

На правах рукописи

Кульбацкий Дмитрий Сергеевич

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА
SLURP-1 И SLURP-2**

Специальность: 03.01.03 – Молекулярная биология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2018

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Государственного учебно-научного учреждения Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в группе биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, **Люкманова Екатерина Назымовна**
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, группа
биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов,
руководитель группы, в.н.с., г. Москва

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, **Федоров Алексей Николаевич**
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория
молекулярной биотехнологии, заместитель директора по научной работе,
руководитель лаборатории, г. Москва

доктор биологических наук, доцент, **Остроумова Ольга Сергеевна**
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии
Российской академии наук, группа моделирования ионных каналов,
руководитель группы, в.н.с., г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 года в __ часов на заседании
Диссертационного Совета Д.217.013.01 при ФГБУ «Государственный научно-
исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» по адресу:
117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1,
Тел.: +7 (495) 315-37-47, e-mail: genetika@genetika.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке НИЦ
«Курчатовский институт» -ГосНИИГенетика и на сайте <http://www.genetika.ru/>

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2019 года.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
кандидат химических наук, доцент

Т.Л. Воюшина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Лиганд-рецепторные взаимодействия лежат в основе ключевых процессов жизнедеятельности организма, таких как передача нервного импульса, межклеточная сигнализация, гормональная регуляция и транспорт биомолекул, поэтому их изучение является актуальной задачей современной молекулярной биологии.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) относятся к лиганд-зависимым ионным каналам и присутствуют в центральной и периферической нервных системах. Эти рецепторы принимают участие в регуляции различных физиологических процессов, таких как передача постсинаптического сигнала возбуждения при выделении нейромедиатора ацетилхолина. В последнее время появились данные о локализации некоторых подтипов nAChR в иммунных клетках и клетках эпителия. Эти не-нейрональные рецепторы вовлечены в регуляцию воспалительных процессов, а также в процессы клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза. Не-нейрональные nAChR также участвуют в возникновении и развитии нескольких видов никотин-индуцированного рака при табакокурении.

Среди молекул, действующих на nAChR, можно выделить класс «трехпетельных» белков, к которым относятся α -нейротоксины ядов змей (как правило, высокоспецифичные ингибиторы nAChR) и эндогенные трехпетельные белки животных. Эндогенные трехпетельные белки различаются как по своему действию на nAChR, так и по локализации – секретируемые или мембранно-связанные с помощью GPI-якоря.

Секретируемые трехпетельные белки человека SLURP-1 и SLURP-2 были обнаружены в эпителиальных тканях и в клетках иммунной системы. Эти белки участвуют в регуляции гомеостаза эпителиальных клеток, а также в развитии воспалительных процессов, модулируя функцию nAChR. Белки SLURP вовлечены в патогенез некоторых кожных заболеваний. Так, точечные мутации в гене SLURP-1 и нокаут гена SLURP-2 приводят к развитию различных кератодерм, а гиперэкспрессия SLURP-2 обнаружена при псориазе.

Изучение механизмов, лежащих в основе взаимодействия белков SLURP-1 и SLURP-2 с их молекулярными мишенями, представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения, т.к. эти белки участвуют в важных физиологических процессах и представляют собой перспективные прототипы для создания новых препаратов для лечения кожных и онкологических заболеваний.

Цели и задачи исследования

Целью данной диссертационной работы являлось исследование фармакологической активности секретируемых трехпетельных белков человека, – SLURP-1 и SLURP-2, определение пространственной структуры и описание молекулярных механизмов действия на примере их рекомбинантных аналогов.

Для достижения заявленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить молекулярные мишени действия белков SLURP-1 и SLURP-2. Исследовать фармакологию взаимодействия белков с различными типами ацетилхолиновых рецепторов.
2. Изучить влияние белков SLURP на пролиферацию нормальных и раковых клеток эпителия. Исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе их про- и анти-пролиферативного действия.
3. Исследовать пространственную структуру и внутримолекулярную динамику SLURP-1 и SLURP-2, предложить модели комплексов белков с предполагаемыми мишенями.

Научная новизна и практическая значимость работы

Все результаты, изложенные в настоящей диссертационной работе, получены впервые.

1. Охарактеризован спектр фармакологической активности рекомбинантных SLURP-1 и SLURP-2 в отношении nAChR и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов (mAChR) человека.
2. Показано влияние рекомбинантных препаратов SLURP-1 и SLURP-2 на пролиферацию клеточных линий эпителиального происхождения: Het-1A (нормальные кератиноциты), A431 (эпидермоидная карцинома), SKBR3 (карцинома молочной железы), MCF-7 (карцинома молочной железы), A549 (аденокарцинома легкого), HT-29 (аденокарцинома кишечника). Показано, что действие SLURP-1 и SLURP-2 на пролиферацию клеток модельных линий опосредовано рецепторами ацетилхолина.
3. Показано, что рекомбинантный SLURP-1 снижает экспрессию $\alpha 7$ -nAChR в раковых клетках, а также стимулирует секрецию эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных депо. Предложен механизм паракринной/аутокринной регуляции гомеостаза клеток эпителия белком SLURP-1.
4. Определена пространственная структура белков SLURP-1 и SLURP-2 и внутримолекулярная динамика в растворе. Предложены модели взаимодействия белка SLURP-2 с различными типами nAChR.

Данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, будут интересны не только с точки зрения фундаментальной науки, но, в перспективе, могут быть использованы для разработки новых препаратов для лечения воспалительных заболеваний кожи, ранозаживления, а также для контроля роста опухолей эпителиального происхождения.

Положения, выносимые на защиту

1. Рекombинантный аналог трехпетельного белка человека SLURP-1 (rSLURP-1) является негативным аллостерическим модулятором никотинового ацетилхолинового рецептора человека $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR). Взаимодействие rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR в клетках линии нормальных кератиноцитов человека Het-1A приводит к подавлению пролиферации.

2. Рекombинантный аналог трехпетельного белка человека SLURP-2 (rSLURP-2) является лигандом никотиновых ацетилхолиновых рецепторов человека $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 4\beta 2$ типов, а также мускариновых ацетилхолиновых рецепторов человека (mAChR) M1 и M3 типов. Взаимодействие rSLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR в клетках линии нормальных кератиноцитов человека Het-1A приводит к подавлению пролиферации, взаимодействие с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR – к увеличению пролиферации.

3. Белки rSLURP-1 и rSLURP-2 обладают пространственной структурой, типичной для трехпетельных белков, но в отличие от трехпетельных токсинов ядов змей демонстрируют аномально высокую подвижность петлевых участков.

4. rSLURP-1 и rSLURP-2 ингибируют пролиферацию клеток аденокарциномы кожи, карциномы молочной железы и аденокарциномы кишечника человека. На клетках аденокарциномы кожи линии A431 антипролиферативный эффект rSLURP-1 обусловлен взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR, а rSLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR и mAChR.

5. В клетках линии A431 существует механизм положительной обратной связи, вызывающий секрецию эндогенного SLURP-1 в ответ на инкубацию клеток с rSLURP-1. rSLURP-1 снижает уровень экспрессии гена $\alpha 7$ -nAChR и представление активного рецептора на клеточной мембране.

Апробация работы

Основные материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на 40-ом конгрессе FEBS (Берлин, Германия, 2015), 10-ом форуме нейронаук FENS (Копенгаген, Дания, 2016), V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2016), XV международном симпозиуме по холинергическим механизмам (Марсель, Франция, 2016), XXIX Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии (Москва, Россия, 2017), конференции «Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы 2017» (Хания, Греция, 2017), Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва, Россия, 2017), 42-конгрессе FEBS (Иерусалим, Израиль, 2017), 43-конгрессе FEBS (Прага, Чехия, 2018), межлабораторном семинаре отдела биоинженерии ИБХ РАН (Москва, Россия, 2018), на заседании секции «Молекулярная биология» Ученого совета НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИ Генетика (Москва, Россия, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, 4 из которых – статьи в реферируемых научных журналах, включенных в список ВАК, и 12 материалов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, состоит из Введения, трех глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение), а также Заключение и Выводов. Работа содержит 47 рисунков и 1 таблицу. Библиографический указатель содержит 119 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и основные задачи работы, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

В **Главе 1** представлен литературный обзор, посвященный молекулярным механизмам и физиологическим функциям nAChR и белков человека SLURP-1 и SLURP-2.

В **Главе 2** изложены основные экспериментальные методики, использованные в работе.

В **Главе 3** изложены основные результаты, полученные в ходе выполнения работы.

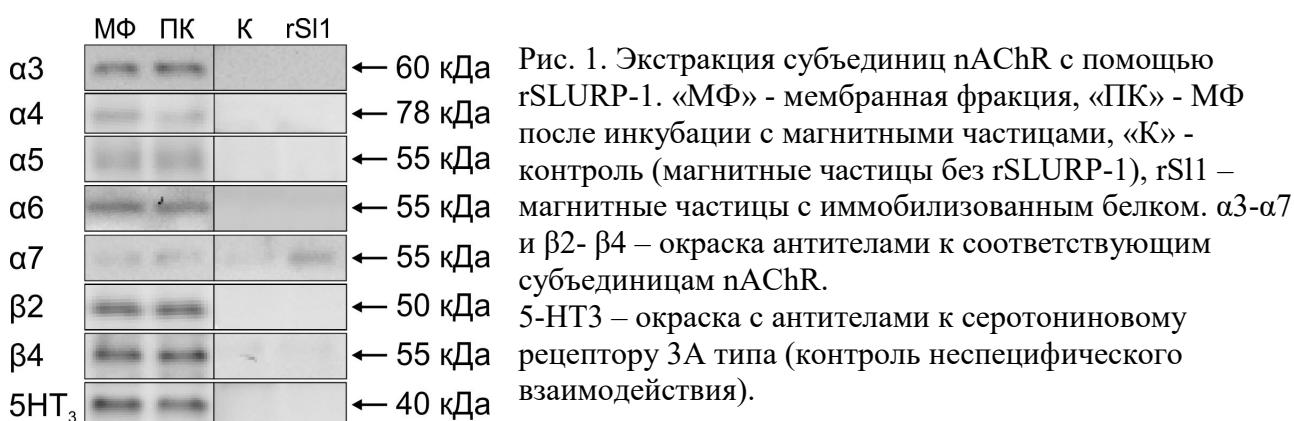
Рекомбинантные препараты белков SLURP-1 и SLURP-2, отличающиеся от природного белка только наличием N-концевого остатка метионина (rSLURP-1 и rSLURP-2, соответственно), были получены совместно с Шулепко М.А., сотрудником группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН. Изотопно-меченные варианты rSLURP-1 и rSLURP-2 были получены лично диссертантом. Исследование влияния rSLURP-1 и rSLURP-2 на клеточные модели (за исключением клеток PC-12) проводились совместно с Бычковым М.Л., сотрудником группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН и Шароновым Г.В., сотрудником лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Поиск мишеней rSLURP-1 и rSLURP-2 с помощью афинной экстракции, а также исследование влияния rSLURP-1 на фосфорилирование ERK1/2 MAP-киназы в клетках PC-12 были выполнены совместно с Арванити М. и проф. Томсеном М.С., сотрудниками отдела дизайна лекарств и фармакологии Университета Копенгагена (Копенгаген, Дания). Исследование влияния rSLURP-1 на активность ионных каналов nAChR было выполнено совместно с Кудрявцевым Д.С., сотрудником лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН. Исследование влияния rSLURP-2 на активность ионных каналов nAChR было выполнено совместно с Бертраном Д., сотрудником HiQScreen (Швейцария). Исследование механизмов связывания rSLURP-1 с nAChR было выполнено совместно с Кашеверовым И.Е., руководителем лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН. Исследование механизмов связывания rSLURP-2 с

nAChR было выполнено совместно с Долежалем В., профессором Института физиологии Чешской Академии Наук (Прага, Чехия). Структурные исследования методами ЯМР-спектроскопии проводились совместно с А.С. Пармоновым и З.О. Шенкаревым, сотрудниками отдела структурной биологии ИБХ РАН. Моделирование комплексов rSLURP-2 с nAChR было выполнено совместно с Чугуновым А.О., сотрудником лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН.

