

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДИНА

Успенська Катерина Романівна

УДК [577.29]:[612.014.46]

МЕХАНІЗМИ СИГНАЛЮВАННЯ ТА БІОЛОГІЧНА РОЛЬ НІКОТИНОВИХ
АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У МІТОХОНДРІЯХ

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної Академії Наук України

Науковий керівник: академік НАН України, доктор біологічних наук, професор, старший науковий співробітник
Скок Марина Володимирівна,
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
завідувач лабораторії імунології клітинних рецепторів

Офіційні опоненти: член-кор. НАН України, доктор біологічних наук, професор, старший науковий співробітник
Стойка Ростислав Степанович,
Інститут біології клітини НАН України, завідувач
відділу регуляції проліферації клітин та апоптозу

кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник **Лушнікова Ірина Василівна,**
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
пров.н.с. відділу цитології

Захист дисертації відбудеться «11» лютого 2019 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий « » січня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Н. П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) є ліганд-залежними іонними каналами. За класичними уявленнями, вважалось, що вони експресуються виключно на зовнішній мембрані збудливих клітин, де беруть участь у передачі сигналів у нервово-м'язових або нервових синапсах. Проте пізніше nAChR були ідентифіковані на багатьох інших, незбудливих клітинах (епітеліальних, кератиноцитах, лімфоцитах, астроцитах, гепатоцитах), де вони регулюють життєво необхідні клітинні функції: виживання, рухливість, адгезію, міграцію тощо [Grando et al., 1995, Chernyavsky et al., 2007, Resende & Adhikari, 2009]. Дослідженнями лабораторії імунології клітинних рецепторів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України було показано, що $\alpha 7\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ та $\alpha 4\beta 2$ субтипи nAChR експресуються у зовнішній мембрані мітохондрій і регулюють процес вивільнення цитохрому *c* під дією різних апоптогенних чинників, що є ключовим етапом мітохондрійного шляху апоптозу [Gergalova et al., 2012]. Було з'ясовано, що активація мітохондрійного nAChR не потребує відкриття його іонного каналу. Натомість, зв'язування як агоністів, так і антагоністів призводить до модуляції активності внутрішньомітохондрійних кіназ, задіяних у регуляції проникності зовнішньої мембрани мітохондрій [Gergalova et al., 2014]. Проте залишалось багато питань, пов'язаних з біосинтезом, функціонуванням та біологічною роллю nAChR у мітохондріях. Зокрема, не було зрозумілим, що є сигналом для направлення новосинтезованих nAChR до мітохондрій, чи відрізняються сигнальні функції різних субодиниць nAChR та як реагують мітохондрійні nAChR на вживання нікотину, запальні процеси або пошкодження, які потребують підвищеної виживаності клітин. Ці питання стали предметом досліджень дисертаційної роботи і визначають її актуальність.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України протягом 2014–2018 рр. у рамках планових досліджень за бюджетною темою: «Вивчення структури і функцій протеїнів і пептидів та їх використання для біомедицини» (ДР№ 0114U003216, 2014-2018рр.). Частину роботи було виконано на базі лабораторії Інтегративної нейробиології холінергічних систем відділу нейронаук Інституту Пастера (Париж, Франція) за підтримки короткотермінової стипендії для країн Центральної та Східної Європи від Федерації Європейських біохімічних товариств (ФЕБС). Роботу було підтримано також стипендією Президента України для молодих вчених (2016-2018рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було встановити сигнали направлення nAChR до мітохондрій, механізми сигналювання та біологічну роль nAChR у мітохондріях.

Відповідно до мети було сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити вуглеводний склад мітохондрійних nAChR як один із сигналів їх спрямування до мітохондрій.

2. З'ясувати вплив нікотину на характер глікозилування, вміст і функціонування мітохондрійних nAHR.

3. Встановити механізм сигналювання $\alpha7\beta2^*$ та $\alpha3\beta4^*$ субтипів nAHR у мітохондріях.

4. Оцінити внесок різних субтипів nAHR в регуляцію мітохондрійного шляху апоптозу.

5. Визначити роль мітохондрійних nAHR печінки при пошкодженні в результаті часткової гепатектомії.

6. Визначити вплив нейрозапалення на мітохондрійні nAHR мозку.

7. Визначити вплив аміксину та агматину на стан мітохондрій.

Об'єкт дослідження: мітохондрії печінки та мозку мишей лінії C57Bl/6, мишей, нокаутних за генами $\alpha7^{-/-}$, $\alpha3^{-/+}$, $\alpha7\beta2^{-/-}$, $\beta4^{-/-}$ субодиниць nAHR, а також щурів лінії Вістар.

Предмет дослідження: направлення, сигналювання та біологічна роль nAHR у мітохондріях.

Методи дослідження: препаративна біохімія, Сендвіч-ІФА, Сендвіч-лектин-ІФА, ДСН-електрофорез, поведінковий тест розпізнавання нового об'єкту, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що сигналювання мітохондрійних nAHR за іон-незалежним механізмом ініціюється конформаційними змінами молекули рецептора, причому різні субодиниці стимулюють активацію різних сигнальних шляхів, що визначає доцільність експресії гетеромерних nAHR в мітохондріях. Вперше показано відмінність вуглеводного складу nAHR плазматичної мембрани та мітохондрій, що може бути одним із сигналів для направлення nAHR у різні компартменти клітини. Було показано, що вживання нікотину, посилюючи глікозилування nAHR, сприяє їх направленню до мітохондрій, але при цьому перешкоджає зв'язуванню специфічних лігандів. Вперше показано участь nAHR у підтриманні виживання клітин печінки після часткової гепатектомії та патогенний вплив нейрозапалення на експресію та функціонування мітохондрійних nAHR мозку. Отримані результати є важливими для розуміння функціонування нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях.

