

ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА LU6/uPAR: ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ МНОГООБРАЗИЕ В РАМКАХ ОДНОГО СТРУКТУРНОГО МОТИВА

©2017 г. Н. А. ВАСИЛЬЕВА^{1,2,3}, Е. В. ЛОКТЮШОВ^{1,2},
М. Л. БЫЧКОВ², З. О. ШЕНКАРЕВ²,
Е. Н. ЛЮКМАНОВА^{1,2,*}

¹Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
РАН, Москва

I. Введение. II. Токсины из яда змей. III. Нейромодуляторы насекомых. IV. Трехпетельные белки рыб и земноводных. V. Трехпетельные белки млекопитающих. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Семейство Lu6/uPAR получило свое название благодаря двум представителям – лимфоцитарному антигену-6 (Lu6) и рецептору активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR). Белки этого семейства характеризуются наличием одного или нескольких LU доменов, состоящих из 60–90 аминокислот (рис. 1). LU домен включает в себя β-структурное ядро, стабилизированное системой четырех инвариантных дисульфидных связей, и три протяженные петли

Принятые сокращения: АХ – ацетилхолин; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; nАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; mAХР – мускариновый ацетилхолиновый рецептор; ТАП – тканевый активатор плазминогена; α-Bgtx – α-бунгаротоксин; GPI-якорь – гликозилфосфатидилинозитольный якорь; Lu6 – антиген лимфоцитов 6; uPAR – рецептор активатора плазминогена урокиназного типа; WTX – необычный токсин из *Naja kaouthia*.

* Адрес для корреспонденции: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 16-14-00102).

(рис. 2). Благодаря подобной структуре *Lu6/uPAR* белки часто называют трехпетельными белками. Вариабельность петлевых участков и обуславливает функциональное многообразие *Lu6/uPAR* белков. Петлевые участки также могут содержать дополнительные дисульфидные связи (рис. 2).

К настоящему времени *Lu6/uPAR* белки обнаружены у насекомых [1], рыб [2], земноводных [3], пресмыкающихся [4], птиц [5] и млекопитающих [6]. Наиболее известными трехпетельными белками являются нейротоксины яда змей, действующие на многочисленные мишени: никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР), мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (мАХР), α/β -адренергические рецепторы, ГАМК_A-рецепторы, кислоточувствительные ионные каналы (ASIC) и др. [7]. Консервативность трехпетельного структурного мотива указывает на большую функциональную важность *Lu6/uPAR* белков млекопитающих. В геноме человека представлено 35 генов, кодирующих трехпетельные белки [8], функции большинства из которых остаются малоизученными. *Lu6/uPAR* белки бывают секретируемыми и закрепленными на мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитольного якоря (GPI-якоря). В этом обзоре рассмотрены *Lu6/uPAR* белки насекомых и хордовых, а также обсуждается известная информация о функции трехпетельных белков млекопитающих.

II. ТОКСИНЫ ИЗ ЯДА ЗМЕЙ

α -НЕЙРОТОКСИНЫ И НИКОТИНОВЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Токсины являются основными белковыми составляющими ядов змей. Наиболее изучены α -нейротоксины, – высокоспецифичные ингибиторы никотинового ацетилхолинового рецептора (нАХР), представляющего собой лигандозависимый ионный канал. α -Нейротоксины интересны как инструменты для изучения свойств нАХР, так и в качестве прототипов препаратов для лечения болезней нервной системы [9]. α -Нейротоксины из яда змей содержат 60–75 аминокислот и 4–5 дисульфидных связей. Выделяют короткие α -нейротоксины (60–62 аминокислоты, 4 дисульфидных связи) и длинные α -нейротоксины (66–75 аминокислоты, 5-я дисульфидная связь в центральной петле, рис. 2). Оба типа α -нейротоксинов эффективно взаимодействуют с мышечными нАХР, в то время как с нейрональными нАХР $\alpha 7$ типа способны эффективно взаимодействовать только длинные нейротоксины [10]. Установлено, что основным структурным элементом α -нейротоксинов, отвечающим за взаимодействие с нАХР, является

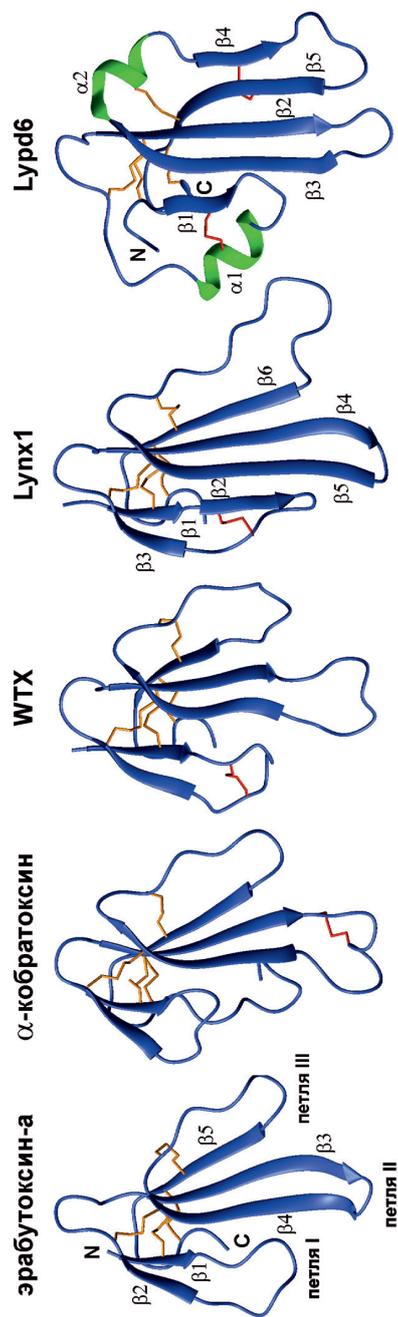


Рис. 2. Структура LU-доменов трехпетельных белков эрабутоксина-а из *Laticauda semifasciata* (PDB 1QKD), α-кобратоксина из *Naja kaouthia* (PDB 2CTX), WTX [P33A] из *Naja kaouthia* (PDB 2MJU), Lypx1 человека (PDB 2LO3) и Lypd6 человека (Шенкарев и др., готовится к публикации). Оранжевым цветом показаны консервативные дисульфидные связи, красным – дополнительные.

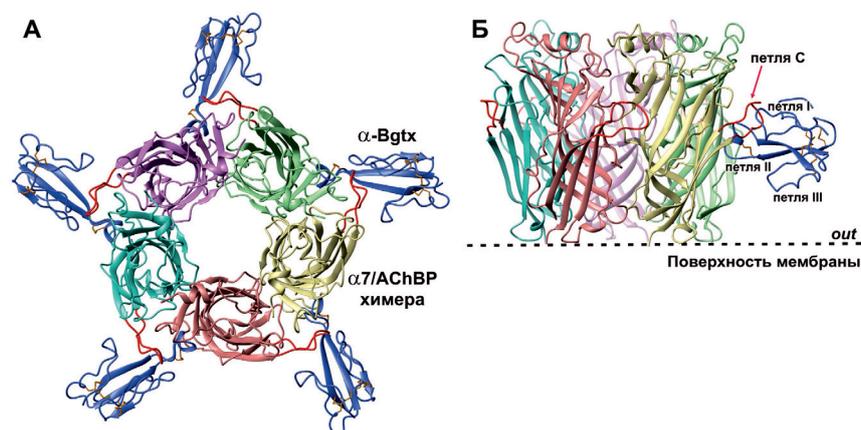


Рис. 3. Структура комплекса α -Bgtx с химерным белком, гомологичным внеклеточному домену α 7-нАХР (PDB 4HQP) [11].

Вид сверху (А), вид сбоку (Б). Разные субъединицы рецептора раскрашены в разные цвета. Красным показана С-петля рецептора, закрывающая вход в ортостерический лигандсвязывающий сайт.

центральная петля, а пятая дисульфидная связь на конце этой петли необходима для взаимодействия с α 7-нАХР (рис. 3) [10, 11].

НЕЙРОТОКСИНЫ И МУСКАРИНОВЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Мишенями действия нейротоксинов яда змей могут быть и мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (мАХР), связанные с G-белками (GPCR) [12]. Существуют мускариновые нейротоксины из яда мамб (MT1–MT7, 4 дисульфидных связи), способные взаимодействовать с различными типами мАХР в качестве агонистов, антагонистов и аллостерических модуляторов [12]. Аллостерические антагонисты MT3 и MT7 из *Dendroaspis angusticeps* специфичны по отношению к M1 и M4 мАХР, остальные мускариновые токсины не так специфичны [12]. Показано, что главной структурной детерминантой высокоафинного взаимодействия MT7 с M1-мАХР является центральная петля токсина [13].

