МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«МИРЭА – Российский технологический университет»

РТУ МИРЭА

Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова
Кафедра химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Преображенского Н.А.

РАБОТА ДОПУЩЕНА К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой _____
Подпись

Грин М.А.

«____» _____ 20____ г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

по направлению подготовки бакалавров 19.03.01 _____
Код направления подготовки *Наименование*

Биотехнология
направления подготовки

На тему:

Исследование особенностей альфа7 и альфа9 никотиновых ацетилхолиновых рецепторов методами сайт-направленного мутагенеза и флоуресцентной детекции кальция

Обучающийся _____ *Исаева Анастасия Сергеевна*
Подпись

Шифр 16Х0348

Группа ХББО-03-16

Руководитель работы _____ к.х.н., доц., доц. Гроза Н.В.
Подпись *Ученая степень, ученое звание, должность* *ФИО*

Научный консультант _____ к.б.н., н.с. Кудрявцев Д.С.
Подпись *Ученая степень, ученое звание, должность* *ФИО*

Консультант по экономической части _____ ассистент Белоусова И.В.
Подпись *Ученая степень, ученое звание, должность* *ФИО*

Москва 2020

Электронная версия ВКР передана на выпускающую кафедру Суворов Н.В.

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«МИРЭА – Российский технологический университет»

РТУ МИРЭА

Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова
Кафедра химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Преображенского Н.А.

СОГЛАСОВАНО	УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой _____ *подпись*	Директор института _____ *подпись*
Грин Михаил Александрович *Фамилия, имя, отчество*	Маслов Михаил Александрович *Фамилия, имя, отчество*
« » _____ 20 г.	« » _____ 20 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы бакалавра

Обучающийся Исаева Анастасия Сергеевна
Фамилия, имя, отчество

Шифр

Направление подготовки 19.03.01 (*индекс направления*) Биотехнология (*наименование направления*)

Группа ХББО-03-16

1. Тема выпускной квалификационной работы:

Исследование особенностей альфа7 и альфа9 никотиновых ацетилхолиновых рецепторов методами сайт-направленного мутагенеза и флоуресцентной детекции кальция

Цель и задачи выпускной квалификационной работы:

Цель работы: исследование молекулярных механизмов функционирования различных типов рецепторов, в частности с мутантными α7 и мышечными никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (нАХР), с помощью сочетания методов сайт-направленного мутагенеза и кальциевого имиджинга.

Задачи работы:

1) Получить точечный мутант α7 нАХР с двойной заменой в участке связывания с лигандами на основе двух мутантов с одиночными заменами: L119D и F209S;
2) Исследовать функциональную активность мутантов мышечного рецептора на основе мутанта, ассоциированного с наследственной миастенией медленных каналов.

3.Этапы выпускной квалификационной работы:

№ этапа	Содержание этапа ВКР	Результат выполнения этапа ВКР	Срок выполнения
1	Поиск литературы по никотиновым ацетилхолиновым рецепторам (нАХР)	выполнено	апрель - май 2020
2	Обработка экспериментальных данных по получению мутантного α7 нАХР	выполнено	27.04.-13.05. 2020
3	Обработка экспериментальных данных мутантных мышечных нАХР	выполнено	14.05.-23.05. 2020
4	Расчет и оформление организационно-экономического раздела, написание и оформление ВКР	выполнено	18.05.-23.05. 2020

4. Перечень разрабатываемых документов и графических материалов:
5. Руководитель выпускной квалификационной работы:

Функциональные обязанности	Должность в Университете	Фамилия, имя, отчество	Подпись
Руководитель ВКР	доцент	Гроза Наталья Викторовна	

Задание выдал

Руководитель ВКР _____
подпись

« 27 » апреля 2020 г.

Задание принял к исполнению

Обучающийся: _____
подпись

« 27 » апреля 2020

Аннотация

Выпускная квалификационная работа посвящена изучению мутантных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) α7 и мышечного подтипов. Целью данной работы является исследование молекулярных механизмов функционирования различных типов рецепторов с помощью сочетания методов сайт-направленного мутагенеза и кальциевого имиджинга.

В ходе выполнения работы была установлена роль аминокислотных остатков в связывании рецепторов с эндогенным лигандом – ацетилхолином. В частности, был получен мутантный нАХР α7-го типа и обработаны данные кальциевого имиджинга мышечного нАХР дикого типа и мутантных рецепторов при аппликации агониста (ацетилхолина) в разных концентрациях.

ВКР бакалавра включает 65 страниц, 25 рисунков, 16 таблиц, 52 литературных источника.

Ключевые слова: агонист, ацетилхолин, никотин, рецептор, лиганд.

Содержание

1. Список используемых сокращений 7
2. Введение 8
3. Литературный обзор 11
3.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) 11
3.2. Строение и функционирование нАХР 17
3.3. α7 нАХР и α9 нАХР 25
3.4. Мышечные нАХР 28
4. Заключение 32
5. Экспериментальная часть 33
5.1. Приборы и материалы 33
5.2. Точечный мутагенез нАХР 34
5.2.1. Подбор праймеров 34
5.2.2. ПЦР-амплификация 35
5.2.3. Электрофорез 36
5.2.4. Экстракция плазмидной ДНК из агарозного геля 37
5.2.5. Трансформация клеток и посев на чашку Петри 37
5.2.6. ПЦР-скрининг колоний и наращивание в жидкой LB-среде 38
5.2.7. Выделение плазмидной ДНК 39
5.2.8. Секвенирование плазмидной ДНК 40
5.3. Флуоресцентная микроскопия и кальциевый имиджинг 41
5.3.1. Программное обеспечение 41
5.3.2. Флуоресцентная детекция цитоплазматического кальция 41
6. Обсуждение полученных результатов 48
7. Экономическая часть 50
7.1. Организация и планирование работ по теме 50
7.1.1. Организация работ 51
7.1.2. График проведения работ 53
7.2. Расчет стоимости проведения работ 54
7.2.1. Затраты на материалы и покупные изделия 55
7.2.2. Расчет затрат на спецоборудование 56

7.2.3. Расчет основной заработной платы персонала 56
7.2.4. Дополнительная заработная плата персонала 57
7.2.5. Страховые отчисления 57
7.2.6. Командировочные расходы 57
7.2.7. Контрагентские услуги 57
7.2.8. Накладные расходы 57
7.2.9. Прочие расходы 57
7.2.10. Полная себестоимость 58
8. Выводы 59
9. Список использованных источников 60

1. Список используемых сокращений

5-HT_3Р – серотониновый рецептор;

АА – аллостерический агонист;

АЦХСБ – ацетилхолин-связывающий белок;

ВнеД – внеклеточный домен;

ВнуД – внутриклеточный (цитоплазматический) домен;

ГАМК$_A$Р – рецептор γ-аминомасляной кислоты;

ОАМ – отрицательный аллостерический модулятор;

ПАМ – положительный аллостерический модулятор;

САМ – сайленсерный (молчащий) аллостерический модулятор;

пЛУИК – пентамерный лиганд-управляемый ионный канал;

ТМД – трансмембранный домен;

мнАХР – мышечный никотиновый ацетилхолиновый рецептор;

нАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор;

ннАХР – нейрональный никотиновый ацетилхолиновый рецептор;

НМС – нервно-мышечный синапс;

α7 нАХР – α7-гомопентамерный никотиновый ацетилхолиновый рецептор;

α7/α9 нАХР – α7-гомопентамерный никотиновый ацетилхолиновый рецептор с мутацией (мутациями) в сторону α9-гомопентамерного никотинового ацетилхолинового рецептора;

αBTX – α-бунгаротоксин (от англ. α-bungarotoxin);

F209S – точечная мутация, замена аминокислоты F (Phe, фенилаланина) в исходной молекуле белка в 209 положении крысиного α7 нАХР на аминокислоту S (Ser, серин);

L119D – точечная мутация, замена аминокислоты L (Leu, лейцина) в исходной молекуле белка в 119 положении крысиного α7 нАХР на аминокислоту D (Asp, аспарагиновую кислоту).

2. Введение

Надсемейство пентамерных лиганд-управляемых ионных каналов (пЛУИК) представляет собой группу трансмембранных рецепторов, обеспечивающих селективный пассивный транспорт ионов через плазматическую мембрану посредством изменения конформации при связывании с молекулами лигандов. Последние можно классифицировать по типу вызываемых ими изменений активности рецептора на: агонисты, переводящие рецептор в активное состояние; антагонисты, блокирующие его; и аллостерические модуляторы, селективно регулирующие действие других лигандов. По строению пЛУИК представляют собой белковые комплексы из пяти субъединиц, симметрично расположенных вокруг центрального ионного канала. В каждой субъединице выделяют три функциональных домена: внеклеточный, трансмембранный и цитоплазматический. Надсемейство пЛУИК включает семейство Цис-петельных рецепторов, представителями которого являются никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) наряду с серотониновыми рецепторами (5-HT_3Р) и рецепторами γ-аминомасляной кислоты (ГАМК$_A$Р). Ключевой особенностью строения рецепторов данного семейства является наличие пары цистеинов, расположенных во внеклеточном домене и соединенных друг с другом посредством дисульфидной связи. нАХР широко распространены по всему животному миру от нематод до человека и экспрессируются во многих областях центральной и периферической нервной системы, а также в глиальных, эпителиальных, эндотелиальных, дендритных и др. клетках. К лигандам нАХР, как видно из названия, относят эндогенный ацетилхолин и экзогенный никотин. Вследствие широкой распространенности в организме и вовлеченности во многие физиологические процессы, нАХР являются перспективной мишенью лекарственных средств при патологиях нервной и иммунной систем, в частности при болезни Альцгеймера, шизофрении, миастении, эпилепсии и др. Гомопентамерные α7 нАХР представляют особый интерес, поскольку обладают уникальными свойствами: высокой проницаемостью для

ионов кальция, высоким сродством к α-бунгаротоксину (α-BTX), относительно низким сродством к никотину и быстрой десенситизацией. Мышечные нАХР, наряду с α7 нАХР обладающие высоким сродством к α-BTX, играют важнейшую роль в жизнедеятельности млекопитающих через обеспечение работы скелетной мускулатуры. Мутации в генах субъединиц мышечного нАХР зачастую приводят к появлению редких генетических заболеваний — наследственных миастений. Наиболее интересными с точки зрения изучения фундаментальных механизмов функционирования нАХР являются миастении так называемых «медленных каналов». Этот тип наследственных миастений вызван мутациями, повышающими активность мышечного нАХР, что приводит к избыточному проникновению ионов кальция в мышечные волокна и повреждению мышечной ткани. Таким образом, исследование нАХР, проницаемых для ионов кальция и их мутантных форм является актуальной задачей, как с точки зрения фундаментальной науки, так и для создания новых лекарственных средств.

Целью данной работы является исследование молекулярных механизмов функционирования различных типов рецепторов, в частности с мутантными α7 и мышечными нАХР, с помощью сочетания методов сайт-направленного мутагенеза и кальциевого имиджинга.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1) получить точечный мутант α7 нАХР с двойной заменой в участке связывания с лигандами на основе двух мутантов с одиночными заменами: L119D и F209S;
2) исследовать функциональную активность мутантов мышечного рецептора на основе мутанта, ассоциированного с наследственной миастенией медленных каналов.

Практическая значимость

В данной работе изучаются мутантные нАХР α7 и мышечного подтипов для установления роли отдельных аминокислотных остатков в связывании этих рецепторов с эндогенным лигандом – ацетилхолином, а также для уточнения механизма работы рецепторов в норме и при патологиях.

3. Литературный обзор

3.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР)

Пентамерные лиганд-управляемые ионные каналы (пЛУИК) являются широко распространенными рецепторами, которые экспрессируются почти повсеместно в основных таксономических группах, за исключением многоклеточных растений и грибов [1]. У позвоночных это надсемейство включает с одной стороны катион-селективные серотониновые рецепторы (5-HT_3Р) и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР), с другой – анион-селективные рецепторы γ-аминомасляной кислоты (ГАМК$_A$Р) и глицина [2]. Цис-петельные рецепторы относятся к надсемейству пЛУИК и отличаются от других представителей наличием пары цистеинов, соединенных дисульфидной связью. В их число входят ацетилхолиновые рецепторы, которые, в свою очередь, состоят из двух основных подтипов: метаботропных мускариновых и ионотропных никотиновых рецепторов. Данные рецепторы активируются эндогенным нейротрансмиттером, ацетилхолином, и экспрессируются как в нейрональных, так и в не-нейрональных клетках. Метаботропные рецепторы представляют собой связанные с G-белками трансмембранные белки, которые активируются мускарином – токсином, выделенным из Мухомора красного (лат. *Amanita muscaria*). Ионотропные катион-селективные нАХР чувствительны к активации никотином [3]. Следует обратить внимание, что в состав молекулы ацетилхолина, мускарина и никотина входит положительно заряженный атом азота, который играет важную роль в связывании этих лигандов с соответствующими рецепторами.

Лиганды, связываясь с определенными сайтами рецептора, модулируют его работу. Их можно разделить на ортостерические (связываются с ортостерическими сайтами рецептора) и аллостерические (связываются с аллостерическими сайтами рецептора) модуляторы. К первым относят вещества, активирующие рецептор (агонисты) и ингибирующие его (антагонисты). Аллостерические модуляторы условно разделяют на четыре подгруппы: положительные (ПАМ), которые потенциируют эффект от связывания агониста с рецептором; отрицательные

(ОАМ), которые, напротив, тормозят активацию рецептора при связывании с агонистом; сайленсерные (молчащие) (САМ), не влияющие на действие агонистов, но блокирующие аллостерические модуляции; аллостерические агонисты (АА), активирующие рецепторы в неортостерических сайтах [5].

нАХР представляют собой трансмембранные рецепторы, состоящие из пяти идентичных (α7 или α9) или различных субъединиц (содержат минимум две субъединицы α-типа). α7 и α9 являются единственными субъединицами α-типа, способными образовывать функциональные гомомерные рецепторы. Выделяют два основных типа нАХР: мышечные (мнАХР) и нейрональные (ннАХР). Первые играют важную роль в механизме нервно-мышечной передачи и являются мишенью миорелаксантов, вторые экспрессируются во многих областях центральной и периферической нервной системы [4]. В геноме млекопитающих было идентифицировано пять субъединиц мнАХР (α1, β, γ, ε и δ) и одиннадцать субъединиц нАХР (α2– α7, α9, α10 и β2– β4). Субъединицы α-типа присутствуют во всех типах нАХР, поскольку содержат сайты связывания с лигандами. Вследствие большого разнообразия типов субъединиц существует множество нАХР с широким спектром фармакологических и кинетических свойств (рисунок 1.1) [5].

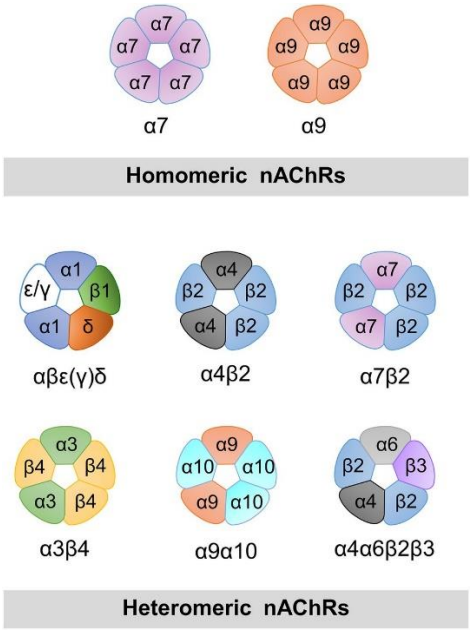

Рисунок 1.1 – Модели пентамерных гомомерных (сверху) и некоторых гетеромерных (снизу) нАХР [5]

В каждой субъединице, составляющей нАХР и другие рецепторы, относящиеся к надсемейству пЛУИК, можно выделить три функциональных домена: внеклеточный (ВнеД), на котором расположены сайты связывания агонистов, трансмембранный (ТМД), формирующий ионную пору и ворота и внутриклеточный (ВнуД), который содержит детерминанты проводимости канала и сайты регуляции внутриклеточного сигналинга [6-8]. Отдельно выделяют область между ВнеД и ТМД, необходимую для связывания некоторых лигандов и определяющую время открытого состояния канала и скорость десенситизации [9,10] (рисунок 1.2).