Практичне значення роботи. У роботі показано, що рівень експресії та склад мітохондрійних nAHR визначає стійкість мітохондрій до дії апоптогенних чинників. Відповідно, при нейрозапаленні, що супроводжується зниженням кількості мітохондрійних nAHR, мітохондрії мозку стають більш уразливими до апоптогенного впливу, а при частковій гепатектомії, навпаки, експресія мітохондрійних nAHR підвищується і підвищує апоптогенну стійкість мітохондрій печінки. Таким чином, активація мітохондрійних nAHR сприяє виживаності клітин за критичних умов. Визначення ефективності алостеричних модуляторів для активації nAHR у мітохондріях може бути основою для пошуку нових терапевтичних підходів для підтримки життєздатності клітин при нейродегенеративних

захворюваннях та інших патологіях, що супроводжуються активацією процесів апоптозу.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, виконане автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і проведених протягом 2014 – 2018 рр. Постановка наукових задач, аналіз та інтерпретація одержаних результатів, підготовка до друку публікацій проводились у співпраці з науковим керівником – академіком НАН України, д.б.н. М.В. Скок. Дисертантом особисто здійснено пошук і аналіз даних літератури, проведено значну частину досліджень і аналіз отриманих даних, сформульовано основні положення та висновки. Дослідження з використанням ДСН-електрофорезу та функціональні тести на стійкість мітохондрій до апоптогенних чинників автором виконано самостійно; експерименти з імуноферментного аналізу та поведінкового тесту виконано спільно зі ст.н.с. відділу молекулярної імунології, к.б.н. О. Ю. Лихмус. Проведення операцій з часткової гепатектомії та лапаротомії виконано завідувачкою відділу системної біології Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, д.б.н. М. Ю. Оболенською. Нокаутних мишей було надано доктором У. Маскосом з Інституту Пастера (Париж, Франція). Проведення експериментів з введення N-стероїлетаноламіну виконано спільно з співробітниками відділу біохімії ліпідів к.б.н. Г. В. Косяковою та к.б.н. Т. М. Горідько Молекулярний докінг-аналіз проведений у лабораторії доктора Х. Аріаса (Аргентина).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на XI з'їзді Українського біохімічного товариства (Київ, Україна, 2014), XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms (Марсель, Франція, 2016), Конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2016 та 2018), Конференції молодих учених відділення біології та біохімії НАН України (Київ, Україна, 2017), 41-му та 42-му Конгресі ФЕБС та 17-ому Форумі молодих вчених (Кушидасі, Турція, 2016; Єрусалим, Ізраїль, 2017), Літній школі з клітинної біоенергетики (Львів, Україна, 2017), Німецько-українському форумі молодих вчених (Київ-Львів, Україна, 2017), міжнародній конференції “Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017” (Крит, Греція, 2017), міжнародній конференції “XI Parnas Conference” (Київ, Україна, 2018), 15-ому Міжнародному симпозиумі аспірантів “Horizons in Molecular Biology” (Геттінген, Німеччина, 2018), а також доповідались на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та відділу молекулярної імунології.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць, з яких 8 статей, з них 7 у міжнародних періодичних фахових наукових виданнях, і 9 тез доповідей у збірках вітчизняних та міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 163 сторінках машинописного тексту. Дисертація складається з таких розділів: «Вступ», «Огляд літератури» (2 підрозділи), «Матеріали і методи

досліджень» (13 підрозділів), «Результати та їх обговорення» (3 підрозділи), «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки», «Список використаних джерел» (271 посилань). Роботу проілюстровано 43 рисунками та 5 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури.

В огляді літератури проаналізовано сучасні дані про структуру та функціонування nAHR плазматичної мембрани; приділено увагу впливу агоністів, антагоністів та алостеричних модуляторів nAHR на функціонування рецептора; узагальнено дані про участь nAHR у розвитку патологій нервової системи та узагальнено найновіші дані про склад та особливості функціонування nAHR у мітохондріях.

Матеріали та методи дослідження.

Дослідження проводили на мишах лінії C57Bl/6, переважно самицях, віком 2-4 місяці, як дикого типу, так і нокаутних за генами $\alpha 7$, $\alpha 3$, $\alpha 7\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниць nAHR, а також на щурах лінії Вістар.

Фракцію мітохондрій та фракцію, збіднену на мітохондрії (не-мітохондрійна фракція), одержували з мозку або печінки методом диференційного центрифугування [Gergalova et al., 2012]. Чистоту одержаних фракцій характеризували методом Сендвіч-імуноферментного аналізу (Сендвіч-ІФА) з використанням антитіл, специфічних до протеїнів, характерних для мітохондрій (VDAC), ендоплазматичного ретикулуму (IRE-1 α) або ядер (ядерний ламін 1B). Концентрацію протеїну у мітохондрійній та не-мітохондрійній фракціях та їх лізатах визначали за допомогою комерційного набору BSA Protein Assay kit (Thermo Scientific, США).

Для дослідження субодиничного складу nAHR фракцію мітохондрій та не-мітохондрійну фракцію заморожували при -20°C , розморожували та інкубували у буфері для лізису (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.14 M NaCl; 0.025% NaN₃; 1% Tween-20 та коктейль інгібіторів протеаз) протягом 2 годин при 4°C , після чого центрифугували 20 хв при 20,000 x g. У планшети для Сендвіч-ІФА (Nunc Maxiorb, Данія) вносили $\alpha 7(1-208)$ -специфічні антитіла (30 мкг/мл при 4°C , на ніч). Блокували 1% BSA/PBS (1 год, 37°C). Після цього детергентні лізати досліджуваних препаратів (по 50 мкл, 100мкг протеїну/мл) вносили у лунки (2 год, 37°C). Планшети промивали водою та вносили біотинільовані $\alpha 3(181-192)$ -, $\alpha 4(181-192)$ -, $\alpha 7(179-190)$ -, $\alpha 9(11-23)$ -, $\alpha 10(404-417)$ -, $\beta 2(190-200)$ або $\beta 4(190-200)$ -специфічні антитіла (2 год, 37°C). Зв'язані антитіла проявляли кон'югатом стрептавідину з пероксидазою хрому і хромогенним субстратом *o*-фенилендіаміном. Оптичну густину визначали при довжині хвилі 490 нм (ОГ_{490нм}) (Stat-Fax2100 Microplate reader, Awarness Technology, FL, США).

Склад вуглеводного компоненту визначали методом Сендвіч-ІФА, де в лунки планшету адсорбували $\alpha 7(179-190)$ -специфічні антитіла (30 мкг/мл при 4°C , на ніч) з подальшим блокуванням вільних місць зв'язування 1% BSA/PBS (1 год, 37°C). Детергентні лізати досліджуваних препаратів

додатково були оброблені 2% ДСН для відділення інших субодиноць або приєднаних протеїнів і додавались у лунки по 50 мкл, 70 мкг протеїну/мл (2 год, 37 °С). Планшети промивали водою та вносили біотинільовані лектини: лектин із *Laburnum anagroids* (LABA), специфічний до залишків фукози; лектин із *Sambucus nigra* (SNA), специфічний до сіалових кислот; лектин арахісу (PNA), специфічний до галактози; аглютинін із зародков пшениці (WGA), специфічний до N-ацетилглюкозаміну; та лектин із квасолі (*Lens culinaris*), специфічний до залишків манози. Зв'язані лектини проявляли кон'югатом стрептавідину з пероксидазою хрому і хромогенним субстратом *o*-фенилендіаміном. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 490 нм. Дані вмісту вуглеводних залишків нормалізували за вмістом $\alpha 7$ НАХР у зразках, що визначали методом Сендвіч-ІФА з використанням $\alpha 7$ -специфічних антитіл.

