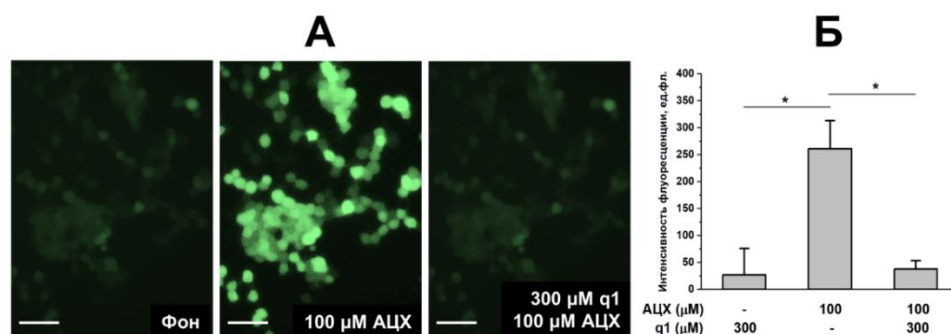


Рисунок 38. Ингибирование агонист-индуцированных ответов клеток Neuro2a, опосредованных активацией $\alpha 7$ nAХР человека, под действием соединения **q1**. (А) В присутствии **q1** в концентрации 300 μM в $\alpha 7$ nAХР-экспрессирующих клетках Neuro2a не наблюдалось повышение интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12, вызванное действием ацетилхолина (АЦХ) в концентрации 100 μM . (Б) Гистограмма отражает усредненные показатели степени ингибирования ацетилхолин(100 μM)-индуцированного повышения уровня флуоресценции Case12 в клетках Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ nAХР человека, под действием **q1** (300 μM). Черные звездочки обозначают статистически достоверную разницу ($p < 0,05$) между двумя группами значений, объединенных серой линией (однопараметрический дисперсионный анализ с тестом Тьюки). В экспериментах использовался 10 μM PNU120596. Масштаб 50 μM . ед.фл. – единицы флуоресценции. Среднее \pm SEM, $n = 4$.

Производные хинолина **q2** и **q3**, содержащие 1,4-диазабицикло[3.2.2]нонановую группу в 6- или 7- положении хинолина, и **q4**, хинклидиновое производное выступали в роли агонистов $\alpha 7$ рецептора – в присутствии позитивного аллостерического модулятора PNU120596 аппликации растворов новых агонистов в микромолярном диапазоне концентраций приводили к увеличению интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12 (Рисунок 39А). Вычисленные значения EC_{50} для соединений **q2**, **q3** (Рисунок 39Б) и **q4** составили $1,41 \pm 0,56 \mu\text{M}$; $1,03 \pm 0,38 \mu\text{M}$ и $1,57 \pm 0,23 \mu\text{M}$ (среднее \pm SEM), соответственно. Соединения **q2**, **q3** и **q4** специфичны в отношении $\alpha 7$ nAХР, т.к. индуцированные ими клеточные ответы полностью блокировались под действием 4 μM раствора α -Ctx (Рисунок 39А).

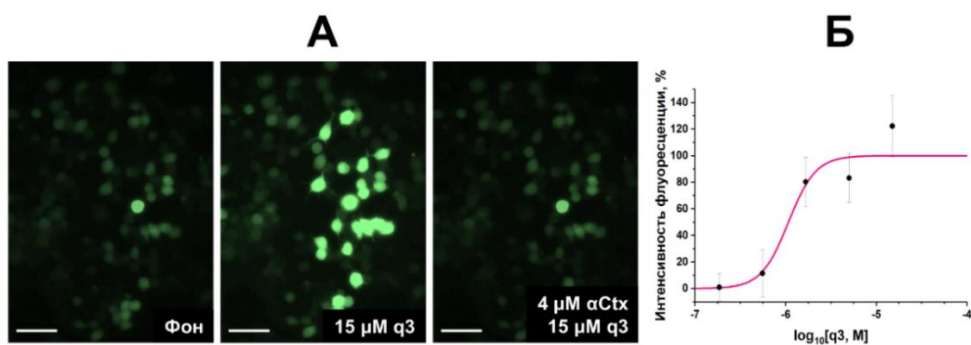


Рисунок 39. Агонистический эффект соединения **q3** в отношении $\alpha 7$ нАХР, экспрессируемого в клетках линии Neuro2a. (А) Аппликация **q3** в концентрации $15 \mu\text{M}$ приводит к повышению интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора Case12, экспрессируемого в клетках Neuro2a совместно с $\alpha 7$ нАХР человека. (Б) Соответствующая концентрационная зависимость амплитуды ответов, индуцированных соединением **q3** в клетках Neuro2a, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР человека. В экспериментах использовался $10 \mu\text{M}$ PNU120596. Масштаб $50 \mu\text{m}$ Среднее \pm SEM, $n=3$.

Интересно, что в электрофизиологических экспериментах по двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих химерный $\alpha 7/\text{GlyR}$, только действие соединения **q4** ($50 \mu\text{M}$) приводило к открытию ионного канала рецептора и появлению ионного тока малой амплитуды, в то время как производные хинолина **q2** и **q3** в концентрации $50 \mu\text{M}$ вовсе не были способны активировать химерный рецептор. Таким образом, производные хинолина **q2** и **q3** проявляли агонистические свойства исключительно в присутствии позитивного аллостерического модулятора, определяя природу этих соединений как «молчащие агонисты» $\alpha 7$ нАХР [293]. Также было показано, что все соединения **q1-4** являются антагонистами $\alpha 4\beta 2$ нАХР крысы: в концентрации $50 \mu\text{M}$ они полностью блокируют эпибатидин ($1 \mu\text{M}$)-индуцированный ток в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих данный подтип нАХР.

В ходе двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 7$ нАХР крысы, было показано, что 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амины **a1** и **a2** способны активировать данный подтип рецептора, и вычисленные значения EC_{50} составляют $5,98 \pm 1,50$ и $2,71 \pm 0,30 \mu\text{M}$ (среднее \pm SEM), соответственно (Рисунок 40А). Соединение **a3** также является агонистом $\alpha 7$ рецептора, однако его активность в разы ниже, чем у **a1** и **a2** (Рисунок 40А). В свою очередь для **a4** было показано, что он не способен активировать рецептор (Рисунок 40А). Агонистические свойства новых 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-аминов в отношении $\alpha 7$ нАХР уменьшались при увеличении числа алкильных заместителей у атома азота, т.е. в ряду **a1, a2** $>$ **a3** $>$ **a4**. Соединения **a1-4** в концентрации $50 \mu\text{M}$ способны блокировать ответы, опосредованные активацией $\alpha 4\beta 2$ нАХР человека, вызванные действием $20 \mu\text{M}$ никотина (Рисунок 40Б). Наиболее активным антагонистом было соединение **a1** (91% ингибирования никотин ($20 \mu\text{M}$)-индуцированных ответов ооцитов *X. laevis*), соединение **a2** ингибирует ионный

ток на 81%, соединение **a4** – на 69%, а ингибирование ответов под действием **a3** было наименьшим среди всех соединений – 53% (Рисунок 40Б).

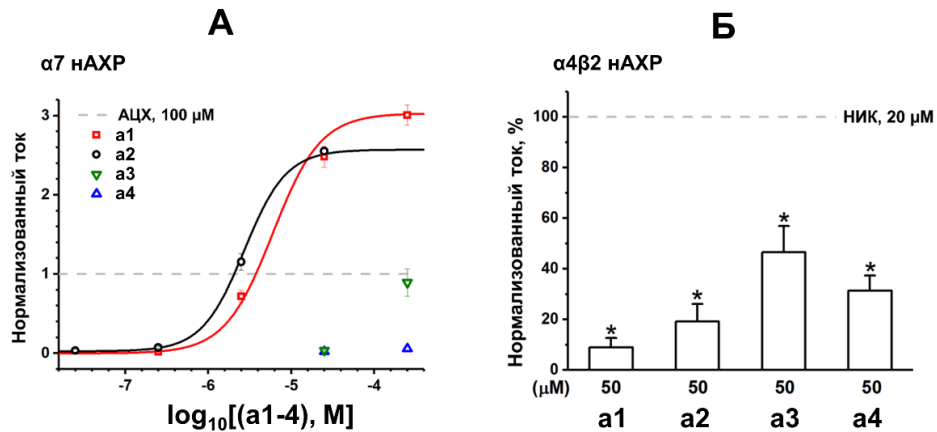


Рисунок 40. Активность соединений a1-4 в отношении $\alpha 7$ nAChR крысы (А) и $\alpha 4\beta 2$ nAChR человека (Б). (А) Тестирование соединений **a1** (красные квадраты), **a2** (черные круги), **a3** (зеленые треугольники) и **a4** (синие треугольники) в качестве агонистов $\alpha 7$ nAChR крысы. Значения пиковой амплитуды токов, вызванных действием новых соединений, нормализовались на значения пиковой амплитуды токов, вызванных действием 100 μ M ацетилхолина (АЦХ, серая пунктирная линия). Среднее \pm SEM, n = 3. (Б) Гистограммы отражают усредненные показатели степени ингибирования никотин (НИК, 20 μ M)-индуцированных токов под действием **a1**, **a2**, **a3** и **a4** в концентрации 50 μ M в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих $\alpha 4\beta 2$ nAChR человека. Среднее \pm SEM, n = 4 – 5. Черные звездочки обозначают статистическую разницу ($p < 0,05$) между нормализованными значениями амплитуды токов при отсутствии или в присутствии новых соединений **a1**, **a2**, **a3** и **a4** (однопараметрический дисперсионный анализ с тестом Тьюки).

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

Заключение

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы являются важными участниками передачи нервного сигнала в центральной и периферических нервных системах, а также вовлечены в протекание множества клеточных процессов: продукции воспалительных цитокинов, миграции, апоптозе и т.д. Широкое распространение данных рецепторов в организме человека и огромный спектр функций приводят к тому, что нарушение правильной работы nAChR связано с развитием множества болезней из числа нейродегенеративных и психических заболеваний, хронической боли, сепсиса и др. Вследствие многообразия представленных подтипов nAChR разработка эффективных лекарственных препаратов, обладающих высокой специфичностью действия и низким числом побочных эффектов, является актуальной, и поиск избирательно-действующих лигандов nAChR продолжается и в настоящее время. В лабораторной практике для тестирования потенциальных лигандов nAChR используются электрофизиологические методы и методы регистрации изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция, т.е. кальциевого имиджинга. В данной работе тестирование потенциальных лигандов $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAChR осуществлялось с помощью разработанного метода кальциевого имиджинга с использованием одноволнового генетически кодируемого сенсора Case12, который гетерологически коэкспрессируется с никотиновыми рецепторами в клетках линии мышинной нейробластомы Neuro2a. Кальциевый имиджинг с Case12 является более удобным и быстрым методом скрининга эффективности новых лигандов nAChR по сравнению с электрофизиологическим анализом, а также позволяет изучать многочисленные мутантные формы рецепторов за короткое время. Возможность регистрации интенсивности свечения Case12 с помощью флуоресцентного микроскопа или планшетного флуориметра со стандартной комбинацией фильтров для детекции GFP является преимуществом перед кальциевым имиджингом на основе генетически-кодируемых FRET-сенсоров, а отсутствие дополнительной стадии нагрузки клеток с использованием цитотоксического агента пробенецида и меньшая стоимость по сравнению с низкомолекулярными индикаторами (например, Fluo-4) делают кальциевый имиджинг с Case12 наиболее предпочтительным методом анализа потенциальных лигандов $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ и $\alpha 7$ nAChR.

