

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Кульбацкий Дмитрий Сергеевич

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

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Люкманова Екатерина Назымовна

Москва

2018

Оглавление

Список сокращений	4
Введение.....	5
Актуальность работы.....	5
Цели и задачи исследования.....	6
Научная новизна и практическая значимость работы	7
Положения, выносимые на защиту	8
Глава 1. Обзор литературы.....	9
1.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы	9
1.1.1 Строение никотиновых рецепторов	9
1.1.2 Механизм передачи сигнала через никотиновый рецептор.	14
1.1.3 Не-нейрональные холинергические сигнальные системы.....	17
1.2. Трехпетельные белки семейства Ly-6/uPAR	27
1.2.1 Трехпетельные нейротоксины из яда змей.....	28
1.2.2 Белки Ly-6/uPAR с GPI-якорем у млекопитающих	29
1.2.3. SLURP-1 – аминокислотная последовательность и процессинг	31
1.2.4. Взаимодействие рекомбинантных аналогов SLURP-1 с nAChR. ...	34
1.2.5. Участие SLURP-1 и SLURP-2 в регуляции пролиферации и воспалительных процессов.....	36
1.2.6 SLURP-1 и SLURP-2 в развитии раковых заболеваний	38
Глава 2. Материалы и методы.....	41
2.1 Материалы	41
2.1.1. Реактивы и ферменты	41
2.1.2. Бактериальные и эукариотические клеточные линии	42
2.1.3. Плазмидные векторы	42
2.1.4. Питательные среды для роста бактериальных культур	42
2.1.5. Питательные среды для роста эукариотических клеточных линий	43
2.1.6. Антитела.....	44
2.1.7. Синтетические олигонуклеотиды.....	45
2.2 Методы.....	46
2.2.1 Получение рекомбинантных белков rSLURP-1 и rSLURP-2.....	46
2.2.2. Аффинная экстракция из образцов тканей.....	50
2.2.3 Вестерн-блоттинг	52
2.2.4. Электрофизиология.....	53
2.2.5 Культивирование эукариотических клеток	54
2.2.6. Анализ пролиферативной активности	56
2.2.7 Культивирование клеток PC12 и анализ фосфорилирования ERK1/2 МАР-киназы.....	56
2.2.8 Конфокальная микроскопия.....	57
2.2.9 Проточная цитометрия	58
2.2.10 ПЦР в реальном времени.....	59
2.2.11 Связывание с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами..	60
2.2.12 Исследование структуры и динамики с помощью ЯМР	61

2.2.13 Численное моделирование комплексов rSLURP-2/nAChR.....	61
Глава 3. Результаты и обсуждение	64
3.1 Рекомбинантный SLURP-1: мишени, механизм действия, пространственная структура.....	64
3.1.1. Аффинная экстракция субъединиц nAChR с помощью rSLURP-1	64
3.1.2. Конкурентное связывание rSLURP-1 с изолированными nAChR ..	65
3.1.3. Действие rSLURP-1 на функцию ионного канала nAChR.....	66
3.1.4 rSLURP-1 подавляет пролиферацию оральных кератиноцитов Het- 1A	69
3.2.5. Пространственная структура белка rSLURP-1.....	73
3.2. Рекомбинантный SLURP-2: мишени, механизм действия, пространственная структура.....	76
3.2.1 Аффинная экстракция мишени rSLURP-2.....	76
3.2.2 Действие rSLURP-2 на функцию ионного канала nAChR	77
3.2.3. Рекомбинантный SLURP-2 модулирует пролиферацию кератиноцитов Het-1A через взаимодействие с nAChR и mAChR	80
3.2.4. Влияние rSLURP-2 на связывание лигандов mAChR	82
3.2.5. Пространственная структура белка rSLURP-2.....	84
3.2.6. Моделирование комплексов rSLURP-2 с nAChR.	89
3.3. Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 на пролиферацию раковых клеток.....	92
3.3.1 rSLURP-1 и rSLURP-2 подавляют рост раковых линий эпителиального происхождения	92
3.1.2. Взаимодействие rSLURP-1 с EGFR и $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431...	96
3.1.3. Влияние rSLURP-1 на экспрессию эндогенных белков SLURP-1 и $\alpha 7$ -nAChR в клетках линии A431	100
Заключение	103
Выводы	104
Благодарности.....	105
Список литературы	106

Список сокращений

АХ – ацетилхолин

ДТТ – дитиотреитол

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор

mAChR – мускариновый ацетилхолиновый рецептор

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

AChBP – ацетилхолин-связывающий белок *Lymnaea stagnalis*

GPCR – рецептор, сопряженный с G-белком

VGCC – потенциалчувствительный кальциевый канал

AChE – ацетилхолинэстераза

BChE – бутирилхолинэстераза

VACHT – везикулярный транспортер ацетилхолина

ЦНС – центральная нервная система

LTP – эффект длительной потенциации

LTD – эффект длительной депрессии

CarAT - карнитин-ацетилтрансфераза

ChAT – холин-ацетилтрансфераза

СНТ-1 – высокоаффинный транспортер ацетилхолина 1-го типа

ОСТ – транспортер органических катионов

PDAC – рак поджелудочной железы

Введение

Актуальность работы

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. Рекомбинантный 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. Рекомбинантный 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 эпидермоидной карциномы, 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. SLURP-1 снижает уровень экспрессии гена $\alpha 7$ -nAChR и представление активного рецептора на клеточной мембране.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) - пентамерные лиганд-зависимые ионные каналы, относящиеся к семейству, включающему также серотониновые рецепторы, рецепторы ГАМК А и С типов, глициновые рецепторы [1]. При активации nAChR естественным агонистом ацетилхолином (АХ) происходит открытие канала, проницаемого для катионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} . Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы в организме человека присутствуют в пре- и пост-синаптической мембране в центральной и периферической нервной системе [2], в нейро-мышечных контактах [3], а также – в эпителиальных клетках [4], клетках иммунной системы [5] и в митохондриях [6].

Никотиновые рецепторы участвуют в формировании различных видов кратковременной и долговременной памяти [2]. Эти рецепторы являются мишенями для разработки лекарственных препаратов, направленных на терапию болезни Альцгеймера, шизофрении и эпилепсии [7,8]. Также никотиновые рецепторы контролируют сокращение мышечных волокон [3], воспалительные процессы [9,10] и гомеостаз эпителиальных клеток [11]. Присутствующие в митохондриальной мембране nAChR регулируют через каскад сигнальных киназ начальные события в митохондриальном пути апоптоза [6].

С нарушениями работы холинергических систем связаны некоторые виды мышечной дистрофии [12], нарушения когнитивных функций [13], развитие злокачественных опухолей различного происхождения и локализации [14].

1.1.1 Строение никотиновых рецепторов

С точки зрения структурной организации nAChR представляет собой трансмембранный белок, состоящий из 5 субъединиц (примерно 50-60 кДа

каждая), симметрично расположенных вокруг поры ионного канала [1]. У позвоночных известно 17 различных субъединиц nAChR, которые классифицируют на мышечные ($\beta 1$, $\nu 1$, γ , δ , ϵ) и нейрональные ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$). nAChR могут быть сформированы как в виде гетеропентамера (например, мышечный рецептор $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ или нейрональный рецептор $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ так и в виде гомопентамера, например, $(\alpha 7)_5$ (см. Рис. 1). Разнообразие субъединичных составов nAChR обеспечивает широкий спектр их электрофизиологических и фармакологических свойств, а также – наличие разнообразных механизмов регуляции сборки того или иного типа nAChR в конкретных тканях и типах клеток.

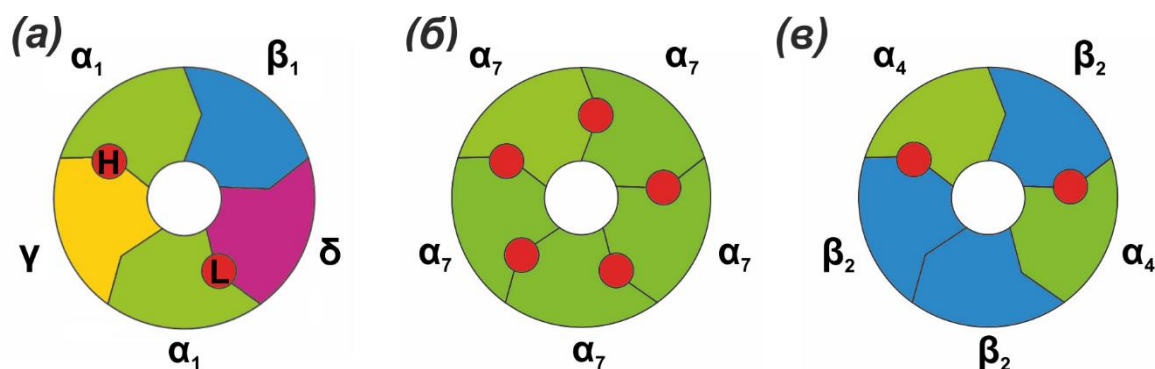


Рис. 1. Субъединичная организация nAChR. (а) – Рецептор мышечного типа $((\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$, эмбриональный), (б) - нейрональный гомопентамерный рецептор $(\alpha 7)_5$, (в)- нейрональный гетеропентамерный рецептор $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$. Кружками показаны сайты связывания АХ. Дополнительно обозначены высоко- (Н) и низкоспецифичные (L) сайты связывания АХ в рецепторе мышечного типа.

Субъединица nAChR состоит из внеклеточного домена, в основном образованного элементами β -структуры; трансмембранного домена, состоящего из 4 α -спиралей M1-M4; внутриклеточного домена, образованного петлей между M3 и M4 и небольшого внеклеточного C-концевого участка (см. Рис. 2а).

Внеклеточный домен содержит сайты связывания ацетилхолина и других лигандов на интерфейсе между двумя субъединицами, причем специфичность конкретного сайта связывания к различным лигандам зависит

как от типа контактирующих субъединиц, так и от порядка их расположения (см. Рис. 1а-1в), т.е. внеклеточный домен каждой субъединицы содержит основную и комплиментарную поверхности, входящие в состав двух различных интерфейсов между субъединицами (см. Рис. 2б). Полноразмерная молекула никотинового рецептора мышечного типа содержит два сайта связывания, расположенные на интерфейсах $\alpha 1L$ - δ и $\alpha 1H$ - γ (см. Рис. 1а), причем эти сайты в мышечном рецепторе отличаются по аффинности к агонистам (L – низкая аффинность, H – высокая аффинность) [15]. В нейрональных рецепторах гетеромерного типа также существует два сайта связывания агониста, однако они не отличаются между собой (см. Рис. 1в). Гомопентамерные нейрональные рецепторы содержат 5 одинаковых сайтов связывания (см. Рис 1б), однако активация/блокирование всех пяти сайтов не является необходимым условием для открытия/закрытия канала рецептора. Так, достаточно связывания всего одной молекулы ортостерического антагониста α -бунгаротоксина с $\alpha 7$ -nAChR, чтобы заблокировать канал рецептора [16], однако при этом не нарушается доступность остальных сайтов для связывания агониста.

Пора ионного канала в трансмембранном домене nAChR формируется аминокислотными остатками спиралей M2, которые окружены кольцом из спиралей M1 и M3 [17]. Открытие канала происходит за счет смещения спиралей M1-M4, вызванного взаимодействием агонистов с внеклеточным доменом рецептора (см. Рис. 3б). Присутствие заряженных остатков в устье канала и гидрофобных остатков в сужении поры (см. Рис. 3а) обеспечивает селективную проницаемость поры для катионов. За счет разнообразия этих ключевых аминокислотных остатков в субъединицах nAChR формируются рецепторы с различным соотношением проводимости для основных переносчиков заряда через канал nAChR – ионов натрия и кальция. Для рецепторов мышечного типа соотношение проводимостей $Ca^{2+}/Na^{+} \sim 0.1$, для гетеромерных нейронального типа ~ 2.0 , для гомопентамерных ~ 10.0 [18].

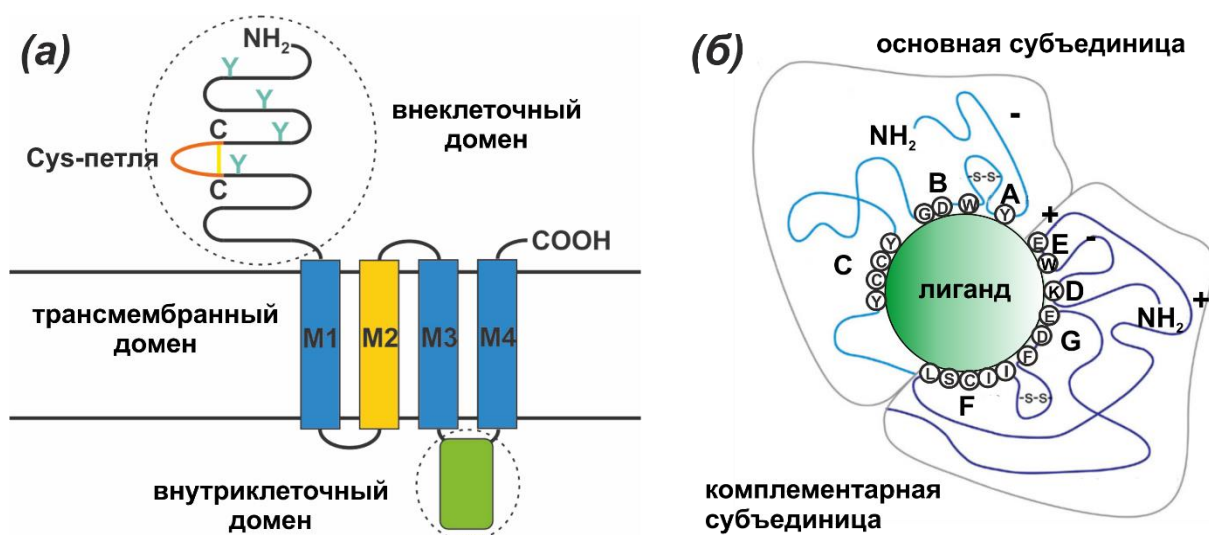


Рис. 2. Схематическое строение субъединицы nAChR. (а) – обобщенная схема строения субъединицы nAChR, символом «Y» показано приблизительное расположение сайтов гликозилирования, желтым цветом отмечена спираль M2, участвующая в формировании ионного канала. Рисунок адаптирован из [1]. (б) – сайт связывания ортостерических лигандов nAChR, сформированный на интерфейсе двух субъединиц, буквами “А”-“F” обозначены петли внеклеточных доменов, участвующие во взаимодействии с лигандом (адаптировано из [15]). Представлен вид со стороны внеклеточного пространства.

Для $\alpha 7$ -nAChR на интерфейсе между спиралями M1 и M3 находится сайт связывания аллостерических модуляторов, которые не вызывают открытия канала сами по себе, но модифицируют ответ канала на воздействие агонистов [17].

Внутриклеточный домен nAChR образован петлями между спиралями M3 и M4 и отличается высокой степенью гетерогенности между различными субъединицами nAChR, хотя для каждого конкретного типа внутриклеточные домены достаточно консервативны в процессе эволюции [19]. Этот домен необходим для сборки функциональных рецепторов из отдельных субъединиц [20], транспорта рецепторов в межклеточные синапсы [21], кластеризации рецепторов мышечного типа в нейро-мышечных синапсах [22], взаимодействия с G-белками в конусе роста нейритов в клетках нейронального происхождения [23].

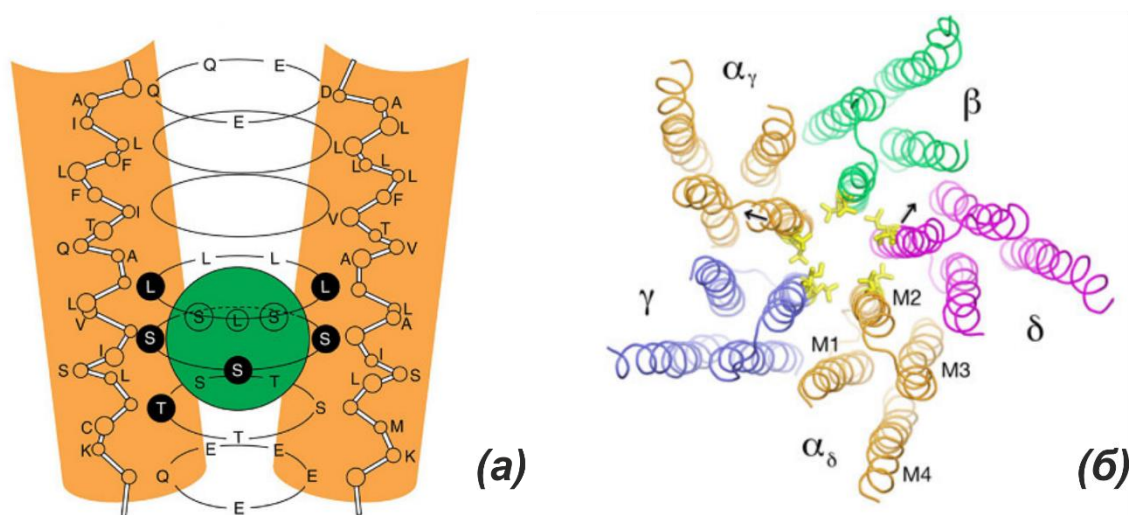


Рис. 3. Структура поры канала nAChR. (а) - формирование поры с селективной проницаемостью для катионов за счет заряженных остатков в устье канала и гидрофобных остатков в его сужении [15]. (б) - согласованное движение спиралей трансмембранного домена при открытии поры nAChR мышечного типа из электрического органа ската *Torpedo californica* [17].

Пространственная структура никотиновых рецепторов долгое время оставалась не изученной из-за того, что эти рецепторы являются мембранными белками, уровень экспрессии которых в большинстве нативных источников недостаточен для исследования методами структурной биологии. В 2001 г. с помощью рентгеноструктурного анализа была получена структура ацетилхолин-связывающего белка (AChBP), выделенного из глиальных тканей моллюска *Lymnaea stagnalis* и представляющего собой структурный гомолог внеклеточных доменов nAChR (степень подобия аминокислотной последовательности AChBP и домена $\alpha 7$ -nAChR 24%, для доменов других nAChR – 20-24%) [24]. В 2011 г. была получена структура водорастворимая химера $\alpha 7$ -AChBP, имеющей 71% гомологии с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR и обладающей функциональной активностью, схожей с активностью полноразмерного рецептора [25]. Эта химер была использована также для определения расположения аллостерических сайтов связывания модуляторов $\alpha 7$ -nAChR [26]. Метод стабилизации внеклеточного домена nAChR в растворе путем замены части

аминокислотных остатков на гомологичные остатки из AChBP также был использован для анализа структуры внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR.

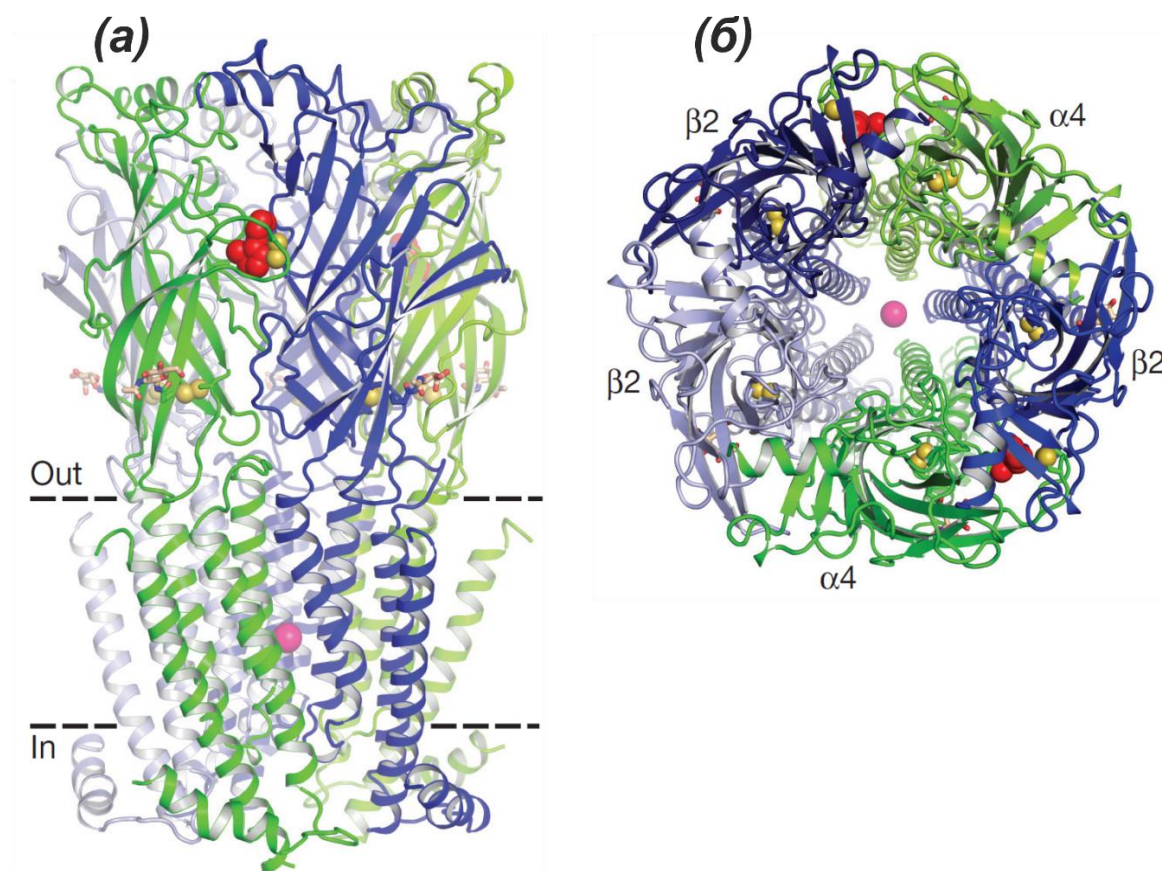


Рис. 4. Пространственная структура полноразмерного нейронального nAChR $\alpha 4\beta 2$ -типа [27]. (а) Вид сбоку; (б) - вид сверху. Субъединицы подписаны на панели (б), положение мембраны показано пунктирной линией.

Первым полноразмерным никотиновым рецептором, для которого была определена пространственная структура (разрешение 4 Å), был мышечный nAChR, выделенный из электрического органа ската *T. californica* [17]. В 2016 г. была определена кристаллическая структура полноразмерного нейронального рецептора $\alpha 4\beta 2$ -типа (разрешение 3.9 Å) (рис. 6) [27]. В 2018 г. методами криоэлектронной микроскопии (разрешение 3.5 Å) были получены структуры полноразмерного рецептора $\alpha 4\beta 2$ разной стехиометрии, что позволило выявить структурные отличия двух изоформ рецептора [28].

1.1.2 Механизм передачи сигнала через никотиновый рецептор.

Для протекания тока через ионный канал никотинового рецептора необходимо связывание двух молекул агониста, например, ацетилхолина или

никотина (см. Рис. 5а). Для никотиновых рецепторов характерно наличие открытого, закрытого и десенситизированного состояний канала. В десенситизированном состоянии возможно связывание агониста с рецептором, однако при этом не происходит открытия канала [15].

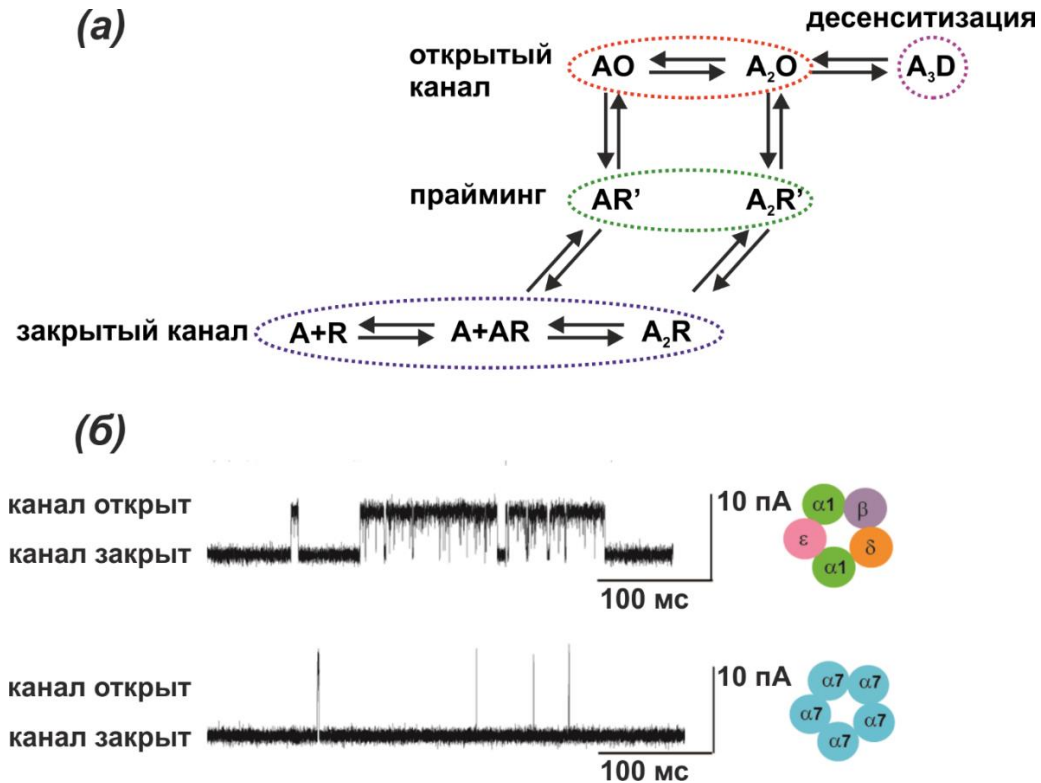


Рис. 5. Связь конформационных состояний рецептора и тока через канал nAChR. (а) Схема переходов между конформационными состояниями рецептора. А – молекула агониста, R – рецептор в закрытом состоянии, R' – «priming» рецептора, O – рецептор в открытом состоянии, D – десенситизированный рецептор (адаптировано из [29]). (б) Сравнение кинетики открытия одиночных каналов nAChR мышечного типа и $\alpha 7$ -типа [30].

Переходы между конформационными состояниями nAChR можно описывать как вероятностные процессы (модель MWC - Monod-Wyman-Changeaux), рассматривая связывание лиганда с рецептором и открытие канала рецептора как независимые события [31]. Дальнейшее развитие этой модели на основе данных об активности одиночных каналов привело к возникновению более сложной кинетической схемы, описывающей не только открытое, закрытое и десенситизированное состояния рецептора, но и состояние прайминга [29,32]. В состоянии прайминга при низких

концентрациях частичного агониста происходит связывание в среднем одной молекулы агониста с рецептором. Это не приводит к открытию канала, но уже вызывает конформационные изменения в рецепторе и повышает чувствительность рецептора при добавлении к ним полного агониста (рис. 5а).

Никотиновый рецептор может десенситизировать в два различных состояния (D1 и D2), что приводит к изменению аффинности к агонисту. Так, для рецептора мышечного типа K_d ацетилхолина в закрытом состоянии составляет 10 мкМ – 1 мМ, в D1 – 1 мкМ, D2 – 3-10 нМ [33]. Скорость наступления десенситизации и время жизни десенситизированного состояния заметно отличаются для различных типов никотиновых рецепторов. Это различие приводит к тому, что в присутствии агониста рецептор мышечного типа успевает до наступления десенситизации множество раз перейти из закрытого состояния в открытое и обратно, в то время как $\alpha 7$ -nAChR практически все время проводит в десенситизированном состоянии, лишь иногда совершая единичные акты открытия канала (Рис. 5б) [30].

Для $\alpha 7$ -nAChR, по некоторым данным, возможна передача сигнала внутрь клетки без протекания тока через канал рецептора [23,34]. В внутриклеточной петле M3-M4 была обнаружена аминокислотная последовательность (а.о. 345-348), гомологичная кластеру связывания G-белков в рецепторах, сопряженных с G-белком (GPCR). Кроме того, гомологичный кластер связывания G-белков был обнаружен в Cys-петельном рецепторе глициновом рецепторе GlyR1. В конусах роста нейритов в клетках PC12 активация $\alpha 7$ -nAChR приводила к активации фосфолипазы C, что в свою очередь приводило к высвобождению вторичного мессенджера инозитолтрифосфата IP3 и выходу кальция из внутриклеточных депо при активации рецепторов IP3. При этом ингибирование $G\alpha_q$ с помощью специфического ингибитора или замена а.о. 345-348 в $\alpha 7$ -nAChR приводило к подавлению активации фосфолипазы C и снижению выхода кальция из внутриклеточных депо при стимуляции рецептора (Рис. 6) [23]. Таким

образом, предполагается, что в некоторых условиях $\alpha 7$ -nAChR может принимать участие в передаче сигнала по метаботропному пути, в результате чего происходит увеличение внутриклеточной концентрации кальция без открытия ионного канала рецептора.

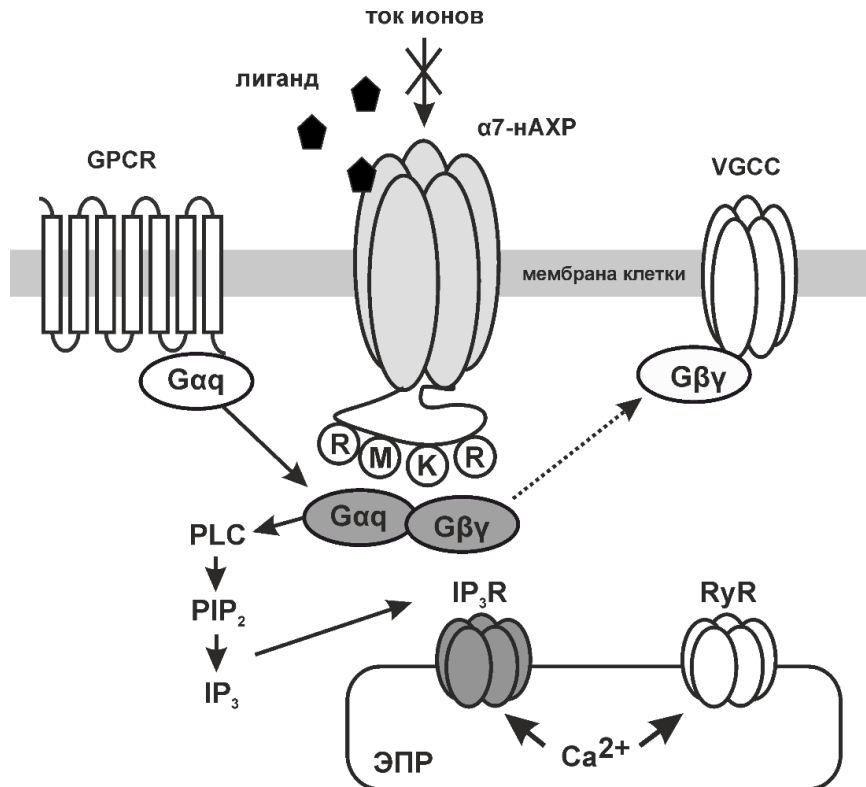


Рис. 6. Метаботропный механизм передачи сигнала через $\alpha 7$ -nAChR. Активация $\alpha 7$ -nAChR приводит к диссоциации комплекса G-белков, взаимодействующего с рецептором через аминокислотный мотив RMKR во внутриклеточной петле M3-M4. Высвобождение Gαq приводит к IP₃-зависимому выходу кальция из внутриклеточных депо, а высвобождение Gβγ – к модуляции потенциал-чувствительных кальциевых каналов (VGCC). Рисунок адаптирован из [23]. GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком, Gαq и Gβγ – субъединицы G-белков, IP₃R – рецепторы инозитолтрифосфата, PIP₂ и IP₃ – формы инозитолфосфата, PLC – фосфолипаза C, RyR – рианодиновые рецепторы, ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

1.1.3 Не-нейрональные холинергические сигнальные системы

Ацетилхолин не только играет роль медиатора в нейро-мышечных синапсах и нервной системе млекопитающих, но и выступает в качестве сигнальной молекулы в не-нейрональных тканях, культурах бактерий, простейших и водорослей [35]. Хотя рецепторы ацетилхолина присутствуют

практически во всех тканях человеческого организма, для полноценного функционирования холинергической сигнальной системы необходимы также компоненты, отвечающие за синтез ацетилхолина, его транспорт и деградацию (Рис. 7), которые будут рассмотрены ниже [36].