«НЕОБЫЧНЫЕ» НЕЙРОТОКСИНЫ

Существует около 30-ти «необычных» нейротоксинов из змей семейства *Elapidae* с дополнительным пятым дисульфидом в петле I. Функции и мишени этих токсинов изучены слабо [14]. Большинство

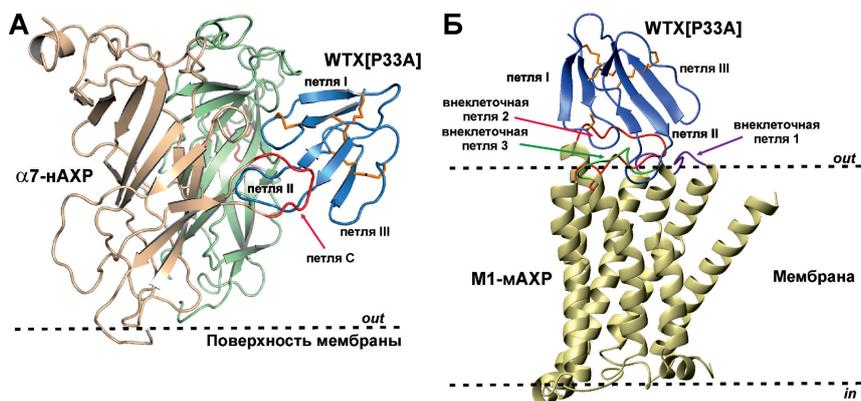


Рис. 4. Модели комплексов необычного токсина WTX с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -нАХР (А) и мАХР М1 типа (Б). В случае нАХР, центральная петля токсина взаимодействует с ортостерическим сайтом рецептора [16], в случае мАХР – с аллостерическим сайтом [17].

«необычных» токсинов характеризуется более низкой токсичностью (LD_{50} – 5–80 мг/кг), чем у α -нейротоксинов (LD_{50} – 0.04–0.30 мг/кг) [14]. Однако, существуют и высокотоксичные «необычные» токсины, например, γ -бунгаротоксин из *B. multicinctus* (LD_{50} ~ 0.15 мг/кг). Филогенетический анализ показал, что семейство «необычных» токсинов не гомогенно: некоторые из них (в основном из *Naja* spp.) ближе к мускариновым токсинам мамбы, а токсины из *Bungarus* spp. – к длинным α -нейротоксинам [4]. «Необычный» (слабый) токсин WTX из *Naja kaouthia* (LD_{50} > 2 мг/кг) совмещает свойства α -нейротоксинов и мускариновых токсинов. WTX необратимо, хотя и с низкой афинностью (IC_{50} ~ 10 мкМ), блокирует мышечный и $\alpha 7$ -нАХР, но может и аллостерически взаимодействовать с разными типами мАХР [15]. Центральная петля WTX, обладающая высокой конформационной пластичностью, важна для взаимодействия как с нАХР, так и с мАХР (рис. 4, [16, 17]).

НЕЙРОТОКСИНЫ И ГАМК_A-РЕЦЕПТОРЫ

Недавно в яде змеи *Micrurus mipartitus* были обнаружены трехпетельные токсины MmTX1 и MmTX2, увеличивающие чувствительность рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК_A-рецепторы) к агонистам [18]. α -Bgtx, известный как высокоспецифичный ингибитор нАХР, также способен селективно ингибировать ГАМК-индуцированные токи через канал $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ рецептора, но с значительно

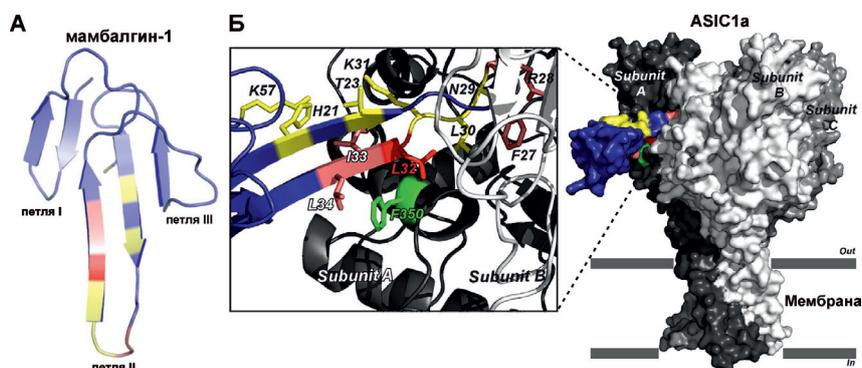


Рис. 5. Модель комплекса мамбалгина-1 с каналом ASIC1a. Показаны кристаллическая структура мамбалгина-1 (А) и контакты центральной петли токсина с каналом (Б). Рисунок адаптирован из статьи [22].

меньшей эффективностью [19]. Способность трехпетельных нейротоксинов ингибировать ГАМК_A-рецепторы была также продемонстрирована на примере α -кобратоксина, нейротоксина I и токсина WTX [20]. Оказалось, что как и в случае с nAHP и mAHP, важным структурным элементом для взаимодействия с ГАМК_A-рецепторами является центральная петля нейротоксинов [20].

НЕЙРОТОКСИНЫ И КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ (ASIC)

В яде черной мамбы обнаружены два трехпетельных белка – мамбалгина, обладающие анальгезирующим эффектом, сравнимым по силе с эффектом морфина [21]. Мишенью действия мамбалгинов являются кислоточувствительные каналы (ASIC) – рецепторы, отвечающие за болевые ощущения у млекопитающих (ASIC1a, ASIC2a и ASIC1b) [21]. Недавно была определена кристаллическая структура мамбалгина-1 и показано, что сайт связывания пептида с каналом ASIC1a находится в центральной петле (аминокислотные остатки Phe27, Leu32 и Leu34, рис. 5) [22].

ЦИТОТОКСИНЫ

Мишенью действия трехпетельных цитотоксинов являются клеточные мембраны. Окончания петель цитотоксинов богаты гидрофобными аминокислотными остатками, образующими мембраносвязывающий мотив [23]. Цитотоксины, взаимодействуя с анионными липидами, индуцируют дезинтеграцию мембран различных клеток, например, миоцитов [24]. На клетках карциномы легкого A549 и лейкемии HL60

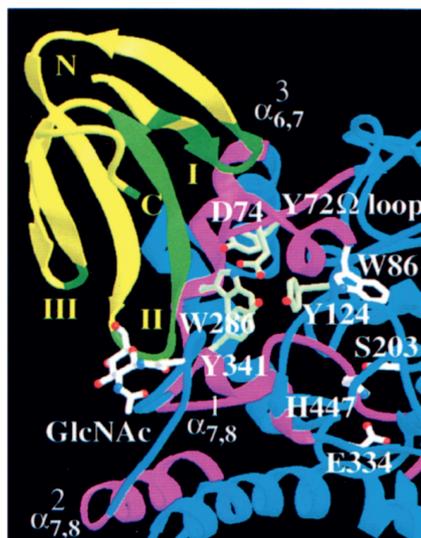


Рис. 6. Комплекс фасцикулина-2 с ацетилхолинэстеразой. Петля II фасцикулина-2 взаимодействует с периферическим анионным сайтом фермента, петля I связывается с Ω -петлей ацетилхолинэстеразы.

Участки фасцикуллина и фермента, участвующие в образовании комплекса, показаны зеленым и пурпурным цветами, соответственно. Рисунок адаптирован из статьи [27].

показана противоопухолевая активность цитотоксинов, связанная с их накоплением в лизосомах: при превышении предельной концентрации происходит разрушение лизосомальной мембраны, что приводит к гибели раковых клеток [25].

ИНГИБИТОРЫ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Фасцикулины из яда мамб препятствуют нервно-мышечной передаче путем ингибирования ацетилхолинэстеразы, гидролизующей АХ в синаптической щели [26]. Структурно фасцикулины подобны коротким α -нейротоксинам (рис. 2). Фасцикулины взаимодействуют с ацетилхолинэстеразой с участием первой и второй петель токсина (рис. 6). Первая петля обеспечивает большую площадь взаимодействия с ферментом, а вторая петля, богатая гидрофобными остатками, блокирует доступ субстрата (АХ) в каталитический сайт ацетилхолинэстеразы [27].

III. НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ НАСЕКОМЫХ

РЕГУЛЯТОР СНА ДРОЗОФИЛ SLEEPLESS

У дрозофилы идентифицирован ген *sleepless*, кодирующий трехпетельный белок, необходимый для сна. Белок SLEEPLESS закреплен на клеточной мембране нейронов с помощью GPI-якоря и экспрессируется в большом количестве в мозге [1]. Потеря SLEEPLESS вызывает значительное сокращение длительности сна, а умеренное снижение

экспрессии SLEEPLESS слабо влияет на исходный сон, но уменьшает количество восстановительного сна после депривации. Известная мутация *quiver*, влияющая на ток через K^+ -канал Shaker, находится в гене *sleepless*. У мутантных мух, страдающих бессонницей, снижается экспрессия Shaker [1]. SLEEPLESS увеличивает уровень экспрессии Shaker, и напрямую взаимодействует с ионным каналом, увеличивая вероятность его открытия [1, 28]. Кроме того, SLEEPLESS является антагонистом nAHP [28]. Оба фактора приводят к пониженной возбудимости нервных клеток и к ослаблению синаптической передачи, что вызывает переход из состояния бодрствования в состояние сна [28]. Выявлена ключевая роль центральной петли белка в его взаимодействии с Shaker и nAHP [29].

LYNX1 И LYNX2 БУРОЙ РИСОВОЙ ЦИКАДКИ NILAPARVATA LUGENS

nAHP опосредует быструю холинергическую синаптическую передачу в мозге насекомых и является мишенями для неоникотиноидных инсектицидов. Два трехпетельных белка Nl-lynx1 и Nl-lynx2 бурой рисовой цикадки *Nilaparvata lugens* модулируют работу nAHP, увеличивая вызванные агонистами макроскопические токи на гетеромерных рецепторах $N\alpha 1/\beta 2$, но не меняют чувствительность рецепторов к агонистам и степень десенситизации [30]. Мутация Y151S $\alpha 1$ -субъединицы nAHP увеличивает устойчивость насекомых к неоникотиноидным инсектицидам (имидаклоприд). Показано, что на мутантных $N\alpha 1/\beta 2$ рецепторах белки Nl-lynx1 и Nl-lynx2 значительно увеличивают амплитуду тока, вызванного имидаклопридом, но не влияют на токи, вызванный АХ [30]. Таким образом, Nl-lynx1 и Nl-lynx2 могут выступать в качестве факторов, влияющих на чувствительность насекомых к неоникотиноидным инсектицидам [30].