В ходе исследования специфичности $\alpha 7/\alpha 9$ мутантных форм nAChR при помощи разработанного метода было обнаружено, что мутации L119D и F187S в ортостерическом лиганд-связывающем участке экстрацеллюлярного домена $\alpha 7$ nAChR приводят к наибольшим изменениям в фармакологических свойствах рецептора – у мутантных форм наблюдается существенное снижение аффинности к агонистам ацетилхолину и эпибатидину. Замена остатка лейцина на остаток аспарагиновой кислоты в положении 119 в последовательности $\alpha 7$ nAChR приводит к значительному ухудшению способности мутантного рецептора связывать

эпибатидин по сравнению с ацетилхолином. Возможно, различие аминокислотных остатков в положении 119 (нумерация $\alpha 7$ нАХР) является одним из ключевых факторов, объясняющих отличия в фармакологических свойствах $\alpha 7$ и $\alpha 9$ нАХР.

Комбинацией методов кальциевого имиджинга с Case12, классического электрофизиологического метода по двухэлектродной фиксации потенциала ооцитов *X. laevis* и радиолигандного анализа была протестирована аффинность, специфичность и механизм действия потенциальных лигандов нАХР из числа природных и синтетических низкомолекулярных или белковых соединений.

Интересные результаты были получены для структурных аналогов *d*-тубокурарина, алкалоидов ВВІQA1 и ВВІQA2, выделенных из экстрактов стеблей *Chondrodendron tomentosum*, которые индейцы племени Матис используют для охоты. Для ВВІQA1 и ВВІQA2 было показано, что они ингибируют ответы никотиновых рецепторов $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$, $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 9\alpha 10$ приблизительно в равной степени, что и *d*-тубокурарин. Причем ингибирование мышечного $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ рецептора проходит по смешанному механизму, в котором происходит связывание антагонистов как с орто-, так и с аллостерическими участками. Особенного внимания заслуживает обнаруженная специфичность действия ВВІQA1 и ВВІQA2 в отношении нАХР: оба алкалоида продемонстрировали существенное ухудшение сродства к другим представителям семейства Cys-петельных рецепторов – ГАМК_AР и 5-НТ_{3A}Р.

В ходе работы также было исследовано воздействие компонента яда шумящей гадюки *Bitis arietans*, баптида 2, на нейрональный $\alpha 7$ и мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ нАХР. Этот короткий пептид, не имеющий в своем составе дисульфидных связей, продемонстрировал ингибирующий эффект в отношении $\alpha 7$ и $\alpha 1\beta 1\epsilon \delta$ нАХР. Ингибирование этих подтипов никотиновых рецепторов протекает по неконкурентному механизму: баптид 2 связывается в аллостерических участках рецептора.

Весьма эффективным антагонистом $\alpha 9\alpha 10$ нАХР является панкреатическая фосфолипаза А₂, которая также связывается с нАХР мышечного типа ската *Torpedo californica* и $\alpha 7$ нАХР. Известно, что $\alpha 9\alpha 10$ нАХР вовлечены в передачу болевых сигналов, и ингибирование этих рецепторов предотвращает нейропатическую боль, поэтому обнаруженный эффект действия панкреатической фосфолипазы А₂ на $\alpha 9\alpha 10$ нАХР достаточно интересен с точки зрения разработки клинически эффективных антиболевых препаратов.

Новые соединения, полученные путем рационального химического синтеза, также являются источником эффективных лигандов никотиновых рецепторов. В данной работе были протестированы производные хинолина и 3-(пиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амины в качестве агонистов $\alpha 7$ нАХР. Пять из этих соединений (**q2**, **q3** 6-(1,4-диазабицикло[3.2.2]нонан-4-ил)хиолин; **q4** N-(хиниклидин-3-ил)хиолин-7-карбоксамид; **a1** 3-(пиридин-3-

ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин; и **a2** 3-(6-хлоропиридин-3-ил)бицикло[2.2.1]гептан-2-амин) обладают выраженными $\alpha 7$ -агонистическими и слабыми $\alpha 4\beta 2$ -антагонистическими свойствами.

Специфичность действия некоторых обнаруженных лигандов является несомненным преимуществом для дальнейшей разработки лекарственных препаратов на их основе. Изучение механизма их действия на никотиновые рецепторы позволит точнее оценить возможные последствия терапии и использовать новые лиганды более эффективно.

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 эписбатидину, что может быть одной из причин неспособности $\alpha 9$ nAХР активироваться под действием эписбатидина, агониста всех других nAХР;
3. Показано, что новые природные алкалоиды ВВ1QA1 и ВВ1QA2 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. ВВ1QA1 и ВВ1QA2 (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 сокращений

- 5-НТ – 5-гидрокситриптамин, или серотонин (от англ. *5-hydroxytryptamine*)
- 5-НТ₃P – серотониновый рецептор, принадлежащий семейству Cys-петельных рецепторов группы лиганд-управляемых ионных каналов
- 5-НТ_{3A}P – гомопентамерный серотониновый рецептор, состоящий из пяти одинаковых субъединиц 5-НТ_{3A}
- АЦХ – ацетилхолин
- АЦХСБ – ацетилхолин-связывающий белок
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГАМК – γ -аминомасляная кислота
- ГАМК_AP – рецептор γ -аминомасляной кислоты, принадлежащий семейству Cys-петельных рецепторов группы лиганд-управляемых ионных каналов
- ГлиP – глициновый рецептор, принадлежащий семейству Cys-петельных рецепторов группы лиганд-управляемых ионных каналов
- ДИ – доверительный интервал
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- МЛА – метилликаконитин
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- НАХP – никотиновый ацетилхолиновый рецептор, принадлежащий семейству Cys-петельных рецепторов группы лиганд-управляемых ионных каналов
- НИК – никотин
- ПАМ – позитивный аллостерический модулятор
- пФЛА₂ – панкреатическая фосфолипаза А₂
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЭПИ – эписбатидин
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум
- ANOVA – дисперсионный анализ (от англ. *analysis of variance*)
- ВВИQA1, ВВИQA2, ВВИQA3 – бисбензилтетрагидроизохинолиновые алкалоиды (от англ. *bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids*)
- СаМ – кальмодулин (от англ. *calmodulin*)
- сpFP – флуоресцентные белки с измененной последовательностью структурных элементов (от англ. *circular permuted fluorescent protein*)

d-TC – тубокурарин (от англ. *d-tubocurarine*)

FRET – Фёрстеровский перенос энергии (от англ. *Förster resonance energy transfer*)

GECI – генетически-кодируемый кальциевый индикатор (от англ. *genetically encoded calcium indicator*)

NMDAR – ионотропный глутаматный рецептор N-метил-D-аспартата (от англ. *N-methyl-D-aspartate receptor*)

PI – йодистый пропидий (от англ. *propidium iodide*)

SD – стандартное отклонение (от англ. *standard deviation*)

SEM – стандартная ошибка среднего (от англ. *standard error of the mean*)

TMRE – этиловый эфир тетраметилродамина (от англ. *tetramethylrhodamine, ethyl ester*)

$\alpha 9^*$ nAХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор, содержащий субъединицу $\alpha 9$ (или другую субъединицу, помеченную звездочкой)

α Bgt – α -бунгаротоксин (от англ. *α -bungarotoxin*)

α Ctx – α -кобротоксин (от англ. *α -cobratoxin*)

Список литературы

1. Albuquerque E. X., Pereira E. F., Alkondon M., Rogers S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function // *Physiol Rev.* - 2009 - Т. 89. - № 1. - С. 73-120.
2. Sigel E., Steinmann M. E. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors // *J Biol Chem.* - 2012 - Т. 287. - № 48. - С. 40224-40231.
3. Betz H., Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity // *J Neurochem.* - 2006 - Т. 97. - № 6. - С. 1600-1610.
4. Lummis S. C. 5-HT(3) receptors // *J Biol Chem.* - 2012 - Т. 287. - № 48. - С. 40239-40245.
5. Thompson A. J., Lester H. A., Lummis S. C. The structural basis of function in Cys-loop receptors // *Q Rev Biophys.* - 2010 - Т. 43. - № 4. - С. 449-499.
6. Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution // *J Mol Biol.* - 2005 - Т. 346. - № 4. - С. 967-989.
7. Green W. N., Wanamaker C. P. The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly // *J Biol Chem.* - 1997 - Т. 272. - № 33. - С. 20945-20953.
8. Jha A., Cadugan D. J., Purohit P., Auerbach A. Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: the cys-loop and M2-M3 linker // *J Gen Physiol.* - 2007 - Т. 130. - № 6. - С. 547-558.
9. Le Novere N., Corringer P. J., Changeux J. P. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences // *J Neurobiol.* - 2002 - Т. 53. - № 4. - С. 447-456.
10. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors // *Nat Rev Neurosci.* - 2002 - Т. 3. - № 2. - С. 102-114.
11. Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors. // *Tocris Bioscience Scientific Review Series.* - 2014.
12. Brejc K., van Dijk W. J., Klaassen R. V., Schuurmans M., van Der Oost J., Smit A. B., Sixma T. K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors // *Nature.* - 2001 - Т. 411. - № 6835. - С. 269-276.
13. Smit A. B., Syed N. I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K. S., Lodder H., van der Schors R. C., van Elk R., Sorgedraeger B., Brejc K., Sixma T. K., Geraerts W. P. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission // *Nature.* - 2001 - Т. 411. - № 6835. - С. 261-268.

- 14.** Celie P. H., Klaassen R. V., van Rossum-Fikkert S. E., van Elk R., van Nierop P., Smit A. B., Sixma T. K. Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors // *J Biol Chem.* - 2005 - T. 280. - № 28. - C. 26457-26466.
- 15.** Hansen S. B., Radic Z., Talley T. T., Molles B. E., Deerinck T., Tsigelny I., Taylor P. Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein // *J Biol Chem.* - 2002 - T. 277. - № 44. - C. 41299-41302.
- 16.** Celie P. H., van Rossum-Fikkert S. E., van Dijk W. J., Brejc K., Smit A. B., Sixma T. K. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures // *Neuron.* - 2004 - T. 41. - № 6. - C. 907-914.
- 17.** Cederholm J. M., Schofield P. R., Lewis T. M. Gating mechanisms in Cys-loop receptors // *Eur Biophys J.* - 2009 - T. 39. - № 1. - C. 37-49.
- 18.** Tasneem A., Iyer L. M., Jakobsson E., Aravind L. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels // *Genome Biol.* - 2005 - T. 6. - № 1. - C. R4.
- 19.** Bocquet N., Prado de Carvalho L., Cartaud J., Neyton J., Le Poupon C., Taly A., Grutter T., Changeux J. P., Corringer P. J. A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family // *Nature.* - 2007 - T. 445. - № 7123. - C. 116-119.
- 20.** Hilf R. J., Dutzler R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel // *Nature.* - 2008 - T. 452. - № 7185. - C. 375-379.
- 21.** Dellisanti C. D., Yao Y., Stroud J. C., Wang Z. Z., Chen L. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution // *Nat Neurosci.* - 2007 - T. 10. - № 8. - C. 953-962.
- 22.** Li S. X., Huang S., Bren N., Noridomi K., Dellisanti C. D., Sine S. M., Chen L. Ligand-binding domain of an alpha7-nicotinic receptor chimera and its complex with agonist // *Nat Neurosci.* - 2011 - T. 14. - № 10. - C. 1253-1259.
- 23.** Hibbs R. E., Gouaux E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor // *Nature.* - 2011 - T. 474. - № 7349. - C. 54-60.
- 24.** Hassaine G., Deluz C., Grasso L., Wyss R., Tol M. B., Hovius R., Graff A., Stahlberg H., Tomizaki T., Desmyter A., Moreau C., Li X. D., Poitevin F., Vogel H., Nury H. X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor // *Nature.* - 2014 - T. 512. - № 7514. - C. 276-281.