Основным механизмом синтеза ацетилхолина в клетках нервной системы и вне ее является перенос холин-ацетилтрансферазой (ChAT) ацетильной группы с молекулы ацетил-кофермента А на молекулу холина, хотя в некоторых случаях (например, в скелетной мускулатуре) эта реакция может осуществляться карнитин-ацетилтрансферазой (CarAT). Скорость синтеза ацетилхолина в клетках лимитируется поступлением холина, который транспортируется внутрь клеток высокоаффинным транспортером холина 1 (СНТ-1) в нервной системе, а вне нервной системы – также гомологами холинового транспортера СТЛ1-5 и транспортером органических катионов ОСТ. Внутри нейрональных клеток ацетилхолин запасается в везикулах с помощью специфического везикулярного транспортера ацетилхолина (VACHT), но этот механизм работает не во всех клетках вне нервной системы. В клетках которые не экспрессируют VACHT секрция ацетилхолина происходит напрямую из цитоплазмы с помощью ОСТ и, предположительно, медиатора [36].

Секретированный ацетилхолин может взаимодействовать с никотиновыми или мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, после чего подвергается гидролизу с помощью внеклеточных ацетилхолинэстеразы (AChE) или бутирилхолинэстеразы (BChE).

1.1.3.1 Холинергическая сигнальная система в легких

Ткани легких содержат как компоненты классической нейрональной холинергической системы (в парасимпатических нервах), так и не-нейрональную холинергическую систему. Активность не-нейрональной системы подтверждается тем фактом, что культуры мелкоклеточного и не-мелкоклеточного рака легкого могут синтезировать ацетилхолин, секретировать его, что приводит к аутокринной регуляции роста клеток через nAChR и mAChR [11]. В отличие от нервной системы, где происходит быстрая секреция больших количеств ацетилхолина за счет везикулярного транспорта, в клетках легочного эпителия секреция ацетилхолина в основном происходит из цитоплазмы через относительно медленные и неселективные транспортеры ОСТ. Скорость и направление транспорта ацетилхолина через ОСТ зависит от градиента концентрации, что делает не-нейрональную холинергическую систему в легких более приспособленной для передачи длительных сигналов небольшой интенсивности.

В клетках реснитчатого эпителия дыхательных путей уровень ChAT повышен в апикальной части клеток, а уровни СНТ и ОСТ повышены в люминальной части клеток, т.е. можно предположить, что ацетилхолин секретировается на поверхность дыхательных путей. Масс-спектрометрический анализ слизистой поверхности трахеи мышей непосредственно подтвердил секрецию ацетилхолина [11]. Таким образом, тонкий жидкостный слой, покрывающий эпителиальные клетки, может служить транспортной средой для ацетилхолина, участвующего в процессах аутокринной и паракринной передаче сигналов. Предположительно, эти сигналы могут быть адресованы клеткам иммунной системы в легких, некоторые из которых (альвеолярные макрофаги) могут перемещаться по поверхности легочного эпителия в слое жидкости, содержащей секретированный ацетилхолин.

1.1.3.2 Холинергические механизмы в иммунной системе

Связь между холинергической передачей сигналов и иммунной системой была впервые продемонстрирована на примере электрической стимуляции блуждающего нерва, которая приводила к выделению значительных количеств ацетилхолина в селезенке [37]. Позднее было установлено, что в основных органах иммунной системы существуют нервные окончания, локализованные около мест скопления В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов и макрофагов и идущие из ствола мозга и периферических нервных узлов и, таким образом, автономная нервная система может принимать участие в регуляции воспалительных процессов [38]. В лимфоцитах на уровне мРНК обнаружены $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединицы nAChR [39].

В отличие от холинергических механизмов в нервной системе и в нейромышечных контактах, для клеток иммунной системы не характерно присутствие компонентов везикулярной системы транспорта ацетилхолина, что делает невозможным быструю передачу холинергического сигнала.

Холинергическая компонента передачи сигнала присутствует в финальной стадии воспалительного рефлекса (Рис. 8), в котором афферентные нейроны активируются экзогенными и эндогенными продуктами воспаления, что, в свою очередь приводит к передаче эфферентных сигналов через блуждающий нерв в селезенку, где адренергические нейроны стимулируют Т-лимфоциты, способные секретировать ацетилхолин. Секреция АХ в селезенке может активировать $\alpha 7$ -nAChR на макрофагах, что приводит к ингибированию фактора NF κ B и подавляет секрецию провоспалительного цитокина HMGB1 [40]. Стимуляция nAChR в Т-лимфоцитах также может подавлять секрецию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1, IL-18 [41]. Нарушения данного механизма приводят к развитию хронических воспалительных реакций [5]. Например, у мышей, нокаутных по гену, кодирующему субъединицу $\alpha 7$ nAChR (CHRNA7), наблюдался повышенный уровень антител в ответ на

иммунизацию овалбумином и повышенный уровень провоспалительных цитокинов $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-6 [42].

Выделение клетками иммунной системы ацетилхолина может использоваться для аутокринной передачи сигнала: так, в Т-клетках лейкемии MOLT-3 и клетках мышинной селезенки в внеклеточное пространство выделяется достаточное количество ацетилхолина, чтобы стимулировать никотиновые рецепторы на поверхности этих клеток, что приводило к повышению уровня экспрессии и релиза IL-2 [43].

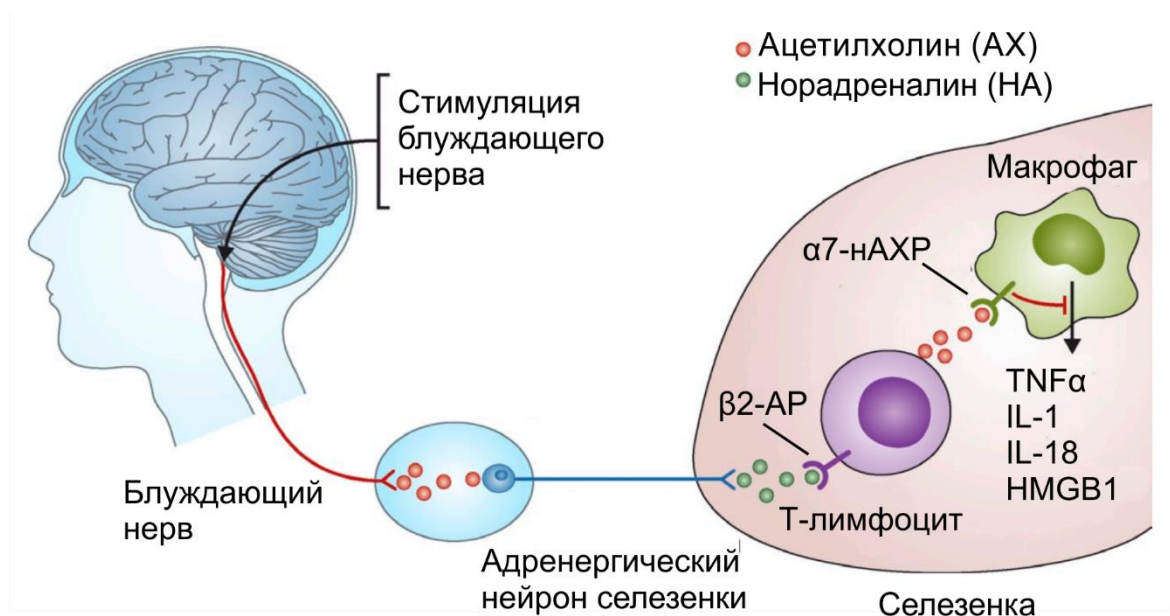


Рис. 8. Участие холинергической сигнальной системы в воспалительном рефлексе. Пример рефлекторной цепи, регулирующей воспалительный процесс, которая состоит из афферентных и эфферентных сигналов, передаваемых через блуждающий нерв в ответ на молекулярные маркеры инфекций и повреждений. Активация адренергических нейронов в селезенке приводит к релизу норадреналина в непосредственной близости от Т-клеток, которые способны секретировать ацетилхолин. Ацетилхолин взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR на поверхности макрофагов, что ингибирует синтез и релиз $\text{TNF}\alpha$, IL-1 , IL-18 , HMGB1 и других цитокинов (рисунок адаптирован из [38]).

Таким образом, холинергическая система принимает участие в регуляции работы иммунной системы наравне с цитокинами.

1.1.3.3 Холинергическая регуляция гомеостаза клеток эпителия

Эпителиальные ткани организма выполняют барьерные, секреторные и сенсорные функции, передача внутри- и межклеточных сигналов посредством адренергической и холинергической систем играет важную роль в поддержании их гомеостаза (в т.ч. пролиферации, миграции, дифференцировки и апоптоза) [4]. Клетки эпидермиса экспрессируют различные типы nAChR: в клетках базального слоя обнаружены $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\beta 2$ и $\beta 4$ -субъединицы nAChR, в клетках шипикового и зернистого слоев – $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 4$ -субъединицы (Рис. 9а). В роговом слое эпидермиса в основном присутствуют $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ и $\beta 1$ -субъединицы nAChR [44,45]. Известно, что ингибирование $\alpha 7$ -nAChR приводит к остановке миграции кератиноцитов [46], а ингибирование экспрессии $\alpha 3$ - и $\alpha 9$ -субъединиц nAChR и mAChR M3-типа, наоборот, способствует откреплению кератиноцитов от базальной мембраны [47].

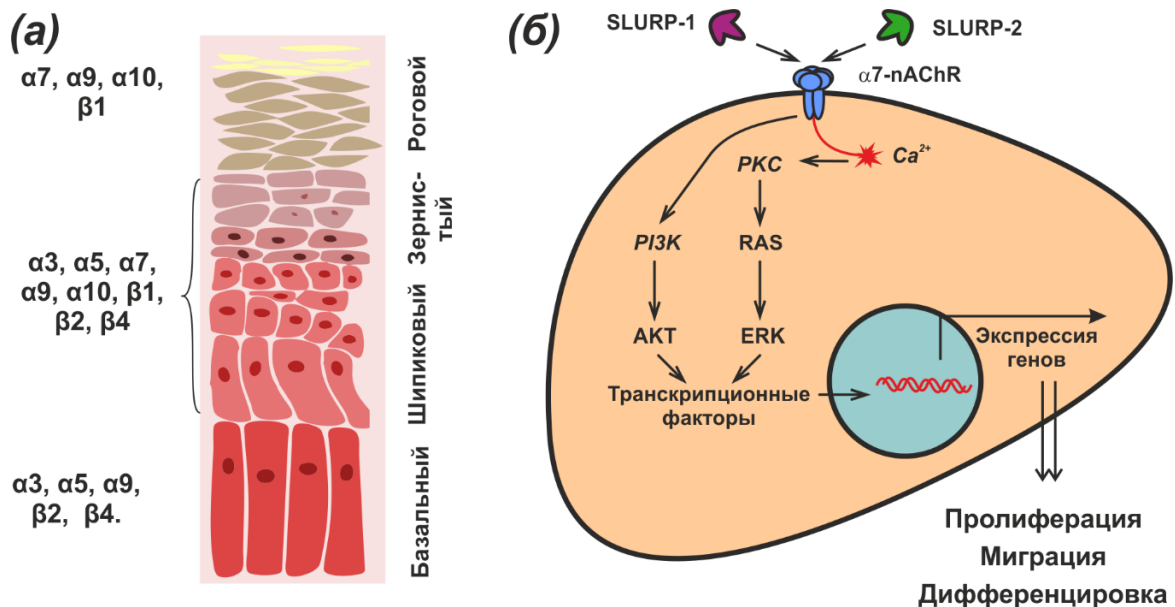


Рис. 9. Влияние nAChR на физиологию клеток эпителия. (а). Экспрессия различных типов nAChR в слоях эпидермиса. (б). Молекулярные механизмы регуляции физиологии кератиноцитов с участием nAChR. Основными вторичными мессенджерами nAChR являются PI3K/АКТ сигнальный путь и киназный каскад, включающий в себя PKC, RAS и ERK [14,48,49]. АКТ – серин/треониновая протеинкиназа Рас- α , ERK – внеклеточные регулируемые сигналом киназы, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, PKC – протеинкиназа C, RAS – малые GTP-азы, SLURP1/2 – Секретируемые белки из семейства Lu-6/uPAR.

$\alpha 7$ -nAChR играет важную регуляторную роль также и в дифференцировке клеток эпидермиса: ингибирование передачи сигнала через этот рецептор приводит к остановке дифференцировки кератиноцитов, но в то же время способствует делению клеток [50]. Наконец, на поздних стадиях развития клеток кожи активация $\alpha 7$ - и $\alpha 9$ -содержащих nAChR и ингибирование mAChR приводят к апоптозу кератиноцитов, что сопровождается увеличением секреции АХ [51]. Холинергическая система играет также важную роль в проявлении реакции кератиноцитов на стресс, индуцированный механическими повреждениями или инфекцией. Так, показано, что при инфекции, активация $\alpha 7$ -nAChR подавляет экспрессию антимикробных пептидов кератиноцитами [52]. Обобщенная схема влияния nAChR на физиологию кератиноцитов приведена на Рис. 9б.

Предполагается, что холинергическая регуляция гомеостаза эпителия осуществляется посредством как ионотропного (в результате открытия канала и возникновения тока ионов кальция через мембрану клетки), так и метаботропного (активация внутриклеточных сигнальных каскадов без открытия канала рецептора) путей передачи сигналов через nAChR. Вторичными мессенджерами последнего являются PI3K/АКТ-сигнальный путь [46] и киназный каскад, включающий в себя протеинкиназу С и киназы RAS и ERK [53].

1.1.3.4 Никотиновые рецепторы ацетилхолина в развитии опухолей

Существуют многочисленные данные, говорящие в пользу того, что курение табака способствует развитию опухолей различной локализации и происхождения [17]. Активация $\alpha 7$ -nAChR никотином и его производными - нитрозаминами (NNK и NNN), также содержащимися в табачном дыме, является одним из предполагаемых механизмов образования опухолей [14]. Активация $\alpha 7$ -nAChR приводит к выделению эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и норадреналина, которые соответственно стимулируют рецепторы EGFR, VEGFR и β -

адренорецепторы, активируя митогенные и антиапоптотические сигнальные пути в опухолевых клетках [14]. Показано, что продолжительное воздействие никотина на кератиноциты может приводить к увеличению экспрессии $\alpha 5$ - и $\alpha 7$ -содержащих nAChR, таким образом дополнительно увеличивая ответ на стимуляцию никотином [54].

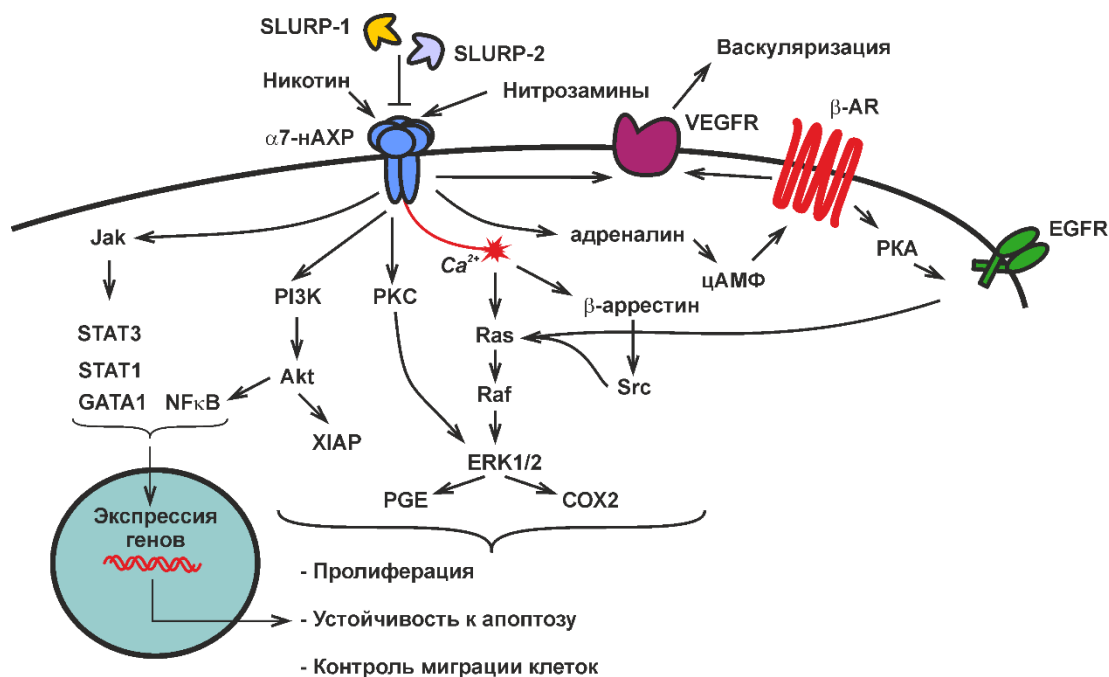


Рис. 10. Роль $\alpha 7$ -nAChR в развитии и прогрессии злокачественных неоплазий. Активация $\alpha 7$ -nAChR увеличивает чувствительность опухолевых клеток к никотину и может стимулировать передачу сигналов через рецепторы факторов роста, запуская митогенные и антиапоптотические сигнальные пути в клетках. Активация $\alpha 7$ -nAChR также вызывает секрецию проонкогенных нейромедиаторов и контролирует миграцию опухолевых клеток. Воздействие эндогенных ингибиторов nAChR может снизить онкогенные эффекты, возникающие при активации $\alpha 7$ -nAChR [105]. АКТ – серин/треониновая протеинкиназа, β -АР – β -адренорецепторы, сАМФ – циклоаденозинмонофосфат, COX2 – циклооксигеназа 2, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, ERK – внеклеточные регулируемые сигналом киназы, Jak – Янус-киназа, NF κ B – ядерный фактор «каппа-би», PGE – простагландин E, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, PKA – протеинкиназа A, PKC – протеинкиназа C, RAF – серин-треониновая протеинкиназа (RAF - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), RAS – малые GTP-азы, SLURP1/2 – Секретируемые белки из семейства Ly-6/uPAR, Src – киназа семейства SFK, STAT – передатчик сигнала и активатор транскрипции, VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов, XIAP – X-связанный ингибитор терминальных каспаз.

Стимуляция nAChR в опухолевых клетках приводит к увеличению концентрации внутриклеточного кальция, что активирует сигнальные пути с участием киназ ERK, Src, PKC, JAK2, а также β -аррестина и транскрипционных факторов NF κ B, GATA3, STAT1 и STAT3 [48,55,56]. Данные сигнальные пути стимулируют прохождение клеток через контрольные точки (checkpoint) клеточных циклов, повышают пролиферацию, стимулируют выработку антиапоптотических белков, в т.ч. подавляющий апоптоз ингибитор каспазной активности XIAP [49]. Таким образом, при активации nAChR никотином и нитрозаминами в опухолевых клетках усиливается пролиферация и вырабатывается устойчивость к апоптозу (рис. 10).

nAChR участвуют не только в развитии солидных опухолей, но и в развитии лейкоemий. АХ, секретируемый злокачественно трансформированными Т-лимфоцитами, может служить аутокринным фактором роста и регулировать пролиферацию клеток лейкоemии посредством изменения кальциевой динамики в клетках. Кроме того, в Т-клетках лейкоemии значительно снижена активность ацетилхолинэстеразы, что дополнительно усиливает сигналы АХ. Однако, в целом, считается, что большую роль в развитии лейкоemий играют не nAChR, а mAChR [57].

nAChR контролируют не только пролиферацию опухолевых клеток, но и их миграцию, а значит – способность опухолей к метастазированию. Стимуляция $\alpha 7$ -nAChR никотином вызывает эпителиально-мезенхимальный переход и миграцию клеток различных опухолевых линий [58]. Нокдаун гена $\alpha 7$ -nAChR в ассоциированных с опухолью макрофагах усиливает миграцию клеток колоректальных карцином, а нокдаун гена $\alpha 3$ -nAChR усиливает миграцию клеток опухоли пищевода [59]. Вероятно, nAChR не только напрямую регулируют подвижность опухолевых клеток, но и обеспечивают регуляцию подвижности клеток опухоли макрофагами. Воздействие никотина может активировать миграцию через различные сигнальные пути: миграция клеток карциномы толстой кишки опосредуется активацией MAP

киназы p38 [60], а метастазирование клеток рака кишечника в макрофагах запускается сигнальным путем JAK2/STAT3 [61].

Рост новых сосудов (ангиогенез) необходим для снабжения быстро делящейся опухолевой массы кислородом и ростовыми факторами и, в конечном итоге, приводит к выходу открепившихся опухолевых клеток в просвет сосудов и метастазированию в различные органы. Было показано, что никотин усиливает рост сосудов в опухоли желудка *in vivo* посредством активации ERK1/2, циклооксигеназы-2 (COX-2) [62] и простагландина E [63].

1.2. Трехпетельные белки семейства Ly-6/uPAR

Трехпетельные белки в рамках единого структурного мотива выполняют разнообразные функции, выступая в качестве токсинов, участвуя в процессах пролиферации и миграции клеток, межклеточных взаимодействиях, созревании иммунных клеток, активации макрофагов и продукции цитокинов [64].

Семейство трехпетельных белков получило название Ly-6/uPAR благодаря двум представителям - лимфоцитарному антигену-6 (Ly6) и рецептору активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR). Белки этого семейства характеризуются наличием LU доменов из 60-90 аминокислот, имеющих трехпетельную структуру, аналогичную структуре α -нейротоксинов ядов змей. LU домен включает в себя β -структурное ядро, из 2-х β -листов, стабилизированное системой четырех инвариантных дисульфидных связей и три протяженные петли. Вариабельность петлевых участков и обуславливает функциональное многообразие Ly6/uPAR белков. Петлевые участки также могут содержать дополнительные дисульфидные связи.

Большинство белков семейства Ly-6/uPAR содержат один LU-домен, за исключением LYPD3 и CD177 (два LU-домена) и uPAR (три LU-домена). Белки данного семейства также можно классифицировать по локализации – большая часть белков семейства присоединена к мембране с помощью GPI-

якоря, однако существуют секретируемые белки (SLURP-1, SLURP-2, группа белков PATE), а также белки, присутствующие в организме как в связанном с мембраной, так и в растворимом состоянии (uPAR) [65].

Белки Ly-6/uPAR с GPI-якорем не обладают цитоплазматическим доменом и поэтому не могут непосредственно принимать участие во внутриклеточных сигнальных каскадах, но они могут взаимодействовать с другими трансмембранными белками. Такие взаимодействия могут дополнительно стимулироваться за счет преимущественной локализации белков с GPI-якорем в липидных рафтах, где также повышена концентрация других сигнальных молекул [66]. Растворимые белки семейства Ly-6/uPAR как напрямую модулировать функцию трансмембранных рецепторов, так и конкурентно связывать лиганды, тем самым изменяя уровень активации рецепторов.

1.2.1 Трехпетельные нейротоксины из яда змей

Нейротоксины – наиболее широко изученный подкласс трехпетельных белков. Структура этих токсинов имеет компактное гидрофобное ядро, стабилизированное 4-5 дисульфидными связями и три «петли», выступающих из него [67].

Трехпетельные нейротоксины из яда змей можно разделить на три класса: короткие α -нейротоксины (60-62 а.о., 4 дисульфидные связи), длинные α -нейротоксины (66-75 а.о., 5 дисульфидных связей, дополнительный дисульфид в центральной петле) и «необычные» нейротоксины (62-68 а.о., 5 дисульфидных связей, дополнительный дисульфид в первой, N-концевой петле) (Рис. 11) [68].

С мышечными nAChR взаимодействуют короткие и длинные α -нейротоксины, но с нейрональными $\alpha 7$ -nAChR способны взаимодействовать только длинные нейротоксины [69]. Основным элементом α -нейротоксинов, отвечающим за взаимодействие с nAChR является центральная петля, а пятая дисульфидная связь на конце петли необходима для взаимодействия с $\alpha 7$

nAChR [70]. Для α -бунгаротоксина (α -Bgtx) известна структура комплекса с лиганд-связывающим доменами nAChR, показавшая, что центральная петля токсина может блокировать ортостерический сайт на рецепторе [71].

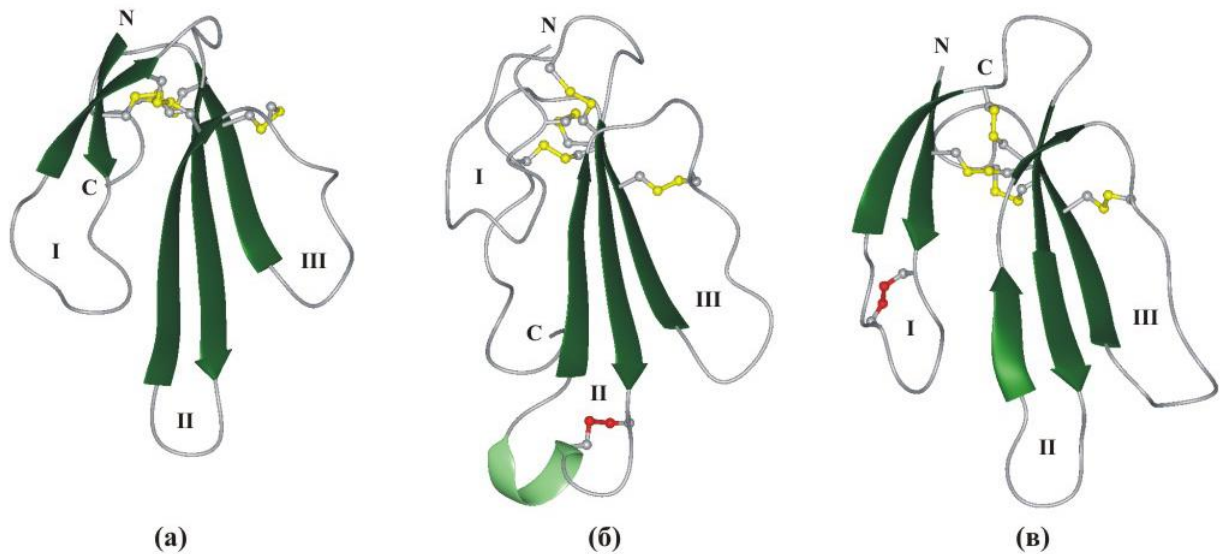


Рис. 11. Пространственные структуры α -нейротоксинов в ленточном представлении. (а) – короткий нейротоксин II из *Naja oxiana*, (б) – длинный α -кобротоксин из *Naja siamensis*, (в) – слабый токсин кандоксин *Bungarus candidus*. Желто-серыми линиями показаны консервативные дисульфидные связи, красно-серыми линиями – дополнительная дисульфидная связь длинных слабых нейротоксинов. Петли пронумерованы римскими цифрами.

1.2.2 Белки Ly-6/uPAR с GPI-якорем у млекопитающих

Белки Ly-6/uPAR не содержат трансмембранного домена, они могут прикрепляться к клеточной мембране с помощью GPI-якоря, присоединяющегося к С-концу белка в процессе посттрансляционной модификации. GPI якорь присутствует у регуляторного белка системы комплемента (CD59), антигена Т- и В-лимфоцитов (Ly-6), рецептора урокиназного активатора плазминогена (urokinase plasminogen activator receptor, uPAR) и многих других трехпетельных белков [64]. Большинство этих белков содержат по одному трехпетельному домену, за исключением LYPD3 и CD177 (по 2 трехпетельных домена), а также uPAR (3 трехпетельных домена).

Как для белков семейства Ly-6/uPAR, так и для нейротоксинов характерно наличие 8 консервативных остатков цистеина, формирующих 4 дисульфидные связи, стабилизирующие структурное ядро молекулы (Рис. 12).

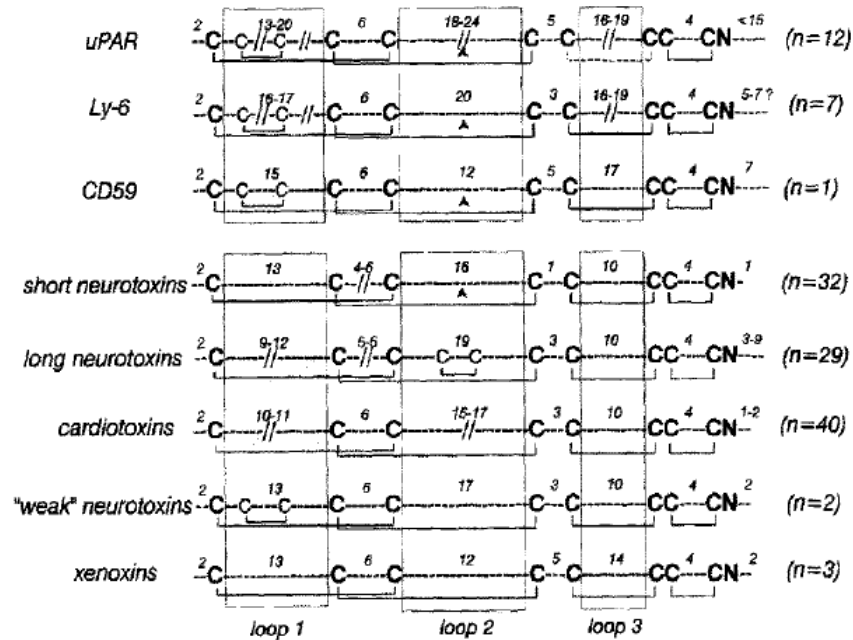


Рис. 12. Выравнивание последовательностей семейства Ly-6/uPAR и нейротоксинов яда змей. На верхней панели показано выравнивание последовательностей отдельных доменов мембранных гликопротеинов семейства Ly-6/uPAR. На нижней панели – аналогичные схемы для секретируемых однодоменных представителей семейства. Показаны расстояния между консервативными цистеинами. В скобках указано количество последовательностей, определяющих каждую группу. Более того, неконсервативные пары цистеинов, найденные во всех мембранных гликопротеинах, а также в длинных и необычных нейротоксинах, находятся далеко от гидрофобного ядра молекулы. Стрелками указаны известные области, соответствующие расположению интронов в генах [72].

До недавнего времени из группы гликопротеинов Ly-6/uPAR только CD59 был изучен на структурном уровне, и его система дисульфидных связей совпадает с системой дисульфидных связей отдельного домена uPAR и «необычных» нейротоксинов. Также, полученные КД-спектры и данные ЯМР-исследования CD59 показывают, что его пространственная структура

похожа на структуры α -нейротоксинов, в частности, белок имеет β -структуру [5].

1.2.3. SLURP-1 – аминокислотная последовательность и процессинг

Белок SLURP-1 (secreted mammalian Ly-6/uPAR related protein 1) впервые был выделен из человеческой мочи и плазмы крови и стал первым секретируемым представителем семейства Ly-6/uPAR [73]. SLURP-1 кодируется локусом ARS (component B)-81/s. Ген SLURP-1 человека расположен на хромосоме 8q24-8qter, как и гены других представителей Ly-6/uPAR млекопитающих, за исключением белка CD59 [73].