Для дослідження у функціональному тесті мітохондрії, що виділялися безпосередньо перед дослідом (у буфері: 10mM HEPES, 0,1mM Pi(K), pH 7,4; 125mM KCl, 25mM NaCl, 5mM сукцинату натрію), інкубували 5 хв з різними апоптогенними чинниками (Ca^{2+} , H_2O_2 , вортманіном) за кімнатної температури. Агоністи, антагоністи або алостеричні модулятори НАХР додавали за 2-3 хв до додавання апоптогенних чинників. Після цього препарат центрифугували 10 хв при 7000 x g (4°C). У надосаді досліджували вміст цитохрому *c* (Цит С) методом Сендвіч-ІФА з використанням небіотинільованих (30мкг/мл) та біотинільованих поліклональних антитіл кроля проти Цит С. Надосад мітохондрій вносили без розведення по 50мкл на лунку. Утворений Сендвіч виявляли за допомогою кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому. Пероксидазну активність визначали за допомогою буферу, що містив *o*-фенилендіамін, як описано вище.

Для вивчення впливу нікотину на мітохондрії печінки *in vivo* тварини з дослідної групи вживали нікотин, розведений у воді (200 мкл/л) *ad libitum* протягом 7 днів. Контрольна група тварин вживала чисту питну воду. Через 7 днів мишей виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації, вилучали печінку, і мітохондрії печінки досліджували як описано вище.

Для вивчення ролі мітохондрійних НАХР в процесі пошкодження і регенерації печінки самці щурів лінії Вістар (200–250г) були прооперовані під анестезією ефіром згідно стандартних процедур [Higgins and Anderson, 1931; Tannuri et al., 2007]. Одній групі тварин було проведено операцію часткової гепатектомії (ЧГЕ), другій – операцію лапаротомії. Під час ЧГЕ медіальна та ліва бокова частина печінки були відрізані та в подальшому використані як контроль для порівняння з печінкою, що регенерує. Під час лапаротомії жодних частин печінки не було вилучено, а після розтину черевна порожнина була зашита так само, як і під час операції ЧГЕ. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під анестезією ефіром через 3, 6, 12 та 24 години після операції, виділяли мітохондрії печінки та не-мітохондрійну фракцію і досліджували їх як описано вище.

Вплив гострого запалення на мітохондрійні НАХР мозку вивчали у мишей лінії C57Bl/6, яким вводили внутрішньочеревно бактерійний

ліпополісахарид (ЛПС) (*E.coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) у дозі 1,7 мг/кг у 0 та 2 день експерименту. Контрольна група тварин залишалась інтактною. На третій день експерименту тварин виводили з експерименту; мозок виймали та використовували для виділення і аналізу мітохондрій, як описано вище. Для індукції хронічного запалення мишам ЛПС вводили внутрішньочеревно, двічі, з інтервалом у 4 тижні. Миші з однієї з груп отримували N-стероїлетаноламін (NSE) у дозі 50мг/кг: 50мкл розчину вводили тваринам *per os* протягом 9 днів: 4 дні до та 5 днів після введення ЛПС.

До початку експерименту з хронічного запалення і після його закінчення мишей тестували у поведінковому тесті «Розпізнання нового об'єкту», який є відображенням стану їх епізодичної пам'яті. У цьому тесті, мишей попередньо поміщали у замкнений простір з двома однаковими об'єктами і давали можливість ретельно їх дослідити протягом 10 хвилин (ознайомча сесія). Після перерви (10 хвилин) один з об'єктів заміняли на новий, що мав подібні розміри, але відрізнявся за формою, кольором та матеріалом, і фіксували кількість досліджень нового і старого об'єктів 10 хвилин (тестова сесія). Стан епізодичної пам'яті характеризувався за індексом дискримінації (ІД), що розраховувався як відношення різниці у кількості досліджень твариною нового та старого об'єктів у тестовій сесії до сумарної кількості досліджень обох однакових об'єктів в ознайомчій сесії. Після проведення поведінкових тестів мишей виводили з експерименту, вилучали мозок і досліджували мітохондрії мозку, як описано вище.

Статистичні розрахунки (обчислення середніх значень та стандартної похибки, статистичний аналіз достовірності відмінності величин всіх описаних експериментів за стандартним критерієм t-тесту Ст'юдента, Mann-Whitney або One-way ANOVA та побудову графіків здійснювали в режимі програмного забезпечення Origin Pro 9.0. Всі результати експериментів виражені як значення \pm стандартна похибка. Значення при $p < 0.05$ розглядались як достовірні.

Результати досліджень та їх обговорення.

Дослідження вуглеводного компоненту nAHR плазматичної мембрани та мітохондрій. Нікотинові рецептори є глікопротеїдами; різні вуглеводні залишки приєднуються до позаклітинної частини субодиниць nAHR в ендоплазматичному ретикулюмі та комплексі Гольджі. Для з'ясування шляхів пост-трансляційних модифікацій мітохондрійних nAHR ми порівняли вуглеводні залишки $\alpha 7$ субодиниці nAHR, що експресовані у плазматичній мембрані або у мітохондріях мозку щурів.

Мітохондрійні $\alpha 7$ nAHR не відрізнялися від nAHR плазматичної мембрани за вмістом N-ацетилглюкозаміну та галактози. Натомість, вміст сіалових кислот та фукози був вищий, а манози - нижчий у $\alpha 7$ nAHR мітохондрій порівняно з $\alpha 7$ nAHR плазматичної мембрани (рис. 1).

Ці дані дозволили нам зробити важливий висновок: мітохондрійні nAHR, подібно до nAHR плазматичної мембрани, проходять пост-трансляційні модифікації в апараті Гольджі, де до протеїнової компоненти рецептора прикріплюються залишки фукози та сіалових кислот. Саме

додаткове сіалування та фукозилування може бути сигналом для направлення молекул новосинтезованого nAHR до мітохондрій, а не до плазматичної мембрани.

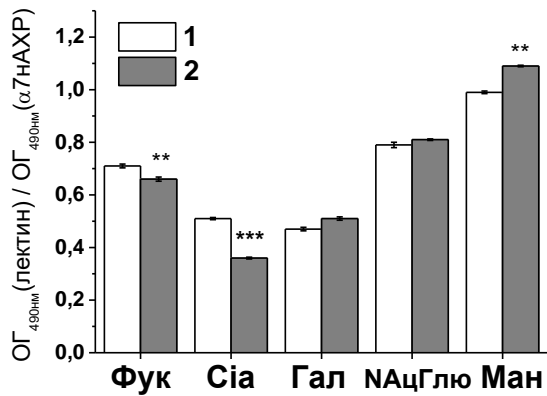


Рис. 1. Склад вуглеводного компоненту, зв'язаного з $\alpha 7$ субодиницею nAHR із мітохондрій (1) та плазматичної мембрани (2) мозку щурів.