- 25.** Huang X., Chen H., Michelsen K., Schneider S., Shaffer P. L. Crystal structure of human glycine receptor-alpha3 bound to antagonist strychnine // *Nature*. - 2015 - T. 526. - № 7572. - C. 277-280.
- 26.** Miller P. S., Aricescu A. R. Crystal structure of a human GABAA receptor // *Nature*. - 2014 - T. 512. - № 7514. - C. 270-275.
- 27.** Zouridakis M., Giastas P., Zarkadas E., Chroni-Tzartou D., Bregestovski P., Tzartos S. J. Crystal structures of free and antagonist-bound states of human alpha9 nicotinic receptor extracellular domain // *Nat Struct Mol Biol*. - 2014 - T. 21. - № 11. - C. 976-980.
- 28.** Morales-Perez C. L., Noviello C. M., Hibbs R. E. X-ray structure of the human alpha4beta2 nicotinic receptor // *Nature*. - 2016 - T. 538. - № 7625. - C. 411-415.
- 29.** Nelson M. E., Kuryatov A., Choi C. H., Zhou Y., Lindstrom J. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors // *Mol Pharmacol*. - 2003 - T. 63. - № 2. - C. 332-341.
- 30.** Tapia L., Kuryatov A., Lindstrom J. Ca²⁺ permeability of the (alpha4)₃(beta2)₂ stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)₂(beta2)₃ human acetylcholine receptors // *Mol Pharmacol*. - 2007 - T. 71. - № 3. - C. 769-776.
- 31.** Mazzaferro S., Benallegue N., Carbone A., Gasparri F., Vijayan R., Biggin P. C., Moroni M., Bermudez I. Additional acetylcholine (ACh) binding site at alpha4/alpha4 interface of (alpha4beta2)₂alpha4 nicotinic receptor influences agonist sensitivity // *J Biol Chem*. - 2011 - T. 286. - № 35. - C. 31043-31054.
- 32.** Sauguet L., Shahsavari A., Poitevin F., Huon C., Menny A., Nemezc A., Haouz A., Changeux J. P., Corringer P. J., Delarue M. Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2014 - T. 111. - № 3. - C. 966-971.
- 33.** Corringer P. J., Baaden M., Bocquet N., Delarue M., Dufresne V., Nury H., Prevost M., Van Renterghem C. Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues // *J Physiol*. - 2010 - T. 588. - № Pt 4. - C. 565-572.
- 34.** Gielen M., Thomas P., Smart T. G. The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors // *Nat Commun*. - 2015 - T. 6. - C. 6829.
- 35.** Millar N. S., Harkness P. C. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review) // *Mol Membr Biol*. - 2008 - T. 25. - № 4. - C. 279-292.
- 36.** Wanamaker C. P., Christianson J. C., Green W. N. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly // *Ann N Y Acad Sci*. - 2003 - T. 998. - C. 66-80.

37. Alder N. N., Johnson A. E. Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum // *J Biol Chem.* - 2004 - T. 279. - № 22. - C. 22787-22790.
38. Colombo S. F., Mazzo F., Pistillo F., Gotti C. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors // *Biochem Pharmacol.* - 2013 - T. 86. - № 8. - C. 1063-1073.
39. Christianson J. C., Green W. N. Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system // *EMBO J.* - 2004 - T. 23. - № 21. - C. 4156-4165.
40. Cooper S. T., Millar N. S. Host cell-specific folding and assembly of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit // *J Neurochem.* - 1997 - T. 68. - № 5. - C. 2140-2151.
41. Kassner P. D., Berg D. K. Differences in the fate of neuronal acetylcholine receptor protein expressed in neurons and stably transfected cells // *J Neurobiol.* - 1997 - T. 33. - № 7. - C. 968-982.
42. Koperniak T. M., Garg B. K., Boltax J., Loring R. H. Cell-specific effects on surface alpha7 nicotinic receptor expression revealed by over-expression and knockdown of rat RIC3 protein // *J Neurochem.* - 2013 - T. 124. - № 3. - C. 300-309.
43. Millar N. S. RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone // *Br J Pharmacol.* - 2008 - T. 153 Suppl 1. - C. S177-183.
44. Nguyen M., Alfonso A., Johnson C. D., Rand J. B. *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase // *Genetics.* - 1995 - T. 140. - № 2. - C. 527-535.
45. Williams M. E., Burton B., Urrutia A., Shcherbatko A., Chavez-Noriega L. E., Cohen C. J., Aiyar J. Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells // *J Biol Chem.* - 2005 - T. 280. - № 2. - C. 1257-1263.
46. Wang Y., Yao Y., Tang X. Q., Wang Z. Z. Mouse RIC-3, an endoplasmic reticulum chaperone, promotes assembly of the alpha7 acetylcholine receptor through a cytoplasmic coiled-coil domain // *J Neurosci.* - 2009 - T. 29. - № 40. - C. 12625-12635.
47. Alexander J. K., Sagher D., Krivoshein A. V., Criado M., Jefford G., Green W. N. Ric-3 promotes alpha7 nicotinic receptor assembly and trafficking through the ER subcompartment of dendrites // *J Neurosci.* - 2010 - T. 30. - № 30. - C. 10112-10126.
48. Dau A., Komal P., Truong M., Morris G., Evans G., Nashmi R. RIC-3 differentially modulates alpha4beta2 and alpha7 nicotinic receptor assembly, expression, and nicotine-induced receptor upregulation // *BMC Neurosci.* - 2013 - T. 14. - C. 47.
49. Valles A. S., Barrantes F. J. Chaperoning alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors // *Biochim Biophys Acta.* - 2012 - T. 1818. - № 3. - C. 718-729.

- 50.** Castelan F., Castillo M., Mulet J., Sala S., Sala F., Dominguez Del Toro E., Criado M. Molecular characterization and localization of the RIC-3 protein, an effector of nicotinic acetylcholine receptor expression // *J Neurochem.* - 2008 - T. 105. - № 3. - C. 617-627.
- 51.** Kuryatov A., Mukherjee J., Lindstrom J. Chemical chaperones exceed the chaperone effects of RIC-3 in promoting assembly of functional alpha7 AChRs // *PLoS One.* - 2013 - T. 8. - № 4. - C. e62246.
- 52.** Gu S., Matta J. A., Lord B., Harrington A. W., Sutton S. W., Davini W. B., Bredt D. S. Brain alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO // *Neuron.* - 2016 - T. 89. - № 5. - C. 948-955.
- 53.** Li P., Steinbach J. H. The neuronal nicotinic alpha4beta2 receptor has a high maximal probability of being open // *Br J Pharmacol.* - 2010 - T. 160. - № 8. - C. 1906-1915.
- 54.** Gardner P., Ogden D. C., Colquhoun D. Conductances of single ion channels opened by nicotinic agonists are indistinguishable // *Nature.* - 1984 - T. 309. - № 5964. - C. 160-162.
- 55.** Mukhtasimova N., Lee W. Y., Wang H. L., Sine S. M. Detection and trapping of intermediate states priming nicotinic receptor channel opening // *Nature.* - 2009 - T. 459. - № 7245. - C. 451-454.
- 56.** Papke R. L., Porter Papke J. K. Comparative pharmacology of rat and human alpha7 nAChR conducted with net charge analysis // *Br J Pharmacol.* - 2002 - T. 137. - № 1. - C. 49-61.
- 57.** Jonsson M., Gurley D., Dabrowski M., Larsson O., Johnson E. C., Eriksson L. I. Distinct pharmacologic properties of neuromuscular blocking agents on human neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a possible explanation for the train-of-four fade // *Anesthesiology.* - 2006 - T. 105. - № 3. - C. 521-533.
- 58.** Alkondon M., Pereira E. F., Cortes W. S., Maelicke A., Albuquerque E. X. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons // *Eur J Neurosci.* - 1997 - T. 9. - № 12. - C. 2734-2742.
- 59.** Alkondon M., Albuquerque E. X. Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2006 - T. 318. - № 1. - C. 268-275.
- 60.** Wessler I. K., Kirkpatrick C. J. Activation of muscarinic receptors by non-neuronal acetylcholine // *Handb Exp Pharmacol.* - 2012 - № 208. - C. 469-491.
- 61.** Du Y., Li R., Lau W. B., Zhao J., Lopez B., Christopher T. A., Ma X. L., Wang Y. Adiponectin at Physiologically Relevant Concentrations Enhances the Vasorelaxative Effect of Acetylcholine via Cav-1/AdipoR-1 Signaling // *PLoS One.* - 2016 - T. 11. - № 3. - C. e0152247.

62. Wang J., Lindstrom J. Orthosteric and allosteric potentiation of heteromeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors // *Br J Pharmacol.* - 2017.
63. Jensen A. A., Frolund B., Liljefors T., Krosggaard-Larsen P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations // *J Med Chem.* - 2005 - T. 48. - № 15. - C. 4705-4745.
64. Badio B., Daly J. W. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist // *Mol Pharmacol.* - 1994 - T. 45. - № 4. - C. 563-569.
65. Bai D., Xu R., Chu G., Zhu X. Synthesis of (+/-)-Epibatidine and Its Analogues // *J Org Chem.* - 1996 - T. 61. - № 14. - C. 4600-4606.
66. Carroll F. I. Epibatidine structure-activity relationships // *Bioorg Med Chem Lett.* - 2004 - T. 14. - № 8. - C. 1889-1896.
67. Cucchiario G., Chaijale N., Commons K. G. The locus coeruleus nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine // *Neuropharmacology.* - 2006 - T. 50. - № 7. - C. 769-776.
68. Verbitsky M., Rothlin C. V., Katz E., Elgoyhen A. B. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor // *Neuropharmacology.* - 2000 - T. 39. - № 13. - C. 2515-2524.
69. Hurst R., Rollema H., Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics // *Pharmacol Ther.* - 2013 - T. 137. - № 1. - C. 22-54.
70. Wonnacott S., Barik J. Nicotinic Acetylcholine Receptors // *Tocris Bioscience Scientific Review Series.* - 2007.
71. Benowitz N. L., Hukkanen J., Jacob P., 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers // *Handb Exp Pharmacol.* - 2009 - № 192. - C. 29-60.
72. Hukkanen J., Jacob P., 3rd, Benowitz N. L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine // *Pharmacol Rev.* - 2005 - T. 57. - № 1. - C. 79-115.
73. Matta S. G., Balfour D. J., Benowitz N. L., Boyd R. T., Buccafusco J. J., Caggiula A. R., Craig C. R., Collins A. C., Damaj M. I., Donny E. C., Gardiner P. S., Grady S. R., Heberlein U., Leonard S. S., Levin E. D., Lukas R. J., Markou A., Marks M. J., McCallum S. E., Parameswaran N., Perkins K. A., Picciotto M. R., Quik M., Rose J. E., Rothenfluh A., Schafer W. R., Stolerman I. P., Tyndale R. F., Wehner J. M., Zirger J. M. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research // *Psychopharmacology (Berl).* - 2007 - T. 190. - № 3. - C. 269-319.