IV. ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ РЫБ И ЗЕМНОВОДНЫХ

БЕЛОК Li16 ДРЕВЕСНОЙ ЛЯГУШКИ RANA SYLVATICA

Древесная лягушка *Rana sylvatica* переживает многонедельную зимнюю спячку с замерзанием тела до 65%. Замерзание включает механизмы адаптации, предотвращающие долговременную ишемию и защищающие макромолекулы от разрушения. У древесной лягушки найден ген *li16*, кодирующий белок из 89 аминокислот с пятью дисульфидными связями (рис. 1, [31]). При замерзании в течение первых суток происходит значительное увеличение уровня экспрессии Li16. При гипоксии и обезвоживании также наблюдается увеличение экспрессии Li16. Разморозка и восстановление нормального уровня

кислорода приводят к падению экспрессии гена до контрольного уровня, что, возможно, указывает на важную роль *Li16* в развитии устойчивости к ишемии при замерзании [31].

БЕЛОК PROD1 – РЕГУЛЯТОР ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ КОНЕЧНОСТЕЙ САЛАМАНДРЫ

Prod1 – это мембраносвязанный трехпетельный белок, регулирующий регенерацию у саламандр, определяя направление роста конечностей [3]. Нарушение экспрессии *prod1* блокирует образование локтевой кости и рост передних пальцев [32]. Недавно было показано, что *Prod1* играет важную роль в регуляции клеточной адгезии. Мембраносвязанные молекулы *Prod1* агрегируют в плоскости клеточной мембраны и взаимодействуют с молекулами *Prod1* на мембране соседних клеток, запуская клеточную адгезию при регенерации конечностей [33].

БЕЛОК LYPD6 – РЕГУЛЯТОР ПРОЦЕССОВ ЭМБРИОГЕНЕЗА РЫБ И ЛЯГУШЕК

В ходе развития аквариумной рыбки *Danio rerio* экспрессия *lypd6* была обнаружена на стадиях бластулы, гастрюлы, сегментации и органогенеза [2]. Трехпетельный белок *Lypd6* усиливает Wnt/ β -катенин каскад, регулирующий эмбриогенез и дифференциацию клеток [2]. Суперэкспрессия ингибиторов Wnt/ β -катенин сигнального каскада *Axin1* и *Dkk1* в эмбрионах подавляет экспрессию *lypd6* на стадиях гастрюлы и сомитогенеза, а суперэкспрессия активатора передачи сигналов *wnt8* напротив увеличивает экспрессию *lypd6* на стадии сомитогенеза. Подавление экспрессии гена *lypd6* вызывает остановку развития эмбрионов, но при инъекции мРНК *Lypd6* наблюдается восстановление нормального развития эмбриона (рис. 7). Закрепление *Lypd6* с помощью GPI-якоря в мембранных рафтах является необходимым условием для взаимодействия с рецепторным комплексом *Lrp6/Frizzled8* и активации фосфорилирования *Lrp6* в мембранных рафтах [2]. Гомолог белка *Lypd6* (*Xlypd6*, рис.1) был обнаружен также у лягушек *Xenopus*. *Xlypd6* имеет схожий с *Lypd6/Danio rerio* профиль экспрессии во время эмбриогенеза [2].

Недавно у *Danio rerio* в хромосоме 2 был обнаружен кластер генов, кодирующих три секреторируемых трехпетельных белка. Функция этих белков в настоящее время неизвестна, но экспрессия в энтодерме указывает на их участие в развитии внутренних органов [34].



Рис. 7. Блокирование экспрессии *lyrd6* с помощью морфолиновых олигонуклеотидов (*lyrd6*⁻) приводит к морфологическим изменениям у эмбрионов *Danio rerio*. Соинъекция мРНК, кодирующей *lyrd6*, восстанавливает морфологию эмбриона. Рисунок адаптирован из статьи [2].

V. ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ГЛИКОПРОТЕИН CD59 – ИНГИБИТОР МЕМБРАНОАТАКУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ИЛИ ПРОТЕКТИН

CD59 является мембранносвязанным белком-регулятором системы комплемента. Этот белок найден в различных клетках крови, эпителия, эндотелия и плаценты. В слюне, амниотической жидкости и моче обнаружены растворимые формы CD59 [35]. Мутации гена *cd59* или генов ферментов, отвечающих за синтез гликозилфосфатидилинозитола, приводят к частичному или полному отсутствию белка CD59. В результате, эритроциты подвергаются комплемент-опосредованному лизису, что может приводить к развитию гемолитической анемии [36]. Определенная методом ЯМР-спектроскопии в 1994 году пространственная структура CD59 человека стала первым доказательством того, что трехпетельные белки встречаются у млекопитающих [35]. Белок имеет характерную для нейротоксинов змей трехпетельную структуру, но в отличие от полностью β -структурных токсинов, удлиненная третья петля CD59 содержит α -спиральный участок.

РЕЦЕПТОР АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА (UPAR)

Рецептор урокиназы uPA синтезируется нормальными и опухолевыми клетками и присутствует на моноцитах, фибробластах, тромбоцитах и эндотелии. Система uPA/uPAR играет важную роль в пролиферации, дифференцировке, адгезии и миграции клеток, активации плазминогена, а также ремоделировании внеклеточного матрикса и базальной мембраны [37]. uPAR связан с поверхностью мембраны с помощью GPI-якоря, но существует и растворимая форма рецептора suPAR (рис. 8). Высокий уровень suPAR является негативным прогнозом течения опухолевых заболеваний, и ингибирование uPAR может быть стратегией лечения онкозаболеваний [38].

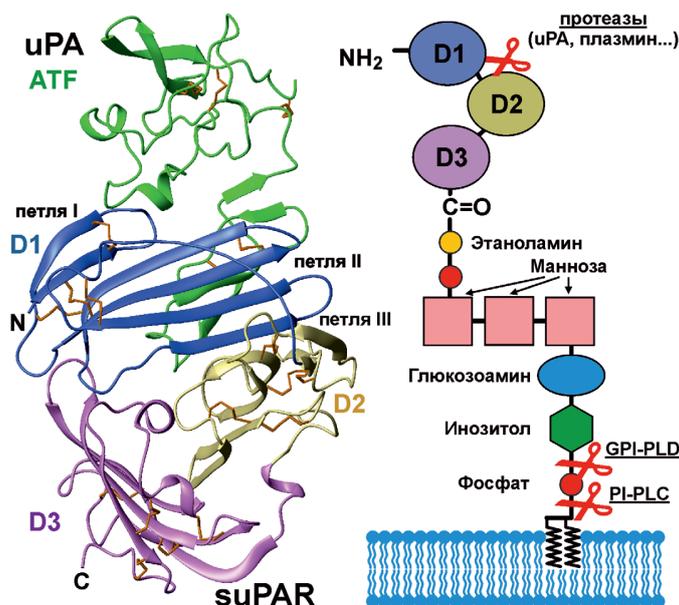


Рис. 8. Структура комплекса N-концевого фрагмента uPA (ATF) и водорастворимого аналога uPAR (suPAR, PDB 2FD6) [39]. Три LU-домена молекулы uPAR (D1, D2, D3) показаны разными цветами. К C-концевой последовательности uPAR присоединяется GPI-якорь, прикрепляющий рецептор к клеточной мембране. Справа показано схематическое строение uPAR с GPI-якорем. Показаны места возможного расщепления молекулы uPAR, которое приводит к формированию активных растворимых сигнальных форм рецептора.

Рецептор uPA состоит из трех LU-доменов D1, D2 и D3 (рис. 8) [39]. Эти домены участвуют во взаимодействии с N-концевым доменом uPA (ATF), что активирует плазминоген. Домены D2 и D3 могут отщепляться и взаимодействовать с рецептором липоксина A4 (LXA4R), передавая сигналы хемотаксиса [37]. Кроме того, uPAR может связываться с интегринами, способствуя межклеточному взаимодействию и адгезии [37].

LYNX1 – ФАКТОР НЕЙРОНАЛЬНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Lynx1 – первый трехпетельный белок, обнаруженный у млекопитающих в ЦНС [6]. Lynx1 экспрессируется в клетках Пуркинье, в ядрах мозжечка, в нейронах коры головного мозга и гиппокампе [6]. Солоколизация Lynx1, прикрепленного к мембране нейронов с помощью GPI-якоря, и nAHP была выявлена в коре головного мозга, таламусе, черной субстанции, мозжечке, гиппокампе и амигдале [40]. Кроме

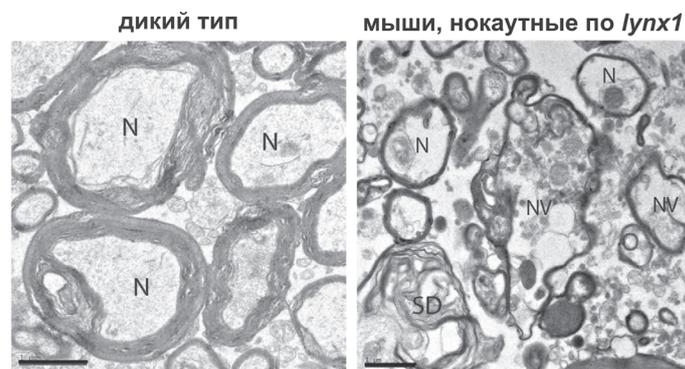


Рис. 9. Разрушение пучков нервных волокон у 13-месячных мышей, нокаутных по гену *lpx1*. У трансгенных мышей наблюдается увеличение расстояния между волокнами, утоньшение миелиновой оболочки (обозначено SD) и вакуолизация аксона (обозначено как NV). Линейка – 1 мкм. Рисунок адаптирован из статьи [45].