1. Рекомбинантный SLURP-1: мишени, механизм действия, пространственная структура

1.1. Аффинная экстракция субъединиц nAChR с помощью rSLURP-1

Для выявления возможных типов nAChR, являющихся мишенями SLURP-1, была использована модельная система с большой плотностью рецепторов нейронального типа, а именно - мембранная фракция гомогената мозга человека (образцы тканей были получены в Университетском госпитале Копенгагена и переданы для проведения эксперимента в отдел дизайна лекарств и фармакологии Университета Копенгагена, данный эксперимент был одобрен Этическим Комитетом Центрального региона Дании (Н-2-2011-104) и выполнен в соответствии с Хельсинкской декларацией). Рекомбинантный SLURP-1 был ковалентно иммобилизован на магнитных частицах, которые использовали для аффинной экстракции рецепторов из предварительно солюбилизированной в детергенте мембранной фракции. Детектирование отдельных субъединиц nAChR осуществляли с помощью вестерн-блота со специфическими первичными антителами, в качестве контроля неспецифического связывания использовали магнитные частицы с заблокированными функциональными группами (без ковалентно иммобилизованного белка). Также для подтверждения специфичности взаимодействия проводили окрашивание мембраны с антителами к серотониновому рецептору 3A типа, сходному по структуре с nAChR.



В результате было установлено, что rSLURP-1 селективно связывает $\alpha 7$ субъединицу nAChR, но не $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$, или $\beta 4$ субъединицы (Рис. 1). Более того, rSLURP-1 не связывал субъединицы гомологичного nAChR серотонинового рецептора. Ни одна из исследуемых субъединиц не была обнаружена при аффинной очистке с магнитными частицами без

иммобилизованного белка, что подтверждает тот факт, что изоляция $\alpha 7$ nAChR не вызвана неспецифическим взаимодействием с магнитными частицами.

1.2. Взаимодействие rSLURP-1 с nAChR

Для исследования взаимодействия rSLURP-1 с nAChR был использован метод конкурентного связывания в присутствии ^{125}I -меченого антагониста nAChR – α -бунгаротоксина (α -Bgtx). В качестве модели нейронального nAChR был использован ацетилхолин-связывающий белок *L. stagnalis* (Ls-AChBP) – структурный гомолог лиганд-связывающего домена $\alpha 7$ -nAChR. rSLURP-1 конкурировал с α -Bgtx за связывание с Ls-AChBP с IC_{50} 4.7 ± 0.3 мкМ (Рис. 2). Однако, для $\alpha 7$ -nAChR человека, гиперэкспрессированного в линии клеток GH₄C1, не наблюдалось конкуренции с α -Bgtx вплоть до 30 мкМ rSLURP-1 (Рис. 2). Для сравнения, вытеснение радиоактивного ^{125}I - α -Bgtx нерадиоактивным α -Bgtx для $\alpha 7$ -nAChR в GH₄C1 характеризуется $\text{IC}_{50} \sim 5$ нМ. Данные по аффинной экстракции $\alpha 7$ -nAChR из гомогената мозга и отсутствие конкуренции за связывание rSLURP-1 с α -Bgtx на этом типе рецептора означают, что rSLURP-1 связывается с $\alpha 7$ -nAChR вне классического сайта связывания агонистов/антагонистов.

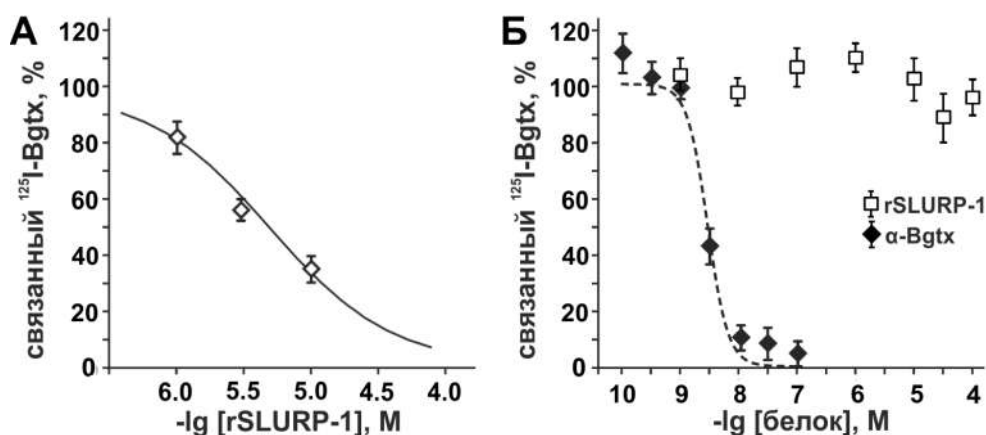


Рис. 2. Конкуренция rSLURP-1 с α -бунгаротоксином (А). Конкуренция rSLURP-1 с ^{125}I - α -Bgtx за связывание с Ls-AChBP. (Б). Вытеснение ^{125}I - α -Bgtx из $\alpha 7$ -nAChR в линии клеток GH₄C1 с помощью rSLURP-1 и α -Bgtx.

1.3. Действие rSLURP-1 на функцию ионного канала $\alpha 7$ -nAChR

Действие rSLURP-1 на функцию ионного канала $\alpha 7$ -nAChR было охарактеризовано на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих соответствующий рецептор. Инкубация ооцитов с rSLURP-1 приводила к ингибированию ответа на ацетилхолин (АХ) до 32 % по отношению к контролю с эффективной концентрацией IC_{50} 940 ± 80 нМ (Рис. 3). Неполное ингибирование ответа на ацетилхолин даже при высоких концентрациях rSLURP-1 и отсутствие токов при аппликации rSLURP-1 без АХ позволяют сделать предположение, что rSLURP-1 ингибирует токи через $\alpha 7$ -nAChR по аллостерическому механизму.

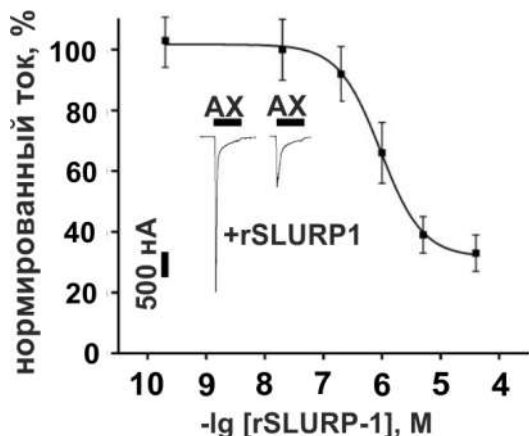


Рис 3. Ингибирование с помощью rSLURP-1 АХ-вызванных токов на $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. На врезке – ответ на 1 мМ АХ в отсутствие и в присутствии 13 мкМ rSLURP-1.

1.4. rSLURP-1 подавляет пролиферацию кератиноцитов Het-1A, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR

При инкубации кератиноцитов Het-1A в присутствии rSLURP-1 в диапазоне концентраций от 0.1 нМ до 10 мкМ через 48 ч наблюдалось снижение числа клеток до 60 ± 2 % по сравнению с контролем с EC_{50} 4.3 ± 0.6 нМ (Рис. 4). Морфология большинства клеток была неизменной по сравнению с контролем. Окрашивание по Хехсту/йодистым пропидием не показало увеличения доли мертвых клеток даже при максимальных концентрациях rSLURP-1 (10 мкМ): 4 ± 1 % мертвых клеток как при обработке rSLURP-1, так и в контроле. Таким образом, снижение числа клеток связано именно со снижением скорости пролиферации, а не с апоптозом или цитотоксическим эффектом.

Кератиноциты экспрессируют различные подтипы ацетилхолиновых рецепторов, и репертуар рецепторов зависит от стадии клеточного развития. Нарушение экспрессии тех или иных рецепторов приводит к различным кожным заболеваниям. Для уточнения типа рецепторов, обуславливающих влияние rSLURP-1 на пролиферацию кератиноцитов, были использован набор ингибиторов nAChR и mAChR: α -Bgtx, специфический антагонист nAChR мышечного типа, а также $\alpha 7$ - и $\alpha 9$ - типов), мекамиламин (Мес, неспецифический блокатор трансмембранного домена nAChR), атропин (Атр, неспецифический антагонист mAChR), а также антитела к внеклеточному домену $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 5). В результате было установлено, что Атр, а следовательно и mAChR, не влияет на антипролиферативную активность rSLURP-1. Мес не оказывал влияния на рост клеток сам по себе, но полностью блокировал эффект rSLURP-1 при совместной аппликации. Антитела к внеклеточному домену $\alpha 7$ -nAChR также не влияли на пролиферацию кератиноцитов, но достоверно снижали эффект от rSLURP-1. С другой стороны, предварительная инкубация кератиноцитов с α -Bgtx не влияла на антипролиферативную активность rSLURP-1. Эти данные с одной стороны указывают на $\alpha 7$ -nAChR как на мишень действия rSLURP-1, а с другой стороны подтверждают отсутствие конкуренции между α -Bgtx и rSLURP-1 за связывание с этим рецептором и указывают на то, что механизм антипролиферативного действия SLURP-1 не может быть объяснен действием только на открытие/закрытие канала nAChR.

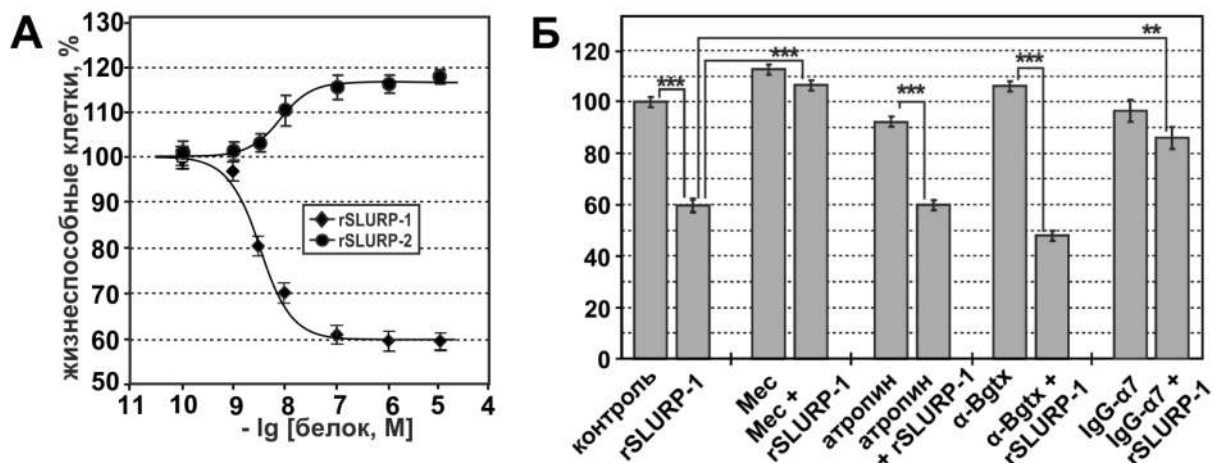


Рис. 4. Влияние rSLURP-1, rSLURP-2 на рост клеток Het-1A. (А). Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 на рост клеток Het-1A через 48 часов после добавления рекомбинантных белков в культуральную среду. (Б). Влияние на рост клеток Het-1A rSLURP-1 (1 мкМ), атропина (1 мкМ), Мес (10 мкМ), α-Bgtx (1 мкМ) и их совместной аппликации.