- 74.** Buccafusco J. J., Terry A. V., Jr. The potential role of cotinine in the cognitive and neuroprotective actions of nicotine // *Life Sci.* - 2003 - T. 72. - № 26. - C. 2931-2942.
- 75.** O'Leary K., Parameswaran N., McIntosh J. M., Quik M. Cotinine selectively activates a subpopulation of alpha3/alpha6beta2 nicotinic receptors in monkey striatum // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2008 - T. 325. - № 2. - C. 646-654.
- 76.** Dwoskin L. P., Teng L., Buxton S. T., Crooks P. A. (S)-(-)-Cotinine, the major brain metabolite of nicotine, stimulates nicotinic receptors to evoke [3H]dopamine release from rat striatal slices in a calcium-dependent manner // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1999 - T. 288. - № 3. - C. 905-911.
- 77.** Vainio P. J., Tuominen R. K. Cotinine binding to nicotinic acetylcholine receptors in bovine chromaffin cell and rat brain membranes // *Nicotine Tob Res.* - 2001 - T. 3. - № 2. - C. 177-182.
- 78.** Daly J. W. Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources // *Cell Mol Neurobiol.* - 2005 - T. 25. - № 3-4. - C. 513-552.
- 79.** Azam L., McIntosh J. M. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors // *Acta Pharmacol Sin.* - 2009 - T. 30. - № 6. - C. 771-783.
- 80.** Yamauchi J. G., Nemezc A., Nguyen Q. T., Muller A., Schroeder L. F., Talley T. T., Lindstrom J., Kleinfeld D., Taylor P. Characterizing ligand-gated ion channel receptors with genetically encoded Ca²⁺⁺ sensors // *PLoS One.* - 2011 - T. 6. - № 1. - C. e16519.
- 81.** Jonsson Fagerlund M., Dabrowski M., Eriksson L. I. Pharmacological characteristics of the inhibition of nondepolarizing neuromuscular blocking agents at human adult muscle nicotinic acetylcholine receptor // *Anesthesiology.* - 2009 - T. 110. - № 6. - C. 1244-1252.
- 82.** Karpen J. W., Hess G. P. Acetylcholine receptor inhibition by d-tubocurarine involves both a competitive and a noncompetitive binding site as determined by stopped-flow measurements of receptor-controlled ion flux in membrane vesicles // *Biochemistry.* - 1986 - T. 25. - № 7. - C. 1786-1792.
- 83.** Dutertre S., Nicke A., Tsetlin V. I. Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms // *Neuropharmacology.* - 2017 - T. 127. - C. 196-223.
- 84.** Kini R. M., Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets // *Toxicon.* - 2010 - T. 56. - № 6. - C. 855-867.
- 85.** Huang S., Li S. X., Bren N., Cheng K., Gomoto R., Chen L., Sine S. M. Complex between alpha-bungarotoxin and an alpha7 nicotinic receptor ligand-binding domain chimaera // *Biochem J.* - 2013 - T. 454. - № 2. - C. 303-310.

- 86.** Shelukhina I. V., Kryukova E. V., Lips K. S., Tsetlin V. I., Kummer W. Presence of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on dorsal root ganglion neurons proved using knockout mice and selective alpha-neurotoxins in histochemistry // *J Neurochem.* - 2009 - T. 109. - № 4. - C. 1087-1095.
- 87.** Paleari L., Negri E., Catassi A., Cilli M., Servent D., D'Angelillo R., Cesario A., Russo P., Fini M. Inhibition of nonneuronal alpha7-nicotinic receptor for lung cancer treatment // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2009 - T. 179. - № 12. - C. 1141-1150.
- 88.** Reid P. F. Alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: a review of the literature leading to its development for this application // *Crit Rev Immunol.* - 2007 - T. 27. - № 4. - C. 291-302.
- 89.** Chen Z. X., Zhang H. L., Gu Z. L., Chen B. W., Han R., Reid P. F., Raymond L. N., Qin Z. H. A long-form alpha-neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia // *Acta Pharmacol Sin.* - 2006 - T. 27. - № 4. - C. 402-408.
- 90.** Gong S., Liang Q., Zhu Q., Ding D., Yin Q., Tao J., Jiang X. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is involved in the cobratoxin-induced antinociception in an animal model of neuropathic pain // *Toxicon.* - 2015 - T. 93. - C. 31-36.
- 91.** Cheng B. C., Zhou X. P., Zhu Q., Gong S., Qin Z. H., Reid P. F., Raymond L. N., Yin Q. Z., Jiang X. H. Cobratoxin inhibits pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats: involvement of cholinergic and serotonergic systems // *Toxicon.* - 2009 - T. 54. - № 3. - C. 224-232.
- 92.** Malca Garcia G. R., Hennig L., Shelukhina I. V., Kudryavtsev D. S., Bussmann R. W., Tsetlin V. I., Giannis A. Curare Alkaloids: Constituents of a Matis Dart Poison // *J Nat Prod.* - 2015 - T. 78. - № 11. - C. 2537-2544.
- 93.** Wintersteiner O., Dutcher J. D. Curare Alkaloids from *Chondodendron Tomentosum* // *Science.* - 1943 - T. 97. - № 2525. - C. 467-470.
- 94.** Heier T. [Muscle relaxants] // *Tidsskr Nor Laegeforen.* - 2010 - T. 130. - № 4. - C. 398-401.
- 95.** Sine S. M. End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease // *Physiol Rev.* - 2012 - T. 92. - № 3. - C. 1189-1234.
- 96.** Brams M., Pandya A., Kuzmin D., van Elk R., Krijnen L., Yakel J. L., Tsetlin V., Smit A. B., Ulens C. A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cys-loop receptors // *PLoS Biol.* - 2011 - T. 9. - № 3. - C. e1001034.
- 97.** Paul M., Callahan R., Au J., Kindler C. H., Yost C. S. Antiemetics of the 5-hydroxytryptamine 3A antagonist class inhibit muscle nicotinic acetylcholine receptors // *Anesth Analg.* - 2005 - T. 101. - № 3. - C. 715-721, table of contents.

- 98.** Zhang R., Wen X., Militante J., Hester B., Rhubottom H. E., Sun H., Leidenheimer N. J., Yan D., White M. M., Machu T. K. The role of loop F residues in determining differential d-tubocurarine potencies in mouse and human 5-hydroxytryptamine 3A receptors // *Biochemistry*. - 2007 - T. 46. - № 5. - C. 1194-1204.
- 99.** Wotring V. E., Yoon K. W. The inhibitory effects of nicotinic antagonists on currents elicited by GABA in rat hippocampal neurons // *Neuroscience*. - 1995 - T. 67. - № 2. - C. 293-300.
- 100.** Timmermann D. B., Gronlien J. H., Kohlhaas K. L., Nielsen E. O., Dam E., Jorgensen T. D., Ahring P. K., Peters D., Holst D., Christensen J. K., Malysz J., Briggs C. A., Gopalakrishnan M., Olsen G. M. An allosteric modulator of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo // *J Pharmacol Exp Ther*. - 2007 - T. 323. - № 1. - C. 294-307.
- 101.** Hurst R. S., Hajos M., Raggenbass M., Wall T. M., Higdon N. R., Lawson J. A., Rutherford-Root K. L., Berkenpas M. B., Hoffmann W. E., Piotrowski D. W., Groppi V. E., Allaman G., Ogier R., Bertrand S., Bertrand D., Arneric S. P. A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization // *J Neurosci*. - 2005 - T. 25. - № 17. - C. 4396-4405.
- 102.** Maelicke A., Samochocki M., Jostock R., Fehrenbacher A., Ludwig J., Albuquerque E. X., Zerlin M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease // *Biol Psychiatry*. - 2001 - T. 49. - № 3. - C. 279-288.
- 103.** Samochocki M., Hoffle A., Fehrenbacher A., Jostock R., Ludwig J., Christner C., Radina M., Zerlin M., Ullmer C., Pereira E. F., Lubbert H., Albuquerque E. X., Maelicke A. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors // *J Pharmacol Exp Ther*. - 2003 - T. 305. - № 3. - C. 1024-1036.
- 104.** Jin X., Steinbach J. H. A portable site: a binding element for 17beta-estradiol can be placed on any subunit of a nicotinic alpha4beta2 receptor // *J Neurosci*. - 2011 - T. 31. - № 13. - C. 5045-5054.
- 105.** Miwa J. M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G. W., Sanchez R., Sali A., Role L. W., Heintz N. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS // *Neuron*. - 1999 - T. 23. - № 1. - C. 105-114.
- 106.** Durek T., Shelukhina I. V., Tae H. S., Thongyoo P., Spirova E. N., Kudryavtsev D. S., Kasheverov I. E., Faure G., Corringer P. J., Craik D. J., Adams D. J., Tsetlin V. I. Interaction of Synthetic Human SLURP-1 with the Nicotinic Acetylcholine Receptors // *Sci Rep*. - 2017 - T. 7. - № 1. - C. 16606.

- 107.** Chimienti F., Hogg R. C., Plantard L., Lehmann C., Brakch N., Fischer J., Huber M., Bertrand D., Hohl D. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda // *Hum Mol Genet.* - 2003 - T. 12. - № 22. - C. 3017-3024.
- 108.** Bacher I., Wu B., Shytle D. R., George T. P. Mecamylamine - a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders // *Expert Opin Pharmacother.* - 2009 - T. 10. - № 16. - C. 2709-2721.
- 109.** Coe J. W., Vetelino M. G., Bashore C. G., Wirtz M. C., Brooks P. R., Arnold E. P., Lebel L. A., Fox C. B., Sands S. B., Davis T. I., Schulz D. W., Rollema H., Tingley F. D., 3rd, O'Neill B. T. In pursuit of alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonists for smoking cessation: carbon analogs of (-)-cytisine // *Bioorg Med Chem Lett.* - 2005 - T. 15. - № 12. - C. 2974-2979.
- 110.** Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea // *J Cell Comp Physiol.* - 1962 - T. 59. - C. 223-239.
- 111.** Ridgway E. B., Ashley C. C. Calcium transients in single muscle fibers // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1967 - T. 29. - № 2. - C. 229-234.
- 112.** Perez Koldenkova V., Nagai T. Genetically encoded Ca(2+) indicators: properties and evaluation // *Biochim Biophys Acta.* - 2013 - T. 1833. - № 7. - C. 1787-1797.
- 113.** Germond A., Fujita H., Ichimura T., Watanabe T. M. Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters // *Biophys Rev.* - 2016 - T. 8. - № 2. - C. 121-138.
- 114.** Souslova E. A., Belousov V. V., Lock J. G., Stromblad S., Kasparov S., Bolshakov A. P., Pinelis V. G., Labas Y. A., Lukyanov S., Mayr L. M., Chudakov D. M. Single fluorescent protein-based Ca²⁺ sensors with increased dynamic range // *BMC Biotechnol.* - 2007 - T. 7. - C. 37.
- 115.** Bassett J. J., Monteith G. R. Genetically Encoded Calcium Indicators as Probes to Assess the Role of Calcium Channels in Disease and for High-Throughput Drug Discovery // *Adv Pharmacol.* - 2017 - T. 79. - C. 141-171.
- 116.** Gong Y., Jiang J. H., Li S. T. Functional expression of human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human embryonic kidney 293 cells // *Mol Med Rep.* - 2016 - T. 14. - № 3. - C. 2257-2263.
- 117.** Groot-Kormelink P. J., Ferrand S., Kelley N., Bill A., Freuler F., Imbert P. E., Marelli A., Gerwin N., Sivilotti L. G., Miraglia L., Orth A. P., Oakeley E. J., Schopfer U., Siehler S. High Throughput Random Mutagenesis and Single Molecule Real Time Sequencing of the Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor // *PLoS One.* - 2016 - T. 11. - № 9. - C. e0163129.