того, *Lpx1* экспрессируется ГАМК-ергическими парвальбуминовыми нейронами зрительной коры головного мозга мыши [41].

Созэкспрессия мембранно-связанного *Lpx1* с $\alpha 4\beta 2$ -нАХР в культуре нейронов приводит к увеличению времени и степени десенситизации рецептора, а также проводимости канала [40]. В эндоплазматическом ретикулуме *Lpx1* может влиять на сборку $\alpha 4\beta 2$ -нАХР, стабилизируя $\alpha 4/\alpha 4$, но не $\beta 2/\beta 2$ димеры, способствуя сдвигу стехиометрического состава рецепторов в сторону $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ -нАХР с пониженной чувствительностью к АХ по сравнению с $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ -нАХР [42].

Нейроны нокаутных по гену *lpx1* мышей более чувствительны к никотину. В тесте условно-рефлекторного избегания нокаутные мыши, получающие никотин, демонстрировали увеличение реакции на сигнальный стимул и повышенную моторную активность в тесте рота-род [43]. Трансгенные мыши с суперэкспрессией секретируемой формы *Lpx1* (без GPI-якоря) также демонстрировали повышенную обучаемость, но мыши с суперэкспрессией GPI-заякоренного *Lpx1* не обладали улучшенными способностями к обучению. Таким образом, растворимая форма *Lpx1* имеет потенциал как инструмент для регуляции АХ-зависимой пластичности мозга и механизмов обучения [44].

Исследование нейродегенерации в дорсальном полосатом теле у нокаутных мышей выявило разрушение пучков нервных волокон, потерю нервных волокон и нейрональных ядер, а также вакуолизацию и разрушение миелиновой оболочки нервных волокон при старении (рис. 9). Ни один из этих морфологических признаков не наблюдался

у молодых трансгенных мышей и у гетерозиготных мышей любого возраста, что указывает на возможность поддержания здоровья нейронов при увеличении концентрации *Lynx1* [45].

Известно, что если на этапе ювенильного периода животному закрыть один глаз (монокулярная депривация) на несколько недель и открыть его после окончания критического периода, то зрение в этом глазе не восстанавливается. В случае взрослых нокаутных по гену *lynx1* мышей после открытия глаза наблюдалось полное восстановление зрения [46]. Монокулярная депривация приводит к повышенной активности тканевого активатора плазминогена (ТАП) в первичной зрительной коре, а у взрослых животных активность ТАП не меняется [47]. Взрослые нокаутные по *lynx1* мыши демонстрировали повышенную активность ТАП, связанное с ней уменьшение плотности дендритных шипиков и изменение формирования глазодоминантности [47]. Показано, что делеция *lynx1* увеличивает скорость появления и исчезновения дендритных шипиков в коре головного мозга взрослых животных [48]. Таким образом, *Lynx1* является одним из ключевых факторов, регулирующих нейрональную пластичность.

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ АНАЛОГ LYNX1

Разработка системы бактериальной продукции водорастворимого домена *Lynx1*, не имеющего GPI-якоря [49], позволила продвинуться в понимании его структурно-функциональных свойств. Показано, что *Lynx1* при низких концентрациях (1 μM) активирует $\alpha 7$ -нАХР, а при высоких (10 μM) – ингибирует работу $\alpha 7$ -нАХР, при этом на рецепторах $\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 4\beta 2$ типов наблюдалась только ингибирующая активность (рис. 10). Выявлены ранее неизвестные мишени действия *Lynx1*: $\alpha 3\beta 2$ - и мышечный нАХР и мАХР М3 типа, причем взаимодействие *Lynx1* с нАХР носит аллостерический характер [50].

Методами ЯМР-спектроскопии было показано, что *Lynx1*, как и α -нейротоксины, имеет «трехпетельную» β -структурную пространственную организацию [50]. Однако, в отличие от нейротоксинов змей, протяженная третья петля *Lynx1*, возможно участвующая во взаимодействии с рецептором, обладает большой конформационной подвижностью в диапазоне времен пс-нс и не имеет упорядоченной структуры в растворе (рис. 11). Похожие динамические свойства были описаны для центральной петли необычного токсина WTX, способного взаимодействовать с низким сродством как с нАХР, так и с мАХР [17]. Возможно, высокая пластичность петель является одним из факторов, определяющих одновременно способность взаимодействовать с разными молекулярными мишенями и низкую

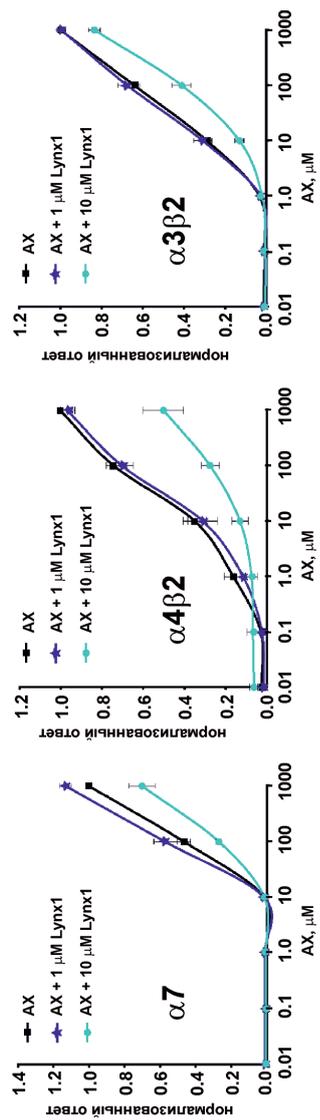


Рис. 10. Влияние водорастворимого LU-домена Lynx1 на AX-индуцированные токи через $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ -нАХР, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*. Рисунок адаптирован из статьи [50].

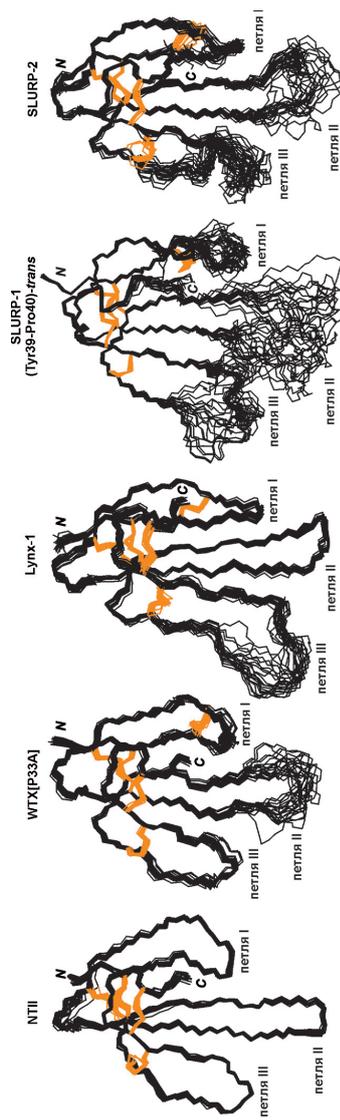


Рис. 11. Суперпозиция наборов пространственных структур, определенных методом ЯМР-спектроскопии, для нейротоксина II из *Naja oxiana* (NTII), WTХ(Р33А), Lynx-1, SLURP-1 и SLURP-2 (коды в базе данных PDB 1NOR, 2MJO, 2LO3, 2MUO и 2N99, соответственно). Дисульфидные связи показаны оранжевым цветом.

аффинность к ним. Для сравнения, α -нейротоксины змей с более упорядоченными петлями (рис. 11) ингибируют nAХР со значительно большей аффинностью [9]. На основе полученной структуры Lynx1 были предложены модели комплексов нейромодулятора с nAХР, согласно которым Lynx1 взаимодействует с внешней стороной петли С рецептора, не проникая в ортостерический сайт и не препятствуя взаимодействию рецептора с агонистами [50, 51].

РОЛЬ LYNX1 В ПАТОФИЗИОЛОГИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Одной из причин нарушения когнитивных процессов при болезни Альцгеймера является дисфункция nAХР мозга [52]. Сопряжение экспрессии Lynx1 и nAХР в участках мозга, отвечающих за память и обучение [53], позволяет предположить вовлечение Lynx1 в развитие болезни Альцгеймера [54]. Показано, что водорастворимый Lynx1 конкурирует с олигомерным β -амилоидным пептидом (1–42) за связывание с субъединицами nAХР, выделенными из гомогената мозга человека. Прединкубация водорастворимого нейромодулятора с культурой нейронов значительно снижает цитотоксический эффект β -амилоидного пептида (1–42) [54]. С другой стороны, обнаружено, что уровень экспрессии Lynx1 в коре головного мозга трансгенных мышей с β -амилоидной и tau-патологией, моделирующих болезнь Альцгеймера, значительно понижен по сравнению со здоровыми мышами [54]. Возможно, ухудшение когнитивных функций при болезни Альцгеймера связано со снижением уровня экспрессии Lynx1.