Фуко – залишки фукози, Сіа – залишки сіалових кислот, Гал – залишки галактози, NAцГлю – N-зв'язаний ацетилглюкозамін, Ман – залишки манози.

** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.0005$ у порівнянні з $\alpha 7$ nAHR мітохондрій.

Дослідження впливу нікотину на субодиничний та вуглеводний склад і функціонування nAHR у мітохондріях печінки. Відомо, що нікотин, завдяки своїй ліпофільній природі, легко проникає через мембрани клітин і в якості внутрішньоклітинного «шаперону» сприяє збиранню окремих субодиниць рецептора у пентамер, фолдингу та дозріванню nAHR в процесі біосинтезу [Salette at al., 2005], а також посилює глікозилування протеїнів.

Ми показали, що, за однакової кількості внесеного протеїну, у мітохондрійній фракції печінки мишей, які вживали нікотин, було більше $\alpha 4$, $\alpha 10$ та $\beta 2$ субодиниць nAHR, а у не-мітохондрійній – менше усіх субодиниць nAHR порівняно з відповідними фракціями мишей з контрольної групи (рис. 2А-Б). У середньому, співвідношення сигналів оптичної густини для мітохондрійних та не-мітохондрійних субодиниць nAHR становило $0,78 \pm 0,06$ в групі контрольних тварин та $1,09 \pm 0,08$ у тварин, що вживали нікотин ($p = 0.008$; $n = 5$), тобто вживання нікотину сприяло перерозподілу внутрішньоклітинних nAHR, особливо підтипу $\alpha 4\beta 2$, на користь мітохондрій.

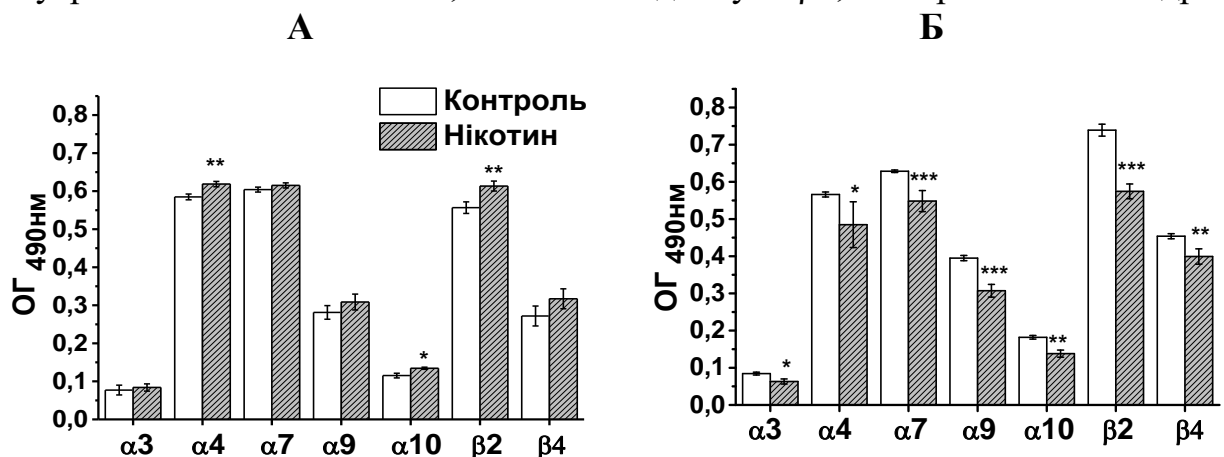


Рис. 2. Субодиничний вміст nAHR у мітохондрійній (А) та не-мітохондрійній (Б) фракціях печінки мишей, що вживали нікотин (Нікотин), та мишей контрольної групи (Контроль), ($n = 5$ для кожної групи) * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$, та *** - $p < 0.0005$ порівняно з Контролем.

Вживання нікотину сприяло фукозилуванню мітохондрійних і сіалуванню не-мітохондрійних $\alpha 7$ субодиниць (рис.3)

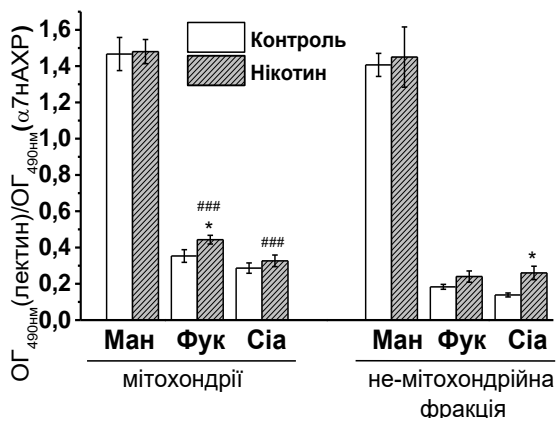


Рис 3. Вміст вуглеводних залишків, зв'язаних з $\alpha 7$ субодиницею nAChR з мітохондрійної та не-мітохондрійної фракції печінки мишей, що вживали нікотин (Нікотин), та мишей контрольної групи (Контроль), ($n = 5$ для кожної групи). * - $p < 0.05$ порівняно з препаратом печінки контрольних мишей, *** - $p < 0.0005$ порівняно з не-мітохондрійною фракцією.

У функціональному тесті мітохондрії печінки контрольних мишей та тих, що вживали нікотин, вивільняли майже однакову кількість цитохрому с (Цит С) під дією Ca^{2+} (рис. 4, А). Проте в мітохондріях мишей, що вживали нікотин, вивільнення Цит С пригнічувалось $\alpha 7$ -специфічними агоністом (PNU-282987) або позитивним алостеричним модулятором (PNU-120596) менш ефективно порівняно з мітохондріями контрольних мишей (Рис. 4, В-Г).