- 118.** Nguyen Q. T., Schroeder L. F., Mank M., Muller A., Taylor P., Griesbeck O., Kleinfeld D. An in vivo biosensor for neurotransmitter release and in situ receptor activity // *Nat Neurosci.* - 2010 - T. 13. - № 1. - C. 127-132.
- 119.** Utsintong M., Rojsanga P., Ho K. Y., Talley T. T., Olson A. J., Matsumoto K., Vajragupta O. Virtual screening against acetylcholine binding protein // *J Biomol Screen.* - 2012 - T. 17. - № 2. - C. 204-215.
- 120.** Hynes J., O'Riordan T. C., Zhdanov A. V., Uray G., Will Y., Papkovsky D. B. In vitro analysis of cell metabolism using a long-decay pH-sensitive lanthanide probe and extracellular acidification assay // *Anal Biochem.* - 2009 - T. 390. - № 1. - C. 21-28.
- 121.** Wang X., Su B., Liu W., He X., Gao Y., Castellani R. J., Perry G., Smith M. A., Zhu X. DLP1-dependent mitochondrial fragmentation mediates 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in neurons: implications for Parkinson's disease // *Aging Cell.* - 2011 - T. 10. - № 5. - C. 807-823.
- 122.** Zhdanov A. V., Waters A. H., Golubeva A. V., Dmitriev R. I., Papkovsky D. B. Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling // *Biochim Biophys Acta.* - 2014 - T. 1837. - № 1. - C. 51-62.
- 123.** Gourine A. V., Kasymov V., Marina N., Tang F., Figueiredo M. F., Lane S., Teschemacher A. G., Spyer K. M., Deisseroth K., Kasparov S. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP // *Science.* - 2010 - T. 329. - № 5991. - C. 571-575.
- 124.** Guo F., Liu B., Tang F., Lane S., Souslova E. A., Chudakov D. M., Paton J. F., Kasparov S. Astroglia are a possible cellular substrate of angiotensin(1-7) effects in the rostral ventrolateral medulla // *Cardiovasc Res.* - 2010 - T. 87. - № 3. - C. 578-584.
- 125.** Kasymov V., Larina O., Castaldo C., Marina N., Patrushev M., Kasparov S., Gourine A. V. Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia // *J Neurosci.* - 2013 - T. 33. - № 2. - C. 435-441.
- 126.** Chang K. T., Niescier R. F., Min K. T. Mitochondrial matrix Ca²⁺ as an intrinsic signal regulating mitochondrial motility in axons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2011 - T. 108. - № 37. - C. 15456-15461.
- 127.** Niescier R. F., Chang K. T., Min K. T. Miro, MCU, and calcium: bridging our understanding of mitochondrial movement in axons // *Front Cell Neurosci.* - 2013 - T. 7. - C. 148.
- 128.** Cai B., Chen X., Liu F., Li J., Gu L., Liu J. R., Liu J. A cell-based functional assay using a green fluorescent protein-based calcium indicator dCys-GCaMP // *Assay Drug Dev Technol.* - 2014 - T. 12. - № 6. - C. 342-351.

- 129.** Akerboom J., Chen T. W., Wardill T. J., Tian L., Marvin J. S., Mutlu S., Calderon N. C., Esposti F., Borghuis B. G., Sun X. R., Gordus A., Orger M. B., Portugues R., Engert F., Macklin J. J., Filosa A., Aggarwal A., Kerr R. A., Takagi R., Kracun S., Shigetomi E., Khakh B. S., Baier H., Lagnado L., Wang S. S., Bargmann C. I., Kimmel B. E., Jayaraman V., Svoboda K., Kim D. S., Schreiter E. R., Looger L. L. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging // *J Neurosci.* - 2012 - T. 32. - № 40. - C. 13819-13840.
- 130.** Chen T. W., Wardill T. J., Sun Y., Pulver S. R., Renninger S. L., Baohan A., Schreiter E. R., Kerr R. A., Orger M. B., Jayaraman V., Looger L. L., Svoboda K., Kim D. S. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity // *Nature.* - 2013 - T. 499. - № 7458. - C. 295-300.
- 131.** King J. R., Ullah A., Bak E., Jafri M. S., Kabbani N. Ionotropic and Metabotropic Mechanisms of Allosteric Modulation of alpha7 Nicotinic Receptor Intracellular Calcium // *Mol Pharmacol.* - 2018 - T. 93. - № 6. - C. 601-611.
- 132.** Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C., Sakmann B. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor // *Nature.* - 1986 - T. 321. - № 6068. - C. 406-411.
- 133.** Missias A. C., Chu G. C., Klocke B. J., Sanes J. R., Merlie J. P. Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch // *Dev Biol.* - 1996 - T. 179. - № 1. - C. 223-238.
- 134.** Missias A. C., Mudd J., Cunningham J. M., Steinbach J. H., Merlie J. P., Sanes J. R. Deficient development and maintenance of postsynaptic specializations in mutant mice lacking an 'adult' acetylcholine receptor subunit // *Development.* - 1997 - T. 124. - № 24. - C. 5075-5086.
- 135.** Schwarz H., Giese G., Muller H., Koenen M., Witzemann V. Different functions of fetal and adult AChR subtypes for the formation and maintenance of neuromuscular synapses revealed in epsilon-subunit-deficient mice // *Eur J Neurosci.* - 2000 - T. 12. - № 9. - C. 3107-3116.
- 136.** Cossins J., Webster R., Maxwell S., Burke G., Vincent A., Beeson D. A mouse model of AChR deficiency syndrome with a phenotype reflecting the human condition // *Hum Mol Genet.* - 2004 - T. 13. - № 23. - C. 2947-2957.
- 137.** Morgan N. V., Brueton L. A., Cox P., Grealley M. T., Tolmie J., Pasha S., Aligianis I. A., van Bokhoven H., Marton T., Al-Gazali L., Morton J. E., Oley C., Johnson C. A., Trembath R. C., Brunner H. G., Maher E. R. Mutations in the embryonal subunit of the acetylcholine receptor (CHRNA7) cause lethal and Escobar variants of multiple pterygium syndrome // *Am J Hum Genet.* - 2006 - T. 79. - № 2. - C. 390-395.

- 138.** Liu Y., Padgett D., Takahashi M., Li H., Sayeed A., Teichert R. W., Olivera B. M., McArdle J. J., Green W. N., Lin W. Essential roles of the acetylcholine receptor gamma-subunit in neuromuscular synaptic patterning // *Development*. - 2008 - T. 135. - № 11. - C. 1957-1967.
- 139.** Wheeler S. V., Jane S. D., Cross K. M., Chad J. E., Foreman R. C. Membrane clustering and bungarotoxin binding by the nicotinic acetylcholine receptor: role of the beta subunit // *J Neurochem*. - 1994 - T. 63. - № 5. - C. 1891-1899.
- 140.** Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M., Tzartos S. J. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity // *FEBS J*. - 2007 - T. 274. - № 15. - C. 3799-3845.
- 141.** Tzartos S. J., Barkas T., Cung M. T., Mamalaki A., Marraud M., Orlewski P., Papanastasiou D., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Tsantili P., Tsikaris V. Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor // *Immunol Rev*. - 1998 - T. 163. - C. 89-120.
- 142.** Lindstrom J. M. Acetylcholine receptors and myasthenia // *Muscle Nerve*. - 2000 - T. 23. - № 4. - C. 453-477.
- 143.** Luo J., Lindstrom J. AChR-specific immunosuppressive therapy of myasthenia gravis // *Biochem Pharmacol*. - 2015 - T. 97. - № 4. - C. 609-619.
- 144.** Gomez A. M., Van Den Broeck J., Vrolix K., Janssen S. P., Lemmens M. A., Van Der Esch E., Duimel H., Frederik P., Molenaar P. C., Martinez-Martinez P., De Baets M. H., Losen M. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis-pathogenesis at the neuromuscular junction // *Autoimmunity*. - 2010 - T. 43. - № 5-6. - C. 353-370.
- 145.** Conti-Fine B. M., Milani M., Kaminski H. J. Myasthenia gravis: past, present, and future // *J Clin Invest*. - 2006 - T. 116. - № 11. - C. 2843-2854.
- 146.** Diaz A., Black E., Dunning J. Is thymectomy in non-thymomatous myasthenia gravis of any benefit? // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. - 2014 - T. 18. - № 3. - C. 381-389.
- 147.** Noridomi K., Watanabe G., Hansen M. N., Han G. W., Chen L. Structural insights into the molecular mechanisms of myasthenia gravis and their therapeutic implications // *Elife*. - 2017 - T. 6.
- 148.** Tracey K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway // *J Clin Invest*. - 2007 - T. 117. - № 2. - C. 289-296.
- 149.** Zhang G., Thomas A. L., Marshall A. L., Kernan K. A., Su Y., Zheng Y., Takano J., Saido T. C., Eddy A. A. Nicotinic acetylcholine receptor alpha1 promotes calpain-1 activation and macrophage inflammation in hypercholesterolemic nephropathy // *Lab Invest*. - 2011 - T. 91. - № 1. - C. 106-123.

- 150.** Abraham E., Gyetko M. R., Kuhn K., Arcaroli J., Strassheim D., Park J. S., Shetty S., Idell S. Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation // *J Immunol.* - 2003 - T. 170. - № 11. - C. 5644-5651.
- 151.** Zhang G., Kernan K. A., Thomas A., Collins S., Song Y., Li L., Zhu W., Leboeuf R. C., Eddy A. A novel signaling pathway: fibroblast nicotinic receptor alpha1 binds urokinase and promotes renal fibrosis // *J Biol Chem.* - 2009 - T. 284. - № 42. - C. 29050-29064.
- 152.** Fanelli V., Morita Y., Cappello P., Ghazarian M., Sugumar B., Delsedime L., Batt J., Ranieri V. M., Zhang H., Slutsky A. S. Neuromuscular Blocking Agent Cisatracurium Attenuates Lung Injury by Inhibition of Nicotinic Acetylcholine Receptor-alpha1 // *Anesthesiology.* - 2016 - T. 124. - № 1. - C. 132-140.
- 153.** Lam D. C., Girard L., Ramirez R., Chau W. S., Suen W. S., Sheridan S., Tin V. P., Chung L. P., Wong M. P., Shay J. W., Gazdar A. F., Lam W. K., Minna J. D. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers // *Cancer Res.* - 2007 - T. 67. - № 10. - C. 4638-4647.
- 154.** Park S., Kim Y. J., Jon S. A high-affinity peptide for nicotinic acetylcholine receptor-alpha1 and its potential use in pulmonary drug delivery // *J Control Release.* - 2014 - T. 192. - C. 141-147.
- 155.** Scheffer D., Sage C., Plazas P. V., Huang M., Wedemeyer C., Zhang D. S., Chen Z. Y., Elgoyhen A. B., Corey D. P., Pingault V. The alpha1 subunit of nicotinic acetylcholine receptors in the inner ear: transcriptional regulation by ATOH1 and co-expression with the gamma subunit in hair cells // *J Neurochem.* - 2007 - T. 103. - № 6. - C. 2651-2664.
- 156.** Osman A. A., Schrader A. D., Hawkes A. J., Akil O., Bergeron A., Lustig L. R., Simmons D. D. Muscle-like nicotinic receptor accessory molecules in sensory hair cells of the inner ear // *Mol Cell Neurosci.* - 2008 - T. 38. - № 2. - C. 153-169.
- 157.** Roux I., Wu J. S., McIntosh J. M., Glowatzki E. Assessment of the expression and role of the alpha1-nAChR subunit in efferent cholinergic function during the development of the mammalian cochlea // *J Neurophysiol.* - 2016 - T. 116. - № 2. - C. 479-492.
- 158.** Tang X., Li Y., Ao J., Ding L., Liu Y., Yuan Y., Wang Z., Wang G. Role of alpha7nAChR-NMDAR in sevoflurane-induced memory deficits in the developing rat hippocampus // *PLoS One.* - 2018 - T. 13. - № 2. - C. e0192498.
- 159.** Nakaizumi K., Ouchi Y., Terada T., Yoshikawa E., Kakimoto A., Isobe T., Bunai T., Yokokura M., Suzuki K., Magata Y. In vivo Depiction of alpha7 Nicotinic Receptor Loss for Cognitive Decline in Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis.* - 2018 - T. 61. - № 4. - C. 1355-1365.