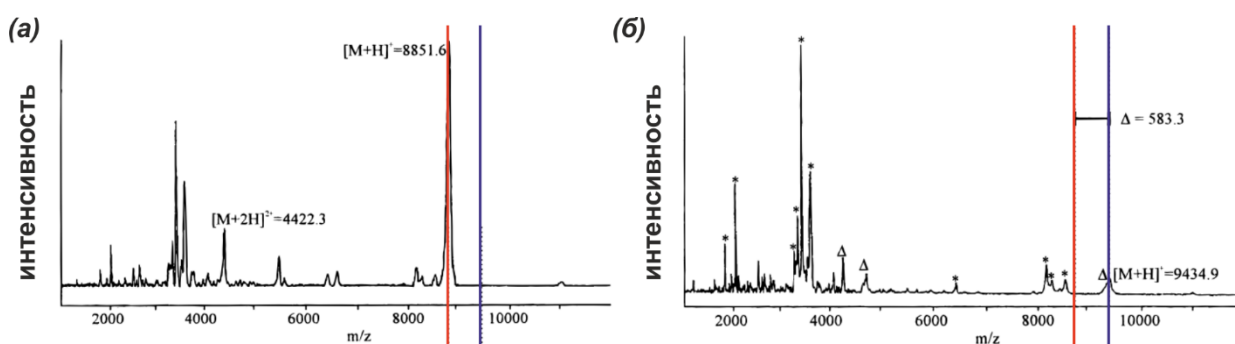


Рис.13. MALDI-MS анализ фракции плазмы крови человека. (а) исходный образец. (б) после восстановления ДТТ и последующего карбоксамидометилирования. На б знаком «*» помечены несмещенные пики, соответствующие пептидам без цистеинов, восстанавливаемых ДТТ. Компоненты, содержащие дисульфидные связи, отмечены «Δ». Красным показан пик SLURP-1 до карбоксамидометилирования, синим – после [73].

Сравнение масс-спектров до и после S-карбоксамидометилирования (Рис. 13) показало, что пик, соответствующий SLURP-1 (8.851 кДа), сдвинулся на 583 Да, что соответствует 10-кратному карбоксамидометилированию белка [73]. Следовательно, молекула SLURP-1 содержит 10 цистеинов. При обработке образца йодацетамидом без ДТТ соответствующий пик не сместился, что значит, что все остатки цистеинов участвуют в образовании дисульфидных связей [73]. Аминокислотная последовательность SLURP-1 была определена de novo с помощью расщепления различными протеазами и LC-MS (Рис. 14а). Порядок замыкания связей в белке был исследован с помощью MS-анализа фрагментов протеолиза при сохранении

дисульфидных связей и частичного секвенирования полученных фрагментов по Эдману (Рис. 14б-в). Полученные данные о системе дисульфидных связей SLURP-1 полностью соответствовали данным о структуре других белков семейства Ly-6/uPAR (Рис. 15).

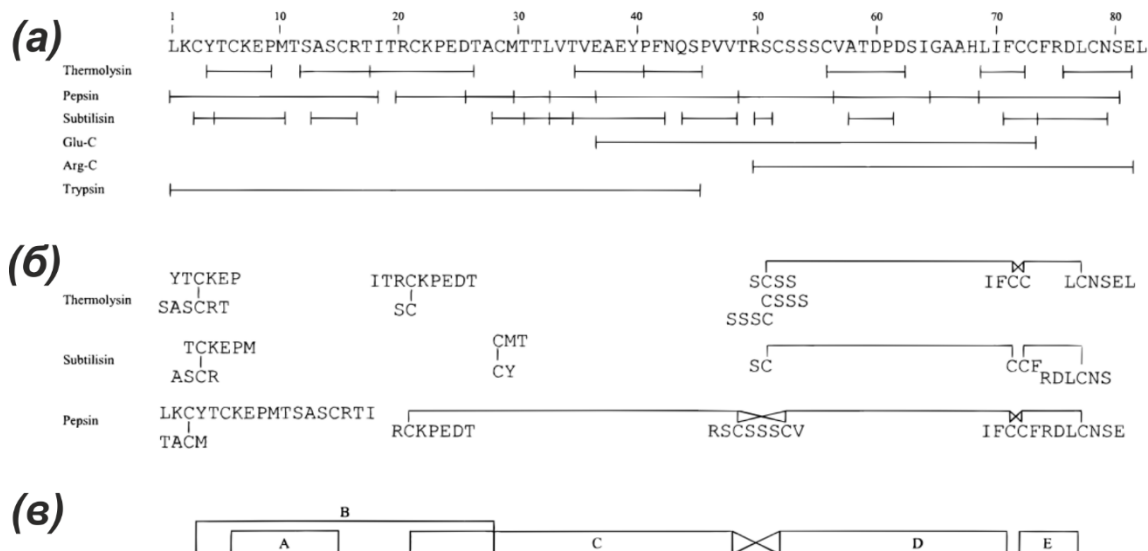


Рис. 14. Определение аминокислотной последовательности и порядка замыкания дисульфидных связей нативного SLURP-1. (а) Аминокислотная последовательность, определенная из перекрывания пептидных фрагментов, полученных в результате протеолитического расщепления. (б) Дисульфидно-связанные фрагменты, полученные в результате неспецифического протеолиза пепсином, термолизином и субтилизином. Для третьего термолизинового фрагмента нельзя определить последовательность: SCSS, CSSS или SSSC. (в) Схема определенных дисульфидных связей [73].

Был проведен филогенетический анализ белка SLURP-1, основанный на последовательностях, общих для семейства Ly-6/uPAR. По результатам применения алгоритма линейного выравнивания Clustal, белок SLURP-1 филогенетически оказался ближе к α -нейротоксинам ядов змей, чем к GPI-заякоренным трехпетельным белкам млекопитающих, что говорит в пользу гипотезы о родстве этих двух подсемейств [73].

Модель пространственной структуры человеческого и мышиногo SLURP-1 была построена на основе их известных аминокислотных последовательностей, а также с использованием пространственной структуры белка CD59 системы комплемента, гомологичного SLURP-1 (Рис.

19). Координаты атомов в CD59 были получены методом ЯМР. Моделирование показало, что SLURP-1, вероятно, является дипольным белком с трехпальцевой структурой [74].

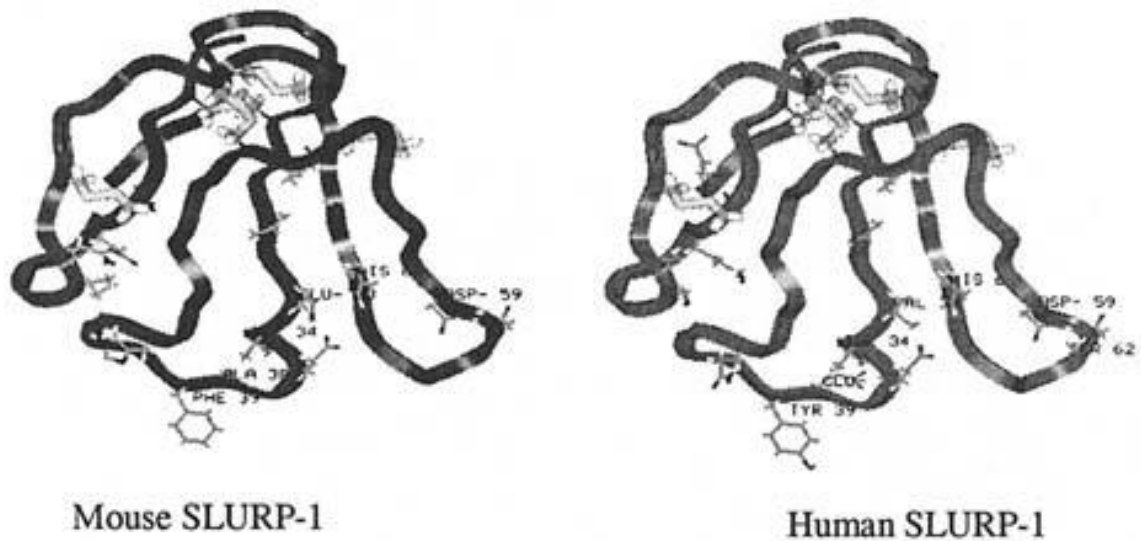


Рис. 15. Модели трехпетельной структуры мышиноного и человеческого SLURP-1, построенные на основе гомологии с белком CD59 [74].

Было доказано, что секреция SLURP-1 происходит за счет отщепления *N*-концевого сигнального пептида. Был изготовлен рекомбинантный белок SLURP-1 с дополнительной *N*-концевой последовательностью в виде гемагглютиниона (НА) и дополнительной *C*-концевой последовательностью в виде белка Мус. Молекулы SLURP-1 были обнаружены в культуральной среде через 48 часов с помощью иммуноблоттинга с анти-Мус антителами. Отсутствие белка с НА на *N*-конце свидетельствовало об отщеплении *N*-концевого пептида при секреции (Рис. 16) [75].

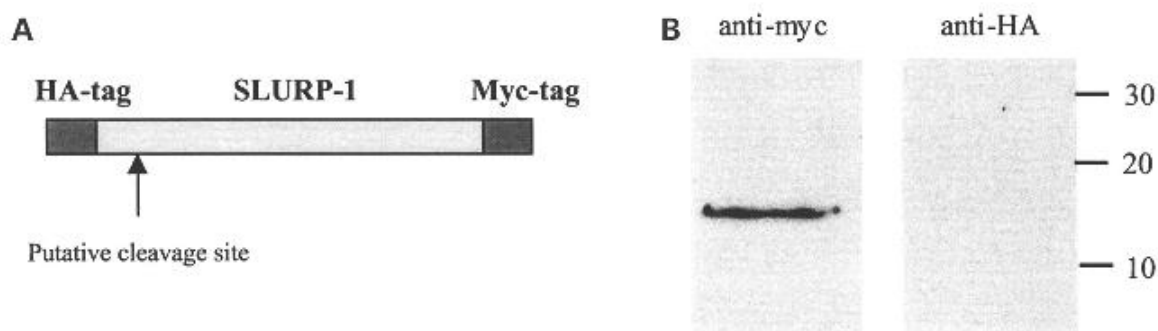


Рис. 16. SLURP-1 – не гликозилированный белок, у которого отщепляется сигнальный пептид в процессе секреции. (А) Конструкция SLURP-1 с N-концевым HA-доменом и C-концевым мус-доменом. (В) Культуральная жидкость была собрана через 48 часов после трансфекции и проведен анализ с помощью иммуноблоттинга с использованием анти-HA и анти-мус антител. Присутствие мус-домена и отсутствие HA в культуральной жидкости говорит в пользу версии, что сигнальная последовательность отщепляется во время секреции [75].

1.2.4. Взаимодействие рекомбинантных аналогов SLURP-1 с nAChR.

Взаимодействие белка SLURP-1 с никотиновыми рецепторами было исследовано в эксперименте по конкурентному связыванию [^3H]-никотина и [^3H]-эпibatидин (высокоаффинный агонист $\alpha 4\beta 2$ -nAChR с $K_i \sim 0.02$ нМ) с нормальными человеческими кератиноцитами, полученными из неонатальных образцов крайней плоти [76]. Рекомбинантный аналог SLURP-1 был получен экспрессией в *E. coli* в виде единой полипептидной конструкции с белком SUMO и His₆-тагом с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии и отщеплением белка-партнера SUMO-протеазой. Следует отметить, что авторами не предоставлены данные, подтверждающие полноту и однородность характера замыкания дисульфидных связей в препарате, что является важной характеристикой нативной структуры SLURP-1.

В результате эксперимента по конкурентному связыванию (Рис. 17) было установлено, что рекомбинантный аналог SLURP-1 вытесняет никотин с EC_{50} 28 нМ и эпibatидин – с EC_{50} 2,2 мкМ [76]. Эти результаты могут свидетельствовать в пользу наличия на кератиноцитах высокоаффинных

сайтов связывания данного аналога рекомбинантного SLURP-1, причем эти сайты связывания не принадлежат $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, т.к. никотин связывается неспецифически с любыми nAChR, а эпibatидин – специфически с $\alpha 4\beta 2$ -nAChR.

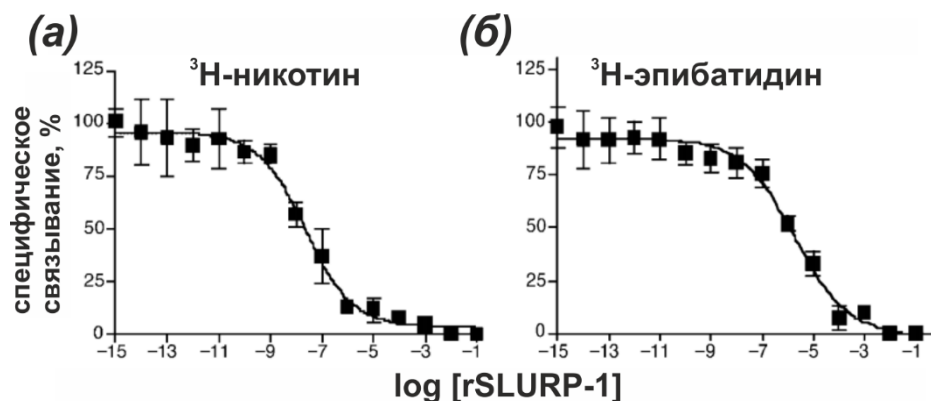


Рис. 17. Конкуренция рекомбинантного аналога SLURP-1 (а) с никотином (EC_{50} 28 нМ) и эпibatидином (EC_{50} 2,2 мкМ) за связывание с нормальными кератиноцитами человека [76].

Влияние другого рекомбинантного аналога SLURP-1 (белок с Мус- и His6-тагами, экспрессированный в культуре клеток HEK293) на функцию канала $\alpha 7$ -nAChR было исследовано в ооцитах *X. laevis* [75]. Данный рекомбинантный аналог SLURP-1 увеличивал амплитуду токов, вызванных аппликацией ацетилхолина (Рис. 18), причем эффект увеличения токов был обратимый и концентрационно-зависимый, т.е. мог быть обусловлен именно связыванием рекомбинантного аналога SLURP-1 с рецептором. Аппликация рекомбинантного аналога SLURP-1 без ацетилхолина не вызывала тока ни при каких концентрациях, т.е. данный белок действовал как позитивный аллостерический модулятор, а не как агонист. Следует отметить, что в данной работе использован N-концевой Мус-tag, имеющий существенный отрицательный заряд (заряд тага -3, заряд трехпетельного домена -2), что могло влиять на активность рекомбинантного белка в отношении исследуемого рецептора.

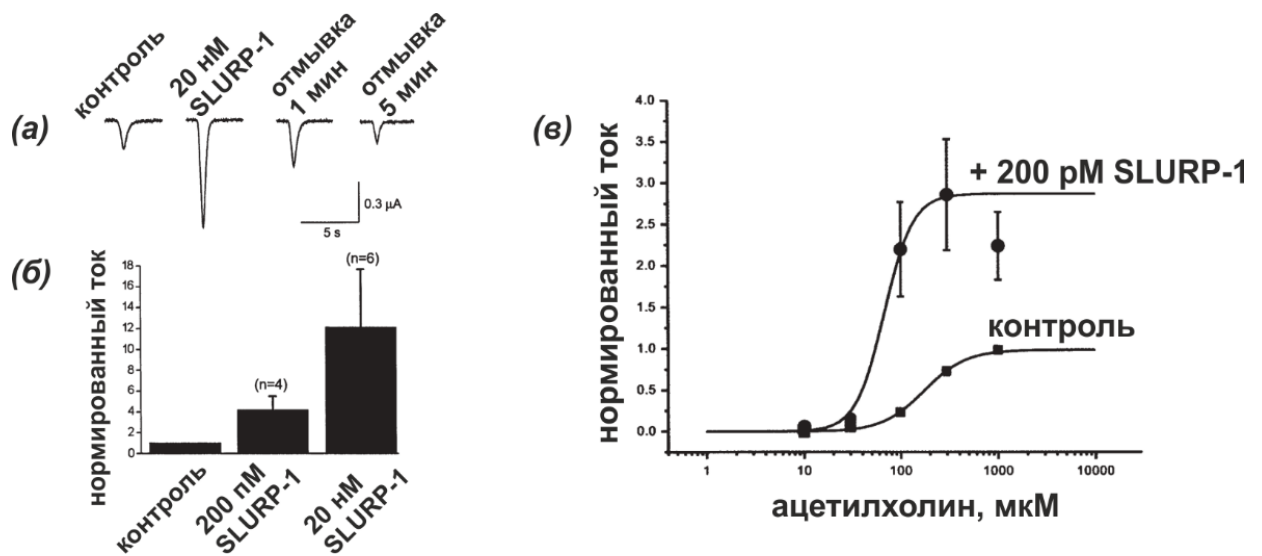


Рис. 18. Действие рекомбинантного аналога SLURP-1 с Мус-тагом на $\alpha 7$ -nAChR в ооцитах *X. laevis*. (а) Примеры ответов на стимуляцию 2с 100 мкМ АХ до и после 5-минутной обработки 20 нМ рекомбинантного аналога SLURP-1. (б) Эффект рекомбинантного аналога SLURP-1 зависит от концентрации, стимуляция 200 мкМ АХ. (в) Кривая чувствительности к агонисту в контроле ($EC_{50} = 178$ мкМ) и при обработке 2,5 мин 200 пМ SLURP-1 ($EC_{50} = 68$ мкМ) [75].

1.2.5. Участие SLURP-1 и SLURP-2 в регуляции пролиферации и воспалительных процессов

Мутация гена ARS B, кодирующего SLURP-1, приводит к заболеванию Mal de Meleda (MdM) [73–75]. Это аутосомно-рецессивное кожное расстройство, характеризующееся обширным воспалением и патологическим изменением структуры кожных покровов. Это свидетельствует о том, что белок SLURP-1 может быть вовлечен в поддержание гомеостаза клеток кожи, кератиноцитов. Экспрессия SLURP-1 была обнаружена в различных тканях эпителиального происхождения, в т.ч. в кератиноцитах *stratum corneum* эпидермиса [74]. Также, с помощью ELISA, присутствие SLURP-1 было обнаружено в плазме крови человека и в культуральной среде первичных культур нормальных кератиноцитов.

Рекомбинантный аналог белка SLURP-1 был способен контролировать апоптоз в нормальных кератиноцитах, вызывая активацию каспаз 3 и 8 [76]. На культуре immortalized кератиноцитов Het-1A было показано, что

белок SLURP-1 может регулировать пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов, предположительно, с участием $\alpha 7$ -nAChR [77]. В дальнейшем было показано, что воздействие SLURP-1 на кератиноциты происходит с не-ионотропной активацией сигнального каскада Ras/Raf-1/MEK/ERK с участием киназы Ras/Raf-1/MEK/ERK и Ca^{2+} опосредованной активации того же сигнального каскада с участием CaMKII/PKC [77], см. Рис. 19. В результате происходило увеличение экспрессии транскрипционного фактора NF- κ B, который регулирует воспалительные и пролиферативные процессы, а также дифференцировку клеток.

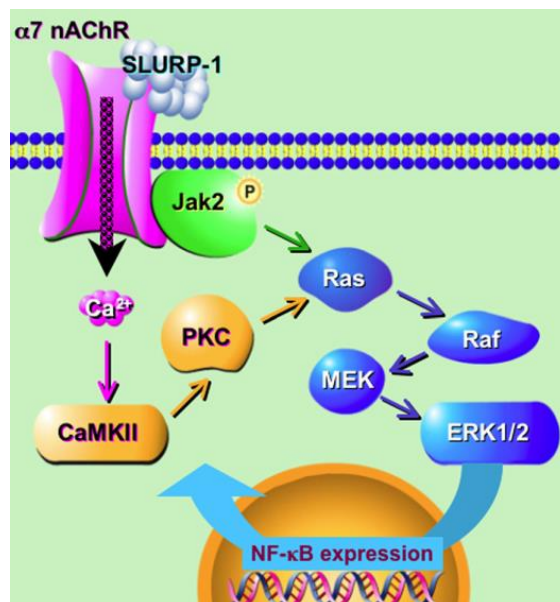


Рис. 19. Предполагаемый в работе [77] механизм увеличения экспрессии фактора NF- κ B с участием SLURP-1. Аутокринное/паракринное воздействие SLURP-1 на $\alpha 7$ -nAChR активирует каскад Ras/Raf-1/MEK/ERK через два комплиментарных механизма: увеличение концентрации внутриклеточного кальция с последующей активацией CaMKII/PKC и независимая от тока ионов через $\alpha 7$ -nAChR активация киназы Jak2.

Экспрессия SLURP-1 была также обнаружена в нервной системе, а именно в корешках дорсальных ганглий спинного мозга [78]. Было показано, что рассечение седалищного нерва у крыс приводит к заметному снижению уровня экспрессии SLURP-1 в ганглиях спинного мозга, что указывает на

возможное участие белка SLURP-1 в холинергической модуляции боли и воспаления в нервной системе.

1.2.6 SLURP-1 и SLURP-2 в развитии раковых заболеваний

Mal de Meleda, заболевание, связанное с мутациями в гене SLURP-1, часто сопровождается плоскоклеточной карциномой кожи или меланомой [79]. Экспрессия SLURP-1 снижена в клетках данных форм рака, а также – в клетках рака легкого [80] и рака кишечника [81]. Воздействие нитрозаминов, возникающих при курении табака, способно вызывать злокачественную трансформацию кератиноцитов [82], что также сопровождается снижением экспрессии SLURP-1 и SLURP-2. Повышение уровней экспрессии SLURP-1 и SLURP-2 в культуре Het-1A за счет трансфекции или обработка этих клеток рекомбинантными аналогами SLURP-1 и -2 снижали способность кератиноцитов к образованию опухолей при обработке нитрозамином и подкожном введении мышам. Таким образом, белки SLURP-1 и SLURP-2 могут выступать в роли естественных «защитников» от образования опухолей при воздействии продуктов курения.

Рак поджелудочной железы подразделяется на два типа по источнику первичной опухоли – эндокринного типа (5% случаев) и экзокринного типа (95% случаев заболевания), среди опухолей экзокринного происхождения наиболее распространенным является рак протоков поджелудочной железы (PDAC) [83]. Курение – наиболее существенный фактор риска не генетического происхождения, ассоциированный со значительным ухудшением выживаемости у пациентов с PDAC. Никотин и его нитрозаминовые производные способны стимулировать миграцию, пролиферацию и инфильтрацию в здоровые ткани в клеточных линиях, выделенных из PDAC.

Связь SLURP-1, $\alpha 7$ -nAChR и процесса развития PDAC была исследована в работе Throm и соавторов [84]. Было показано, что у пациентов с PDAC перед операцией по удалению опухоли в среднем в 2 раза ниже уровень

экспрессии гена CHRNA7, кодирующего $\alpha 7$ субъединицу nAChR, по сравнению с здоровыми людьми или пациентами с хроническим панкреатитом ($p < 0.004$). Пациенты с PDAC и относительно высоким уровнем экспрессии CHRNA7 показывали лучшую выживаемость после удаления первичной опухоли (Рис. 20).

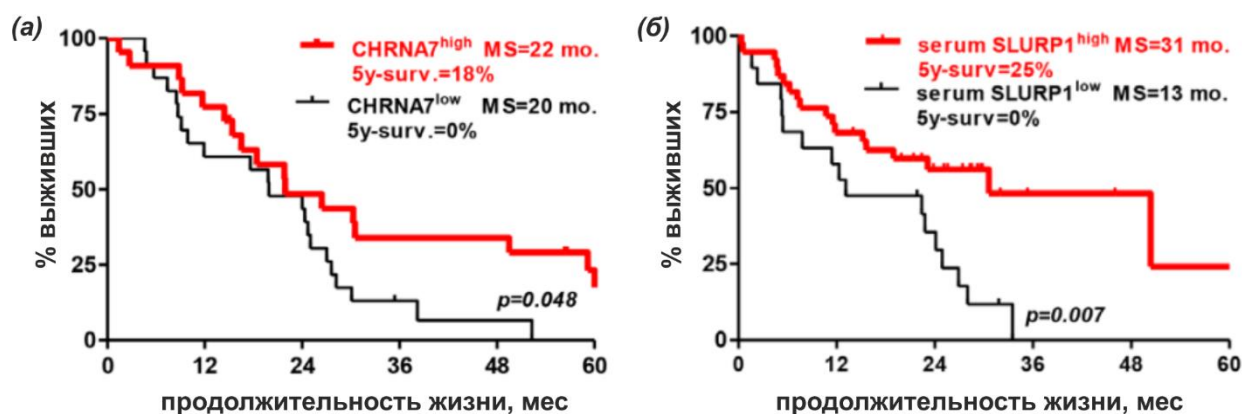


Рис. 20. Влияние уровней экспрессии $\alpha 7$ -nAChR и SLURP-1 на выживаемость пациентов с раком поджелудочной железы. А- группа пациентов с относительно высоким уровнем экспрессии CHRNA7 (более 50 копий гена CHRNA7 на 10000 копий гена PPIB, обозначена красным) демонстрирует лучшую выживаемость после удаления первичной опухоли ($p = 0.048$), MS – медианная продолжительность жизни, 5y-surv – процент выживших через 5 лет. В – аналогично А, группа пациентов с относительно высоким уровнем SLURP-1 в крови (>16 нг/мл) перед удалением опухоли демонстрирует лучшую выживаемость после операции ($p = 0.007$) [84]

В отличие от CHRNA7, уровень экспрессии гена SLURP1 в клетках поджелудочной железы и уровень белка SLURP-1 в сыворотке перед удалением опухоли не отличались у пациентов с PDAC, пациентов с хроническим панкреатитом и здоровых людей. Уровень экспрессии SLURP-1 также не коррелировал с образованием метастазов на поздних стадиях PDAC. Интересно отметить, что относительно высокий уровень белка SLURP-1 в сыворотке пациентов перед удалением опухоли (>16 нг/мл) коррелировал с увеличением продолжительности жизни после удаления первичной опухоли: медианная продолжительность жизни при низком уровне SLURP-1 составляла 13 месяцев, при высоком – 31 месяц. 5-летний процент

выживаемости у пациентов с PDAC при низком уровне экспрессии SLURP-1 составлял 0%, при высоком – 25%.

С помощью проточной цитометрии было показано, что подавление экспрессии $\alpha 7$ -nAChR с помощью siRNA приводит к достоверному уменьшению связывания флуоресцентного SLURP-1 с клетками линий COLO357 (на 85%) и PANC-1 (на 95%), которые получены из опухоли поджелудочной железы. На основе этих данных авторы делают вывод, что в данных клеточных линиях SLURP-1 связывается именно с $\alpha 7$ -nAChR.

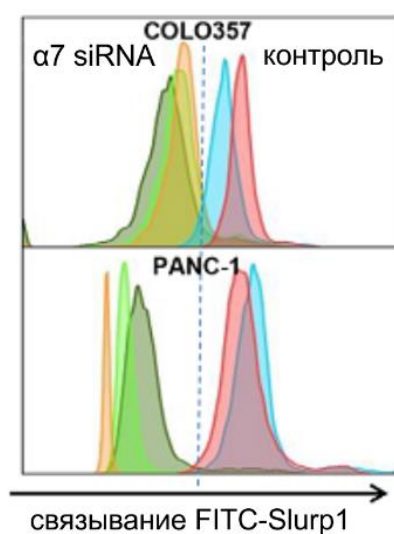


Рис. 21. Анализ связывания флуоресцентного SLURP-1 с клетками линий COLO357 и PANC-1 с помощью проточной цитометрии. Синий – не трансфицированные клетки; красный – трансфекция неспецифической siRNA; желтый, светло-зеленый и темно-зеленый – трансфекция siRNA, специфичной к различным участкам гена CHRNA7 [84].

Также обработка клеток COLO357 и PANC-1 никотином или SLURP-1 приводила к противоположным эффектам в отношении пролиферации и инвазивности (Рис. 21). SLURP-1 снижал скорость миграции (эффект более выражен для COLO357) и инвазивность (эффект более выражен для PANC-1), причем в обоих тестах нокдаун гена CHRNA7 с помощью siRNA приводил к отмене эффекта.

Таким образом, в данной работе показано что SLURP-1 способен подавлять миграцию и инвазивность клеток рака поджелудочной железы, этот эффект опосредован взаимодействием SLURP-1 именно с $\alpha 7$ -nAChR, и высокие уровни белка SLURP-1 в крови у пациентов с данным типом рака коррелируют с большей продолжительностью жизни после удаления первичной опухоли.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1. Реактивы и ферменты

В работе были использованы следующие реактивы:

Tris, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NH_4Cl , сульфит натрия, дитиотреитол (DTT), KOH, NaOH, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), трифторуксусная кислота, ацетонитрил, Triton X-100, мочевиная, L-аргинин, глицерин – Panreac, Испания.

CaCl_2 – Fluka, Германия.

HEPES, MgSO_4 , восстановленный глутатион (GSH), окисленный глутатион (GSSG), тетратионат натрия, бычий сывороточный альбумин (BSA), фибронектин, бычий коллаген I-го типа, EGTA, коктейль ингибиторов протеаз для тканей млекопитающих - Sigma-Aldrich, США.

$^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -глюкоза – Cambridge Isotope Laboratories, Великобритания.

Реактив для выделения тотальной РНК ExtractRNA, набор для синтеза кДНК MMLV RT kit, смесь для ПЦР в реальном времени с красителями и ДНК-полимеразой qPCR mix-HS SYBRHigh ROX – Евrogen, Россия.

Триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар – BD Biosciences, США.

Водорастворимый тетразолиевый краситель WST-1, 1-метокси-5-метилфеназин метилсульфат (1-m-PMS) - Santa Cruz, США.

Бунгаротоксин, gefitinib, мекамиламин, атропин – Tocris, Великобритания

Соляная кислота, уксусная кислота – Химмед, Россия.

Для приготовления растворов и буферов использовали дистиллированную воду, дополнительно очищенную на установке Milli-Q (Millipore, США).

2.1.2. Бактериальные и эукариотические клеточные линии

E. coli штамм BL21(DE3) – *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS* (New England Biolabs, США).

Het-1A – нормальные иммортализованные кератиноциты пищевода человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC).

A431 – эпидермоидная карцинома человека, характеризуется повышенным уровнем экспрессии EGFR (получена из коллекции ATCC),

A549 – аденокарцинома базального альвеолярного эпителия человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

U251-MG – глиобластома человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

SKBR-3 – аденокарцинома молочной железы человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC),

HT-29 – колоректальная аденокарцинома человека, эпителиальная морфология (получена из коллекции ATCC).

PC-12 – феохромацитомы крысы (получена из коллекции ATCC).

2.1.3. Плазмидные векторы

Для экспрессии генов *slurp-1* и *slurp-2* в *E. coli* был использован плазмидный вектор *pET22b (+)* (Novagen, США).

2.1.4. Питательные среды для роста бактериальных культур

Клетки *E. coli* выращивали в питательных средах LB, TB и M9. Состав среды LB: 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl. Состав среды TB: 12 г/л триптон, 24 г/л дрожжевой экстракт, 4мл/л глицерин, после автоклавирования добавляли стерильный раствор 0.17 М KH_2PO_4 , 0.72 М K_2HPO_4 в количестве 100мл/л. Состав среды M9: 6 г/л Na_2HPO_4 , 3 г/л KH_2PO_4 , 0.5 г/л NaCl, 2 г/л NH_4Cl , 240 мг/л MgSO_4 , 11 мг/л CaCl_2 , 3 г/л

глюкоза, 2 мг/л дрожжевой экстракт, 200 мкл/л 5 %-й р-р тиамин хлорида, рН 7.4.

Твердую среду LB получали добавлением к среде LB бакто-агара до 1.5 % (вес/объем). Для селекции трансформированных клеток в среды добавляли антибиотик ампициллин до конечной концентрации 100 мкг/л.

