

## **$\alpha$ -КОНОТОКСИНЫ В ИССЛЕДОВАНИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

© 2009 г. И. Е. КАШЕВЕРОВ, В. И. ЦЕТЛИН

*Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. II. Общие данные о никотиновых ацетилхолиновых рецепторах: подтипы, структура, функция. III.  $\alpha$ -Конотоксины: структура и специфичность. IV. Синтетические аналоги  $\alpha$ -конотоксинов в исследовании холинорецепторов. V. Ацетилхолин-связывающие белки – пространственные гомологи лиганд-связывающих доменов холинорецепторов. VI.  $\alpha$ -Конотоксины и ацетилхолин-связывающие белки: структурно-функциональные исследования и новые компьютерные модели на их основе. VII. Заключение.

### **I. ВВЕДЕНИЕ**

На сегодняшний день никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нАХР), относящийся к большому «Cys-петельному» семейству лиганд-управляемых ионных каналов (среди которых представлены также глициновый, 5HT<sub>3</sub>-, GABA-A и другие рецепторы), – один из наиболее изученных в структурно-функциональном плане нейрорецепторов. Имеется крио-электронно-микроскопическая структура нАХР из электрического органа ската *Torpedo marmorata* с разрешением 4 Å [1], а совсем недавно были установлены кристаллические структуры высокого разрешения для сходных по пространственной организации бактериальных лиганд-управляемых ионных каналов [2–4]. Детальная информация о структуре непосредственно лиганд-связывающих участков нАХР стала доступна лишь после открытия, экспрессии и кристаллизации в 2001 г. водорастворимого ацетилхолин-связывающего белка (АХСБ) из прудовика *Lymnaea stagnalis*,

---

*Принятые сокращения:* нАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; АХСБ – ацетилхолин-связывающий белок; а.о. – аминокислотный остаток; Бра – бензоилфенилаланин

*Адрес для корреспонденции:* vits@mx.ibch.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-07075-д.

представляющего собой пространственный гомолог N-концевых лиганд-связывающих доменов никотиновых и всех остальных «Cys-петельных» рецепторов [5, 6]. Наличие этих пространственных структур и возможность привлечения арсенала методов компьютерного моделирования позволяет сегодня делать обоснованные предположения о молекулярном механизме функционирования рецепторов всего семейства и моделировать новые соединения с заданными свойствами (drug design) на основе известных на сегодня холинергических лигандов. С различными nAХР взаимодействует большое количество соединений самой разной природы – от низкомолекулярных веществ до пептидов и небольших белков (соединения пептидной природы рассмотрены в обзорах [7, 8]). Среди наиболее известных (и исторически самых первых) были полипептидные  $\alpha$ -нейротоксины из яда змей – антагонисты некоторых типов холинорецепторов, с помощью которых ( $\alpha$ -бунгаротоксина и  $\alpha$ -кобротоксина) был впервые очищен nAХР из *Torpedo* [9], затем нейрональный холинорецептор из мозга крысы [10], а еще позднее и АХСБ из *L. stagnalis* [5]. Однако в последнее время при исследовании nAХР в дополнение к  $\alpha$ -нейротоксинам все чаще стали применять небольшие токсические пептиды, выделенные из яда морских улиток семейства *Conus* – так называемые  $\alpha$ -конотоксины. Первые  $\alpha$ -конотоксины были выделены в начале 80-х годов прошлого века, а в настоящее время благодаря быстро растущему числу новых пептидов (полученных как непосредственной очисткой из яда многочисленных видов улиток, так и синтезом на основе структур, выявленных генно-инженерными методами), количество используемых в исследованиях nAХР соединений на основе  $\alpha$ -конотоксинов и их аналогов исчисляется уже сотнями (широкий спектр синтетических аналогов  $\alpha$ -конотоксинов представлен в обзоре [7]). Причиной этому служит достаточно высокая селективность пептидов по отношению к разным подтипам nAХР, а также сравнительная простота химического синтеза  $\alpha$ -конотоксинов.

Предлагаемая обзор освещает основные этапы применения  $\alpha$ -конотоксинов для исследования структурных и функциональных характеристик nAХР разных типов и служит дополнением к многочисленным обзорным статьям, обобщающим различные аспекты использования этих пептидов – от проблем их синтеза до перспектив применения в клинической практике (см., например, [11–16]).

## II. ОБЩИЕ ДАННЫЕ О НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРАХ: ПОДТИПЫ, СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ

Структурно-функциональные исследования нАХР насчитывают уже несколько десятилетий (см., например, обзор [17]), чему способствовало наличие богатого природного источника этого рецептора – электрического органа скатов *Torpedo* (*T. marmorata* или *T. californica*) и открытие высокоактивного и селективного блокатора этого рецептора –  $\alpha$ -бунгаротоксина из яда *Bungarus multicinctus* [18]. Оба эти обстоятельства позволили впервые охарактеризовать нАХР из *Torpedo* как олигомерный белок с молекулярной массой в 220 кДа, состоящий из 5-ти субъединиц (двух  $\alpha 1$ , и по одной  $\beta 1$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ ). Доступность природного нАХР *Torpedo* в конечном итоге стала решающим фактором (вместе с огромным прогрессом в совершенствовании инструментальной базы) для получения впоследствии его структуры методом крио-электронной микроскопии [1, 19, 20]. Благодаря этим работам мы знаем, что все 5 субъединиц располагаются в мембране псевдосимметрично вокруг центральной оси, по которой проходит ионный канал. Два лиганд-связывающих участка холинергических агонистов и конкурентных антагонистов при этом располагаются в областях контакта больших N-концевых внеклеточных доменов двух  $\alpha 1$  и соседних с ними  $\gamma$ - и  $\delta$ -субъединиц рецептора примерно в их средней части (по отношению к мембранной поверхности).

По своим фармакологическим и структурным характеристикам, а также представленности в электрическом органе (перерожденная мышечная ткань), нАХР *Torpedo* относят по современной классификации к холинорецепторам мышечного типа. Рецепторы из мышечных тканей млекопитающих содержат в своем составе  $\gamma$ -субъединицу только на первых этапах развития организма, которая замещается у взрослых форм на  $\varepsilon$ -субъединицу. Пространственная структура такого мышечного нАХР пока отсутствует, но многочисленные косвенные данные указывают на сходную с рецептором *Torpedo* 5-субъединичную организацию ионного канала.

Значительно позднее – с использованием все того же  $\alpha$ -бунгаротоксина – в мозге млекопитающих был обнаружен новый «нейрональный» тип нАХР [10, 21]. Позднее он был охарактеризован как гомолигомерный  $\alpha 7$  подтип рецептора (состоящий из 5-ти одинаковых  $\alpha 7$ -субъединиц). В нервных тканях были обнаружены и другие подтипы нАХР. К настоящему времени известно о существовании 9-ти нейрональных  $\alpha$ -субъединиц ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) и 3-х  $\beta$ -субъединиц ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ),

которые могут образовывать как гомоолигомерные формы нАХР (кроме  $\alpha 7$  также и  $\alpha 8$  и  $\alpha 9$  подтипы), так и гетеромерные (состоящие из различных композиций  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц). Наиболее распространенными из выявленных в нервных тканях подтипов нейрональных нАХР являются  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\alpha 6\beta 2$ ,  $\alpha 7$  и другие. Пространственных структур ни для одного нейронального нАХР также пока не получено, но и для этих рецепторов предполагается соответствующая 5-субъединичная структура, стехиометрия которой (для сложных гетеромерных подтипов), как правило, неизвестна.

Интересно, что нейрональные нАХР были обнаружены также и в пре-синаптических областях синапса (в отличие от нАХР мышечного типа, выявленных только в пост-синаптической мембране нервно-мышечного сочленения и непосредственно участвующих в нервно-мышечной передаче), где они выполняют различные функции – например, регуляцию выброса везикул с различными нейротрансмиттерами. Кроме того, субъединицы нейрональных нАХР были выявлены и в самых разных не-нейрональных тканях и органах (клетках иммунной системы, легких, коже) [22–24], где они могут быть вовлечены в развитие ряда патологических состояний [25].

К настоящему времени показано, что нарушение работы некоторых подтипов нАХР может вызывать или быть следствием ряда заболеваний, таких как мышечные дистрофии (миастении) [26] и некоторые виды эпилепсии [27]. В ряде работ была выявлена взаимосвязь между болезнями Альцгеймера и Паркинсона, а также шизофренией и нарушением в уровне определенных подтипов нейрональных нАХР [14, 28].

Все это диктует необходимость поиска и создания новых высокоаффинных и селективных лигандов для каждого подтипа холинорецепторов. Основой для этих исследований служат многочисленные известные соединения, взаимодействующие с разными участками нАХР, арсенал которых включает сегодня агонисты (эндогенные и экзогенные), антагонисты (конкурентные, а также неконкурентные – в том числе непосредственные блокаторы ионного канала) и разнообразные модуляторы холинергической активности. Такое разнообразие, то есть способность связывать различные классы соединений, вероятно, обусловлено участием нАХР в различных физиологических процессах, в том числе и в составе многокомпонентных белковых комплексов, и требует достаточно «тонкой» подстройки работы рецептора под определенную задачу. Хорошо известно, что связывание агонистов с их «классическими» участками на нАХР приводит к конформационным изменениям

рецептора, которые в свою очередь вызывают открытие ионного канала. Конкурентные антагонисты (включая наиболее известные белковые и пептидные токсины –  $\alpha$ -нейротоксины и  $\alpha$ -конотоксины) взаимодействуют с участком связывания агонистов, предотвращая активацию рецептора. Однако на холинорецепторах выявлены также и другие участки взаимодействия с рядом соединений, которые могут при связывании в этих участках ослаблять или усиливать ионные токи. Последние, так называемые позитивные аллостерические модуляторы, в настоящее время представляют большой интерес как возможные лекарства нового поколения.

Наиболее востребованными до недавнего времени инструментами изучения структурно-функциональных свойств нАХР служили  $\alpha$ -нейротоксины из ядов змей, благодаря своему исключительно высокому сродству к некоторым подтипам рецептора (см., например, обзоры [29, 30]). Однако не для всех подтипов нАХР имеются избирательно действующие на них нейротоксины змей. Так называемые «короткие»  $\alpha$ -нейротоксины эффективно взаимодействуют только с мышечными нАХР;  $\alpha$ -нейротоксины «длинного» типа узнают, кроме мышечных, также и нейрональные гомоолигомерные ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ) холинорецепторы. Еще один токсический полипептид из яда *B. multicinctus* – к-бунгаротоксин – специфичен к  $\alpha 3\beta 2$  нАХР.

Несомненным преимуществом выделенных в начале 80-х годов прошлого века из яда морских улиток семейства *Conus*  $\alpha$ -конотоксинов, подобно  $\alpha$ -нейротоксинам, являющихся конкурентными антагонистами нАХР, оказалась высокая избирательность действия различных пептидов на разные подтипы холинорецепторов. Этот факт вместе с возможностью получения таких пептидов в препаративных количествах методами пептидного синтеза способствовал быстрому их внедрению в арсенал инструментов исследования нАХР.

### **III. $\alpha$ -КОНОТОКСИНЫ: СТРУКТУРА И СПЕЦИФИЧНОСТЬ**

К настоящему времени описано более 500 видов ядовитых морских моллюсков, относящихся к обширному семейству *Conus*. Все они хищники с разной пищевой специализацией (рыбы, другие моллюски, черви), яд которых служит для обездвиживания соответствующих жертв. По своему молекулярному разнообразию яд этих улиток не уступит яду змей, однако его особенностью является присутствие в нем большого количества физиологически активных компонентов пептидной природы. Первоначальные оценки предполагали в яде каждого вида *Conus* около сотни самых разных по структуре и

функции пептидов, названных общим термином конопептиды [31, 32]; применение усовершенствованных методов жидкостной хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией увеличили это число до 1000–1900 [33] и таким образом, эта природная пептидная библиотека может насчитывать сотни тысяч соединений.

Существующая классификация всего этого пептидного царства основана на структурном сходстве различных конопептидов, выражающемся в первую очередь в наличии, количестве и схеме замыкания дисульфидных мостов, что связано и со специфической пространственной структурой, и с определенным типом биологической активности. К настоящему времени из конопептидов выделены такие классы, как контулакины, конантокины, контрифаны, различные группы конотоксинов и некоторые другие. Разные классы конопептидов специфически взаимодействуют с самыми различными лиганд-управляемыми и потенциал-зависимыми ионными каналами, G-белок-зависимыми рецепторами, нейротранспортерами и другими мишенями [31, 34, 35]. Самый большой и наиболее хорошо изученный класс конопептидов формируют конотоксины – пептиды, содержащие в своем составе две или более дисульфидные связи, которые в свою очередь подразделяют на подклассы ( $\alpha$ -,  $\omega$ -,  $\mu$ -,  $\kappa$ - и другие конотоксины) по количеству и схеме замыкания дисульфидов, а также по их специфичности к тому или иному рецептору или каналу. Среди них наиболее обширной сегодня является группа  $\alpha$ -конотоксинов, конкурентных антагонистов различных подтипов nAHP. Представитель именно этой группы конопептидов был впервые выделен из яда *C. geographus* и охарактеризован как пост-синаптический блокатор в нервно-мышечном сочленении лягушки почти 3 десятилетия назад [36]. Высокая эффективность и специфичность взаимодействия с nAHP привели к интенсивным поискам этих соединений в ядах многочисленных видов *Conus* и к настоящему времени уже идентифицировано более 4-х десятков  $\alpha$ -конотоксинов.

Структурной особенностью  $\alpha$ -конотоксинов является наличие в небольшой молекуле (12–22 аминокислотных остатка (а.о.)) двух дисульфидных связей с характерным расположением остатков цистеина вдоль аминокислотной цепи (СС–С–С) и их замыканием ( $C^1$ – $C^3$  и  $C^2$ – $C^4$ ). Известно два исключения из этого правила:  $\alpha$ -конотоксин SII из *C. striatus* с дополнительными N- и C-концевыми цистеинами, замкнутыми в третий дисульфидный мост [37], и пептид lt14a из *C. litteratus* с нехарактерным расположением остатков цистеинов (С–С–С–С) – ингибитор некоторых нейрональных nAHP [38].

Количество а.о., находящихся между вторым и третьим, а также третьим и четвертым цистеинами, определяет размер так называемых петель I и II  $\alpha$ -конотоксинов и позволяет провести их дополнительное подразделение на подгруппы (например, 3/5 или 4/7  $\alpha$ -конотоксины). В табл. 1 представлена лишь часть известных на сегодня  $\alpha$ -конотоксинов, которые оказались наиболее востребованными в исследованиях НАХР.

Здесь необходимо отметить, что среди разнообразных конопептидов к настоящему времени обнаружены и конотоксины других подклассов, взаимодействующие с холинорецепторами:  $\psi$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha A_s$ ,  $\alpha C$ ,  $\alpha S$  и  $\alpha D$  [88–94]. Они больше по размеру, чем  $\alpha$ -конотоксины (от 18 а.о.), имеют 3 или 5 дисульфидов (за исключением 32-членного  $\alpha C$ -конотоксина PrXA, содержащего только одну дисульфидную связь [92]), а представители  $\alpha S$ - и  $\alpha D$ -подклассов по своим размерам (47–50 а.о.) уже приближаются к  $\alpha$ -нейротоксинам из яда змей [93, 94]. Сложность синтеза подобных пептидов (при крайне ограниченных возможностях получения их из природного яда моллюсков в достаточных количествах) является основным препятствием к их широкому использованию в исследованиях НАХР.