LYNX1 МОДУЛИРУЕТ ХОЛИНЕРГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ

При картировании экспрессии Lynx1 в различных органах крысы помимо мозга небольшое количество Lynx1 было обнаружено в ткани легкого [53]. Показано, что Lynx1 действует как отрицательный модулятор nAХР в нормальной и опухолевой легочной ткани [55]. В нормальном легком Lynx1 ограничивает увеличение экспрессии никотиновых рецепторов и ГАМК_A-рецепторов, наблюдающееся при хроническом употреблении никотина, и контролирует синтез муцина [55]. При раке легкого наблюдается снижение экспрессии Lynx1, блокирование гена *lynx1* интерферирующей РНК стимулирует рост раковых клеток, а суперэкспрессия *lynx1* снижает их пролиферацию [55]. Таким образом, Lynx1 можно рассматривать как прообраз препаратов для лечения астмы, хронической обструктивной болезни лёгких и рака легких [55]. Интересно, что кроме Lynx1 в тканях легкого была обнаружена также экспрессия нейромодулятора Lynx2 [55].

НЕЙРОМОДУЛЯТОР LYNX2

Впервые экспрессия *lynx2* была обнаружена в нейронах периферической и центральной нервных систем эмбриона мыши [56]. Высокий уровень экспрессии *lynx2* наблюдался в СА1 поле гиппокампа, нейронах зубчатой извилины, коре головного мозга глубоких слоев и нейронах спинного мозга [56]. К рождению мРНК *lynx2* обнаруживается в зрительной коре [46], гиппокампе и лобной коре [57]. В течение первых двух недель постнатального периода уровень мРНК *lynx2* в лобной коре и гиппокампе возрастает с последующим постепенным спадом, выходящим на плато в 60-ти и 26-ти дневном возрасте, соответственно [53].

Показано, что Lynx2 уменьшает АХ-индуцированный ток через $\alpha 4\beta 2$ -НАХР, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*, и усиливает их десенситизацию [57]. С другой стороны, Lynx2 снижает экспрессию $\alpha 4\beta 2$ -НАХР на мембране клетки, преимущественно образуя комплекс с $\alpha 4$, а не с $\beta 2$ субъединицей рецептора [58]. Возможно, Lynx2 влияет на стехиометрию $\alpha 4\beta 2$ -НАХР при сборке в эндоплазматическом ретикулуме, как это было показано ранее для Lynx1 [42].

Несмотря на схожие фармакологические свойства, профили экспрессии *lynx1* и *lynx2* в мозге существенно различаются, что указывает на участие этих нейромодуляторов в различных процессах. В пользу этого говорят эксперименты с нокаутными по гену *lynx2* мышами, демонстрирующими нормальную моторную и сенсомоторную активность по сравнению с диким типом [57] в отличие от мышей, нокаутных по гену *lynx1* [43].

НЕЙРОМОДУЛЯТОР LYPD6

Экспрессия гена *lypd6*, кодирующего мембранносвязанный трехпетельный белок, обнаружена в коре головного мозга и спинном мозге мышей [59]. У крыс экспрессия *lypd6* обнаружена в мозге, легком, почках, сердце, печени и простате [60], а у человека – во многих тканях, в особенности в головном мозге и сердце [61]. *lypd6* наравне с *lynx1* экспрессируется в ГАМК-ергических нейронах зрительной коры головного мозга мышей, но экспрессия *lynx1* наблюдалась только в парвальбуминовых интернейронах, а экспрессия *lypd6* – только в соматостатиновых [41]. В серотониновых интернейронах не было обнаружено мРНК ни *lynx1*, ни *lypd6* [41]. Разграничение областей экспрессии различных нейромодуляторов в мозге может иметь важное значение для направленной и специфической стимуляции отдельных популяций интернейронов при лечении психических заболеваний [41].

На нейронах тригемнального ганглия мыши показано, что *Lypd6* вызывает увеличение амплитуды Ca^{2+} -тока в ответ на никотин [59]. Трансгенные мыши с суперпродукцией *Lypd6* обладают повышенной локомоторной активностью и висцеральной гипералгезией, что указывает на усиление холинергического тонуса [59]. Применение специфических ингибиторов $\alpha 7$ -нАХР позволило определить, что мишенью действия *Lypd6* являются не гомопентамерные $\alpha 7$ -нАХР, а другие типы нАХР [59]. Однако, в работе [60] водорастворимый рекомбинантный вариант *Lypd6*, слитый с глутатион-S-трансферазой, ингибировал никотин-индуцированный ток на срезах гиппокампа СА1 слоя. Различие в функциональной активности эндогенного и рекомбинантного нейромодуляторов, возможно, связано с наличием глутатион-S-трансферазы. Схожее влияние дополнительных последовательностей на активность по отношению к нАХР также наблюдали для SLURP-1 человека [62].

Введение никотина крысам в пренатальном- и раннем постнатальном периоде приводило к увеличению в гиппокампе уровня экспрессии *Lypd6*, чего не наблюдалось у взрослых животных [60]. При этом, значимых изменений в профиле экспрессии *Lypx1* и $\beta 2$ субъединицы нАХР не обнаруживалось [60]. Попытки получения мышей с заблокированной экспрессией *lypd6* приводили либо к смерти, либо к рождению животных, не способных к размножению [59]. Это, вместе с высокой гомологией аминокислотных последовательностей *Lypd6* мыши и *Danio rerio* (~ 87 %, рис. 1), указывает на особую роль *Lypd6* и связанной с ним холинергической активации в эмбриональном развитии.

НЕЙРОМОДУЛЯТОР LYPD6B

Экспрессия гена *lypd6b* была обнаружена в семенниках, легких, желудке, предстательной железе, мозге и других органах человека [63]. *Lypd6b* экспрессируется в глутамат-ергических и ГАМК-ергических интернейронах зрительной коры головного мозга взрослых мышей [41]. Первичная структура *Lypd6b* характеризуется высокой степенью гомологии с *Lypd6* (~54%, рис. 1). Как и *Lypd6*, *Lypd6b* имеет в своем составе C-концевую аминокислотную последовательность, к которой потенциально может присоединяться GPI-якорь, но наличие GPI-якоря экспериментально подтверждено только для *Lypd6* [2]. В отличие от других трехпетельных белков, *Lypd6* и *Lypd6b* помимо трехпетельного домена [64] имеют необычные дополнительные протяженные N- и C-концевые последовательности, примыкающие к LU-домену (рис. 1), их роль неизвестна.

Соэкспрессия Lypd6b с $\alpha 3\beta 4$ -нАХР в ооцитах *Xenopus* увеличивает скорость десенситизации и чувствительность $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ рецепторов к АХ. Также, Lypd6b ингибирует $\alpha 3\alpha 5\text{D}\beta 4$ -нАХР, но не оказывает влияния на $\alpha 3\alpha 5\text{N}\beta 4$ -рецепторы, отличающиеся заменой D398N в субъединице $\alpha 5$, связанной с развитием никотиновой зависимости [65].

PSCA – АНТИГЕН СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

PSCA встречается в мембранной и растворимой форме [66, 67]. Экспрессия гена *pzca* обнаружена в эпителии мочевого пузыря, почек, пищевода, желудка, коже, базальных клетках предстательной железы и тканях плаценты [68]. Белок PSCA является маркером для некоторых опухолей: предстательной железы, желудка и мочевого пузыря [69]. PSCA является онкогеном при раке предстательной железы и глиоме, но онкосупрессором при раке желудка и желчного пузыря [68].

Показано, что PSCA экспрессируется в цилиарных ганглиях курицы на 14 день эмбрионального развития. На поздних стадиях развития куриных эмбрионов небольшая экспрессия мРНК *pzca* наблюдалась также в грудных мышцах, печени, яичниках, яичках, сердце и мозжечке. Значительно большие уровни *pzca* были обнаружены в конечном мозге и периферической нервной системе [5]. Нейрональные ткани взрослых мышей, как и куриных эмбрионов, содержат больше *pzca*, чем не-нейрональные ткани. Также, уровень экспрессии *pzca* коррелирует с экспрессией $\alpha 7$ нАХР [5].

PSCA блокирует активацию $\alpha 7$ -нАХР в нейронах цилиарного ганглия, а гиперпродукция *pzca* в эмбрионах курицы приводит к уменьшению гибели нейронов хориоидного сплетения, но не цилиарного ганглия [5]. PSCA ингибирует никотин-индуцированное фосфорилирование MAP киназы ERK1/2 в клетках PC12, возможно, регулируя таким образом синаптическую пластичность в нейронах [67]. В лобной коре головного мозга людей, больных болезнью Альцгеймера, содержание PSCA повышено на 70% по сравнению со здоровыми людьми, что, возможно, указывает на вовлечение PSCA в патогенез болезни Альцгеймера [67].

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ БЕЛКИ SLURP-1 И SLURP-2

SLURP-1 и SLURP-2 обнаруживаются в эпителиальных и иммунных клетках млекопитающих и рассматриваются как ауто/паракринные регуляторы эпителиального гомеостаза [70]. Белки SLURP контролируют рост, миграцию и дифференцировку эпителиальных клеток, а также развитие воспалений и опухолей [70]. SLURP-1 обладает

антипролиферативной активностью и способствует апоптозу кератиноцитов человека [71], а SLURP-2 ускоряет рост клеток, замедляя их дифференцировку и ослабляя ответ на проапоптотические сигналы [70]. Показано, что белки SLURP регулируют заживление ран на коже и слизистых оболочках [72] и принимают участие в защите клеток кожи от онкогенной трансформации, вызванной нитрозамином [70, 71]. Точечные мутации в гене SLURP-1 вызывают ауточомное воспалительное заболевание кожи и ногтей Mal de Meleda [73]. Ингибирование гена *slurp-2* приводит к возникновению ладонно-подошвенной кератодермии [74], а у больных псориазом повышен уровень экспрессии *slurp-2* [75]. Экспрессия SLURP-1 была обнаружена в клетках колоректальной аденокарциномы человека HT-29, и уровень экспрессии SLURP-1 в этих клетках значительно снижается при их обработке никотином [76]. При этом добавление рекомбинантных препаратов SLURP-1 и SLURP-2 ингибирует рост клеток HT-29 [77]. Также, белки SLURP, возможно, принимают участие в работе иммунной системы [78] и экспрессируются в сенсорных нейронах [79].