1.5. Пространственная структура rSLURP-1

Для определения пространственной структуры с помощью гетероядерной ЯМР-спектроскопии были получены ^{15}N и ^{13}C - ^{15}N -меченные образцы rSLURP-1. В спектрах ЯМР ^{15}N -меченого rSLURP-1 идентифицировалось два набора сигналов, соответствующие двум структурным формам белка. Согласно опубликованным данным (Шулепко и др., Биохимия, 2013), эта конформационная гетерогенность вызвана цис-транс изомерией пептидной связи Tyr39-Pro40 с характерным временем перехода из одного состояния в другое ~ 4 мс. Две структурные формы rSLURP-1 обладали примерно одинаковой заселенностью в условиях эксперимента.

Пространственная структура обоих конформеров rSLURP-1 была определена с использованием ^{13}C , ^{15}N -меченного препарата белка. Также была исследована динамика основной цепи (Рис. 5). Обе формы белка имеют типичную трехпетельную форму с двумя антипараллельными β-слоями. Пространственная структура обоих конформеров rSLURP-1 хорошо определена только в консервативном β-структурном ядре, в то время как три петли и С-концевой фрагмент белка принимают разнообразные неупорядоченные конформации. Полученные данные ^{15}N -релаксации демонстрируют, что отсутствие структурной конвергенции в этой области – это следствие подвижности основной цепи в двух временных диапазонах - пс-нс и мкс-мс. Высокая подвижность больших фрагментов rSLURP-1 ($\sim 60\%$ остатков rSLURP-1 участвуют в интенсивных движениях в пс-нс и/или мкс-мс диапазоне) напоминает ситуацию с внутренне неупорядоченными белками, некоторые из которых играют ключевую роль в процессах сигнализации и регуляции в клетках. Предположительно, неупорядоченные фрагменты молекулы rSLURP-1 могут обеспечивать обратимое взаимодействие с несколькими белками-мишенями или несколькими сайтами на поверхности одного рецептора.

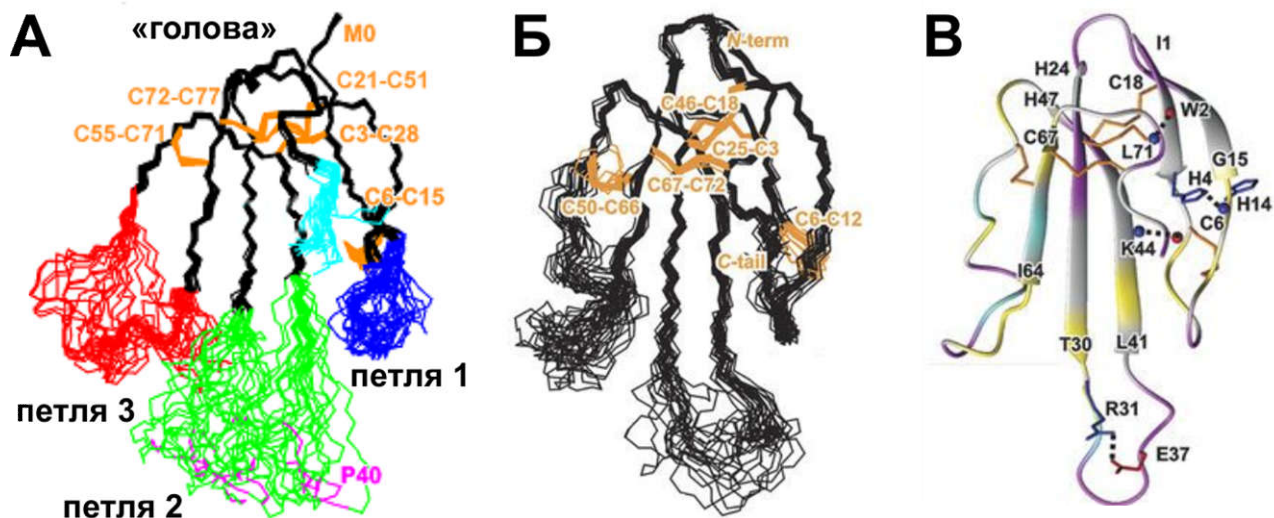


Рис. 5. Пространственные структуры rSLURP-1 и rSLURP-2. (А). 20 лучших структур rSLURP-1, наложенных друг на друга по регионам с хорошо упорядоченной структурой. (Б). 20 лучших структур rSLURP-2. (В). Ленточное представление пространственной структуры rSLURP-2 с наложенными данными о динамике, полученными с помощью ЯМР. Желтым цветом показаны регионы, участвующие в движениях в пс-нс диапазоне, фиолетовым – в движениях в мкс-мс диапазоне.

2. Рекомбинантный SLURP-2: мишени, механизм действия, пространственная структура

2.1. Аффинная экстракция мишени rSLURP-2

Аналогично описанному выше эксперименту по аффинной экстракции мишени rSLURP-1, rSLURP-2 был ковалентно иммобилизован на магнитных частицах и использован для идентификации субъединиц nAChR, взаимодействующих с данным белком. Несмотря на присутствие некоторой доли неспецифического связывания для контрольных магнитных частиц, на основе полученных результатов можно сделать вывод, что rSLURP-2 может взаимодействовать с несколькими типами субъединиц nAChR: $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, и $\beta 4$ (Рис. 6). Как и в случае с rSLURP-1, связывания с серотониновым рецептором 5-HT₃ не наблюдалось.

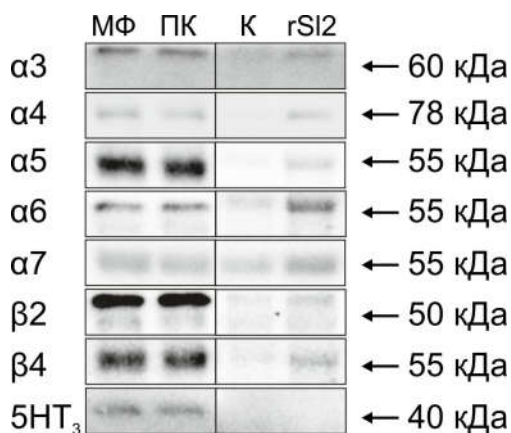


Рис. 6. Экстракция субъединиц nAChR с помощью rSLURP-2. «МФ» - мембранная фракция, «ПК» - МФ после инкубации с магнитными частицами, «К» - контроль, rSL2 – магнитные частицы с иммобилизованным белком. $\alpha 3$ - $\alpha 7$ и $\beta 2$ - $\beta 4$ – окраска антителами к субъединицам nAChR, 5-HT₃ – окраска с антителами к серотониновому рецептору 3A типа (контроль неспецифического взаимодействия).

2.2. Действие rSLURP-2 на функцию ионного канала nAChR

Для подтверждения возможности взаимодействовать rSLURP-2 с nAChR, состоящими из $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ и $\beta 2$ субъединиц, было охарактеризовано влияние белка на $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR (наиболее распространенные нейрональные nAChR человека), экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. Амплитуду ответов, вызванных 100 мкМ АХ, сравнивали с амплитудой ответов, полученных при предварительной инкубации ооцитов с rSLURP-2 в концентрации 30 нМ - 3 мкМ. Полученные результаты показали, что аппликация только rSLURP-2 не вызывает токов ни через один из исследуемых типов рецепторов. Инкубация ооцитов с rSLURP-2 приводила к умеренному ингибированию АХ-вызванных токов для $\alpha 3\beta 2$ -nAChR ($IC_{50} > 3$ мкМ), для $\alpha 4\beta 2$ -nAChR и $\alpha 7$ -nAChR наблюдалось выраженное ингибирование АХ-индуцированных токов с $IC_{50} \sim 1.7$ мкМ и ~ 3 мкМ, соответственно. Однако, на рецепторах $\alpha 7$ -nAChR при концентрациях rSLURP-2 < 1 мкМ наблюдалось увеличение ответа, вызванного АХ (Рис. 7).

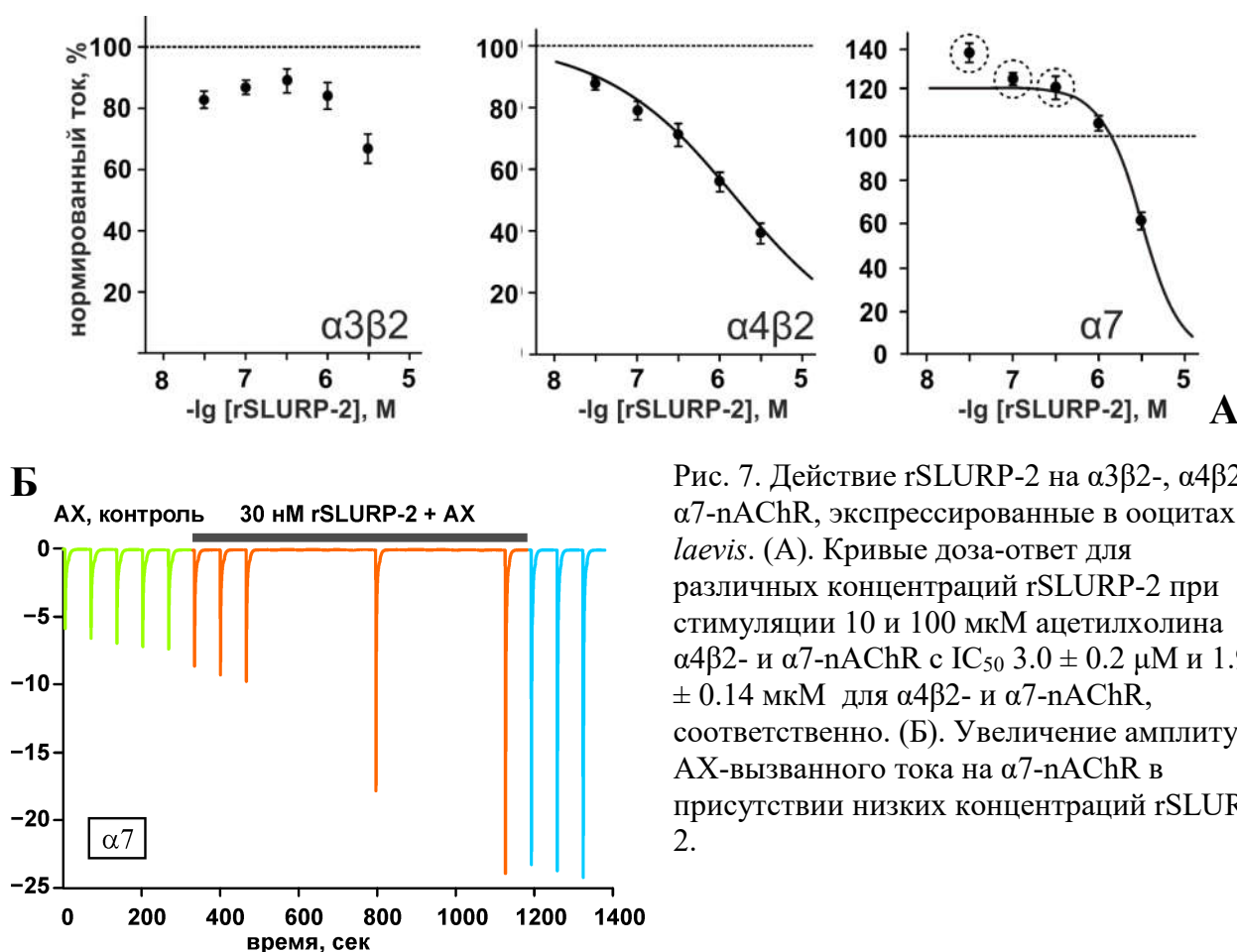


Рис. 7. Действие rSLURP-2 на $\alpha 3\beta 2$ -, $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*. (А). Кривые доза-ответ для различных концентраций rSLURP-2 при стимуляции 10 и 100 мкМ ацетилхолина на $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR с $IC_{50} 3.0 \pm 0.2 \mu M$ и $1.90 \pm 0.14 \mu M$ для $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, соответственно. (Б). Увеличение амплитуды АХ-вызванного тока на $\alpha 7$ -nAChR в присутствии низких концентраций rSLURP-2.