2.1.5. Питательные среды для роста эукариотических клеточных линий

Для выращивания эукариотических клеточных линий использовали следующие среды:

A431, MCF-7, A549, U251 MG - DMEM (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия).

SKBR3 - McCoy's 5A (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 10% эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific).

A172, HT-29 - RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 10% эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific).

Het-1A - BEGM (Lonza/Clonetics Corporation, Швейцария). Для клеток Het-1A культуральный пластик предварительно покрывали смесью 0.01 г/л фибронектина (Sigma-Aldrich), 0.03г/л бычьего коллагена I-го типа (Sigma-Aldrich), 0.01г/л бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich), растворенных в культуральной среде BEGM в течение ночи при 37 °C, 5% CO₂.

PC-12 - DMEM (Gibco, Life Technologies, США), 10% инактивированная сыворотка лошади (Gibco, Life Technologies, США), эмбриональная телячья сыворотка (FCS, HyClone, Thermo Fisher Scientific), 25 ед/мл пенициллин, 25 мкг/мл стрептомицин, 1 mM пируват натрия, 2 mM глутамин. Культуральный пластик предварительно покрывали р-ром поли-L-лизина 5мкг/мл.

2.1.6. Антитела

Первичные антитела:

β 2-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:1000 (предоставлены Dr. Cecilia Gotti, Istituto di Neuroscienze, Италия),

α 3-nAChR – поликлональный IgG козы, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-1771, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 4-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-5591, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 5-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-28795, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 6-nAChR – поликлональный IgG козы, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-27292, Santa Cruz Biotechnology, США),

5-HT₃ (серотониновый рецептор 3A типа) - поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100 (каталожный номер sc-27292, Santa Cruz Biotechnology, США),

α 7-nAChR – поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:1000, разведение для конфокальной микроскопии – 1:500, разведение для проточной цитометрии – 1:1000 (каталожный номер ab23832, Abcam, Великобритания),

β 4-nAChR - поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:100, (каталожный номер ab156213, Abcam, Великобритания),

pERK1/2 (фосфорилированные MAPK-киназы ERK1 и ERK2) - поликлональный IgG кролика, разведение для вестерн-блоттинга - 1:4000, (каталожный номер 9101, Cell Signalling Technology, Нидерланды),

EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) - моноклональный IgG кролика, разведение для конфокальной микроскопии 1:500, (каталожный номер 52894, Abcam, Великобритания),

SLURP-1 - моноклональный IgG мыши, разведение для конфокальной микроскопии – 1:500, (каталожный номер 52894, Abcam, Великобритания),

Антитела для изотипического контроля:

IgG мыши - разведение для проточной цитометрии 1:1000 (каталожный номер 31903, Thermo Fisher Scientific, США),

IgG кролика - разведение для проточной цитометрии 1:1000 (каталожный номер 31235, Thermo Fisher Scientific, США),

Вторичные антитела:

Анти-IgG кролика, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) – поликлональный IgG козы, разведение вестерн-блоттинга – 1:2000 (каталожный номер P0448, Dako, Дания),

Анти-IgG козы, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) – поликлональный IgG кролика, разведение вестерн-блоттинга – 1:2000 (каталожный номер P0449, Dako, Дания),

Анти-IgG мыши, конъюгированный с флуоресцентным красителем AlexaFluor 488 – поликлональный IgG козы, разведение для проточной цитометрии – 1:1000 (каталожный номер A-11001, Invitrogen, США),

Анти-IgG кролика, конъюгированный с флуоресцентным красителем AlexaFluor 488 – поликлональный IgG козы, разведение для конфокальной микроскопии – 1:10000, разведение для проточной цитометрии – уточнить (A-11008, Invitrogen, США),

2.1.7. Синтетические олигонуклеотиды

Таблица 1. Используемые в работе синтетические олигонуклеотиды

Ген	Последовательность олигонуклеотидов		Размер ампликона, б.п.
	Прямой	Обратный	
b-actin	TCATGTTTGAGA-	GTCTTTGCG-	250

	CCTTCAACAC	GATGTCCACG	
GAPDH	TGCACCACCA- ACTGCTTAGC	GGCATGGACTG- TGGTCATGAG	46
RPL13A	CCTGGAGGAGA- AGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTG- TGTATTTGTCAA	78
SLURP-1	GTGAGGCC- TCAAGTGCTAC	GCTCTGGTTGA- AGGGGTACTC	213
SLURP-2	GAGGGACTCCA- CCCCTGTGT	GCAGCCTATGT- GGCACATCTT	357
Lynx-1	ACCACTCGAA- CTTACTTCACC	ATCGTACACG- GTCTCAAAGC	81
$\alpha 3$-nAChR	CCTGTTCCAG- TACCTGTTCG	AGACATGGACA- CCTCAAACCTG	97
$\alpha 4$-nAChR	GTCAAAGACAA- CTGCCGGAGACTT	TGATGAGCATTGG- AGCCCCACTGC	300
$\alpha 7$-nAChR	TGCACGTGTC- CCTGCAAGGC	GTACACGGTG- AGCGGCTGCG	112
$\alpha 9$-nAChR	ATCCTGAAGTAC- ATGTCCAGGATC	TGGCCTTGTGGT- CCTTGAGGCACT	300
$\beta 2$-nAChR	ACGGTGTTC- TGCTGCTCATC	CACACTCTGG- TCATCATCCTC	507

2.2 Методы

2.2.1 Получение рекомбинантных белков rSLURP-1 и rSLURP-2

Клонирование генов *slurp-1* и *slurp-2*. Гены *slurp-1* и *slurp-2*, кодирующие белки SLURP-1 и SLURP-2 человека были сконструированы с помощью ПЦР из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов (Евроген, Москва)]. Последовательность генов была оптимизирована для экспрессии в *E. coli*, сигнальный пептид в обоих белках был удален, на 5'-конец был введен кодон ATG, необходимый для инициации трансляции. Полученные гены клонированы в вектор *pET22b* (+) по сайтам рестрикции *NdeI* и *HindIII*, корректная последовательность вставки была подтверждена секвенированием (синтез олигонуклеотидов и секвенирование выполнены ЗАО «Евроген»).

Экспрессия генов *slurp-1* и *slurp-2* в *E. coli*. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (Novagen, США) трансформировали соответствующим вектором

и рассеивали на чашки Петри с LB-агаром и ампициллином 100 мкг/мл. Колонии с чашки инокулировали в 30 мл питательной среды ТВ, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 37°C с умеренным перемешиванием (250 об. /мин.) на орбитальном шейкере до достижения клеточной плотности в культуре, соответствующей величине поглощения 0.6 при 600 нм. Далее полученную культуру инокулировали в 2 л среды ТВ в ферментере (Bioflow 3000, New Brunswick Scientific, США). Культивирование осуществляли при 37°C в условиях автоматического поддержания относительного содержания кислорода в системе не менее 30% от максимально достижимого. Регулируемыми параметрами были обороты мешалки и скорость подачи воздуха. Экспрессию генов *slurp-1* и *slurp-2* индуцировали добавлением изопропил- β -d-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 0.05 mM при клеточной плотности в культуре, соответствующей величине поглощения 0.8 при 600 нм. После индукции культивирование клеток осуществляли в течение 16 ч.

Для продукции ^{13}C - ^{15}N -меченых аналогов *slurp-1* и *slurp-2* 1 л клеточной культуры, предварительно выращенной на среде ТВ в колбах до клеточной плотности, соответствующей величине поглощения 0.8 при 600 нм, центрифугировали в течение 15 мин при 2500 g. Клеточный осадок стерильно ресуспендировали в 1 л минимальной среды M9, содержащей в качестве источников углерода и азота ^{13}C -глюкозу и ^{15}N - NH_4Cl (Cambridge Isotope Laboratories, Великобритания). Индукцию и дальнейшее выращивание проводили так же, как на среде ТВ.

Отмывка телец включения. Клетки собирали центрифугированием (10000 g, 20 мин, 4°C) и ресуспендировали в холодном буфере 20 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0 (буфер W) в соотношении 10 мл буфера на 1 г осадка. Далее суспензию клеток дезинтегрировали ультразвуком (Branson Digital Sonifier, США) при выходной мощности 50 Вт и 4°C в течение 10 мин. Полученную взвесь центрифугировали при 36000 g в течение 20 мин. Образовавшийся осадок ресуспендировали в буфере W,

содержащем 2 М мочевины. Суспензию переносили в предварительно охлажденный стакан, дезинтегрировали 2 мин. и центрифугировали в тех же условиях, что и ранее. После отмывания 2 М мочевиной осадок промывали буфером W, содержащим 1 % Triton X-100, и затем - деионизованной водой (MilliQ, Millipore, США). Отмытые тельца включения хранили при – 20°C.

Восстановление rSLURP-1, rSLURP-2 и очистка из телец включения. Отмытые тельца включения ресуспендировали в буфере 30 mM Трис-HCl pH 8.7, 8 М мочевины, 0.4 М сульфит натрия, 0.15 М тетрагидрат натрия из расчета 10 мл буфера на 1 г телец включения. Суспензию дезинтегрировали ультразвуком (Branson Digital Sonifier) при выходной мощности 50 Вт и 4°C в течение 1 мин и оставляли на 12 ч при слабом перемешивании. Затем суспензию центрифугировали при 36000 g и 4°C в течение 30 мин, супернатант разводили деионизованной водой в 10 раз с добавлением сухой мочевины так, чтобы конечная концентрация мочевины была не ниже 2 М. После этого препарат сульфитированного целевого белка наносили на колонку с DEAP-сферонит-ОН (совместная разработка ГНИИ ОЧБ, Санкт-Петербург и ИБХ РАН), предварительно уравновешенную буфером W (30 mM Трис-HCl, pH 8.0). После нанесения белка колонку последовательно промывали буфером W, буфером W, содержащим 1 М NaCl, буфером W (для удаления NaCl) и буфером W, содержащим 8 М мочевины. Сульфитированный целевой белок элюировали буфером, имеющим следующий состав 30 mM Трис-HCl, 8 М мочевины, 0.5 М NaCl, pH 8.0. Во фракции, содержащие целевой белок, добавляли 1000-кратный (по отношению к белку) молярный избыток ДТТ. Восстановленный целевой белок очищали с помощью ВЭЖХ на приборе “Smartline” (Knauer, Германия) (колонка с обращенной фазой Jupiter C4, A300, 10 × 250 мм, Phenomenex, США). Целевой белок элюировали градиентом ацетонитрила (20–45 %) в течение 40 мин в присутствии 0.1 % ТФУ.

Ренатурация rSLURP-1 и rSLURP-2. Препараты восстановленных целевых белков лиофилизировали и растворяли в буфере для ренатурации,

содержащем 50 мМ Трис-HCl pH 10.5, 2 М мочевины, 0.5 М L-аргинина, 4 мМ GSH и 1 мМ GSSG для rSLURP-1, 2 мМ GSH и 2 мМ GSSG для кЫДГКЗ-2, до конечной концентрации белка 0.05 мг/мл. Полученный раствор титровали с помощью HCl до pH 7.0 для rSLURP-1, pH 9.0 для rSLURP-2. Ренатурацию проводили при 4°C в течение 3 суток. После окончания процесса ренатурации раствор, содержащий ренатурированный белок, диализовали против деионизованной воды (MilliQ, Millipore, США) в соотношении объемов 1:500, титровали ТФУ до pH 4.0 и концентрировали в 10 раз с помощью ячейки для ультрафильтрации с размером пор мембраны 1 кДа (Millipore, США).

Очистка ренатурированного белка. Анализ и очистку целевых белков после ренатурации проводили с помощью ВЭЖХ (колонка с обращенной фазой Jupiter C4, A300, 4.6 × 250 мм, Phenomenex, США). Элюцию белков осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 % до 45 % за 50 мин в присутствии 0.1 % TFA. Количество целевого белка после очистки оценивали по поглощению при 280 нм с использованием расчетного коэффициента экстинкции. Препараты полученных ренатурированных белков лиофилизировали.

Анализ качества полученных препаратов. Для подтверждения чистоты и идентичности целевого белка масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре UltraFlex TOF/TOF фирмы «Brucker Daltonics» (Германия), оснащенным источником ионизации MALDI. В линейном режиме детектировали положительно заряженные ионы. Также чистоту целевого белка подтверждали денатурирующим электрофорезом во полиакриламидном геле. Степень замыкания дисульфидных связей анализировали с помощью реактива Элмана.

Конъюгирование SLURP-1 с флуоресцентной меткой AlexaFluor-647. Конъюгирование rSLURP-1 с флуоресцентным красителем AlexaFluor 647 осуществляли с помощью карбодиимидной сшивки, используя набор Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit (Life Technologies, США). Для этого 50 мкл 7.7

мМ р-ра активированного сукцинимидного эфира AlexaFluor 647 в DMSO добавляли к 0.5мл 0.22 мМ р-ра rSLURP-1 в буфере 0.1 М бикарбонат натрия рН 8.3 и полученную смесь (молярное соотношение краситель: белок 7:2) инкубировали с перемешиванием 12 ч при комнатной температуре в темноте (для предотвращения распада красителя). Продукты реакции разделяли на ВЭЖХ (таким же образом, как проводили очистку ренатурированного белка), в результате была идентифицирована фракция, содержащая конъюгат белка с одной молекулой красителя (по данным масс-спектрометрии) и обладающая антипролиферативной активностью в отношении Het-1A, сходной с активностью rSLURP-1 без красителя.

2.2.2. Аффинная экстракция из образцов тканей

Для уточнения фармакологического профиля rSLURP-1 и rSLURP-2 в отношении nAChR человека в качестве источника рецепторов различного субъединичного состава была использована мембранная фракция тканей неокортекса височной доли мозга человека.

Образцы ткани были получены при лобэктомии передней части височной доли у двух пациентов (женщины 30 и 38 лет) с медикаментозно неизлечимой формой эпилепсии с инициацией в гиппокампе. Было получено информированное согласие в письменной форме со стороны пациентов. 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. Полученные образцы были немедленно заморожены с помощью сухого льда и хранились при -80°C до момента использования. Гистологические исследования тканей не выявили значимых изменений.

Для конъюгации с магнитными частицами PureProteome™ NHS Flexibind (Millipore, Billerica, MA) rSLURP-1 растворяли при концентрации 2мг/мл в

PBS, pH 7.4 и смешивали с магнитными частицами в соотношении 1:2 (по объему), в соответствии с рекомендациями производителя. rSLURP-2 растворяли в концентрации 1.63 мг/мл в PBS pH 7.4. Реакцию конъюгации проводили в течение ночи при 4°C. Далее раствор целевого белка удаляли и свободные реактивные группы на поверхности магнитных частиц блокировали с помощью инкубации в 100 mM Tris-HCl pH 8.0 в течение 1 ч при 4°C. Эффективность конъюгирования анализировали по содержанию белка (rSLURP-1 или rSLURP-2) в растворе до конъюгирования и после удаления магнитных частиц. Концентрацию белка в р-ре определяли с помощью реактива Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, США), эффективность конъюгирования составляла 90-95 %. В качестве контроля неспецифического связывания использовали магнитные частицы, обработанные по тому же протоколу с использованием PBS вместо р-ра белка. Для снижения неспецифического связывания магнитные частицы инкубировали в 0.1 % р-ре бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS pH 7.4 перед использованием в течение 1 ч при 4°C.

Образцы тканей мозга были гомогенизированы в 1 мл буфера для лизиса (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 5 mM ЭГТА, 10 мкл/мл коктейль ингибиторов протеаз для тканей млекопитающих, pH 7.5) с использованием гомогенизатора PT1200C (Kinematica, Luzern, Switzerland) в течение 20 секунд. Гомогенат центрифугировали 40 минут при 100,000×g и 4°C с использованием ультрацентрифуги Optima L90-K (Beckman), супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса с добавлением 2% Triton X-100 с помощью гомогенизатора в течение 20 секунд и инкубировали 2 часа при 4°C на орбитальном шейкере (15 rpm). Затем образец центрифугировали как описано выше и получившийся супернатант использовали для аффинной экстракции. Суммарное содержание белка в образце было определено с помощью реактива Брэдфорда.

Для аффинной экстракции образец гомогената в количестве, соответствующем 500-1000 мкг тотального белка, смешивали с 50 мкл

магнитных частиц, объем суспензии доводили до 1500 мкл буфером для лизиса и инкубировали в течение 18-22 ч при 4°C на орбитальном шейкере (15 об/мин). Затем магнитные частицы дважды промывали в 1 М NaCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ NaH₂PO₄, 0.5 % Triton X-100, pH 7.5 и три раза в 0.1 М NaCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ NaH₂PO₄, 0.5 % Triton X-100, pH 7.

Для элюции экстрагированных белков магнитные частицы сразу после промывки ресуспендировали в 40мкл 2X буфера для нанесения (120 мМ Трис, 20 % (v/v) глицерин, 10 % (v/v) меркаптоэтанол, 4 % (w/v) SDS, 0.05 % (w/v) бромфеноловый синий, pH 6.8), инкубировали 10 мин. при 95°C в твердотельном термостате, инкубировали 10 мин. на льду. Далее магнитные частицы осаждали с помощью магнитного штатива, супернатант отбирали и использовали в качестве образца для вестерн-блоттинга.

2.2.3 Вестерн-блоттинг

В образцах гомогенатов тканей до и после инкубирования с магнитными частицами для вестерн-блоттинга измеряли содержание тотального белка с помощью реактива Брэдфорд, образцы выравнивали по концентрации тотального белка с помощью разведения. В образцы добавляли 4x буфер для нанесения, инкубировали 5 минут при 95°C, подвергали электрофорезу с использованием гелей Any-kD (Bio-Rad, США) и переносили на мембрану PVDF (Bio-Rad, США) в буфере Trans-Blot Turbo Transfer Buffer (Bio-Rad, США) с помощью камеры для переноса Tran-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Перенос производили со следующими параметрами: 15V, 2.5A, 15 минут, стабилизация по силе тока. Для визуализации переноса на мембрану использовали окрашенный белковый маркер молекулярных весов PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo-Fisher, США).

Мембраны промывали 3 раза по 5 минут TBS (20 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 7.5) с 0.1 % Tween-20, затем блокировали 1 час в TBS + 5 % сухое молоко (BioRad, США), этот же раствор использовали для разведения первичных и вторичных антител.

Инкубацию в растворе первичных антител (список антител и рабочие разведения приведены выше в разделе «Материалы») проводили в течение ночи в контейнере с увлажняемым воздухом при 4°C. Затем раствор первичных антител удаляли, мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в TBS-T и инкубировали 1ч в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. После 5-кратной промывки TBS-T мембрану инкубировали 1 мин в растворе субстрата для хемилюминесценции (Western Lightning® ECL Pro, Perkin Elmer) и сигнал детектировали с помощью анализатора Chemidoc XR (Bio-Rad, США). В случае необходимости повторного детектирования с помощью других первичных антител на той же мембране, мембрану отмывали с помощью Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) и далее повторно инкубировали с раствором новых первичных антител, как описано выше для мембраны после переноса.

Для оценки относительного содержания целевого белка в образце использовали среднюю оптическую плотность детектированных полос в ожидаемом диапазоне масс с вычитанием фонового значения сигнала на мембране рядом с данной полосой. Молекулярный вес оценивали при сравнении с окрашенным маркером молекулярных весов.

2.2.4. Электрофизиология

Для исследования влияния белков SLURP-1 и SLURP-2 на проводимость каналов nAChR был использован метод двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Ооциты были выделены согласно методике, описанной ранее [85]: ткани яичников были извлечены из лягушки и помещены в среду Barth (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 1 mM Hepes, 0.8 mM MgSO₄, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.4 mM CaCl₂, pH 7.4) с добавлением канамицина 2 мг/мл. Перед инъекцией мРНК ооциты выделяли из фолликулярной ткани, обрабатывая 0.2 % коллагеназой 1-го типа (Sigma-Aldrich) в р-ре Рингера (82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, pH 7.4) при

медленном перемешивании в течении 3-4 ч. После обработки коллагеназой ооциты промывали избытком р-ра Рингера для удаления остаточной коллагеназной активности и проводили предварительную сортировку по размеру с помощью полимерного сита. Далее с помощью бинокулярного микроскопа и пинцета в чашке Петри вручную отделяли ооциты V-VI стадии развития, идентифицированные по размеру и окраске. Полученные ооциты переносили в новые 35мм чашки Петри со средой Barth с канамицином.

В ооциты инъецировали 2 нг мРНК, кодирующей $\alpha 4\beta 2$ (смесь мРНК двух субъединиц 1:1), $\alpha 3\beta 2$ (смесь 1:1), или $\alpha 7$ nAChR и инкубировали в среде Barth с канамицином при 18°C 2-5 суток перед измерениями, удаляя каждый день нежизнеспособные ооциты.

Для двухэлектродной фиксации потенциала использовали автоматизированную систему HiClamp (Multi-Channel Systems, Germany). Мембранный потенциал фиксировали на - 100 мВ, ооциты омывались р-ром Рингера. Предварительная инкубация ооцитов с rSLURP-1 или rSLURP-2 проводилась в течении 100 с в р-ре Рингера с добавлением 20 мкг/мл BSA. Лиофилизированные rSLURP-1 или rSLURP-2 разводили в 100 % DMSO в концентрации 1 мМ, непосредственно перед использованием растворы с меньшей концентрацией получали разведением в р-ре Рингера. Конечная концентрация ДМСО при стимуляции составляла не более 1 %. Стимуляция проводилась с помощью перемещения ооцита с установленными электродами в камеру, содержащую р-р Рингера с добавлением ацетилхолина. Данные записывали с помощью усилителя, фильтра и АЦП, встроенных в HiClamp и затем анализировали с помощью программы MATHLAB (Mathworks, США) с пакетом расширений, предназначенных для управления и обработки данных с HiClamp.

2.2.5 Культивирование эукариотических клеток

Клетки линии эпидермоидной карциномы человека A431, клетки аденокарциномы груди MCF-7, клетки легочной карциномы A549, клетки

глиобластомы U251, клетки аденокарциномы груди SKBR3, клетки глиомы A172, карциномы кишечника HT-29, клетки линии нормальных кератиноцитов Het-1A выращивали согласно рекомендациям ATCC (составы культуральных сред для каждой линии указаны выше в разделе «Материалы»). Все типы клеток инкубировали при 37°C, 5 % CO₂ и пересаживали два раза в неделю.

Для изучения влияния rSLURP-1 и rSLURP-2 на пролиферацию клетки высевали в 96-луночный планшет (0.5×10⁴ клеток на лунку для A549, A172 и U251 MG, 0.75×10⁴ клеток на лунку для A431, 1×10⁴ клеток на лунку для Het-1A и 1.5×10⁴ клеток на лунку для MCF-7 и SKBR3) и культивировали в течение 24 ч. Затем добавляли rSLURP-1 или rSLURP-2 (растворенные в концентрации 1 мМ в 100 % DMSO и разведенные до необходимой концентрации соответствующей культуральной средой так, чтобы финальная концентрации DMSO не превышала 1 %), gefitinib или α -бунгаротоксин (водные растворы) в концентрациях от 1 мМ до 100 нМ и инкубировали в полной среде в течение 24 ч. Были использованы два типа отрицательного контроля: клетки без добавления какиз-либо препаратов и клетки с добавлением rSLURP-1 в концентрации 0.001 нМ.

При обработке клеток rSLURP-1 или rSLURP-2 с различными ингибиторами (gefitinib, атропин, мекамиламин, тимолол) клетки предварительно инкубировали с этими ингибиторами (10 нМ на 10 мин) и промывали два раза полной средой. Затем к клеткам добавляли rSLURP-1 или rSLURP-2 (1 нМ) и соответствующий ингибитор (10 нМ), после чего клетки культивировали в течение 24 ч.

Для изучения пролонгированного эффекта rSLURP-1 или rSLURP-2 на пролиферацию (более 24 ч) к клеткам дополнительно добавляли rSLURP-1 или rSLURP-2 каждые 24 часа.

2.2.6. Анализ пролиферативной активности

Клеточный рост измеряли с помощью колориметрического теста WST-1, являющегося аналогом МТТ-теста метаболической активности. Для этого водорастворимый тетразолиевый краситель WST-1 (Santa Cruz) и промежуточный электроноакцептор 1-m-PMS (Santa Cruz) добавляли к клеткам в конечных концентрациях 0.25 мМ и 5 мкМ, соответственно, клетки инкубировали при 1 ч и детектировали образование окрашенного продукта по поглощению на 440-460 нм с нормализацией по поглощению на 655 нм с использованием микропланшетного сканера (Uniplan, ЗАР Пикон, Россия).

Флуоресцентная микроскопия с окраской Хехст 33342/ йодистый пропидий была использована для изучения токсических эффектов изучаемых препаратов, как было описано ранее в [86]. Клетки окрашивали 1 мкМ Хехст 33342 и 0.5 мкМ йодистого пропидия в 96-луночных планшетах, затем исследовали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100-f с 40х объективом. Флуоресценцию йодистого пропидия возбуждали с использованием барьерного фильтра на 530–585 нм и регистрировали с использованием барьерного фильтра на 615 нм. Флуоресценцию Хехст 33342 возбуждали с использованием барьерного фильтра на 359–371 нм и регистрировали с использованием барьерного фильтра на 410 нм. Для каждой лунки 96-луночного планшета 5 кадров (320x240 мкм) анализировали с помощью функции «Analyze Particles» в программе ImageJ.

Данные по влиянию rSLURP-1 и rSLURP-2 для колориметрического теста WST-1 и для окрашивания по Хехсту/йодистым пропидием совпадали, поэтому для оценки пролиферативной активности использовали тест WST-1.

2.2.7 Культивирование клеток PC12 и анализ фосфорилирования ERK1/2 MAP-киназы

Клетки PC12 культивировали в 75-см² флаконах, покрытых 5мкг/мл поли-L-лизина (Sigma-Aldrich) в среде DMEM (Gibco Life Technologies, NY)

с добавлением 10 % инактивированной сыворотки лошади, 5 % эмбриональной бычьей сыворотки, 25 ед/мл пенициллина, 25 мкг/мл стрептомицина, 1 mM пирувата натрия, 2 mM глутамин при 37°C в увлажняемом инкубаторе с 5 % CO₂. Клетки пересаживали каждые 3-4 дня, отделяя их от подложки с помощью 0.25 % р-ра трипсина с 0.5 mM ЭДТА в PBS и высевая при 15 % конфлюэнтности.

Для анализа фосфорилирования ERK1/2 клетки высевали в 24-луночные плашки при плотности 12×10^4 клеток/см² за 24 ч до эксперимента. В день эксперимента культуральную среду заменяли на среду с пониженным содержанием сыворотки (1 % инактивированная сыворотка лошади, 0.5 % эмбриональная телячья сыворотка) на 3 часа, далее инкубировали 10 мин с добавлением rSLURP-1 или rSLURP-2, разведенных в DMSO/DMEM с финальной окнцентрацией DMSO не более 1 % и проводили стимуляцию 25 мкМ никотином в течение 5 минут. После стимуляции клетки лизировали в 100 мкл охлажденного на льду буфера для лизиса (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Трис, 4 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (v/v) NP-40, 1 мкл/мл коктейль ингибиторов протеаз, pH 7.4). Для достижения полного разрушения клеток лизат замораживали на 15 минут при -80°C, оттаивали, обрабатывали ультразвуком на льду. Лизаты хранили при -80°C до момента использования. Пептид VD-220 (RYNNHDPDGG) и rSLURP-1 в концентрациях 10 мкМ использовали в качестве негативных контролей.

Содержание фосфорилированной формы ERK1/2 в лизатах анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

2.2.8 Конфокальная микроскопия

Клетки высевали на покровные стекла в 24-луночной планшете в полной среде за день до эксперимента. Клетки инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1/AlexaFluor-647 в течении 1ч, фиксировали в 10 % растворе формальдегида, пермеабилизировали с помощью 0.1 % Triton X-100 (1 мин, 20°C), инкубировали в 1 % р-ре бычьего сывороточного альбумина в

сбалансированном солевом р-ре Хэнкса (HBSS, ПанЭко, Россия) и окрашивали антителами. Для промежуточных отмывок использовали HBSS. Были использованы первичные антитела к EGFR и $\alpha 7$ nAChR, вторичные антитела, конъюгированные с AlexaFluor 488. Окрашенные клетки помещали на предметное стекло, смачивали 50 мкл HBSS, накрывали покровным стеклом и исследовали с помощью инвертированного конфокального микроскопа SP2 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с 100 $\times$ объективом с масляной иммерсией (NA=1.4). Изображения получали с латеральным разрешением примерно 0.2 мкм и аксиальным разрешением примерно 1.2 мкм. Изображения с окраской Alexa-488 и Alexa-647 были получены последовательно. Краситель Alexa-488 (Alexa-647) возбуждали лазером с длиной волны 488 нм (633 нм) и детектировали в спектральном диапазоне 505-550 нм (650-720 нм).

2.2.9 Проточная цитометрия

Для предварительной инкубации в течение 24 ч 1 нМ rSLURP-1 добавляли в культуральную среду к клеткам, высеянными в 12-луночном планшете. Для инкубации в течении 1 ч клетки промывали дважды р-ром солей Хэнкса (ПанЭко, Россия) и инкубировали в р-ре Хэнкса с добавлением rSLURP-1 или в р-ре Хэнкса без rSLURP-1 (в качестве контроля).

После инкубации с SLURP-1 клетки трижды промывали р-ром Версена (ПанЭко, Россия) и обрабатывали р-ром Версена с трипсином (ПанЭко, Россия) 10 мин, осаждали центрифугированием и фиксировали в 10 % р-ре формальдегида в PBS в течение 15 мин. Фиксированные клетки пермеабилizировали в PBS, содержащем 0.1 % Triton X-100, 1 % BSA и 50 мМ NH₄Cl (для прекращения процесса фиксации). После этого суспензию фиксированных и пермеабилizированных клеток разделяли на 2 аликвоты, промывали PBS и инкубировали в р-ре первичных антител или контрольных изотипических антител IgG (контроль) в концентрации 10 мкг/мл в PBS с 1 % BSA в течении 45 мин при 20°C. Были использованы первичные антитела к

SLURP-1 или к $\alpha 7$ nAChR, в качестве изотипического контроля – IgG мыши или IgG.

После инкубации с первичными антителами клетки промывали PBS и инкубировали с вторичными антителами против IgG мыши или кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой AlexFluor-488 в концентрации 10 мкг/мл в PBS с 1 % BSA в течении 45 мин при 20°C. Обработанные клетки промывали и ресуспендировали в PBS, затем анализировали с помощью цитометра FC-500 (Beckman Coulter). Флуоресценцию возбуждали на длине волны 488 нм и регистрировали эмиссию в диапазоне 505-545 нм. Данные анализировали с помощью программы FlowJo X (Tree Star Inc., США). Для выделения интенсивности специфической компоненты окраски из медианной интенсивности флуоресценции с специфическими антителами вычитали медианную интенсивность флуоресценции соответствующего изотипического контроля.

2.2.10 ПЦР в реальном времени

Тотальную мРНК выделяли из культуры клеток с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Затем тотальную кДНК синтезировали с помощью набора MMLV RT (Евроген, Россия). Далее проводили реакцию ПЦР в реальном времени с праймерами, описанными в разделе 2.1.7 и с готовой смесью для количественной ПЦР, содержащей краситель SYBR Green I и референсный краситель ROX. Для этого 12.5 мкл р-ра кДНК, полученного из 1 мкг тотальной РНК смешивали с 7.5 мкL смеси праймеров для ПЦР и 5 мкл 5x qPCR mix-HS SYBRHigh ROX (Евроген, Россия). Негативные контроли содержали все компоненты ПЦР смеси за исключением ДНК и не давали сигнала в реакции. Все реакции ПЦР проводили с использованием амплификатора DT-Prime (ДНК-Технология, Россия). Данные анализировали в программном пакете RealTime PCR v.7.7 (ДНК-Технология, Россия).