До сравнительно недавнего времени все новые природные  $\alpha$ -конотоксины обнаруживали непосредственным выделением и хроматографической очисткой из цельных ядов *Conus*. В настоящее время большое количество новых пептидов открывается генно-инженерными методами – первоначальной идентификацией в библиотеке кДНК (полученной из мРНК, выделенной из ядовитых желез моллюсков), последующим пептидным синтезом и характеристикой функциональной активности синтетического продукта. Таким методом были обнаружены  $\alpha$ -конотоксины Ac1.1a/b, ImII, RgIA, BuIA, GIC, PIA, AgIA/B, Vc1.1, PeIA и Lp1.1 [51, 54, 55, 61, 81, 84, 87, 95–97] (структуры некоторых из них см. в табл. 1). Однако такой подход обычно не позволяет выявить возможные посттрансляционные модификации в структуре пептидов, хотя уже есть примеры решения этой проблемы применением современных методов масс-спектрометрии к анализу цельных ядов [98, 99]. Следует отметить, что природные  $\alpha$ -конотоксины содержат большое количество различных посттрансляционных модификаций. Наиболее характерные из них – амидированный С-конец, наличие остатков гидроксипролина,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты, сульфатированного тирозина (см. табл. 1) [70, 71, 100–104]. Более того, для полученных из библиотек кДНК структур нельзя утверждать наличие такого же, как и у природных  $\alpha$ -конотоксинов, замыкания дисульфидов ( $C^1-C^3$

Таблица 1.  
Структура и селективность некоторых представителей  
 $\alpha$ -конотоксинов

Токсин <sup>1</sup>	Вид <i>Conus</i>	Год <sup>2</sup>	Аминокислотная последовательность <sup>3</sup>	Селективность к подтипам нАХР	Ссылки <sup>4</sup>
<b>3/5 <math>\alpha</math>-конотоксины</b>					
GI	<i>C. geographus</i>	1981	ECCNPACGRHYS*	$\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$	[39–43]
MI	<i>C. magus</i>	1982	GRCCHPACGKNYS*	$\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$	[39, 41–46]
SI	<i>C. striatus</i>	1988	ICCNPAACGPKYS*	$\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$	[41, 43, 47–49]
SIA	<i>C. striatus</i>	1991	YCCHPACGKNFDC*	$\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$	[42, 43, 49, 50]
<i>Ac1.1b</i>	<i>C. achatinus</i>	2007	NGRCCHPACGKHFS*	$\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta$	[51]
<b>4/3 <math>\alpha</math>-конотоксины</b>					
ImI	<i>C. imperialis</i>	1994	GCCSDPRCAWR*	$\alpha 7, \alpha 9\alpha 10, \alpha 3\beta 2, \alpha 3\beta 4$	[52–55]; [56]; [57]
ImII	<i>C. imperialis</i>	2003	ACCSDRRCRWR*	$\alpha 7, \alpha 1\beta 1\epsilon\delta$	[54, 56]
<i>RgIA</i>	<i>C. regius</i>	2006	GCCSDPRCRYR	$\alpha 9\alpha 10$	[55, 58–60]
<b>4/4 <math>\alpha</math>-конотоксины</b>					
<i>BuIA</i>	<i>C. bullatus</i>	2005	GCCSTFPACVLY*	$\alpha 3(\alpha 6)\beta 2, \alpha 3(\alpha 6)\beta 4$	[61, 62]
<b>4/6 <math>\alpha</math>-конотоксины</b>					
AuIB	<i>C. aulicus</i>	1998	GCCSYPPCFATNPD*	$\alpha 3\beta 4$	[63, 64]
<b>4/7 <math>\alpha</math>-конотоксины</b>					
PnIA	<i>C. pennaceus</i>	1994	GCCSLPPCAANNPDY*	$\alpha 3\beta 2$	[65–68]
PnIB	<i>C. pennaceus</i>	1994	GCCSLPPCALSNDY*	$\alpha 7, \alpha 3\beta 4$	[65, 66]; [69]
EI	<i>C. ermineus</i>	1995	RDOCCYHPTCNMSNPQIC*	$\alpha 1\beta 1\gamma/\epsilon\delta, \alpha 3\beta 4, \alpha 4\beta 2$	[70, 71]
MII	<i>C. magus</i>	1996	GCCSNPVCCHLEHSNLC*	$\alpha 3\beta 2(\beta 3), \alpha 6$ -содержащие	[68, 72–75]; [76–80]
GIC	<i>C. geographus</i>	2002	GCCSHPACAGNNQHIC*	$\alpha 3\beta 2$	[81]
<i>Vc1.1</i>	<i>C. victoriae</i>	2003	GCCSDPRCNVDHPEIC*	$\alpha 9\alpha 10, \alpha 3\beta 4, \alpha 3(\alpha 5)\beta 2$	[58, 82]; [83]
PIA	<i>C. purpurascens</i>	2003	RDPCCSNPVC TVHNPQIC*	$\alpha 6\alpha 3\beta 2(\beta 3), \alpha 6\alpha 3\beta 4$	[84]
OmIA	<i>C. omaria</i>	2006	GCCSHPACNVNPHICG*	$\alpha 3\beta 2, \alpha 7$	[85]
SrIA	<i>C. spurius</i>	2007	RTCCSROTCRMYPYLCG*	$\alpha 4\beta 2, \alpha 1\beta 1\gamma\delta$	[71]
TxIA	<i>C. textile</i>	2007	GCCSRPCCIANNPDL*	$\alpha 3\beta 2$	[86]
<i>ArIB</i>	<i>C. arenatus</i>	2007	DECCSNPACRVNPHVCR	$\alpha 7, \alpha 6\alpha 3\beta 2\beta 3, \alpha 3\beta 2$	[87]

<sup>1</sup> Структура выделенных курсивом  $\alpha$ -конотоксинов выведена из кДНК; <sup>2</sup> год опубликования структуры; <sup>3</sup> во всех  $\alpha$ -конотоксинах замкнуты дисульфидные связи C<sup>1</sup>–C<sup>3</sup> и C<sup>2</sup>–C<sup>4</sup> (выделены серым фоном), а также \* указывает наличие амидированного С-конца, Y – обозначает сульфатированный тирозин – Y(SO<sub>3</sub>H), O – 4-гидроксипролин,  $\gamma$  –  $\gamma$ -карбоксиглутаминовую кислоту; <sup>4</sup> разделение ссылок точкой с запятой соответствует таковому в предыдущем столбце при разделении соответствующих подтипов нАХР.

и  $C^2-C^4$ ; так называемая «глобулярная» конформация). При этом синтетические аналоги многих выделенных из яда  $\alpha$ -конотоксинов (GI [105], GII [39], BuIA [62], ImI [106], RgIA [60]) с неправильным замыканием дисульфидных связей («gibbon» изомеры с  $C^1-C^4$  и  $C^2-C^3$  или даже формы с  $C^1-C^2$  и  $C^3-C^4$  дисульфидами) оказываются значительно менее активными, чем природные изомеры. Пожалуй, единственным исключением из этого правила является «gibbon» изомер  $\alpha$ -конотоксина AuIB, оказавшийся на порядок активнее своего природного изомера в тестах на парасимпатических нейронах крысы [107]. Интересно, что среди разнообразия конопептидов ядов *Conus* были обнаружены пептиды со структурой, подобной «gibbon» изомерам  $\alpha$ -конотоксинов:  $\rho$ -конотоксин TIA – блокатор  $\alpha_1$ -адренорецептора [108] или  $\chi$ -конотоксины, взаимодействующие с нейрональным транспортером норадреналина [109].

Пространственная структура  $\alpha$ -конотоксинов (зависящая от характера замыкания дисульфидов и количества а.о. в петлях I и II) во многом определяет их средство и селективность к подтипам nAHP. Из табл. 1 видно, что все  $\alpha$ -конотоксины из 3/5 подгруппы являются лигандами nAHP мышечного типа (а также рецепторов из *Torpedo*), поэтому для краткости их можно назвать «мышечными»  $\alpha$ -конотоксинами. Представители других подгрупп (4/3, 4/4, 4/6, 4/7) с большей или меньшей избирательностью взаимодействуют с различными нейрональными nAHP («нейрональные»  $\alpha$ -конотоксины). При этом они не проявляют явной зависимости между средством к определенному подтипу рецептора и своей принадлежностью к данной структурной подгруппе и, как правило, с близкой эффективностью взаимодействуют с двумя или более нейрональными подтипами nAHP (см. табл. 1). Интересно, что некоторые  $\alpha$ -конотоксины (ImII, EI, SrIA, SrIB) способны узнавать как мышечные, так и некоторые нейрональные холинорецепторы, однако все они по средству к мышечным nAHP заметно уступают 3/5  $\alpha$ -конотоксинам [56, 71].

К настоящему времени пространственные структуры высокого разрешения (в растворе – ЯМР или кристалле – рентгеноструктурный анализ) получены для большинства природных  $\alpha$ -конотоксинов [60, 65, 83, 104, 107, 110–124]. Все «нейрональные»  $\alpha$ -конотоксины разных подгрупп (4/3, 4/4, 4/6, 4/7), в отличие от 3/5 пептидов, характеризуются наличием выраженного  $\alpha$ -спирального участка вокруг 3-го а.о. цистеина (см. рис. 1 и [125]), что возможно объясняет выраженную специфичность последних только к мышечным nAHP.

Еще одной особенностью большинства 3/5  $\alpha$ -конотоксинов является их способность различать два участка связывания на мышеч-

ных nAХР и рецепторах *Torpedo*. При этом данный эффект – видоспецифичен. Например,  $\alpha$ -конотоксины MI, GI, SIA имеют высокоаффинный сайт связывания в области контакта  $\alpha 1$ - и  $\gamma$ -субъединиц nAХР из *T. californica* и низкоаффинный на границе  $\alpha 1$ - и  $\delta$ -субъединиц [41, 126]. В то же время сродство этих пептидов к  $\alpha 1/\delta$  сайту на мышечных холинорецепторах млекопитающих на 4 порядка выше, чем к  $\alpha 1/\gamma$  сайту [42, 127]. С другой стороны, гомологичный упомянутым пептидам  $\alpha$ -конотоксин SI (табл. 1) не обнаружил различия в сродстве к двум участкам связывания рецептора *Torpedo*, но сохранил эту способность по отношению к мышечному холинорецептору [48]. В отличие от 3/5 конотоксинов, представитель другой подгруппы –  $\alpha$ -конотоксин EI, также взаимодействующий с nAХР мышечного типа (табл. 1), показал более высокую аффинность к  $\alpha 1/\gamma$  участку nAХР *Torpedo*, но не различал между двумя сайтами связывания на мышечном холинорецепторе [70]. Исключительно высокое различие в сродстве к этим двум сайтам связывания того же рецептора (до 6 порядков с преимуществом к  $\alpha 1/\delta$  участку) была выявлена у недавно открытых  $\alpha$ -конотоксинов Ac1.1a и Ac1.1b [51].

Приведенные примеры наглядно свидетельствуют о преимуществах использования природных  $\alpha$ -конотоксинов – исключительно «тонких» инструментов для структурно-функциональной характеристики не только различных типов nAХР из разных источников, но даже их отдельных лиганд-связывающих участков. В первую очередь это относится к «мышечным» конотоксинам и холинорецепторам; ситуация с «нейрональными»  $\alpha$ -конотоксинами в этом смысле более сложная.

Первый выделенный в 1994 г. «нейрональный»  $\alpha$ -конотоксин ImI [128] был отнесен сначала к блокаторам гомоолигомерных nAХР: гетерологически экспрессированных в ооцитах *Xenopus* мышечных  $\alpha 7$ - и  $\alpha 9$ -подтипов и природного  $\alpha 7$  nAХР крысы [52, 53]. Позднее появились данные о более высокой аффинности этого пептида к некоторым гетеромерным холинорецепторам:  $\alpha 3\beta 4$  типу из коры надпочечников быка [57] или рекомбинантным  $\alpha 3\beta 2$  nAХР человека и крысы [56, 129]. Вероятно, как и в случае с «мышечными»  $\alpha$ -конотоксинами, «нейрональные»  $\alpha$ -конотоксины могут быть чувствительны к видовому происхождению холинорецептора. Кроме того, в литературе появились данные о влиянии на активность и даже специфичность некоторых «нейрональных» конотоксинов фактора «природности» тестируемого nAХР – находится ли он в природном источнике или является рекомбинантным продуктом [64].

Похожая история имела место и в случае с другим «нейрональным»  $\alpha$ -конотоксином – МII (табл. 1), который долгое время считался специфическим лигандом только холинорецепторов  $\alpha 3\beta 2$  типа [72–74]. Поздее, однако, выяснилось, что с еще большей эффективностью этот пептид связывается с различными нАХР, содержащими в своем составе  $\beta 3$ - и особенно  $\alpha 6$ -субъединицы (см., например, [75–80, 130] и обзоры [131, 132]). Еще один пример в этом ряду – «полиспецифичный» к самым разным подтипам нейрональных нАХР  $\alpha$ -конотоксин Vc1.1 (см. табл. 1 и [83, 95]), для которого не сразу была установлена основная мишень – гомоолигомерные  $\alpha 9$  холинорецепторы (в последнее время все чаще описываемые в комбинации со структурной  $\alpha 10$ -субъединицей) [58, 82].

В последние годы появилось (в том числе выявленных на основе анализа мРНК) много новых представителей всех подклассов «нейрональных»  $\alpha$ -конотоксинов с уникальными свойствами. Например, обнаружены природные  $\alpha$ -конотоксины PIA и OmIA, способные эффективно различать подтипы холинорецепторов с  $\alpha 3$ - и  $\alpha 6$ -субъединицами; причем первый пептид – мощный блокатор  $\alpha 6$  содержащих нАХР [84], а второй, напротив,  $\alpha 3$  содержащих рецепторов [85]. Было найдено также несколько новых высокоселективных для гетеромерного  $\alpha 3\beta 2$  нАХР  $\alpha$ -конотоксинов (например, GIC и TxIA (табл. 1) со сродством не менее, чем на 2 порядка более высоким, чем к другим подтипам холинорецепторов [81, 86]).

$\alpha$ -Конотоксин AuIB на сегодняшний день остается единственным природным пептидом, для которого основной мишенью является  $\alpha 3\beta 4$  нАХР (сродство к рекомбинантному  $\alpha 7$  рецептору крысы на порядок хуже) [63, 64]. Недавно описанный  $\alpha$ -конотоксин BuIA [61], хотя и не обладает какой-либо «нейрональной специфичностью» [61, 62], но с разной скоростью диссоциирует из комплексов с нАХР, содержащих  $\beta 2$ - или  $\beta 4$ -субъединицы [61, 133], что позволяет с помощью этого  $\alpha$ -конотоксина установить, содержится ли в данном подтипе холинорецептора  $\beta 2$ - или  $\beta 4$ -субъединица.

Необычным свойством  $\alpha$ -конотоксина ImII (очень близкого по структуре  $\alpha$ -конотоксину ImI) является его способность взаимодействовать с рекомбинантным  $\alpha 7$  нАХР, практически не конкурируя при этом с таким известным антагонистом этого подтипа рецептора, как  $\alpha$ -бунгаротоксин [54, 56]. Этот факт был расценен как наличие другого участка связывания  $\alpha$ -конотоксина ImII – отличного от «классического» сайта связывания агонистов/конкурентных антагонистов (таких, как  $\alpha$ -бунгаротоксин или  $\alpha$ -конотоксин ImI). Подобные дополнительные участки связывания имеются, по-видимому, и на

мышечном nAHP из *T. californica* (Кашеверов и др., J. Neurochem., в печати). Третий недавно открытый представитель подгруппы 4/3  $\alpha$ -конотоксинов – RgIA, в отличие от родственных ImI и ImII, оказался высокоактивным и селективным блокатором  $\alpha 9\alpha 10$  nAHP [55, 58]. Особый интерес к этому пептиду и упомянутому выше  $\alpha$ -конотоксину Vc1.1 вызван их способностью подавлять нейропатическую боль на моделях *in vivo* [58, 134]. Однако задействованность в антиболевым эффекте  $\alpha 9\alpha 10$  nAHP в настоящее время активно дискутируется [58, 135], в частности и потому, что природный прототип  $\alpha$ -конотоксина Vc1.1 (Vc1a, несущий две пост-трансляционные модификации [98]), также является мощным антагонистом  $\alpha 9\alpha 10$  nAHP, но не обладает антиболевым активностью.