Увеличение АХ-вызванных токов на $\alpha 7$ -nAChR, наблюдаемое на кривой доза-ответ для низких концентраций rSLURP-2, напоминает ранее описанное действие конкурентного ингибитора тубокурарина на $\alpha 3\beta 4$ рецепторах. Похожие наблюдения были сделаны для некоторых холинергических препаратов (атропин, скополамин, физостигмин) в отношении $\alpha 4\beta 2$ рецепторов. Увеличение АХ-вызванных токов при низких концентрациях лиганда было

также описано для частичных агонистов $\alpha 7$ -nAChR RG3487 и энцениклина (EVP-6124) и получило название «прайминг».

2.3. Рекомбинантный SLURP-2 модулирует пролиферацию кератиноцитов Het-1A через взаимодействие с nAChR и mAChR

Влияние rSLURP-2 на пролиферацию кератиноцитов Het-1A было исследовано в диапазоне концентраций 0.1 нМ до 10 мкМ. Инкубация клеток Het-1A с rSLURP-2 приводила к небольшому, но статистически значимому увеличению числа клеток с $EC_{50} \sim 7.6 \pm 1.0$ нМ, максимальный эффект составлял 116% по сравнению с контролем (Рис. 4, 8). Для уточнения роли различных типов nAChR и, возможно, mAChR в этом эффекте были использованы ингибиторы такие как Мес, α -Bgtx, α -конотоксин МП (ингибитор $\alpha 3\beta 2$ -nAChR), Atr. α -Bgtx и Мес не оказывали значимого влияния на рост клеток, а α -конотоксин МП снижал число жизнеспособных клеток до $\sim 87\%$ по сравнению с контролем. Преинкубация кератиноцитов с α -Bgtx привела примерно к двукратному росту числа клеток в присутствии rSLURP-2 (Рис. 8). С другой стороны, совместная аппликация с α -конотоксином МП и Мес привела к выраженному снижению числа жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (снижение на $34 \pm 4\%$ и $54 \pm 3\%$, соответственно) (Рис. 8). Аналогично rSLURP-1, окрашивание по Хехсту/йодистым пропидием показало, что доля мертвых клеток при обработке rSLURP-2 и rSLURP-2 + Мес или + конотоксин МП составляет порядка $4 \pm 1\%$ (как и в контрольном образце) и морфология ядер не меняется. Таким образом, уменьшение числа жизнеспособных клеток по сравнению с контролем в данном эксперименте связано именно со снижением пролиферации, а не с цитотоксичностью.

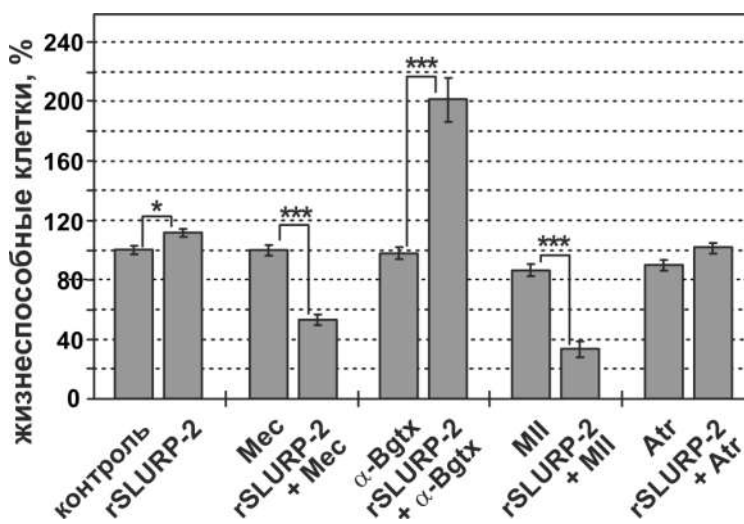


Рис. 8 Эффекты rSLURP-2 (1 мкМ), Atr (1 μ М), Мес (10 μ М), α -Bgtx (1 μ М), конотоксина МП (1 μ М) и их совместного применения на рост клеток Het-1A через 48 часов. Символ «*» обозначает статистически значимые отличия между указанными на рисунке группами.

Обнаруженный антипролиферативный эффект при совместном применении Мес и rSLURP-2 можно объяснить тем, что, видимо, не только nAChR являются мишенями rSLURP-2 в кератиноцитах. Воздействие на клетки 1 мкМ Atr приводило к снижению числа жизнеспособных кератиноцитов до $\sim 91\%$ по сравнению с контролем, а при одновременном применении атропина и rSLURP-2 антипролиферативный и пролиферативный эффекты нейтрализовали друг друга (число жизнеспособных клеток $\sim 102\%$, что значимо

отличается от экспериментов как с rSLURP-2 так и с и атропином). Наблюдаемое повышение пролиферативной активности rSLURP-2 при блокировании $\alpha 7$ -nAChR с α -Bgtx показывает, что взаимодействие SLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR может ингибировать пролиферацию клеток. С другой стороны, эксперимент с α -конотоксином МП показал, что взаимодействие SLURP-2 с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR способствует увеличению пролиферации клеток. Результаты, полученные в присутствии неспецифических ингибиторов nAChR и mAChR (Мес и атропин, соответственно) показывают, что rSLURP-2 может также взаимодействовать с мускариновыми рецепторами, но результирующий эффект на пролиферацию кератиноцитов сложно однозначно охарактеризовать из-за фона, образованного более сильными nAChR-опосредованными эффектами.

2.4. Конкурентное связывание rSLURP-2 с mAChR

Возможное взаимодействие rSLURP-2 с mAChR в кератиноцитах было подтверждено экспериментами на клетках CHO, гиперэкспрессирующих отдельные подтипы mAChR. Было обнаружено слабо выраженное положительное влияние rSLURP-2 на связывание ортостерического лиганда ^3H -N-метил-скополамина (NMS) с M1- и M3-mAChR (константы равновесной диссоциации $K_d \sim 230$ и 140 нМ, соответственно (Рис. 9А,Б). Напротив, влияния rSLURP-2 на связывание NMS с M2-, M4- и M5-mAChR при относительно большой концентрации белка (1.4 мкМ) не наблюдалось (Рис. 9В).

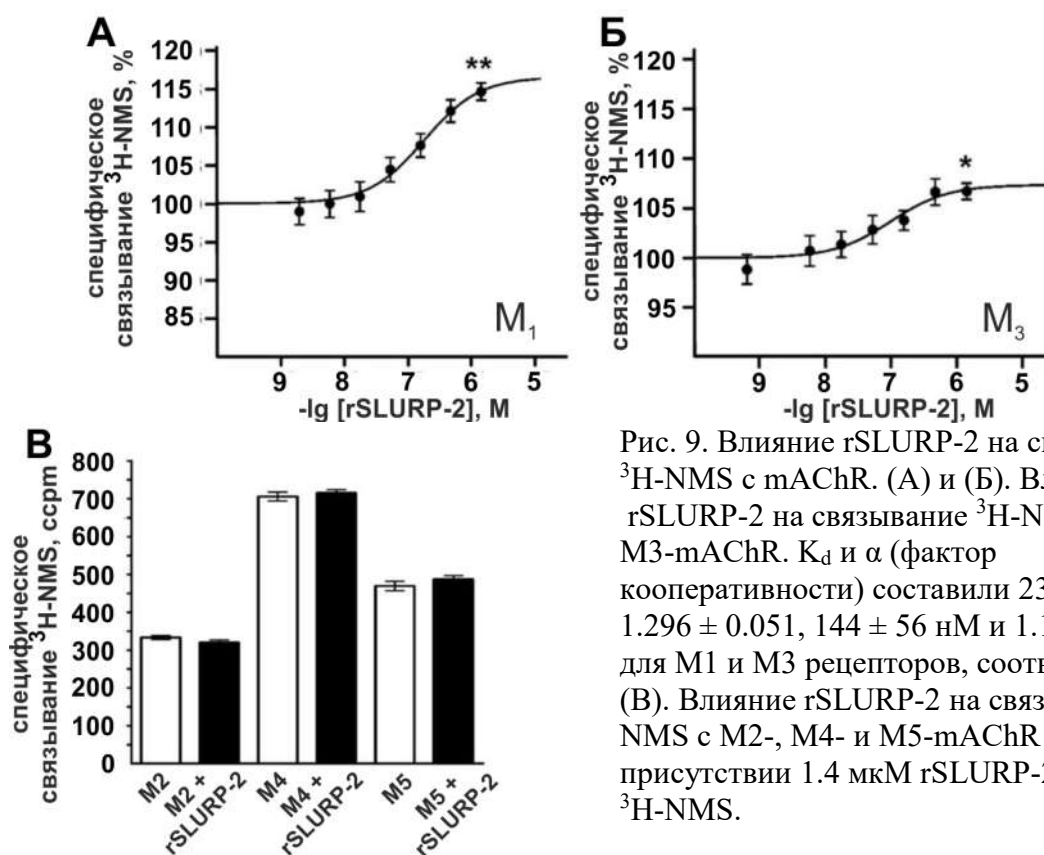


Рис. 9. Влияние rSLURP-2 на связывание ^3H -NMS с mAChR. (А) и (Б). Влияние rSLURP-2 на связывание ^3H -NMS с M1- и M3-mAChR. K_d и α (фактор кооперативности) составили 231 ± 81 нМ и 1.296 ± 0.051 , 144 ± 56 нМ и 1.128 ± 0.013 , для M1 и M3 рецепторов, соответственно. (В). Влияние rSLURP-2 на связывание ^3H -NMS с M2-, M4- и M5-mAChR в присутствии 1.4 мкМ rSLURP-2 и 150 пМ ^3H -NMS.