- 160.** Lendvai B., Kassai F., Szajli A., Nemethy Z. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition // *Brain Res Bull.* - 2013 - T. 93. - C. 86-96.
- 161.** Shen J. X., Yakel J. L. Functional $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors on astrocytes in rat hippocampal CA1 slices // *J Mol Neurosci.* - 2012 - T. 48. - № 1. - C. 14-21.
- 162.** Suzuki T., Hide I., Matsubara A., Hama C., Harada K., Miyano K., Andra M., Matsubayashi H., Sakai N., Kohsaka S., Inoue K., Nakata Y. Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role // *J Neurosci Res.* - 2006 - T. 83. - № 8. - C. 1461-1470.
- 163.** Cheng Q., Yakel J. L. The effect of $\alpha 7$ nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus // *Biochem Pharmacol.* - 2015 - T. 97. - № 4. - C. 439-444.
- 164.** Schaaf C. P. Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease // *Genet Med.* - 2014 - T. 16. - № 9. - C. 649-656.
- 165.** Wang Y., Xiao C., Indersmitten T., Freedman R., Leonard S., Lester H. A. The duplicated $\alpha 7$ subunits assemble and form functional nicotinic receptors with the full-length $\alpha 7$ // *J Biol Chem.* - 2014 - T. 289. - № 38. - C. 26451-26463.
- 166.** Dineley K. T., Pandya A. A., Yakel J. L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders // *Trends Pharmacol Sci.* - 2015 - T. 36. - № 2. - C. 96-108.
- 167.** Liu Q., Huang Y., Xue F., Simard A., DeChon J., Li G., Zhang J., Lucero L., Wang M., Sierks M., Hu G., Chang Y., Lukas R. J., Wu J. A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides // *J Neurosci.* - 2009 - T. 29. - № 4. - C. 918-929.
- 168.** Moretti M., Zoli M., George A. A., Lukas R. J., Pistillo F., Maskos U., Whiteaker P., Gotti C. The novel $\alpha 7\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization // *Mol Pharmacol.* - 2014 - T. 86. - № 3. - C. 306-317.
- 169.** Mowrey D. D., Liu Q., Bondarenko V., Chen Q., Seyoum E., Xu Y., Wu J., Tang P. Insights into distinct modulation of $\alpha 7$ and $\alpha 7\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the volatile anesthetic isoflurane // *J Biol Chem.* - 2013 - T. 288. - № 50. - C. 35793-35800.
- 170.** Schirmer S. U., Eckhardt I., Lau H., Klein J., DeGraaf Y. C., Lips K. S., Pineau C., Gibbins I. L., Kummer W., Meinhardt A., Haberberger R. V. The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin // *Reproduction.* - 2011 - T. 142. - № 1. - C. 157-166.

- 171.** Maus A. D., Pereira E. F., Karachunski P. I., Horton R. M., Navaneetham D., Macklin K., Cortes W. S., Albuquerque E. X., Conti-Fine B. M. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors // *Mol Pharmacol.* - 1998 - T. 54. - № 5. - C. 779-788.
- 172.** Baez-Pagan C. A., Delgado-Velez M., Lasalde-Dominicci J. A. Activation of the Macrophage alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation // *J Neuroimmune Pharmacol.* - 2015 - T. 10. - № 3. - C. 468-476.
- 173.** Corradi J., Bouzat C. Understanding the Bases of Function and Modulation of alpha7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery // *Mol Pharmacol.* - 2016 - T. 90. - № 3. - C. 288-299.
- 174.** De Rosa M. J., Esandi Mdel C., Garelli A., Rayes D., Bouzat C. Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes // *J Neuroimmunol.* - 2005 - T. 160. - № 1-2. - C. 154-161.
- 175.** Ni M., Yang Z. W., Li D. J., Li Q., Zhang S. H., Su D. F., Xie H. H., Shen F. M. A potential role of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in cardiac angiogenesis in a pressure-overload rat model // *J Pharmacol Sci.* - 2010 - T. 114. - № 3. - C. 311-319.
- 176.** Zdanowski R., Krzyzowska M., Ujazdowska D., Lewicka A., Lewicki S. Role of alpha7 nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways // *Cent Eur J Immunol.* - 2015 - T. 40. - № 3. - C. 373-379.
- 177.** Egea J., Buendia I., Parada E., Navarro E., Leon R., Lopez M. G. Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection // *Biochem Pharmacol.* - 2015 - T. 97. - № 4. - C. 463-472.
- 178.** Martelli D., McKinley M. J., McAllen R. M. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review // *Auton Neurosci.* - 2014 - T. 182. - C. 65-69.
- 179.** Millet T., Roger P. L., Eran N., Yael B. D., Tehila M., Talma B. Role of the alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and RIC-3 in the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway // *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* - 2017 - T. 17. - № 2. - C. 90-99.
- 180.** Shytle R. D., Mori T., Townsend K., Vendrame M., Sun N., Zeng J., Ehrhart J., Silver A. A., Sanberg P. R., Tan J. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors // *J Neurochem.* - 2004 - T. 89. - № 2. - C. 337-343.
- 181.** Park H. J., Lee P. H., Ahn Y. W., Choi Y. J., Lee G., Lee D. Y., Chung E. S., Jin B. K. Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action // *Eur J Neurosci.* - 2007 - T. 26. - № 1. - C. 79-89.
- 182.** Parada E., Egea J., Buendia I., Negredo P., Cunha A. C., Cardoso S., Soares M. P., Lopez M. G. The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by

inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2 // *Antioxid Redox Signal.* - 2013 - T. 19. - № 11. - C. 1135-1148.

183. Guan Y. Z., Jin X. D., Guan L. X., Yan H. C., Wang P., Gong Z., Li S. J., Cao X., Xing Y. L., Gao T. M. Nicotine inhibits microglial proliferation and is neuroprotective in global ischemia rats // *Mol Neurobiol.* - 2015 - T. 51. - № 3. - C. 1480-1488.

184. Andersen N., Corradi J., Sine S. M., Bouzat C. Stoichiometry for activation of neuronal alpha7 nicotinic receptors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2013 - T. 110. - № 51. - C. 20819-20824.

185. Palma E., Bertrand S., Binzoni T., Bertrand D. Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine // *J Physiol.* - 1996 - T. 491 (Pt 1). - C. 151-161.

186. daCosta C. J., Free C. R., Sine S. M. Stoichiometry for alpha-bungarotoxin block of alpha7 acetylcholine receptors // *Nat Commun.* - 2015 - T. 6. - C. 8057.

187. Wells G. B. Structural answers and persistent questions about how nicotinic receptors work // *Front Biosci.* - 2008 - T. 13. - C. 5479-5510.

188. Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J. A., Patrick J. W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium // *J Neurosci.* - 1993 - T. 13. - № 2. - C. 596-604.

189. Guerra-Alvarez M., Moreno-Ortega A. J., Navarro E., Fernandez-Morales J. C., Egea J., Lopez M. G., Cano-Abad M. F. Positive allosteric modulation of alpha-7 nicotinic receptors promotes cell death by inducing Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum // *J Neurochem.* - 2015 - T. 133. - № 3. - C. 309-319.

190. Zimmermann I., Marabelli A., Bertozzi C., Sivilotti L. G., Dutzler R. Inhibition of the prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel ELIC by divalent cations // *PLoS Biol.* - 2012 - T. 10. - № 11. - C. e1001429.

191. Albuquerque E. X., Alkondon M., Pereira E. F., Castro N. G., Schrattenholz A., Barbosa C. T., Bonfante-Cabarcas R., Aracava Y., Eisenberg H. M., Maelicke A. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1997 - T. 280. - № 3. - C. 1117-1136.

192. Kabbani N., Nordman J. C., Corgiat B. A., Veltri D. P., Shehu A., Seymour V. A., Adams D. J. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? // *Bioessays.* - 2013 - T. 35. - № 12. - C. 1025-1034.

- 193.** King J. R., Nordman J. C., Bridges S. P., Lin M. K., Kabbani N. Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors // *J Biol Chem.* - 2015 - T. 290. - № 33. - C. 20060-20070.
- 194.** de Jonge W. J., Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation // *Br J Pharmacol.* - 2007 - T. 151. - № 7. - C. 915-929.
- 195.** Chernyavsky A. I., Arredondo J., Galitovskiy V., Qian J., Grando S. A. Upregulation of nuclear factor-kappaB expression by SLURP-1 is mediated by alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and involves both ionic events and activation of protein kinases // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 2010 - T. 299. - № 5. - C. C903-911.
- 196.** Nordman J. C., Kabbani N. An interaction between alpha7 nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells // *J Cell Sci.* - 2012 - T. 125. - № Pt 22. - C. 5502-5513.
- 197.** Couturier S., Bertrand D., Matter J. M., Hernandez M. C., Bertrand S., Millar N., Valera S., Barkas T., Ballivet M. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX // *Neuron.* - 1990 - T. 5. - № 6. - C. 847-856.
- 198.** Bouzat C., Bartos M., Corradi J., Sine S. M. The interface between extracellular and transmembrane domains of homomeric Cys-loop receptors governs open-channel lifetime and rate of desensitization // *J Neurosci.* - 2008 - T. 28. - № 31. - C. 7808-7819.
- 199.** Frazier C. J., Rollins Y. D., Breese C. R., Leonard S., Freedman R., Dunwiddie T. V. Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells // *J Neurosci.* - 1998 - T. 18. - № 4. - C. 1187-1195.
- 200.** Szabo A. K., Pesti K., Mike A., Vizi E. S. Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on alpha7 nicotinic acetylcholine receptors // *Neuropharmacology.* - 2014 - T. 81. - C. 42-54.
- 201.** Young G. T., Zwart R., Walker A. S., Sher E., Millar N. S. Potentiation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008 - T. 105. - № 38. - C. 14686-14691.
- 202.** Elgoyhen A. B., Katz E. The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse // *J Physiol Paris.* - 2012 - T. 106. - № 1-2. - C. 47-56.
- 203.** Plazas P. V., Katz E., Gomez-Casati M. E., Bouzat C., Elgoyhen A. B. Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor // *J Neurosci.* - 2005 - T. 25. - № 47. - C. 10905-10912.

- 204.** Morley B. J., Li H. S., Hiel H., Drescher D. G., Elgoyhen A. B. Identification of the subunits of the nicotinic cholinergic receptors in the rat cochlea using RT-PCR and in situ hybridization // *Brain Res Mol Brain Res.* - 1998 - T. 53. - № 1-2. - C. 78-87.
- 205.** Franchini L. F., Elgoyhen A. B. Adaptive evolution in mammalian proteins involved in cochlear outer hair cell electromotility // *Mol Phylogenet Evol.* - 2006 - T. 41. - № 3. - C. 622-635.
- 206.** Elgoyhen A. B., Franchini L. F. Prestin and the cholinergic receptor of hair cells: positively-selected proteins in mammals // *Hear Res.* - 2011 - T. 273. - № 1-2. - C. 100-108.
- 207.** Lipovsek M., Fierro A., Perez E. G., Boffi J. C., Millar N. S., Fuchs P. A., Katz E., Elgoyhen A. B. Tracking the molecular evolution of calcium permeability in a nicotinic acetylcholine receptor // *Mol Biol Evol.* - 2014 - T. 31. - № 12. - C. 3250-3265.
- 208.** Boffi J. C., Marcovich I., Gill-Thind J. K., Corradi J., Collins T., Lipovsek M. M., Moglie M., Plazas P. V., Craig P. O., Millar N. S., Bouzat C., Elgoyhen A. B. Differential Contribution of Subunit Interfaces to alpha9alpha10 Nicotinic Acetylcholine Receptor Function // *Mol Pharmacol.* - 2017 - T. 91. - № 3. - C. 250-262.
- 209.** Vetter D. E., Katz E., Maison S. F., Taranda J., Turcan S., Ballesterero J., Liberman M. C., Elgoyhen A. B., Boulter J. The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007 - T. 104. - № 51. - C. 20594-20599.
- 210.** Indurthi D. C., Pera E., Kim H. L., Chu C., McLeod M. D., McIntosh J. M., Absalom N. L., Chebib M. Presence of multiple binding sites on alpha9alpha10 nAChR receptors alludes to stoichiometric-dependent action of the alpha-conotoxin, Vc1.1 // *Biochem Pharmacol.* - 2014 - T. 89. - № 1. - C. 131-140.
- 211.** Elgoyhen A. B., Johnson D. S., Boulter J., Vetter D. E., Heinemann S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells // *Cell.* - 1994 - T. 79. - № 4. - C. 705-715.
- 212.** Elgoyhen A. B., Vetter D. E., Katz E., Rothlin C. V., Heinemann S. F., Boulter J. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2001 - T. 98. - № 6. - C. 3501-3506.
- 213.** Fuchs P. A. A 'calcium capacitor' shapes cholinergic inhibition of cochlear hair cells // *J Physiol.* - 2014 - T. 592. - № 16. - C. 3393-3401.
- 214.** Lips K. S., Pfeil U., Kummer W. Coexpression of alpha 9 and alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons // *Neuroscience.* - 2002 - T. 115. - № 1. - C. 1-5.