В целом, характеризуя специфичность известных на сегодня «нейрональных»  $\alpha$ -конотоксинов, приходится признать, что большинство природных пептидов взаимодействует с примерно равной эффективностью с несколькими подтипами нейрональных nAHP (см. табл. 1). До сих пор сохраняется необходимость в селективном к гомомерным  $\alpha 7$  холинорецепторам и при этом высоко активном  $\alpha$ -конотоксине; нет аффинных лигандов для  $\alpha 3\beta 4$  nAHP и практически отсутствуют пептиды, которые мощно и специфически взаимодействовали бы с основным типом холинорецепторов, представленных в мозге –  $\alpha 4\beta 2$ . Все это диктует необходимость не только в расширении поиска новых пептидных соединений в яде моллюсков *Conus*, но и в создании на основе уже известных  $\alpha$ -конотоксинов аналогов с заданными свойствами.

#### IV. СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ $\alpha$ -КОНОТОКСИНОВ В ИССЛЕДОВАНИИ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ

Уже с момента выделения первых  $\alpha$ -конотоксинов были начаты работы по созданию их различных аналогов и к настоящему времени в литературе описаны сотни подобных пептидных лигандов на основе и «мышечных», и «нейрональных»  $\alpha$ -конотоксинов (структуры большей части представлены в обзорах [7, 136]). Синтез таких аналогов преследовал самые разные цели – основные из них в обобщенном виде представлены в табл. 2.

Одно из основных направлений подобных работ – выявление структурных элементов  $\alpha$ -конотоксинов, которые определяют их аффинность и специфичность к тому или иному подтипу nAHP. Часть этих исследований была посвящена изучению роли общих для всех  $\alpha$ -конотоксинов компонентов – таких, как дисульфидные

связи, формирующие характерные для каждой подгруппы петли I и II (см. рис. 1), или амидированный С-конец. О важности правильного замыкания двух дисульфидов в молекулах различных  $\alpha$ -конотоксинов для проявления ими биологической активности уже упоминалось ранее. При этом оказалось, что не последнюю роль в образовании «правильных» дисульфидов играет амидирование С-конца [143]. Важная роль химической природы такого «замыкания» была показана в серии работ с синтетическими аналогами некоторых пептидов, у которых дисульфидные связи заменены на искусственные конструкции (лактамы, дикарба-связи, селеноцистины) [146, 161–164]. Подобные синтезы, кроме чисто структурных исследований, могут иметь и

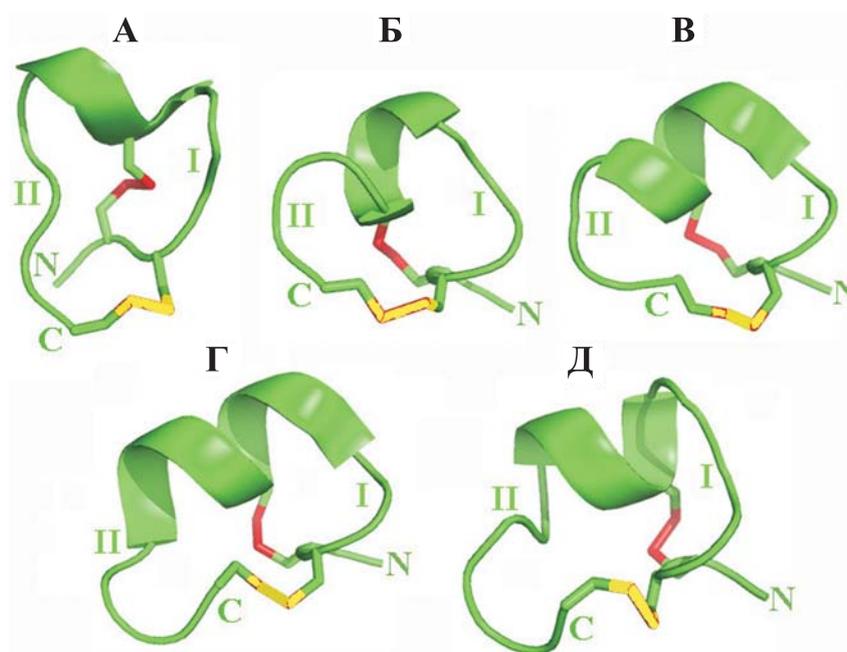


Рис. 1. Пространственные структуры на основе данных ЯМР для представителей разных подгрупп  $\alpha$ -конотоксинов: (А) –  $\alpha$ -конотоксин GI (3/5 подгруппа; PDB ID – 1XGA); (Б) –  $\alpha$ -конотоксин ImI (4/3 подгруппа; PDB ID – 1IMI); (В) –  $\alpha$ -конотоксин BuIA (4/4 подгруппа; PDB ID – 2I28); (Г) –  $\alpha$ -конотоксин AuIB (4/6 подгруппа; PDB ID – 1DG2); (Д) –  $\alpha$ -конотоксин MII (4/7 подгруппа; PDB ID – 1MII). Дисульфидные связи C<sup>1</sup>–C<sup>3</sup> и C<sup>2</sup>–C<sup>4</sup> выделены красным и желтым цветами, соответственно. Указаны также N- и С-концы и расположение петель I (аминокислотные остатки между вторым и третьим цистеинами) и II (аминокислотные остатки между третьим и четвертым цистеинами)  $\alpha$ -конотоксинов.

Таблица 2.  
Создание синтетических аналогов α-конотоксинов для исследования nAHR

Основная цель получения аналогов	Изменения/модификации структуры	Токсин	Ссылки <sup>1</sup>
Выяснение структурных элементов токсина, определяющих его функциональную активность и специфичность	Химические модификации активных групп	GI; MI; ImI; PnIA; PnIB; AnIB	[137, 138]; [45, 139, 140]; [141-144]; [144]; [145]; [103]
	Укороченные фрагменты	GI; SI; AcI.Ib; GID; PnIA; AnIB; RgIA	[146]; [47]; [51]; [104, 147]; [148]; [103]; [59]
	Одиночные замены а.о.	GI; SI; SIA; MI; ImI; ImII; RgIA; PnIA; PnIB; GID; VcI.I; TxIA; ArIB	[43, 49, 138, 146, 149]; [43, 48, 149]; [43]; [39, 43, 45, 139, 140, 149]; [54, 141, 142, 150, 151]; [54]; [59]; [65, 66, 69, 145]; [145]; [104]; [82, 135]; [86]; [87]
	Ala (Asp, Lys)-сканирующие мутагенезы	MI; ImI; PnIA; MII; VcI.I; GID	[45]; [150]; [152]; [78, 153]; [82]; [147]
Определение элементов токсина, формирующих его пространственную организацию	Множественные замены а.о.	ImI; MII; PnIA; PnIB; ArIB	[141]; [78, 154]; [86, 145, 155]; [145]; [87, 156]
	Химерные конструкции из разных токсинов	GI/ImI	[138]
	Cys-Cys изомеры	GI; GII; MI; SI; AuIB; RgIA; BulA	[105]; [39]; [39]; [157]; [64, 107]; [60]; [62]
	Нарушение дисульфидных связей	GI; MI; ImI	[146, 158, 159]; [39]; [150, 160]

окончание табл. 2 см. на стр. 289.

*окончание табл. 2.*

Определение элементов токсина, формирующую его пространственную организацию	Замена дисульфидных связей на иные	GI, SI; ImI; RgIA	[146]; [161]; [162, 163]; [164]
	Димеризация	GI	[138]
	Циклизация	МП	[165]
Фотоафинная модификация nAChR	Одиночные или множественные замены определенных а.о.	GI; ImI	[166]; [160, 167]
	Модификация фотоактивируемыми группами	GIA; MI; ImI	[50]; [168, 169]; [142]
	Замена а.о. на фотоактивируемые а.о.	GI	[168, 170, 171]
Создание флуоресцентных лигандов	Модификация флуоресцентными группами	GI; ImI; МП	[172, 173]; [24]; [174]
	[ <sup>125</sup> I]йодирование	GIA; MI; GI; МП; ArgB	[50]; [46, 50, 168, 169, 175]; [168, 170, 171]; [176-182]; [183]
Создание радиоактивных лигандов	Тритирование	GI	[184]
	Введение в структуры жирных кислот	МП	[185, 186]
Для клинических целей	Химерные структуры с чужеродными пептидными фрагментами	GI	[187, 188]

<sup>1</sup> разделение ссылкой точкой с запятой соответствует таковому в предыдущем столбце при разделении соответствующих α-конотоксинов.

важную практическую составляющую, например, как поиск способов увеличения стабильности соединений для успешного применения в исследованиях *in vivo* или клинической практике. Так, на эту роль вполне могут претендовать некоторые аналоги  $\alpha$ -селеноконотоксина ImI, сохранившие активность природного пептида [162]. Другой подход к решению проблемы стабильности пептидных лигандов (см. посвященной этой теме обзор [11]) – это создание циклических аналогов. Одной из первых (и чуть ли не единственной на сегодня) работ по подобной «инженерии» конотоксинов стало получение циклических аналогов  $\alpha$ -конотоксина МП с использованием серии линкеров разной длины; при этом один из аналогов сохранил эффективность и селективность природного пептида [165]. Несколько работ было опубликовано по созданию соединений с нарушенными дисульфидами или измененным положением в аминокислотной последовательности остатка(ов) цистеина, приводящее к изменению размера петель I и II  $\alpha$ -конотоксинов [138, 148, 158–160]. Среди последних следует отметить серию аналогов  $\alpha$ -конотоксина PnIA с последовательным укорочением размера петли II [148] и химерные молекулы, состоящие из петель разных подгрупп конотоксинов [138].

Однако основная часть информации об «активных сайтах»  $\alpha$ -конотоксинов разных подгрупп, определяющих их эффективность и специфичность, была получена из работ, в которых синтезировались и исследовались аналоги, содержащие единичные или множественные замены различных а.о. (так называемый «мутагенез»  $\alpha$ -конотоксинов) (табл. 2). Для таких наиболее востребованных  $\alpha$ -конотоксинов – как MI, RgIA, Vc1.1, GID, ImI, PnIA, PnIB и МП, в серии работ была проведена полная замена всех а.о. (за исключением дисульфидформирующих а.о. Cys), в том числе и на Ala (часто используемый в белково-пептидных исследованиях так называемый «аланин-сканирующий мутагенез») [45, 59, 82, 147, 150, 152, 153]. Благодаря этим исследованиям удалось, в частности, показать принципиальную роль Arg9  $\alpha$ -конотоксина GI для его эффективного взаимодействия с НАХР мышечного типа и для способности различать высоко- и низкоаффинные участки связывания на этих рецепторах [48, 49]. В то же время результаты «аланин-сканирующего мутагенеза» для другого «мышечного»  $\alpha$ -конотоксина MI выявили совершенно иной набор важных а.о. – наибольшее падение ингибиторной активности на высокоаффинном сайте связывания наблюдалось у аналогов, содержащих [Tyr12Ala] и [Pro6Ala] замены [45].

Мутагенез «нейрональных»  $\alpha$ -конотоксинов также выявил разнообразие а.о., отвечающих за сродство и специфичность каж-

дого конкретного представителя. Например, три соседних а.о. Asp5-Pro6-Arg7 и Trp10, полностью определяют специфичность α-конотоксина ImI к гомомерному α7 нАХР [141, 167]. В то же время у α-конотоксина PnIV главную роль в специфичности именно к α7 нАХР выполняет Leu10 [69]. Эффективный блокатор гетеромерного α3β2 холинорецептора – α-конотоксин МП, оказался чувствителен к любой из трех мутаций по а.о. – Asn5, Pro6 и His12 [153]. Исследования недавно открытого α-конотоксина RgIA, эффективного лиганда α9α10 нАХР, выявили структурный элемент этой эффективности и специфичности – а.о. Arg9 [59]. С другой стороны, еще один блокатор α9α10 нАХР – α-конотоксин Vc1.1 – существенно снижал сродство к этому рецептору при замене практически любого а.о.: трех из первой петли (Asp5-Pro6-Arg7) и пяти из второй (Asp11-His12-Pro13-Glu14-Phe15) [82]. Похожая ситуация с потерей сродства уже к α4β2 холинорецептору при одиночных заменах почти всех остатков на Ala (а также амидировании С-конца) наблюдалась и для α-конотоксина GID [147]. Полученная из «мутагенеза» α-конотоксинов информация и наличие пространственных структур высокого разрешения для большинства этих пептидов (см. рис. 1) позволили получить представления об участках их поверхности, контактирующих с конкретными подтипами нАХР.

Параллельно проводившиеся работы по мутации различных а.о. субъединиц холинорецепторов позволили охарактеризовать площадки связывания и на самих рецепторах. Такие работы были выполнены для мышечных [175, 189] и для различных нейрональных [56, 67, 68, 73, 154, 190] нАХР. С их помощью удалось, например, показать, какие а.о. трех субъединиц мышечных нАХР задействованы в формировании двух (α1/γ и α1/δ) различающихся по аффинности сайтов связывания конкурентных антагонистов, в том числе и α-конотоксинов [189, 191]. Мутации в субъединицах нейрональных нАХР (α3, α7, β2, β4 и других) позволили выявить а.о., участвующие в связывании α-конотоксина МП [68, 73] или вызывающие различия в кинетических параметрах связывания α-конотоксина BuIA с нАХР, содержащими β2- или β4-субъединицы [192]. С другой стороны, мутации в лиганд-связывающем участке α7 нАХР приводили к потере способности узнавать этот рецептор α-конотоксином ImI, но не ImII [56], что послужило убедительным доводом (в дополнение к неспособности последнего эффективно конкурировать с α-бунгаротоксином, о чем упоминалось в главе II) в пользу предположения о наличии иного участка связывания α-конотоксина ImII на α7 холинорецепторе [54].

Наиболее важным итогом всех этих «мутационных» работ можно считать появление гипотезы о природе конкретных взаимодействий

между отдельными а.о. лиганда и субъединицы холинорецептора в участке связывания, выявляемое с помощью метода парных мутаций. Этот подход использует тестирование набора мутированных пептидов и субъединиц нАХР и был применен для  $\alpha$ -конотоксинов MI, GI, SI, ImI, PnIA и PnIB [140, 145, 149, 151] и холинорецепторов разных типов. Результаты, полученные с использованием метода парных мутаций, позволили прийти к заключению о существовании сильного взаимодействия между Arg7  $\alpha$ -конотоксина ImI и Leu10  $\alpha$ -конотоксина PnIB, с одной стороны и, соответственно, остатками Tyr195 и Trp149 субъединицы гомомерного  $\alpha 7$  нАХР, с другой; при этом в обоих случаях эта основная связь стабилизировалась несколькими дополнительными предполагаемыми контактами [145, 151]. Несколько вероятных контактов между а.о.  $\alpha$ -конотоксина MI и а.о. мышечных нАХР (в том числе и рецепора *Torpedo*) также были предложены [140, 149].

Еще одним способом получения информации о прямых контактах между лигандом и его мишенью может быть метод фотоаффинной модификации. Он достаточно широко применялся для характеристики лиганд-связывающих участков природного нАХР *Torpedo* с помощью фотоактивируемых производных  $\alpha$ -нейротоксинов (см., например, [193–195]). Для получения фотоактивируемых лигандов по аминокетогруппам  $\alpha$ -конотоксинов GIA, ImI и MI вводились фотометки различной природы [50, 142, 168, 169]; фотоактивируемые аналоги  $\alpha$ -конотоксина GI получали в ходе пептидных синтезов введением в его аминокислотную последовательность остатка фотоактивируемой аминокислоты (*n*-бензоилфенилаланина, Bra) [168, 170, 171]. В первых работах с использованием таких аналогов было показано участие N- и C-концевых частей молекулы во взаимодействии с холинорецептором *Torpedo* и показано расположение участков их связывания на границах контакта  $\alpha 1$ -субъединицы нАХР с соседними субъединицами [50, 168]. Позднее с помощью фотоактивируемых аналогов  $\alpha$ -конотоксинов GI и MI удалось идентифицировать фрагменты  $\alpha 1$ ,  $\gamma$ - и  $\delta$ -субъединиц, участвующие в связывании этих аналогов, частично картировать  $\alpha 1/\gamma$  [171] и  $\alpha 1/\delta$  [169] лиганд-связывающие участки для двух разных нАХР *Torpedo*, соответственно, и даже предположить в первом случае участие а.о. Glu57  $\gamma$ -субъединицы в образовании кросс-сшивки с а.о. Bra12 соответствующего аналога  $\alpha$ -конотоксина GI.