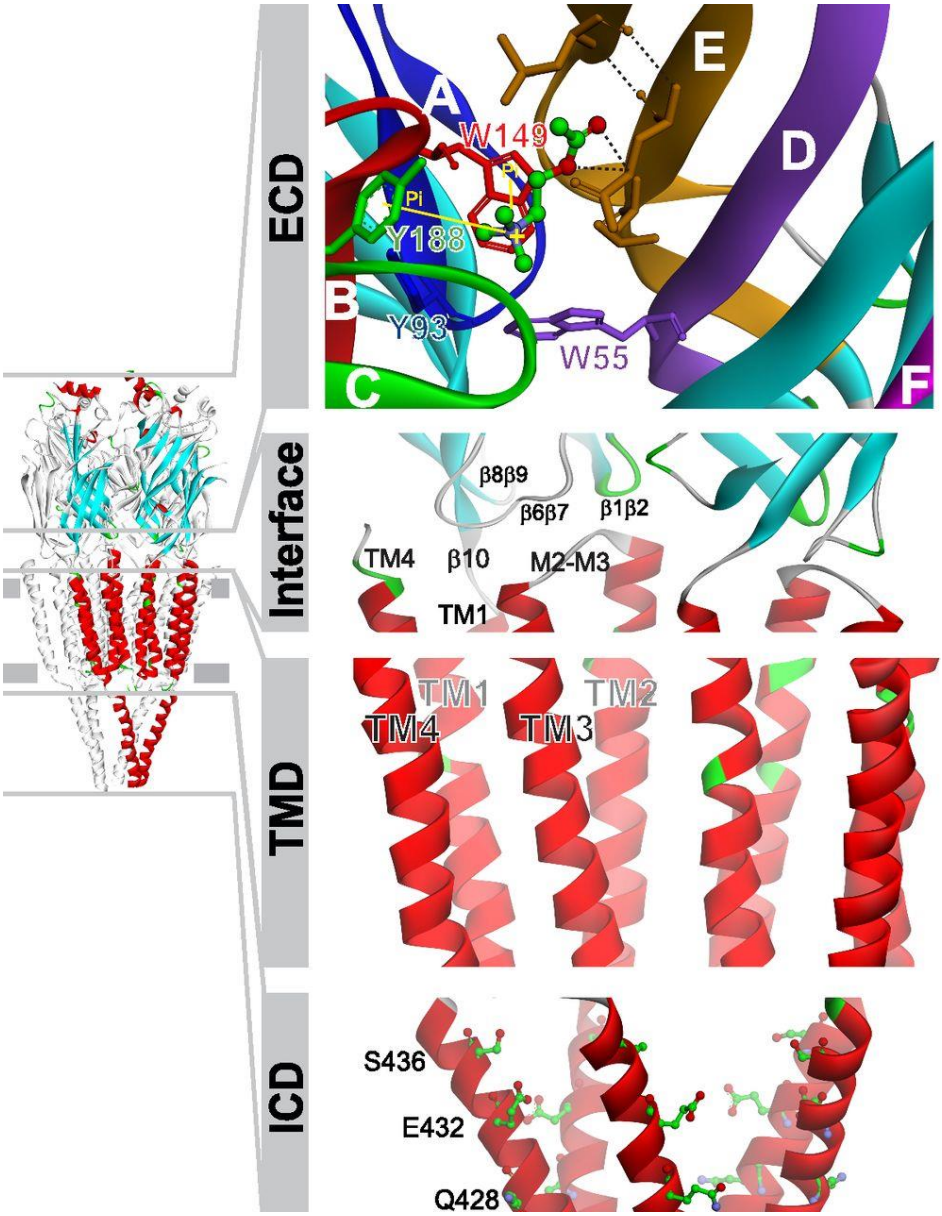

Рисунок 1.2 – Структурная модель пЛУИК. ECD – ВнеД, interface – область между ВнеД и ТМД, TMD – ТМД, ICD – ВнуД [5]

ВнеД по структуре представляет собой иммуноглобулин-подобный β – сэндвич. Сайты связывания лигандов находятся на границе раздела двух соседних субъединиц. Три петли (A – C), стягивающие β – тяжи, располагаются на основной «+» грани субъединицы α-типа и содержат остатки преимущественно ароматических аминокислот, необходимые для связывания и открытия ионного канала. ВнеД соседней субъединицы, образующей комплементарную «–» грань, содержит аминокислотные остатки, формирующие петли D-F. Ключевыми остатками ароматических аминокислот «+» грани являются Y188, W149 и Y93

(остатки тирозина и триптофана в положениях 188, 149 и 93), а «–» грани – W55 (остаток триптофана в положении 55). ТМД состоит из четырех спиралей (TM1 – TM4). Внутреннее кольцо из TM2 - спиралей пяти субъединиц образуют стенки ионной поры, а внешнее кольцо из пятнадцати α-спиралей (TM1, TM3 и TM4) экранирует внутреннее кольцо из TM2 – спиралей от липидов [11]. Область между ВнеД и ТМД содержит Цис-петлю (петлю β6β7), петли β1β2 и β8β9 от ВнеД, линкер M2-M3 от ТМД. Считается, что ВнуД связан с белками цитоскелета клетки и участвует в модуляции рецепторов пЛГИК [13]. На рисунке 1.2 показано, как ацетилхолин присоединен к сайту связывания [5].

Одними из самых распространенных в нервной системе нАХР являются гомопентамерные α7 нАХР, который также экспрессируется во многих не-нейрональных клетках. Было обнаружено, что уменьшение экспрессии α7 нАХР в головном мозге, в частности в гиппокампе, является одной из причин болезни Альцгеймера [13] и шизофрении [14]. Также доказана роль α7 нАХР в холинергическом противовоспалительном пути, поскольку данные рецепторы экспрессируются во многих типах иммунных клеток. Обладая уникальными активационными свойствами, высокой проницаемостью для ионов кальция и играя важную роль во многих неврологических, психических и воспалительных заболеваниях, α7 нАХР являются терапевтической мишенью для лекарственной модуляции.

Высокогомологичные α7 и α9 нАХР играют роль в различных физиологических функциях и заболеваниях. Исследование структурных основ фармакологических различий данных рецепторов с использованием методов сайт-направленного мутагенеза, электрофизиологии и кальциевого имиджинга показало, что существенное влияние на афинность агонистов оказывают остаток лейцина в положении 119 α7 нАХР (остаток аспарагиновой кислоты в α9 нАХР) и остаток фенилаланина в положении 187 α7 нАХР (остаток серина в α9 нАХР) [15]. нАХР, содержащие α9 субъединицу, в последнее десятилетие рассматриваются в качестве потенциальной новой терапевтической мишени для лечения нейропатической боли [16]. Было доказано, что α9α10 нАХР вовлечены в иммунологические

реакции, а их неправильное функционирование способствует развитию аутоиммунных заболеваний [17], в частности рассеянного склероза [18].

Одним из основных участников передачи сигнала в нервно-мышечном синапсе (НМС) являются 2α1β1δε нАХР и 2α1β1δγ нАХР, которые располагаются на концевых пластинках в нервно-мышечных синапсах (НМС). НМС активируется при связывании нейромедиатора ацетилхолина, высвобождаемого моторным нейроном, с мышечным нАХР, что создает потенциал концевой пластинки, который затем распространяется через поверхность мышечного волокна в поперечные Т-канальцы мышц, вызывая высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума, что инициирует сокращение мышц. Неправильное функционирование и нарушенная экспрессия мышечных нАХР проявляются при таком орфанном заболевании, как врожденный миастенический синдром [19].

Таким образом, нАХР представляют обширную группу рецепторов, модулирование которых играет важную роль в лечении заболеваний иммунной системы (воспаление, аутоиммунные заболевания) и нервной системы (болезнь Альцгеймера, шизофрения, нейропатические боли), в том числе заболеваний, связанных с нервно-мышечной передачей сигнала (врожденный миастенический синдром).

3.2. Строение и функционирование нАХР

Структурная информация высокого разрешения была получена методом электронной дифракции кристаллов нАХР мышечного типа (2α1β1δγ), выделенных из *Torpedo marmorata* (разрешение 4 Å) и методом рентгеновской кристаллографии ацетилхолин-связывающего белка (АЦХСБ), структурно аналогичного ВнеД нАХР (разрешение около 2 Å) [20].

По структуре нАХР представляет собой гликопротеин с приблизительной молекулярной массой 290 кДа, состоящий из четырех типов субъединиц. Рецептор имеет три домена: большой N-концевой внеклеточный домен с сайтами связывания лигандов; трансмембранный домен, составляющий мембранную пору; вариабельный у разных субъединиц цитоплазматический (внутриклеточный) домен. Длина всех трех доменов одной субъединицы в сумме составляет около 160 Å. ВнеД формирует широкий проход, диаметром около 20 Å, и имеет два сайта связывания с ацетилхолином (у α-субъединиц), которые выступают приблизительно на 40 Å над поверхностью мембраны и располагаются на противоположных сторонах относительно центральной поры. ТМД представляет собой заполненную водой узкую пору, пронизывающую мембрану насквозь. ТМД содержит ворота канала, которые открываются, когда ацетилхолин занимает оба сайта связывания. Вариабельный ВнуД формирует узкий проход, пропускающий ионы в клетку [21].

Последовательность каждой субъединицы нАХР состоит из одного ВнеД, четырех ТМД (ТМ1 – ТМ4) и одного ВнуД, расположенного между ТМ3 и ТМ4. На рисунке 2.1 желтым выделена Цис-петля, стабилизируемая образующими дисульфидный мостик остатков цистеина, между которыми располагается 13 аминокислотных остатков, высоко консервативных в семействе Цис-петельных рецепторов. Другая петля – «С» – формирует участок связывания лигандов. Субъединицы, имеющие пару цистеин-цистеин в петле «С», относят к α-субъединицам. Аминокислотные остатки, выделенные зеленым цветом, участвуют в фор-

мировании агонист-связывающего «кармана» α-субъединицы, а оранжевые аминокислотные остатки важны для формирования его комплементарной поверхности. Аминокислотные остатки, обозначенные оранжевым цветом с черной точкой, необходимы для открытия и закрытия ворот канала. Остатки аминокислот в TM2, выделенные серым цветом, важны для формирования ворот, а те, что выделены голубым, необходимы для открытия канала. Остатки, выстилающие пору, обозначенные зеленым цветом, являются детерминантами ионной селективности и проводимости канала (E241 частично определяет проницаемость ионов для кальция). C418 в TM4, способствует измерениям ответа нАХР при взаимодействии с лигандами. Участки N-гликозилирования, относительное расположение которых (кроме расположенных в Цис-петле) различается у субъединиц, обозначены синими «Y» [22].

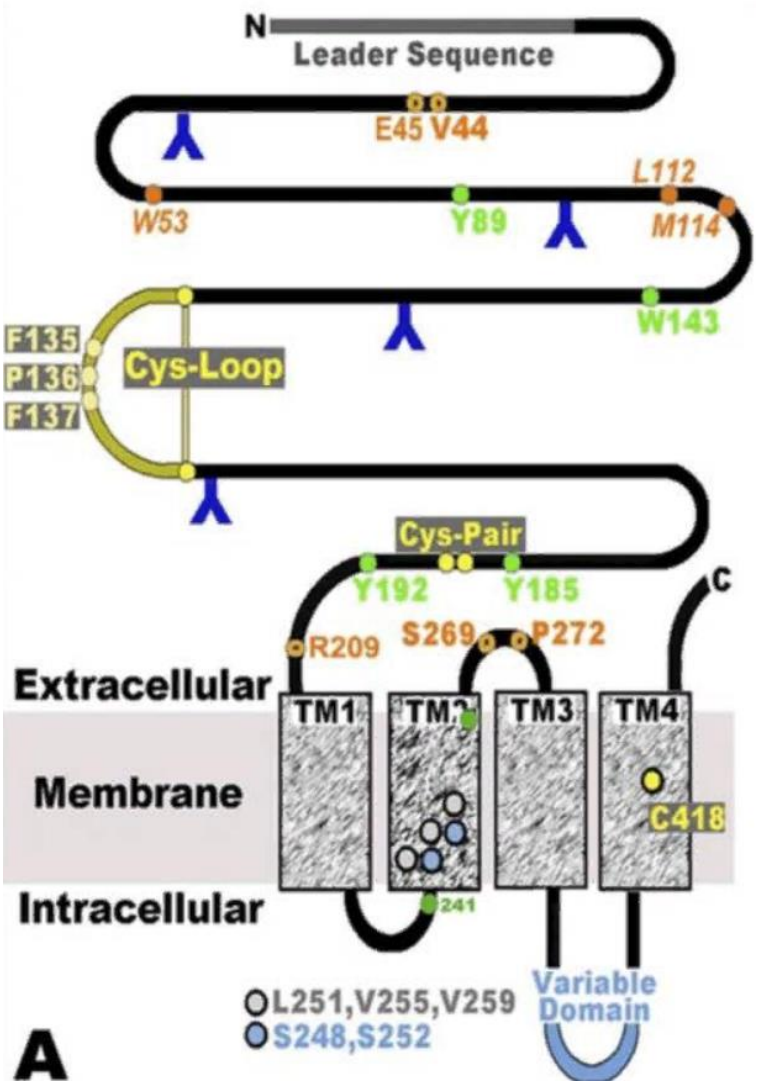

Рисунок 2.1 – Схема последовательности аминокислотных остатков субъединицы нАХР [22]

N-концевой ВнеД каждой субъединицы содержит десять β-тяжей, формирующих β-сэндвич, и одну крупную α-спираль, что аналогично структуре АЦХСБ. Порядок субъединиц в рецепторах основан на расположении основных, комплементарных граней и сайтов связывания между соседними субъединицами. Соседние субъединицы связаны через взаимодействия N-концевых ВнеД (главным образом, полярные), α-спиральных ТМД (главным образом, гидрофобные) и петель между ТМД и амфифильной спиралью МА в большой цитоплазматической петле непосредственно перед М4 (рисунок 2.2). Цис-петля и петля β1–β2 N-концевого ВнеД субъединицы взаимодействуют с короткой петлей М2-М3 в ТМД. Это взаимодействие между доменами способствует открытию канала в связанной с агонистами конформации. Изменение конформации α-субъединиц, в частности В и С петель, приводит к изменению конформаций других субъединиц, что лежит в основе механизма открытия ворот ионного канала. Сравнение закрытых и открытых структур нАХР позволяют предположить, что в основе открытия канала лежат ротационные движения внутри субъединиц. Внеклеточные и цитоплазматические центральные кольца, окруженные субъединицами на внеклеточной и цитоплазматической сторонах ТМД соответственно, являются сильно электроотрицательными, что, вероятно, способствует катионной селективности открытого канала. Узкие отверстия на поверхности колец также, по-видимому, способствуют селективности канала по заряду и размеру ионов, регулированию тока ионов, пропускаемого через пору [20].

На рисунке 2.2 внеклеточная α-спираль обозначена α1. Синим и красным обозначены β-тяжи, обращенные внутрь и наружу канала соответственно и образующие β-сэндвич. М1 – М4 – трансмембранные спирали, МА – амфифильная внутриклеточная спираль в большой цитоплазматической петле около М4. Петли А, В и С составляют основную «+» поверхность ортостерического сайта связы-

вания. Цепь β2, петля между цепями β5' и β6, петля между цепями β8 и β9 образуют комплементарную «–» поверхность. Также на рисунке обозначена Цис-петля (Cys-loop). Основной иммуногенный регион (MIR – main immunogenic region) связан с аутоиммунным ответом, приводящим к заболеванию миастении Гравис [23]. На рисунке не обозначена большая цитоплазматическая петля, соединяющая М3 с МА, которая предшествует М4, т.к. она не была идентифицирована с помощью электронной микроскопии [20].