- 215.** Mohammadi S. A., Burton T. J., Christie M. J. alpha9-nAChR knockout mice exhibit dysregulation of stress responses, affect and reward-related behaviour // *Behav Brain Res.* - 2017 - T. 328. - C. 105-114.
- 216.** Smith M. L., Souza F. G., Bruce K. S., Strang C. E., Morley B. J., Keyser K. T. Acetylcholine receptors in the retinas of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mouse // *Mol Vis.* - 2014 - T. 20. - C. 1328-1356.
- 217.** Holt J. C., Kewin K., Jordan P. M., Cameron P., Klapczynski M., McIntosh J. M., Crooks P. A., Dwoskin L. P., Lysakowski A. Pharmacologically distinct nicotinic acetylcholine receptors drive efferent-mediated excitation in calyx-bearing vestibular afferents // *J Neurosci.* - 2015 - T. 35. - № 8. - C. 3625-3643.
- 218.** Luebke A. E., Maroni P. D., Guth S. M., Lysakowski A. Alpha-9 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in the rodent vestibular labyrinth // *J Comp Neurol.* - 2005 - T. 492. - № 3. - C. 323-333.
- 219.** Fujii T., Mashimo M., Moriwaki Y., Misawa H., Ono S., Horiguchi K., Kawashima K. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells // *Front Immunol.* - 2017 - T. 8. - C. 1085.
- 220.** Koval L., Lykhmus O., Zhmak M., Khruschov A., Tsetlin V., Magrini E., Viola A., Chernyavsky A., Qian J., Grando S., Komisarenko S., Skok M. Differential involvement of alpha4beta2, alpha7 and alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro // *Int J Biochem Cell Biol.* - 2011 - T. 43. - № 4. - C. 516-524.
- 221.** Peng H., Ferris R. L., Matthews T., Hiel H., Lopez-Albaitero A., Lustig L. R. Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes // *Life Sci.* - 2004 - T. 76. - № 3. - C. 263-280.
- 222.** St-Pierre S., Jiang W., Roy P., Champigny C., LeBlanc E., Morley B. J., Hao J., Simard A. R. Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Bone Marrow-Derived Pro-Inflammatory Monocyte Production and Survival // *PLoS One.* - 2016 - T. 11. - № 2. - C. e0150230.
- 223.** Huang L. C., Lin C. L., Qiu J. Z., Lin C. Y., Hsu K. W., Tam K. W., Lee J. Y., Yang J. M., Lee C. H. Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtype Alpha-9 Mediates Triple-Negative Breast Cancers Based on a Spontaneous Pulmonary Metastasis Mouse Model // *Front Cell Neurosci.* - 2017 - T. 11. - C. 336.
- 224.** Spina R., Voss D. M., Asnaghi L., Sloan A., Bar E. E. Atracurium Besylate and other neuromuscular blocking agents promote astroglial differentiation and deplete glioblastoma stem cells // *Oncotarget.* - 2016 - T. 7. - № 1. - C. 459-472.

- 225.** Mucchietto V., Fasoli F., Pucci S., Moretti M., Benfante R., Maroli A., Di Lascio S., Bolchi C., Pallavicini M., Dowell C., McIntosh M., Clementi F., Gotti C. alpha9- and alpha7-containing receptors mediate the pro-proliferative effects of nicotine in the A549 adenocarcinoma cell line // *Br J Pharmacol.* - 2017.
- 226.** Chernyavsky A. I., Arredondo J., Vetter D. E., Grando S. A. Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization // *Exp Cell Res.* - 2007 - T. 313. - № 16. - C. 3542-3555.
- 227.** Bader S., Diener M. Novel aspects of cholinergic regulation of colonic ion transport // *Pharmacol Res Perspect.* - 2015 - T. 3. - № 3. - C. e00139.
- 228.** Zablotni A., Dakischew O., Trinkaus K., Hartmann S., Szalay G., Heiss C., Lips K. S. Regulation of acetylcholine receptors during differentiation of bone mesenchymal stem cells harvested from human remaining debris // *Int Immunopharmacol.* - 2015 - T. 29. - № 1. - C. 119-126.
- 229.** Lykhmus O., Voytenko L. P., Lips K. S., Bergen I., Krasteva-Christ G., Vetter D. E., Kummer W., Skok M. Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha9 and alpha10 Subunits Are Expressed in the Brain of Mice // *Front Cell Neurosci.* - 2017 - T. 11. - C. 282.
- 230.** Lips K. S., Konig P., Schatzle K., Pfeil U., Krasteva G., Spies M., Haberberger R. V., Grando S. A., Kummer W. Coexpression and spatial association of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and alpha10 in rat sympathetic neurons // *J Mol Neurosci.* - 2006 - T. 30. - № 1-2. - C. 15-16.
- 231.** Grau V., Wilker S., Hartmann P., Lips K. S., Grando S. A., Padberg W., Fehrenbach H., Kummer W. Administration of keratinocyte growth factor (KGF) modulates the pulmonary expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7, alpha9 and alpha10 // *Life Sci.* - 2007 - T. 80. - № 24-25. - C. 2290-2293.
- 232.** Mishra N. C., Rir-sima-ah J., Boyd R. T., Singh S. P., Gundavarapu S., Langley R. J., Razani-Boroujerdi S., Sopori M. L. Nicotine inhibits Fc epsilon RI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha 7/alpha 9/alpha 10-nicotinic receptors // *J Immunol.* - 2010 - T. 185. - № 1. - C. 588-596.
- 233.** Richter K., Mathes V., Fronius M., Althaus M., Hecker A., Krasteva-Christ G., Padberg W., Hone A. J., McIntosh J. M., Zakrzewicz A., Grau V. Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors // *Sci Rep.* - 2016 - T. 6. - C. 28660.
- 234.** Zakrzewicz A., Richter K., Agne A., Wilker S., Siebers K., Fink B., Krasteva-Christ G., Althaus M., Padberg W., Hone A. J., McIntosh J. M., Grau V. Canonical and Novel Non-Canonical Cholinergic

Agonists Inhibit ATP-Induced Release of Monocytic Interleukin-1beta via Different Combinations of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits alpha7, alpha9 and alpha10 // *Front Cell Neurosci.* - 2017 - T. 11. - C. 189.

235. Nguyen V. T., Ndoye A., Grando S. A. Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity // *Am J Pathol.* - 2000 - T. 157. - № 4. - C. 1377-1391.

236. Simard A. R., Gan Y., St-Pierre S., Kousari A., Patel V., Whiteaker P., Morley B. J., Lukas R. J., Shi F. D. Differential modulation of EAE by alpha9*- and beta2*-nicotinic acetylcholine receptors // *Immunol Cell Biol.* - 2013 - T. 91. - № 3. - C. 195-200.

237. Rothlin C. V., Katz E., Verbitsky M., Elgoyhen A. B. The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, glycine, and type 3 serotonin receptors // *Mol Pharmacol.* - 1999 - T. 55. - № 2. - C. 248-254.

238. Katz E., Verbitsky M., Rothlin C. V., Vetter D. E., Heinemann S. F., Elgoyhen A. B. High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor // *Hear Res.* - 2000 - T. 141. - № 1-2. - C. 117-128.

239. Lioudyno M. I., Verbitsky M., Glowatzki E., Holt J. C., Boulter J., Zadina J. E., Elgoyhen A. B., Guth P. S. The alpha9/alpha10-containing nicotinic ACh receptor is directly modulated by opioid peptides, endomorphin-1, and dynorphin B, proposed efferent cotransmitters in the inner ear // *Mol Cell Neurosci.* - 2002 - T. 20. - № 4. - C. 695-711.

240. Lioudyno M. I., Verbitsky M., Holt J. C., Elgoyhen A. B., Guth P. S. Morphine inhibits an alpha9-acetylcholine nicotinic receptor-mediated response by a mechanism which does not involve opioid receptors // *Hear Res.* - 2000 - T. 149. - № 1-2. - C. 167-177.

241. Ballesteros J. A., Plazas P. V., Kracun S., Gomez-Casati M. E., Taranda J., Rothlin C. V., Katz E., Millar N. S., Elgoyhen A. B. Effects of quinine, quinidine, and chloroquine on alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptors // *Mol Pharmacol.* - 2005 - T. 68. - № 3. - C. 822-829.

242. Rothlin C. V., Katz E., Verbitsky M., Vetter D. E., Heinemann S. F., Elgoyhen A. B. Block of the alpha9 nicotinic receptor by ototoxic aminoglycosides // *Neuropharmacology.* - 2000 - T. 39. - № 13. - C. 2525-2532.

243. Plazas P. V., Savino J., Kracun S., Gomez-Casati M. E., Katz E., Parsons C. G., Millar N. S., Elgoyhen A. B. Inhibition of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor by neramexane, an open channel blocker of N-methyl-D-aspartate receptors // *Eur J Pharmacol.* - 2007 - T. 566. - № 1-3. - C. 11-19.