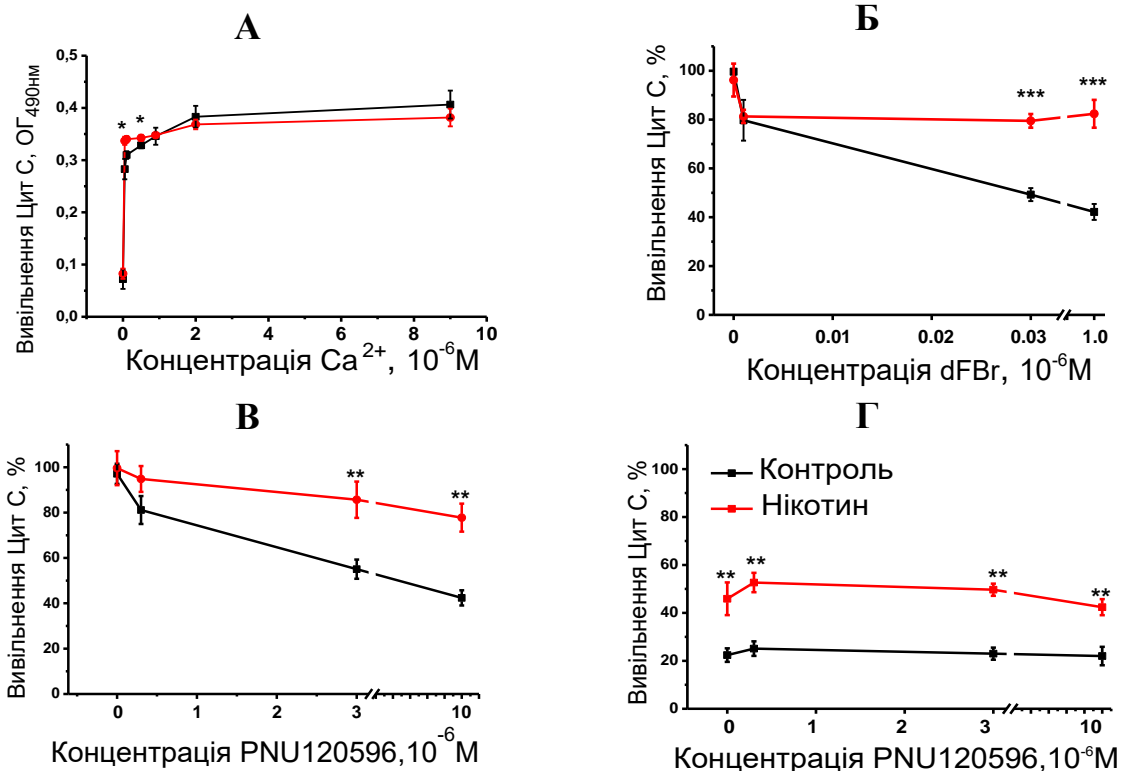


Рис. 4. Вивільнення цитохрому с (Цит С) з мітохондрій печінки контрольних мишей (Контроль) та мишей, що вживали нікотин (Нікотин), під дією Ca^{2+} (А), у присутності dFBr під дією вортманіну (Б), під дією Ca^{2+} у присутності PNU120596 (В) або PNU120596 + PNU-282987(Г). $n = 5$ для кожної групи, * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$ порівняно з контролем. За 100% прийнято рівень вивільнення Цит С без дії жодних чинників.

Крім того, вивільнення Цит С, стимульоване вортманіном, менш

ефективно пригнічувалось $\beta 2$ -специфічним позитивним алостеричним модулятором (dFBr) у порівнянні з мітохондріями контрольних мишей (Рис. 4, Б). Отримані дані свідчать про те, що вживання нікотину збільшувало глікозилювання $\alpha 7$ nAХР та сприяло посиленому направленню nAХР печінки до мітохондрій, однак робило nAХР мітохондрій менш чутливими до дії специфічних агоністів та алостеричних модуляторів.

Механізм сигналювання $\alpha 7\beta 2^*$ nAХР у мітохондріях. Сигналювання мітохондрійних nAХР є іон-незалежним і визначається конформаційними змінами в молекулі пентаметру за зв'язування специфічних лігандів. Ми використали панель $\alpha 7$ -специфічних позитивних алостеричних модуляторів (ПАМів), зв'язування яких змінює конформацію nAХР, не відкриваючи іонний канал, щоб з'ясувати, зв'язування яких сайтів мітохондрійних nAХР є необхідним (достатнім) для індукції їх сигналювання. Було показано, що ПАМи II типу, PNU-120596 та 4BP-TQS, які, за даними докінг-аналізу, зв'язуються в трансмембранній частині nAХР, ефективно пригнічували вивільнення Цит С (рис. 5, А, Б), а ПАМ I типу NS-1738, який зв'язується у надклітинній частині nAХР, не впливав на виділення Цит С, однак, на відміну від PNU-120596 та 4BP-TQS, запобігав ефекту PNU282987 (рис. 5, В). Таким чином, саме зв'язування сайту у трансмембранному домені $\alpha 7$ субодиниці викликає конформаційні зміни, достатні для сигналювання мітохондрійних $\alpha 7$ -вмісних nAХР.

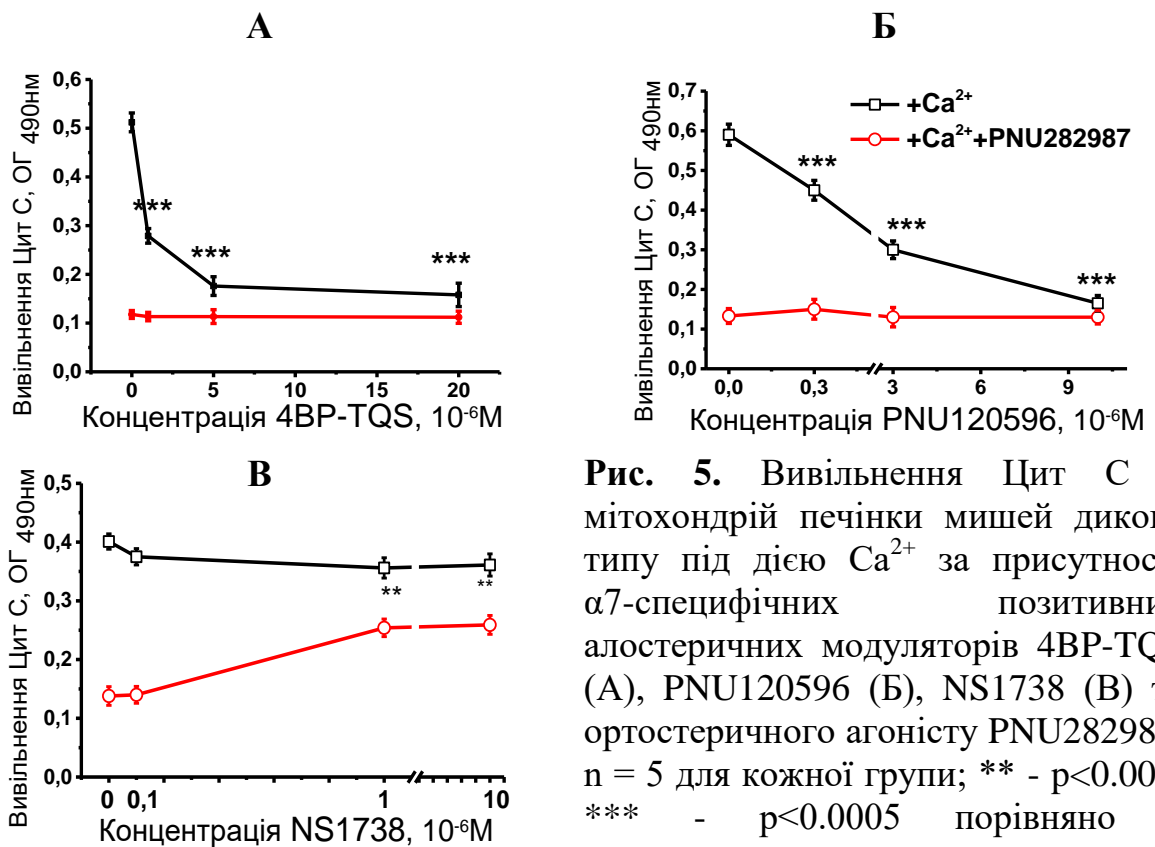


Рис. 5. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки мишей дикого типу під дією Ca^{2+} за присутності $\alpha 7$ -специфічних позитивних алостеричних модуляторів 4BP-TQS (А), PNU120596 (Б), NS1738 (В) та ортостеричного агоністу PNU282987. $n = 5$ для кожної групи; ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.0005$ порівняно з контролем.