SLURP-1 избирательно взаимодействует с $\alpha 7$ -нАХР и ингибирует АХ-индуцированный ток через $\alpha 7$ -нАХР, экспрессированных в ооцитах *Xenopus*, с $IC_{50} \sim 1$ мкМ. При этом SLURP-1 не конкурирует с ^{125}I -меченым α -Bgtx за взаимодействие с $\alpha 7$ -нАХР, что указывает на связывание SLURP-1 не с ортостерическим сайтом рецептора [62]. Антипролиферативная активность SLURP-1, вероятно, обусловлена взаимодействием с $\alpha 7$ -нАХР. Предполагается, что SLURP-1, взаимодействуя с этим рецептором, запускает внутриклеточные процессы, связанные как с током ионов Ca^{2+} через канал рецептора, так и с активацией киназ по метаботропному пути [80]. Это подтверждается отсутствием влияния α -Bgtx на антипролиферативную активность SLURP-1 [62].

Структура SLURP-1 необычна для трехпетельных белков: при наличии хорошо структурированного ядра все три петли молекулы не образуют упорядоченной структуры (рис. 11). Это вместе с *cis-trans* изомерией пептидной связи Tyr39-Pro40 в центральной петле обуславливает аномальную конформационную пластичность петлевых участков молекулы в растворе. Такая подвижная структура говорит о возможном наличии у SLURP-1 разных мишеней действия, связанных с передачей сигнала по ионотропному и метаботропному путям.

Еще недавно считалось, что ауто/паракринная активность SLURP-2 опосредована его избирательным взаимодействием с $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 9$ -нАХР [81]. Однако, в 2016 году было показано, что SLURP-2 взаимодействовать с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ субъединицами нАХР из коры головного мозга, что указывает на его более широ-

кий фармакологический профиль [81]. Показано, что SLURP-2 ингибирует АХ-индуцированные токи через $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 3\beta 2$ -нАХР, экспрессированные в ооцитах *Xenopus* [82]. В случае $\alpha 7$ -нАХР SLURP-2, как и Lynx1, в концентрациях ≤ 1 мкМ значительно усиливает ток, вызванный АХ, но при этом ингибирует рецептор при более высоких концентрациях [82]. При некоторых условиях SLURP-2 увеличивает амплитуду тока через $\alpha 7$ -нАХР более чем в 5 раз (рис. 12). Наблюдаемый эффект активации рецептора при низких концентрациях лиганда напоминает «priming effect», описанный для других лигандов нАХР, таких как тубокурарин [83]. Также, SLURP-2 является аллостерическим лигандом М1 и М3 мАХР человека [82]. Взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2$ -нАХР и М3-мАХР, SLURP-2 увеличивает пролиферацию кератиноцитов человека, а взаимодействие с $\alpha 7$ -нАХР приводит к ингибированию роста клеток [82]. Известно, что кератиноциты на разных этапах жизненного цикла экспрессируют различные типы нАХР, и действие SLURP-2 может зависеть от стадии развития клетки.

Как и в случае WTX, Lynx1 и SLURP-1, петли SLURP-2 демонстрируют значительную конформационную пластичность, обусловленную движениями в пс-нс диапазоне времен (рис. 11) [82]. Интересно, что Lynx1 и SLURP-2 являются продуктами одного гена, но полученные в результате альтернативного сплайсинга белковые продукты имеют низкую степень гомологии (~30%). Тем не менее, анализ фармакологических и структурных свойств молекул Lynx1 и SLURP-2 указывает на большое функциональное сходство этих белков.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Более 40 лет назад у млекопитающих были обнаружены трехпетельные белки, демонстрирующие структурную гомологию с α -нейротоксинами змей, и часто имеющие схожие молекулярные мишени, например, никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Это породило массу вопросов относительно эволюционных связей в семействе белков Луб/иPAR. Сегодня многие из этих вопросов остаются без ответа. Обнаружение трехпетельных белков у насекомых, рыб и амфибий указывает на то, что нейротоксины змей имеют более позднее эволюционное происхождение и, возможно, «разработаны» природой на основе эндогенных регуляторов жизненно важных рецепторов [4]. Видимо, в ходе эволюции нейротоксины приобрели свои уникальные свойства, а именно высокую селективность, аффинность и способность необратимо блокировать рецепторы-мишени.

Все известные на сегодняшний день эндогенные представители семейства Луб/уPAR играют ключевую роль в жизнедеятельности организма. Нарушение их экспрессии приводит к возникновению различных заболеваний или носит летальный характер. Последние успехи в секвенировании геномов и анализе протеома позволяют надеяться на открытие новых представителей семейства трехпепельных белков у различных организмов. Поэтому особую актуальность приобретает создание эффективных рекомбинантных систем продукции Луб/уPAR белков, позволяющих получать миллиграммовые количества белков для структурно-функциональных исследований [84].

ЛИТЕРАТУРА

1. Koh, K., Joiner, W.J., Wu, M.N., Yue, Z., Smith, C.J., Sehgal, A. (2008) Identification of SLEEPLESS, a sleep-promoting factor, *Science*, **321**, 372–376.
2. Özhan, G., Sezgin, E., Wehner, D., Pfister, A.S., Köhl, S.J., Kagermeier-Schenk, B., Köhl, M., Schwillke, P., Weidinger, G. (2013) Lypd6 enhances Wnt/ β -catenin signaling by promoting Lrp6 phosphorylation in raft plasma membrane domains, *Dev. Cell*, **26**, 331–345.
3. da Silva, S.M., Gates, P.B., Brookes, J.P. (2002) The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration, *Dev. Cell*, **3**, 547–555.
4. Fry, B.G., Wüster, W., Kini, R.M., Brusic, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P. (2003) Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins, *J. Mol. Evol.*, **57**, 110–129.
5. Hruska, M., Keefe, J., Wert, D., Tekinay, A.B., Hulce, J.J., Ibañez-Tallon, I., Nishi, R. (2009) Prostate stem cell antigen is an endogenous lynx1-like prototoxin that antagonizes $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors and prevents programmed cell death of parasympathetic neurons, *J. Neurosci.*, **29**, 14847–14854.
6. Miwa, J.M., Ibanez-Tallon, I., Crabtree, G.W., Sanchez, R., Sali, A., Role, L.W., Heintz, N. (1999) Lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS, *Neuron*, **23**, 105–114.
7. Kini, R.M., Doley, R. (2010) Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets, *Toxicon*, **56**, 855–867.
8. Loughner, C.L., Bruford, E.A., McAndrews, M.S., Delp, E.E., Swamynathan, S., Swamynathan, S.K. (2016) Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes, *Human Genomics*, **10**, P. 10.
9. Tsetlin, V.I., Hucho, F. (2004) Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications, *FEBS Lett.*, **557**, 9–13.
10. Lyukmanova, E.N., Shenkarev, Z.O., Schulga, A.A., Ermolyuk, Y.S., Mordvintsev, D.Y., Utkin, Y.N., Shoulepko, M.A., Hogg, R.C., Bertrand, D., Dolgikh, D.A., Tsetlin, V.I., Kirpichnikov, M.P. (2007) Bacterial expression, NMR, and electrophysiology analysis of chimeric short/long-chain α -neurotoxins acting on neuronal nicotinic receptors, *J. Biol. Chem.*, **282**, 24784–24791.
11. Huang, S., Li, S.X., Bren, J., Cheng, K., Gomoto, R., Chen, L., Sine, S.M. (2013) Complex between α -bungarotoxin and an $\alpha 7$ nicotinic receptor