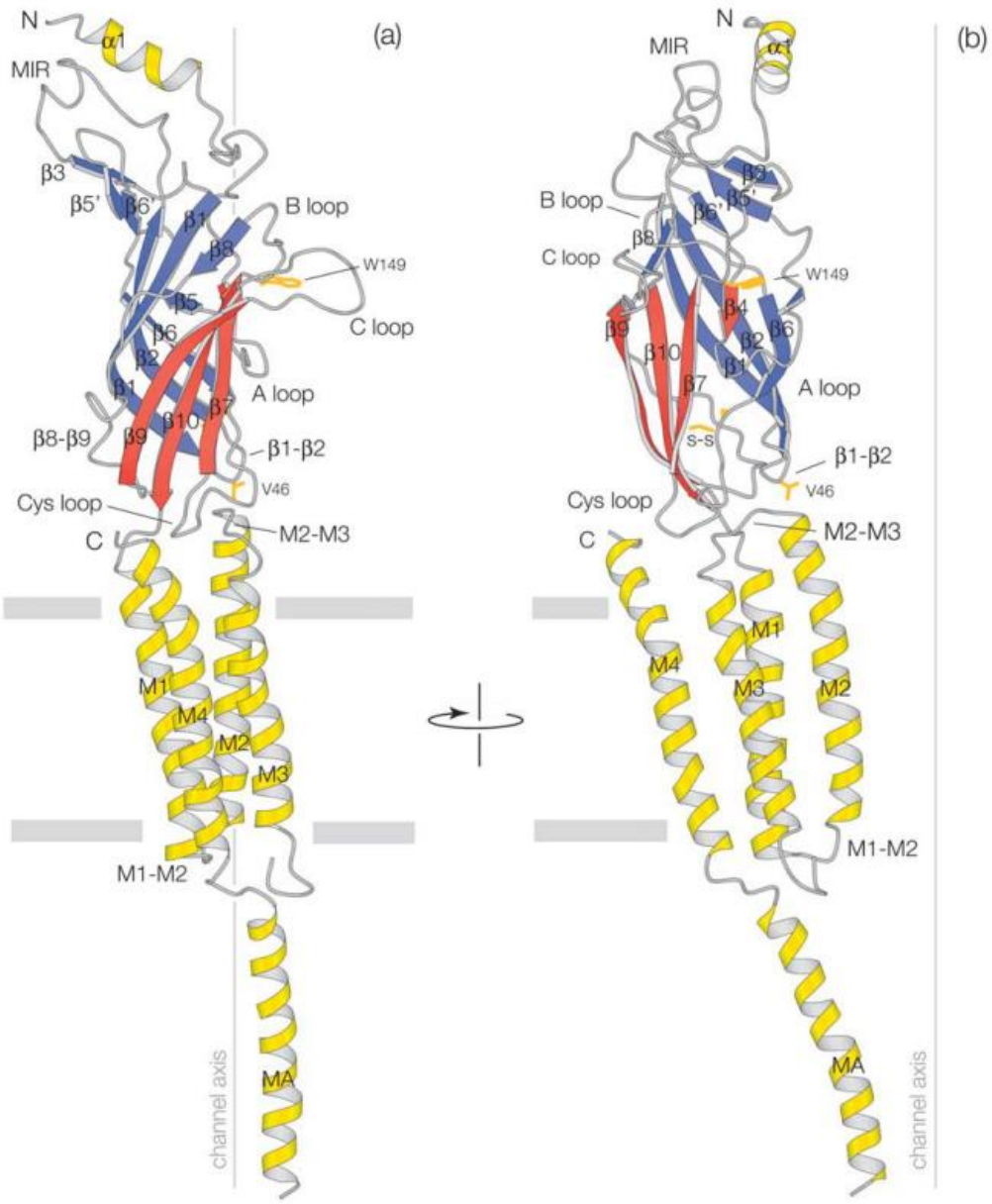

Рисунок 2.2 – Ленточная диаграмма α1-субъединицы нАХР из *Torpedo marmorata* (разрешение 4 Å), установленная методом электронной микроскопии

и обработанная математически. Субъединица изображена в плоскости плазматической мембраны. Channel axis – центральная ось канала. Слева – вид сзади (a), справа – вид сбоку (b). Субъединицы нАХР схожи по строению, за исключением некоторых коротких неконсервативных участков (например, β8 – β9 и С-петля) [21].

Как упоминалось ранее, нАХР состоит из пяти гомомерных или гетеромерных субъединиц. На рисунке 2.3 показана ленточная диаграмма мышечного нАХР. Для ясности на изображении слева (a) выделены лиганд-связывающие ВнеД, справа (b) – две фронтальные субъединицы. Желтым выделен Trp149, являющийся одним из ключевых остатков лиганд-связывающего домена. Горизонтальные линии обозначают липидный бислой (E, extracellular – внеклеточное пространство; I, intracellular – цитоплазматичнское пространство). Пунктирная линия справа обозначает основные зоны контактов между субъединицами [21].

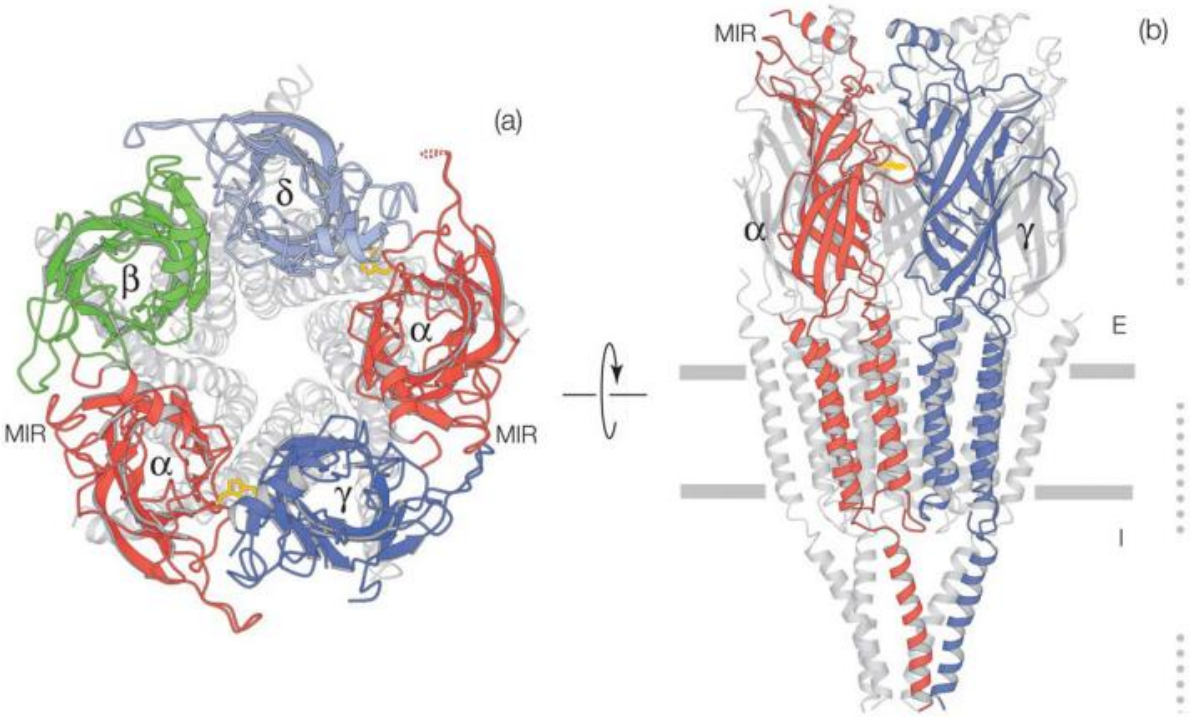

Рисунок 2.3 – Ленточная диаграмма мышечного Нахр [21]

Лиганд связывается с рецептором в кармане, образованном на границе раздела между основной «+» поверхностью α-субъединицы и комплементарной

«–» поверхностью соседней субъединицы. Это приводит к вращательному движению в β-сэндвиче, что приводит в движение TM2 спираль, поворачивая ее от гидрофобной конфигурации закрытого канала к более гидрофильной конфигурации открытого канала, пропускающего ионы (рисунок 2.4) [22]. Темно-синим обозначена агонист-связывающая α-субъединица, голубым – структурная β-субъединица (изображение A). При связывании агониста C-петля «+» поверхности, на вершине которой находится пара цистеин-цистеин, перемещается в сторону структурной субъединицы на значительное расстояние (~11 Å), чтобы перекрыть сайт связывания и эффективно упаковать лиганд в глубокий гидрофобный карман между субъединицами. В дополнение к паре цистеинов существуют другие остатки, необходимые для связывания лиганда – это преимущественно гидрофобные ароматические аминокислотные остатки, в частности Tyr93, Tyr149, Tyr190, Tyr198 [24]. Стоит отметить, что субъединицы α5 и α10 не связывают агонисты, поскольку не содержат ключевых остатков на «+» поверхности, необходимых для связывания (в частности, у α5 субъединицы вместо Tyr198 находится остаток аспарагиновой кислоты). Основными остатками на комплементарной «–» стороне, способствующими связыванию лиганда, являются L112, M114 и Trp53. В целом, аффинность лиганда определятся строением основной поверхности, а комплементарная поверхность определяет его селективность [22].

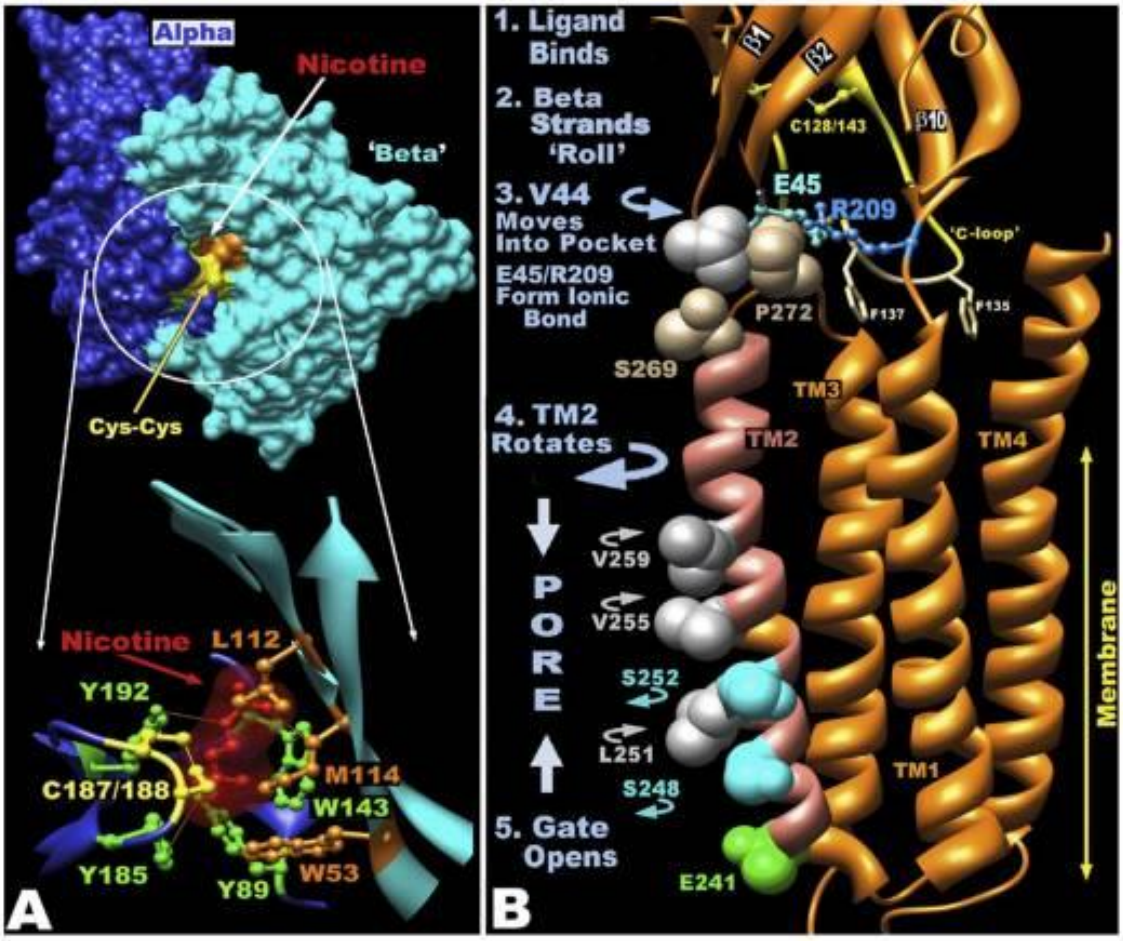

Рисунок 2.4 – Лиганд-связывающий сайт и предложенный механизм открытия ионной поры [22]

Молекула никотина на рисунке 2.4 А выделена красным, С-петля – желтым. Другие остатки, взаимодействующие с лигандом со стороны α-субъединицы обозначены зеленым, а со стороны β-субъединицы – оранжевым. Тонкими линиями обозначены водородные связи между никотином и аминокислотными остатками. W143 α-субъединицы способствует формированию основы сайта связывания агониста, Y185 важен для стабилизации лиганда в кармане. В α5-субъединице этот остаток заменен на аспарагиновую кислоту, которая вводит отрицательно заряженную группу в карман и ингибирует связывание лиганда. Вышеперечисленные гидрофобные аминокислотные остатки соседних субъединиц стабилизируют лиганд в кармане посредством Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, а другие остатки (например, D85 вблизи W143) стабилизируют пространственное по-

ложение первых. На рисунке 2.4 B показан порядок конформационных изменений после связывания с лигандом (1): возникает вращательное движение в β-цепях, которое передвигается через субъединицу (2) к ТМД. При этом происходит два важных события: во-первых, перемещение петли между цепями β1 и β2 в направлении последовательности аминокислотных остатков, связывающих TM2 и TM3, что переводит V44 в гидрофобный карман, образующийся за счет близости P272 и S269; во-вторых, цепь β10 передвигает против часовой стрелки R209 в сторону E45, формируя ионную связь (3). Эти взаимодействия приводят к вращению TM2 на ~15° для перемещения гидрофобных аминокислотных остатков ионных ворот (V255, V259, L251) из поры и полярных S248 и S252 в сторону расширения канала (4). В результате ворота канала открываются и ионы проходят через мембрану. Остатки аминокислот, расположенные на внутриклеточных и внеклеточных гранях (например, E241), являются полярными и/или заряженными и образуют высокозаряженные кольца, которые усиливают проницаемость конкретных ионов (например, Ca^{2+}) [22].

В закрытом нелиганд-связанном состоянии спирали TM2 пяти субъединиц образуют барьер для потока ионов за счет того, что гидрофобные аминокислотные остатки выступают в пору канала, формируя ворота канала с узким (~3 Å) проходом. В результате связывания рецептора с лигандом происходит временное удаление остатков гидрофобных ворот из поры, вызванное вращением ВнеД и спирали TM2, и увеличение диаметра поры до ~8 Å с одновременным перемещением гидрофильных остатков в центр канала для поддержания потока ионов [22]. Мутации с заменой гидрофобных остатков на гидрофильные приводят к неспецифическому повышению проницаемости канала, что может являться причиной эпилепсии [25, 26]. Наибольшие конформационные изменения в ТМД претерпевает спираль TM4, поскольку она расположена в липидной среде и имеет меньше контактов с другими составляющими рецептора, чем спирали TM1 – TM3. Данное движение может иметь дополнительное функциональное значение, по-

скольку TM4 содержит остаток цистеина вблизи границы мембраны с водой, который, по-видимому, участвует в агрегации рецепторов, например, включая α7 нАХР в липидные рафты мембраны [27, 28].

Помимо закрытого (C) и открытого (O) состояния рецептора согласно модели Моно-Уаймена-Шанжо выделяют десенситизированное (D) состояние, подразумевающее высокую аффинность агониста с одновременным закрытием канала (рисунок 2.5). Также выделяют промежуточные состояния рецептора. Количество состояний и скорость перехода между ними определяет кинетику рецептора и его физиологическую роль [5].

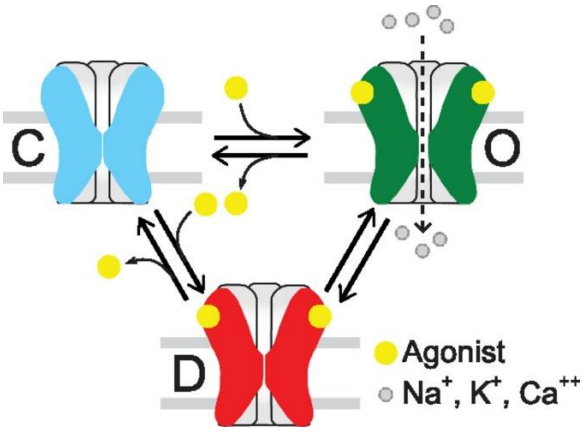

Рисунок 2.5 – Модель активации нАХР [5]

3.3. α7 нАХР и α9 нАХР

Гомопентамерные α7 нАХР являются лиганд-катионными каналами, характеризующимися высокой проницаемостью ионов кальция [29] и очень быстрой скоростью десенсибилизации [30]. Благодаря двойной (ионотропной и метаботропной) природе α7 нАХР активируют различные сигнальные пути в клетке. α7 нАХР широко распространены в нервной системе: главным образом, в областях, отвечающих за когнитивные функции и память, таких как гиппокамп, кора головного мозга и несколько подкорковых структур лимбической системы [31]. Дисфункция данных рецепторов связана с нервно-психическими и неврологическими расстройствами, такими как шизофрения и болезнь Альцгеймера. α7 нАХР также экспрессированы в не-нейрональных клетках: в частности, в иммунных клетках, включая астроциты, клетки эндотелия, клетки-предшественники

олигодендритов, клетки микроглии, где они играют определяющую роль процессах воспаления и нейропротекции [32]. Таким образом, потенцирование α7 нАХР является терапевтической стратегией при неврологических и воспалительных нарушениях.

В нейронах α7 нАХР локализуются пресинаптически, способствуя высвобождению нейромедиаторов. Постсинаптически рецепторы опосредуют быструю синаптическую передачу. В перисинаптических местах α7 нАХР модулируют другие пути поступления нейромедиаторов в нейроны и активируют различные сигнальные пути через объемную передачу [3, 33] (рисунок 3.1) [5].