На відміну від $\alpha 7$ -специфічних ПАМів, які захищали мітохондрії переважно від дії Ca^{2+} , $\beta 2$ -специфічний dFBr, був ефективним переважно проти вортманіну. Зважаючи на те, що Ca^{2+} діє на мітохондрії через СаКМІІ

кіназу, а вортманін є інгібітором PI_3 -кінази, ці дані означали, що dFBr впливав переважно на PI_3 -кіназний шлях сигналювання, а PNU-120596 - на СаКМІІ-залежний шлях. Відповідно, ми вважаємо, що $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниці пов'язані з двома різними (тобто СаКМІІ- і PI_3 К-залежними) внутрішньомітохондрійними сигнальними шляхами. Тому стимуляція гетерогенних $\alpha 7\beta 2$ нАХР запускає обидва шляхи і є більш ефективною порівняно з дією гомомерних $\alpha 7$ нАХР.

Механізм сигналювання $\alpha 3\beta 4^*$ нАХР у мітохондріях. Для з'ясування механізму сигналювання $\alpha 3\beta 4^*$ мітохондрійних нАХР ми дослідили вплив (\pm)-18-метоксикоронаридину ((\pm)-18-МС) та (+)-катарантину, неконкурентних антагоністів $\alpha 3\beta 4$ нАХР, на вивільнення Цит С із ізольованих мітохондрій мозку і печінки за дії апоптогенних чинників різної природи – Ca^{2+} або H_2O_2 . Попередньо було показано, що рівень $\alpha 3\beta 4^*$ нАХР є вищим у мітохондріях печінки порівняно з мозком і значно зростає в мітохондріях $\alpha 7^{-/-}$ мишей.

Таблиця 1.

Фармакологічна активність похідних коронаридину на мітохондрійні нАХР.

Миші	Мітохондрії	Похідні коронаридину	IC ₅₀ (мкМ)	
			Ca ²⁺	H ₂ O ₂
Дикий тип	Печінка	(\pm)-18-МС	4,6 \pm 0,4	2,4 \pm 0,2
		(+)-катарантин	25,0 \pm 1,0	29,3 \pm 5,5
	Мозок	(\pm)-18-МС	Не було ефекту	2,0 \pm 0,2
		(+)-катарантин		
$\alpha 7^{-/-}$	Печінка	(\pm)-18-МС	3,1 \pm 0,9	4,2 \pm 0,3
		(+)-катарантин	25,0 \pm 1,0	23,7 \pm 1,5
	Мозок	(\pm)-18-МС	2,9 \pm 0,6	>>5

Згідно із даними, представленими в Таблиці 1, (\pm)-18-МС пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій у 10 разів ефективніше, ніж (+)-катарантин. В мітохондріях мишей дикого типу він впливав переважно за дії H_2O_2 , а в мітохондріях $\alpha 7^{-/-}$ мишей - також і за дії Ca^{2+} . На відміну, (+)-катарантин ефективніше впливав на вивільнення Цит С під дією Ca^{2+} , ніж під дією H_2O_2 . За даними молекулярного докінгу, (\pm)-18-МС зв'язується у трансмембранному сайті між $\alpha 3$ та $\beta 4$ субодиницями, а (+)-катарантин – у сайті між двома $\beta 4$ субодиницями. Отримані нами дані свідчать про те, що зв'язування ліганду у сайті між двома різними субодиницями є більш потужним сигналом, і викликані ним конформаційні зміни достатні для впливу на внутрішньомітохондрійний Src-залежний шлях сигналювання (активованій H_2O_2), тоді як зв'язування у $\beta 4/\beta 4$ -сайті активує переважно (і менш ефективно) СаКМІІ-залежний шлях. Крім того, різна активність (\pm)-18МС в мітохондріях мишей дикого типу і $\alpha 7^{-/-}$ означає, що $\alpha 3\beta 4^*$ нАХР, за звичай пов'язаний з Src-кіназою, за відсутності $\alpha 7$ нАХР компенсує його вплив на СаКМІІ кіназу.

Таким чином, гетеромерна природа мітохондрійних нАХР забезпечує ефективний захист від апоптогенних чинників різного походження.

Відсутність $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниць нАХР не критично впливає на чутливість мітохондрій до дії Ca^{2+} . Ми дослідили, як впливає відсутність окремих субодиниць нАХР на чутливість мітохондрій до Ca^{2+} та лігандів, специфічних до різних субтипів нАХР, на моделі нокаутних мишей, які не експресували $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниці або містили знижену кількість $\alpha 3$ субодиниць (гетерозиготи). Було показано, що, загалом, відсутність окремих субодиниць не критично впливала на стійкість мітохондрій до Ca^{2+} , однак мітохондрії $\alpha 7^{-/-}$ і $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ мишей були більш чутливими до низьких (0,1 – 0,5 мкМ), але більш стійкими до високих доз Ca^{2+} (0,9 – 9,0 мкМ) у порівнянні з мітохондріями мишей дикого типу (рис. 6).

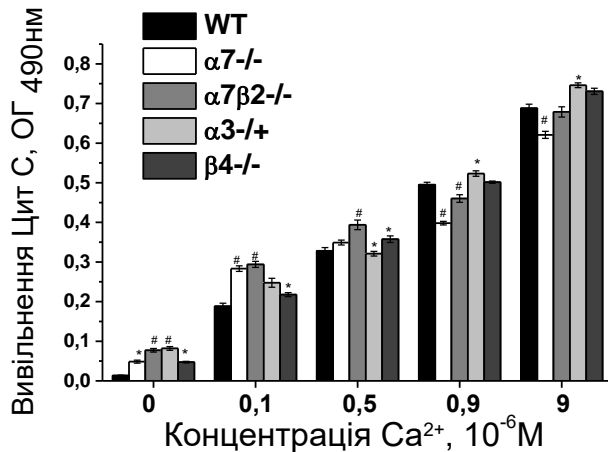


Рис. 6. Вивільнення Цит С із мітохондрій печінки мишей дикого типу (WT) та нокаутних ($\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$, $\alpha 3^{-/-}$, $\beta 4^{-/-}$) при дії різних концентрацій іонів Ca^{2+} . Кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка (n=5); * - $p < 0.05$; # - $p < 0.0005$ порівняно з диким типом.