- ligand-binding domain chimaera, *Biochem. J.*, **454**(2), 303–310.
12. Servent, D., Blanchet, G., Mourier, G., Marquer, C., Marcon, E., and Fruchart-Gaillard, C. (2011) Muscarinic toxins, *Toxicon*, **58**, 455–463.
 13. Marquer, C., Fruchart-Gaillard, C., Letellier, G., Marcon, E., Mourier, G., Zinn-Justin, S., Menez, A., Servent, D., Gilquin, B. (2011) Structural model of ligand-G protein-coupled receptor (GPCR) complex based on experimental double mutant cycle data: MT7 snake toxin bound to dimeric hM1 muscarinic receptor, *J. Biol. Chem.*, **286**, 31661–31675.
 14. Nirthanan, S., Gopalakrishnakone, P., Gwee, M.C., Khoo, H.E., Kini, R.M. (2003) Non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon*, **41**, 397–407.
 15. Mordvintsev, D.Y., Polyak, Y.L., Rodionov, D.I., Jakubik, J., Dolezal, V., Karlsson, E., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N. (2009) Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors, *FEBS J.*, **276**, 5065–5075.
 16. Lyukmanova, E.N., Shulepko, M.A., Shenkarev, Z.O., Kasheverov, I.E., Chugunov, A.O., Kulbatskii, D.S., Myshkin, M.Y., Utkin, Y.N., Efremov, R.G., Tsetlin, V.I. Arseniev, A.S., Kirpichnikov, M.P., Dolgikh, D.A. (2016) Central loop of non-conventional toxin WTX from *Naja kaouthia* is important for interaction with nicotinic acetylcholine receptors, *Toxicon*, **119**, 274–279.
 17. Lyukmanova, E.N., Shenkarev, Z.O., Shulepko, M.A., Paramonov, A.S., Chugunov, A.O., Janickova, H., Dolejsi, E., Dolezal, V., Utkin, Y.N., Tsetlin, V.I. Arseniev, A.S., Efremov, R.G., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P. (2015) Structural insight into specificity of interactions between nonconventional three-finger weak toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and muscarinic acetylcholine receptors, *J. Biol. Chem.*, **290**, 23616–23630.
 18. Rosso, J.P., Schwarz, J.R., Diaz-Bustamante, M., Céard, B., Gutiérrez, J.M., Kneussel, M., Pongs, O., Bosmans, F., Bougis, P.E. (2015) MmTX1 and MmTX2 from coral snake venom potently modulate GABAA receptor activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E891–900.
 19. Hannan, S., Mortensen, M., Smart, T.G. (2015) Snake neurotoxin α -bungarotoxin is an antagonist at native GABA(A) receptors, *Neuropharmacology*, **93**, 28–40.
 20. Kudryavtsev, D.S., Shelukhina, I.V., Son, L.V., Ojomoko, L.O., Kryukova, E.V., Lyukmanova, E.N., Zhmak, M.N., Dolgikh, D.A., Ivanov, I.A., Kasheverov, I.E., Starkov, V.G., Ramerstorfer, J., Sieghart, W., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N. (2015) Neurotoxins from snake venoms and α -conotoxin ImI inhibit functionally active ionotropic γ -aminobutyric acid (GABA) receptors., *J. Biol. Chem.*, **290**, 22747–22758.
 21. Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., Lingueglia, E. (2012) Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain, *Nature*, **490**, 552–555.
 22. Mourier, G., Salinas, M., Kessler, P., Stura, E.A., Leblanc, M., Tepshi, L., Besson, T., Diochot, S., Baron, A., Douguet, D., Lingueglia, E., Servent, D. (2016) Mambalgins-1 pain-relieving peptide, stepwise solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition, *J. Biol. Chem.*, **291**, 2616–2629.
 23. Efremov, R.G., Volynsky, P.E., Nolde, D.E., Dubovskii, P.V., Arseniev, A.S. (2002) Interaction of cardiotoxins with membranes: a molecular modeling study, *Biophys. J.*, **83**, 144–153.
 24. Dubovskii, P.V., Konshina, A.G., Efremov, R.G. (2014) Cobra cardiotoxins: membrane interactions and pharmacological potential, *Curr. Med. Chem.*, **21**, 270–287.

25. Feofanov, A.V., Sharonov, G.V., Astapova, M.V., Rodionov, D.I., Utkin, Y.N., Arseniev, A.S. (2005) Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage, *Biochem. J.*, **390**, 11–18.
26. Cervenanský, C., Dajas, F., Harvey, A.L., Karlsson, E. (1991) in International encyclopedia of pharmacology and therapeutics: snake toxins (Harvey, A. L., ed.), 303–321. Pergamon Press, New York.
27. Bourne, Y., Taylor, P., Marchot, P. (1995) Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex, *Cell*, **83**, 503–512.
28. Wu, M., Robinson, J.E., Joiner, W.J. (2014) SLEEPLESS is a bifunctional regulator of excitability and cholinergic synaptic transmission, *Curr. Biol.*, **24**, 621–629.
29. Wu, M., Liu, C.Z., Joiner, W.J. (2016) Structural analysis and deletion mutagenesis define regions of QUIVER/SLEEPLESS that are responsible for interactions with shaker-type potassium channels and nicotinic acetylcholine receptors, *PLoS One*, **11**, e0148215.
30. Yang, B., Yao, X., Gu, S., Zhang, Y., Liu, Z., Zhang, Y. (2010) Selectivity of lynx proteins on insect nicotinic acetylcholine receptors in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, *Insect. Mol. Biol.*, **19**, 283–289.
31. McNally, J.D., Wu, S.B., Sturgeon, C.M., Storey, K.B. (2002) Identification and characterization of a novel freezing inducible gene, *li16*, in the wood frog *Rana sylvatica*, *FASEB J.*, **16**, 902–904.
32. Kumar, A., Gates, P.B., Czarkwiani, A., Brockes, J.P. (2015) An orphan gene is necessary for preaxial digit formation during salamander limb development, *Nat. Commun.*, **6**, 8684.
33. Nomura, K., Tanimoto, Y., Hayashi, F., Harada, E., Shan, X.Y., Shionyu, M., Hijikata, A., Shirai, T., Morigaki, K., Shimamoto, K. (2017) The role of the *Prod1* membrane anchor in newt limb regeneration, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **56**, 270–274.
34. Wang, M., Li, L., Guo, Q., Zhang, S., Ji, D., Li, H. (2016) Identification and expression of a new Ly6 gene cluster in zebrafish *Danio rerio*, with implications of being involved in embryonic immunity, *Fish Shellfish Immunol.*, **54**, 230–240.
35. Fletcher, C.M., Harrison, R.A., Lachmann, P.J., Neuhaus, D. (1994) Structure of a soluble, glycosylated form of the human complement regulatory protein CD59, *Structure*, **2**, 185–199.
36. Parker, C., Omine, M., Richards, S., Nishimura, J., Bessler, M., Ware, R., Hillmen, P., Luzzatto, L., Young, N., Kinoshita, T., Rosse, W., Socié, G. (2005) Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Blood*, **106**, 3699–3709.
37. Blasi, F., Carmeliet, P. (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 932–943.
38. Su, S.C., Lin, C.W., Yang, W.E., Fan, W.L., Yang, S.F. (2016) The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies, *Expert Opin. Ther. Targets*, **20**, 551–566.
39. Huai, Q., Mazar, A.P., Kuo, A., Parry, G.C., Shaw, D.E., Callahan, J., Li, Y., Yuan, C., Bian, C., Chen, L., Furie, B., Furie, B.C., Cines, D.B., Huang, M. (2006) Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor, *Science*, **311**, 656–659.
40. Ibañez-Tallon, I., Miwa, J.M., Wang, H.L., Adams, N.C., Crabtree, G.W., Sine, S.M., Heintz, N. (2002) Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin *lynx1*, *Neuron*, **33**, 893–903.
41. Demars, M.P., Morishita, H. (2014) Cortical parvalbumin and somatostatin GABA neurons express distinct endogenous modulators of nicotinic acetylcholine receptors, *Mol. Brain.*, **7**, 75–79.
42. Nichols, W.A., Henderson, B.J., Yu, C., Parker, R.L., Richards, C.I., Lester, H.A., Miwa, J.M. (2014) Lynx1 shifts

- $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor subunit stoichiometry by affecting assembly in the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **289**, 31423–31432.
43. Miwa, J.M., Stevens, T.R., King, S.L., Caldarone, B.J., Ibanez-Tallon, I., Xiao, C., Fitzsimonds, R.M., Pavlides, C., Lester, H.A., Picciotto, M.R., Heintz, N. (2006) The protoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo, *Neuron*, **51**, 587–600.
44. Miwa, J.M., Walz, A. (2012) Enhancement in motor learning through genetic manipulation of the Lynx1 gene, *PLoS One*, **7**, e43302.
45. Kobayashi, A., Parker, R.L., Wright, A.P., Brahem, H., Ku, P., Oliver, K.M., Walz, A., Lester, H.A., Miwa, J.M. (2014) Lynx1 supports neuronal health in the mouse dorsal striatum during aging: an ultrastructural investigation, *J. Mol. Neurosci.*, **53**, 525–536.
46. Morishita, H., Miwa, J.M., Heintz, N., Hensch, T.K. (2010) Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex, *Science*, **330**, 1238–1240.
47. Bukhari, N., Burman, P.N., Hussein, A., Demars, M.P., Sadahiro, M., Brady, D.M., Tsirka, S.E., Russo, S., Morishita, H. (2015) Unmasking proteolytic activity for adult visual cortex plasticity by the removal of Lynx1, *J. Neurosci.*, **35**, 12693–12702.
48. Sajo, M., Ellis-Davies, G., Morishita, H. (2016) Lynx1 limits dendritic spine turnover in the adult visual cortex, *J. Neurosci.*, **36**, 9472–9478.
49. М.А. Шулепко, Е.Н. Люкманова, И.Е. Кашеверов, Д.А. Долгих, В.И. Цетлин, М.П. Кирпичников. «Бактериальная продукция водорастворимого домена lynx1, – эндогенного нейромодулятора никотиновых рецепторов человека». *Биорг. хим.* (2011) **37(5)**, 609–615.
50. Lyukmanova, E.N., Shenkarev, Z.O., Shulepko, M.A., Mineev, K.S., D'Hoedt, D., Kasheverov, I.E., Filkin, S.Y., Krivolapova, A.P., Janickova, H., Dolezal, V., Dolgikh, D.A., Arseniev, A.S., Bertrand, D., Tsetlin, V.I., Kirpichnikov, M.P. (2011) NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human LYNX1, *J. Biol. Chem.*, **286**, 10618–10627.
51. Lyukmanova, E.N., Shulepko, M.A., Buldakova, S.L., Kasheverov, I.E., Shenkarev, Z.O., Reshetnikov, R.V., Filkin, S.Y., Kudryavtsev, D.S., Ojomoko, L.O., Kryukova, E.V., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P., Bregestovski, P.D., Tsetlin, V.I. (2013) Ws-LYNX1 residues important for interaction with muscle-type and/or neuronal nicotinic receptors, *J. Biol. Chem.*, **288**, 15888–15899.
52. Taly, A., Corringer, P.J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J.P. (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 733–750.
53. Thomsen, M.S., Cinar, B., Jensen, M.M., Lyukmanova, E.N., Shulepko, M.A., Tsetlin, V., Klein, A.B., Mikkelsen, J.D. (2014) Expression of the Ly-6 family proteins Lynx1 and Ly6H in the rat brain is compartmentalized, cell-type specific, and developmentally regulated, *Brain Struct. Funct.*, **219**, 1923–1934.
54. Thomsen, M.S., Arvaniti, M., Jensen, M.M., Shulepko, M.A., Dolgikh, D.A., Pinborg, L.H., Härtig, W., Lyukmanova, E.N., Mikkelsen, J.D. (2016) Lynx1 and A β 1–42 bind competitively to multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes, *Neurobiol. Aging*, **46**, 13–21.
55. Fu, X.W., Song, P.F., Spindel, E.R. (2015) Role of Lynx1 and related Ly6 proteins as modulators of cholinergic signaling in normal and neoplastic bronchial epithelium, *Int. Immunopharmacol.*, **29**, 93–98.
56. Dessaud, E., Salaün, D., Gayet, O., Chabbert, M., deLapeyrière, O. (2006) Identification of lynx2, a novel member of the ly-6/neurotoxin superfamily, expressed in neuronal subpopulations during mouse development, *Mol. Cell Neurosci.*, **31**, 232–242.