Т.к. оральные кератиноциты, использованные в работе, не экспрессируют M1-mAChR, вероятно, мишенью rSLURP-2 в кератиноцитах являются M3-mAChR. Полученные данные позволяют предположить, что SLURP-2 участвует на разных стадиях созревания клеток путем взаимодействия с различными

типами ацетилхолиновых рецепторов, экспрессия которых меняется в ходе жизненного цикла кератиноцитов. Возможно, изменения в относительном уровне экспрессии SLURP-1 и SLURP-2 вместе с изменением репертуара экспрессируемых nAChR и mAChR в кератиноцитах необходимы для поддержания оптимальной скорости пролиферации в процессе развития.

2.5. Пространственная структура белка rSLURP-2

Пространственная структура rSLURP-2 была исследована с помощью гетероядерной ЯМР-спектроскопии с использованием ^{13}C , ^{15}N -меченного белка. В процессе поиска оптимальных условий было установлено, что белок при концентрации выше 0.1 мМ выпадает в осадок при $\text{pH} > 6.0$. При pH в диапазоне от 3.0 до 4.5 наблюдалось два набора сигналов основной цепи. Один набор сигналов (дисперсия хим. сдвигов ^1HN от 7.1 до 9.7 м.д.) соответствовал структурированной форме rSLURP-2, другой (дисперсия химсдвигов ^1HN от 7.7 до 8.9 м.д.) – вероятно, неструктурированной форме. Снижение дисперсии химсдвигов ^1HN типично для денатурации β -структурного ядра. Популяция структурированной формы rSLURP-2 постепенно снижалась с понижением pH и белок полностью переходил в неструктурированную форму при $\text{pH} \sim 2.5$.

При $\text{pH} \sim 5.0$ повышение концентрации rSLURP-2 выше 0.2 мМ вызывало появление сигналов от второй формы белка со значительно сниженной дисперсией химических сдвигов ^1HN , что может свидетельствовать о неспецифической агрегации. Сигналы от двух форм rSLURP-2 наблюдались при $\text{pH} 5.0$ в диапазоне концентраций от 0.2 мМ до 1.0 мМ, при концентрации 1.5 мМ наблюдались сигналы только от формы со сниженной дисперсией хим. сдвигов (предположительно, агрегированной). Тот факт, что сигналы мономерной/структурированной и агрегированной/неструктурированной форм одновременно присутствуют в спектре, свидетельствует о медленном для ЯМР обмене между этими двумя состояниями с характерным временем в мкс-мс диапазоне. Для снижения степени агрегации белка при $\text{pH} \sim 5.0$ в образец добавляли 5% диоксан, что привело к значительному улучшению качества спектров ЯМР и сделало возможным отнесение сигналов в спектрах и исследование пространственной структуры rSLURP-2 в растворе в концентрации 0.5 мМ. Сравнение полученных ^1H и ^{15}N химических сдвигов с добавлением диоксана с химическими сдвигами, полученными для 0.08 мМ образца в воде, показало, что добавление диоксана не влияло на пространственную структуру rSLURP-2.

Полученные данные ЯМР показывают, что rSLURP-2 имеет типичную трехпетельную структуру, стабилизированную четырьмя дисульфидными связями в “голове” молекулы (Cys3-Cys25, Cys18-Cys46, Cys50-Cys66 и Cys67-Cys72) и одной в первой петле (Cys6-Cys12) (Рис. 5). Пространственная структура rSLURP-2 стабильна только в консервативном β -структурном ядре, в то время как концы всех трех петель - неупорядочены. Данные ^{15}N -релаксации показали наличие увеличенной подвижности основной цепи в петлевых участках в двух временных диапазонах (пс-нс и мкс-мс). Важно отметить, что для минимизации влияния агрегации белка и добавления диоксана на скорость

^{15}N -релаксации, измерения проводили для образца 0.08М в водном растворе без добавления диоксана. Анализ полученных данных по релаксации подтвердил, что rSLURP-2 в воде находится в мономерном состоянии при концентрациях ниже 0.1 мМ.

Петли трехпетельных белков считаются основными структурными детерминантами их взаимодействия с мишенями. Сравнение последовательностей SLURP-2 с другими трехпетельными белками, действующими на nAChR, показывает значительные отличия в распределении зарядов в петлях. В отличие от другого трехпетельного белка человека Lynx1 и α -нейротоксинов змей, которые в целом заряжены положительно, молекула rSLURP-2 имеет отрицательный суммарный заряд. Нетипичные структурные и динамические свойства петель SLURP-2 по сравнению с Lynx1, SLURP-1 и α -нейротоксинами могут подразумевать другой характер взаимодействия с nAChR.

2.6. Моделирование комплексов rSLURP-2 с nAChR

Изменяющаяся активность rSLURP-2 в присутствии селективных ортостерических антагонистов nAChR (α -Bgtx и конотоксин МII) позволяет предположить, что сайт связывания rSLURP-2 на поверхности nAChR перекрывается с ортостерическим сайтом связывания. Ортостерический (“классический”) сайт связывания расположен на внеклеточной части рецептора на интерфейсе между основной (+) и комплементарной (-) субъединицами, и он включает С-петлю основной субъединицы. Для изучения организации предполагаемого интерфейса взаимодействия rSLURP-2 с nAChR был проведен белок-белковый докинг rSLURP-2 к внеклеточным лиганд-связывающим доменам $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, основываясь на предположении, что при связывании с nAChR rSLURP-2 взаимодействует с С-петлей. Модели внеклеточных доменов $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR были построены по гомологии с структурой химеры Ls-AChBP с $\alpha 7$ -nAChR (Li и др., 2011).

Чтобы учесть структурную подвижность каждого из партнеров, мы проводили симуляции методом молекулярной динамики (MD) в ячейке с явно заданной водой отдельно для rSLURP-2 и доменов рецептора. Последующая кластеризация результатов привела к формированию конформационных ансамблей, которые были использованы при расчете белок-белкового докинга. Конформации $\alpha 7$ -nAChR с “закрытым” и “открытым” ортостерическим сайтом отличались положением С-петли основной субъединицы рецептора. Далее были проведены три серии докинга rSLURP-2/nAChR: для $\alpha 3\beta 2$ домена с “закрытым” ортостерическим сайтом, для $\alpha 7$ домена с “закрытым” ортостерическим сайтом и для $\alpha 7$ домена с “открытым” ортостерическим сайтом.

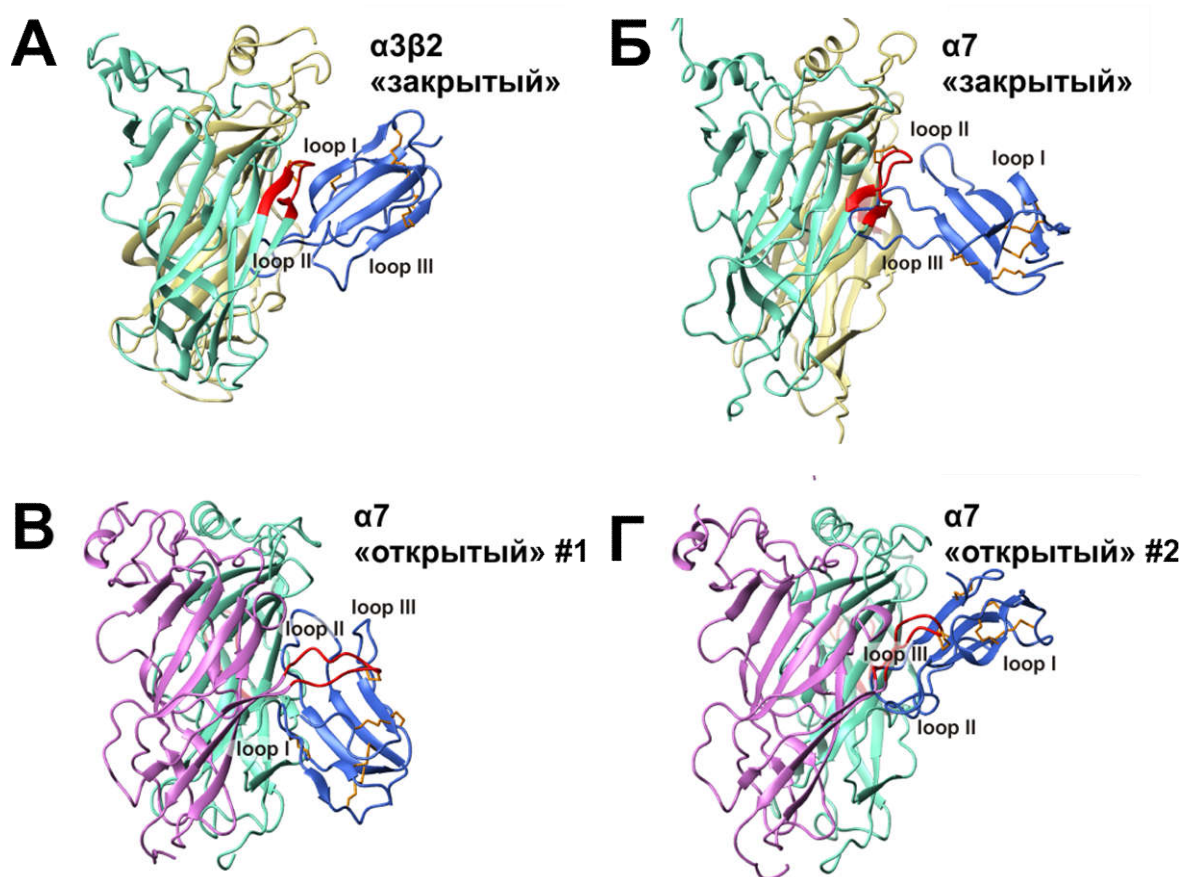


Рис. 10. Комплексы rSLURP-2 с внеклеточными доменами $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR. (А, Б). rSLURP-2 с «закрытыми» ортостерическими сайтами в $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR. (В, Г). Два решения комплекса rSLURP-2 с «открытым» ортостерическим сайтом в $\alpha 7$ -nAChR. Показаны боковые виды полученных моделей. Молекула rSLURP-2 показана синим цветом, а ее дисульфидные связи оранжевым цветом. Три петли rSLURP-2 подписаны «loop I»- «loop III». Для рецептора $\alpha 3\beta 2$ субъединицы $\alpha 3$ показаны светло-зеленым цветом, а $\beta 2$ -субъединицы пшеничным. Для «закрытого» ортостерического сайта гомопентамерного $\alpha 7$ -рецептора основные и комплементарные субъединицы показаны соответственно светло-зеленым и пшеничным цветами. Для «открытого» ортостерического сайта гомопентамерного $\alpha 7$ -рецептора основная и комплементарная субъединицы указаны пурпурным и светло-зеленым цветами, соответственно. Петля С субъединиц $\alpha 3$ и $\alpha 7$ показана красным цветом.