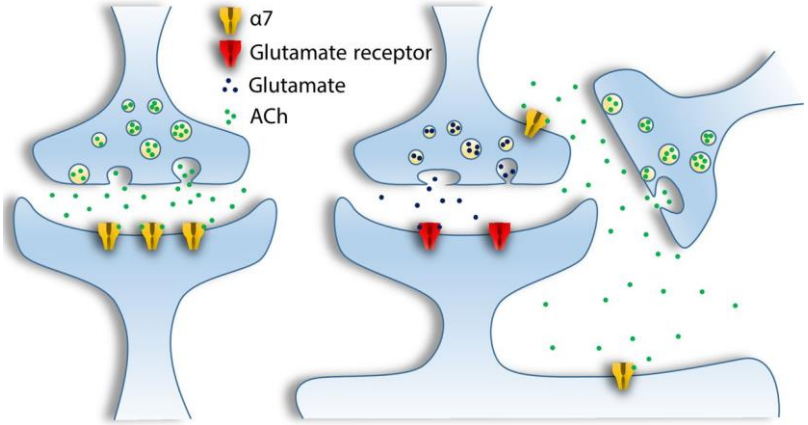

Рисунок 3.1 – Нейротрансмиссия, опосредованная α7 нАХР в мозге млекопитающих (ACh – ацетилхолин) [5].

В не-нейрональных клетках, включая лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги, α7 нАХР является важным участником холинергического противовоспалительного пути, который является связующим звеном между врожденной иммунной системой и эфферентными нервами [34]. Также α7 нАХР опосредует холинергический путь в мозге, что имеет решающее значение в нейропротекции и, вероятно, при болезни Паркинсона, кислородной депривации, глобальной ишемии [5, 32].

Внутриклеточная сигнализация, опосредованная активацией α7 нАХР, основана на проведении кратковременных токов ионов Na^+, K^+, Ca^{2+}. Существенное значение имеет механизм кальций-индуцированного высвобождения каль-

ция через рецепторы IP3. В качестве метаботропных рецепторов α7 нАХР опосредуют внутриклеточные сигналы, связываясь с G-белками (Gα и Gβγ) и рядом других. В иммунных клетках α7 нАХР участвует в нескольких внутриклеточных путях, обладающих противовоспалительным эффектом. Например, было показано, что α7 нАХР активирует JAK2/STAT3-сигнальный путь, что приводит к ингибированию ядерного фактора NF-κB и выработки противовоспалительных цитокинов клеткой. Также было показано, что α7 нАХР активирует PI3K/Akt-путь, который способствует транслокации Nrf-2 в ядро и сверхэкспрессии гемоксигеназы (HO-1), что приводит к мощным противовоспалительным эффектам [35 – 37] (рисунок 3.2) [5].

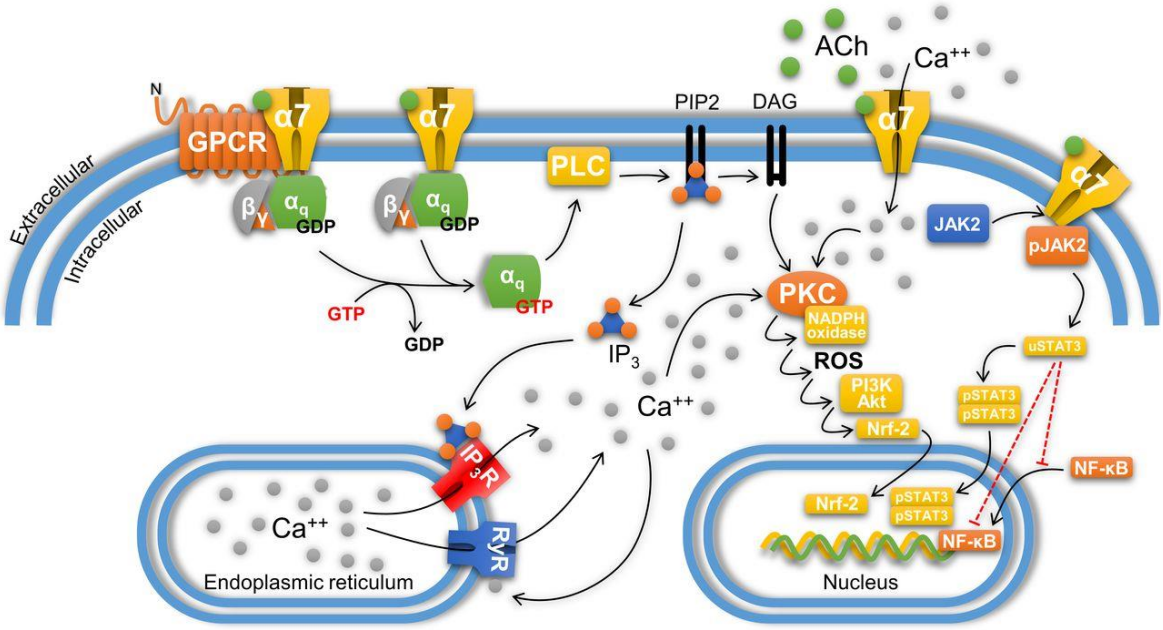

Рисунок 3.2 – внутриклеточные сигнальные пути, опосредованные α7 нАХР [5]

Обозначения на рисунке 3.2: DAG – diacylglycerol, диацилглицерин; GPCR – G protein-coupled receptor, G – белок связанный рецептор; IP3 – inositol trisphosphate, инозитолтрифосфат; JAK2 – Janus kinase 2, Янус-киназа 2; NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный транскрипционный фактор каппа-легкой цепи энхансер-активированных B-клеток; Nrf-2 – NF-E2-related factor; NF-E2 связанный фактор; PI3K/Akt путь – внутриклеточный сигнальный путь, центральными компонентами которого являются ферменты

PI3K (Phosphoinositide 3-kinases, фосфоинозитид-3-киназы) и Akt (протеинкиназа семейства B); PKC – protein kinase C, протеинкиназа C; PLC – phospholipase C, фосфолипаза C; ROS – reactive oxygen species, активные формы кислорода; RyR – ryanodine receptor, рианодиновый рецептор; STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3, сигнальный белок и активатор транскрипции 3.

α9 нАХР близок к α7 нАХР по ряду свойств: он гомопентамерен, высоко проницаем для ионов кальция и обладает высоким сродством к таким антагонистам, как метилциклонитин и α-бунгаротоксин [15]. Предположительно, α9-содержащие нАХР являются терапевтической мишенью при лечении невропатической боли [38]. α9α10 нАХР экспрессируются в иммунных клетках и, предположительно, вовлечены в иммунологические реакции.

Благодаря сочетанию методов сайт-направленного мутагенеза и кальциевого имиджинга было доказано, что мутации L119D и F187S в человеческом α7 нАХР (аминокислотные остатки в человеческом α7 нАХР были заменены на аминокислотные остатки человеческого α9 нАХР в соответствующих положениях в районе петли C) приводят к снижению аффинности ряда лигандов. Благодаря этому было доказано, что аминокислотные остатки в данных позициях являются ключевыми при связывании лигандов [15].

Таким образом, одной из задач данной работы было получение двойного мутанта крысиного α7 нАХР с мутациями в сторону крысиного α9 нАХР в положениях, аналогичных таковым у крысиного α7 нАХР (L119D и F209S).

3.4. Мышечные нАХР

Мышечные нАХР разделяются на две изоформы: фетального типа – нАХР, сформированные из двух α1, β1, γ и δ субъединиц (γ-нАХР) и взрослого типа – 2α1β1εδ (ε-нАХР) (рисунок 4.1). Первые экспрессируются неиннервированными мышечными клетками и симпластами (мышечными волокнами), существующими на ранних стадиях при физиологическом развитии или при заболеваниях, приводящих к мышечной денервации; вторые – зрелыми концевыми пластинами иннервированных мышечных волокон. С функциональной точки зрения, у γ-

нАХР проводимость одного ионного канала ниже, а продолжительность открытого состояния больше. Оба типа проницаемы для Ca^{2+} и других бивалентных катионов, но ε-нАХР обладают более высокой проницаемостью. Проницаемость ионов Ca^{2+} мышечных нАХР зависит от субъединиц, составляющих рецептор, вероятно, из-за различного распределения заряженных аминокислотных остатков во внутриклеточном и внеклеточном окончаниях спирали М2 в ТМД [39]. Так, например, у грызунов и людей γ-нАХР обладают меньшей проницаемостью Ca^{2+}, чем ε-нАХР [40].

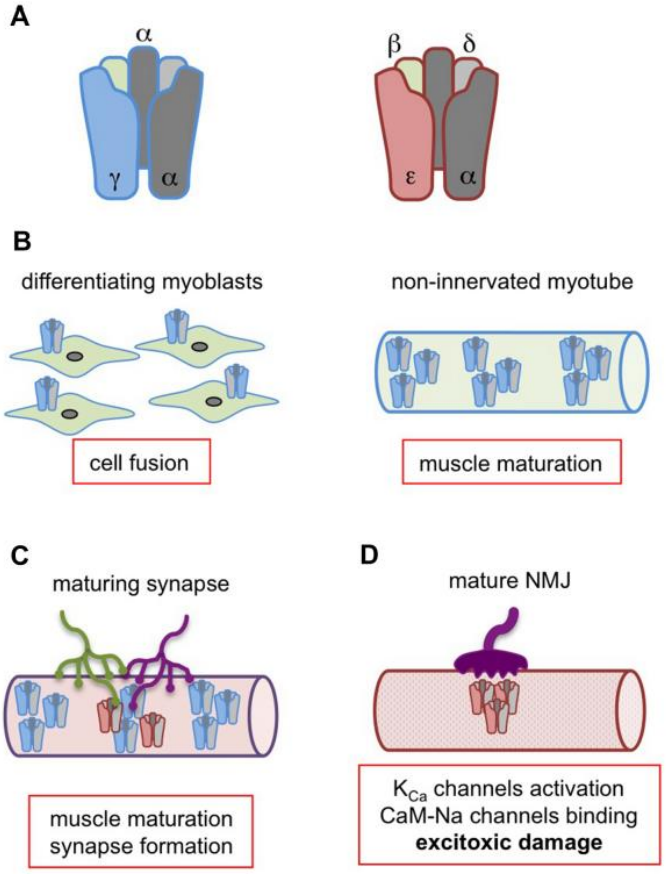

Рисунок 4.1 - Мышечные нАХР. A: Структура двух изоформ мышечных нАХР. B-D: локализация нАХР-каналов в мышечных клетках на разных стадиях развития. B: Дифференциация миобластов (слияние клеток), неиннервированные симпласты (развитие мышечного волокна). C: развитие синапса (развитие мышечного волокна, образование синапса). D: Развитие NMJ (neuromuscular

junction - нервно-мышечное соединение) (активация кальций-зависимых калиевых каналов, в патологических случаях – связывание кальмодулина и активация потенциалзависимых натриевых каналов, экситоксичное повреждение) [40].

In vitro, ацетилхолин способствует формированию симпластов из миосателлитных клеток, вызывая повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Повышенная концентрация Ca^{2+} в цитоплазме запускает ряд процессов в клетке, таких как активация кальпаина, Ca^{2+}-зависимой протеазы, запускающей деградацию мембраны миобластов, и активация кальциневрина и транскрипционного фактора NFATc2, который координирует экспрессию генов, необходимых для формирования и развития мышечных волокон. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме опосредуется связыванием ацетилхолина с мышечными нАХР (например, γ-нАХР), последующей активацией потенциалзависимых ионных каналов (voltage-gated Ca^{2+} channels - VGCC) и через каналы, регулируемые высвобождением Ca^{2+} из внутренних источников (store-operated channels - SOCs) [41, 42]. Также возможно высвобождение ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных источников через рианодиновые рецепторы IP_3R (рисунок 4.1) [40].

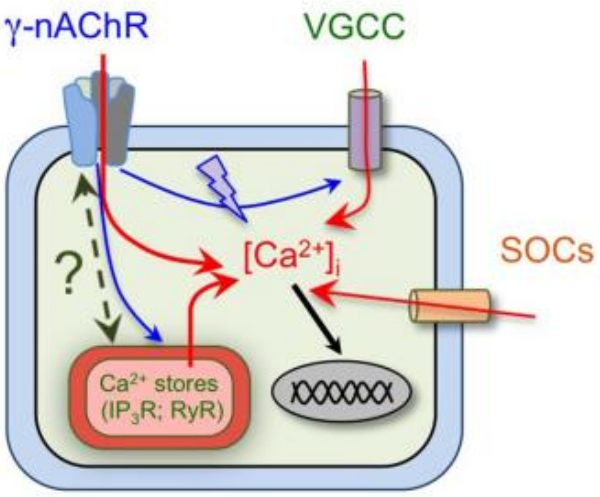

Рисунок 4.2 – Механизмы повышения концентрации ионов кальция в цитоплазме (обозначения в тексте) [40]

В развитом нервно-мышечном соединении на концевой пластинке, прилегающей к поверхности мышечного волокна, ε-нАХР опосредует мышечную активность. Деполяризация концевой пластинки приводит к возникновению потенциала на мышечном волокне. Активация мышечного волокна через ε-нАХР также запускает активацию Ca^{2+}-зависимых K^{+} каналов, открытие которых вызывает реполяризацию (восстановление потенциала покоя) концевой пластины [43]. Также локальное повышение концентрации Ca^{2+} может влиять на активацию синаптических потенциалзависимых Na^{+} каналов посредством связывания кальмодулина [44, 45]. Оба события, вероятно, участвуют в регуляции возбуждения мышечного волокна, причем повышенная проницаемость человеческих ε-нАХР для ионов кальция, вероятно, способствует этому. Однако, нарушенная регуляция ε-нАХР является причиной повреждения концевой пластинки. Это происходит при орфанном заболевании с аутосомно-доминантным типом наследования, вызванном мутацией в генах, кодирующих субъединицы α1, β, 1ε – миастеническом синдроме [46]. При данном расстройстве повышается скорость открытия и снижается скорость закрытия канала мышечного нАХР, т.е. увеличивается время открытого состояния канала, что приводит к избытку катионов в синаптической щели, замедлению ее деполяризации, миопатии, расширению синаптического пространства и отложению нерастворимых солей кальция. Миастенический синдром может выражаться в слабости шейных, лопаточных и запястных мышц [47], однако в отдельных случаях могут возникать также офтальмопарез, дизартрия проксимальных отделов конечностей и дыхательная недостаточность [46].

Таким образом, мышечные нАХР являются важной терапевтической мишенью для лечения миастенического синдрома.

4. Заключение

нАХР представляют разнообразную группу широко распространенных рецепторов, которые экспрессируются в центральных и периферических областях нервной системы (ннАХР), мышечных тканях (мнАХР), эпителиальных, некоторых типах иммунных клеток (лимфоциты, макрофаги). Благодаря данным рецепторам осуществляется селективный транспорт катионов через плазматическую мембрану (ионотропная функция) и активация различных сигнальных путей клетки (метаботропная функция). Так, например, α7 ннАХР способствуют высвобождению нейромедиаторов и опосредуют быструю синаптическую передачу, а в иммунных клетках α7 нАХР опосредует внутриклеточные сигнальные пути, обладающие противовоспалительным эффектом. Мышечные ε-нАХР в развитом НМС опосредуют мышечную активность. Дисфункция нАХР является одной из причин таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, шизофрении, миастении, эпилепсии и др.

Таким образом, нАХР являются важной терапевтической мишенью лекарственных средств. В настоящее время проведение научных исследований, целью которых является углубление знаний о строении, механизме и способах модулирования работы нАХР, является актуальной задачей.

5. Экспериментальная часть

5.1. Приборы и материалы

Приборы: автоматические пипетки (“Eppendorf”, Германия), бактериальный шейкер (“CertomatRH”, Германия), вортекс (миксер) Vortex V-1 plus (“BioSan”, Латвия), ДНК-амплификатор Mastercycler nexus (“Eppendorf”, Германия), камера для горизонтального электрофореза Wide Mini-Sub Cell GT (“Bio-Rad”, США), ламинарный бокс (“Thermo Fisher Scientific”, США), микроцентрифуга Mini Spin 5415C (“Eppendorf”, Германия), электронные весы Gottingen E 5500 S (“Sartorius”, Германия).

Материалы: штамм *E. coli* DH5α (“Thermo Fisher Scientific”, США), ампициллин («Ф-Синтез», Россия), бромид этидия (“Pharmacia”, Швеция), буфер для нанесения образцов ДНК на агарозный гель Gel Loading Buffer II (“Thermo Fisher Scientific”, США), маркер длин ДНК GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США), набор реактивов для проведения ПЦР Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (“Thermo Fisher Scientific”, США), набор реактивов для проведения ПЦР Encyclo PCR kit («Евроген», Россия), 50X TAE (трис-ацетатный) электродный буфер («Евроген», Россия), набор реактивов для выделения плазмидной ДНК “Plasmid Miniprep” («Евроген», Россия), набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей “CleanupMini” («Евроген», Россия), пластиковые наконечники для автоматических пипеток (“UL Plast”, Польша), пластиковые пробирки 1,5 мл (“Eppendorf”, Германия), чашки Петри (“SPL Lifesciences”, Корея), ген крысиного α7 нАХР с точечной мутацией L119D в плазмидном векторе pcDNA3.1; среда SOC: 2% бакто-триптон, 0,5% бакто-дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$,10 мМ $MgSO_4$ и 20 мМ глюкозы; среда LB:1,5% бакто-триптон, 0,5% бакто-дрожжевой экстракт, 1% NaCl; агаризованная (твердая) среда LB: 1,5% раствор агара в среде LB.