57. Tekinay, A.B., Nong, Y., Miwa, J.M., Lieberam, I., Ibanez-Tallon, I., Greengard, P., Heintz, N. (2009). A role for LYNX2 in anxiety-related behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4477–4482.
58. Wu, M., Puddifoot, C.A., Taylor, P., Joiner, W.J. (2015) Mechanisms of inhibition and potentiation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by members of the Ly6 protein family, *J. Biol. Chem.*, **290**, 24509–24518.
59. Darvas, M., Morsch, M., Racz, I., Ahmadi, S., Swandulla, D., Zimmer, A. (2009) Modulation of the Ca²⁺ conductance of nicotinic acetylcholine receptors by Lypd6, *Eur. Neuropharmacol.*, **19**, 670–681.
60. Arvaniti, M., Jensen, M.M., Soni, N., Wang, H., Klein, A.B., Thiriet, N., Pinborg, L.H., Muldoon, P.P., Wienecke, J., Imad Damaj, M., Kohlmeier, K.A., Gondré-Lewis, M.C., Mikkelsen, J.D., Thomsen, M.S. (2016) Functional interaction between Lypd6 and nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.*, **138**, 806–820.
61. Zhang, Y., Lang, Q., Li, J., Xie, F., Wan, B., Yu, L. (2010) Identification and characterization of human LYPD6, a new member of the Ly-6 superfamily, *Mol. Biol. Rep.*, **37**, 2055–2062.
62. Lyukmanova, E.N., Shulepko, M.A., Kudryavtsev, D., Bychkov, M.L., Kulbatskii, D.S., Kasheverov, I.E., Astapova, M.V., Feofanov, A.V., Thomsen, M.S., Mikkelsen, J.D., Shenkarev, Z.O., Tsetlin, V.I., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov M.P. (2016) Human secreted Ly-6/uPAR related protein-1 (SLURP-1) is a selective allosteric antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, *PLoS One*, **11**, e0149733.
63. Ni, J., Lang, Q., Bai, M., Zhong, C., Chen, X., Wan, B., Yu, L. (2009) Cloning and characterization of a human LYPD7, a new member of the Ly-6 superfamily, *Mol. Biol. Rep.*, **36**, 697–703.
64. Парамонов А.С., Кульбацкий Д.С., Локтюшов Е.В., Царев А.В., Долгих Д.А., Шенкарёв З.О., Кирпичников М.П., Люкманова, Е.Н. (2017) Рекомбинантная продукция и исследование структуры белков человека Lypd6 и Lypd6b, *Биоорг. Химия*, **43**, 620–630.
65. Ochoa, V., George, A.A., Nishi, R., Whiteaker, P. (2016) The prototoxin LYPD6B modulates heteromeric $\alpha 3\beta 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptors, but not $\alpha 7$ homomers, *FASEB J.*, **30**, 809–816.
66. Reiter, R.E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M.M., Loda, M., Witte, O.N. (1998) Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1735–1740.
67. Jensen, M.M., Arvaniti, M., Mikkelsen, J.D., Michalski, D., Pinborg, L.H., Härtig, W., Thomsen, M.S. (2015) Prostate stem cell antigen interacts with nicotinic acetylcholine receptors and is affected in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **36**, 1629–1638.
68. Ono, H., Hiraoka, N., Lee, Y.S., Woo, S.M., Lee, W.J., Choi, I.J., Saito, A., Yanagihara, K., Kanai, Y., Ohnami, S., Chiwaki, F., Sasaki, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., Saeki N. (2012) Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis, *Genes, Chromosomes Cancer*, **51**, 30–41.
69. Moore, M.L., Teitell, M.A., Kim, Y., Watabe, T., Reiter, R.E., Witte, O.N., Dubey, P. (2008) Deletion of PSCA increases metastasis of TRAMP-induced prostate tumors without altering primary tumor formation, *Prostate*, **68**, 139–151.
70. Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Grando, S.A. (2007) SLURP-1 and -2 in normal, immortalized and malignant oral keratinocytes, *Life Sci.*, **80**, 2243–2247.

71. Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Webber, R.J., Grando, S.A. (2005) Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **125**, 1236–1241.
72. Chernyavsky, A.I., Kalantari-Dehaghi, M., Phillips, C., Marchenko, S., Grando, S.A. (2012) Novel cholinergic peptides SLURP-1 and -2 regulate epithelialization of cutaneous and oral wounds, *Wound Repair Regen.*, **20**, 103–113.
73. Perez, C., Khachemoune, A. (2016) Mal de Meleda: a focused review, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **17**, 63–70.
74. Allan, C.M., Procaccia, S., Tran, D., Tu, Y., Barnes, R.H. 2nd, Larsson, M., Allan, B.B., Young, L.C., Hong, C., Tontonoz, P., Fong, L.G., Young, S.G., Beigneux, A.P. (2016) Palmoplantar keratoderma in Slurp2-deficient mice, *J. Invest. Dermatol.*, **136**, 436–443.
75. Tsuji, H., Okamoto, K., Matsuzaka, Y., Iizuka, H., Tamiya, G., Inoko, H. (2003) SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris, *Genomics*, **81**, 26–33.
76. Pettersson, A., Nylund, G., Khorram-Manesh, A., Nordgren, S., Delbro, D.S. (2009) Nicotine induced modulation of SLURP-1 expression in human colon cancer cells, *Auton. Neurosci.*, **148**, 97–100.
77. Lyukmanova, E.N., Shulepko, M.A., Bychkov, M.L., Shenkarev, Z.O., Paramonov, A.S., Chugunov, A.O., Arseniev, A.S., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P. (2014) Human SLURP-1 and SLURP-2 proteins acting on nicotinic acetylcholine receptors reduce proliferation of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells, *Acta Naturae*, **6**, 60–66.
78. Moriwaki, Y., Yoshikawa, K., Fukuda, H., Fujii, Y.X., Misawa, H., Kawashima, K. (2007) Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands, *Life Sci.*, **80**, 2365–2368.
79. Moriwaki, Y., Watanabe, Y., Shinagawa, T., Kai, M., Miyazawa, M., Okuda, T., Kawashima, K., Yabashi, A., Waguri, S., Misawa, H. (2009) Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand, *Neurosci. Res.*, **64**, 403–412.
80. Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Galitovskiy, V., Qian, J., Grando, S.A. (2010) Upregulation of nuclear factor-kappaB expression by SLURP-1 is mediated by alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and involves both ionic events and activation of protein kinases, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **299**, 903–911.
81. Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Jolkovsky, D.L., Webber, R.J., Grando, S.A. (2006) SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium, *J. Cell. Physiol.*, **208**, 238–245.
82. Lyukmanova, E.N., Shulepko, M.A., Shenkarev, Z.O., Bychkov, M.L., Paramonov, A.S., Chugunov, A.O., Kulbatskii, D.S., Arvaniti, M., Dolejsi, E., Schaer, T., Arseniev, A.S., Efremov, R.G., Thomsen, M.S., Dolezal, V., Bertrand, D., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P. (2016) Secreted isoform of human Lynx1 (SLURP-2): spatial structure and pharmacology of interactions with different types of acetylcholine receptors, *Sci. Rep.*, **6**, 30698.
83. Cachelin, A.B., Rust, G. (1994) Unusual pharmacology of (+)-tubocurarine with rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing beta 4 subunits, *Mol. Pharmacol.*, **46**, 1168–1174.
84. Shulepko, M.A., Lyukmanova, E.N., Shenkarev, Z.O., Dubovskii, P.V., Astapova, M.V., Feofanov, A.V., Arseniev, A.S., Utkin, Y.N., Kirpichnikov, M.P., Dolgikh, D.A. (2017) Towards universal approach for bacterial production of three-finger Ly6/uPAR proteins: Case study of cytotoxin I from cobra *N. oxiana*, *Protein Expr. Purif.*, **130**, 13–20.