В комплексе с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, rSLURP-2 взаимодействовал с ортостерическим сайтом связывания с помощью петель I и II, при этом конец петли II располагался под петлей С $\alpha 3$ субъединицы. В случае $\alpha 7$ -nAChR с «закрытым» сайтом связывания, rSLURP-2 взаимодействовал с рецептором петлями II и III и его вытянутая петля III проникала в ортостерический сайт связывания. Для комплекса rSLURP-2 с «открытым» сайтом связывания $\alpha 7$ -nAChR были получены две группы решений с различными ориентациями лиганда. В этих группах rSLURP-2 также занимал ортостерический сайт связывания и взаимодействовал с внутренней стороной С-петли с помощью петель I и II, II и III, соответственно. Таким образом, петля II rSLURP-2 участвует в формировании комплекса во всех случаях (Рис. 10). «Закрытое» положение С-петли в $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -доменах напоминает конформацию рецептора в модели комплекса другого трехпетельного белка человека Lynx1 с AChBP, -

структурным гомологом лиганд-связывающего домена nAChR, и в пространственной структуре комплекса химеры $\alpha 7$ /AChBP с агонистом эпибатином (Lyukmanova и др., 2011). Однако, в вышеупомянутой модели Lynx1 взаимодействовал с внешней стороной С-петли AChBP. «Открытая» конформация С-петли, наблюдаемая в данной работе для $\alpha 7$ -nAChR напоминает положение С-петли в кристаллических структурах AChBP и химеры $\alpha 7$ /AChBP в комплексе с антагонистами.

Во всех смоделированных комплексах интерфейсы взаимодействия $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR с rSLURP-2 частично перекрываются с сайтом связывания антагониста в структуре комплекса $\alpha 7$ /AChBP с α -Bgtx. Т.е. компьютерное моделирование подтвердило возможное взаимодействие rSLURP-2 с ортостерическим лиганд-связывающим сайтом nAChR. Сравнение комплексов rSLURP-2 с $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -доменами в «закрытой» конформации показывает, что ортостерический сайт связывания на рецепторах занят петлями II и III лиганда, соответственно. Предположительно, противоположные эффекты на пролиферацию кератиноцитов, вызванные взаимодействием rSLURP-2 с $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, могут быть результатом как различного характера взаимодействия рецептор/лиганд, так и вовлечением различных сигнальных каскадов, ассоциированных с этими типами рецепторов.

3. Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 на клеточные линии опухолевого происхождения

3.1. rSLURP-1 и rSLURP-2 подавляют рост раковых линий эпителиального происхождения

Активация $\alpha 7$ -nAChR никотином приводит к увеличению экспрессии этого рецептора в раковых клетках и стимулирует их пролиферацию (Egleton и др., 2008). Ранее в отделе биоинженерии ИБХ РАН была показана антипролиферативная активность белков SLURP по отношению к линии колоректальной аденокарциномы HT-29 (Люкманова и др., 2014). Для проверки предположения, что антипролиферативная активность белков SLURP имеет место и для других раковых линий эпителиального происхождения, действие rSLURP-1 и rSLURP-2 было изучено на следующих линиях: A431 (эпидермоидная карцинома), A549 (аденокарцинома базального альвеолярного эпителия), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) и SKBR-3 (аденокарцинома молочной железы).

Инкубация раковых клеток с rSLURP-1 и rSLURP-2 в наномолярных концентрациях в течение 24 ч приводила к значительному снижению количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (Рис. 13). Исследование с окрашиванием по Хехсту/йодистым пропидием показало, что форма ядер осталась неизменной по сравнению с контролем, а доля мертвых клеток не увеличилась. Анализ кривых «доза-ответ» показал концентрационно-зависимый характер действия белков SLURP на линии A431, MCF7 и SKBR-3 с EC_{50} в диапазоне от 0.02 to 3.1 нМ и снижением числа жизнеспособных клеток до 40-70 % (Рис. 11). Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 на пролиферацию клеток

сравнили с эффектом α -Bgtx, который по литературным данным также может подавлять рост раковых клеток эпителиального происхождения, однако, в отличие от белков SLURP, практически необратимо блокирует $\alpha 7$ -nAChR типа (Paeleari и др., 2008). Для всех протестированных клеточных линий α -Bgtx ингибировал пролиферацию с EC_{50} в диапазоне от 0.01 to 1.4 нМ.

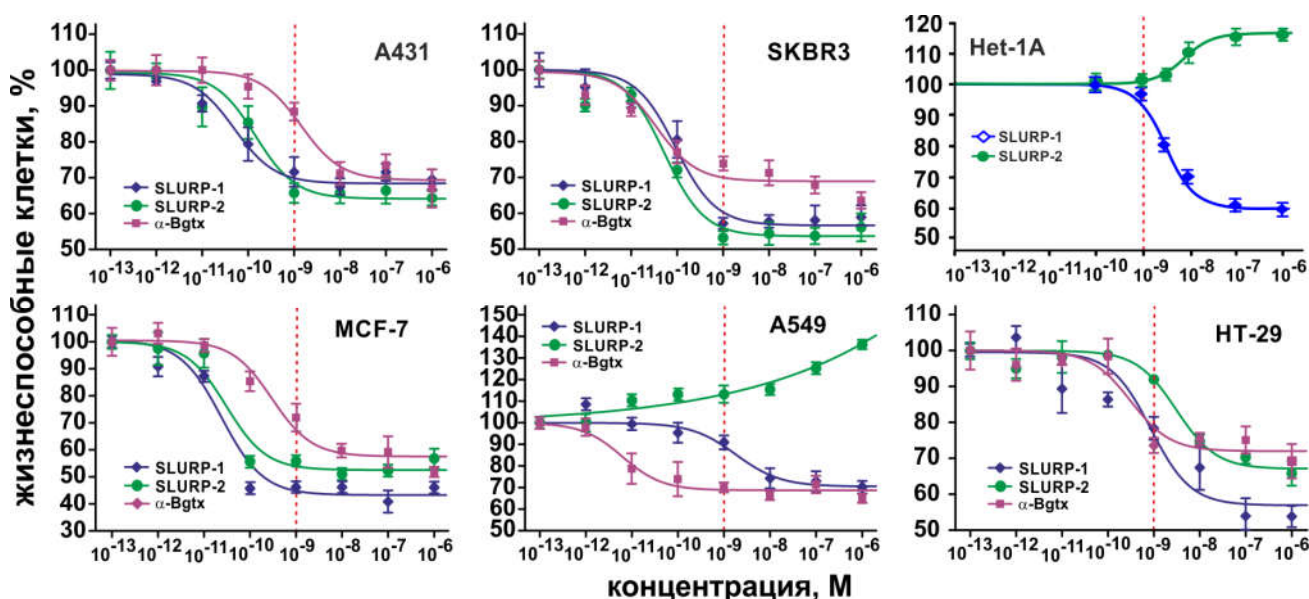


Рис. 11. Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 на рост раковых клеток эпителиального происхождения через 24 ч инкубации. Для сравнения приведены данные для кератиноцитов Het-1A и колоректальной карциномы HT-29 (Люкманова и д., 2014).

rSLURP-1 ингибировал пролиферацию клеток аденокарциномы легкого A549 до ~70 % по сравнению с контролем, в то время как rSLURP-2 увеличивал пролиферацию до ~125 % по сравнению с контролем (Рис. 12). Стоит отметить, что подобные разнонаправленные эффекты rSLURP-1 и rSLURP-2 наблюдались также для линии нормальных кератиноцитов Het-1A (Рис 4). SLURP-1 – селективный антагонист $\alpha 7$ -nAChR, в то время как rSLURP-2 действует на разные типы ацетилхолиновых рецепторов (Рис. 8, 9) и более того, может вызывать активацию $\alpha 7$ -nAChR в низких концентрациях в присутствии агонистов, например, ацетилхолина (Рис. 7). Возможно, разное действие rSLURP-1 и rSLURP-2 на различных клеточных линиях обусловлено отличающимся репертуаром рецепторов-мишеней.

Сравнение концентрационных зависимостей и величины антипролиферативного эффекта, вызванного белками rSLURP на нормальных кератиноцитах и раковых клетках, указывает на существование потенциального «терапевтического окна». Действующая концентрация rSLURP значительно ниже для нескольких типов раковых эпителиальных линий по сравнению с нормальными кератиноцитами. Так, обработка клеток A431, SKBR3 и MCF-7 препаратами rSLURP-1 и rSLURP-2 приводила к значительному снижению клеточного роста уже при концентрации белков 1 нМ, в то время как на нормальных кератиноцитах Het-1A эта концентрация не вызывала видимого эффекта (Рис. 11).

3.2. Взаимодействие rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431

Одним из предполагаемых механизмов никотин-индуцированного развития рака считается активация $\alpha 7$ -nAChR никотином и его нитрозаминовыми производными (NNK и NNN), которые также присутствуют в табачном дыме. Активация $\alpha 7$ -nAChR в свою очередь активирует сигнальные пути, сопряженные с рецепторами EGF, VEGF и β -адренергическими рецепторами, которые активируют митогенные, анти-апоптотические и пролиферативные сигнальные пути (Schaal и др., 2014).

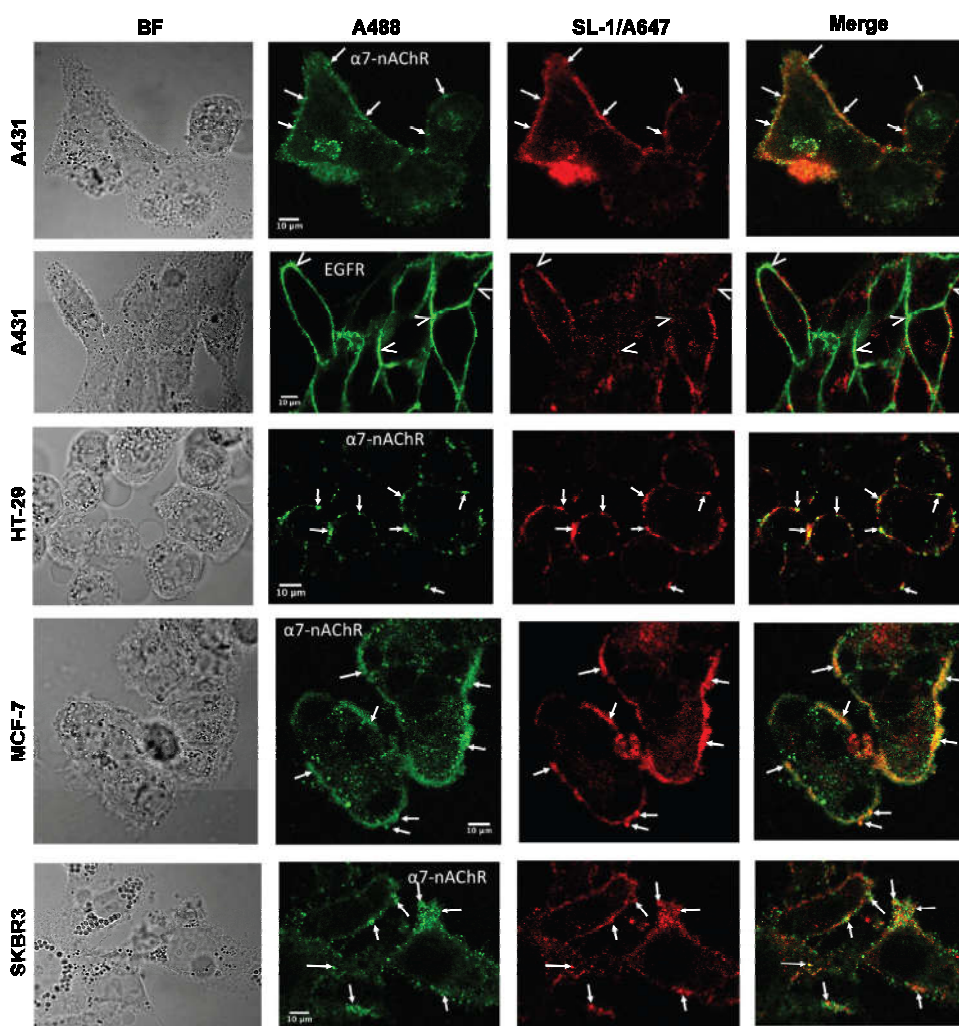


Рис. 12. Солокализация rSLURP-1/A647 с $\alpha 7$ -nAChR и EGFR в раковых клетках. Клетки инкубировали в течение 1 часа с SL-1/A647, фиксировали и окрашивали на $\alpha 7$ -nAChR или EGFR (для A431). Стрелками показаны участки на плазматической мембране, где SL-1/A647 солокализуется с $\alpha 7$ -nAChR. Регионы клеточной мембраны с заметным окрашиванием EGFR, но с низким SL-1/A647 мембранным связыванием, обозначены большими стрелками. Шкала 10 мкм.