5.2. Точечный мутагенез нАХР

Целью данной работы является получение гена α7/α9 нАХР с двумя точечными мутациями: L119D и F209S, а также изучение особенностей функциональной активности мышечных нАХР с мутациями: G173S, L219A, L219T и двойные мутации: L219A, G173S и L219T, G173S. Для введения точечной мутации F209S в исходный мутантный L119D α7 нАХР крысы применили метод сайт-направленного мутагенеза, который заключался в подборе праймеров, проведении ПЦР-амплификации с последующей трансформацией компетентных клеток *E.coli*, селекцией колоний на чашке Петри, выделении плазмидной ДНК и секвенировании.

5.2.1. Подбор праймеров

В базе данных Nucleotide [48] определили последовательность FASTA (последовательность нуклеотидов ДНК) α7 нАХР крысы. С помощью программы primerDesignProgram [49] произвели замену остатка фенилаланина в 209 положении α7 нАХР на остаток серина (F209S) и получили FASTA последовательность прямого (F, forward) и обратного (R, reverse) праймеров, скорректировали в программе Microsoft Word согласно статье [50] так, что с 5'-конца каждого праймера удалили 8 нуклеотидов (стёрли 8 букв), к 3'-концам приписали G (гуанин) или C (цитозин), т.к. ДНК-полимераза достраивает 3'-концы. Определили температуры плавления (Tm, melting temperature) с помощью программы Primer-BLAST [51] и посредством добавления к 5'- или 3'- концу G или C добились приблизительно одинаковой Tm. В результате были подобраны праймеры со следующими свойствами (Таблица 1.1) и сиквенсом (Таблица 1.2):

Таблица 1.1 – Свойства праймеров (н. – нуклеотиды)

F.primer	R.primer
Tm=68,60°C	Tm=69,36°C
длина=34 н.	длина=34 н.

Таблица 1.2 – Сиквенс праймеров

F.primer	5'-CAGCACTCATAGCTCTTCTCATTCCTTTTGCCAG-3'

R.primer	5'-AGGAATGAGAAGAGCTATGAGTGCTGCAAAGAGC-3'

5.2.2. ПЦР-амплификация

Для проведения ПЦР – амплификации была изготовлена ПЦР-смесь в соотношении компонентов, подобранном в соответствии с протоколом (Thermo Scientific Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase) – Таблица 2.1.

Таблица 2.1. – Компоненты ПЦР-смеси (Control plasmid – ген крысиного α7 нАХР с точечной мутацией L119D в плазмидном векторе pcDNA3.1)

Вещество	На 25 мкл реакционной смеси
5XPhusiun HF Buffer	5 мкл
Control plasmid (RAT L119D) 7.2 kb (18,7нг/мкл)	1,25 мкл
F.primer (ЗАО «Евроген») (10мкМ)	1,25 мкл
R.primer (ЗАО «Евроген») (10мкМ)	1,25 мкл
dNTP mix (10mM)	0,5 мкл
ddH_2O	15,5 мкл (для отриц. контроля: 16,75 мкл)
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/мкл)	0,5 мкл

Прилили с помощью микропипетки необходимое количество каждого вещества в соответствии с порядком в таблице в каждый из пяти пронумерованных (1-4, К-контроль) эппендорфов (в контрольный эппендорф не приливали control plasmid). На амплификаторе (Eppendorf) установили температурный, временной режим и количество циклов в соответствии с Таблицей 2.2 с использованием градиента температур для подбора оптимальных условий амплификации (Таблица 2.3). Продукты ПЦР хранили при -20°С.

Таблица 2.2 – Условия ПЦР – амплификации

Стадия	Кол-во циклов	Температура, °С	Время
Предварительная денатурация	1	98	1 мин
Денатурация	35	98	30 с
Отжиг	35	градиент	1 мин
Элонгация	35	72	4 мин
Заключительная элонгация	1	72	7 мин

Таблица 2.3 – Градиент температур

Эппендорф 1	Эппендорф 2	Эппендорф 3	Эппендорф 4	Эппендорф контрольный
61.3°C	63.8°C	62.2°C	68.7°C	69.9°C

5.2.3. Электрофорез

Для визуализации результатов ПЦР-амплификации применили электрофорез с использованием 1×TAE (трис-ацетатного) буфера, агарозного геля (1% в TAE-буфере), бромистого этидия (0,5 мкл на 25 мкл 1%-го раствора агарозы в TAE буфере), маркера длин ДНК более чем на 1 кб (килобазу, 1000 пар нуклеиновых оснований) – Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, буфера для нанесения образцов ДНК на агарозный гель – Gel Loading Buffer II (Thermo Scientific). На парафильме с помощью микропипетки к 3 мкл образца из каждого эппендорфа прилили по 1 мкл буфера Gel Loading Buffer II и по 2 мкл 1×TAE буфера для разбавления буфера Gel Loading Buffer II в 6 раз, затем полученную смесь веществ перенесли в лунки застывшего агарозного геля, помещенного в электрофорезную камеру с 1×TAE буфером. В одну лунку прилили 3 мкл маркера, накрыли электрофорезную камеру крышкой с электродами и включили подачу тока. Через некоторое время просветили агарозный гель под УФ (320 нм): в эппендорфе 3 обнаружили продукт ПЦР необходимой длины (7,2 кб) – рисунок 3.1.

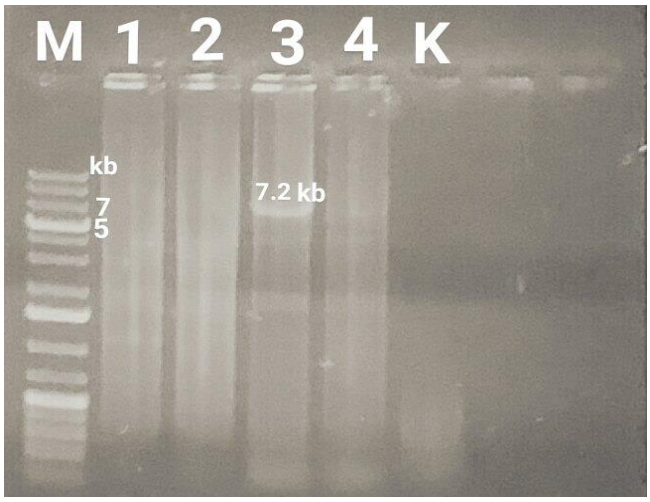

Рисунок 3.1 – визуализация результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле (М – маркер, 1 – 4 – эппердорфы, К – отрицательный контроль)

5.2.4. Экстракция плазмидной ДНК из агарозного геля

С целью выделения продукта ПЦР нужной длины повторно провели электрофорез в агарозном геле (0,8%), вырезали из агарозного геля полосу с целевыми продуктами ПЦР и экстрагировали их в соответствии с протоколом для набора реактивов Thermo Scientific Gene Extraction and DNA Cleanup Mikro Kit. С помощью спектрофотометра UV – 2501 PC по спектру поглощения в области 220 – 300 нм определили наличие молекул ДНК в трех эппендорфах (максимум поглощения пришелся на 260 нм).

5.2.5. Трансформация клеток и посев на чашку Петри

Трансформацию компетентных клеток *E.coli* (штамм DH5α) произвели в соответствии с протоколом химической трансформации (трансформации тепловым шоком) от ЗАО «Евроген» с использованием среды SOC, посев производили на LB-агар, селекцию производили с использованием 1000×ампициллина (его распределили равномерно на поверхности твердой LB-среды шпателем) – рисунок 5.1.

Рисунок 5.1 – Колонии компетентных клеток на твердой LB-среде с ампициллином (7 колоний и 8-ая на периферии)

5.2.6. ПЦР-скрининг колоний и наращивание в жидкой LB-среде

Для проведения ПЦР-скрининга колоний подобрали условия, используя праймеры, специфически отжигающиеся на фланкирующих нуклеотидных последовательностях гена α7 нАХР крысы (свойства праймеров в Таблице 6.1), и в качестве ДНК-матрицы использовали control plasmid (см. Таблицу 2.1). ПЦР-смесь подготовили в соответствии с протоколом для набора реактивов Encyclo PCR kit (ЗАО «Евроген») (Таблица 6.2).

Таблица 6.1 – Свойства праймеров (н. – нуклеотиды)

F.primer	R.primer
Tm=57,72°C	Tm=56,07°C
длина=20 н.	длина=20 н.

Таблица 6.2 - Компоненты ПЦР-смеси

Вещество	На 25 мкл реакционной смеси
Encyclo буфер X10	2,5 мкл
F.primer	1,25 мкл
R.primer	1,25 мкл
dNTP mix (10mM)	0,5 мкл
ddH_2O	18,7 мкл
ДНК-матрица	0,3 мкл
Encyclo полимераза X50	0,5 мкл

Согласно протоколу на амплификаторе установили температурный, временной режим и количество циклов в соответствии с Таблицей 6.3 с использованием градиента температур для подбора оптимальных условий амплификации (Таблица 6.4). Продукты ПЦР хранили при -20°C.

Таблица 6.3 – Условия ПЦР – амплификации

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
предварительна денатурация	1	95°C	1 минута

Продолжение таблицы 6.3

денатурация отжиг элонгация	35	95°C градиент (центр – 56,1°C) 72°C	10 секунд 30 секунд 20 секунд
финальная элонгация	1	72°C	3 минуты

Таблица 6.4 – Градиент температур

Эппендорф 1	Эппендорф 2	Эппендорф 3	Эппендорф 4	Эппендорф 5 (контрольный, без матрицы ДНК)
52.1°C	53.8°C	56.1°C	58.4°C	60.1°C

После проведения электрофореза в агарозном геле, который показал наличие необходимого продукта во всех эппендорфах 1 – 4, сделали вывод о том, что оптимальной температурой для проведения ПЦР-скрининга колоний является 58.4°C, т.к. при более высоких температурах меньше неспецифических продуктов ПЦР. Таким образом, ПЦР-скрининг колоний проводили в тех же условиях и с теми соотношениями реагентов, которые описаны выше, но в качестве ДНК-матрицы использовали control plasmid (см. Таблицу 2.1) и колонии с чашки Петри (8ая на периферии принималась за отрицательный контроль, т.к. предполагалось, что на периферии меньшие концентрации антибиотика), температуру для всех эппендорфов выставили 58.4°C. Электрофорез (рисунок 6.1) показал наличие целевого ПЦР-продукта во всех эппендорфах (включая эппендорф с отрицательным контролем), в связи с чем наращивание в жидкой LB-среде с ампициллином производили со всеми клонами: петлей переносили колонии под ламинаром в стерильные пробирки со средой, ставили пробирки в шейкер-инкубатор при 37°C на ночь.

5.2.7. Выделение плазмидной ДНК

Выделение производили согласно протоколу для набора реактивов Plasmid Miniprep (ЗАО «Евроген»). Поскольку после осаждения клеток центрифугированием осадок образовался только в двух эппендорфах, далее работали с ними. С

помощью спектрофотометра UV-2501PC измерили концентрации плазмидной ДНК (Таблица 7.1).

Таблица 7.1 – Характеристики плазмидных ДНК в эппенорфах

Эппендорф 1	Эппендорф 2
Макс. поглощение при ʎ=256.00нм	Макс. поглощение при ʎ=257.50нм
OD_{260}=0.323 abs	OD_{260}=0.499 abs
C=119,5 нг/мкл	C=184,6 нг/мкл

5.2.8. Секвенирование плазмидной ДНК

Секвенирование образцов производила компания ЗАО «Евроген». Полученный сиквенс проверили на наличие мутаций с помощью инструмента NCBI Protein BAST [52], в результате было доказано наличие обеих точечных мутаций (Таблица 8.1). В Таблице 8.1 приводится данные сравнения последовательности аминокислотных остатков, закодированных в исследуемом образце (Исслед.) и в исходном гене α7 нАХР крысы (Исходн.). Зеленым цветом выделены аминокислотные остатки, которые необходимо было заменить (целевые мутации: L119D и F209S), желтым – нецелевые мутации.

Таблица 8.1 – Сравнение последовательностей аминокислотных остатков

Исслед.	MCGGRGGIWLALAAALLHVSLQGEFQRRLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSPSLL
Исходн.	MCGGRGGIWLALAAALLHVSLQGEFQRRLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSLL
Исслед.	QIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNMSEYPGVKNVRFPDGQIWKPDILLYNSADE
Исходн.	QIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNMSEYPGVKNVRFPDGQIWKPDILLYNSADE
Исслед.	RFDATFHTNVLVNASGHCQYDPPLPVRSSIASTILHCQYDPPGIFKSSCYIDVRWFPFDV
Исходн.	RFDATFHTNVLVNASGH----------CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDV
Исслед.	QQCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISSYIPNGEWDLMGIPGKRNEKSYECKKEPYPDVT
Исходн.	QQCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISSYIPNGEWDLMGIPGKRNEKFYECCKEPYPDVT

5.3. Флуоресцентная микроскопия и кальциевый имиджинг

В данной работе осуществлялась обработка видео кальциевого имиджинга с помощью программ Image J, Microsoft Office Excel, LibreOffice и языка программирования R. Видео, получение которых описано в пункте 5.3.2 в соответствии со статьей [15] были записаны ранее в отделе нейроиммунной сигнализации ИБХ РАН.

5.3.1. Программное обеспечение

Image J (разработчик: Wayne Rasband (NIH)), Microsoft Office Excel (разработчик: Microsoft), LibreOffice, язык программирования R (для статистической обработки данных).

5.3.2. Флуоресцентная детекция цитоплазматического кальция

Для измерения изменений внутриклеточной концентрации кальция трансфицированные клетки (Neuro2acells), нанесенные на покровные стекла, перфузировали при комнатной температуре буфером, содержащим 140 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 2,8 мМ KCl, 4 мМ $MgCl_2$, 20 мМ буфера HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 10 мМ глюкозы; pH 7,4. Экспрессия Case12, флуоресцентного генетически-кодируемого биосенсора ионов кальция (обладает флуоресценцией в зеленой области спектра, имеет максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции при 491 и 516 нм соответственно), позволила осуществлять прямой мониторинг изменений концентрации цитоплазматического кальция с помощью микроскопа с соответствующей комбинацией фильтров и CCD-камерой с охлаждением CAM-XM10 (Olympus, Япония). Видео были сделаны и обработаны с использованием программного обеспечения CellA Imaging Software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия), программы Image J, CellX и OriginPro 7.5 (Origi-nLab, MA, США, для статистического анализа). Клетки подвергали действию ацетилхолина (Sigma, Германия) и изменения флуоресценции Case12 регистрировали для каждой клетки независимо. Все записи были сделаны при комнатной температуре [15].

На рисунке 5.3.2.1. А представлены клетки до аппликации ацетилхолина, Б — клетки после аппликации ацетилхолина (появление флуоресценции), В — Пример графика интенсивности флуоресценции во времени (отдельной клетки)

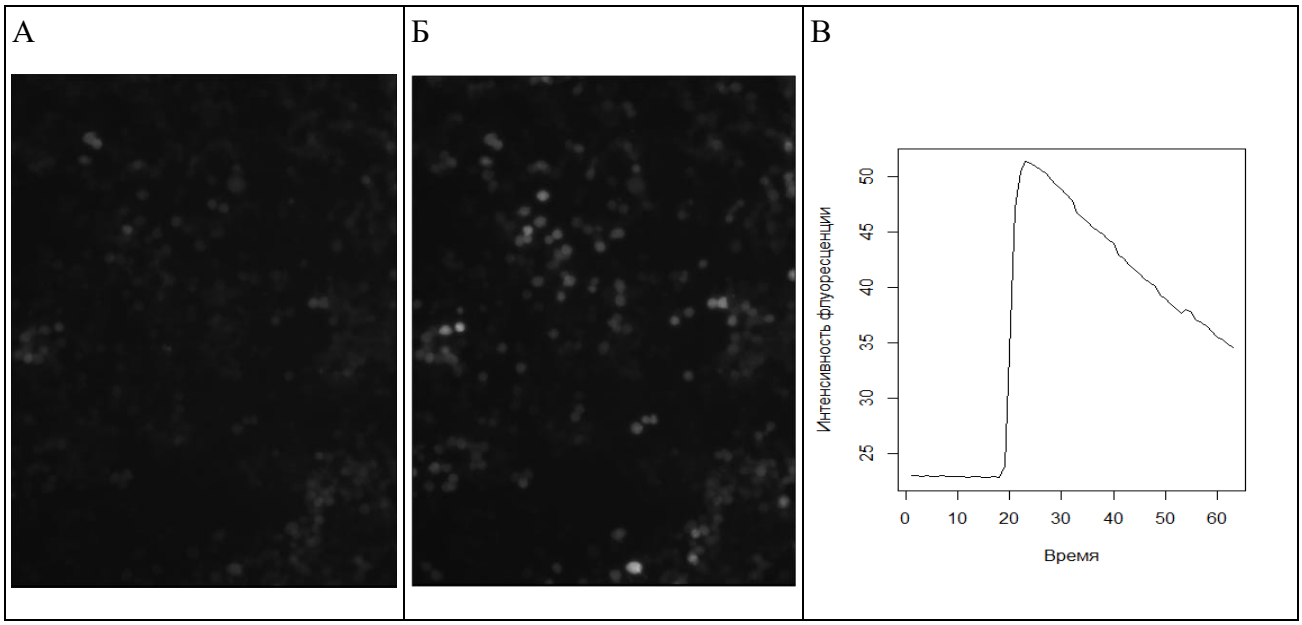

Рисунок 5.3.2.1 - Регистрация повышения концентрации цитоплазматического кальция с помощью флуоресцентной микроскопии

Амплитуды интенсивности флуоресценции десяти произвольно выбранных клеток заносились в таблицу. Данные по всем мутантам представлены на рисунке 5.3.2.2.