2.2.11 Связывание с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами

Для исследования взаимодействия rSLURP-2 с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами использовали мембранную фракцию клеток СНО, экспрессирующих индивидуальные типы никотиновых рецепторов (предоставлены проф. Т.И. Боннером). Методика получения мембран и характеристика клеточных линий были описаны ранее в [87]. Экспрессия различных типов mAChR в этих клетках подтверждали экспериментом с насыщением ^3H -NMS. Уровень экспрессии рецепторов находился в пределах от 1.5 до 12.1 пмоль/мг тотального белка. Не трансфицированные клетки демонстрировали слабое, вероятно – неспецифическое, связывание ^3H -NMS (~ 0.07 пмоль/мг тотального белка). Эксперименты по связыванию радиоактивно-меченых лигандов проводили в 96-луночных планках при 30°C в буфере 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.4. Конечный объем реакции составлял 400 мкл для связывания с насыщением и 200 мкл для остальных экспериментов. Реакцию связывания проводили 1 ч для экспериментов с насыщением и 2 ч для экспериментов с псевдоконкуренцией. Для экспериментов с измерением диссоциации мембранную фракцию инкубировали 2 ч с 3.2 нМ ^3H -NMS в присутствии или в отсутствие 4.2 мкМ rSLURP-2 и стимулировали диссоциацию добавлением 10 мкМ атропина. rSLURP-2 растворяли в DMSO, который присутствовал в реакции в концентрации не более 1 %. Уровень неспецифического связывания определяли в присутствии 10 мкМ атропина.

Реакцию останавливали быстрой фильтрацией через фильтры GF/B (Whatman) с использованием фильтрующей системы Brandel (Gaithersburg, MD). Фильтры высушивали и остаточную радиоактивность измеряли с помощью твердотельного сцинтиллятора Meltilex A (Perkin Elmer) в сцинтилляционном счетчике Microbeta (Perkin Elmer).

2.2.12 Исследование структуры и динамики с помощью ЯМР

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) были получены на спектрометрах Bruker Avance 600 и Avance 800, оборудованных криодатчиками. Для отнесения сигналов в спектре и для расчета пространственной структуры были использованы 0.3 мМ образец ^{13}C , ^{15}N -меченного rSLURP-1 (5 % D₂O, pH 4.7, 37°C) и 0.5 мМ образец ^{13}C , ^{15}N -меченного rSLURP-2 (5 % D₂O, 5 % диоксан, pH 5.0, 37°C). Отнесение сигналов основной цепи было выполнено с использованием стандартного набора 3D спектров с тройным резонансом [88]: были получены спектры 3D ^{13}C -HCCH-TOCSY, ^{15}N - или ^{13}C -фильтрованный 3D TOCSY и NOESY. Расчет пространственной структуры был выполнен в программе CYANA [89]. Ограничения сверху на межпротонные расстояния были получены из кросс-пиков NOESY ($t_m = 100$ ms) через калибровку “ $1/r^6$ ”. Торсионные углы и стереоспецифическое отнесение были получены через $^3\text{JHNH}\alpha$ и $^3\text{JNH}\beta$ константы взаимодействия, а также через интенсивности NOE. Наличие водородных связей подтверждали с использованием температурных градиентов HN-протонов, измеренных в диапазоне температур 20 - 50°C. Параметры релаксации ядер ^{15}N (R1, R2, ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -NOE) были измерены при 60 MHz с использованием стандартного набора псевдо-3D экспериментов. Параметры релаксации измеряли для двух образцов rSLURP-2 (образца, использованного для расчета структуры и 0.08 мМ образца ^{13}C , ^{15}N -меченого rSLURP-2 в воде без добавления диоксана) и для одного образца rSLURP-1 (использованного для получения структуры). Координаты атомов в структуре rSLURP-2 были депонированы в базу данных PDB под номером 2N99.

2.2.13 Численное моделирование комплексов rSLURP-2/nAChR

Для изучения предполагаемого способа взаимодействия rSLURP-2 с его мишенями, были использованы модели $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, построенные по гомологии с использованием кристаллической структуры химеры $\alpha 7$ /AChBP в качестве шаблона (PDB ID 3SQ9; [25]) и с помощью программы

MODELLER 8.2 [90]. Для создания комплекса использовалась последовательность действий, аналогичная описанной ранее [91]:

(1) 3D-модели лиганд-связывающих доменов $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR подвергли симуляции молекулярной динамики в водном объеме $\approx 10 \times 10 \times 11 \text{ nm}^3$ с для получения набора состояний с различной конформацией. Все расчеты были выполнены в GROMACS 4.5.2 [92] с набором параметров Gromos96 45a3 и воды, заданной моделью SPC. Остальные параметры молекулярной динамики были заданы следующим образом: давление 1 бар (баростат Берендсена), температура 37°C (термостат с V-ренормировкой), и электростатический потенциал PME. Для каждого рецептора проводили расчет двух независимых траекторий по 200 нс.

(2) Конформационную кластеризацию проводили с помощью объединенных MD-траекторий длительностью 400 нс с использованием алгоритма кластеризации Gromos и дистанционного порога 0.25 нм. Для $\alpha 7$ nAChR в процессе симуляции наблюдались различные конформации C-петли в отдельных субъединицах. В некоторых субъединицах наблюдалась «открытая» конформация, в некоторых – «закрытая». Кластеризация $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7$ («открытой») и $\alpha 7$ («закрытой») дала 9, 9, и 11 структур, соответственно.

(3) Аналогично, три MD-траектории продолжительностью 200 нс были рассчитаны для rSLURP-2 (с использованием трех различных моделей по данным ЯМР в качестве начальной точки). Конформационная кластеризация дала 11 структур.

(4) Было проведено $9 \times 11 = 99$, $9 \times 11 = 99$, и $11 \times 11 = 121$ раундов докинга для комплексов $\alpha 3\beta 2$ /rSLURP-2, $\alpha 7$ («закрытой»)/rSLURP-2 and $\alpha 7$ («открытой»)/rSLURP-2, соответственно. Докинг проводили в программе ZDOCK [93]. На этом этапе вводили ограничение в виде взаимодействия rSLURP-2 только с C-петлей рецептора. При каждом запуске программа ZDOCK генерировала 2000 структур комплекса; 100 верхних по рейтингу были использованы для дальнейшего анализа (всего: 9900, 9000, и 12100).

(5) Отобранные решения докинга были дополнительно «отфильтрованы» с использованием дополнительного протокола оценки по следующим критериям: (а) rSLUPR-2 имеет значительную поверхность контакта с рецептором ($>400 \text{ \AA}^2$); (б) число «хороших» контактов (водородные связи, солевые мостики или специфический стекинг) больше 12, и (в) комплиментарность гидрофобных/гидрофильных свойств в комплексе >0.6 . Анализ этого набора критериев для комплекса был выполнен в программе PLATINUM [94].

Глава 3. Результаты и обсуждение

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

3.1.1. Аффинная экстракция субъединиц nAChR с помощью rSLURP-1

Для уточнения типов субъединиц nAChR, являющихся мишенями SLURP-1 и SLURP-2 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 Хельсинской декларацией). Рекомбинантный SLURP-1 был ковалентно иммобилизован на магнитных частицах, которые использовали для аффинной экстракции рецепторов из предварительно солюбилизированной в детергенте мембранной фракции [95]. Детектирование связанных субъединиц nAChR осуществляли с помощью вестерн-блота с антителами, специфичными к отдельным субъединицам nAChR. Также для подтверждения специфичности взаимодействия проводили окрашивание вестерн-блота с антителами к серотониновому рецептору 3A типа, сходному по структуре с nAChR.

В результате было установлено, что rSLURP-1 связывает $\alpha 7$ -nAChR, но не $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$, или $\beta 4$ субъединицы (Рис. 22). 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. Приведенные в данном разделе

результаты получены с участием проф. Томсена М.С. (отдел дизайна лекарств и фармакологии, Университет Копенгагена, Дания).

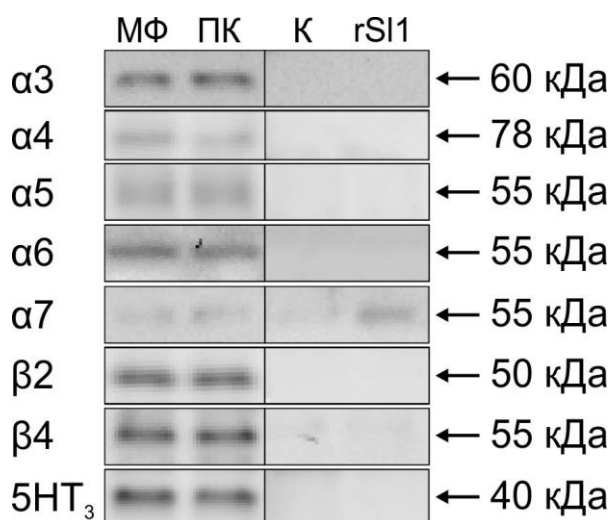


Рис. 22. Аффинная экстракция субъединиц nAChR с помощью rSLURP-1 из мембранной фракции головного мозга. «МФ» - мембранная фракция до инкубации с магнитными частицами, «ПК» - мембранная фракция после инкубации с магнитными частицами, «К» - контроль (магнитные частицы без иммобилизованного белка), rSL1 – магнитные частицы с иммобилизованным белком. α3-α7 и β2- β4 – окрашивание с первичными антителами к соответствующим субъединицам nAChR, 5-НТ₃ – окраска с антителами к серотониновому рецептору 3А типа (контроль неспецифического взаимодействия). Указаны примерные молекулярные массы для детектированных полос, определенные по маркеру молекулярных весов.

3.1.2. Конкурентное связывание rSLURP-1 с изолированными nAChR

Для уточнения сайта взаимодействия rSLURP-1 с потенциальными мишенями был использован метод конкурентного связывания в присутствии радиоактивно-меченого специфического антагониста α7-nAChR – бунгаротоксина. Ранее для rSLURP-1 была продемонстрирована конкуренция с ¹²⁵I-α-Bgtx за связывание с nAChR мышечного типа из *Torpedo californica* с IC₅₀ 40±10 мкМ [96]. Эти данные указывают на то, что сайт связывания rSLURP-1 может частично перекрываться с сайтами связывания α-нейротоксинов. В данной работе в качестве модели нейронального nAChR был использован ацетилхолин-связывающий белок *L. stagnalis* (Ls-AChBP) – структурный гомолог лиганд-связывающего домена α7-nAChR [25], для

которого наблюдалась конкуренция rSLURP-1 с ^{125}I - α -Bgtx, характеризующаяся IC_{50} 4.7 ± 0.3 мкМ (Рис. 23а). Однако, для полноразмерного $\alpha 7$ -nAChR, гиперэкспрессированного в линии клеток GH₄Cl, не наблюдалось конкуренции с α -Bgtx вплоть до 30 мкМ rSLURP-1 (Рис. 23б). Для сравнения, вытеснение радиоактивного ^{125}I - α -Bgtx не радиоактивным α -Bgtx для $\alpha 7$ -nAChR в GH₄Cl показано на рисунке 23б.

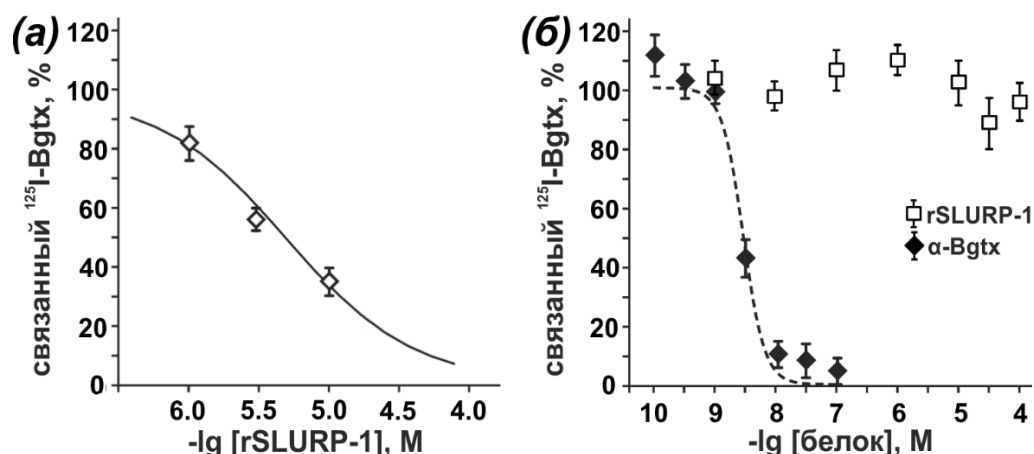


Рис. 23. Конкуренция rSLURP-1 с α -бунгаротоксином. (а) Конкуренция rSLURP-1 с ^{125}I - α -Bgtx за связывание с Ls-AChBP, Каждая точка - среднее $\pm$ стандартное отклонение. трех независимых измерений. Уравнение Хилла ($y = 100\% / (1 + ([\text{rSLURP-1}] / \text{IC}_{50})^{\text{nH}})$) было использовано для описания нормализованных данных по Ls-AChBP (% от связывания в контроле). Были получены параметры IC_{50} и nH - 4.7 ± 0.3 мкМ и 0.87 ± 0.04 для Ls-AChBP. (б) Конкуренция rSLURP-1 с ^{125}I - α -Bgtx за связывание с лизатом клеток GH₄Cl, экспрессирующих $\alpha 7$ -nAChR. Для сравнения показана кривая вытеснения ^{125}I - α -Bgtx не радиоактивным α -Bgtx.

В совокупности 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 может взаимодействовать с $\alpha 7$ -nAChR вне классического сайта связывания агонистов/антагонистов.

3.1.3. Действие rSLURP-1 на функцию ионного канала nAChR

Действие rSLURP-1 на функцию ионного канала $\alpha 7$ -nAChR было охарактеризовано на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих данный тип рецептора. Инкубация ооцитов с rSLURP-1 приводила к ингибированию ответа на ацетилхолин до 32% по отношению к контролю с относительно низкой эффективной концентрацией (IC_{50} 940 ± 80 нМ, Рис. 29). Аппликация

rSLURP-1 не вызывала токов через канал рецептора в отсутствие ацетилхолина.

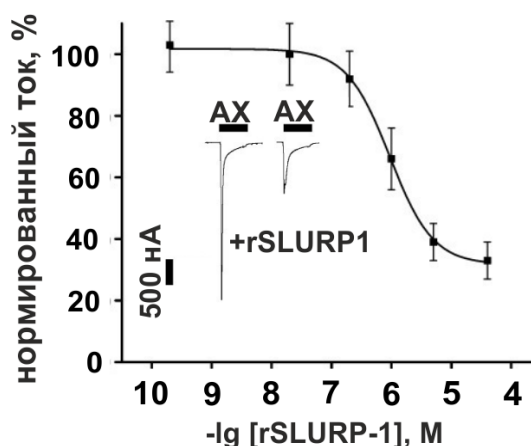


Рис 24. Ингибирование вызванных ацетилхолином токов с помощью rSLURP-1 на $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. Кривая доза-эффект для токов, вызванных 1 мМ ацетилхолина в присутствии rSLURP-1. Каждая точка - среднее $\pm$ S.E. из трех независимых экспериментов. Для описания нормализованных данных (% от контроля) было использовано уравнение Хилла. Полученные параметры IC₅₀, nM и A₁ - 940 ± 80 нМ, 1.2 ± 0.1 и 32 ± 2 % соответственно. На врезке – ответ на 1 мМ AX в отсутствие и в присутствии 13 мкМ rSLURP-1.

Ингибирующая активность 5 мкМ rSLURP-1 была протестирована при различных концентрациях ацетилхолина (1 мкМ – 1 мМ, Рис. 25а), в результате было установлено, что статистически достоверный эффект ингибирования наблюдается при концентрации ацетилхолина от 100 мкМ ($p < 0.05$, t-критерий, сравнение с величиной ответа при 1 мкМ ацетилхолина и 5 мкМ rSLURP-1). Инкубация ооцитов с 1 мкМ rSLURP-1 не вызывала сдвиг кривой чувствительности $\alpha 7$ -nAChR к ацетилхолину, что означает отсутствие конкуренции между rSLURP-1 и ацетилхолином (Рис. 25б).

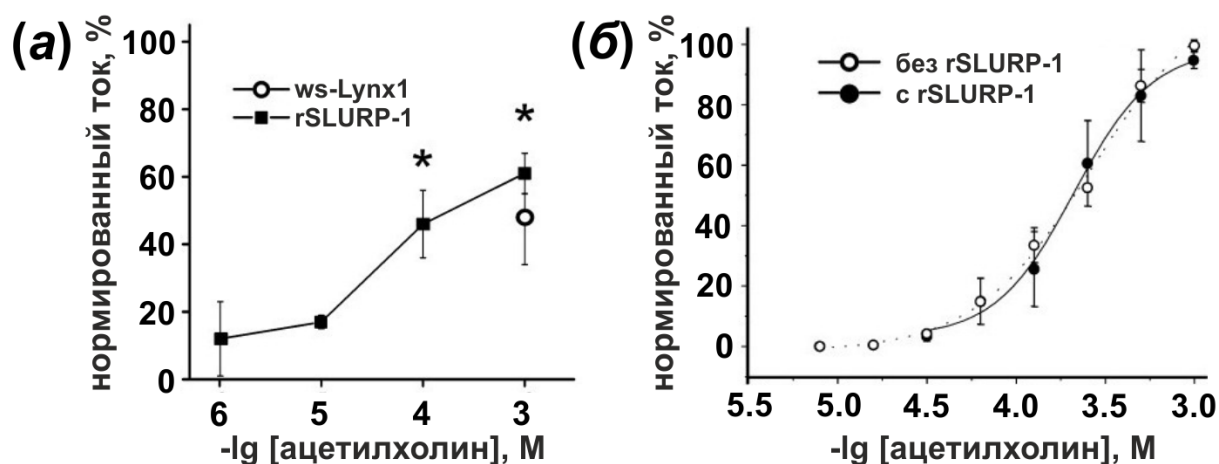


Рис. 25. rSLURP-1 не конкурирует с АХ. (а) - Зависимость эффекта от 5 мкМ rSLURP-1 на $\alpha 7$ -nAChR от концентрации ацетилхолина. Данные по ингибированию с помощью rSLURP-1 показаны закрашенными квадратами, ответ на 1 мМ АСh в присутствии 5 мкМ ws-Lynx1 - кружком. “*” - указывает на значимое отличие ($p < 0.05$, t-тест). (б). Кривая чувствительности к ацетилхолину в отсутствии (пунктирная линия, не закрашенные кружки) и в присутствии (сплошная линия, закрашенные кружки) 1 мкМ rSLURP-1.

Ранее для рекомбинантного аналога SLURP-1 с С-концевым Мус-тагом было продемонстрировано увеличение токов через $\alpha 7$ -nAChR в наномолярных концентрациях [75]. В нашей работе не было обнаружено увеличения амплитуды токов в широком диапазоне концентраций rSLURP-1 (Рис. 24). Возможно, это несоответствие определяется различием в аминокислотной последовательности различных вариантов SLURP-1. Мус-таг содержит 10 аминокислотных остатков (EQKLISEEDL), 5 из которых заряжены. Добавление такой относительно длинной отрицательно заряженной С-концевой последовательности могло повлиять на свойства молекулы SLURP-1 и ее взаимодействие с рецептором. Возможное влияние длинной С-концевой последовательности трехпетельных α -нейротоксинов из яда змей на взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR было описано ранее [70,97].

Увеличение эффекта от rSLURP-1 в присутствии высокой концентрации агониста характерно для действия лигандов на открытое состояние канала (большая доля рецепторов активируется при высокой концентрации агониста – большая доля блокируется rSLURP-1). В то же время непосредственное блокирование канала трехпетельным белком представляется маловероятным

ввиду стерических затруднений. Стоит отметить, что подобный эффект не является необычным для лигандов nAChR. Так, хорошо изученный блокатор nAChR d-тубокурарин тоже действует как блокатор открытого канала мышечных nAChR [33], но в настоящий момент для него обнаружены только сайты связывания на интерфейсе двух субъединиц, но не в устье канала [98]. Неполное ингибирование ответа на ацетилхолин даже при высоких концентрациях rSLURP-1 позволяет сделать предположение, что rSLURP-1 ингибирует токи через $\alpha 7$ -nAChR по аллостерическому механизму. Приведенные в данном разделе результаты получены с участием Кудрявцева Д.С. (лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН).

3.1.4 rSLURP-1 подавляет пролиферацию оральных кератиноцитов Het-1A

Ранее было показано, что гибридный белок SUMO-SLURP-1 (MW ~ 22 кДа, MW SLURP-1 ~ 9 кДа) ингибирует пролиферацию линии immortalized оральных кератиноцитов человека Het-1A [76], а рекомбинантный аналог SLURP-1 с N-концевым сигнальным пептидом длиной 22 а.о. (MW ~ 11 кДа, [77]) индуцирует повышение экспрессии гена NF- κ B. Подавление экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в клетках линии Het-1A (далее – кератиноциты) с помощью РНК-интерференции или ингибирование $\alpha 7$ -nAChR селективным агонистом метилликаконитином (MLA) приводили к исчезновению эффекта, вызванного этим аналогом SLURP-1 [77]. Было высказано предположение, что эффект природного SLURP-1 в кератиноцитах обеспечивается взаимодействием SLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR как агонистом [76,77].

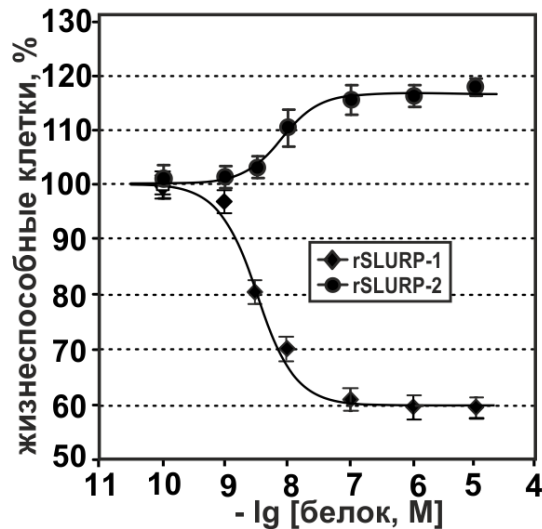


Рис. 26. Влияние rSLURP-1, rSLURP-2 на рост клеток Het-1A. Каждая точка - среднее $\pm$ S.E. из 6-12 независимых измерений с помощью WST-теста, проведенного через 48 часов после добавления рекомбинантных белков в культуральную среду. Уравнение Хилла ($y=A1+(100\%-A1)/(1+([rSLURP-1]/IC_{50})^n)$) было использовано для описания данных по rSLURP-1 и rSLURP-2 (% от контроля). Полученные параметры EC_{50} , nH и A1 были 4 ± 0.5 nM, 1.3 ± 0.2 и 60 ± 2 % для rSLURP-1; 7.6 ± 1.0 nM, 1.5 ± 0.4 и 116 ± 1 % для rSLURP-2.

В данной работе был использован рекомбинантный аналог SLURP-1 – rSLURP-1, отличающийся от природного белка только наличием N-концевого остатка метионина. Технология получения данного белка в тельцах включения в *E. coli* с последующей ренатурацией была разработана ранее и описана в [96]. Из литературных данных известно, что аналог SLURP-1, полученный секрецией в клетках HEK-293 (выход ~ 0.1 мг/л клеточной культуры) не гликозилирован [75]. Этот факт позволяет рассматривать rSLURP-1 в качестве модели SLURP-1.

При инкубации кератиноцитов Het-1A в течение 48 ч в присутствии rSLURP-1 в диапазоне концентраций от 0.1 нМ до 10 мкМ наблюдалось снижение числа жизнеспособных клеток с EC_{50} 4 нМ и максимальным эффектом в 60 ± 2 % клеток по сравнению с контрольной культурой, не подвергавшейся воздействию rSLURP-1 (Рис. 26). Измерение числа жизнеспособных клеток проводилось с помощью WST-1 – аналога тетразолиевого красителя МТТ, используемого для измерения активности клеточных оксиредуктаз. Чтобы подтвердить различие между

цитотоксичностью и сниженной пролиферацией, мы проводили дополнительное исследование клеток в лунках планшетов и измеряли их жизнеспособность с помощью окрашивания по Хехсту/йодистым пропидием. Наблюдалось явное снижение плотности клеток, в то время как 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 в эксперименте (10 мкМ): 4 ± 1 % мертвых клеток как при обработке rSLURP-1, так и в контроле, т.е. снижение числа клеток в культуре можно объяснить только снижением скорости пролиферации. Для сравнения был проанализирован рост клеток в присутствии ws-Lynx1, другого эндогенного модулятора семейства Ly-6/uPAR, действующего на nAChR [99,100] в концентрации до 1 мкМ. В этом случае снижение числа клеток не наблюдалось.

Также для уточнения механизма действия rSLURP-1 был использован неспецифический ингибитор каспазной активности z-VAD-fmk. Данное соединение блокирует ранние стадии апоптоза [101] и отсутствие влияния z-VAD-fmk на эффект rSLURP-1 (Рис. 27) свидетельствует в пользу того, что снижение количества жизнеспособных клеток не связано с апоптозом.

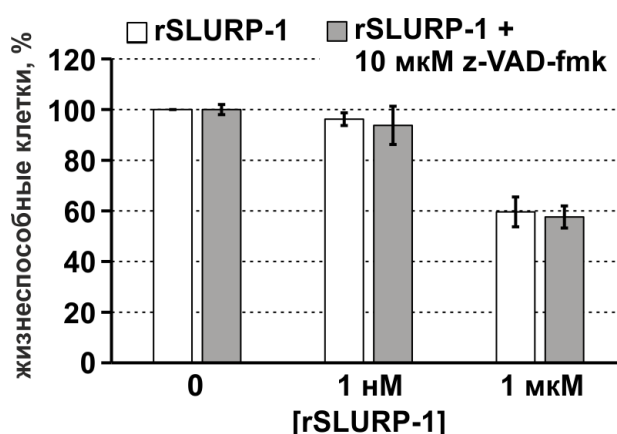


Рис. 27. Подавление пролиферации Het-1A с помощью rSLURP-1 не блокируется ингибитором ранних стадий апоптоза z-FAD-fmk. Нормированные данные WST-теста, каждый столбец – среднее из 6-8 независимых измерений $\pm$ S.E. Статистически значимые отличия внутри групп по данным t-теста отсутствуют.

Для уточнения типа рецепторов, обуславливающих действие rSLURP-1 на пролиферацию кератиноцитов, были использованы α -бунгаротоксин (конкурентный антагонист nAChR мышечного типа, а также $\alpha 7$ - и $\alpha 9$ -nAChR, α -Bgtx), мекамиламин (неспецифический блокатор трансмембранного домена nAChR, Мес) и атропин (неспецифического антагонист mAChR) а также антитела к внеклеточному домену $\alpha 7$ -nAChR (см. Рис. 28).

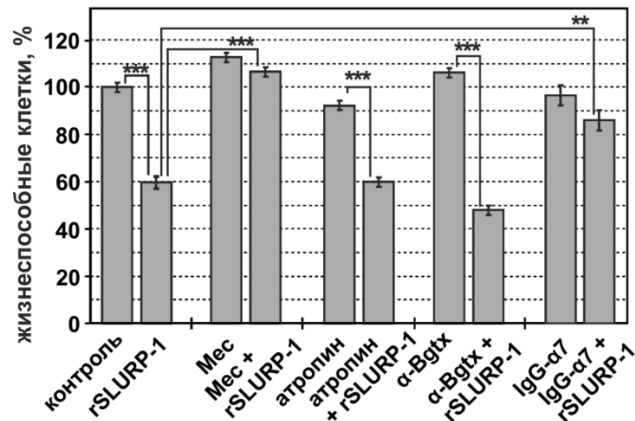


Рис. 28. Эффекты от rSLURP-1 (1 мкМ), атропина (1 мкМ), Мес (10 мкМ), α -Bgtx (1 мкМ), и их ко-аппликации. Нормированные данные WST-теста, проведенного через 48 часов после добавления рекомбинантных белков и ингибиторов в культуральную среду. Каждый столбец - среднее $\pm$ S.E. из 12 независимых экспериментов. Знаки “***” и “**” указывают на статистическую значимость различий (t-критерий, $p < 0.01$ и $p < 0.001$, соответственно).

В результате было установлено, что атропин не влияет на эффект от rSLURP-1, т.е. можно предположить, что в данный процесс не вовлечены мускариновые ацетилхолиновые рецепторы.

Мекамиламин не оказывал влияния на рост клеток сам по себе, но полностью блокировал эффект rSLURP-1 при совместном применении, т.е. можно предположить, что rSLURP-1 влияет на пролиферацию кератиноцитов именно через взаимодействие с nAChR. Антитела к внеклеточному домену $\alpha 7$ -nAChR 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. Этот факт указывает на то, что механизм действия

rSLURP-1 на пролиферацию не может быть объяснен действием только на открытие/закрытие канала nAChR, как это было предположено ранее [76,77].

3.2.5. Пространственная структура белка rSLURP-1.

Пространственная структура rSLURP-1 была исследована методом ЯМР-спектроскопии в растворе, что позволяет получить не только данные о пространственной структуре белка с атомным разрешением, но и дает информацию о динамических характеристиках молекулы, недоступную в случае использования рентгеноструктурного анализа. Были получены образцы rSLURP-1, меченные стабильными изотопами ^{15}N и ^{13}C . Ранее было показано, что в спектрах ЯМР наблюдается два набора сигналов, соответствующих двум структурным формам rSLURP-1 [96]. Согласно опубликованным данным ЯМР, эта конформационная гетерогенность вызвана цис-транс изомеризацией пептидной связи Tyr39-Pro40 с характерным временем ~ 4 мс и две структурные формы rSLURP-1 обладают примерно одинаковой заселенностью в условиях эксперимента.

Пространственная структура обоих конформеров rSLURP-1 была исследована с использованием $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -меченого образца с помощью стандартных методов гетероядерной ЯМР-спектроскопии в растворе (см. Методы) в условиях, описанных ранее [96]. Оба конформера обладали типичной трехпетельной формой с двумя антипараллельными β -слоями. Первый β -слой был сформирован двумя β -тяжами и включает остатки петли I (Leu1-Thr5 и Thr17-Cys21). Второй состоял из трех тяжей и включал фрагменты петли II (Ala26-Leu32, Thr48-Ser52) и петли III (Leu68-Cys72). Аналогично водорастворимому фрагменту белка Lynx-1 человека [99], структура rSLURP-1 включает две консервативные β -шпильки в области “головы” и C-концевой последовательности (Рис. 29). Пространственное положение C-концевой последовательности по отношению к N-концевому β -тяжу контролируется водородными связями HN Lys2 – O δ 1 Asn75 и HN Leu76 – CO Lys2.

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 конформации (Рис. 29). Полученные данные ^{15}N -релаксации демонстрируют, что отсутствие структурной конвергенции в этой области - следствие подвижности основной цепи на двух временных масштабах - пс-нс и мкс-мс.