Как было установлено выше, общей мишенью действия rSLURP-1, rSLURP-2 и α -Bgtx является $\alpha 7$ -nAChR. Для изучения мишени действия rSLURP-1 в раковых клетках мы проанализировали солокализацию флуоресцентно-меченого rSLURP-1 (SL-1/A647) с $\alpha 7$ -nAChR с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 12). Достоверная солокализация SL-1/A647 и эндогенного $\alpha 7$ -nAChR была обнаружена в основном на поверхности плазматической мембраны. Клеточная линия A431 характеризуется

суперпродукцией рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), стимулирующего пролиферацию раковых клеток (Anderson и др., 2001). Ранее была обнаружена солокализация $\alpha 7$ -nAChR и EGFR на мембране клеток рака легкого и пищевода (Chernyavsky и др., 2015). Мы проанализировали солокализацию SL-1/A647 и EGFR (Рис. 12). Для EGFR распределение по мембране было относительно однородным, поэтому любой связанный с поверхностью мембраны SL-1/A647 был солокализован с какой-то частью EGFR, однако распределение двух меток имело низкую степень корреляции: некоторые клетки с высокой степенью экспрессии EGFR практически не связывали SL-1/A647 и наоборот. Хотя эти результаты не позволяют полностью опровергнуть предположение о взаимодействии SL-1/A647 с EGFR, они показывают, что EGFR не является основной мишенью SLURP-1 на поверхности плазматической мембраны.

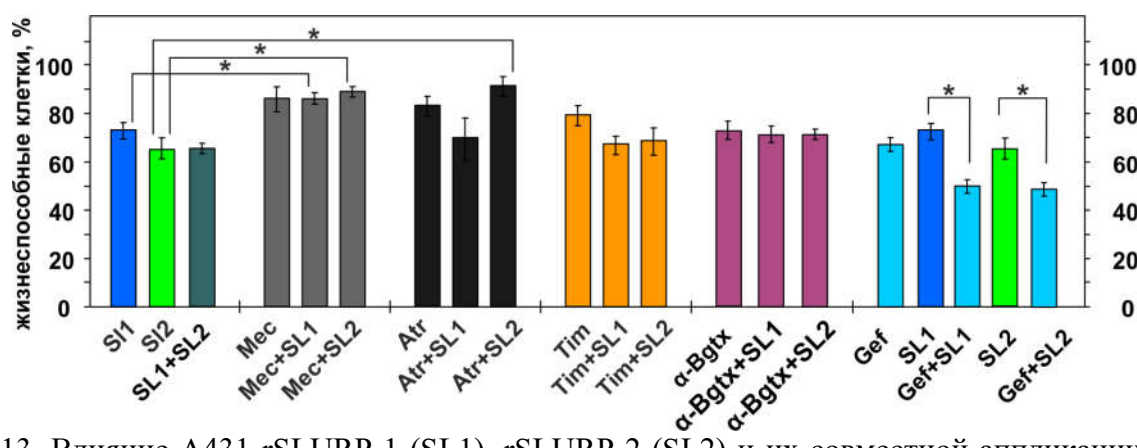


Рис. 13. Влияние A431 rSLURP-1 (SL1), rSLURP-2 (SL2) и их совместной аппликации Mec, Atr, тимололом (Tim) и gefитинибом (Gef) на пролиферацию клеток. Концентрации rSLURP-1 и rSLURP-2 составляли 1 nM, концентрации остальных веществ – 10 nM.

Чтобы подтвердить что именно ацетилхолиновые рецепторы, а не EGFR являются основными мишенями SLURP в клетках A431, был исследован антипролиферативный эффект этих белков в присутствии мекамиламина, атропина, gefитиниба и тимолола, которые являются ингибиторами nAChR, mAChR, EGFR и β -адренергических рецепторов, соответственно. Mec и Atr не оказывали существенного влияния на рост клеток сами по себе (Рис. 13). Совместная аппликация SLURP с Mec приводила к отмене антипролиферативного эффекта обоих SLURP. Совместная аппликация Atr значительно снижала антипролиферативный эффект SLURP-2 и не оказывала влияния на активность SLURP-1. Блокирование β -адренергических рецепторов тимололом не оказывало значимого влияния на антипролиферативную активность обоих SLURP, означая, что β -адренергические рецепторы не участвуют в сигнальных путях, ответственных за действие белков SLURP на клетки A431.

В соответствии с литературными данными, мы наблюдали значительное ингибирование роста клеток A431 под действием gefитиниба: инкубация клеток с 10 nM gefитиниба приводила к снижению пролиферации до ~ 70% по сравнению с контролем (Рис. 13). Совместное применение gefитиниба и SLURP в концентрациях, необходимых для насыщения их

антипролиферативного действия по-отдельности (10 нМ и 1 нМ, соответственно), приводило к аддитивному эффекту и практически полной остановке роста раковых клеток (Рис. 13). Следовательно, rSLURP-1 и rSLURP-2 регулируют пролиферацию клеток через сигнальный путь (пути), которые не связаны с непосредственной активацией EGFR. Таким образом, антипролиферативная активность SLURP-1 на клетках A431 опосредована взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR, в то время как в механизм действия SLURP-2 вовлечены различные nAChR и mAChR.

3.3. Влияние rSLURP-1 на экспрессию эндогенных белков SLURP-1 и $\alpha 7$ -nAChR в клетках линии A431

Согласно литературным данным, стимуляция никотином приводит к увеличению уровня экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в клетках рака легкого, а также к снижению уровня экспрессии SLURP-1 в клетках рака легкого и кишечника (Pettersson и др, 2009; Kalantari-Dehaghi и др., 2012). В связи с этим возникло предположение, что воздействие rSLURP-1 может иметь обратный эффект в раковых клетках. Методами проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-меченого α -Bgtx было показано, что 24-часовая инкубация клеток A431 с rSLURP-1 при концентрации 1 мкМ снижала уровень экспрессии $\alpha 7$ -nAChR на плазматической мембране клеток на ~ 25% (Рис. 14B).

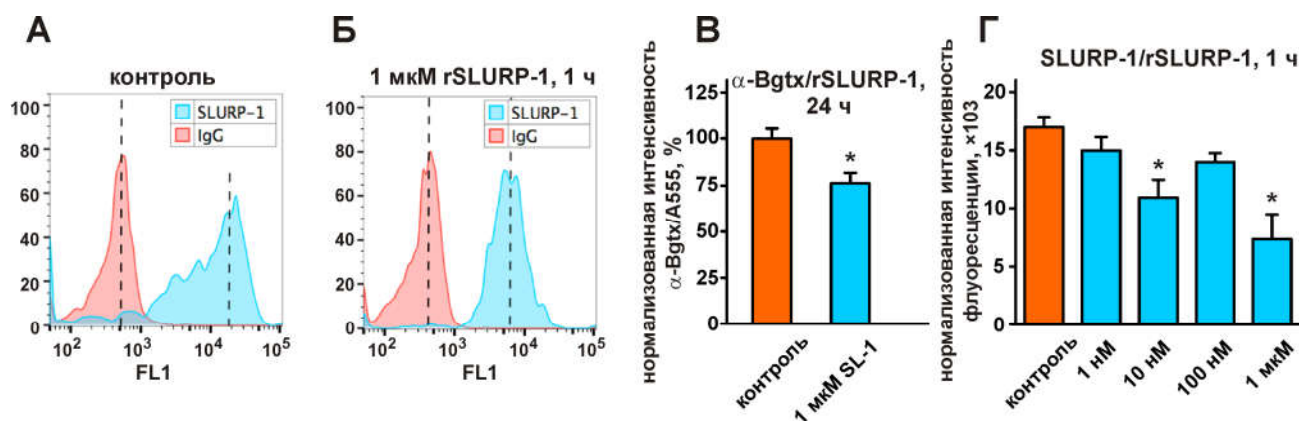


Рис. 14. Анализ содержания эндогенных SLURP-1 и $\alpha 7$ -nAChR методами проточной цитометрии. (А), (Б). Гистограммы распределения клеток по интенсивности сигнала для изотипического контроля и клеток, обработанных rSLURP-1. Пунктирные линии показывают медиану распределения. (В). Окрашивание $\alpha 7$ -nAChR с помощью флуоресцентно-меченого α -Bgtx при обработке клеток 1 мкМ rSLURP-1 в течение 24 ч. (Г). Окрашивание эндогенного SLURP-1 при обработке клеток A431 различными концентрациями rSLURP-1 в течение 1 ч.

Кроме того, под действием rSLURP-1 происходило также значительное снижение содержания эндогенного SLURP-1 в клетках A431 уже после часовой инкубации с белком (до 50%, Рис. 14Г). Анализ клеток A431 после часовой инкубации с rSLURP-1 с помощью конфокальной микроскопии также показал значительное снижение интенсивности окрашивания внутриклеточного SLURP-1.

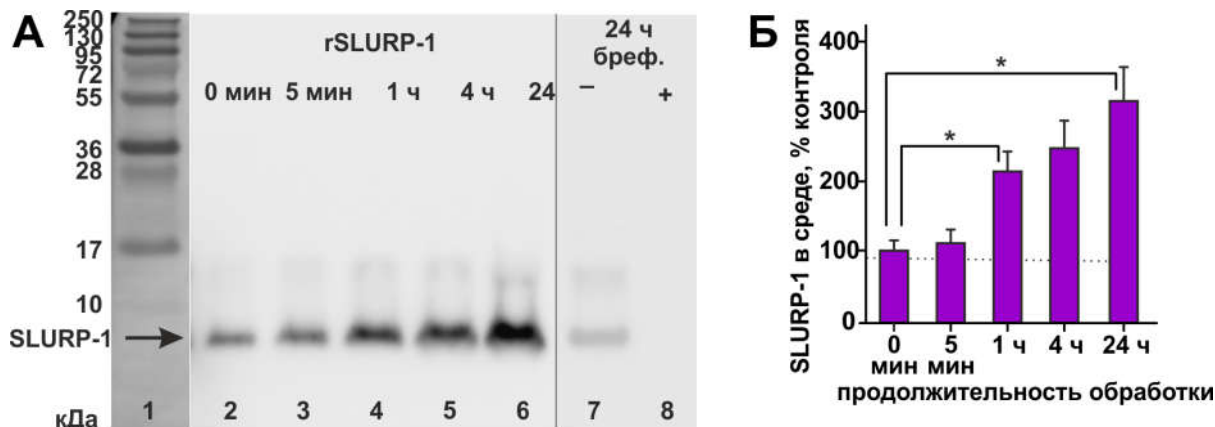


Рис. 15. Анализ содержания SLURP-1 в культуральной среде при обработке клеток A431 rSLURP-1. (А). Репрезентативный вестерн-блот с антителами к SLURP-1. (Б). Количественный анализ интенсивностей полос образцов культуральной среды, окрашенных антителами против SLURP-1 после инкубации клеток в течение разного времени с 1 мкМ rSLURP-1, нормированных на величину в точке «0 мин». Данные выражены как среднее $\pm$ SEM, $n = 7$. * ($P < 0,05$) означает достоверное отличие с группой «0 мин», по результатам дисперсионного анализа ANOVA с *post-hoc* тестом Даннета. Базовый уровень эндогенного SLURP-1 ($87 \pm 14\%$) во внеклеточной среде показан пунктирной линией. Анализ данных с помощью уравнения ($y = 100\% + A0 \cdot (1 - \exp[-k0 \cdot t])$) выявил максимальную концентрацию SLURP-1 во внеклеточной среде $A0 = 291 \pm 22\%$, скорость процесса секреции $k0 = 0,79 \pm 0,36 \text{ h}^{-1}$. Определенная скорость $k0$ соответствует полупериоду $0,9 \pm 0,4$ часа.