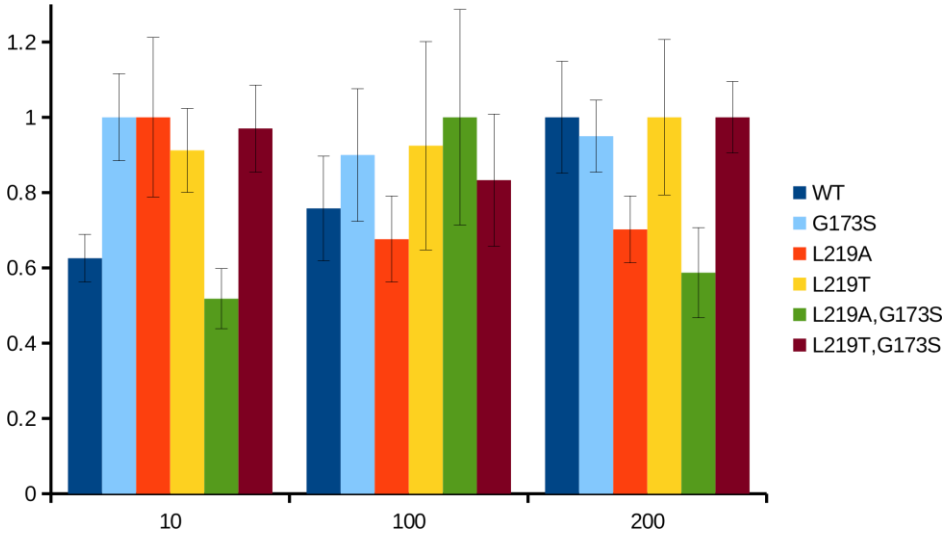

Рисунок 5.3.2.2. – Сравнение усредненных нормализованных амплитуд ответов на 10, 100 и 200 мкМ ацетилхолина для мышечного рецептора дикого типа (WT) и линейки мутантных мышечных нАХР

Данные, описывающие падение интенсивности флуоресценции, позволяют сравнить скорость десенситизации рецепторов. На рисунках 5.3.2.3 – 5.3.2.4 представлены графики зависимости интенсивности флуоресценции от времени: начальный момент времени соответствует максимальному значению интенсивности флуоресценции, усредненной для трех отдельно взятых клеток. На каждом рисунке также изображен график аппроксимирующей функции, которая позволяет составить приближенную математическую модель, характеризующую падение флуоресценции во времени (R^2 – величина достоверности аппроксимации). Данные учитывают погрешность измерений, соответствующую стандартной ошибке.

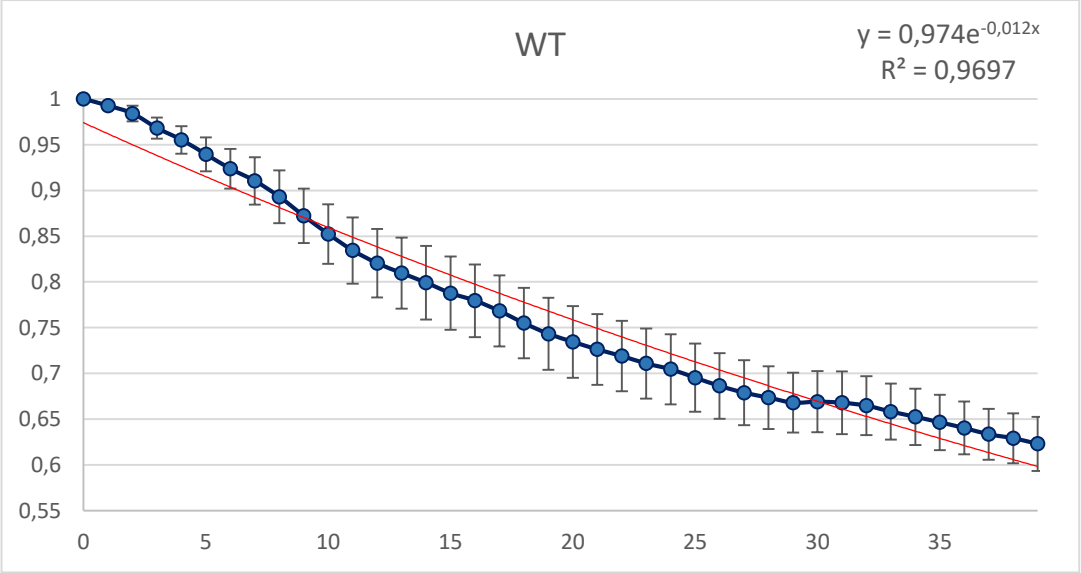

Рисунок 5.3.2.3 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для клеток дикого типа (WT)

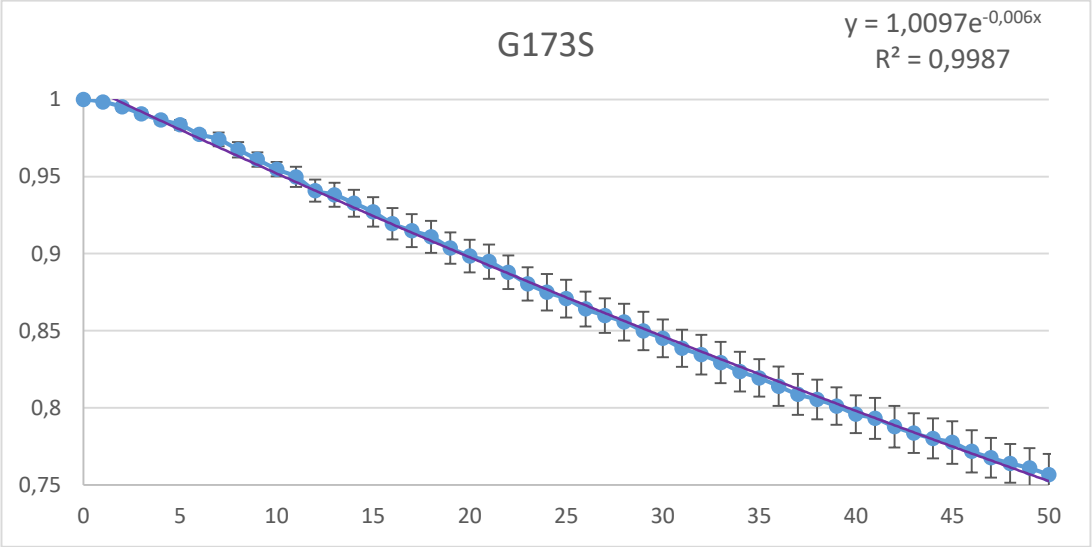

Рисунок 5.3.2.4 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для клеток с мутантным мнАХР (G173S)

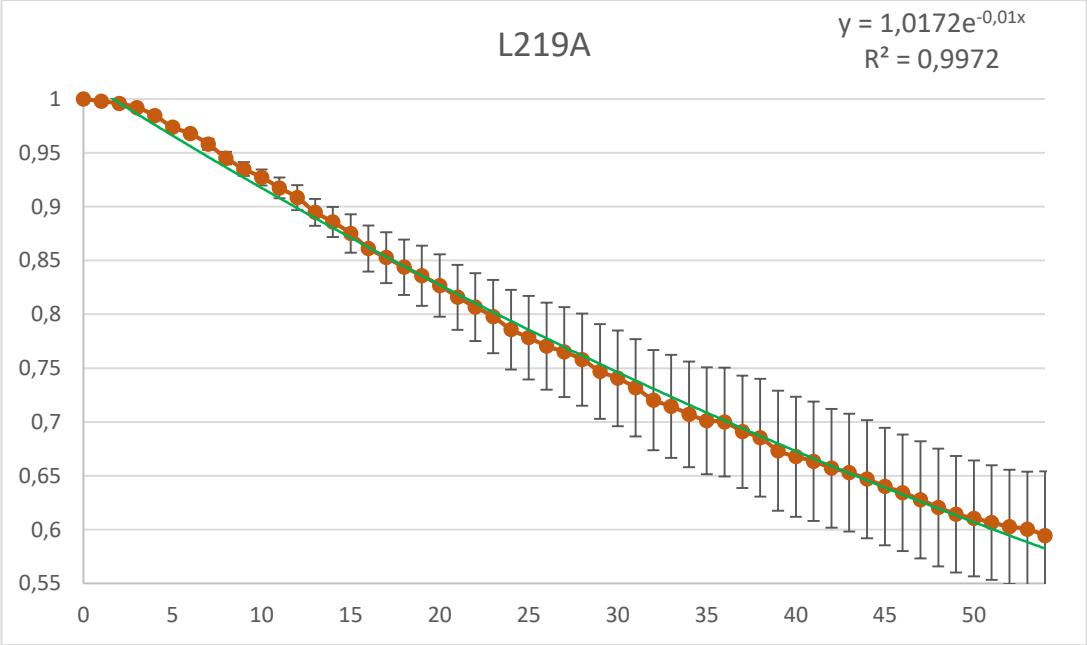

Рисунок 5.3.2.5 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для клеток с мутантным мнАХР (L219A)

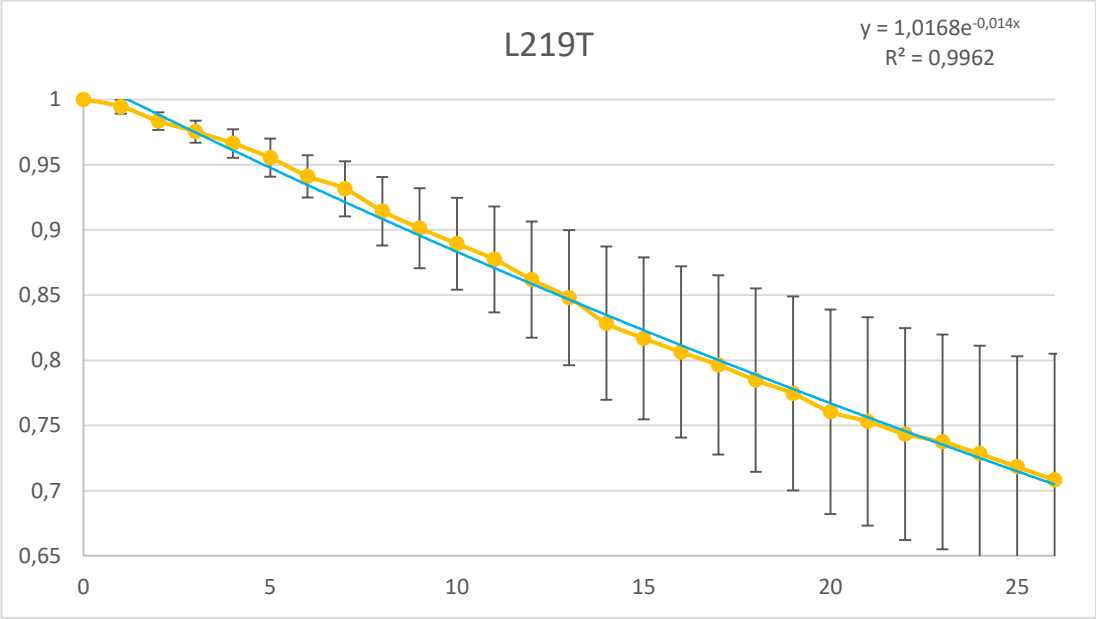

Рисунок 5.3.2.6 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для клеток с мутантным мнАХР (L219T)

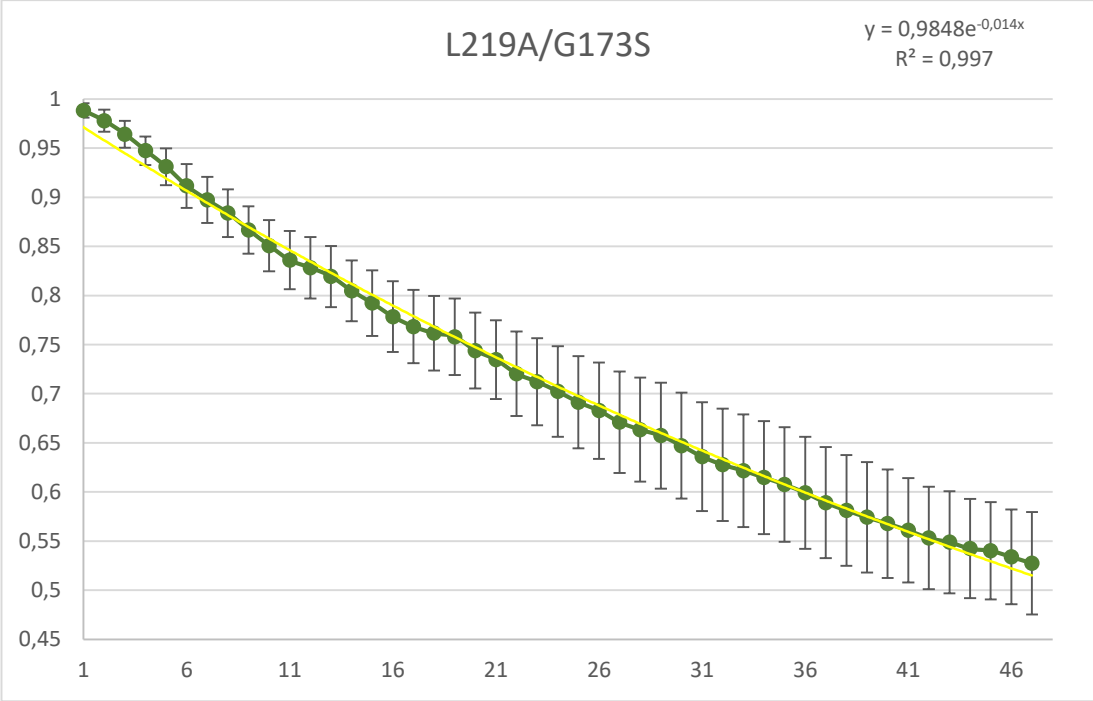

Рисунок 5.3.2.7 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для клеток с мутантным мнАХР (L219A/G173S)

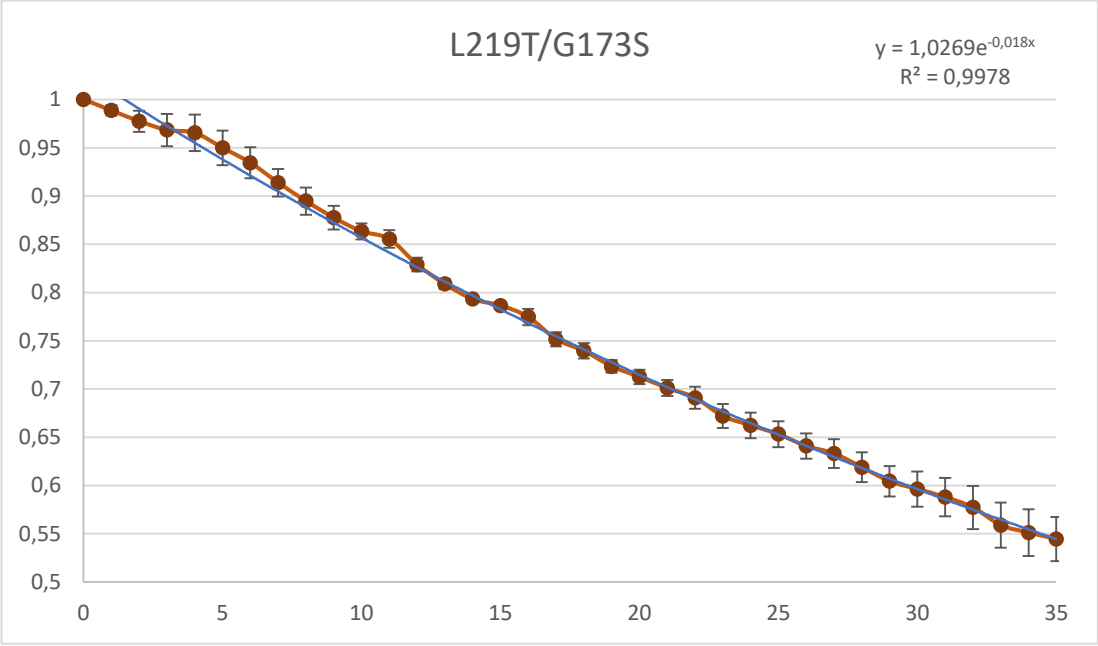

Рисунок 5.3.2.8 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для клеток с мутантным мнАХР (L219T/G173S)

На рисунке 5.3.2.9 изображен общий график, позволяющий оценить скорость десенситизации и влияние различных мутаций на нее.