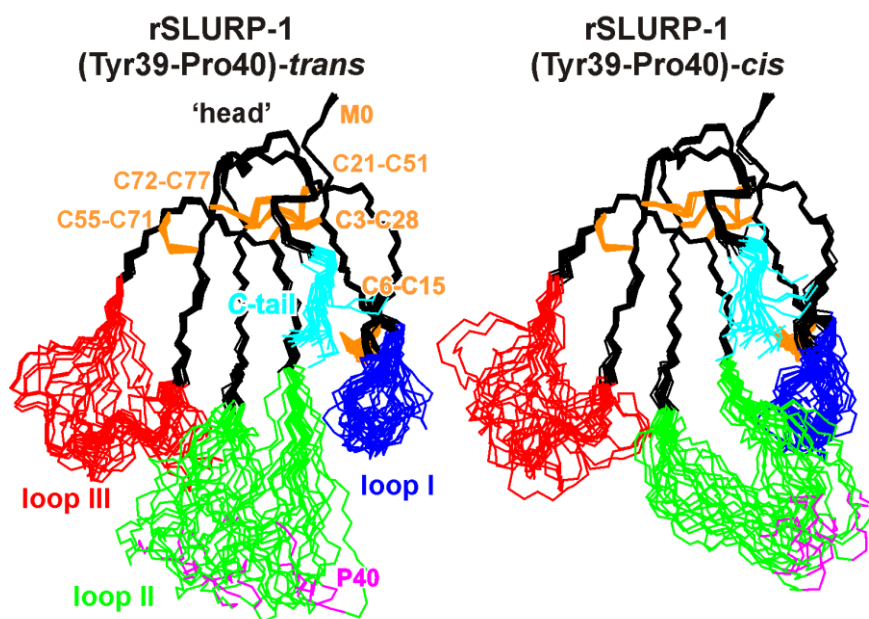


Рис. 29. Пространственная структура двух конформеров rSLURP-1 по данным ЯМР-спектроскопии. Показано наложение 20 лучших структур, цветом отмечены подвижные петлевые участки и дисульфидные связи.

Основные детерминанты взаимодействия трехпетельных лигандов nAChR расположены в их петлях [102]. Например, данные мутагенеза демонстрируют, что петля II α -нейротоксинов и петли II и III ws-Lynx1 важны для холинергической активности этих белков [70,91,103]. Полученные в данной работе структурные данные указывают на значительную конформационную подвижность всех трех петель rSLURP-1. Это отличает rSLURP-1 от других трехпетельных лигандов nAChR (змеиных α -нейротоксинов и Lynx1), для которых не наблюдается сопоставимая неупорядоченность петельных областей [99,104,105]. Сравнение аминокислотных последовательностей этих лигандов с SLURP-1 (Рис. 30) показывает значительные отличия в распределении зарядов в петельных

областях. В отличие от молекул Lynx1 и α -нейротоксинов, которые заряжены положительно, молекула SLURP-1 имеет отрицательный суммарный заряд. Измененное распределение зарядов и отличия в структурных и динамических свойствах подразумевают, что сайт взаимодействия rSLURP-1 с nAChR может отличаться от сайта взаимодействия, характерного для других трехпетельных белков.

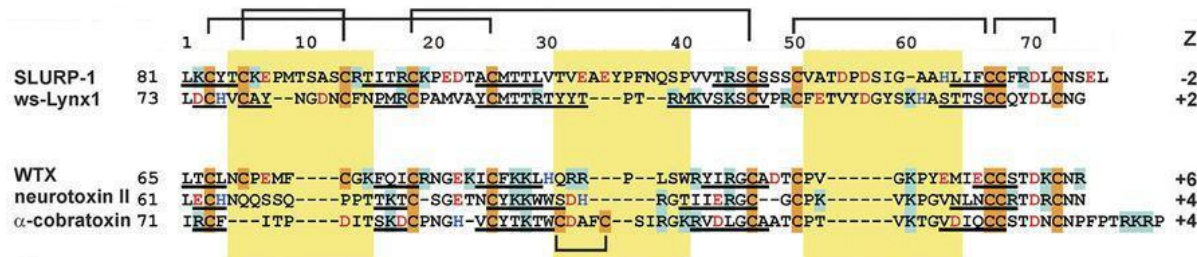


Рис. 30. Выравнивание аминокислотной последовательности SLURP-1 с другими Ly-6/uPAR белками человека и трехпетельными змеиными нейротоксинами. Последовательность водорастворимого домена Lynx-1 человека (ws-Lynx1) показана без консенсусного сайта присоединения GPI-якоря на С-конце. Положительно заряженные (Arg/Lys), отрицательно заряженные (Asp/Glu), и аминокислотные остатки His и Cys отмечены цветом. Фрагменты, соответствующие β -тяжам в пространственной структуре белков - подчеркнуты. Регионы, соответствующие петлям - помечены желтыми прямоугольниками.

Высокая подвижность больших фрагментов rSLURP-1 (~60% остатков rSLURP-1 участвуют в интенсивных движениях на пс-нс и/или мкс-мс масштабах) напоминает ситуацию с внутренне неупорядоченными белками, некоторые из которых играют ключевую роль в процессах сигнализации и регуляции в клетках [106]. Возможно, неупорядоченные фрагменты SLURP-1 могут обеспечивать обратимое взаимодействие с несколькими белками-мишенями или несколькими сайтами на поверхности одного рецептора, что объясняет одновременную модуляцию активности канала $\alpha 7$ -nAChR в электрофизиологических экспериментах (см. раздел 3.1.3) и не связанный с прохождением тока через канал эффект подавления пролиферации в кератиноцитах (см. раздел 3.1.4). Приведенные в данном разделе данные

получены при участии Парамонова А.С. и Шенкарева З.О. (Отдел структурной биологии ИБХ РАН).

3.2. Рекombинантный SLURP-2: мишени, механизм действия, пространственная структура

3.2.1 Аффинная экстракция мишени rSLURP-2

Для уточнения типов субъединиц nAChR, являющихся мишенями SLURP-2, был проведен эксперимент с аффинной экстракцией субъединиц nAChR, аналогичный описанному выше для rSLURP-1 (см. раздел 3.1.1).

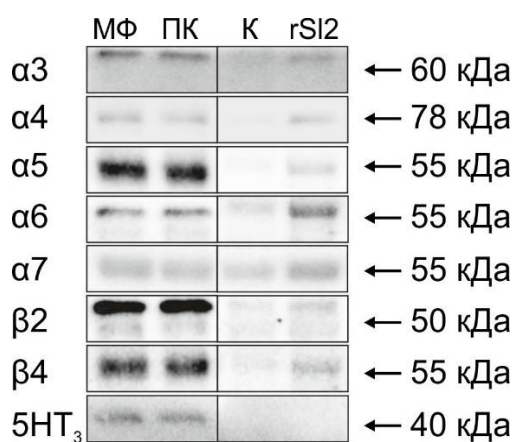


Рис. 31. Аффинная экстракция субъединиц nAChR с помощью rSLURP-2 из мембранной фракции головного мозга человека. «МФ» - мембранная фракция до инкубации с магнитными частицами, «ПК» - мембранная фракция после инкубации с магнитными частицами, «К» - контроль (магнитные частицы без иммобилизованного белка), rSl2 – магнитные частицы с иммобилизованным белком. α3-α7 и β2- β4 – окрашивание с первичными антителами к соответствующим субъединицам nAChR, 5-НТ3 – окраска с антителами к серотониновому рецептору 3А типа (контроль неспецифического взаимодействия). Указаны примерные молекулярные массы для детектированных полос, определенные по маркеру молекулярных весов.

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: α3, α4, α5, α7, β2, и β4 (Рис. 31). Как и в случае с rSLURP-1, связывания с серотониновым рецептором 5-НТ3 не наблюдалось. Для α6 наблюдается только небольшое различие между

магнитными частицами с rSLURP-2 и контрольным образцом, которое не позволяет говорить о специфичности связывания этой субъединицы. Приведенные в данном разделе результаты получены с участием проф. Томсена М.С. (отдел дизайна лекарств и фармакологии, Университет Копенгагена, Дания)

3.2.2 Действие rSLURP-2 на функцию ионного канала nAChR

Действие rSLURP-2 было охарактеризовано на $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR (широко распространенные в теле человека и фармакологически важные nAChR), экспрессированных в ооцитах *X. laevis*.

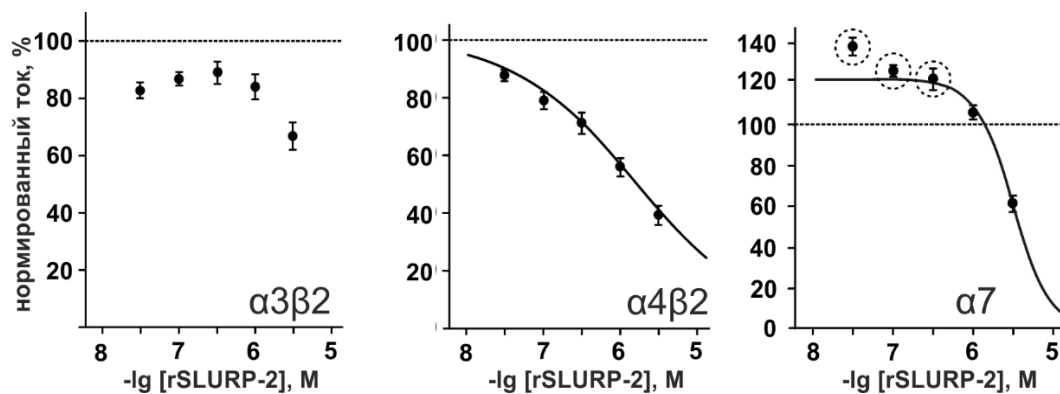


Рис. 32. Действие rSLURP-2 на $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*. Кривые доза-ответ для различных концентраций rSLURP-2 при стимуляции 100, 10, 100 мкМ ацетилхолина на $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, и $\alpha 7$ nAChRs, соответственно. Концентрации ацетилхолина были близки к половине эффективной концентрации (EC_{50}) ацетилхолина для соответствующих типов рецепторов [107]. Каждая точка представляет собой среднее $\pm$ S.E. из 7, 6 и 7 независимых экспериментов, соответственно. Уравнение Хилла ($y = A_0 / (1 + ([rSLURP-2] / IC_{50})^{nH})$) использовалось для описания нормализованных данных (% от контроля), полученных для $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ рецепторов. Для $\alpha 4\beta 2$ рецептора значение параметра масштаба (A_0) было зафиксировано на 100%. Полученное значение A_0 для $\alpha 7$ рецептора составляло $122 \pm 3\%$. Полученные параметры IC_{50} и nH составляли 1.7 ± 0.4 мкМ и 0.54 ± 0.03 , 3.0 ± 0.2 мкМ и 1.90 ± 0.14 , для $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ рецепторов, соответственно.

Амплитуда ответов, вызванных стимуляцией 100 мкМ ацетилхолина, сравнивалась с амплитудой ответов, полученных при предварительной инкубации ооцитов, записанных в присутствии 30 нМ - 3 мкМ rSLURP-2. Полученные результаты показали, что аппликация только rSLURP-2 не

вызывает токов ни через один из исследуемых типов рецепторов. Воздействие rSLURP-2 при стимуляции рецепторов ацетилхолином (Рис. 32) приводило к умеренному эффекту ингибирования для $\alpha 3\beta 2$ nAChR ($IC_{50} > 3$ мкМ), для $\alpha 4\beta 2$ наблюдался отчетливый концентрационно-зависимый эффект ($IC_{50} \sim 1.7$ мкМ). rSLURP-2 ингибировал $\alpha 7$ рецептор с $IC_{50} \sim 3$ мкМ, однако при низких концентрациях rSLURP-2 (< 1 мкМ) наблюдалось увеличение ответа, вызванного ацетилхолином, по сравнению с контролем.

Увеличение вызванных ацетилхолином токов, наблюдаемое на кривой доза-ответ для rSLURP-2 и $\alpha 7$ -nAChR напоминает ранее описанное действие низких концентраций конкурентного ингибитора тубокурарина на $\alpha 3\beta 4$ рецепторы [108]. Было установлено, что связывание тубокурарина при низкой концентрации в одном сайте способствует открытию канала при действии ацетилхолина. Похожие наблюдения и выводы были сделаны для некоторых холинергических препаратов (атропин, скополамин, физостигмин), которые демонстрировали конкурентную активность в отношении $\alpha 4\beta 2$ рецепторов [109]. Увеличение вызванных ацетилхолином токов при низких концентрациях лиганда было также описано для частичных агонистов $\alpha 7$ -nAChR - RG3487 [110] и энцениклина (EVP-6124) [111] и было названо эффектом «прайминга».

Для дальнейшего исследования предполагаемого эффекта прайминга, вызванного rSLURP-2, были проведены эксперименты с нерегулярной стимуляцией рецепторов. Как показано на Рис. 33а, воздействие 30 нМ rSLURP-2 приводит к потенциации вызванных никотином токов через $\alpha 7$ -nAChR. Потенциация наблюдаемых токов с использованием этого экспериментального протокола соответствует увеличенному ответу на ацетилхолин на кривой “доза-ответ” для $\alpha 7$ -nAChR, хотя амплитуда эффекта была значительно выше.

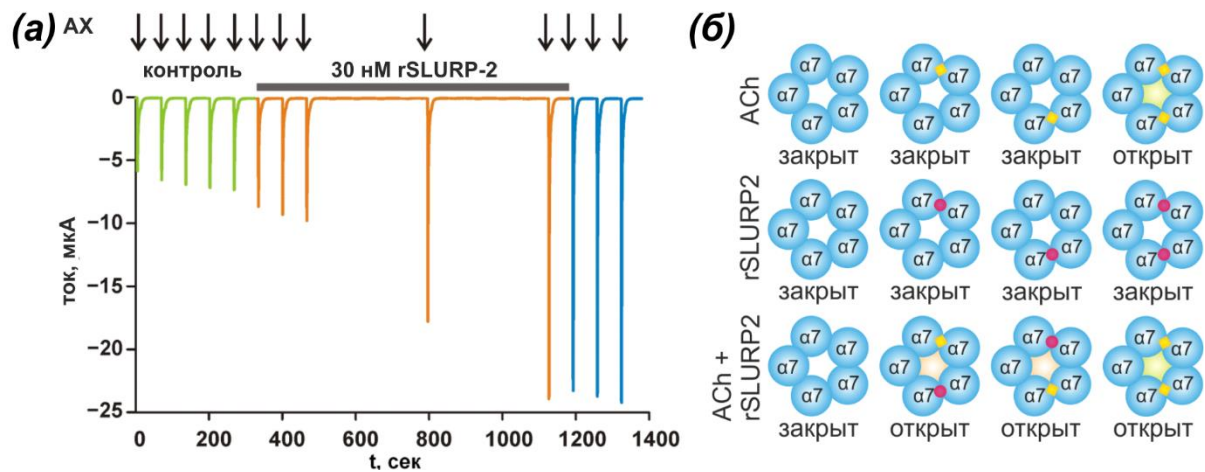


Рис. 33. Эффект «прайминга». (а) - электрофизиологические данные по вызванным ацетилхолином токам через $\alpha 7$ -nAChR в отсутствии и в присутствии 30 нМ rSLURP-2. Токи вызывались 5-секундными импульсами 40 мкМ ацетилхолина. Импульсы ацетилхолина чередовались с их отсутствием. Показана репрезентативная кривая из 9 независимых экспериментов. Зеленые кривые показывают ответ, вызванный только ацетилхолином, оранжевые - такой же импульс ацетилхолина в присутствии rSLURP-2, синие - ответ, вызванный ацетилхолином после прекращения воздействия rSLURP-2. (б) – схема предполагаемого эффекта прайминга SLURP-2 на $\alpha 7$ -nAChR. Молекулы ацетилхолина и rSLURP-2 показаны желтыми ромбами и красными кругами, соответственно. Открытые каналы $\alpha 7$ -nAChR показаны зеленым и оранжевым цветом пор. Поры закрытых каналов показаны белым цветом.

Гипотеза об эффекте увеличения активности (прайминга) rSLURP-2 по отношению к $\alpha 7$ -nAChR проиллюстрирована на Рис. 33б. Рецепторы состоят из пяти одинаковых субъединиц и активируются взаимодействием как минимум с двумя молекулами ацетилхолина. В то же время, связывание rSLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR не вызывает открытия канала. Если концентрация rSLURP-2 невелика, то только некоторые рецепторы связаны с одной или двумя молекулами rSLURP-2 и каналы остаются закрытыми. Добавление ацетилхолина при низкой концентрации rSLURP-2 приводит к ситуации, когда в некоторой фракции рецепторов одновременно связаны одна молекула ацетилхолина и одна молекула rSLURP-2. Такие рецепторы с двумя лигандами активируются (обозначено оранжевой серединой на Рис. 33б), и, в среднем по популяции, будет протекать больший ток по сравнению с контролем. В этом случае будут существовать два типа активированных

рецепторов: только с ацетилхолином и с ацетилхолином и rSLURP-2. Таким образом, rSLURP-2 может вызывать прайминг ответа на ацетилхолин. Ингибирование $\alpha 7$ -nAChR, наблюдаемое при высокой концентрации rSLURP-2 может объясняться или конкуренцией между ацетилхолином и SLURP-2 за связывание с рецептором, или десенситизацией $\alpha 7$ -nAChR при продолжительном воздействии rSLURP-2. Приведенные в данном разделе данные получены при участии Д. Бертрана (компания HiQScreen, Швейцария).

3.2.3. 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, максимальный эффект составлял 116% по сравнению с контролем ($p < 0.01$, $n = 12$, Рис. 34). Кривая концентрационной зависимости этого эффекта описывалась уравнением Хилла с $EC_{50} \sim 8$ нМ и $nH \sim 1.5$.

Для уточнения роли различных типов nAChR и mAChR в этом эффекте были использованы различные ингибиторы, такие как α -Bgtx (ингибитор $\alpha 7$, $\alpha 9$ и мышечных nAChR), α -конотоксин МП (ингибитор $\alpha 3\beta 2$ -nAChR), мекамиламин (неселективный ингибитор nAChR), атропин (неселективный ингибитор mAChR). α -Bgtx и Мес не оказывали статистически значимого влияния на рост клеток, а α -конотоксин МП снижал число жизнеспособных клеток до ~ 87 % по сравнению с контролем. Преинкубация кератиноцитов с α -Bgtx привела примерно к двукратному росту числа жизнеспособных клеток в присутствии rSLURP-2 (Рис. 34). С другой стороны, совместная инкубация 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).

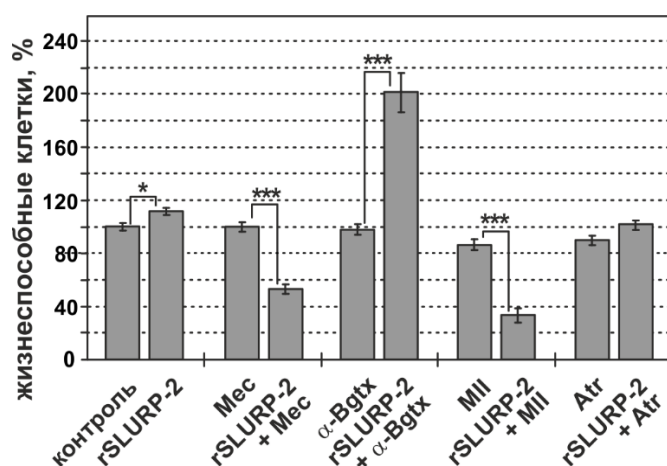


Рис. 34. Влияние rSLURP-2 (1 мкМ), атропина (Atr, 1 мкМ), мекамиламина (Mec, 10 мкМ), α -Bgtx (1 мкМ), конотоксина МII (1 мкМ) и их совместного применения на рост клеток Het-1A через 48 часов. Каждый столбец - среднее $\pm$ S.E. из четырех независимых экспериментов с тремя повторами в каждом. Попарное сравнение данных для групп с и без обработки rSLUP-2 было сделано с помощью t-критерия. Множественные сравнения всех экспериментальных групп с “контрольной” группой и с группой “rSLURP-2” были проведены с помощью ANOVA с пост-тестом Даннета на множественные сравнения. Количество символов «*» обозначает уровень значимости t-критерия: 1 символ – $p < 0.05$, 2 - $p < 0.01$, 3 - $p < 0.001$.

Аналогично rSLURP-1, окрашивание по Хехсту/йодистым пропидием показало, что доля мертвых клеток при обработке rSLURP-2 и rSLURP-2 + мекамиламин или конотоксин МII составляет $\sim 4 \pm 1\%$ (столько же - в контрольном образце), морфология ядер остается неизменной по сравнению с контролем. Таким образом, уменьшение числа жизнеспособных клеток по сравнению с контролем в данном эксперименте связано со снижением пролиферации, а не с цитотоксичностью.

Обнаруженный антипролиферативный эффект при совместном применении Mec 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.

3.2.4. Влияние rSLURP-2 на связывание лигандов mAChR

Для изучения возможности специфического взаимодействия rSLURP-2 с различными mAChR были использованы мембраны клеток CHO, гиперэкспрессирующих отдельные типы этих рецепторов (клеточные линии предоставлены проф. Т.И. Боннером). 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 $K_a \sim 230$ и 140 нМ, соответственно (Рис. 35а и 35б). С другой стороны, не наблюдалось влияния на связывание NMS с M2, M4 и M5 mAChR при относительно большой концентрации rSLURP-2 - 1.4 мкМ (Рис. 36а).

Чтобы провести различие между ортостерическим и аллостерическим режимом взаимодействия rSLURP-2 с mAChR, было измерено влияние rSLURP-2 на скорость диссоциации ^3H -NMS на рецепторах M1 и M3 типа (Рис. 36б). Скорости диссоциации ^3H -NMS в присутствии rSLURP-2 изменились по сравнению с контрольным экспериментом ($n=4$, $p < 0.05$). Скорость диссоциации (мин^{-1}) увеличилась с 0.082 ± 0.002 до 0.093 ± 0.002

($n=4$, $p < 0.05$) для M1 рецептора, и снизилась с 0.066 ± 0.001 до 0.059 ± 0.002 ($n=4$, $p < 0.05$) для M3 рецептора. Эти данные говорят в пользу аллостерической природы взаимодействия rSLURP-2/mAChR.

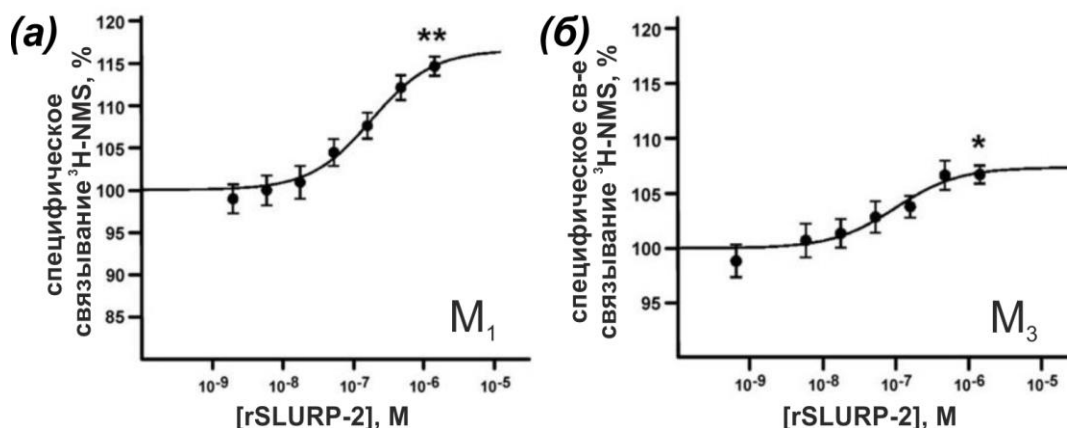


Рис. 35. rSLURP-2 увеличивает $^3\text{H-NMS}$ с M1- (а) и M3-mAChR (б). Каждая точка - среднее $\pm$ S.E. из четырех независимых экспериментов по 4 повтора в каждом. Для описания нормализованных данных использовалось следующее уравнение: $y = 100 * ([\text{NMS}] + K_d) / \{[\text{NMS}] + K_d \cdot (K_a + [\text{rSLURP-2}]) / (K_a + [\text{rSLURP-2}] / \alpha)\}$. K_d для связывания $^3\text{H-NMS}$ (197 и 187 pM для M1 и M3 mAChR, соответственно), определяли параллельно в экспериментах с насыщением. Полученные параметры K_a (равновесная константа диссоциации rSLURP-2) и α (фактор кооперативности) составляли 231 ± 81 нМ и 1.296 ± 0.051 , 144 ± 56 нМ и 1.128 ± 0.013 , для M1 и M3 рецепторов, соответственно. * и ** соответствуют $p < 0.05$, $p < 0.01$, по t-критерию при сравнении с контролем.

Так как оральные кератиноциты, использованные в работе, не экспрессируют M1-mAChR [4], вероятно, мишенью rSLURP-2 в кератиноцитах являются M3-mAChR. Полученные данные позволяют предположить, что SLURP-2 участвует в разных стадиях созревания клеток путем взаимодействия с различными типами ацетилхолиновых рецепторов, экспрессия которых меняется на различных стадиях 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.

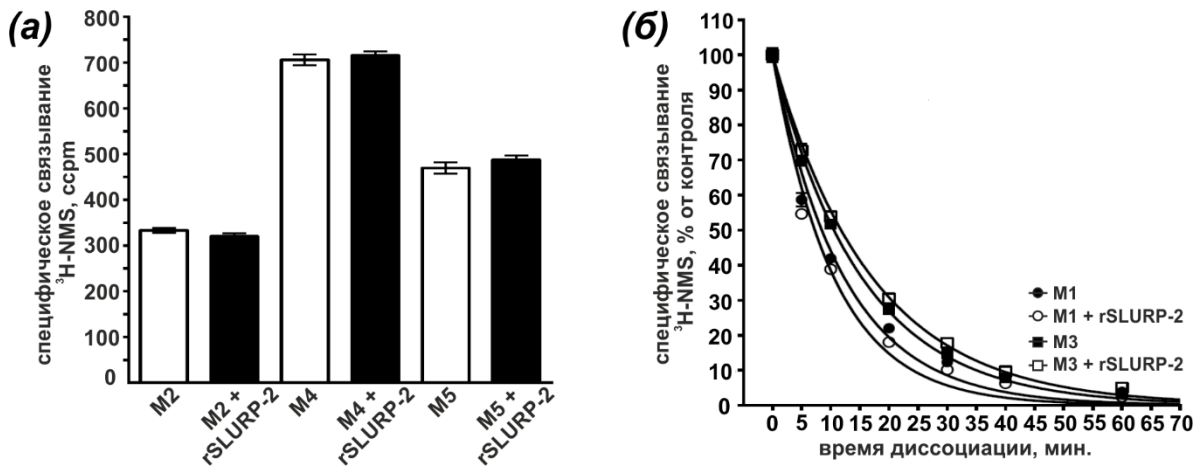


Рис. 36. Действие rSLURP-2 на M2-, M4-, M5-mAChR и кинетика диссоциации NMS. (А) - влияние rSLURP-2 на связывание $^3\text{H-NMS}$ с M2, M4 и M5 mAChR в присутствии 1.4 мкМ rSLURP-2 и 150 пМ $^3\text{H-NMS}$. Столбцы представляют среднее $\pm$ S.E. специфического связывания $^3\text{H-NMS}$ в двух независимых экспериментах, в каждом из которых 4 повтора. (Б) - влияние rSLURP-2 на скорость диссоциации $^3\text{H-NMS}$ с M1 и M3 mAChR. Нормализованные данные (% от контроля) описывали с помощью уравнения экспоненциального спада. Присутствие 4.2 мкМ rSLURP-2 (на врезке) изменило константу скорости диссоциации $^3\text{H-NMS}$ (K_{off} , min^{-1}) с 0.082 ± 0.002 до 0.093 ± 0.002 ($n=4$, $p<0.05$, t-критерий) и с 0.066 ± 0.001 до 0.059 ± 0.002 ($n=4$, $p<0.05$, t-критерий) для M1 и M3 рецепторов, соответственно. Константы скорости диссоциации представлены как среднее $\pm$ S.E. от величин, полученных в 4 независимых экспериментах по 3 повтора в каждом.

Интересно, что другие Lu-6/uPAR белки также могут взаимодействовать с nAChR и mAChR. Так, были описаны слабые аллостерические взаимодействия ws-Lynx1 [99] и змеиного токсина WTX [91] с mAChR. Данные результаты были получены при участии В. Долежала (Институт физиологии Академии наук Чехии, Прага).

3.2.5. 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 $^1\text{H}_\text{N}$ от 7.1 до 9.7 м.д.) соответствовал структурированной форме rSLURP-2, другой (дисперсия хим.

сдвигов $^1\text{H}_\text{N}$ от 7.7 до 8.9 м.д.) – вероятно, неструктурированной форме. Снижение дисперсии хим. сдвигов ^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 pH $\sim$ 2.5.

При 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 $^1\text{H}_\text{N}$, что может свидетельствовать о неспецифической агрегации. Сигналы от двух форм rSLURP-1 наблюдались при 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 двух форм (мономерной/структурированной и агрегированной/неструктурированной) 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 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.

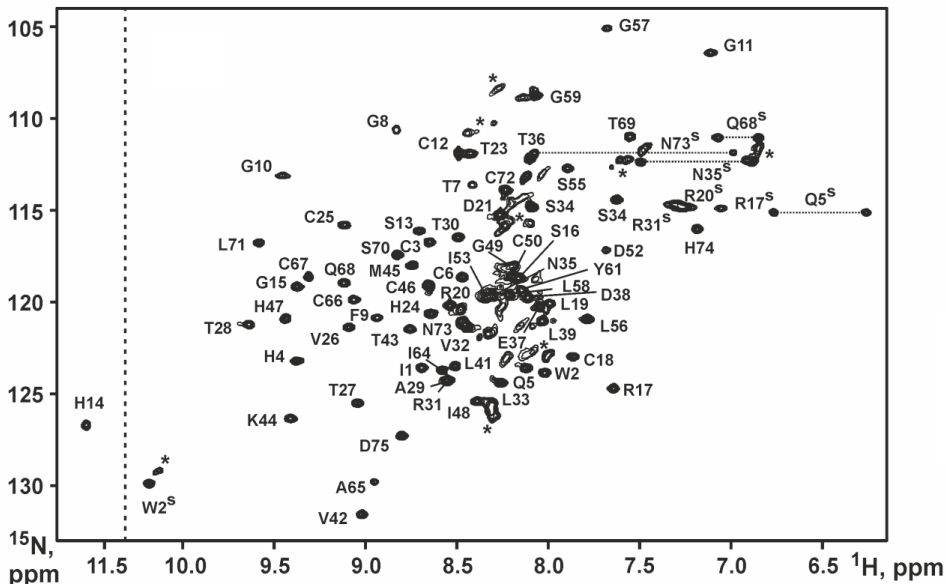


Рис. 37. Отнесение сигналов rSLURP-2 в спектре ЯМР. 2D ^1H , ^{15}N -HSQC спектр rSLURP-2 (0.5 mM, 5% диоксан, pH 5.0, 37°C). Указаны отнесения резонансов. Резонансы боковых цепей отмечены верхним индексом “s.” Сигналы, относящиеся к несвернутому/агрегированному белку помечены звездочкой “*”. Относительная заселенность этих форм не превышает 10%.

Полученные данные ЯМР показывают, что rSLURP-2 имеет типичную трехпетельную структуру, состоящую из двух антипараллельных β -слоев (Рис. 38). Первый β -слой состоит из двух β -тяжей и включает в себя остатки из петли I (Ile1-His4, Gly15-Cys18). Второй слой состоит из трех тяжей, которые образованы остатками из петли II (His24-Thr30, Leu41-His47) и петли III (Ile64-Cys67). Аналогично белку Lynx1 [99], rSLURP-2 включает несколько консервативных β -поворотов в области “головы” и в C-концевой последовательности. Молекула rSLURP-2 стабилизирована четырьмя дисульфидными связями в “голове” (Cys3-Cys25, Cys18-Cys46, Cys50-Cys66 и Cys67-Cys72) и одной в первой петле (Cys6-Cys12).