Это позволило предположить, что в ответ на добавление к клеткам rSLURP-1 происходит секреция эндогенного SLURP-1. Действительно, после обработки клеток A431 rSLURP-1 наблюдалось значительное увеличение внеклеточного уровня SLURP-1 уже после 1 ч инкубации, причем этот эффект блокировался ингибитором экзоцитоза брефельдином А (Рис. 15А). Кинетический анализ SLURP-1 показал, что процесс секреции характеризуется полупериодом ~ 1 ч и содержание SLURP-1 в культуральной среде возрастает примерно в 3 раза в течение 24 ч (Рис. 15Б). Таким образом, взаимодействие rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR на плазматической мембране клетки приводит к высвобождению эндогенного белка из внутриклеточных депо, что, в свою очередь, служит сигналом для соседних клеток.

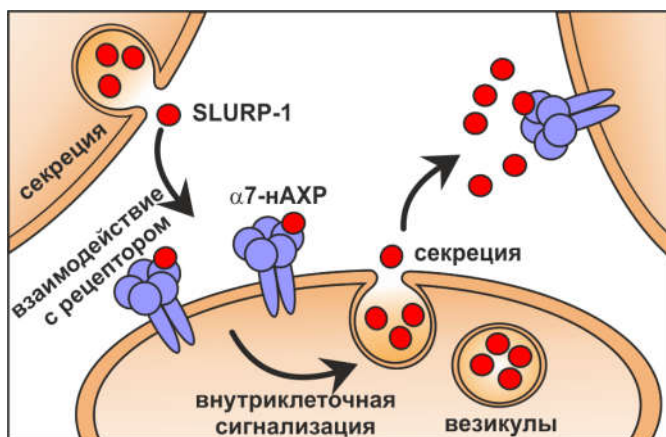


Рис. 16. Механизм положительной обратной связи в паракринной сигнализации SLURP-1.

ВЫВОДЫ

- 1) Изучена фармакология взаимодействия рекомбинантных аналогов белков SLURP-1 и SLURP-2 с никотиновыми и мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR и mAChR). Показано, что rSLURP-1 селективно взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR, в то время как rSLURP-2 взаимодействует с широким спектром никотиновых рецепторов и мускариновыми рецепторами M1 и M3 типов.
- 2) rSLURP-1 ингибирует пролиферацию нормальных кератиноцитов человека линии Het-1A, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR, при этом, возможно, задействуется метаботропный механизм передачи сигнала через рецептор. Влияние rSLURP-2 на пролиферацию кератиноцитов зависит от типа рецепторов, через которые осуществляется передача сигнала. Взаимодействие rSLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR приводит к ингибированию, а с рецепторами $\alpha 3\beta 2$ -nAChR к усилению роста клеток.
- 3) rSLURP-1 и rSLURP-2 ингибируют пролиферацию клеток аденокарциномы кожи, карциномы молочной железы и аденокарциномы кишечника человека. На клетках аденокарциномы кожи линии A431 показано, что антипролиферативный эффект rSLURP-1 обусловлен взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR, а rSLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR и mAChR.
- 4) Изучен механизм паракринной/аутокринной регуляции клеток A431 белком SLURP-1. Показано, что добавление rSLURP-1 во внешнюю среду клеток A431 стимулирует секрецию эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных депо и снижает экспрессию гена $\alpha 7$ -nAChR и представление активного рецептора на клеточной мембране.
- 5) Определена пространственная структура и динамика rSLURP-1 и rSLURP-2 в растворе. Подтверждена структурная гомология белков SLURP и трехпетельных нейротоксинов змей. Петлевые участки белков SLURP слабо структурированы и обладают высокой конформационной подвижностью. Предложены модели комплексов rSLURP-2 с внеклеточными доменами $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

- 1) **Кульбацкий Д.С.**, Бычков М.Л., Люкманова Е.Н. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы человека: строение, функция и физиологическая роль. *Биоорганическая химия*, 2018, 44(6), с. 595–607.
- 2) Lyukmanova E.N., Bychkov M.L., Sharonov G.V., Efremenko A.V., Shulepko M.A., Vasilieva N.A., **Kulbatskii D.S.**, Shenkarev Z.O., Feofanov A.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Human Secreted Proteins SLURP-1 and SLURP-2 Control the Growth of Epithelial Cancer Cells via interaction with Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Br. J. Pharmacology*, 2018, 175, p.1973–1986.
- 3) Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D.S., Bychkov M.L., **Kulbatskii D.S.**, Kasheverov I.E., Astapova M.V., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D., Shenkarev Z.O., Tsetlin V.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Human Secreted Ly-6/uPAR Related Protein-1 (SLURP-1) Is a Selective Allosteric Antagonist of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *PLoS One*, 2016; 11(2):e0149733.
- 4) Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., **Kulbatskii D.S.**, Avariniti M., Dolejsi E., Schaer T., Arseniev A.S., Efremov R.G., Thomsen M.S., Dolezal V., Bertrand D., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Secreted Isoform of Human Lynx1 (SLURP-2): Spatial Structure and Pharmacology of Interactions with Different Types of Acetylcholine Receptors. *Scientific Reports*, 2016, 6:30698.

Материалы конференций:

- 1) Shulepko M.A., Bychkov M.L., Sharonov G.V., Efremenko A.V., **Kulbatskii D.S.**, Shenkarev Z.O., Feofanov A.V., Shlepova O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. Human Secreted Protein SLURP1 interacts with Nicotinic Acetylcholine Receptors to Control the Growth of Epithelial Cancer Cells. *43rd FEBS Congress*, Прага, Чехия, 2018, FEBS Open Bio, 8(1), p.330.
- 2) **Kulbatskii D.S.**, Bychkov M.L., Efremenko A.V., Sharonov G.V., Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Lyukmanova E.N. Human proteins SLURP-1 and SLURP-2 suppress proliferation of epithelial cells by interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *42nd FEBS Congress*, Иерусалим, Израиль, 2017, FEBS J., 284(1), p. 352.
- 3) Шулепко М.А., Бычков М.Л., Ефременко А.В., Шаронов Г.В., **Кульбацкий Д.С.**, Шенкарев З.О., Феофанов А.В., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Люкманова Е.Н. Подавление пролиферации раковых клеток белками человека SLURP-1 и SLURP-2. *Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова»*, Москва, 2017, Acta Naturae, спецвыпуск, стр. 161.
- 4) **Кульбацкий Д.С.**, Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Шенкарев З.О., Бычков М.Л., Парамонов А.С., Чугунов А.О., Томсен М.С., Долежал В., Бертран Д., Кирпичников М.П., Долгих Д.А. Секретируемая изоформа белка человека Lynx1 (SLURP-2) регулирует пролиферацию кератиноцитов посредством взаимодействия с различными типами не-нейрональных ацетилхолиновых рецепторов. *XXIX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные*

направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2017, сборник материалов конференции, стр. 60.

- 5) **Kulbatskii D.S.**, Bychkov M.L., Shulepko M.A., Dolgikh D.A., Lyukmanova E.N. Human protein SLURP-1 is a natural defender of lung cells from nicotine-induced cell proliferation and malignant transformation. *Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Хания, Греция, 2017, сборник материалов конференции, стр. S31. Устный доклад.
- 6) Lyukmanova E.N., Bychkov M.L., **Kulbatskii D.S.**, Shulepko M.A., Efremenko A.V., Sharonov G.V., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. Anticancer activity of human secreted proteins SLURP-1 and SLURP-2: implication of nicotinic acetylcholine receptors. *Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Хания, Греция, 2017, сборник материалов конференции, стр. P28.
- 7) Shulepko M.A., Kudryavtsev D.S., Bychkov M.L., **Kulbatskii D.S.**, Kasheverov I.E., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Shenkarev Z.O., Tsetlin V.I., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Lyukmanova E.N. Human Secreted Protein SLURP-1 Interacts with $\alpha 7$ nAChR in a non-canonical mode. *Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Хания, Греция, 2017, сборник материалов конференции, стр. P33.
- 8) Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., **Kulbatskii D.S.**, Bychkov M.L., Thomsen M.S., Dolezhal V., Bertrand D., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Lyukmanova E.N. Human Secreted Protein SLURP-2 Interacts with Different types of Nicotinic and Muscarinic Acetylcholine Receptors to regulate keratinocytes proliferation. *Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Хания, Греция, 2017, сборник материалов конференции, стр. P34.
- 9) Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., **Кульбацкий Д.С.**, Бычков М.Л., Васильева Н.А., Локтюшов Е.В., Бойко А.А., Феофанов А.В., Шенкарев З.О., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Трехпетельные белки семейства Ly-6/uPAR: функциональное многообразие в рамках одного структурного мотива. *V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН*, Санкт-Петербург, 2016, сборник материалов конференции, стр. 38.
- 10) **Kulbatskii D.S.**, Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., Bychkov M.L., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Thomsen M.S., Tsetlin V.I., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Lyukmanova E.N. Human secreted Ly-6/uPAR related proteins: insights into specificity of interaction with acetylcholine receptors. Part 1: SLURP-1 exclusively binds to human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors on outside of orthosteric binding site. *XVth International Symposium on Cholinergic mechanisms*, Марсель, Франция, 2016, J. Neurochemistry, 142 (2), 193.
- 11) Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Kudryavtsev D.S., Bychkov M.L., **Kulbatskii D.S.**, M.V. Astapova, A.V. Feofanov, M. Thomsen, J. Mikkelsen, Z.O. Shenkarev, V.I. Tsetlin, M.P. Kirpichnikov, D.A. Dolgikh. Functional Properties of human Secreted Ly-6/uPAR Protein SLURP-1 Support a Non-Canonical mode of Interaction with $\alpha 7$ -nAChR. *10th FENS Forum of Neuroscience*, Копенгаген, Дания, 2016, сборник материалов конференции, стр. 173.
- 12) Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Bychkov M.L., **Kulbatskii D.S.**, Thomsen M.S., Dolgikh D.A. Structure-Function Study of Human Secreted Ly-6/uPAR Related Proteins SLURP-1 and SLURP-2 Suggests Multiple Molecular Targets. *40th FEBS Congress*, Берлин, Германия, 2015, FEBS J., 282(1), p. 168.