Способность природных  $\alpha$ -конотоксинов достаточно эффективно различать многочисленные подтипы холинорецепторов делает их потенциально пригодными в качестве маркеров соответствующих

мишений в клетках, тканях и органах. Высокочувствительными методами детектирования малочисленных рецепторов являются флуоресцентный и радиолигандный анализы. Случаи получения флуоресцентно меченных производных  $\alpha$ -конотоксинов пока единичны [24, 172–174], а радиоактивные лиганды на их основе все более широко используются в различных исследованиях (см. табл. 2). Так, уже описано получение радиоактивных форм (тригированных или [ $^{125}$ I]иодированных)  $\alpha$ -конотоксинов МI и GI, которые служат эффективной заменой широко применяемому коммерческому [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -бунгаротоксину при работе с мышечными nAHP [43, 46, 50, 168, 175, 184]. В обоих случаях изотоп иода вводится в ароматическое кольцо остатка Туг; при этом возможно образование моно- и ди-иодпроизводных (в отсутствие Туг иодированию могут подвергаться остатки His) [137]. Для успешного применения метода фотоаффинной модификации nAHP *Torpedo* (см. выше) необходимо было также радиоактивно пометить все фотоактивируемые аналоги  $\alpha$ -конотоксинов [50, 168–171]. Получены и радиоактивные формы «нейрональных»  $\alpha$ -конотоксинов: в недавней работе было заявлено о синтезе [ $^{125}$ I]иодированного производного AgIB[V11L, V16A] аналога – мощного антагониста  $\alpha 7$  nAHP (см. табл. 3), – которое связывалось с мембранами мышинового гиппокампа с наномолярным сродством [183]. Однако самое широкое применение среди радиоактивно меченных  $\alpha$ -конотоксинов нашел [ $^{125}$ I]иодированный аналог  $\alpha$ -конотоксина МII, для получения которого молекулу пептида пришлось удлинить с N-конца на а.о. Туг [176]. Этот радиоактивный лиганд сегодня активно используется для детектирования подтипов nAHP, содержащих  $\alpha 6$ - и/или  $\alpha 3$ -субъединицы, на самых разных клеточных и тканевых препаратах и срезах (см, например, [130, 176–182]).

В последние годы явный прогресс был достигнут и в создании новых аналогов  $\alpha$ -конотоксинов, которые обладают более высоким сродством или специфичностью к определенному подтипу nAHP по сравнению с природными соединениями (табл. 3). Несмотря на большое разнообразие известных на сегодня природных пептидов и изначально более высокую (по сравнению, например, с нейротоксинами из ядов змей) их селективность к разным холинорецепторам, «узкоспециализированных» на конкретный подтип nAHP (в основном это касается нейрональных рецепторов)  $\alpha$ -конотоксинов практически нет (см. табл. 1). Необходимость в подобных лигандах заставляет создавать все новые и новые варианты на основе природных пептидных структур, в первую очередь, вводя в них одиночные или множественные аминокислотные замены. Выбор таких замен,

Таблица 3.  
**Влияние аминокислотных замен на активность  
и/или селективность некоторых  $\alpha$ -конотоксинов.  
Примеры создания высокоактивных и специфичных  
лигандов нАХР определенных типов**

Токсины и аналоги	Аминокислотная последовательность <sup>1</sup>	Сродство (нМ) к				Ссылки
		$\alpha$ 9 $\alpha$ 10 нАХР	$\alpha$ 7 нАХР	$\alpha$ 3 $\beta$ 2 нАХР	$\alpha$ 6 $\alpha$ 3 $\beta$ 2 $\beta$ 3 нАХР	
AnIB	GGCCSHPCAANNQDYC*	—	76	0.28	—	[103]
AnIB[ $\underline{Y}$ 16Y]	GGCCSHPCAANNQDYC*	—	840	0.64	—	[103]
PnIA	GCCSLPPCAANNPDYC*	—	250	8-25	—	[66-68]
PnIA[A10L]	GCCSLPPCALNNPDYC*	—	13	99	—	[66,86]
PnIA[S5R,A10L]	GCCSRPPCALNNPDYC*	—	10	4.6	—	[86]
TxIA	GCCSRPPCIANNPDLC*	—	390	3.6	—	[86]
TxIA[A10L]	GCCSRPPCIANNPDLC*	—	39	2.0	—	[86]
MII	GCCSNPVCHLEHSNLC*	—	~200	2.2	0.39	[72,78]
MII[E11A]	GCCSNPVCHLAHSNLC*	—	1050	8.7	0.16	[78]
MII[H9A,L15A]	GCCSNPVCALEHSNAC*	—	>10000	4850	2.4	[78]
MII[S4A,E11A,L15A]	GCCSNPVCHLAHSNAC*	—	~10000	1400	1.2	[154]
ArIB	DECCSNPACRVNPNHVCRRR	—	1.8	60	6.5	[87]
ArIB[V11L]	DECCSNPACRLNPNHVCRRR	—	0.54	39	—	[87]
ArIB[V11L,V16A]	DECCSNPACRLNPNHACRRR	—	0.36	75	120	[87]
ArIB[V11L,V16D]	DECCSNPACRLNPNHDCRRR	—	1.1	>10000	830	[87]
Vc1.1	GCCSDPRCNYDHP EIC*	110	7100	5500	—	[82]
Vc1.1[N9A]	GCCSDPRCAYDHP EIC*	13	$\geq$ 3000	185	—	[82]
Vc1.1[N9I]	GCCSDPRCIYDHP EIC*	9	960	230	—	[82]
Vc1.1[N9L]	GCCSDPRCLYDHP EIC*	8	$\geq$ 3000	2300	—	[82]
Vc1.1[N9G]	GCCSDPRCGYDHP EIC*	6	$\geq$ 3000	$\geq$ 3000	—	[82]

<sup>1</sup> во всех  $\alpha$ -конотоксинах и аналогах замкнуты дисульфидные связи C<sup>1</sup>-C<sup>3</sup> и C<sup>2</sup>-C<sup>4</sup>;

\* указывает наличие амидированного С-конца;

$\underline{Y}$  – обозначает сульфатированный тирозин – Y(SO<sub>3</sub>H);

фоном выделены введенные в аналоги замены а.о.

как правило, основывается либо на сходстве с аминокислотными последовательностями других известных  $\alpha$ -конотоксинов, либо на результатах Ala-сканирующего мутагенеза, либо проводится целенаправленное введение гидрофобных или заряженных а.о. Дополнительным преимуществом  $\alpha$ -конотоксинов является их возможная чувствительность к любой аминокислотной замене или даже химической модификации а.о. Наиболее известный пример для первого случая – это когда единственная мутация [A10L] у  $\alpha$ -конотоксина PnIA меняла его специфичность с подтипа  $\alpha 3\beta 2$  nAXP на  $\alpha 7$  (табл. 3) [65, 66]. Другой пример – когда модификация 5-(R)-фенилом остатка Pго6 в  $\alpha$ -конотоксине ImI существенно увеличила сродство аналога к  $\alpha 7$  nAXP [144].

Так, выше уже упоминалось о важности положительного заряда в N-концевой части (а.о. Arg9) как «мышечных» [48, 49, 139], так и некоторых «нейрональных» [59]  $\alpha$ -конотоксинов для их активности и/или специфичности. Для дальнейшего изучения эффекта положительного заряда в этой части молекулы была синтезирована серия аналогов нескольких «мышечных»  $\alpha$ -конотоксинов с введенными остатками Lys или Arg [43]. Оказалось, что появление положительного заряда в 12-м положении аминокислотной последовательности у  $\alpha$ -конотоксинов GI, SI и SIA увеличивало в несколько раз их сродство к nAXP *Torpedo*; при этом максимальный эффект (более чем на 2 порядка) достигался заменой [D12K] у  $\alpha$ -конотоксина SIA. Целенаправленное введение положительно заряженных а.о. было проведено также для «нейрональных»  $\alpha$ -конотоксинов PnIA[A10L] [86, 155] и Vc1.1 [82]; при этом для последнего были проведены полные Ala-, Asp- и Lys-сканирующие мутагенезы. Наиболее заметным здесь стало увеличение сродства к  $\alpha 7$  nAXP цыпленка для PnIA[A10L] при введении в него дополнительной [D14K]-мутации [155] и заметное возрастание аффинности к  $\alpha 9\alpha 10$  nAXP для аналогов  $\alpha$ -конотоксина Vc1.1, содержащих вместо Asn9 ряд алифатических а.о. (см. табл. 3 и [82]).

Пожалуй, самыми успешными примерами создания «узкоспециализированных» лигандов для конкретных подтипов холинорецепторов на сегодня следует признать получение серии аналогов  $\alpha$ -конотоксинов MII и AgIV. Введением в последовательность первого пептида одиночных, двойных и даже тройных замен нескольких а.о. на Ala удалось получить не только самый мощный на сегодня антагонист  $\alpha 6\alpha 3\beta 2\beta 3$  nAXP – MII[E11A] [78, 181], но и создать лиганды (MII[H9A,L15A] и MII[S4A,E11A,L15A]), более чем на три порядка различающиеся по сродству к родственным подтипам рецептора, содержащим  $\alpha 6$ - и  $\alpha 3$ -субъединицы [78, 154] (табл. 3). С помощью

МII[S4A,E11A,L15A] были выявлены те а.о. в этих субъединицах, которые отвечают за подобное различие [154]. Перспективность введения аминокислотных замен была наглядно продемонстрирована в случае с  $\alpha$ -конотоксином ArIB, когда из «полиспецифичного» пептида (см. табл. 1) были получены эффективные и высокоспецифичные к  $\alpha 7$  nAХР лиганды – ArIB[V11L,V16A] и ArIB[V11L,V16D] (см. табл. 3 и [87]). Первый из них, как уже упоминалось, получен в радиоактивной форме и успешно использован в радиолигандных тестах по детектированию  $\alpha 7$  холинорецептора в препаратах гиппокампа [183].

Синтез новых аналогов  $\alpha$ -конотоксинов разных подгрупп не прекращается и стимулируется регулярным открытием все новых их представителей в ядах *Conus*, а в последнее время и компьютерным моделированием (см. далее). При этом в дизайне и получении новых соединений на основе этих пептидов в последние несколько лет стали прослеживаться четкие тенденции к их возможному практическому применению в качестве лекарств нового поколения. Так, в медицинскую практику уже введен (под торговым названием Приалт) блокатор определенных типов  $Ca^{2+}$  каналов –  $\omega$ -конотоксин MVIIA – для подавления хронической боли [196]. В настоящее время продолжается упомянутая выше научная дискуссия об антиболевых свойствах  $\alpha$ -конотоксинов Vc1.1 и RgIA, тестируемых в некоторых моделях на животных [58, 134], дающая надежду на возможное использование  $\alpha$ -конотоксинов в качестве анальгетиков [95]. Эта дискуссия расширилась после того, как появились данные о возможном агонистическом действии этих конотоксинов на  $Ca_v2.2$  тип  $Ca^{2+}$  канала через G-белок-зависимый GABA-B рецептор [197, 198]. Перспективными могут оказаться недавно открытые  $\alpha$ -конотоксины SrIA и SrIB, обладающие при низких концентрациях способностью усиливать холинергические эффекты [71]. Поэтому вполне логично выглядят попытки создания более стабильных *in vivo* пептидных аналогов (путем циклизации или введением неприродных связей), о чем также уже упоминалось выше. В этом же ряду стоит и попытка создания аналогов  $\alpha$ -конотоксинов, способных преодолеть гемэнцефалический барьер. При введении в разные положения молекулы  $\alpha$ -конотоксина MII остатка жирной кислоты (lip amino acid) удалось получить аналог (содержащий эту модификацию на N-концевой аминогруппе), который сохранил активность исходного пептида [185] и позднее был протестирован на распределение *in vivo* при оральном введении [186].

## V. АЦЕТИЛХОЛИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ – ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ГОМОЛОГИ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ

Результатом многолетних исследований взаимодействия различных нАХР с холинергическими лигандами самой разной природы (методами фотоаффинной модификации и мутационного анализа, которые обсуждались выше в применении к  $\alpha$ -конотоксинам) привели к пониманию принципов организации структуры и локализации участков связывания нейротрансмиттеров на рецепторе. Эти карманы связывания находятся на границах контакта соседних субъединиц (одной из которых должна быть  $\alpha$ -субъединица) и образованы тремя сегментами (петлями)  $\alpha$ -субъединицы (основная сторона) и тремя петлями соседней субъединицы (вспомогательная сторона). По принятой сегодня номенклатуре, эти сегменты получили обозначение А–F петель (см., например [199]). На рис. 2 приведены в качестве примера последовательности двух  $\alpha$ -субъединиц мышечного и нейронального нАХР с указанием расположения этих петель. Для связывания с нАХР всех классических холинергических лигандов была показана принципиальная роль одних и тех же ароматических а.о. в петлях основной стороны, а также соседних а.о. С<sub>1</sub> и С<sub>2</sub> петли С (см. рис. 2).

Однако существенный прорыв в понимании детальной структурной организации лиганд-связывающих участков нАХР был достигнут после выделения из глиальной ткани прудовика *Lymnaea stagnalis* ацетилхолин-связывающего белка (АХСБ), модулирующего синаптическую передачу [5]. Успешная экспрессия этого водорастворимого белка и его последующая кристаллизация привели к получению пространственной структуры высокого разрешения в 2.7 Å [6], которая, стала наряду с крио-электронной структурой нАХР *Torpedo* [1], основой для объяснения полученных ранее результатов структурно-функциональных исследований холинорецепторов и создания моделей их комплексов с лигандами различной природы. Позднее были обнаружены и так же успешно экспрессированы и кристаллизованы два других АХСБ из моллюсков *Aplysia californica* [200] и *Bulinus truncatus* [201].

Все АХСБ по своему размеру близки к N-концевым лиганд-связывающим доменам субъединиц нАХР и в функционально-активной форме образуют симметричную пентамерную форму с порой вдоль центральной оси, очень напоминающую «внеклеточную» часть пентамерного рецепторного комплекса. Несмотря на то, что гомология по аминокислотной последовательности как между самими

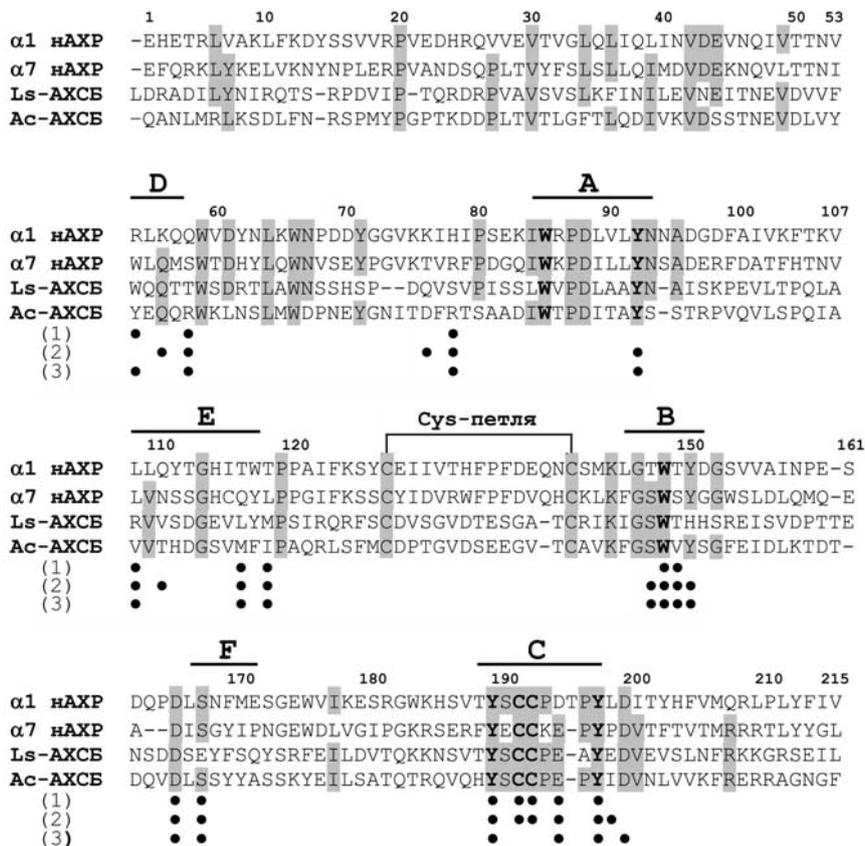


Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей двух N-концевых внеклеточных доменов α-субъединиц нАХР (мышечного α1 и нейронального α7) человека с последовательностями АХСБ из *L. stagnalis* и *A. californica*.