Похожее расположение дисульфидных связей наблюдается в других Ly-6/uPAR белках и “нетипичных” нейротоксинах из яда змей, например, в “слабом” токсине из яда *Naja kaouthia* (WTX) (Рис. 30). Кроме стандартных водородных связей в основной цепи, связанными с каноническими элементами вторичной структуры, “голова” и петли белка стабилизированы дополнительными водородными связями и электростатическими

взаимодействиями (Рис. 38б). Например, две водородные связи (HN Leu71 – CO Trp2 и HN Lys44 – CO Cys6) контролируют ориентацию петли I в пространстве по отношению к C-концевой последовательности и петле II, соответственно. Предполагаемый солевой мостик (Arg31 – Glu37) и водородная связь (HN His14 - N δ 1 His4) связывают петлю I и петлю II между собой. Интересно, что похожая N-H $\cdots$ N водородная связь была ранее обнаружена в водорастворимом домене человеческого Lynx1 [100]. Образование этой связи “боковая цепь - основная цепь” приводит к значительному сдвигу соответствующего $^1\text{H}_\text{N}$ резонанса в сторону слабого поля (~ 11.6 ppm, Рис. 37).

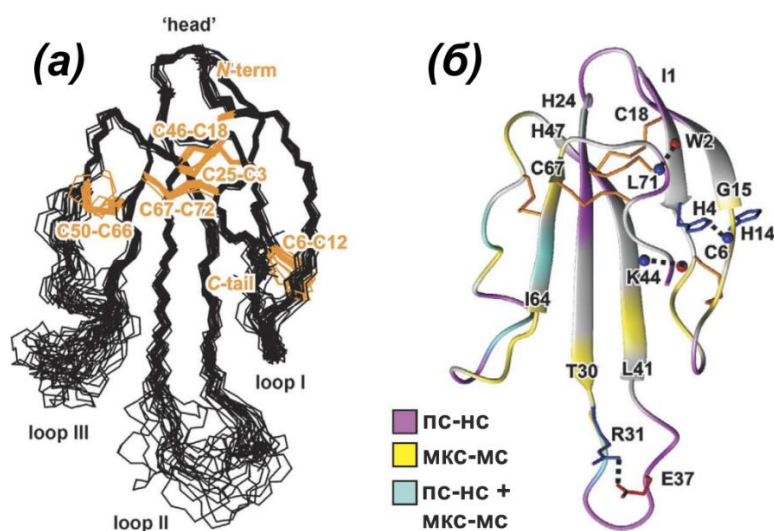


Рис. 38. Пространственная структура rSLURP-2. (а) - Набор 20 лучших структур rSLURP-2, наложенных друг на друга по атомам основной цепи в регионах с хорошо упорядоченной структурой. Три петли rSLURP-2 подписаны «loop I»-«loop III», «голова» - «head». Дисульфидные связи показаны оранжевым. (б) - Ленточное представление пространственной структуры rSLURP-2 с наложенными данными о динамике, полученными с помощью ЯМР. Скорость ^{15}N релаксации измеряли при 60 МГц (pH 5.0, 37°C) 0.08 мМ rSLURP-2 в воде без добавления диоксана. Отмечены фрагменты основной цепи, участвующие в динамических процессах на пс-нс масштабах (гетероядерный NOE < 0.7) или мкс-мс масштабе (произведение $R_1 \cdot R_2 > 20 \text{ s}^{-2}$ или сигналы H_N уширены больше, чем предел детектирования). Отмечены дополнительные электростатические и водородные связи, стабилизирующие структуру белка. Амидные и карбонильные группы основной цепи отмечены синими и красными сферами, соответственно.

Пространственная структура rSLURP-2 стабильна только в консервативном β -структурном ядре, в то время как концевые участки всех трех петель - неупорядоченные. 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.

Данные ЯМР указывают на структурное сходство rSLURP-2 с другими Ly-6/uPAR белками. Молекула rSLURP-2 содержит β -структурное ядро с тремя выступающими петлями. Петли rSLURP-2 демонстрируют значительную конформационную подвижность (Рис. 38а). Высокая подвижность петель, как предполагается — один из факторов, обуславливающих способность ws-Lynx1 и WTX взаимодействовать как с nAChR, так и с mAChR, хотя и с довольно низкой аффинностью (в мкМ диапазоне) [91,99]. Для сравнения, змеиные токсины, у которых в основном более упорядоченные петли, взаимодействуют с nAChR с высокой специфичностью в нМ концентрациях [112].

Сравнение последовательностей SLURP-2 с другими трехпетельными белками, действующими на nAChR, показывает значительные отличия в распределении зарядов в петлях (Рис. 30). В отличие от Lynx1 и α -нейротоксинов, которые заряжены положительно, молекула rSLURP-2 имеет отрицательный суммарный заряд. Нетипичные структурные и динамические свойства петель SLURP-2 по сравнению Lynx1, SLURP-1 и α -нейротоксинами могут подразумевать дугой характер взаимодействия с nAChR. Приведенные в данном разделе данные получены при участии Парамонова А.С. и Шенкарева З.О. (Отдел структурной биологии ИБХ РАН).

3.2.6. Моделирование комплексов rSLURP-2 с nAChR.

Изменяющаяся активность rSLURP-2 в присутствии селективных ортостерических антагонистов nAChR (α -Bgtx и конотоксин MII) 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 так называемую С-петлю основной субъединицы [71]. 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 [71].

Чтобы учесть структурную подвижность каждого из партнеров, были проведены симуляции методом молекулярной динамики (MD) в ячейке с явно заданной водой отдельно для rSLURP-2 и лиганд-связывающих доменов рецептора. Последующая кластеризация результатов привела к формированию конформационных ансамблей, которые были использованы при расчете белок-белкового докинга. Для $\alpha 7$ -nAChR в полученных структурных ансамблях конформация С-петли значительно отличалась для различных интерфейсов связывания rSLURP-2 на поверхности рецептора. Конформации с “закрытым” и “открытым” ортостерическим сайтом отличались положением С-петли основной субъединицы рецептора. В тоже время для $\alpha 3\beta 2$ -nAChR наблюдалась только «закрытая» конформация С-петли. 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.

В комплексе с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, rSLURP-2 взаимодействовал с ортостерическим сайтом с помощью петель I и II, при этом конец петли II располагался под петлей C $\alpha 3$ субъединицы. В случае $\alpha 7$ -nAChR с “закрытым” ортостерическим сайтом, rSLURP-2 взаимодействовал с рецептором петлями II и III и его вытянутая петля III проникала в ортостерический сайт. Для комплекса rSLURP-2 с “открытым” ортостерическим сайтом $\alpha 7$ -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 C-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. 39).

«Закрытое» положение C-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 [25,99]. Однако, в вышеупомянутой модели Lynx1 взаимодействовал с внешней стороной C-петли AChBP. «Открытая» конформация C-петли, наблюдаемая в данной работе для $\alpha 7$ -nAChR напоминает позицию C-петли в кристаллических структурах AChBP и химеры $\alpha 7$ /AChBP в комплексе с антагонистами.

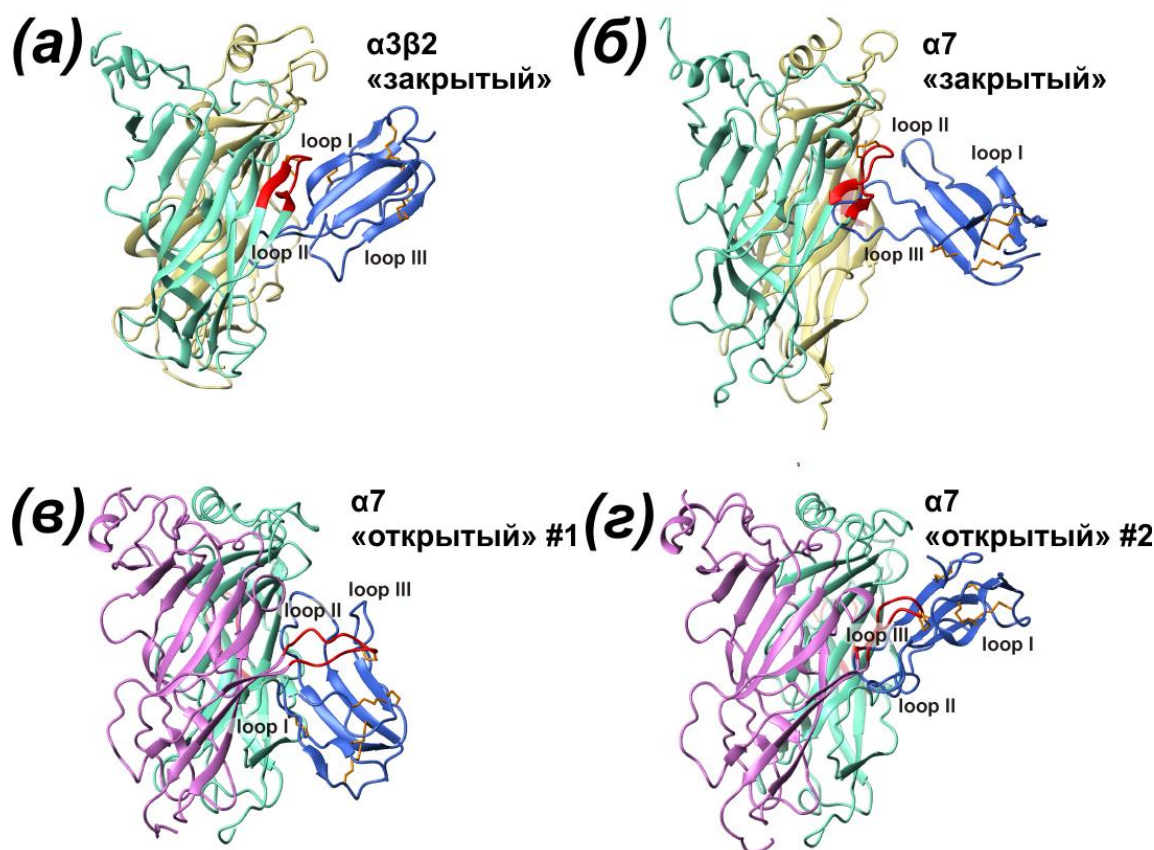


Рис. 39. Комплексы rSLURP-2 с внеклеточными доменами $\alpha\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR. (а, б). rSLURP-2 с «закрытыми» ортостерическими сайтами в $\alpha\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR. (в, г). Два решения комплекса rSLURP-2 с «открытым» ортостерическим сайтом в $\alpha 7$ -nAChR. Показаны боковые виды полученных моделей. Молекула rSLURP-2 показана синим цветом, а ее дисульфидные связи оранжевым цветом. Три петли rSLURP-2 подписаны. Для рецептора $\alpha\beta 2$ 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.

Важно отметить, что во всех смоделированных комплексах интерфейсы взаимодействия $\alpha\beta 2$ - 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 $\alpha\beta 2$ - 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.

3.3. Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 на пролиферацию раковых клеток

3.3.1 rSLURP-1 и rSLURP-2 подавляют рост раковых линий эпителиального происхождения

Ранее в отделе биоинженерии ИБХ РАН была показана антипролиферативная активность белков SLURP по отношению к линии колоректальной аденокарциномы HT-29 [113]. 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 или меланома), A549 (аденокарцинома базального альвеолярного эпителия), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), 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. 40), в то время как морфология клеток оставалась неизменной. 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 до 3.1 нМ и снижением числа жизнеспособных клеток до 40-70 % (Рис. 40). 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 [114]. Для всех протестированных клеточных линий α -Bgtx ингибировал пролиферацию с EC_{50} в диапазоне от 0.01 to 1.4 нМ.

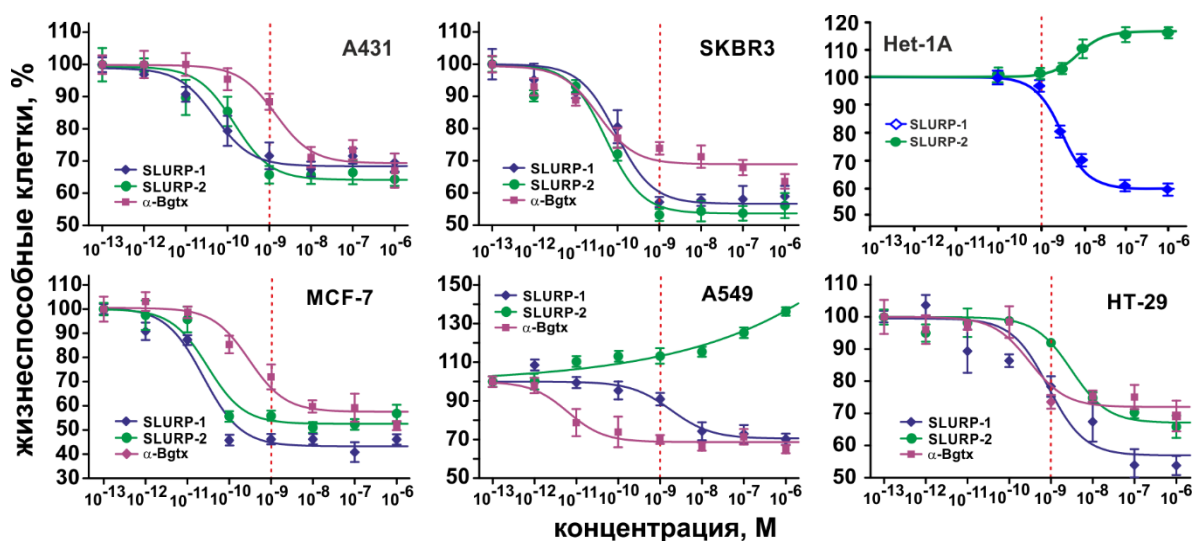


Рис. 40. Влияние rSLURP-1 и rSLURP-2 на рост раковых клеток эпителиального происхождения через 24 ч. Для сравнения приведены данные для кератиноцитов Het-1A и колоректальной карциномы HT-29 (адаптировано из [113]). Данные представлены как среднее $\pm$ S.E. из $n = 6$ независимых измерений, «*» означает $p < 0.05$ по сравнению с контролем с 0.001 нМ rSLURP-1 (0.1 нМ для Het-1A) с использованием ANOVA с post-hoc тестом Даннета на множественные сравнения.

В отношении SLURP-1 и SLURP-2 существует предположение [82], что они выполняют функцию ауто- и паракринных регуляторов, контролирующих рост, дифференциацию и миграцию кератиноцитов. Согласно представленным выше данным (Рис. 40) rSLURP-1 и rSLURP-2 могут также регулировать рост злокачественных клеток. Все исследованные клеточные линии экспрессируют гены, кодирующие несколько субъединиц никотиновых ацетилхолиновых рецепторов ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$, и $\beta 4$), которые, предположительно, являются мишенями действия белков SLURP (Рис. 22 и 31). В то же время, эффекты SLURP на разные эпителиальные клеточные линии не одинаковы. Так, SLURP-1 и SLURP-2 приводят к значительному

снижению пролиферации клеточных линий A431, SKBR3 и MCF-7 (Рис. 40), но продолжительность этих эффектов не одинакова. В случае SKBR3 и MCF-7 однократное применение 1 нМ SLURP приводило к антипролиферативному эффекту, длящемуся как минимум 48 ч, в то время как для A431 антипролиферативный эффект наблюдался на 24 ч и исчезал через 48 ч. Вероятно, существуют некоторые факторы, определяющие величину и направление эффекта от SLURP. В частности, к таким факторам могут относиться эндогенные SLURP-1 и SLURP-2 (точнее, уровни их экспрессии и секреции). Данные ПЦР подтверждают, что гены *SLURP-1* и *SLURP-2* экспрессируются в изучаемых клетках, однако уровни экспрессии белков SLURP-1 и SLURP-2 в этих культурах в настоящий момент остаются неизученными. Следует отметить, что экзогенный SLURP-1 может модулировать уровень секреции эндогенного SLURP-1, как это показано далее для A431 (Рис. 46). В этом случае на уровень пролиферации клеток может влиять как увеличение количества молекул SLURP, взаимодействующих с рецепторами на поверхности клетки, так и уменьшение количества молекул SLURP, взаимодействующих с пока не установленными внутриклеточными рецепторами.

В случае линии карциномы легких A549, SLURP-1 ингибировал пролиферацию клеток, а SLURP-2 – стимулировал ее (Рис. 40). Ранее подобные разнонаправленные эффекты наблюдались для линии нормальных кератиноцитов Het-1A (Рис. 26). SLURP-1 – антагонист $\alpha 7$ -nAChR, в то время как SLURP-2 может вызывать активацию $\alpha 7$ -nAChR в низких концентрациях в присутствии агонистов, например ацетилхолина (см. Рис. 32). Клетки линий Het-1A и A549 имеют значительно более высокий уровень экспрессии $\alpha 7$ -nAChR по сравнению с другими типами рецепторов (Рис. 41), и пролиферативный эффект SLURP-2 на эти клетки может быть вызван его необычным действием на $\alpha 7$ -nAChR. Таким образом, характер действия белков SLURP на конкретную клеточную линию может также зависеть от

репертуара никотиновых рецепторов, экспрессированных на поверхности этих клеток.

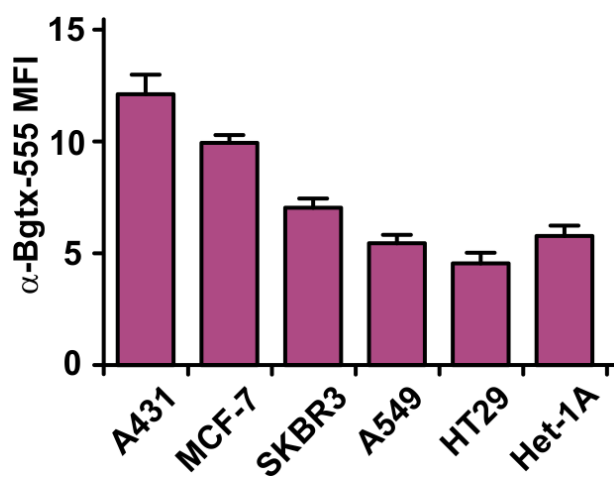


Рис. 41. Сравнение количества функциональных $\alpha 7$ -nAChR на поверхности различных клеточных линий. Данные проточной цитометрии по окрашиванию α -бунгаротоксином с меткой AlexaFluor-555, медианная интенсивность флуоресценции (MFI) $\pm$ S.E.M., $n = 6$ независимых измерений для каждой культуры.

Интересно отметить, что белки SLURP не влияют на рост глиальных клеток линий U251 MG и A172 (данные не приводятся). При этом на уровне мРНК обе глиальные клеточные линии не отличаются от исследованных эпителиальных клеточных линий по уровням экспрессии субъединиц nAChR, SLURP-1 и SLURP-2. Возможно, есть какие-то отличия в сигнальных каскадах, связывающих модуляцию nAChR и регуляцию пролиферации клеток.

Сравнение концентрационных зависимостей и величины антипролиферативного эффекта, вызванного белками SLURP, указывает на существование потенциального «терапевтического окна» для этих белков. Действующая концентрация SLURP значительно ниже для несколько типов раковых эпителиальных линий по сравнению с нормальными кератиноцитами. Так, обработка A431, SKBR3 и MCF-7 1 нМ рекомбинантного SLURP-1 приводила к значительному снижению клеточного роста, в то время как для нормальных кератиноцитов Het-1A эта доза не вызывала видимого эффекта. На клетках Het-1A и на A549 ингибиторный эффект SLURP-1 начинал проявляться с 10 нМ, а для SLURP-2 – с 100 нМ (Рис. 40).

3.1.2. Взаимодействие rSLURP-1 с EGFR и $\alpha 7$ -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 [48,115]. Активация $\alpha 7$ -nAChR, согласно этому предположению, стимулирует секрецию адреналина, норадреналина и EGF, что приводит к активации рецепторов EGF и VEGF, а также β -адренергических рецепторов, которые в свою очередь активируют митогенные, анти-апоптотические и пролиферативные сигнальные пути [63,115].

Недавно была описана со-локализация $\alpha 7$ -nAChR и EGFR на мембране клеток рака легкого и пищевода, а также было высказано предположение о пересечении сигнальных путей этих двух рецепторов [116]. Для проверки этого предположения мы проанализировали со-локализацию флуоресцентно-меченого rSLURP-1 (SL-1/A647) в клетках линий A431, HT-29, MCF-7, SKBR-3 с обеими потенциальными мишенями - $\alpha 7$ -nAChR и EGFR с помощью конфокальной микроскопии.

Полученные изображения (Рис. 42) демонстрируют сложную структуру распределения $\alpha 7$ -nAChR в клетке: точечное присутствие в цитоплазме и ядре, а также – сильно неоднородное распределение на поверхности мембраны. Следует упомянуть, что внутриклеточная локализация $\alpha 7$ -nAChR например в митохондриях, была описана ранее [116,117]. Достоверная со-локализация SL-1/A647 и эндогенного $\alpha 7$ -nAChR была обнаружена в основном на поверхности плазматической мембраны. Для EGFR

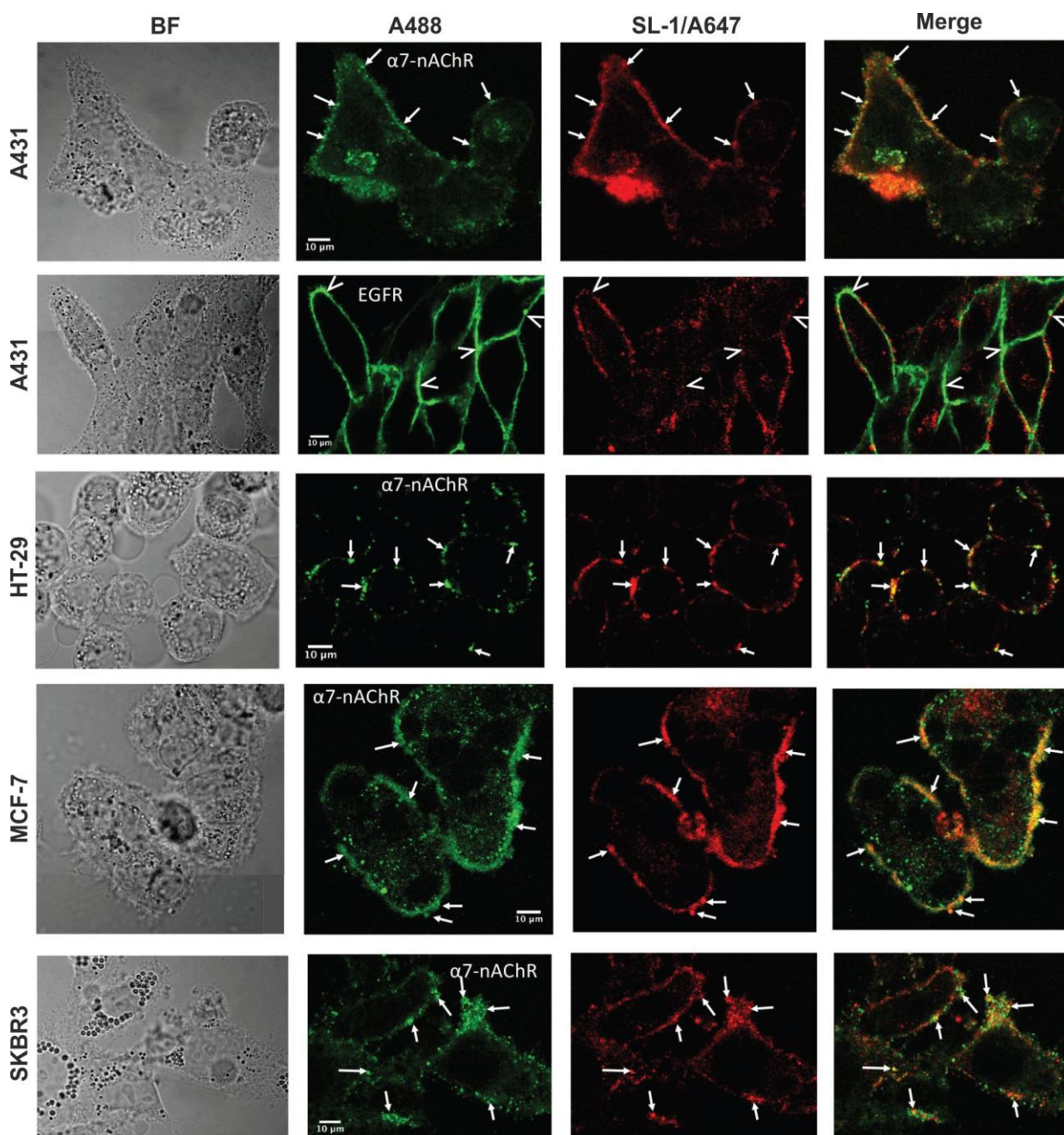


Рис. 42. Локализация rSLURP-1, $\alpha 7$ -nAChR, EGFR в клетках A431. Клетки инкубировали 1 ч с SL-1/A647, фиксировали и окрашивали с антителами к $\alpha 7$ -nAChR (верхняя строка) или EGFR (нижняя строка). Представлены изображения в светлом поле (первый столбец), конфокальные флуоресцентные изображения для антител с детектированием по Alexa-488 (второй столбец) и для SL-1/A647 (третий столбец) а также наложение двух флуоресцентных каналов (четвертый столбец). Стрелками показаны участки цитоплазматической мембраны, где есть со-локализация SL-1/A647 с рецептором, V-образные указатели показывают участки с высокой концентрацией рецепторов, но низкой концентрацией SL-1/A647.

распределение по мембране было относительно однородным, поэтому любой связанный со поверхностью мембраны SL-1/A647 был со-локализован 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. Следует отметить, что в данном эксперименте EGFR окрашивали на пермеабелизованных клетках с помощью антител к внутриклеточному домену EGFR, так что конкуренция между SL-1/A647 и антителами к EGFR за связывание с одним и тем же сайтом представляется маловероятной. Хотя эти результаты не позволяют полностью опровергнуть предположение о связывании SL-1/A647 с EGFR, они показывают, что EGFR не является основной мишенью SLURP-1 на поверхности плазматической мембраны.

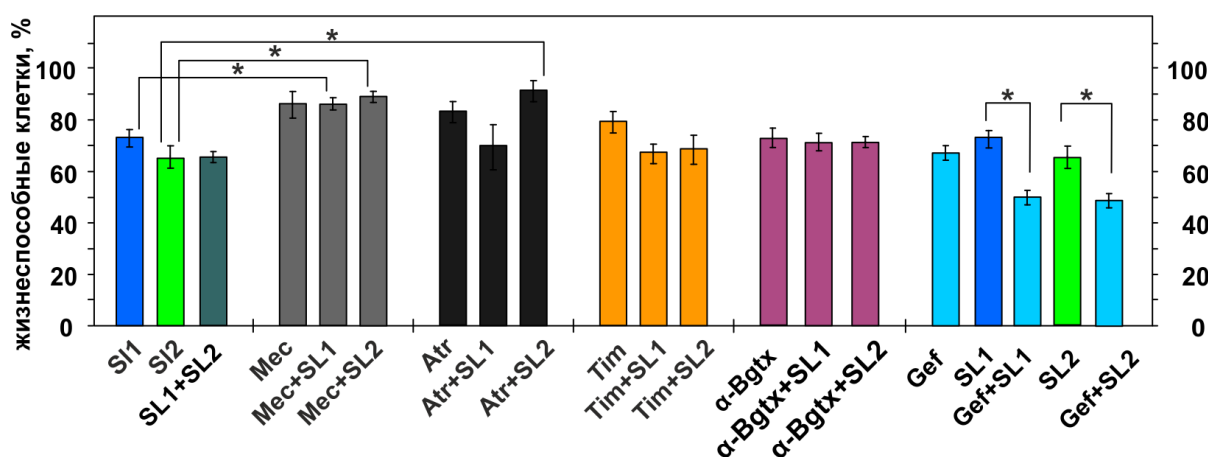


Рис. 43. Влияние на пролиферацию клеток A431 rSLURP-1, rSLURP-2 и их совместного применения с мекамиламином, атропином, тимололом и gefитинибом. Данные представлены как среднее $\pm$ SE из $n = 6$ независимых повторов, «*» означает $p < 0.05$ по двустороннему t-критерию. Концентрации rSLURP-1 и rSLURP-2 составляли 1 нМ, концентрации остальных веществ – 10 нМ.

Чтобы подтвердить, что именно ацетилхолиновые рецепторы, а не EGFR являются основными мишенями SLURP в клетках A431, мы исследовали антипролиферативный эффект этих белков в присутствии мекамиламина атропина и gefитиниба, которые являются специфическими ингибиторами nAChR, mAChR и EGFR, соответственно (Рис. 43). Кроме того, для изучения роли β -адренергических рецепторов в антипролиферативном действии в SLURP мы использовали ингибитор β -адренергических рецепторов – ТИМОЛОЛ.

Мекамиламин и атропин не оказывали существенного влияния на рост клеток сами по себе (Рис. 43). Ко-аппликация SLURP с мекамиламином приводила к отмене антипролиферативного эффекта SLURP. Ко-аппликация атропина значительно снижала антипролиферативный эффект SLURP-2 и не оказывала влияния на эффект от SLURP-1. На основании этих данных можно предположить, что 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. Блокирование β -адренергических рецепторов тимололом не оказывало значимого влияния на антипролиферативную активность SLURP. Это значит, что β -адренергические рецепторы не участвуют в сигнальных путях, ответственных за эффект белков SLURP на линию клеток A431.

В соответствии с ранее опубликованными данными [118], мы наблюдали значительное ингибирование роста клеток A431 под действием gefitiniba (Рис. 43): 10 нМ приводили к снижению пролиферации до $\sim 70\%$ по сравнению с контрольной группой. Для проверки гипотезы что SLURP и gefitinib действуют на различные рецепторы на поверхности мембраны и передают сигнал через различные сигнальные пути, мы исследовали эффект совместного применения этих веществ на пролиферацию клеток A431 (Рис. 43). Совместное применение gefitiniba и SLURP в концентрации 10 нМ и 1 нМ, соответственно, приводило к аддитивному эффекту с полной остановкой роста раковых клеток. На основании этих результатов можно предположить, что rSLURP-1 и rSLURP-2 регулируют пролиферацию клеток через сигнальный путь (пути), которые не связаны с непосредственной активацией EGFR. Приведенные в данном разделе результаты получены с участием Шаронова Г.В. (лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН) и Бычкова М.Л. (группа биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН).

3.1.3. 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 [81,119]. 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. 44).

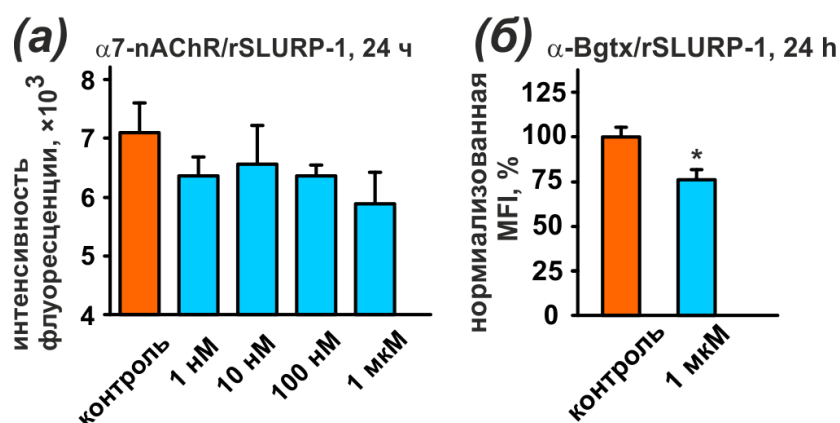


Рис. 44. Анализ содержания эндогенного $\alpha 7$ -nAChR с помощью проточной цитометрии. (а) – медианная интенсивность флуоресценции (MFI) при окрашивании клеток A431 первичными антителами к внеклеточному домену $\alpha 7$ -nAChR при обработке rSLURP-1 в течение 24 ч. Контроль – клетки A431 без обработки rSLURP-1. (б) – окрашивание $\alpha 7$ -nAChR в клетках A431 с помощью флуоресцентного α -Bgtx, контроль – клетки без обработки rSLURP-1. Шкала интенсивности нормирована на уровень окрашивания в контрольном образце. Данные представлены как среднее $\pm$ SE из $n = 6$ независимых измерений, «*» - $p < 0.05$ при сравнении с контрольной группой с помощью t-теста.