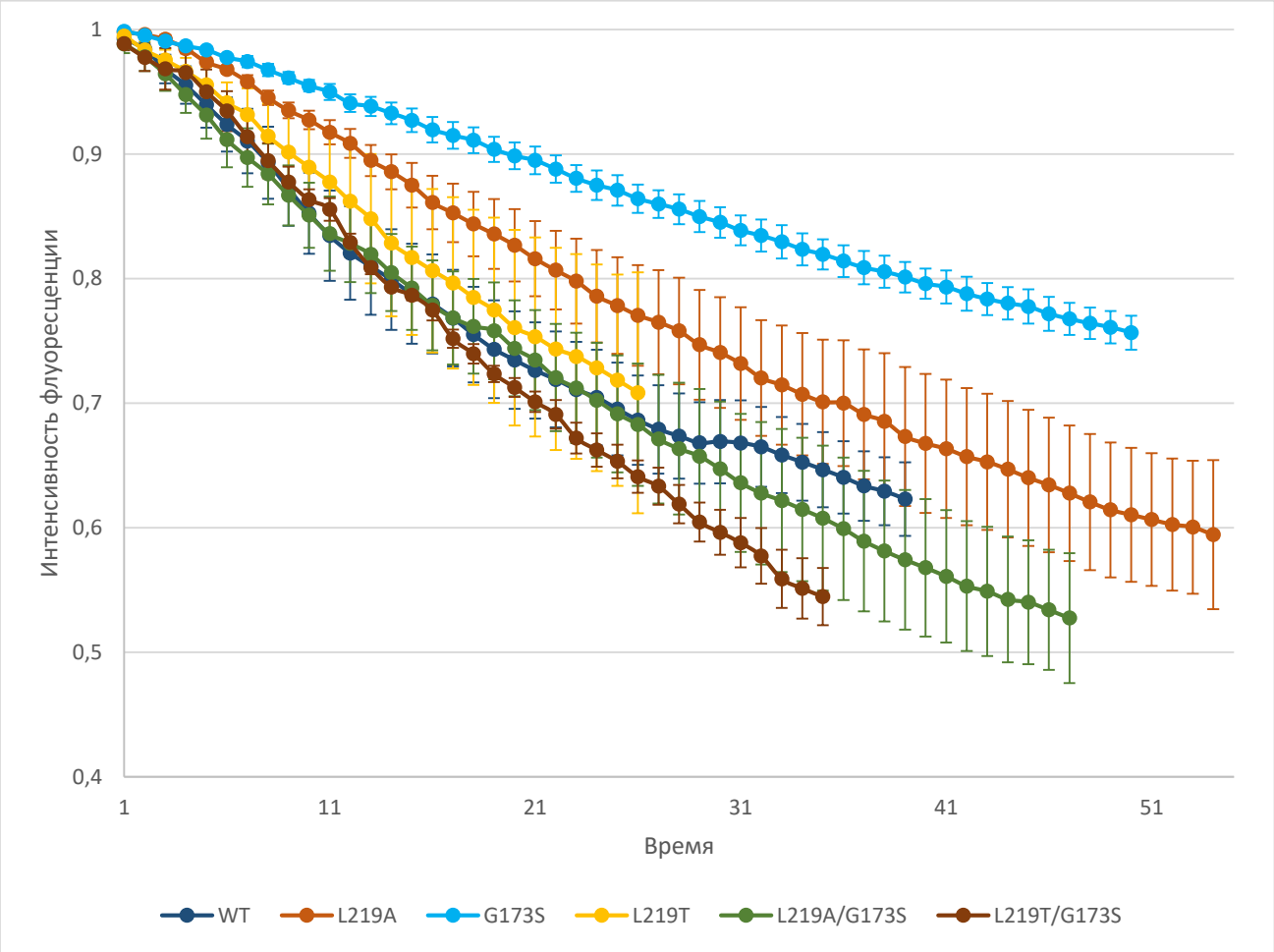

Рисунок 5.3.2.9 – Общий график зависимости интенсивности флуоресценции от времени

Данные были обработаны с помощью функции nls языка программирования R путем нелинейной регрессии с использованием экспоненциальной модели следующего вида$y = a \cdot e^{bx}$и полученные коэффициенты заносились в таблицу 5.3.2.1

Таблица 5.3.2.1

	a	(95% interval)	b	(95% interval)
WT	0.996741	(0.982551872; 1.010929928)	-1.30E-02	(-1.37E-02; -1.23E-02)
L219A	1.03	(1.02577816; 1.03422184)	-1.04E-02	(-1.06E-02; -1.03E-02)
G173S	1.01576	(1.01403794; 1.01748166)	-5.88E-03	(-5.95E-03; -5.82E-03)
L219T	1.03074	(1.025271896; 1.036208304)	-1.41E-02	(-1.44E-02; -1.37E-02)
L219A/G173S	1.003828	(0.998435452; 1.009220548)	-1.40E-02	(-1.43E-02; -1.38E-02)
L219T/G173S	1.043575	(1.037092892; 1.050057508)	-1.80E-02	(-1.83E-02; -1.76E-02)

6. Обсуждение полученных результатов

В процессе точечного мутагенеза нАХР α7-го подтипа было выяснено, что в процессе внесения мутации F209S происходит незапланированная дупликация участка «С»-петли. Эта дупликация возникает вследствие того, что участок гена α7 нАХР, кодирующий «С»-петлю, содержит повторяющиеся нуклеотидные последовательности, способствующие неправильному отжигу праймеров. Данное явление представляет достаточно большой интерес с точки зрения фундаментальных исследований эволюции рецептора. Действительно, «С»-петля играет важную роль в функционировании пЛУИК (см. Литературный обзор). При этом, участок гена, кодирующий эту эволюционно-значимую часть рецептора, сам является продуктом дупликации нуклеотидной последовательности, что приводит к повышенной нестабильности данного участка гена. В дальнейшей работе будут исследованы эволюционные аспекты структуры гена α7 нАХР и родственного ему α9 нАХР для дальнейшего уточнения знаний о принципах функционирования этих рецепторов.

При исследовании мышечного нАХР методом кальциевого имиджинга обнаружено, что в ответ на низкие концентрации ацетилхолина (10 мкМ) мутанты G173S, L219T и L219A проявляют повышенную активность в сравнении с мышечным нАХР дикого типа (WT). При этом комбинирование этих точечных мутаций вызывает неравнозначные эффекты. Так, присутствие в рецепторе одновременно замен L219A и G173S приводит к уменьшению чувствительности мутантного рецептора к низким концентрациям ацетилхолина до уровня рецептора дикого типа, несмотря на то, что в отдельности обе мутации повышают чувствительность рецептора к низким концентрациям ацетилхолина. Однако сочетание L219T и G173S не приводит к аналогичному уменьшению активности. Вместе с тем, в ответ на аппликацию высоких концентраций ацетилхолина (200 мкМ) единичные и двойные мутанты нАХР показывают различную степень активации. Введение мутации L219A приводит к уменьшению активации рецептора в ответ

на 200 мкМ ацетилхолина (в сравнении с максимально достижимыми уровнями активации этого рецептора в ответ на 100 мкМ ацетилхолина). При этом не имеет значения наличие или отсутствие в рецепторе замены G173S. Мутантные нАХР G173S, L219T и двойной мутант G173S/L219T показали ответы близкие к 100% при аппликации 200 мкМ, то есть они в этом отношении не отличаются значительно от нАХР дикого типа. Таким образом мутация L219A взаимодействует с мутацией G173S (вызывающей редкое генетическое заболевание — миастению медленных каналов), что приводит к уменьшению чувствительности двойного мутанта и к низким, и к слишком высоким концентрациям ацетилхолина. Такое взаимодействие двух мутаций, по одиночке повышающих чувствительность рецептора к ацетилхолину, может быть объяснено физическим взаимодействием соответствующих боковых цепей аминокислотных остатков. Это предположение подтверждается данными рентгеноструктурного анализа внеклеточного домена субъединицы α1 мнАХР.

Благодаря графикам, описывающим падение интенсивности флуоресценции во времени, было выявлено, что мнАХР с мутацией G173S десенситизируется медленнее, чем дикий тип (WT). Мутантные мнАХР L219A и L219T десенситизируются аналогично WT. Введение в мутантный G153S мнАХР мутаций L219T и L219A возвращает скорость десенситизации к нормальным значениям. Таким образом, мутации в положениях 173 и 219 функционально и топологически взаимосвязаны, что указывает на то, что они являются элементами одного пути проведения аллостерического сигнала в нАХР.

7. Экономическая часть

Научное исследование посвящено получению мутантного гена α7 нАХР крысы и расчету данных кальциевого имиджинга мутантных мышечных нАХР.

7.1. Организация и планирование работ по теме

В составе работ было задействовано 4 человека:

1. Руководитель выпускной квалификационной работы от университета, доцент кафедры ХТБАСМиОХ – вносит необходимые коррективы и оценивает выполненную работу в целом;

2. Консультант по специальной части ВКР, руководитель от предприятия, где производится ВКР, научный сотрудник лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий – отвечает за грамотную постановку задачи, контролирует отдельные этапы работы, отвечает за консультирование в области технической части проекта;

3. Студент 4-го курса бакалавриата (разработчик) – реализация всех поставленных задач, в том числе проведение основного эксперимента, необходимых расчетов и подготовка проектной документации.

Состав задействованных в работе участников представлен на рисунке 7.1.1.

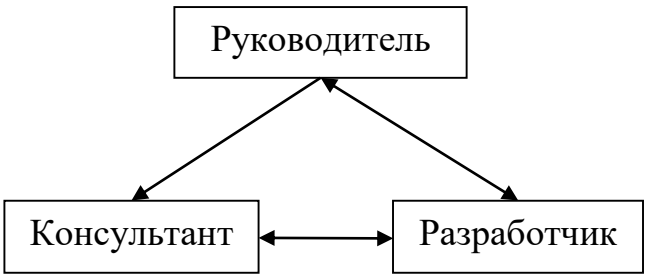

Рисунок 7.1.1 – Организационное взаимодействие

7.1.1. Организация работ

Общая продолжительность работ составила 74 дня. В Таблице 7.1.1 приведены основные этапы работ.

Таблица 7.1.1 – Организация работ

№	Название этапа	Исполнитель	Трудоемкость, чел/дни	Продолжительность работ, дни
1	**Разработка и утверждение задания**	Разработчик	**3**	**3**
		Руководитель	**3**	
		Консультант	**3**	
2	**Подбор методов исследования**	Руководитель	**5**	**5**
		Консультант	**5**	
3	**Подготовка материалов для исследования:**			**14**
3.1	Подбор праймеров	Разработчик	**1**	
3.2	Заказ праймеров и ожидание их доставки	Разработчик	**7**	
		Консультант	**1**	
3.3	Приготовление LB-среды	Разработчик	**1**	
3.4	Приготовление агаризованной LB-среды	Разработчик	**1**	

Продолжение Таблицы 7.1.1

3.5	Разработка структуры основного эксперимента	Разработчик	**1**	
		Руководитель	**3**	
		Консультант	**3**	
4	**Проведение основного эксперимента:**			**25**
4.1	Подбор условий и проведение ПЦР	Разработчик	**3**	
4.2	Проведение электрофореза	Разработчик	**1**	
4.3	Экстракция плазмидной ДНК из агарозного геля	Разработчик	**1**	
4.4	Трансформация и посев на чашку Петри	Разработчик	**1**	
4.5	Подбор условий для ПЦР-скрининга	Разработчик	**3**	
4.6	ПЦР-скрининг и наращивание в жидкой LB-среде	Разработчик	**1**	
4.7	Выделение плазмидной ДНК	Разработчик	**1**	

Продолжение таблицы 7.1.1

4.8	Заказ на секвенирование и ожидание результата	Разработчик	**7**	
		Консультант	**1**	
4.9	Проведение расчетов и проверка результата	Разработчик	**7**	
		Консультант	**2**	
5	**Оформление ВКР:**			**27**
5.1	Литературный обзор	Разработчик	**20**	
		Руководитель	**3**	
		Консультант	**3**	
5.2	Экспериментальная часть	Разработчик	**3**	
		Руководитель	**2**	
		Консультант	**2**	
5.3	Расчетная часть	Разработчик	**3**	
		Руководитель	**1**	
		Консультант	**1**	
5.4	Результаты и выводы	Разработчик	**1**	
		Консультант	**1**	
Итого дней:			**105**	**74**

7.1.2. График проведения работ

Календарный график исполнения работы представлен на рисунке 7.1.2. Из рисунка 7.1.2. также видно, что общий срок разработки составит 74 дня.

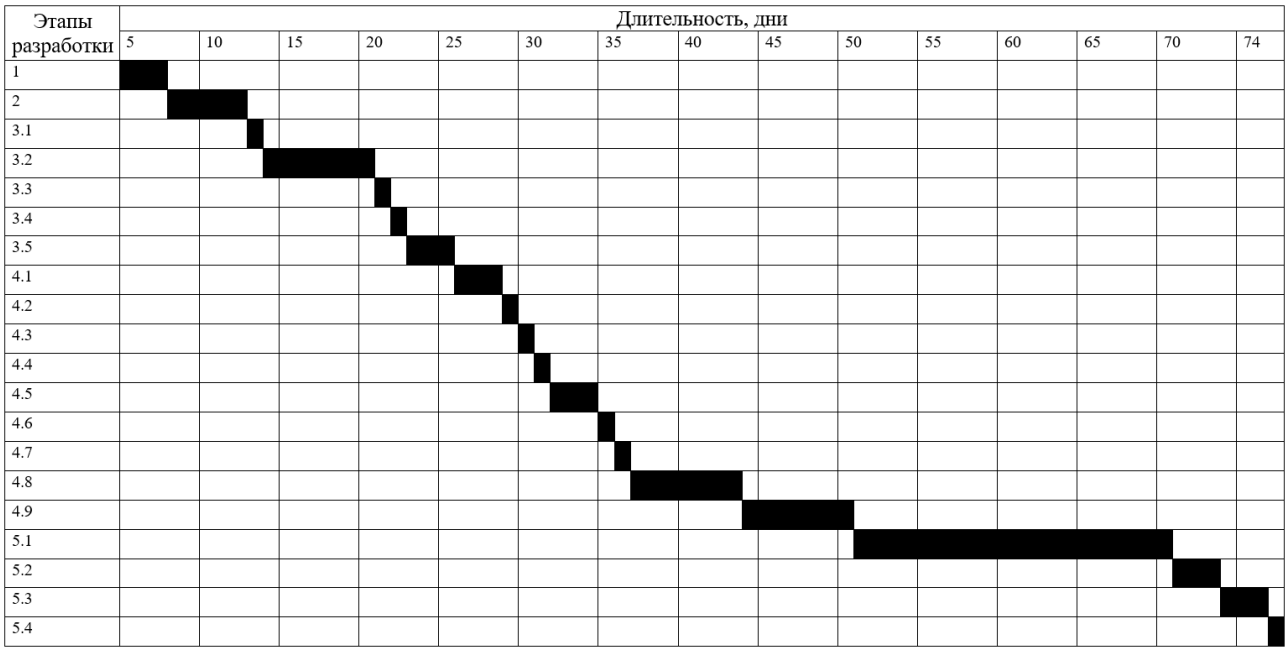

Рисунок 7.1.2 - Календарный график исполнения работы

7.2. Расчет стоимости проведения работ

В выпускной квалификационной работе объем затрат на НИР был проведен методом расчета стоимости конкретных материалов для каждого метода:

1. Материалы и покупные изделия;
2. Спецоборудование;
3. Основная заработная плата персонала;
4. Дополнительная заработная плата персонала;
5. Страховые отчисления;
6. Контрагентские услуги;
7. Командировки;
8. Накладные расходы;
9. Прочие расходы.