Нумерация а.о. – по последовательности α1-субъединицы. Серым фоном выделены консервативные остатки (не менее трех совпадений из четырех). Указано примерное расположение петель, формирующих участки связывания агонистов/конкурентных антагонистов нАХР (А, В, С – петли основной и D, Е, F – петли вспомогательной стороны); в петлях А, В, С жирным шрифтом указаны а.о., непосредственно взаимодействующие с агонистами по данным различных исследований. Также указано положение Сус-петли. Точками указаны основные контакты АХСБ из *A. californica* с α-коноксинами PnIA[A10L,D14K] (1), ImI (2) и TxIA[A10L] (3) по данным кристаллографических исследований.

АХСБ, так и между ними и различными субъединицами нАХР невелика и составляет 18–24 %, все наиболее важные остатки петель А–F, формирующих лиганд-связывающий карман холинорецепторов, присутствуют и у АХСБ (см. рис. 2). Этот факт, очевидно, объясняет способность АХСБ эффективно связывать низкомолекулярные агонисты нАХР, а также многие другие холинергические лиганды, например,  $\alpha$ -бунгаротоксин [5, 200], и, в дополнение к указанному выше структурному сходству, дает основание рассматривать эти белки в качестве адекватной модели лиганд-связывающих доменов всех холинорецепторов. Интересно, что три разных АХСБ проявляют различную чувствительность к разным холинергическим лигандам: например,  $\alpha$ -бунгаротоксин обладает нанолярным сродством к белку из *L. stagnalis*, на два порядка меньшим к АХСБ из *A. californica* и практически не связывается с белком из *B. truncatus* [155, 200, 201]. Этот факт очень напоминает фармакологическое разнообразие различных подтипов нАХР и позволяет провести дополнительную параллель в сходстве между АХСБ и холинорецепторами.

Первая опубликованная структура АХСБ представляла собой комплекс с молекулами буфера НЕРЕС (по одной в каждом из 5-ти карманов связывания пентамера), в котором проводилась кристаллизация [6]. Это соединение содержит положительно заряженный четвертичный амин, как и классический лиганд нАХР – ацетилхолин. Вскоре были опубликованы кристаллические структуры комплексов АХСБ из *L. stagnalis* и *A. californica* с настоящими холинергическими агонистами карбамоилхолином и никотином [202], а также  $\alpha$ -лобелином и эпibatидином [203]. Во всех полученных комплексах молекулы агонистов (а также молекулы НЕРЕС) были расположены полностью внутри кармана связывания, как и предсказывалось ранее, образованного петлями А, В и С одной молекулы АХСБ и петлями D, F и E соседней с ней другой молекулы белка. Оказалось, что этот карман образован боковыми цепями в основном ароматических а.о.: Tyr89/91 (петля А, соответственно, АХСБ из *L. stagnalis/A. californica*), Trp143/145 (петля В), Tyr185/186, соседних Cys187-Cys188/188-189 и Tyr192/193 (петля С), Trp53/Tyr53 и Gln55 (петля D), Arg104/Val106, Leu112/Met114 и Met114/Ile116 (петля E), Tyr164/166 (петля F). Все перечисленные остатки основной стороны (петли А, В и С) совпадают с соответствующими а.о.  $\alpha$ -субъединиц нАХР различных подтипов (рис. 2), в отличие от остатков вспомогательной стороны.

С учетом полученных структур АХСБ были предложены первые модели комплексов нейрональных и мышечных нАХР с пептидными антагонистами,  $\alpha$ -нейротоксинами и  $\alpha$ -конотоксинами (см., напри-

мер, [204, 205]), участок связывания которых, согласно моделям, был расположен в том же кармане, что и для низкомолекулярных агонистов. Однако, основываясь на пространственной структуре АХСБ из *Lymnaea stagnalis*, данных опытов, полученных с помощью парных мутаций (см. выше), и методах докинга, было высказано предположение о возможном перекрытии, но не идентичности участков связывания  $\alpha$ -конотоксинов PnIB и ImI на  $\alpha 7$  типе холинорецептора или  $\alpha$ -конотоксинов PnIA и MII на  $\alpha 3\beta 2$  nАХР [205]. Несмотря на то, что при создании подобного рода моделей иногда привлекались дополнительные данные, полученные из структурных исследований (ЯМР, рентгеноструктурный анализ) комплексов фрагментов  $\alpha$ -субъединиц некоторых nАХР или их гомологов с пептидными токсинами [206–209], они не могли учитывать выявленных позднее существенных конформационных отличий в участке связывания, занятого молекулой антагониста. Возможность подобного рода конформационных отличий стала ясна уже при сравнении кристаллических структур АХСБ в комплексе с агонистами со структурой белка с незанятым участком связывания [203] – в первом случае петля С оказывается придвинутой к центральной оси пентамера, как бы охватывая связанную молекулу агониста.

Первая кристаллическая структура комплекса АХСБ с пептидным антагонистом была получена для  $\alpha$ -кобратоксина [210]. Хотя в этом случае не удалось достичь высокого разрешения (4.2 Å), она подтвердила предположения о многоточечном характере взаимодействия нейротоксина с мишенью и показала проникновение концевого изгиба его центральной петли в лиганд-связывающий карман. При этом петля С у АХСБ осталась в более отклоненном от центральной оси пентамера положении, в отличие от ее положения в комплексе белка с любым агонистом (отклонение доходило до 10 Å). Окончательное подтверждение факта существенного конформационного отличия участка связывания АХСБ, занятого антагонистом, стало возможным после получения структур высокого разрешения (2.1–2.4 Å) комплексов АХСБ с другими пептидными холинергическими антагонистами –  $\alpha$ -конотоксинами [86, 129, 155, 203].

## **VI. α-КОНОТОКСИНЫ И АЦЕТИЛХОЛИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И НОВЫЕ КОМПЬЮТЕРНЫЕ МОДЕЛИ НА ИХ ОСНОВЕ**

Поскольку в функционально-активной форме все АХСБ представляют собой гомопентамеры, можно было ожидать, что по своему фармакологическому профилю они будут наиболее близки гомомерным подтипам ( $\alpha 7$  и  $\alpha 9$ ) нейрональных нАХР. В действительности, однако, три разных белка показывают сильно различающееся сродство к конкретному лиганду. В предыдущей главе уже упоминалось о подобном эффекте по отношению к  $\alpha$ -бунгаротоксину. В полной мере это оказалось справедливым и для  $\alpha$ -конотоксинов. Так,  $\alpha$ -конотоксин ImI, как и  $\alpha$ -бунгаротоксин, эффективный блокатор  $\alpha 7$  нАХР, обладая наномолярной аффинностью к АХСБ *A. californica*, показывает в зависимости от метода тестирования на 2–4 порядка меньшее сродство к белку из *L. stagnalis* [155, 200], сравнимое с эффективностью действия мышечных  $\alpha$ -конотоксинов (табл. 4). Другой специфичный к  $\alpha 7$  холинорецепторам пептид – PnIA[A10L] аналог – в конкуренции с радиоактивно меченным  $\alpha$ -бунгаротоксином не уступал по сродству  $\alpha$ -конотоксину ImI за связывание с АХСБ из *A. californica*, но показал при этом достаточно эффективное связывание и со вторым белком (табл. 4). Микромолярное сродство к обоим АХСБ показал  $\alpha$ -конотоксин МП, действующий на гетеромерные  $\alpha 6/\alpha 3\beta 2$  холинорецепторы.

Стоит отметить, что введением мутаций в  $\alpha$ -конотоксины можно добиться получения аналогов, более эффективных по отношению не только к разным нАХР (см. главу IV), но и к разным АХСБ. Так, SIA[D12K] мутант оказался не только мощным блокатором нАХР *T. californica*, но и более чем на порядок активнее природного «мышечного»  $\alpha$ -конотоксина SIA по отношению к обоим АХСБ, а дополнительная [D14K]-замена в PnIA[A10L] привела к заметному возрастанию сродства такого двойного мутанта к АХСБ из *L. stagnalis*, но не *A. californica*, что было продемонстрировано двумя независимыми методами (табл. 4).

Способность АХСБ эффективно связывать некоторые  $\alpha$ -конотоксины дает основание к использованию этих белков для скринирования ядов *Conus* на предмет поиска новых пептидных лигандов нАХР. Первым удачным примером применения такого подхода стало обнаружение с помощью АХСБ из *L. stagnalis* и выделение из яда *C. textile* нового  $\alpha$ -конотоксина TxIA [86] (см. также табл. 1). Он оказался

Таблица 4.  
**Эффективность взаимодействия  $\alpha$ -конотоксинов и их аналогов с АХСБ из *L. stagnalis* (Ls) и *A. californica* (Ac) по данным, полученным с использованием различных методов**

Токсины и аналоги	Средство ( $IC_{50}/K_i$ или $K_D$ , нМ) по данным RLA/SPR/ITC/SF <sup>1</sup>		Ссылки
	Ls-АХСБ	Ac-АХСБ	
GI	40000/-/-/-	25500/-/-/-	[155]
MI	8500/-/-/-	4500/-/-/-	[136]
SIA	12000/-/-/-	44000/-/-/-	[136]
SIA[D12K]	820/-/-/-	3700/-/-/-	[136]
MIИ	780-1100/-/-/-	4100/-/-/-	[86, 155]
ImI	4100/-/-/14000	33/-/-/0.88	[155, 200]
PnIA	1000/-/-/-	-	[86]
PnIA[A10L]	80-160/-/85/-	36/-/37/-	[86, 155]
PnIA[A10L,D14K]	13/8.8/28/-	28/-/33/-	[86, 155]
PnIA[S5R,A10L]	6.2/-/-/-	-	[86]
TxIA	1.7/-/-/-	-	[86]
TxIA[A10L]	1.1/-/-/-	-	[86]

<sup>1</sup> RLA – представлены значения  $IC_{50}$  или  $K_i$ , полученные методом радиолигандного анализа в конкуренции с [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -бунгаротоксином за связывание с АХСБ; SPR – представлены значения  $K_D$  прямого связывания с АХСБ из метода поверхностного плазмонного резонанса; ITC – представлены значения  $K_D$  прямого связывания с АХСБ из метода изотермической калориметрии; SF – представлены расчетные значения  $K_D$  по тушению флуоресценции собственных триптофанов, полученные методом спектрофлуориметрии в остановленном потоке.

первым пептидом, для которого эффективность взаимодействия с АХСБ была выше, чем с nАХР, среди которых наибольшим было средство к  $\alpha 3\beta 2$  типу. Его TxIA[A10L] аналог оказался даже более эффективным на АХСБ и на nАХР (см. [86] и табл. 4).

Кристаллическая структура высокого разрешения (2.4 Å) первой была установлена для комплекса АХСБ из *A. californica* и аналога PnIA[A10L,D14K], эффективного блокатора  $\alpha 7$  nАХР, с наномолярным средством взаимодействующего также и с обоими АХСБ [155] (табл. 4). Пять молекул пептида были погружены в те же пять карманов связывания, расположенных на границе контакта соседних молекул белка, в которых ранее обнаружили связанные агонисты. При взаимодействии PnIA[A10L,D14K] с АХСБ преобладают гидрофобные кон-

такты. На основной стороне эти контакты со стороны белка были сформированы за счет тех же самых консервативных а.о., которые и определяют «холинергический профиль» АХСБ: Trp145 из петли В, Tyr186, Tyr193 и соседний дисульфид Cys188-Cys189 из петли С (рис. 2). Боковые цепи Val106, Met114, Ile116 и Val146 образуют особую гидрофобную область, в которой располагается мутированный остаток Leu10 пептида, наделяющий его повышенным сродством к  $\alpha 7$  нАХР и АХСБ *L. stagnalis* (см. выше). Ряд контактов с другими а.о. основной и вспомогательной стороны (Tyr53, Arg57, Arg77, Asp162, Ser164 и Glu191) завершают пространственную организацию участка связывания пептида (рис. 2).

Выявленные взаимодействия между а.о. АХСБ и PnIA[A10L,D14K] находятся в хорошем соответствии с предполагавшимися по данным мутагенеза контактами между родственным  $\alpha$ -конотоксином PnIB и  $\alpha 7$  нАХР, хотя были обнаружены и определенные расхождения. Так, по данным метода парных мутаций, определяющая роль в связывании а.о. Leu10 пептида (в значительной степени ответственного за высокое сродство  $\alpha$ -конотоксинов PnIB и PnIA[A10L] к  $\alpha 7$  нАХР) отводилась а.о. Trp149 рецептора (см. главу IV), тогда как по данным рентгеноструктурного анализа гомологичный остаток АХСБ из *A. californica* (Trp145) расположен вблизи а.о. Pro6 и Pro7 пептида, а его Leu10, как упоминалось выше, находится в гидрофобном кармане из боковых цепей 4-х алифатических остатков белка.

Позднее были получены кристаллические структуры высокого разрешения еще для двух комплексов АХСБ из *A. californica* с  $\alpha$ -конотоксинами ImI [129, 203] и TxIA[A10L] [86]. Все три пептида занимают один и тот же сайт связывания, но их расположение в этом сайте несколько различается. Даже молекулы очень близких по структуре TxIA[A10L] и PnIA[A10L,D14K] аналогов (см. табл. 1) имеют различающуюся ориентацию в кармане связывания (рис. 3). Это различие является следствием уникальных контактов с остатками АХСБ для каждого пептида при том, что большая часть выявленных рентгеноструктурным анализом взаимодействий является общей для всех трех соединений (рис. 2). Пример подобной уникальной связи – это сильное ионное взаимодействие между а.о. Asp195 белка и Arg5 TxIA[A10L]; для  $\alpha$ -конотоксина ImI (с его заметно отличающейся от первых двух пептидов структурой и аминокислотным составом) также были выявлены взаимодействия с а.о. Gln55, Asp75, Thr108 и Ile194 АХСБ, не задействованные в связывании TxIA[A10L] и PnIA[A10L,D14K] (рис.2).