Кроме того, под действием rSLURP-1 происходило также значительное снижение содержания эндогенного SLURP-1 в клетках A431 уже после часовой инкубации с белком (примерно на 30 %, Рис. 45). Анализ клеток A431 после часовой инкубации с rSLURP-1 с помощью конфокальной микроскопии также показал значительное снижение интенсивности окрашивания внутриклеточного SLURP-1.

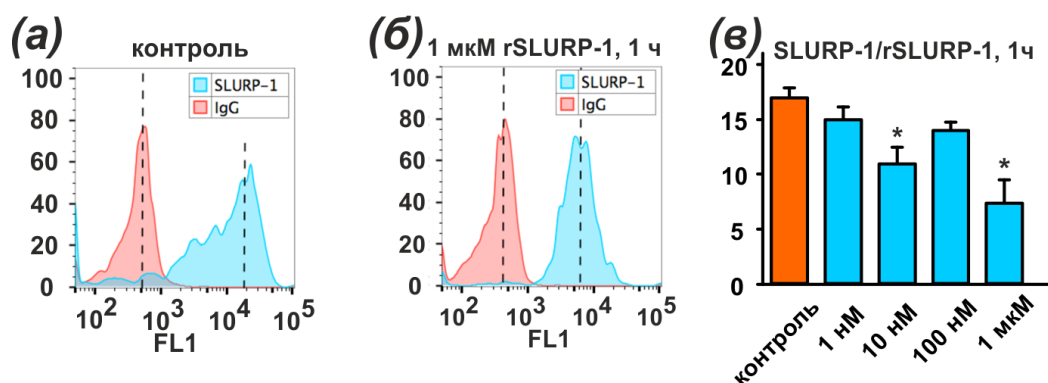


Рис. 45. Анализ содержания эндогенного SLURP-1 с помощью проточной цитометрии. (а) и (б). Гистограммы распределения клеток по интенсивности сигнала от Alexa-488 для необработанных клеток (слева) и клеток, обработанных 1 ч х 1 мкМ rSLURP-1. В качестве первичных антител использовали антитела к SLURP-1 (голубой цвет) и изотипический IgG (оранжевый). Вертикальные пунктирные линии показывают медиану каждого распределения – медианная интенсивность флуоресценции (MFI) при окрашивании клеток A431 первичными антителами к внеклеточному домену $\alpha 7$ -nAChR при обработке rSLURP-1 в течение 24 ч. Контроль – клетки A431 без обработки rSLURP-1. (в). Средняя интенсивность окрашивания $\alpha 7$ -nAChR при обработке различными концентрациями rSLURP-1 в течение 24ч в сравнении с необработанными клетками, окрашенными параллельно. Данные представлены как среднее $\pm$ SE из $n = 6$ независимых измерений, «*» - $p < 0.05$ при сравнении с контрольной группой с помощью ANOVA с post-hoc тестом Даннета на множественные сравнения.

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 уровня SLURP-1 в культуральной среде уже после 1 ч инкубации, причем этот эффект блокировался ингибитором экзоцитоза брефельдином А (Рис. 46). Анализ временной зависимости количества SLURP-1 в культуральной жидкости 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. 46б).

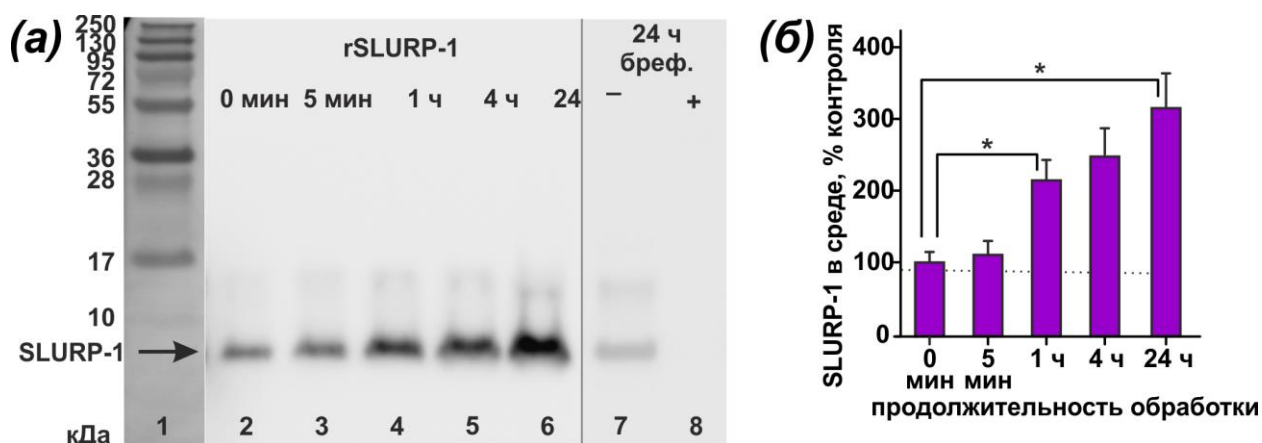


Рис. 46. Анализ содержания SLURP-1 в культуральной среде при обработке клеток A431 rSLURP-1. (а). Репрезентативный вестерн-блот с антителами к SLURP-1. (б). Количественный анализ интенсивностей полос образцов культуральной среды, окрашенных антителами против SLURP-1 после инкубации клеток в течение разного времени с 1 мкМ rSLURP-1, нормированных на величину в точке «0 мин». Данные выражены как среднее $\pm$ S.E., $n = 7$. * ($P < 0,05$) 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 ($y = 100\% + A_0 \cdot (1 - \exp [-k_0 \cdot t])$) выявил максимальную концентрацию SLURP-1 во внеклеточной среде $A_0 = 291 \pm 22\%$, скорость процесса секреции $k_0 = 0,79 \pm 0,36 \text{ h}^{-1}$. Определенная скорость k_0 соответствует полупериоду $0,9 \pm 0,4 \text{ ч}$.

Таким образом, взаимодействие SLURP-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. 47).

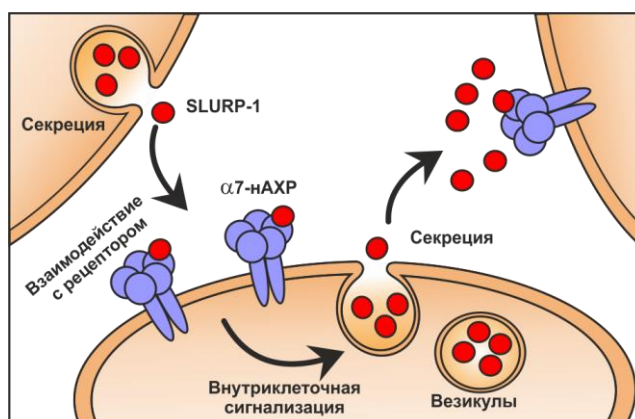


Рис. 47. Механизм положительной обратной связи в паракринной сигнализации SLURP-1.

Заключение

В представленной работе исследованы функциональная активность и пространственная структура рекомбинантных аналогов секретируемых трехпетельных белков человека SLURP-1 и SLURP-2, и выявлены новые детали молекулярных механизмов их действия. Установлено, что rSLURP-1 способен связываться только с $\alpha 7$ субъединицей nAChR, в то время как rSLURP-2 взаимодействует с широким спектром субъединиц nAChR, а также с mAChR M1 и M3 типов. Показано, что rSLURP-1 действует на $\alpha 7$ -nAChR как негативный аллостерический модулятор. Для rSLURP-2 обнаружен эффект ингибирования токов через $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ -nAChR, а также «прайминг» $\alpha 7$ -nAChR при низких концентрациях белка.

Показано, что rSLURP-1 и rSLURP-2 могут регулировать пролиферацию кератиноцитов. rSLURP-1 подавляет пролиферацию кератиноцитов через взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR, однако этот эффект нельзя объяснить только механизмом регуляции ионного канала. rSLURP-2 подавляет пролиферацию также через $\alpha 7$ -nAChR, но в то же время стимулирует рост клеток через $\alpha 3\beta 2$ -nAChR и, возможно, M3-mAChR. По-видимому, SLURP-2 является универсальным регулятором гомеостаза эпителия, участвующим в разных стадиях клеточного развития.

Показано, что rSLURP-1 и rSLURP-2 значительно ингибируют пролиферацию раковых клеток ряда линий эпителиального происхождения. Для линии клеток меланомы A431 обнаружено, что обработка культуры клеток препаратом rSLURP-1 стимулирует секрецию эндогенного SLURP-1 из внутриклеточных депо, что может служить механизмом синхронизации и коллективной защиты эпителиальных тканей от злокачественной трансформации и усиления пролиферации. Таким образом, выполнение диссертационной работы позволило получить не только новые научные знания о белках SLURP-1 и SLURP-2, но также имеет практическую ценность для дальнейших разработок области биотехнологии, фармакологии и биомедицины.

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 M3 типа.

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 и M3-mAChR к усилению роста клеток.

3) rSLURP-1 и rSLURP-2 ингибируют пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы, 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.

Благодарности

Мне хотелось бы выразить глубокую благодарность своему научному руководителю – к.б.н. Люкмановой Екатерине Назымовне, с.н.с. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и руководителю группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН. Данная диссертационная работа была выполнена благодаря ее постоянному вниманию, участию и поддержке. Также я хотел бы выразить свою благодарность сотрудникам группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН к.б.н. Шулепко М.А. и Бычкову М.Л., которые оказывали неоценимую помощь в разработке методов и получении результатов, использованных в данной работе. Выражаю свою благодарность академику РАН, д.б.н. Кирпичникову М.П. и профессору, д.б.н. Долгих Д.А., предоставившим возможность выполнения экспериментальной части данной работы на базе отдела биоинженерии ИБХ РАН и кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Выражаю искреннюю благодарность всем, кто принимал участие в разработке методов, использованных в данной работе, предоставлял доступ к оборудованию, помогал в проведении экспериментов и с анализом полученных экспериментальных результатов: профессору РАН, д.ф.-м.н. З.О. Шенкареву, к.ф.-м.н. А.С. Парамонову и профессору д.х.н. А.С. Арсеньеву из Отдела структурной биологии ИБХ РАН; профессору, PhD М.С. Томсену и PhD М. Арванити из Отдела дизайна лекарств и фармакологии Университета Копенгагена (Дания); к.б.н. Д.С. Кудрявцеву и д.х.н. И.Е. Кашеверову из лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН; Д. Бертрану из HiQScreen Sarl. (Швейцария); профессору В. Долежалю из Института физиологии Чешской Академии Наук (Чехия); к.ф.-м.н. А.О. Чугунову из лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН; к. ф.-м.н. Шаронову Г.В. и профессору д.ф.-м.н. Феофанову А.В. из лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН.

Отдельную благодарность хочу выразить всем сотрудникам отдела биоинженерии и структурной биологии ИБХ РАН, кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ за высокий профессионализм и дружелюбие, неизменно помогавшее мне на всем пути выполнения диссертационной работы.

Список литературы

1. Albuquerque E.X. et al. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function // *Physiological Reviews*. 2009. Vol. 89, № 1. P. 73–120.
2. Koukoulis F., Maskos U. The multiple roles of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system // *Biochemical Pharmacology*. 2015. Vol. 97, № 4. P. 378–387.
3. Martyn J.A.J., Fagerlund M.J., Eriksson L.I. Basic principles of neuromuscular transmission // *Anaesthesia*. 2009. Vol. 64. P. 1–9.
4. Grando S.A., Pittelkow M.R., Schallreuter K.U. Adrenergic and Cholinergic Control in the Biology of Epidermis: Physiological and Clinical Significance // *Journal of Investigative Dermatology*. 2006. Vol. 126, № 9. P. 1948–1965.
5. Tracey K.J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway // *Journal of Clinical Investigation*. 2007. Vol. 117, № 2. P. 289–296.
6. Uspenska K. et al. Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors Support Liver Cells Viability After Partial Hepatectomy // *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 9.
7. Dineley K.T., Pandya A.A., Yakel J.L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015. Vol. 36, № 2. P. 96–108.
8. Steinlein O.K., Bertrand D. Nicotinic receptor channelopathies and epilepsy // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2010. Vol. 460, № 2. P. 495–503.
9. Wessler I. et al. The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology // *Life Sciences*. 2003. Vol. 72, № 18–19. P. 2055–2061.
10. Fujii T. et al. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells // *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8.
11. Kummer W., Krasteva-Christ G. Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology // *Current Opinion in Pharmacology*. 2014. Vol. 16. P. 43–49.
12. Lindstrom J. Autoimmune diseases involving nicotinic receptors // *Journal of Neurobiology*. 2002. Vol. 53, № 4. P. 656–665.
13. Levin E.D., Simon B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals // *Psychopharmacology*. 1998. Vol. 138, № 3–4. P. 217–230.
14. Grando S.A. Connections of nicotine to cancer // *Nature Reviews Cancer*. 2014. Vol. 14, № 6. P. 419–429.
15. Hammond C. The ionotropic nicotinic acetylcholine receptors // *Cellular and Molecular Neurophysiology*. Elsevier, 2015. P. 173–197.
16. daCosta C.J.B., Free C.R., Sine S.M. Stoichiometry for α -bungarotoxin block of $\alpha 7$ acetylcholine receptors // *Nature Communications*. 2015. Vol. 6, № 1.

17. Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from Torpedo postsynaptic membranes // Quarterly Reviews of Biophysics. 2013. Vol. 46, № 04. P. 283–322.
18. Dani J.A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine // International Review of Neurobiology. Elsevier, 2015. Vol. 124. P. 3–19.
19. Stokes C., Treinin M., Papke R.L. Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors // Trends in Pharmacological Sciences. 2015. Vol. 36, № 8. P. 514–523.
20. Kracun S. et al. Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function: nAChR M3-M4 intracellular domain // British Journal of Pharmacology. 2009. Vol. 153, № 7. P. 1474–1484.
21. Williams B.M. et al. The long internal loop of the $\alpha 3$ subunit targets nAChRs to subdomains within individual synapses on neurons in vivo // Nature Neuroscience. 1998. Vol. 1, № 7. P. 557–562.
22. Borges L.S. et al. Identification of a Motif in the Acetylcholine Receptor Subunit Whose Phosphorylation Regulates Rapsyn Association and Postsynaptic Receptor Localization // Journal of Neuroscience. 2008. Vol. 28, № 45. P. 11468–11476.
23. King J.R. et al. Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors // Journal of Biological Chemistry. 2015. Vol. 290, № 33. P. 20060–20070.
24. Brejc K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. 2001. Vol. 411. P. 8.
25. Li S.-X. et al. Ligand-binding domain of an $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist // Nature Neuroscience. 2011. Vol. 14, № 10. P. 1253–1259.
26. Spurny R. et al. Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol. 112, № 19. P. E2543–E2552.
27. Morales-Perez C.L., Noviello C.M., Hibbs R.E. X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor // Nature. 2016. Vol. 538, № 7625. P. 411–415.
28. Walsh R.M. et al. Structural principles of distinct assemblies of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor // Nature. 2018. Vol. 557, № 7704. P. 261–265.
29. Mukhtasimova N., daCosta C.J.B., Sine S.M. Improved resolution of single channel dwell times reveals mechanisms of binding, priming, and gating in muscle AChR // The Journal of General Physiology. 2016. Vol. 148, № 1. P. 43–63.

30. Bouzat C., Sine S.M. Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level: nACh receptor channels // *British Journal of Pharmacology*. 2018. Vol. 175, № 11. P. 1789–1804.
31. Edelstein S.J., Changeaux J.-P. Allosteric proteins after thirty years: the binding and state functions of the neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors.
32. Lape R., Colquhoun D., Sivilotti L.G. On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily // *Nature*. 2008. Vol. 454, № 7205. P. 722–727.
33. Colquhoun D., Ogden D.C. Nicotinic acetylcholine receptors of nerve and muscle: functional aspects. 1987. Vol. 81. P. 8.
34. King J.R. et al. Ionotropic and Metabotropic Mechanisms of Allosteric Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Intracellular Calcium // *Molecular Pharmacology*. 2018. Vol. 93, № 6. P. 601–611.
35. Beckmann J., Lips K.S. The Non-Neuronal Cholinergic System in Health and Disease // *Pharmacology*. 2013. Vol. 92, № 5–6. P. 286–302.
36. Israël M., Dunant Y. Acetylcholine release. Reconstitution of the elementary quantal mechanism // *Journal of Physiology-Paris*. 1998. Vol. 92, № 2. P. 123–128.
37. Brandon K.W., Rand M.J. Acetylcholine and the sympathetic innervation of the spleen // *The Journal of Physiology*. 1961. Vol. 157, № 1. P. 18–32.
38. Andersson U., Tracey K.J. Neural reflexes in inflammation and immunity // *The Journal of Experimental Medicine*. 2012. Vol. 209, № 6. P. 1057–1068.
39. Fujii T. et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells // *Journal of Pharmacological Sciences*. 2017. Vol. 134, № 1. P. 1–21.
40. Wang H. et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis // *Nature Medicine*. 2004. Vol. 10, № 11. P. 1216–1221.
41. Rosas-Ballina M. et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit // *Science*. 2011. Vol. 334, № 6052. P. 98–101.
42. Fujii Y.X. et al. Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice // *Journal of Neuroimmunology*. 2007. Vol. 188, № 1–2. P. 80–85.
43. Mashimo M. et al. Acetylcholine released from T cells regulates intracellular Ca^{2+} , IL-2 secretion and T cell proliferation through nicotinic acetylcholine receptor // *Life Sciences*. 2017. Vol. 172. P. 13–18.
44. Kurzen H. et al. Phenotypical and Molecular Profiling of the Extraneuronal Cholinergic System of the Skin // *Journal of Investigative Dermatology*. 2004. Vol. 123, № 5. P. 937–949.

45. Curtis B.J., Radek K.A. Cholinergic Regulation of Keratinocyte Innate Immunity and Permeability Barrier Integrity: New Perspectives in Epidermal Immunity and Disease // *Journal of Investigative Dermatology*. 2012. Vol. 132, № 1. P. 28–42.
46. Chernyavsky A.I. Differential regulation of keratinocyte chemokinesis and chemotaxis through distinct nicotinic receptor subtypes // *Journal of Cell Science*. 2004. Vol. 117, № 23. P. 5665–5679.
47. Nguyen V.T. et al. Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes // *Experimental Cell Research*. 2004. Vol. 294, № 2. P. 534–549.
48. Schuller H.M. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? // *Nature Reviews Cancer*. 2009. Vol. 9, № 3. P. 195–205.
49. Dasgupta P. Nicotine induces cell proliferation by -arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways // *Journal of Clinical Investigation*. 2006. Vol. 116, № 8. P. 2208–2217.
50. Arredondo J. et al. Central role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium // *The Journal of Cell Biology*. 2002. Vol. 159, № 2. P. 325–336.
51. Nguyen V.T. et al. Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine // *Journal of Cell Science*. 2001. Vol. 114, № 6. P. 1189–1204.
52. Radek K.A. et al. Neuroendocrine Nicotinic Receptor Activation Increases Susceptibility to Bacterial Infections by Suppressing Antimicrobial Peptide Production // *Cell Host & Microbe*. 2010. Vol. 7, № 4. P. 277–289.
53. Chernyavsky A.I. et al. The Ras/Raf-1/MEK1/ERK Signaling Pathway Coupled to Integrin Expression Mediates Cholinergic Regulation of Keratinocyte Directional Migration // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280, № 47. P. 39220–39228.
54. Arredondo J. et al. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of 5 and 7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke // *The FASEB Journal*. 2007.
55. Trombino S. et al. $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors Affect Growth Regulation of Human Mesothelioma Cells: Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. P. 13.
56. Arredondo J. et al. Receptor-mediated tobacco toxicity: Alterations of the NF- κ B expression and activity downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes // *Life Sciences*. 2007. Vol. 80, № 24–25. P. 2191–2194.

57. Dobrovinskaya O. et al. Cholinergic Machinery as Relevant Target in Acute Lymphoblastic T Leukemia // *Frontiers in Pharmacology*. 2016. Vol. 7.
58. Dasgupta P. et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines // *International Journal of Cancer*. 2009. Vol. 124, № 1. P. 36–45.
59. Zhao Y. et al. Nicotine Activates YAP1 through nAChRs Mediated Signaling in Esophageal Squamous Cell Cancer (ESCC) // *PLoS ONE* / ed. Guan X.-Y. 2014. Vol. 9, № 3. P. e90836.
60. Xiang T. et al. Nicotine enhances invasion and metastasis of human colorectal cancer cells through the nicotinic acetylcholine receptor downstream p38 MAPK signaling pathway // *Oncology Reports*. 2016. Vol. 35, № 1. P. 205–210.
61. Fei R. et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in tumor-associated macrophages inhibits colorectal cancer metastasis through the JAK2/STAT3 signaling pathway // *Oncology Reports*. 2017. Vol. 38, № 5. P. 2619–2628.
62. Shin V.Y. Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2 // *Carcinogenesis*. 2004. Vol. 25, № 12. P. 2487–2495.
63. Wong H.P.S. et al. Nicotine Promotes Colon Tumor Growth and Angiogenesis through $\alpha 7$ -Adrenergic Activation // *Toxicological Sciences*. 2007. Vol. 97, № 2. P. 279–287.
64. Loughner C.L. et al. Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes // *Human Genomics*. 2016. Vol. 10, № 1.
65. Kong H.K., Park J.H. Characterization and function of human Ly-6/uPAR molecules // *BMB Reports*. 2012. Vol. 45, № 11. P. 595–603.
66. Özhan G. et al. Lypd6 Enhances Wnt/ β -Catenin Signaling by Promoting Lrp6 Phosphorylation in Raft Plasma Membrane Domains // *Developmental Cell*. 2013. Vol. 26, № 4. P. 331–345.
67. Nirthanan S., Gwee M.C.E. Three-Finger α -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On. P. 17.
68. Lyukmanova E.N. et al. In vitro production of three-finger neurotoxins from snake venoms, a disulfide rich proteins. Problems and their solutions (Review) // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2010. Vol. 36, № 2. P. 137–145.
69. Mordvintsev D.Y. et al. Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors: Weak toxin binds two acetylcholine receptor types // *FEBS Journal*. 2009. Vol. 276, № 18. P. 5065–5075.

70. Lyukmanova E.N. et al. Bacterial Expression, NMR, and Electrophysiology Analysis of Chimeric Short/Long-chain α -Neurotoxins Acting on Neuronal Nicotinic Receptors // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, № 34. P. 24784–24791.
71. Huang S. et al. Complex between α -bungarotoxin and an $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand-binding domain chimaera // *Biochemical Journal*. 2013. Vol. 454, № 2. P. 303–310.
72. Ploug M., Ellis V. Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom α -neurotoxins // *FEBS Letters*. 1994. Vol. 349, № 2. P. 163–168.
73. Adermann K. et al. Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily // *Protein Science*. 2008. Vol. 8, № 4. P. 810–819.
74. Mastrangeli R. et al. ARS Component B: structural characterization, tissue expression and regulation of the gene and protein (SLURP-1) associated with Mal de Meleda // *European Journal of Dermatology*. 2003. Vol. 13, № 6. P. 560–570.
75. Chimienti F. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda // *Human Molecular Genetics*. 2003. Vol. 12, № 22. P. 3017–3024.
76. Arredondo J. et al. Biological Effects of SLURP-1 on Human Keratinocytes // *Journal of Investigative Dermatology*. 2005. Vol. 125, № 6. P. 1236–1241.
77. Chernyavsky A.I. et al. Upregulation of nuclear factor- κ B expression by SLURP-1 is mediated by $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and involves both ionic events and activation of protein kinases // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010. Vol. 299, № 5. P. C903–C911.
78. Moriwaki Y. et al. Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand // *Neuroscience Research*. 2009. Vol. 64, № 4. P. 403–412.
79. Bergqvist C. et al. SLURP-1 is mutated in Mal de Meleda, a potential molecular signature for melanoma and a putative squamous lineage tumor suppressor gene // *International Journal of Dermatology*. 2018. Vol. 57, № 2. P. 162–170.
80. Russo P. et al. Nicotinic receptor and tobacco-related cancer // *Life Sciences*. 2012. Vol. 91, № 21–22. P. 1087–1092.
81. Pettersson A. et al. Nicotine induced modulation of SLURP-1 expression in human colon cancer cells // *Autonomic Neuroscience*. 2009. Vol. 148, № 1–2. P. 97–100.

82. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. Overexpression of SLURP-1 and -2 alleviates the tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamine on immortalized oral epithelial cells // *Biochemical Pharmacology*. 2007. Vol. 74, № 8. P. 1315–1319.
83. Iodice S. et al. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis // *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2008. Vol. 393, № 4. P. 535–545.
84. Throm V.M. et al. Endogenous CHRNA7-ligand SLURP1 as a potential tumor suppressor and anti-nicotinic factor in pancreatic cancer // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 14.
85. Hogg R.C. et al. An automated system for intracellular and intranuclear injection // *Journal of Neuroscience Methods*. 2008. Vol. 169, № 1. P. 65–75.
86. Efremenko A.V. et al. Cobalt bis(dicarbollide) versus closo-dodecaborate in boronated chlorin e6 conjugates: implications for photodynamic and boron-neutron capture therapy // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2012. Vol. 11, № 4. P. 645.
87. Bonner I. Antagonist Binding Properties of Five Cloned Muscarinic Receptors Expressed in CHO-Ki Cells. P. 8.
88. Cavanagh J. et al. *Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice*. New York, USA: Academic Press, 2006.
89. Güntert P. Automated NMR Structure Calculation With CYANA // *Protein NMR Techniques*. New Jersey: Humana Press, 2004. Vol. 278. P. 353–378.
90. Martí-Renom M.A. et al. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. 2000. P. 37.
91. Lyukmanova E.N. et al. Structural Insight into Specificity of Interactions between Nonconventional Three-finger Weak Toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and Muscarinic Acetylcholine Receptors // *Journal of Biological Chemistry*. 2015. Vol. 290, № 39. P. 23616–23630.
92. Hess B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation // *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2008. Vol. 4, № 3. P. 435–447.
93. Chen R., Li L., Weng Z. ZDOCK: An initial-stage protein-docking algorithm // *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 2003. Vol. 52, № 1. P. 80–87.
94. Pyrkov T.V. et al. PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25, № 9. P. 1201–1202.
95. del Toro E.D. et al. Immunocytochemical localization of the $\gamma 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system // *The Journal of Comparative Neurology*. 1994. Vol. 349, № 3. P. 325–342.

96. Shulepko M.A. et al. Human neuromodulator SLURP-1: Bacterial expression, binding to muscle-type nicotinic acetylcholine receptor, secondary structure, and conformational heterogeneity in solution // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. Vol. 78, № 2. P. 204–211.
97. Antil-Delbeke S. et al. Molecular Determinants by Which a Long Chain Toxin from Snake Venom Interacts with the Neuronal $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, № 38. P. 29594–29601.
98. Chiara D.C., Cohen J.B. Identification of Amino Acids Contributing to High and Low Affinity *d*-Tubocurarine Sites in the *Torpedo* Nicotinic Acetylcholine Receptor // *Journal of Biological Chemistry*. 1997. Vol. 272, № 52. P. 32940–32950.
99. Lyukmanova E.N. et al. NMR Structure and Action on Nicotinic Acetylcholine Receptors of Water-soluble Domain of Human LYNX1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286, № 12. P. 10618–10627.
100. Lyukmanova E.N. et al. Water-soluble LYNX1 Residues Important for Interaction with Muscle-type and/or Neuronal Nicotinic Receptors // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, № 22. P. 15888–15899.
101. Belmokhtar C.A., Hillion J., Ségal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms // *Oncogene*. 2001. Vol. 20, № 26. P. 3354–3362.
102. Kini R.M., Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets // *Toxicon*. 2010. Vol. 56, № 6. P. 855–867.
103. Servent D. et al. Molecular characterization of the specificity of interactions of various neurotoxins on two distinct nicotinic acetylcholine receptors // *European Journal of Pharmacology*. 2000. Vol. 393, № 1–3. P. 197–204.
104. Golovanov A.P. et al. Two-dimensional ^1H -NMR study of the spatial structure of neurotoxin II from *Naja naja oxiana* // *European Journal of Biochemistry*. 1993. Vol. 213, № 3. P. 1213–1223.
105. Connolly P.J. et al. Molecular Dynamics of the Long Neurotoxin LSIII[†] // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42, № 49. P. 14443–14451.
106. Iakoucheva L.M. et al. Intrinsic Disorder in Cell-signaling and Cancer-associated Proteins // *Journal of Molecular Biology*. 2002. Vol. 323, № 3. P. 573–584.
107. Chavez-Noriega L.E. et al. Pharmacological Characterization of Recombinant Human Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 7$ Expressed in *Xenopus* Oocytes. 1997. Vol. 280. P. 11.
108. Cachelin B. Unusual Pharmacology of (+)-Tubocurarine with Rat Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Containing $\alpha 4$ Subunits. P. 7.

109. Smulders C.J.G.M. et al. Cholinergic drugs potentiate human nicotinic $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptors by a competitive mechanism // *European Journal of Pharmacology*. 2005. Vol. 509, № 2–3. P. 97–108.
110. Wallace T.L. et al. RG3487, a Novel Nicotinic 7 Receptor Partial Agonist, Improves Cognition and Sensorimotor Gating in Rodents // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011. Vol. 336, № 1. P. 242–253.
111. Prickaerts J. et al. EVP-6124, a novel and selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors // *Neuropharmacology*. 2012. Vol. 62, № 2. P. 1099–1110.
112. Tsetlin V., Hucho F. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications // *FEBS Letters*. 2004. Vol. 557, № 1–3. P. 9–13.
113. Lyukmanova E.N. et al. Human SLURP-1 and SLURP-2 Proteins Acting on Nicotinic Acetylcholine Receptors Reduce Proliferation of Human Colorectal Adenocarcinoma HT-29 Cells // *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6, № 4(23). P. 7.
114. Paleari L. et al. Role of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in human non-small cell lung cancer proliferation: $\alpha 7$ -nAChR and NSCLC growth // *Cell Proliferation*. 2008. Vol. 41, № 6. P. 936–959.
115. Schaal C., Chellappan S.P. Nicotine-Mediated Cell Proliferation and Tumor Progression in Smoking-Related Cancers // *Molecular Cancer Research*. 2014. Vol. 12, № 1. P. 14–23.
116. Chernyavsky A.I., Shchepotin I.B., Grando S.A. Mechanisms of growth-promoting and tumor-protecting effects of epithelial nicotinic acetylcholine receptors // *International Immunopharmacology*. 2015. Vol. 29, № 1. P. 36–44.
117. Gergalova G. et al. Mitochondria Express $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors to Regulate Ca^{2+} Accumulation and Cytochrome c Release: Study on Isolated Mitochondria // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, № 2. P. 8.
118. Lin H.Q., Katsifis A., Meriaty H. Tumour Response to Gefitinib Is Associated with EGF- and Gefitinib- but not Radiation-modulated EGFR Expression // *ANTICANCER RESEARCH*. 2010. P. 7.
119. Kalantari-Dehaghi M., Bernard H.-U., Grando S.A. Reciprocal effects of NNK and SLURP-1 on oncogene expression in target epithelial cells // *Life Sciences*. 2012. Vol. 91, № 21–22. P. 1122–1125.