Мітохондрії $\alpha 7^{-/-}$, $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ та $\alpha 3^{-/-}$ нокаутних мишей містять підвищену кількість $\alpha 9$ та $\beta 4$ субодиниць нАХР⁺. Було показано, що відсутність $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниць нАХР компенсується підвищенням $\alpha 9$ та/або $\beta 4$ субодиниць в мітохондріях печінки (рис. 7, А). Додаткові дослідження показали, що ці дві субодиниці можуть входити до складу гетеромерного рецептору $\alpha 9\beta 4$, а також підвищувати рівень $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 4$ и $\alpha 9\alpha 10$ нАХР (рис. 7, Б).

Відповідно, α -комотоксин ReIA, специфічний до $\alpha 9$ -вмісних нАХР, пригнічував вивільнення Цит С з мітохондрій під дією Ca^{2+} та, меншою мірою, під дією 0,5 мМ H_2O_2 , і його дія за присутності Ca^{2+} була більш вираженою у мітохондріях $\alpha 7^{-/-}$ нокаутних мишей порівняно з мітохондріями мишей дикого типу (рис. 8).

Таким чином, $\alpha 9$ -вмісні нАХР могли функціонально заміщати $\alpha 7$ -вмісні нАХР у $\alpha 7^{-/-}$ та $\alpha 7\beta 2^{-/-}$ мишей, сприяючи стійкості їх мітохондрій до дії Ca^{2+} .

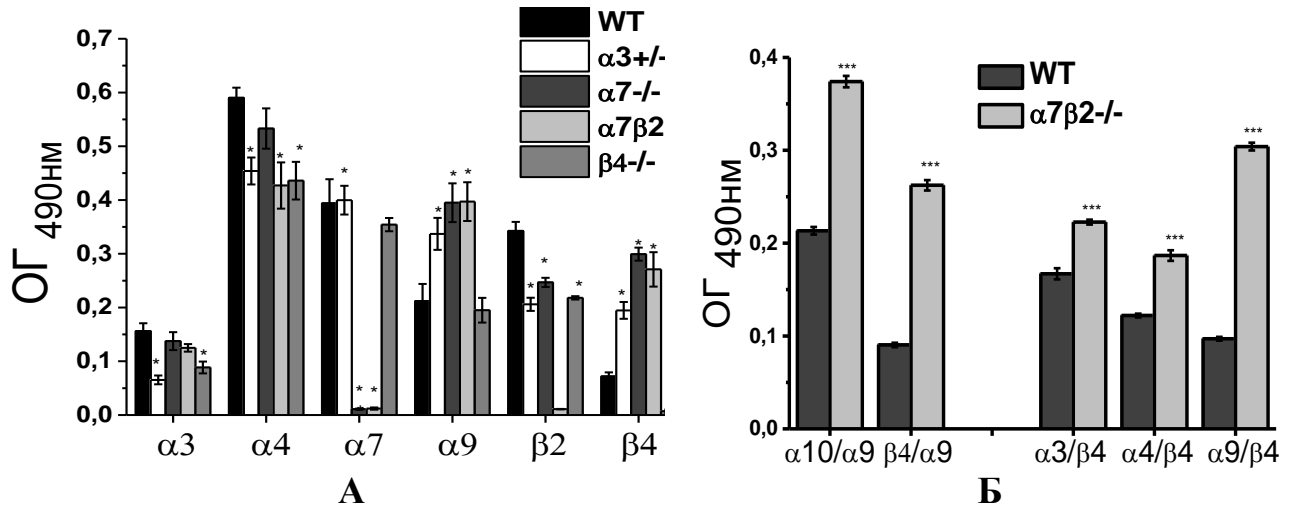


Рис. 7. А - Вміст $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниць у мишей дикого типу та нокаутних мишей. Б - Вміст гетеромерних субтипів nAChR у мітохондріях печінки мишей дикого типу та $\alpha 7\beta 2^{-/-}$. Кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка ($n=5$). * - $p < 0.05$, *** - $p < 0.0005$ порівняно з диким типом.

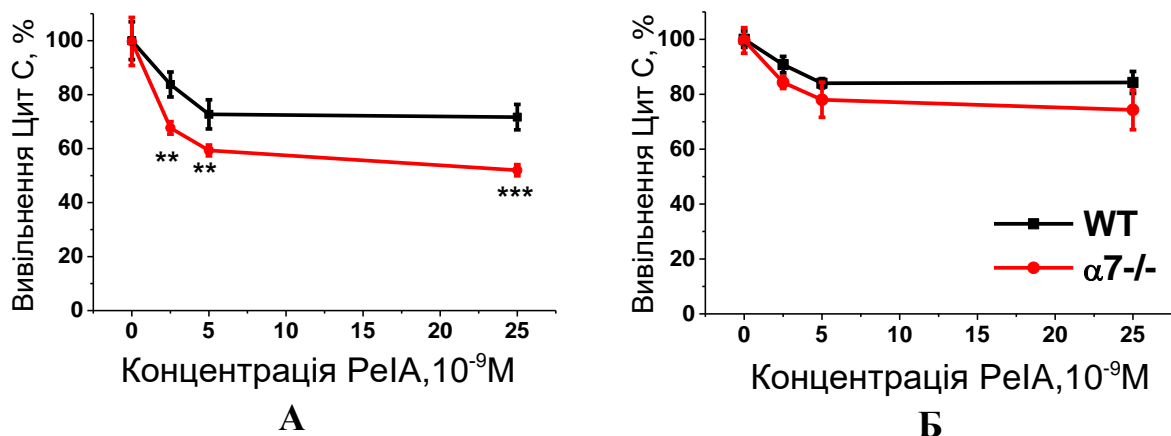


Рис. 8. Вплив α -конотоксину ReIA на вивільнення Цит С під дією $9\mu\text{M}$ Ca^{2+} (А) або $0,5\text{ mM}$ H_2O_2 (Б). ** - $p < 0.005$; *** - $p < 0.0005$ порівняно з диким типом.

Мітохондрійні nAChR підтримують життєздатність клітин печінки після часткової гепатектомії. Операція часткової гепатектомії (ЧГЕ) – це визнана експериментальна модель регенерації печінки з добре визначеними подіями, які розвиваються після оперативного втручання. Зокрема, відомо, що в перші години після ЧГЕ клітини частини печінки, що залишилися, максимально життєздатні, тобто захищені від апоптозу. Приймаючи до уваги роль мітохондрійних nAChR в регуляції апоптозу, ми вивчили субодиничний склад мітохондрійних nAChR печінки в різні строки після ЧГЕ.