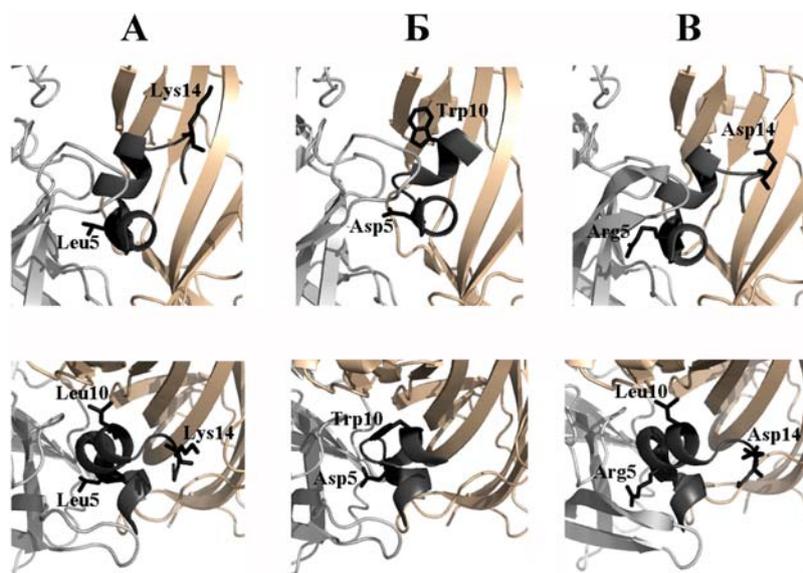


Рис. 3. Кристаллические структуры лиганд-связывающего участка АХСБ из *A. californica* с находящимися в нем  $\alpha$ -конотоксинами: (А) – PnIA[A10L,D14K] (4/7 подгруппа; PDB ID – 2br8); (Б) – ImI (4/3 подгруппа; PDB ID – 2c9t); (В) – TxIA[A10L] (4/7 подгруппа; PDB ID – 2uz6). На верхней панели представлен вид сбоку; на нижней – вид сверху. Для простоты указаны части структур только двух соседних молекул АХСБ (основная сторона – слева, окрашена серым цветом; вспомогательная сторона – справа, окрашена коричневым цветом) из целого пентамерного комплекса. Конотоксины окрашены в темный цвет; для них отдельно обозначены боковые цепи 5-го, 10-го и 14-го а.о.

Однако, несмотря на эти различия, основной характерной структурной особенностью комплексов АХСБ из *A. californica* с каждым их трех пептидов является отодвинутое от центральной оси пентамерного комплекса положение петли С белка (а.о. 183–194). Оно аналогично положению петли С другого АХСБ из *L. stagnalis* в комплексе с  $\alpha$ -бунгаротоксином (см. главу V) и близко к ее положению в свободном АХСБ [203, 211] или в  $\alpha 1$ -субъединице nАХР *T. marmorata* [1], т.е. в случае отсутствия каких-либо лигандов в участке(ах) связывания. Как уже упоминалось выше, при связывании различных холинергических агонистов рентгеноструктурный анализ выявляет петлю С придвинутой к молекуле АХСБ и как бы охватывающей молекулу лиганда. Переноса эти данные на функционально-активный холинорецептор, можно сделать предположение, что в состоянии

покоя (resting state) в отсутствие агонистов петля С отодвинута от центральной оси ионного канала; связывание агониста приводит к ее смещению в сторону оси (десенситизированное состояние рецептора), что вызывает конформационные перестройки (поворот субъединиц вокруг центральной оси), передающиеся на канальную часть и вызывающие в конечном итоге открытие канала. Связывание же антагониста ( $\alpha$ -конотоксина или  $\alpha$ -нейротоксина) фиксирует положение петли С (и, соответственно, состояние покоя рецептора), блокируя возможность канальных перестроек и функционального ответа. Однако к подобным интерпретациям возможного механизма передачи сигнала через nAHP, сделанным на основе структуры комплексов водорастворимых АХСБ с  $\alpha$ -конотоксинами, надо относиться с осторожностью, поскольку те же  $\alpha$ -конотоксины ImI и PnIA[A10L,D14K] вели себя как агонисты по отношению  $\alpha$ 7 nAHP, содержащему [L247T]-мутацию [129, 155].

Полученная новая структурная информация об организации лиганд-связывающих участков АХСБ, занятых антагонистами, внесла существенные коррективы в методы компьютерного моделирования (докинга и молекулярной динамики), сделала их более адекватными при решении задач создания новых высокоэффективных и селективных лигандов для разных подтипов холинорецепторов и позволила успешно объяснить в ряде случаев полученные ранее экспериментальные данные. В качестве иллюстрации последнего ниже приводятся несколько примеров «компьютерного объяснения» некоторых результатов структурно-функциональных исследований АХСБ и nAHP с использованием  $\alpha$ -конотоксинов.

В главе VI упоминалось, что дополнительная [D14K]-мутация в  $\alpha$ -конотоксине PnIA[A10L] приводила к заметному увеличению эффективности взаимодействия с АХСБ из *L. stagnalis*, но не *A. californica* (табл. 4). Для объяснения этого эффекта на основе кристаллической структуры комплекса PnIA[A10L,D14K] с АХСБ из *A. californica* было проведено моделирование расположения этого аналога в кармане связывания второго белка [155]. Согласно полученным расчетам, в комплексе с последним, введенный а.о. Lys14 аналога может образовывать сильное ионное взаимодействие с а.о. Glu110 белка, тогда как в комплексе с АХСБ *A. californica* боковая цепь Lys14 экспонирована в растворитель. Чтобы объяснить подобное увеличение сродства к nAHP *T. californica* для аналогов «мышечных»  $\alpha$ -конотоксинов, в которые вводили положительно заряженный а.о. по 12-му положению (см. главу IV), была построена модель этого рецептора с одним из таких аналогов – SIA[D12K], для которого

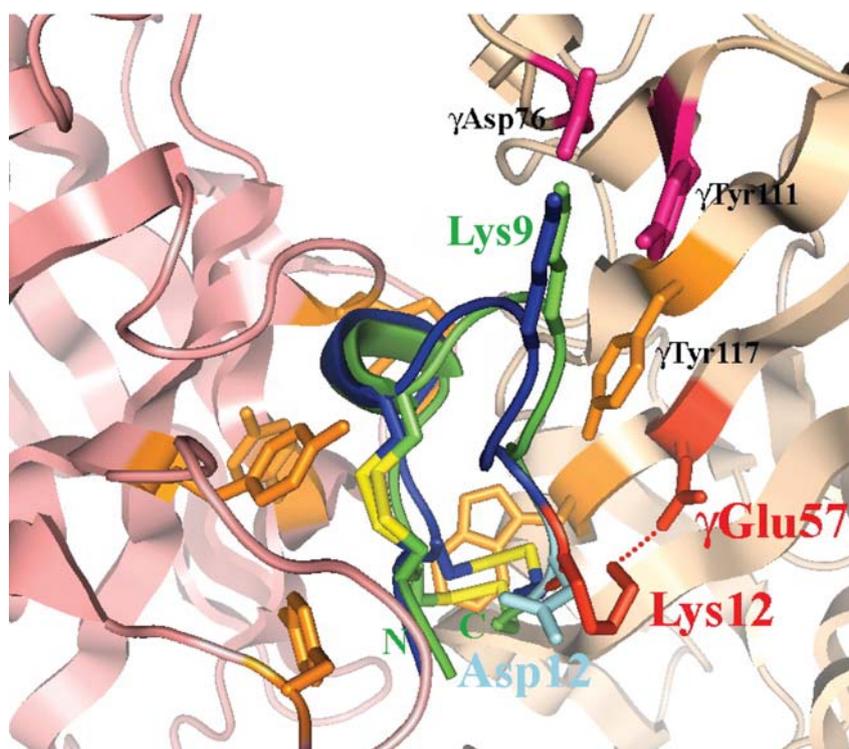


Рис. 4. Модель расположения  $\alpha$ -коноксина SIA (синий цвет) или его SIA[D12K] аналога (зеленый цвет) в лиганд-связывающем участке nAHP *T. californica*.

Розовым цветом слева обозначен N-концевой внеклеточный домен  $\alpha 1$ -субъединицы рецептора (основная сторона), бежевым цветом справа –  $\gamma$ -субъединицы (вспомогательная сторона). Показаны и выделены оранжевым цветом боковые цепи ароматических а.о. субъединиц nAHP, участвующих в связывании классических агонистов. Обозначены и также выделены цветом (малиновым) а.о. вспомогательной стороны, которые предположительно контактируют с  $\alpha$ -коноксином SIA. Красным цветом выделен а.о. Glu57  $\gamma$ -субъединицы, который может образовывать сильную ионную связь (пунктир) с а.о. Lys12 мутантного пептида, также выделенного красным цветом (остаток Asp12 природного  $\alpha$ -коноксина SIA окрашен голубым цветом). У пептидов также дополнительно выделены N- и C-концы и дисульфидные связи (желтым цветом). Рисунок взят из статьи Кашеверов и др. [43].

эффект был максимальным [43]. Согласно построенной модели (рис. 4), причиной возрастания эффективности взаимодействия с рецептором может служить образование ионной связи между Lys12 пептида и Glu57  $\gamma$ -субъединицы нАХР *T. californica*. Моделирование того же рецептора, но уже в комплексе с фотоактивируемым аналогом другого «мышечного»  $\alpha$ -конотоксина GI показало возможность существования двух разных ориентаций молекулы аналога в  $\alpha 1/\gamma$  лиганд-связывающем участке рецептора [171]. В этих двух рассчитанных ориентациях фотоактивируемая группа пептида была приближена, соответственно, к петлям D или F, фрагменты которых кросс-сшиты с конотоксином, и были детектированы в опытах по фотоаффинной модификации нАХР *T. californica* [171].

К настоящему времени опубликовано большое количество работ, в которых приводятся модели комплексов различных типов нейрональных нАХР с холинергическими лигандами самой разной природы, в том числе  $\alpha$ -конотоксинами (см., например, [155, 212–214]). Последние могут быть использованы для дизайна новых мощных и селективных пептидных аналогов. Успешным примером создания эффективного аналога  $\alpha$ -конотоксина на основе данных, полученных из кристаллической структуры комплексов  $\alpha$ -конотоксинов с АХСБ, может служить получение PnIA[S5R,A10L] [86]. Кристаллическая структура комплекса TxIA[A10L] аналога – эффективного лиганда  $\alpha 3\beta 2$  нАХР (см. табл. 3) – с АХСБ из *A. californica* выявила взаимодействие между Arg5 пептида и Tyr186 и Asp195 белка (см. выше). Введение а.о. Arg в 5-е положение  $\alpha$ -конотоксина PnIA[A10L] привело к новому соединению, которое показало более высокое сродство к  $\alpha 3\beta 2$  нАХР (табл. 3) и к АХСБ из *L. stagnalis* (табл. 4).

Все приведенные выше примеры убедительно говорят о той огромной роли, которую сыграли АХСБ в развитии наших знаний об устройстве и функционировании всей холинергической системы. Тем не менее до недавнего времени оставался вопрос о корректности переноса данных (в первую очередь данных рентгеноструктурного анализа), полученных на гетерологически экспрессированных водорастворимых АХСБ, на полноразмерные никотиновые холинорецепторы. Два недавних открытия – кристаллизация структуры комплекса гетерологически экспрессированного лиганд-связывающего домена  $\alpha 1$ -субъединицы мышечного нАХР мыши с  $\alpha$ -бунгаротоксином [215] и кристаллизация полноразмерных бактериальных лиганд-управляемых ионных каналов [2–4, 216], – могут в существенной степени снять подобного рода сомнения. Несмотря

на то, что структура высокого разрешения (1.94 Å) комплекса с  $\alpha$ -бунгаротоксином была получена для мономерного домена  $\alpha 1$ -субъединицы nAHP, она оказалась в близком соответствии со структурой АХСБ (в виде отдельно взятого протомера пентамерного комплекса) с  $\alpha$ -кобратоксином. Было выявлено такое же отклоненное положение петли С и наличие тех же контактов между токсином и петлями основной стороны домена.

Недавно открытую группу бактериальных ионных каналов с некоторыми ограничениями относят к семейству «Cys-петельных» рецепторов, поскольку в их первичной структуре отсутствуют соответствующие а.о. Cys; кроме того, для них пока не выявлены какие-либо специфические лиганды, за исключением показанной активации одного из них протонами. Тем не менее пространственная структура N-концевого внеклеточного домена бактериальных каналов оказалась очень похожей (включая наличие характерной петли С) на структуры как АХСБ, так и домена nAHP *Torpedo*, что дает определенные перспективы на дальнейшее использование этих бактериальных рецепторов в структурно-функциональной характеристике всего семейства.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исторически сложилось так, что важную роль в разнообразных исследованиях никотиновых холинорецепторов сыграли лиганды пептидной природы. На первых этапах этими лигандами были нейротоксины из яда змей, с помощью которых было проведено обнаружение, выделение и первичная характеристика некоторых подтипов nAHP. Однако около 30-ти лет назад в дополнение к ним появился новый инструмент изучения всего семейства холинорецепторов – токсичные пептиды из яда морских моллюсков,  $\alpha$ -колотоксины. Очевидные преимущества – выраженная селективность к разным подтипам nAHP и простота синтеза, привели к бурному росту исследований по структурно-функциональной характеристике холинорецепторов с их использованием. К настоящему моменту уже достигнуты первые успехи в создании мощных и высокоспецифичных к определенным подтипам nAHP соединений на основе природных  $\alpha$ -колотоксинов. Огромный шаг в определении структурной организации участков связывания лигандов на холинорецепторах был сделан с открытием ацетилхолин-связывающих белков – идеальных моделей лиганд-связывающих доменов всех nAHP – и их кристаллизацией как

в свободном виде, так и в комплексах с агонистами и антагонистами, в том числе и с  $\alpha$ -конотоксинами и их аналогами. Это дало возможность определить те конформационные отличия в структуре лиганд-связывающих сайтов, которые наблюдаются при связывании холинергических агонистов и антагонистов. В свою очередь такая информация стала основой для адекватного применения методов компьютерного моделирования и дизайна новых аналогов  $\alpha$ -конотоксинов для их применения как в научных исследованиях, так и в медицинской практике.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Unwin, N. (2005) *J. Mol. Biol.*, **346**, 967–989.
2. Bocquet, N., Prado de Carvalho, L., Cartaud, J., Neyton, J., Le Poupon, C., Taly, A., Grutter, T., Changeux, J.P., Corringer, P.J. (2007) *Nature*, **445**, 116–119.
3. Hilf, R.J., Dutzler, R. (2008) *Nature*, **452**, 375–379.
4. Hilf, R.J., Dutzler, R. (2009) *Nature*, **457**, 115–118.
5. Smit, A.B., Syed, N.I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K.S., Lodder, H., van der Schors, R.C., van Elk, R., Sorgedraeger, B., Brejc, K., Sixma, T.K., Geraerts, W.P. (2001) *Nature*, **411**, 261–268.
6. Brejc, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2001) *Nature*, **411**, 269–276.
7. Kasheverov, I.E., Utkin, Y.N., Tsetlin, V.I. (2009) *Curr. Pharmaceut. Des.*, **15**, 2430–2452.
8. Tsetlin, V., Utkin, Y., Kasheverov, I. (2009) *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 720–731.
9. Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 362–373.
10. Salvaterra, P.M., Mahler, H.R. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 6327–6334.
11. Craik, D.J., Adams, D.J. (2007) *ACS Chem. Biol.*, **2**, 457–468.
12. Nicke, A., Wonnacott, S., Lewis, R.J. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2305–2319.
13. Janes, R.W. (2005) *Curr. Opin. Pharmacol.*, **5**, 280–292.
14. Olivera, B.M., Quik, M., Vincler, M., McIntosh, J.M. (2008) *Channels*, **2**, 143–152.
15. Azam, L., McIntosh, J.M. (2009) *Acta Pharmacol. Sin.*, **30**, 771–783.
16. Livett, B.G., Sandall, D.W., Keays, D., Down, J., Gayler, K.R., Satkunanathan, N., Khalil, Z. (2006) *Toxicol.*, **48**, 810–829.
17. Hucho, F., Tsetlin, V.I., Machold, J. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **239**, 539–557.
18. Chang, C.C., Lee, C.Y. (1963) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **144**, 241–257.
19. Tierney, M.L., Unwin, N. (2000) *J. Mol. Biol.*, **303**, 185–196.
20. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Unwin, N. (2003) *Nature*, **423**, 949–955.
21. McQuarrie, C., Salvaterra, P.M., De Blas, A., Routes, J., Mahler, H.R. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 6335–6339.
22. Conti-Fine, B.M., Navaneetham, D., Lei, S., Maus, A.D. (2000) *Eur. J. Pharmacol.*, **393**, 279–294.