7.2.1. Затраты на материалы и покупные изделия

Таблица 7.2.1 – Затраты на материалы и реагенты

№	Наименование расходов	Единицы измерения	Количество	Цена за единицу, руб.	Сумма, руб.
1	Бумага А 4	пачка	1	175	175
2	Флешка 2Гб	шт	1	550	550
3	Картридж для принтера	шт	1	2350	2350
4	Карандаш	шт	5	7	35
5	Ручка	шт	5	15	75
6	Праймеры	пары	2	2000	8000
7	Комплект реактивов для проведения ПЦР (1)	шт	1	7300	7300
8	Комплект реактивов для проведения ПЦР (2)	шт	1	15000	15000
9	Комплект реактивов для проведения трансформации	шт	1	5000	5000
10	Комплект реактивов для проведения выделения ДНК	шт	1	3500	3500
11	Комплект реактивов для выделения и очистки ДНК из агарозного геля	шт	1	5000	5000
10	Наконечники, 10 мкл	упаковка	2	1 050	2100
11	Наконечники, 200 мкл	упаковка	2	500	1000
12	Наконечники, 1000 мкл	упаковка	1	6400	64000
13	50XTAE буфер	л	1	6200	6200
14	LB-среда	шт	1	8300	8300
15	Агар бактериологический	Упаковка (500 г)	1	17000	17000

Продолжение Таблицы 7.2.1

16	Маркер длин ДНК	шт	1	1300	1300
17	Буфер для нанесения образцов ДНК на агарозный гель	шт	1	2600	2600
18	Среда SOC	Упаковка (500 г)	1	3840	3840
19	Ампициллин	Упаковка (25 г)	1	3920	3920
20	Чашка Петри	шт	1	100	100
21	Микропробирки, 2 мл	Упаковка (500 шт)	1	1	1040
				Итого:	**100785**
				Транспортно-заготовительные расходы (15% от стоимости):	**15117,7**
				Итого:	**115902,7**

7.2.2. Расчет затрат на спецоборудование

Спецоборудование отсутствует, затрат нет.

7.2.3. Расчет основной заработной платы персонала

Расчеты основной заработной платы представлены в таблице 7.2.2.

Таблица 7.2.2 – Расчет основной заработной платы персонала

Должность	**Месячный оклад, руб**	**Оплата за день, руб**	**Длительность работы, дн.**	**Сумма зарплаты, руб**
Руководитель	70000	3181,8	17	**54090,6**
Консультант	60000	2727,3	22	**60000,6**
Разработчик	3000	136,4	66	**9002,4**
			Итого:	**123093,6**

Заработная плата составляет 123093,6 рублей.

7.2.4. Дополнительная заработная плата персонала

К данной статье расходов относятся выплаты, предусмотренные законодательством о труде за неотработанное по уважительным причинам время: оплата очередных и дополнительных отпусков; времени, связанного с выполнением государственных и общественных обязанностей; выплата вознаграждения за выслугу лет (составляет 25% от суммы основной заработной платы).

ДЗП = 123093,6 *0,25 = 30773,4 руб.

7.2.5. Страховые отчисления

Отчисления на социальные нужды составляют 30% от фонда оплаты труда (ФОТ), который состоит из основной и дополнительной заработной платы:

ФОТ = ОЗП + ДЗП = 123093,6 + 30773,4 = 153867 руб.

СО = ФОТ * 30% = 153867* 0,30 = 46160,1 руб.

7.2.6. Командировочные расходы

Расходы по данному разделу отсутствуют.

7.2.7. Контрагентские услуги

В процессе разработки данного проекта услуги сторонних организаций не использовались.

7.2.8. Накладные расходы

Накладные расходы – расходы на содержание и ремонт зданий, сооружений, оборудования и инвентаря, которые определяются процентом от суммы основной заработной платы научного и производственного персонала.

Сумма накладных расходов составляет 250% от основной заработной платы.

НР = ОЗП * 250% = 123093,6 * 2,5 = 307734 руб.

7.2.9. Прочие расходы

По данной статье расходов нет.

7.2.10. Полная себестоимость

Таблица 7.2.10 – Полная себестоимость

№ п/п	Наименование статей расходов	Затраты
1	Материалы и реагенты	115902,7
2	Спецоборудование	-
3	Основная заработная плата	123093,6
4	Дополнительная заработная плата	30773,4
5	Страховые отчисления	44002,8
6	Контрагентские услуги	-
7	Командировочные расходы	-
8	Накладные расходы	289756,7
9	Прочие расходы	-
	Итого	**623663,8**

Полная себестоимость исследования составляет 623663,8 руб.

Норма прибыли составляет 30% от стоимости разработки.

П = 623663,8 * 0,3 = 187099,14 руб.

Исследование ведется не для коммерческой организации, поэтому работа не облагается налогом на добавочную стоимость (НДС).

Таким образом, договорная цена будет представлять собой:

ДЦ = себестоимость + прибыль = 623663,8 + 187099,14 = 810762,94 руб.

8. Выводы

1. Была произведена мутация F209S в нАХР α7-го подтипа с мутацией L119D. В процессе внесения мутации F209S произошла незапланированная дупликация участка «С»-петли, что произошло вследствие наличия в «С»-петле повторяющихся нуклеотидных последовательностей.
2. Были обработаны данные кальциевого имиджинга мышечного нАХР дикого типа (WT) и мутантных рецепторов при аппликации агониста (ацетилхолина) в разных концентрациях. Исследование показало, что при низких концентрациях ацетилхолина (10 мкМ) мутанты G173S, L219T и L219A проявляют повышенную активность в сравнении с мышечным нАХР дикого типа (WT), а мутация L219A взаимодействует с мутацией G173S (вызывающей миастению), что приводит к уменьшению чувствительности двойного мутанта и к низким, и к слишком высоким концентрациям ацетилхолина. Благодаря графикам падения интенсивности флуоресценции во времени было выявлено, что мутации в положениях 173 и 219 мнАХР функционально и топологически взаимосвязаны.

9. Список использованных источников

1. Mariama, J., Evolution of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels: Pro-Loop Receptors / J. Mariama, T. Antoine, H. Jérôme // PLoS One – 2016. – Vol. 11, №3. – e0151934.
2. Corringer, P.J. et al. Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain / P-J Corringer, F. Poitevin, M. S. Prevost, L. Sauguet, M. Delarue, J-P. Changeux // Structure – 2012. Vol. 20, №6. – P. 41-56.
3. Edson, X. A. et al. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function / X. A. Edson, F. R. P. Edna, A. Manickavasagom, W. R. Scott / / Physiol Rev – 2009. – Vol. 89, №1. – P. 73-120.
4. Sine, S.M., End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease /S. M. Sine // Physiol Rev – 2012. – Vol. 92, №3. – P. 1189 –1234.
5. Corradi, J. B. W., Understanding the Bases of Function and Modulation of α7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery / J. B. W. Corradi, C. Bouzat // Mol Pharmacol – 2016. – Vol. 90, №3. – P. 288-99.
6. Paulo, J.A., Proteomic analysis of an alpha7 nicotinic acetylcholine receptor interactome / J.A. Paulo, W. J. Brucker, E. Hawrot // J Proteome Res – 2009. – Vol. 8, №4. – P. 1849–1858.
7. Jones, A.K., Proteins interacting with nicotinic acetylcholine receptors: expanding functional and therapeutic horizons / A.K. Jones, S. D. Buckingham, D. B. Sattelle // Trends Pharmacol Sci – 2010. – Vol. 31, №10. – P. 455–462.
8. King, J.R. et al. Identification and characterization of a G protein-binding cluster in α7 nicotinic acetylcholine receptors / J. R. King, J. C. Nordman, S. P. Bridges, M. Lin // J Biol Chem – 2015. – Vol. 290, №33. – P. 20060–20070.
9. Bouzat, C. et al. The interface between extracellular and transmembrane domains of homomeric Cys-loop receptors governs open-channel lifetime and

rate of desensitization / C. Bouzat, M. Bartos, J. Corradi, S. M. Sine // J Neurosci – 2008. – Vol. 28, №31 – P. 7808–7819.

10. Yan, H. et al. The coupling interface and pore domain codetermine the single-channel activity of the α7 nicotinic receptor / H. Yan, N. Pan, F. Xue, Y. Zheng, C. Li, Y. Chang, Z. Xu, H. Yang, J. Zhang / / Neuropharmacology – 2015. - Vol. 95. – P. 448–458.
11. Althoff, T. et al. X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors / T. Althoff, R. E. Hibbs, S. Banerjee, E. Gouaux // Nature – 2014. – Vol. 512, №7514 – P. 333–337.
12. Andersen, N. et al. Functional relationships between agonist binding sites and coupling regions of homomeric Cys-loop receptors / N. Andersen, J. Corradi, M. Bartos, S. M. Sine, C. Bouzat // J Neurosci – 2011. – Vol. 31, №10 – P. 3662–3669.
13. Guan, Z.Z. et al. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease / Z. Z. Guan, X. Zhang, R. Ravid, A. Nordberg // J Neurochem – 2000. – Vol. 74, №1 – P. 237–243.
14. Dineley, K.T. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders / K. T. Dineley, A. A.Pandya, J. L. Yakel // Trends Pharmacol Sci – 2015. – Vol. 36, №2 – P. 96–108.
15. Shelukhina, I. et al. Calcium imaging with genetically encoded sensor Case12: Facile analysis of α7/α9 nAChR mutants / I. Shelukhina, E. Spirova, D. Kudryavtsev, L. Ojomoko, M. Werner, C. Methfessel, M. Hollmann, V. Tsetlin // PLoS One – 2017. – Vol. 12, №8 – e0181936.
16. Hone, A.J. α9-containing nicotinic acetylcholine receptors and the modulation of pain / A. J. Hone, D. Servent, J. M. Mcintosh // Br J Pharmacol – 2018. – Vol. 175, №11 – P. 1915-1927.

17. Nevin, S.T. et al. Are alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors a pain target for alpha-conotoxins? / S. T. Nevin, R. J. Clark, H. Klimis, M. J. Christie, D. J. Craik, D. J. Adams // Mol Pharmacol – 2007. – Vol. 72, №6 – P. 1406-1410.
18. Simard A.R., et al. Differential modulation of EAE by α9*- and β2*-nicotinic acetylcholine receptors / A. R. Simard, S. St-Pierre, A. Kousari, V. Patel, P. Whiteaker, B. J. Morley, R. J. Lukas, F-D. Shi // Immunol Cell Biol – 2013. – Vol. 91, №3 – P. 195-200.
19. Hughes, B.W. Molecular architecture of the neuromuscular junction. / B. W. Hughes, L. L. Kusner, H. J. Kaminski // Muscle Nerve – 2006. – Vol. 33, №4 – P. 445–461.
20. Wells, G.B. Structural answers and persistent questions about how nicotinic receptors work / G. B. Wells // Front Biosci – 2008. – Vol. 13 – P. 5479-510.
21. Unwin, N. Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4 A˚ Resolution / N. Unwin // J Mol Biol – 2005. – Vol. 346, №4 – P. 967-89.
22. Albuquerque, E.X. et al. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function / E. X. Albuquerque, E. F. R. Pereira, M. Alkondon, S. W. Rogers // Physiol Rev – 2009. – Vol. 9, №1 – P. 73-120.
23. Lindstrom, J.M. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology / J. M. Lindstrom // Ann N Y Acad Sci – 2003. – Vol. 998 – P. 41–52.
24. Karlin, A. Functional domains of the nicotinic acetylcholine receptor / A. Karlin, R. N. Cox, M. Dipaola, E. Holtzman, P. N. Kao, P. Lobel, L. Wang, N. Yodh // Ann NY Acad Sci – 1986 – Vol. 463 – P. 53–69.
25. Kuryatov, A. et al. Mutation causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy alters Ca^{2+} permeability, conductance, gating of human α4β2 nicotinic acetylcholine receptors / A. Kuryatov, V. Gerzanich, M. Nelson, F. Olale, J. Lindstrom // J Neurosci – 1997 – Vol. 17, №23 – P. 9035–9047.

26. Lester, H.A. et al. Hypersensitive knockin mouse strains identify receptors and pathways for nicotine action / H. A. Lester, C. Fonck, A. R. Tapper, S. McKinney, M. I. Damaj, S. Balogh, J. Owens, J. M. Wehner, A. C. Collins, C. Labarca / / Curr Opin Drug Discov Dev – 2003 – Vol. 6, №5 – P. 633–639.
27. Bruses, J.L. et al. Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (α)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons / J. L. Bruses, N. Chauvet, U. Rutishauser // J Neurosci – 2001 – Vol. 21 – P. 504–512.
28. Zhu, D. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering / D. Zhu, W. C. Xiong, L. Mei // J Neurosci – 2006 – Vol. 26, №18 – P. 4841–4851.
29. Shen, J-x., Yakel, J.L., Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system / J-x. Shen, J. L. Yakel // Acta Pharmacol Sin – 2009 – Vol. 30, №6 – P. 673–80.
30. Papke, R.L. et al. alpha7 receptor-selective agonists and modes of alpha7 receptor activation / R. L. Papke, E. Meyer, T. Nutter, V. V. Uteshev // Eur J Pharmacol – 2000 – Vol. 393, №1–3 – P. 179–95.
31. Lendvai, B. et al. α7 nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition / B. Lendvai, F. Kassai, A. Szájli, Z. Némethy // Brain Res Bull – 2013 – Vol. 93 – P. 86–96.
32. Shytle, R.D. et al. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors / R. D. Shytle, T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A. A. Silver, P. R. Sanberg, J. Tan // J Neurochem – 2004 – Vol. 89, №2 – P. 337–343.
33. Sinkus, M.L. The human CHRNA7 and CHRFAM7A genes: A review of the genetics, regulation, and function / M. L. Sinkus, S. L. Graw, R. Freedman, R. G. Ross, S. Leonard // Neuropharmacology – Vol. 96 – P. 274–288.

34. Martelli, D. et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review / D. Martelli, M. J. McKinley, R. M. McAllen // Auton Neurosci – 2014 – Vol. 182 – P. 65–69.
35. Jonge, W.J. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation / W. J. Jonge, L. Ulloa // Br J Pharmacol – 2007 – Vol. 151, №7 – P. 915–929.
36. Báez-Pagán, C.A. Activation of the macrophage α7 nicotinic acetylcholine receptor and control of inflammation / C. A. Báez-Pagán, M. Delgado-Vélez, J. A. Lasalde-Dominicci // J Neuroimmune Pharmacol – 2015 – Vol. 10, №3 – P. 468–476.
37. Egea, J. et al. Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection / J. Egea, I. Buendia, E. D. Parada, E. Navarro, R. León, M. G. López // Biochem Pharmacol – 2015 – Vol. 97, №4 – P. 463–472.
38. Hone, A.J. α9-containing nicotinic acetylcholine receptors and the modulation of pain / A.J. Hone, D. Servent, J.M. McIntosh // Br J Pharmacol – 2018 – Vol. 175, №11 – P. 1915 – 1927.
39. Fucile, S. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors / S. Fucile // Cell Calcium. 2004. **35**(1): p. 1-8.
40. Grassi, F. Calcium in fl ux through muscle nAChR-channels: One route, multiple roles / F. Grassi, S. Fucile // Neuroscince – 2019 – S0306-4522(19)30251-9.
41. Entwistle, A. et al. The control of chick myoblast fusion by ion channels operated by prostaglandins and acetylcholine / A. Entwistle, R. J. Zalin, S. Bevan, A. Warner // J Cell Biol – 1988 – Vol. 106 – P.1693-1702.
42. Constantin, B. Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels / Constantin, B., Cognard, C., Raymond, G. // Cell Calcium – 1996 – Vol. 19 - №5 – P. 365-374.
43. Allard, B. et al. Intracellular Ca^{2+} changes and Ca^{2+}-activated K^{+} channel activation induced by acetylcholine at the endplate of mouse skeletal muscle

fibres / B. Allard, J. C. Bernengo, O. Rougier, V. Jacquemond // J Physiol – 1996 – Vol. 494 – P. 337-349.

44. Young, K.A. Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin / K.A. Young, J.H. Caldwell // J Physiol – 2005 – Vol. 565 – P. 349-370.

45. Biswas, S. Mechanisms of a human skeletal myotonia produced by mutation in the C-terminus of NaV1.4: is Ca^{2+} regulation defective? / S. Biswas, D. A. DiSilvestre, P. Dong, G. F. Tomaselli // PLoS One – 2013 – 8e81063.

46. Otero-Cruz, J., D. et al. Decoding Pathogenesis of Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndromes using Recombinant Expression and Mice Models / J. D. Otero-Cruz, C. A. Báez-Pagán, L. Dorna-Pérez, G. E. Grajales-Reyes, R. T. Ramírez-Ordoñez, C. A. Luciano, C. M. Gomez, J. A. Lasalde-Dominicci // P R Health Sci J – 2010 – Vol. 29, №1 – P. 4–17.

47. Engel, A.G., Congenital myasthenic syndromes / A. G. Engel // Handb Clin Neurol – 2008 – Vol. 91 – P. 285-331.

48. National Center for Biotechnology [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/, свободный – (18.05.20)

49. Agilent [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.chem.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp, свободный – (18.05.20)

50. Zheng L, Baumann U, Reymond JL., *An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol*. Nucleic acids research. 2004. **32**(14): e115.

51. National Center for Biotechnology [Электронный ресурс]. – Режим доступа:https://https.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/,свободный – (18.05.20)

52. National Center for Biotechnology [Электронный ресурс]. – Режим доступа:https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#AAB25224,свободный – (18.05.20)