- 244.** Suckfull M., Althaus M., Ellers-Lenz B., Gebauer A., Gortelmeyer R., Jastreboff P. J., Moebius H. J., Rosenberg T., Russ H., Wirth Y., Krueger H. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the efficacy and safety of neramexane in patients with moderate to severe subjective tinnitus // *BMC Ear Nose Throat Disord.* - 2011 - T. 11. - C. 1.
- 245.** Decker M. W., Rueter L. E., Bitner R. S. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class of analgesics // *Curr Top Med Chem.* - 2004 - T. 4. - № 3. - C. 369-384.
- 246.** Ellison M., Haberlandt C., Gomez-Casati M. E., Watkins M., Elgoyhen A. B., McIntosh J. M., Olivera B. M. Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR // *Biochemistry.* - 2006 - T. 45. - № 5. - C. 1511-1517.
- 247.** Nevin S. T., Clark R. J., Klimis H., Christie M. J., Craik D. J., Adams D. J. Are alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors a pain target for alpha-conotoxins? // *Mol Pharmacol.* - 2007 - T. 72. - № 6. - C. 1406-1410.
- 248.** McIntosh J. M., Plazas P. V., Watkins M., Gomez-Casati M. E., Olivera B. M., Elgoyhen A. B. A novel alpha-conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat alpha9alpha10 and alpha7 nicotinic cholinergic receptors // *J Biol Chem.* - 2005 - T. 280. - № 34. - C. 30107-30112.
- 249.** Hone A. J., Servent D., McIntosh J. M. alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors and the modulation of pain // *Br J Pharmacol.* - 2017.
- 250.** Del Bufalo A., Cesario A., Salinaro G., Fini M., Russo P. Alpha9 alpha10 nicotinic acetylcholine receptors as target for the treatment of chronic pain // *Curr Pharm Des.* - 2014 - T. 20. - № 38. - C. 6042-6047.
- 251.** Zheng L., Baumann U., Reymond J. L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol // *Nucleic Acids Res.* - 2004 - T. 32. - № 14. - C. e115.
- 252.** Fuchs P. A., Murrow B. W. Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea // *J Neurosci.* - 1992 - T. 12. - № 3. - C. 800-809.
- 253.** Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis // *J Comput Chem.* - 2004 - T. 25. - № 13. - C. 1605-1612.
- 254.** Lansdell S. J., Gee V. J., Harkness P. C., Doward A. I., Baker E. R., Gibb A. J., Millar N. S. RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells // *Mol Pharmacol.* - 2005 - T. 68. - № 5. - C. 1431-1438.
- 255.** Kasheverov I. E., Utkin Y. N., Tsetlin V. I. Naturally occurring and synthetic peptides acting on nicotinic acetylcholine receptors // *Curr Pharm Des.* - 2009 - T. 15. - № 21. - C. 2430-2452.

- 256.** Sine S. M., Ohno K., Bouzat C., Auerbach A., Milone M., Pruitt J. N., Engel A. G. Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity // *Neuron*. - 1995 - T. 15. - № 1. - C. 229-239.
- 257.** Tomaselli G. F., McLaughlin J. T., Jurman M. E., Hawrot E., Yellen G. Mutations affecting agonist sensitivity of the nicotinic acetylcholine receptor // *Biophys J*. - 1991 - T. 60. - № 3. - C. 721-727.
- 258.** Wang H. L., Auerbach A., Bren N., Ohno K., Engel A. G., Sine S. M. Mutation in the M1 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit decreases the rate of agonist dissociation // *J Gen Physiol*. - 1997 - T. 109. - № 6. - C. 757-766.
- 259.** Croxen R., Newland C., Beeson D., Oosterhuis H., Chauplannaz G., Vincent A., Newsom-Davis J. Mutations in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in patients with the slow-channel congenital myasthenic syndrome // *Hum Mol Genet*. - 1997 - T. 6. - № 5. - C. 767-774.
- 260.** Grutter T., de Carvalho L. P., Dufresne V., Taly A., Edelstein S. J., Changeux J. P. Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2005 - T. 102. - № 50. - C. 18207-18212.
- 261.** Quiram P. A., Jones J. J., Sine S. M. Pairwise interactions between neuronal alpha7 acetylcholine receptors and alpha-conotoxin ImI // *J Biol Chem*. - 1999 - T. 274. - № 28. - C. 19517-19524.
- 262.** Quiram P. A., McIntosh J. M., Sine S. M. Pairwise interactions between neuronal alpha(7) acetylcholine receptors and alpha-conotoxin PnIB // *J Biol Chem*. - 2000 - T. 275. - № 7. - C. 4889-4896.
- 263.** Zondlo N. J. Aromatic-proline interactions: electronically tunable CH/pi interactions // *Acc Chem Res*. - 2013 - T. 46. - № 4. - C. 1039-1049.
- 264.** Papke R. L., Stokes C., Williams D. K., Wang J., Horenstein N. A. Cysteine accessibility analysis of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor ligand-binding domain identifies L119 as a gatekeeper // *Neuropharmacology*. - 2011 - T. 60. - № 1. - C. 159-171.
- 265.** Azam L., Papakyriakou A., Zouridakis M., Giastas P., Tzartos S. J., McIntosh J. M. Molecular interaction of alpha-conotoxin RgIA with the rat alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor // *Mol Pharmacol*. - 2015 - T. 87. - № 5. - C. 855-864.
- 266.** Araoz R., Molgo J., Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins // *Toxicon*. - 2010 - T. 56. - № 5. - C. 813-828.
- 267.** Tuba Z., Maho S., Vizi E. S. Synthesis and structure-activity relationships of neuromuscular blocking agents // *Curr Med Chem*. - 2002 - T. 9. - № 16. - C. 1507-1536.

- 268.** Della Rocca G., Pompei L. A novel approach to reversal of neuromuscular blockade // *Minerva Anesthesiol.* - 2009 - T. 75. - № 5. - C. 349-351.
- 269.** Carron M., Zarantonello F., Tellaroli P., Ori C. Efficacy and safety of sugammadex compared to neostigmine for reversal of neuromuscular blockade: a meta-analysis of randomized controlled trials // *J Clin Anesth.* - 2016 - T. 35. - C. 1-12.
- 270.** Bowman W. C., Rodger I. W., Houston J., Marshall R. J., McIndewar I. Structure:action relationships among some desacetoxo analogues of pancuronium and vecuronium in the anesthetized cat // *Anesthesiology.* - 1988 - T. 69. - № 1. - C. 57-62.
- 271.** Lien C. A. Development and potential clinical impairment of ultra-short-acting neuromuscular blocking agents // *Br J Anaesth.* - 2011 - T. 107 Suppl 1. - C. i60-71.
- 272.** Meakin G. H. Recent advances in myorelaxant therapy // *Paediatr Anaesth.* - 2001 - T. 11. - № 5. - C. 523-531.
- 273.** Warrell D. A. Snake bite // *Lancet.* - 2010 - T. 375. - № 9708. - C. 77-88.
- 274.** Kordis D., Gubensek F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families // *Gene.* - 2000 - T. 261. - № 1. - C. 43-52.
- 275.** Nirthanan S., Gopalakrishnakone P., Gwee M. C., Khoo H. E., Kini R. M. Non-conventional toxins from Elapid venoms // *Toxicon.* - 2003 - T. 41. - № 4. - C. 397-407.
- 276.** Vulfius C. A., Gorbacheva E. V., Starkov V. G., Osipov A. V., Kasheverov I. E., Andreeva T. V., Astashev M. E., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. An unusual phospholipase A(2) from puff adder *Bitis arietans* venom--a novel blocker of nicotinic acetylcholine receptors // *Toxicon.* - 2011 - T. 57. - № 5. - C. 787-793.
- 277.** Vulfius C. A., Kasheverov I. E., Starkov V. G., Osipov A. V., Andreeva T. V., Filkin S. Y., Gorbacheva E. V., Astashev M. E., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a novel facet in the pleiotropic activities of snake venom phospholipases A2 // *PLoS One.* - 2014 - T. 9. - № 12. - C. e115428.
- 278.** Mackessy S. P. Handbook of venoms and toxins of reptiles /: CRC press, 2016.
- 279.** McArdle J. J., Lentz T. L., Witzemann V., Schwarz H., Weinstein S. A., Schmidt J. J. Waglerin-1 selectively blocks the epsilon form of the muscle nicotinic acetylcholine receptor // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1999 - T. 289. - № 1. - C. 543-550.
- 280.** Shelukhina I. V., Zhmak M. N., Lobanov A. V., Ivanov I. A., Garifulina A. I., Kravchenko I. N., Rasskazova E. A., Salmova M. A., Tukhovskaya E. A., Rykov V. A., Slashcheva G. A., Egorova N. S.,

Muzyka I. S., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Azemiopsin, a Selective Peptide Antagonist of Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor: Preclinical Evaluation as a Local Muscle Relaxant // *Toxins (Basel)*. - 2018 - T. 10. - № 1.

281. Vulfius E. A., Gorbacheva, E.V., Filina, Y.V., Starkov, V.G., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.U.N. Polypeptide antagonists of nicotinic acetylcholine receptors and Ca²⁺ channels from venoms of snakes of Viperidae family // *Proc. Of International Conference "Receptors and Intracellular Signaling", Pushchino*. - 2009 - T. 1. - C. 345-349.

282. Ellison M., Gao F., Wang H. L., Sine S. M., McIntosh J. M., Olivera B. M. Alpha-conotoxins ImI and ImII target distinct regions of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes // *Biochemistry*. - 2004 - T. 43. - № 51. - C. 16019-16026.

283. Ellison M., McIntosh J. M., Olivera B. M. Alpha-conotoxins ImI and ImII. Similar alpha 7 nicotinic receptor antagonists act at different sites // *J Biol Chem*. - 2003 - T. 278. - № 2. - C. 757-764.

284. Kasheverov I. E., Zhmak M. N., Fish A., Rucktooa P., Khrushov A. Y., Osipov A. V., Ziganshin R. H., D'Hoedt D., Bertrand D., Sixma T. K., Smit A. B., Tsetlin V. I. Interaction of alpha-conotoxin ImII and its analogs with nicotinic receptors and acetylcholine-binding proteins: additional binding sites on Torpedo receptor // *J Neurochem*. - 2009 - T. 111. - № 4. - C. 934-944.

285. Grishin A. A., Wang C. I., Muttenthaler M., Alewood P. F., Lewis R. J., Adams D. J. Alpha-conotoxin AuIB isomers exhibit distinct inhibitory mechanisms and differential sensitivity to stoichiometry of alpha3beta4 nicotinic acetylcholine receptors // *J Biol Chem*. - 2010 - T. 285. - № 29. - C. 22254-22263.

286. Simonson P. D., Deberg H. A., Ge P., Alexander J. K., Jeyifous O., Green W. N., Selvin P. R. Counting bungarotoxin binding sites of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian cells with high signal/noise ratios // *Biophys J*. - 2010 - T. 99. - № 10. - C. L81-83.

287. Romero H. K., Christensen S. B., Di Cesare Mannelli L., Gajewiak J., Ramachandra R., Elmslie K. S., Vetter D. E., Ghelardini C., Iadonato S. P., Mercado J. L., Olivera B. M., McIntosh J. M. Inhibition of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2017 - T. 114. - № 10. - C. E1825-E1832.

288. Li D., Kim W., Shin D., Jung Y., Bae H., Kim S. K. Preventive Effects of Bee Venom Derived Phospholipase A(2) on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice // *Toxins (Basel)*. - 2016 - T. 8. - № 1.

289. Ouach A., Pin F., Bertrand E., Vercouillie J., Gulhan Z., Mothes C., Deloye J. B., Guilloteau D., Suzenet F., Chalon S., Routier S. Design of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor ligands using the

(het)Aryl-1,2,3-triazole core: Synthesis, in vitro evaluation and SAR studies // *Eur J Med Chem.* - 2016 - T. 107. - C. 153-164.

290. Glennon R. A., Dukat M. alpha4beta2 nACh receptor pharmacophore models // *Bioorg Med Chem Lett.* - 2004 - T. 14. - № 8. - C. 1841-1844.

291. Guandalini L., Martini E., Dei S., Manetti D., Scapecchi S., Teodori E., Romanelli M. N., Varani K., Greco G., Spadola L., Novellino E. Design of novel nicotinic ligands through 3D database searching // *Bioorg Med Chem.* - 2005 - T. 13. - № 3. - C. 799-807.

292. Guandalini L., Norcini M., Varani K., Pistolozzi M., Gotti C., Bazzicalupi C., Martini E., Dei S., Manetti D., Scapecchi S., Teodori E., Bertucci C., Ghelardini C., Romanelli M. N. Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of new quinoline derivatives as nicotinic ligands // *J Med Chem.* - 2007 - T. 50. - № 20. - C. 4993-5002.

293. Chojnacka K., Papke R. L., Horenstein N. A. Synthesis and evaluation of a conditionally-silent agonist for the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor // *Bioorg Med Chem Lett.* - 2013 - T. 23. - № 14. - C. 4145-4149.