23. Sciamanna, M.A., Griesmann, G.E., Williams, C.L., Lennon, V.A. (1997) *J. Neurochem.*, **69**, 2302–2311.
24. Kumar, P., Meizel, S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 25928–25935.
25. Grando, S.A. (2008) *J. Pharmacol. Sci.*, **106**, 174–179.
26. Vincent, A., Beeson, D., Lang, B. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6717–6728.
27. Steinlein, O.K. (2004) *Prog. Brain Res.*, **145**, 275–285.
28. O'Neill, M.J., Murray, T.K., Lakics, V., Visanji, N.P., Duty, S. (2002) *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, **1**, 399–411.
29. Tsetlin, V. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **264**, 281–286.
30. Tsetlin, V.I., Hucho, F. (2004) *FEBS Lett.*, **557**, 9–13.
31. Norton, R.S., Olivera, B.M. (2006) *Toxicon*, **48**, 780–798.
32. Daly, N.L., Craik, D.J. (2009) *Life*, **61**, 144–150.
33. Davis, J., Jones, A., Lewis, R.J. (2009) *Peptides*, **30**, 1222–1227.
34. Terlau, H., Olivera, B.M. (2004) *Physiol. Rev.*, **84**, 41–68.
35. Armishaw, C.J., Alewood, P.F. (2005) *Curr. Protein Pept. Sci.*, **6**, 221–240.
36. Gray, W.R., Luque, A., Olivera, B.M., Barrett, J., Cruz, L.J. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 4734–4740.
37. Ramilo, C.A., Zafaralla, G.C., Nadasdi, L., Hammerland, L.G., Yoshikami, D., Gray, W.R., Kristipati, R., Ramachandran, J., Miljanich, G., Olivera, B.M., Cruz, L.J. (1992) *Biochemistry*, **31**, 9919–9926.
38. Peng, C., Tang, S., Pi, C., Liu, J., Wang, F., Wang, L., Zhou, W., Xu, A. (2006) *Peptides*, **27**, 2174–2181.
39. Hashimoto, K., Uchida, S., Yoshida, H., Nishiuchi, Y., Sakakibara, S., Yukari, K. (1985) *Eur. J. Pharmacol.*, **118**, 351–354.
40. McManus, O.B., Musick, J.R., Gonzalez, C. (1981) *Neurosci. Lett.*, **25**, 57–62.
41. Hann, R.M., Pagán, O.R., Eterović, V.A. (1994) *Biochemistry*, **33**, 14058–14063.
42. Groebe, D.R., Dumm, J.M., Levitan, E.S., Abramson, S.N. (1995) *Mol. Pharmacol.*, **48**, 105–111.
43. Kasheverov, I.E., Zhmak, M.N., Vulfius, C.A., Gorbacheva, E.V., Mordvintsev, D.Y., Utkin, Y.N., van Elk, R., Smit, A.B., Tsetlin, V.I. (2006) *FEBS J.*, **273**, 4470–4481.
44. Luetje, C.W., Wada, K., Rogers, S., Abramson, S.N., Tsuji, K., Heinemann, S., Patrick, J. (1990) *J. Neurochem.*, **55**, 632–640.
45. Jacobsen, R.B., DelaCruz, R.G., Grose, J.H., McIntosh, J.M., Yoshikami, D., Olivera, B.M. (1999) *Biochemistry*, **38**, 13310–13315.
46. Luo, S., McIntosh, J.M. (2004) *Biochemistry*, **43**, 6656–6662.
47. Zafaralla, G.C., Ramilo, C., Gray, W.R., Karlstrom, R., Olivera, B.M., Cruz, L.J. (1988) *Biochemistry*, **27**, 7102–7105.
48. Groebe, D.R., Gray, W.R., Abramson, S.N. (1997) *Biochemistry*, **36**, 6469–6474.
49. Hann, R.M., Pagan, O.R., Gregory, L.M., Jacome, T., Eterovic, V.A. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9051–9056.
50. Myers, R.A., Zafaralla, G.C., Gray, W.R., Abbott, J., Cruz, L.J., Olivera, B.M. (1991) *Biochemistry*, **30**, 9370–9377.
51. Liu, L., Chew, G., Hawrot, E., Chi, C., Wang, C. (2007) *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **39**, 438–444.
52. Johnson, D.S., Martinez, J., Elgoyhen, A.B., Heinemann, S.F., McIntosh,

- J.M.* (1995) *Mol. Pharmacol.*, **48**, 194–199.
53. *Pereira, E.F., Alkondon, M., McIntosh, J.M., Albuquerque, E.X.* (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 1472–1483.
54. *Ellison, M., McIntosh, J.M., Olivera, B.M.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 757–764.
55. *Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M.E., Watkins, M., Elgoyhen, A.B., McIntosh, J.M., Olivera, B.M.* (2006) *Biochemistry*, **45**, 1511–1517.
56. *Ellison, M., Gao, F., Wang, H.L., Sine, S.M., McIntosh, J.M., Olivera, B.M.* (2004) *Biochemistry*, **43**, 16019–16026.
57. *Broxton, N.M., Down, J.G., Gehrmann, J., Alewood, P.F., Satchell, D.G., Livett, B.G.* (1999) *J. Neurochem.*, **72**, 1656–1662.
58. *Vinclair, M., Wittenauer, S., Parker, R., Ellison, M., Olivera, B.M., McIntosh, J.M.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17880–17884.
59. *Ellison, M., Feng, Z.P., Park, A.J., Zhang, X., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Norton, R.S.* (2008) *J. Mol. Biol.*, **377**, 1216–1227.
60. *Clark, R.J., Daly, N.L., Halai, R., Nevin, S.T., Adams, D.J., Craik, D.J.* (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 597–602.
61. *Azam, L., Dowell, C., Watkins, M., Stitzel, J.A., Olivera, B.M., McIntosh, J.M.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 80–87.
62. *Jin, A.H., Brandstaetter, H., Nevin, S.T., Tan, C.C., Clark, R.J., Adams, D.J., Alewood, P.F., Craik, D.J., Daly, N.L.* (2007) *BMC Struct. Biol.*, **7**, 28.
63. *Luo, S., Kulak, J.M., Cartier, G.E., Jacobsen, R.B., Yoshikami, D., Olivera, B.M., McIntosh, J.M.* (1998) *J. Neurosci.*, **18**, 8571–8579.
64. *Nicke, A., Samochocki, M., Loughnan, M.L., Bansal, P.S., Maelicke, A., Lewis, R.J.* (2003) *FEBS Lett.*, **554**, 219–223.
65. *Hogg, R.C., Miranda, L.P., Craik, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F., Adams, D.J.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 36559–36564.
66. *Luo, S., Nguyen, T.A., Cartier, G.E., Olivera, B.M., Yoshikami, D., McIntosh, J.M.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 14542–14548.
67. *Everhart, D., Reiller, E., Mirzoiian, A., McIntosh, J.M., Malhotra, A., Luetje, C.W.* (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 664–670.
68. *Dutertre, S., Nicke, A., Lewis, R.J.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 30460–30468.
69. *Broxton, N., Miranda, L., Gehrmann, J., Down, J., Alewood, P., Livett, B.* (2000) *Eur. J. Pharmacol.*, **390**, 229–236.
70. *Martinez, J.S., Olivera, B.M., Gray, W.R., Craig, A.G., Groebe, D.R., Abramson, S.N., McIntosh, J.M.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 14519–14526.
71. *López-Vera, E., Aguilar, M.B., Schiavon, E., Marini, C., Ortiz, E., Restano Cassulini, R., Batista, C.V.F., Possani, L.D., Heimer de la Cotera, E.P., Peri, F., Becerril, B., Wanke, E.* (2007) *FEBS J.*, **274**, 3972–3985.
72. *Cartier, G.E., Yoshikami, D., Gray, W.R., Luo, S., Olivera, B.M., McIntosh, J.M.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 7522–7528.
73. *Harvey, S.C., McIntosh, J.M., Cartier, G.E., Maddox, F.N., Luetje, C.W.* (1997) *Mol. Pharmacol.*, **51**, 336–342.
74. *Kaiser, S.A., Soliakov, L., Harvey, S.C., Luetje, C.W., Wonnacott, S.* (1998) *J. Neurochem.*, **70**, 1069–1076.
75. *McIntosh, J.M., Gardner, S., Luo, S., Garrett, J.E., Yoshikami, D.* (2000) *Eur. J. Pharmacol.*, **393**, 205–208.

76. *Vailati, S., Hanke, W., Bejan, A., Barabino, B., Longhi, R., Balestra, B., Moretti, M., Clementi, F., Gotti, C.* (1999) *Mol. Pharmacol.*, **56**, 11–19.
77. *Champtiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D.J., Przybylski, C., Léna, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F.M., Le Novere, N., McIntosh, J.M., Gardier, A.M., Changeux, J.-P.* (2003) *J. Neurosci.*, **23**, 7820–7829.
78. *McIntosh, J.M., Azam, L., Staheli, S., Dowell, C., Lindstrom, J.M., Kuryatov, A., Garrett, J.E., Marks, M.J., Whiteaker, P.* (2004) *Mol. Pharmacol.*, **65**, 944–952.
79. *Grinevich, V.P., Letchworth, S.R., Lindenberger, K.A., Menager, J., Mary, V., Sadieva, K.A., Buhlman, L.M., Bohme, G.A., Pradier, L., Benavides, J., Lukas, R.J., Bencherif, M.* (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 619–626.
80. *Gotti, C., Moretti, M., Zanardi, A., Gaimarri, A., Champtiaux, N., Changeux, J.P., Whiteaker, P., Marks, M.J., Clementi, F., Zoli, M.* (2005) *Mol. Pharmacol.*, **68**, 1162–1171.
81. *McIntosh, J.M., Dowell, C., Watkins, M., Garrett, J.E., Yoshikami, D., Olivera, B.M.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33610–33615.
82. *Halai, R., Clark, R.J., Nevin, S.T., Jensen, J.E., Adams, D.J., Craik, D.J.* (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20275–20284.
83. *Clark, R.J., Fischer, H., Nevin, S.T., Adams, D.J., Craik, D.J.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 23254–23263.
84. *Dowell, C., Olivera, B.M., Garrett, J.E., Staheli, S.T., Watkins, M., Kuryatov, A., Yoshikami, D., Lindstrom, J.M., McIntosh, J.M.* (2003) *J. Neurosci.*, **23**, 8445–8452.
85. *Talley, T.T., Olivera, B.M., Han, K.H., Christensen, S.B., Dowell, C., Tsigelny, I., Ho, K.-Y., Taylor, P., McIntosh, J.M.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 24678–24686.
86. *Dutertre, S., Ulens, C., Böttner, R., Fish, A., van Elk, R., Kendel, Y., Hoppling, G., Alewood, P.F., Schroeder, C., Nicke, A., Smit, A.B., Sixma T.K., Lewis, R.J.* (2007) *EMBO J.*, **26**, 3858–3867.
87. *Whiteaker, P., Christensen, S., Yoshikami, D., Dowell, C., Watkins, M., Gulyas, J., Rivier, J., Olivera, B.M., McIntosh, J.M.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 6628–6638.
88. *Shon, K.J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, G.E., Hopkins, C., Gray, W.R., Watkins, M., Hillyard, D.R., Rivier, J., Torres, J., Yoshikami, D., Olivera, B.M.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 9581–9587.
89. *Van Wagoner RM, Jacobsen RB, Olivera BM, Ireland CM.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 6353–6362.
90. *Jacobsen, R., Yoshikami, D., Ellison, M., Martinez, J., Gray, W.R., Cartier, G.E., Shon, K.J., Groebe, D.R., Abramson, S.N., Olivera, B.M., McIntosh, J.M.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22531–22537.
91. *Teichert, R.W., López-Vera, E., Gulyas, J., Watkins, M., Rivier, J., Olivera, B.M.* (2006) *Biochemistry*, **45**, 1304–1312.
92. *Jimenez, E.C., Olivera, B.M., Teichert, R.W.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 8717–8724.
93. *Teichert, R.W., Jimenez, E.C., Olivera, B.M.* (2005) *Biochemistry*, **44**, 7897–7902.
94. *Loughnan, M., Nicke, A., Jones, A., Schroeder, C.I., Nevin, S.T., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 24745–24755.
95. *Sandall, D.W., Satkunanathan, N., Keays, D.A., Polidano, M.A., Liping, X., Pham, V., Down, J.G., Khalil,*

- Z., Livett, B.G., Gayler, K.R. (2003) *Biochemistry*, **42**, 6904–6911.
96. McIntosh, J.M., Plazas, P.V., Watkins, M., Gomez-Casati, M.E., Olivera, B.M., Elgoyhen, A.B. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 30107–30112.
97. Peng, C., Han, Y., Sanders, T., Chew, G., Liu, J., Hawrot, E., Chi, C., Wang, C. (2008) *Peptides*, **29**, 1700–1707.
98. Jakubowski, J.A., Keays, D.A., Kelley, W.P., Sandall, D.W., Bingham, J.P., Livett, B.G., Gayler, K.R., Sweedler, J.V. (2004) *J. Mass Spectrom.*, **39**, 548–557.
99. Quinton, L., Le Car, J.P., Vinh, J., Gilles, N., Chamot-Rooke, J. (2006) *Toxicon*, **47**, 715–726.
100. López-Vera, E., Jacobsen, R.B., Ellison, M., Olivera, B.M., Teichert, R.W. (2007) *Toxicon*, **49**, 1193–1199.
101. Wolfender, J.L., Chu, F., Ball, H., Wolfender, F., Fainzilber, M., Baldwin, M.A., Burlingame, A.L. (1999) *J. Mass Spectrom.*, **34**, 447–454.
102. Loughnan, M., Bond, T., Atkins, A., Cuevas, J., Adams, D.J., Broxton, N.M., Livett, B.G., Down, J.G., Jones, A., Alewood, P.F., Lewis, R.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 15667–15674.
103. Loughnan, M.L., Nicke, A., Jones, A., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 1234–1241.
104. Nicke, A., Loughnan, M.L., Millard, E.L., Alewood, P.F., Adams, D.J., Daly, N.L., Craik, D.J., Lewis, R.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 3137–3144.
105. Gehrman, J., Alewood, P.F., Craik, D.J. (1998) *J. Mol. Biol.*, **278**, 401–415.
106. Kang, T.S., Radić, Z., Talley, T.T., Jois, S.D., Taylor, P., Kini, R.M. (2007) *Biochemistry*, **46**, 3338–3355.
107. Dutton, J.L., Bansal, P.S., Hogg, R.C., Adams, D.J., Alewood, P.F., Craik, D.J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 48849–48857.
108. Sharpe, I.A., Thomas, L., Loughnan, M., Motin, L., Palant, E., Croker, D.E., Alewood, D., Chen, S., Graham, R.M., Alewood, P.F., Adams, D.J., Lewis, R.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 34451–34457.
109. Sharpe, I.A., Gehrman, J., Loughnan, M.L., Thomas, L., Adams, D.A., Atkins, A., Palant, E., Craik, D.J., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J. (2001) *Nat. Neurosci.*, **4**, 902–907.
110. Maslennikov, I.V., Sobol, A.G., Gladky, K.V., Lugovskoy, A.A., Ostrovsky, A.G., Tsetlin, V.I., Ivanov, V.T., Arseniev, A.S. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **254**, 238–247.
111. Guddat, L.W., Martin, J.A., Shan, L., Edmundson, A.B., Gray, W.R. (1996) *Biochemistry*, **35**, 11329–11335.
112. Gouda, H., Yamazaki, K., Hasegawa, J., Kobayashi, Y., Nishiuchi, Y., Sakakibara, S., Hirano, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1343**, 327–334.
113. Benie, A.J., Whitford, D., Hargittai, B., Barany, G., Janes, R.W. (2000) *FEBS Lett.*, **476**, 287–295.
114. Maslennikov, I.V., Shenkarev, Z.O., Zhmak, M.N., Ivanov, V.T., Methfessel, C., Tsetlin, V.I., Arseniev, A.S. (1999) *FEBS Lett.*, **444**, 275–280.
115. Rogers, J.P., Luginbuhl, P., Shen, G.S., McCabe, R.T., Stevens, R.C., Wemmer, D.E. (1999) *Biochemistry*, **38**, 3874–3882.
116. Chi, S.W., Kim, D.H., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Han, K.H. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 1228–1234.
117. Cho, J.H., Mok, K.H., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Park, K.H.,

- Han, K.H.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8680–8685.
118. *Hu, S.H., Gehrmann, J., Guddat, L.W., Alewood, P.F., Craik, D.J., Martin, J.L.* (1996) *Structure*, **4**, 417–423.
119. *Hu, S.H., Gehrmann, J., Alewood, P.F., Craik, D.J., Martin, J.L.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 11323–11330.
120. *Shon, K.J., Koerber, S.C., Rivier, J.E., Olivera, B.M., McIntosh, J.M.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 15693–15700.
121. *Chi, S.W., Kim, D.H., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Han, K.H.* (2004) *Biochem. J.*, **380**, 347–352.
122. *Chi, S.W., Lee, S.H., Kim, D.H., Kim, J.S., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Han, K.H.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1990–1997.
123. *Park, K.H., Suk, J.E., Jacobsen, R., Gray, W.R., McIntosh, J.M., Han, K.H.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 49028–49033.
124. *Chi, S.W., Kim, D.H., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Han, K.H.* (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 248–254.
125. *Millard, E.L., Daly, N.L., Craik, D.J.* (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2320–2326.
126. *Utkin, Y.N., Kobayashi, Y., Hucho, F., Tsetlin, V.I.* (1994) *Toxicon*, **32**, 1153–1157.
127. *Kreienkamp, H.J., Sine, S.M., Maeda, R.K., Taylor, P.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 8108–8114.
128. *McIntosh, J.M., Yoshikami, D., Mahe, E., Nielsen, D.B., Rivier, J.E., Gray, W.R., Olivera, B.M.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 16733–16739.
129. *Ulens, C., Hogg, R.C., Celie, P.H., Bertrand, D., Tsetlin, V., Smit, A.B., Sixma, T.K.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3615–3620.
130. *Cui, C., Booker, T.K., Allen, R.S., Grady, S.R., Whiteaker, P., Marks, M.J., Salminen, O., Tritto, T., Butt, C.M., Allen, W.R., Stitzel, J.A., McIntosh, J.M., Boulter, J., Collins, A.C., Heinemann, S.F.* (2003) *J. Neurosci.*, **23**, 11045–11053.
131. *Quik, M., McIntosh, J.M.* (2006) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 481–489.
132. *Grady, S.R., Salminen, O., Laverty, D.C., Whiteaker, P., McIntosh, J.M., Collins, A.C., Marks, M.J.* (2007) *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1235–1246.
133. *Azam, L., McIntosh, J.M.* (2006) *Mol. Pharmacol.*, **70**, 967–976.
134. *Satkunanathan, N., Livett, B., Gayler, K., Sandall, D., Down, J., Khalil, Z.* (2005) *Brain Res.*, **1059**, 149–158.
135. *Nevin, S.T., Clark, R.J., Klimis, H., Christie, M.J., Craik, D.J., Adams, D.J.* (2007) *Mol. Pharmacol.*, **72**, 1406–1410.
136. *Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И.* (2006) *Биоорганическая химия*, **32**, 115–129.
137. *Gray, W.R., Luque, F.A., Galyean, R., Atherton, E., Sheppard, R.C., Stone, B.L., Reyes, A., Alford, J., McIntosh, M., Olivera, B.M., Cruz, L.J., Rivier, J.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 2796–2802.
138. *Kasheverov, I.E., Zhmak, M.N., Maslennikov, I.V., Utkin, Y.N., Tsetlin, V.I.* (2003) *Neurochem. Res.*, **28**, 599–606.
139. *Papineni, R.V., Sanchez, J.U., Baksis, K., Willcockson, I.U., Pedersen, S.E.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23589–23598.
140. *Bren, N., Sine, S.M.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 12692–12700.
141. *Quiram, P.A., Sine, S.M.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11007–11011.

142. Utkin, Y.N., Zhmak, M.N., Methfessel, C., Tsetlin, V.I. (1999) *Toxicon*, **37**, 1683–1695.
143. Kang, T.S., Vivekanandan, S., Jois, S.D., Kini, R.M. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 6333–6337.
144. Armishaw, C., Jensen, A.A., Balle, T., Clark, R.J., Harpsøe, K., Skonberg, C., Liljefors, T., Strømgaard, K. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 9498–9512.
145. Quiram, P.A., McIntosh, J.M., Sine, S.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4889–4896.
146. Almquist, R.G., Kadambi, S.R., Yasuda, D.M., Weill, F.L., Polgar, W.E., Toll, L.R. (1989) *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 455–462.
147. Millard, E.L., Nevin, S.T., Loughnan, M.L., Nicke, A., Clark, R.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J., Adams, D.J., Craik, D.J., Daly, N.L. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 4944–4951.
148. Jin, A.H., Daly, N.L., Nevin, S.T., Wang, C.I., Dutertre, S., Lewis, R.J., Adams, D.J., Craik, D.J., Alewood, P.F. (2008) *J. Med. Chem.*, **51**, 5575–5584.
149. Velez-Carrasco, W., Valdes, S., Agresar, L., Lettich, A., Guerra, A.Y., Hann, R.M. (2004) *Biochemistry*, **43**, 12700–12708.
150. Servent, D., Thanh, H.L., Antil, S., Bertrand, D., Corringer, P.J., Changeux, J.P., Ménez, A. (1998) *J. Physiol. (Paris)*, **92**, 107–111.
151. Quiram, P.A., Jones, J.J., Sine, S.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 19517–19524.
152. Hogg, R.C., Hopping, G., Alewood, P.F., Adams, D.J., Bertrand, D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 26908–26914.
153. Everhart, D., Cartier, G.E., Malhotra, A., Gomes, A.V., McIntosh, J.M., Luetje, C.W. (2004) *Biochemistry*, **43**, 2732–2737.
154. Azam, L., Yoshikami, D., McIntosh, J.M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 11625–11632.
155. Celie, P.H., Kasheverov, I.E., Mordvintsev, D.Y., Hogg, R.C., van Nierop, P., van Elk, R., van Rossum-Fikkert, S.E., Zhmak, M.N., Bertrand, D., Tsetlin, V., Sixma, T.K., Smit, A.B. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 582–588.
156. Innocent, N., Livingstone, P.D., Hone, A., Kimura, A., Young, T., Whiteaker, P., McIntosh, J.M., Wonnacott, S. (2008) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **327**, 529–537.
157. Hargittai, B., Barany, G. (1999) *J. Pept. Res.*, **54**, 468–479.
158. Kaerner, A., Rabenstein, D.L. (1999) *Biochemistry*, **38**, 5459–5470.
159. Mok, K.H., Han, K.H. (1999) *Biochemistry*, **38**, 11895–11904.
160. Lamthanh, H., Jegou-Matheron, C., Servent, D., Menez, A., Lancelin, J.M. (1999) *FEBS Lett.*, **454**, 293–298.
161. Hargittai, B., Sole, N.A., Groebe, D.R., Abramson, S.N., Barany, G. (2000) *J. Med. Chem.*, **43**, 4787–4792.
162. Armishaw, C.J., Daly, N.L., Nevin, S.T., Adams, D.J., Craik, D.J., Alewood, P.F. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 14136–14143.
163. MacRaid, C.A., Illesinghe, J., van Lierop, B.J., Townsend, A.L., Chebib, M., Livett, B.G., Robinson, A.J., Norton, R.S. (2009) *J. Med. Chem.*, **52**, 755–762.
164. Robinson, A.J., van Lierop, B.J., Garland, R.D., Teoh, E., Elaridi, J., Illesinghe, J.P., Roy Jackson, W. (2009) *Chem. Commun. (Camb.)*, **(28)**, 4293–4295.
165. Clark, R.J., Fischer, H., Dempster, L., Daly, N.L., Rosengren, K.J., Nevin, S.T., Meunier, F.A., Adams, D.J., Craik, D.J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13767–13772.

166. Zhang, R., Snyder, G. (1991) *Biochemistry*, **30**, 11343–11348.
167. Rogers, J.P., Luginbuhl, P., Pemberton, K., Harty, P., Wemmer, D.E., Stevens, R.C. (2000) *J. Mol. Biol.*, **304**, 911–926.
168. Kasheverov, I., Rozhkova, A., Zhmak, M., Utkin, Y., Ivanov, V., Tsetlin, V.I. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3664–3673.
169. Cortez, L., Marino-Buslje, C., de Jiménez Bonino, M.B., Hellman, U. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 275–279.
170. Kasheverov, I., Zhmak, M., Chivilyov, E., Saez-Brionez, P., Utkin, Y., Hucho, F., Tsetlin, V. (1999) *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **19**, 559–571.
171. Kasheverov IE, Chiara DC, Zhmak MN, Maslennikov IV, Pashkov VS, Arseniev AS, Utkin, Y.N., Cohen, J.B., Tsetlin, V.I. (2006) *FEBS J.*, **273**, 1373–1388.
172. Ashcom, J.D., Stiles, B.G. (1997) *Biochem. J.*, **328**, 245–250.
173. Schreiter, C., Gjoni, M., Hovius, R., Martinez, K.L., Segura, J.M., Vogel, H. (2005) *Chembiochem.*, **6**, 2187–2194.
174. Vishwanath, V.A., McIntosh, J.M. (2006) *Bioconjug. Chem.*, **17**, 1612–1617.
175. Sugiyama, N., Marchot, P., Kawanishi, C., Osaka, H., Molles, B., Sine, S.M., Taylor, P. (1998) *Mol. Pharmacol.*, **53**, 787–794.
176. Whiteaker, P., McIntosh, J.M., Luo, S., Collins, A.C., Marks, M.J. (2000) *Mol. Pharmacol.*, **57**, 913–925.
177. Champtiaux, N., Han, Z.Y., Bessis, A., Rossi, F.M., Zoli, M., Marubio, L., McIntosh, J.M., Changeux, J.P. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 1208–1217.
178. Whiteaker, P., Peterson, C.G., Xu, W., McIntosh, J.M., Paylor, R., Beaudet, A.L., Collins, A.C., Marks, M.J. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 2522–2529.
179. Salminen, O., Whiteaker, P., Grady, S.R., Collins, A.C., McIntosh, J.M., Marks, M.J. (2005) *Neuropharmacology*, **48**, 696–705.
180. Salminen, O., Drapeau, J.A., McIntosh, J.M., Collins, A.C., Marks, M.J., Grady, S.R. (2007) *Mol. Pharmacol.*, **71**, 1563–1571.
181. Bordia, T., Grady, S.R., McIntosh, J.M., Quirk, M. (2007) *Mol. Pharmacol.*, **72**, 52–61.
182. Doura, M.B., Gold, A.B., Keller, A.B., Perry, D.C. (2008) *Brain Res.*, **1215**, 40–52.
183. Whiteaker, P., Marks, M.J., Christensen, S., Dowell, C., Collins, A.C., McIntosh, J.M. (2008) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**, 910–919.
184. Золотарев Ю.А., Бочаров Э.В., Дадаян А.К., Кашеверов И.Е., Жмак М.Н., Масленников И.В., Борисов Ю.А., Арсеньев А.С., Мясоодов Н.Ф., Цетлин В.И. (2000) *Биоорган. химия*, **26**, 587–592.
185. Blanchfield, J.T., Dutton, J.L., Hogg, R.C., Gallagher, O.P., Craik, D.J., Jones, A., Adams, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F., Toth, I. (2003) *J. Med. Chem.*, **46**, 1266–1272.
186. Blanchfield, J.T., Gallagher, O.P., Cros, C., Lewis, R.J., Alewood, P.F., Toth, I. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **361**, 97–102.
187. Mezo, G., Drakopoulou, E., Paal, V., Rajnavolgyi, E., Vita, C., Hudecz, F. (2000) *J. Pept. Res.*, **55**, 7–17.
188. Drakopoulou, E., Uray, K., Mezo, G., Price, M.R., Vita, C., Hudecz, F. (2000) *J. Pept. Sci.*, **6**, 175–185.
189. Sine, S.M., Kreienkamp, H.J., Bren, N., Maeda, R., Taylor, P. (1995) *Neuron*, **15**, 205–211.
190. Quiram, P.A., Sine, S.M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11001–11006.

191. Chiara, D.C., Xie, Y., Cohen, J.B. (1999) *Biochemistry*, **38**, 6689–6698.
192. Shiembob, D.L., Roberts, R.L., Luetje, C.W., McIntosh, J.M. (2006) *Biochemistry*, **45**, 11200–11207.
193. Kreienkamp, H.J., Utkin, Y.N., Weise, C., Machold, J., Tsetlin, V.I., Hucho, F. (1992) *Biochemistry*, **31**, 8239–8244.
194. Machold, J., Weise, C., Utkin, Y.N., Franke, P., Tsetlin, V.I., Hucho, F. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **228**, 947–954.
195. Utkin, Y.N., Krivoshein, A.V., Davydov, V.L., Kasheverov, I.E., Franke, P., Maslennikov, I.V., Arseniev, A.S., Hucho, F., Tsetlin, V.I. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **253**, 229–235.
196. Williams, J.A., Day, M., Heavner, J.E. (2008) *Expert. Opin. Pharmacother.*, **9**, 1575–1583.
197. Callaghan, B., Haythornthwaite, A., Berecki, G., Clark, R.J., Craik, D.J., Adams, D.J. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 10943–10951.
198. McIntosh, J.M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A.B., Vincler, M. (2009) *Biochem. Pharmacol.*, doi:10.1016/j.bcp.2009.05.020.
199. Sine, S.M. (2002) *J. Neurobiol.*, **53**, 431–446.
200. Hansen, S.B., Talley, T.T., Radic, Z., Taylor, P. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 24197–24202.
201. Celie, P.H., Klaassen, R.V., van Rossum-Fikkert, S.E., van Elk, R., van Nierop, P., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 26457–26466.
202. Celie, P.H., van Rossum-Fikkert, S.E., van Dijk, W.J., Brejc, K., Smit, A.B., Sixma, T.K. (2004) *Neuron*, **41**, 907–914.
203. Hansen, S.B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., Bourne, Y. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3635–3646.
204. Fruchart-Gaillard, C., Gilquin, B., Antil-Delbeke, S., Le Novere, N., Tamiya, T., Corringer, P.J., Changeux, J.P., Menez, A., Servent, D. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3216–3221.
205. Dutertre, S., Lewis, R.J. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2327–2334.
206. Moise, L., Piserchio, A., Basus, V.J., Hawrot, E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12406–12417.
207. Samson, A., Scherf, T., Eisenstein, M., Chill, J., Anglister, J. (2002) *Neuron*, **35**, 319–332.
208. Zeng, H., Hawrot, E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 37439–37445.
209. Harel, M., Kasher, R., Nicolas, A., Guss, J.M., Balass, M., Fridkin, M., Smit, A.B., Brejc, K., Sixma, T.K., Katchalski-Katzir, E., Sussman, J.L., Fuchs, S. (2001) *Neuron*, **32**, 265–275.
210. Bourne, Y., Talley, T.T., Hansen, S.B., Taylor, P., Marchot, P. (2005) *EMBO J.*, **24**, 1512–1522.
211. Gao, F., Bren, N., Burghardt, T.P., Hansen, S., Henchman, R.H., Taylor, P., McCammon, J.A., Sine, S.M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 8443–8451.
212. Parthiban, M., Rajasekaran, M.B., Ramakumar, S., Shanmughavel, P. (2009) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **26**, 535–547.
213. Sgrignani, J., Bonaccini, C., Grazioso, G., Chioccioli, M., Cavalli, A., Gratteri, P. (2009) *J. Comp. Chem.*, doi: 10.1002/jcc.21251.
214. Pérez, E.G., Cassels, B.K., Zapata-Torres, G. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 251–254.
215. Dellisanti, C.D., Yao, Y., Stroud, J.C., Wang, Z.Z., Chen, L. (2007) *Nat. Neurosci.*, **10**, 953–962.

216. *Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M.,  
Le Poupon, C., Changeux, J.P.,*

*Delarue, M., Corringer, P.J.* (2009)  
*Nature*, **457**, 111–114.