Було виявлено, що через 3 години після ЧГЕ у мітохондріях печінки підвищувався вміст $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ та $\beta 2$ субодиниць nAChR (рис. 9, А). Після лапаротомії вміст всіх субодиниць, крім $\alpha 9$, значно знизився, і відновлення рівнів $\alpha 4$, $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниць спостерігалось тільки на 12 годину після операційного втручання. (рис. 9, Б).

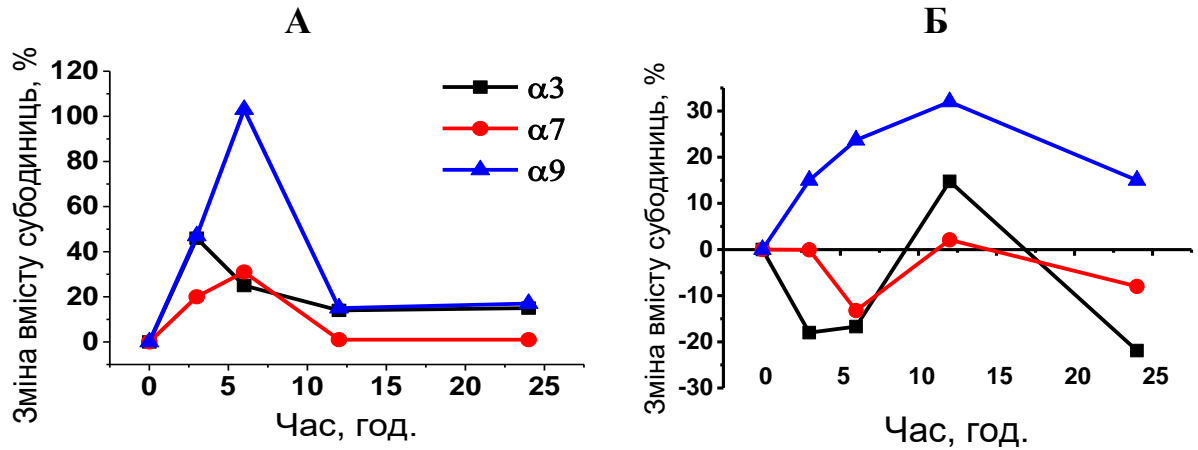


Рис. 9. Зміни вмісту субодиниць НАХР (у %, порівняно з видаленою частиною год.) у мітохондріях після часткової гепатектомії (А) та лапаротомії (Б).

Відповідно до даних функціонального тесту, через 3 та 6 годин після ЧГЕ мітохондрії печінки, вивільнювали менше Цит С при дії Ca^{2+} або H_2O_2 порівняно з доопераційним рівнем (рис. 10, А). Таким чином, підвищення рівнів $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$ та $\alpha 9\alpha 10$ субтипів НАХР супроводжувалось збільшенням стійкості мітохондрій печінки до апоптогенних стимулів. Натомість, мітохондрії печінки щурів, яким була проведена лапаротомія, вивільняли більше Цит С у порівнянні з мітохондріями неоперованих тварин (рис. 10, Б), тобто зниження кількості мітохондрійних НАХР супроводжувалось зменшенням стійкості мітохондрій до апоптогенного впливу. При цьому підвищення $\alpha 9$ -вмісних НАХР не компенсувало дефіциту інших субтипів НАХР.

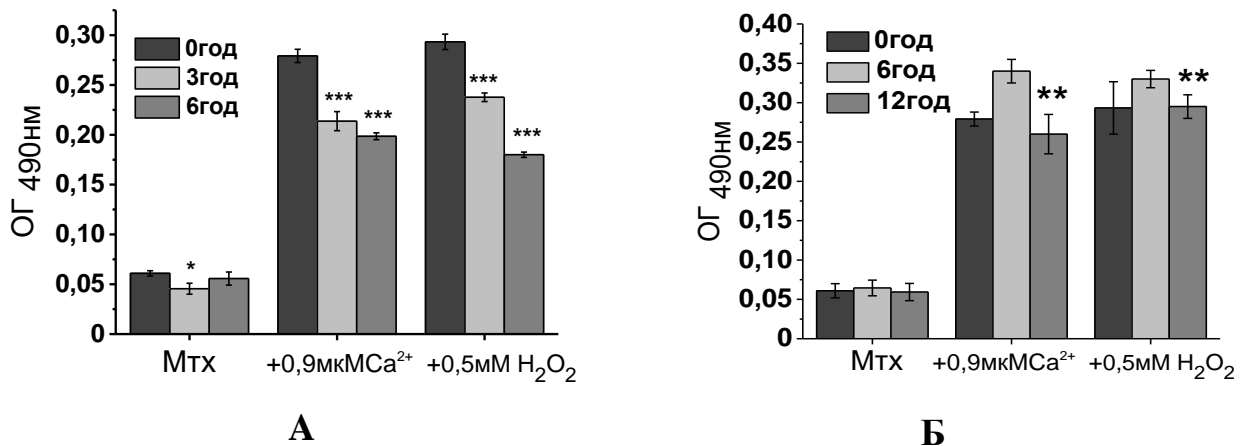


Рис. 10. Вивільнення Цит С з мітохондрій печінки щурів після частковою гепатектомії (А) або лапаротомії (Б) під дією Ca^{2+} або H_2O_2 . Кожний стовпчик відповідає середньому значенню вимірювань \pm стандартна похибка, $n = 3$. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,0005$ - порівняно з мітохондріями печінки, видаленої під час операції, 0 год.

Отримані дані свідчать про те, що мітохондрійні НАХР вкрай важливі під час фази ініціації регенерації печінки, сприяючи виживанню клітин, але не під час фази проліферації, що відбувається пізніше.

Дослідження впливу запалення на мітохондрійні nAХР мозку.

Відомо, що nAХР $\alpha 7$ субтипу, локалізовані в плазматичній мембрані імунних клітин, регулюють запальні процеси в різних тканинах, включаючи головний мозок [Terrado et al., 2015]. В дисертаційній роботі ми вивчали вплив ЛПС на мітохондрії мозку на моделі гострого запалення. Було виявлено, що введення ЛПС протягом 3-х днів знижувало рівень $\alpha 7$ субодиниць nAХР як в мітохондрійній, так і в не-мітохондрійній фракціях мозку (рис. 11). При цьому компенсаторно підвищувались рівні $\alpha 3$ та $\beta 4$ субодиниць. В експериментах, проведених в лабораторії проф. Х. Сорек, було з'ясовано, що при цьому знижувався рівень мРНК $\alpha 7$ субодиниці, тобто зміни відбувались на рівні експресії гену $\alpha 7$.

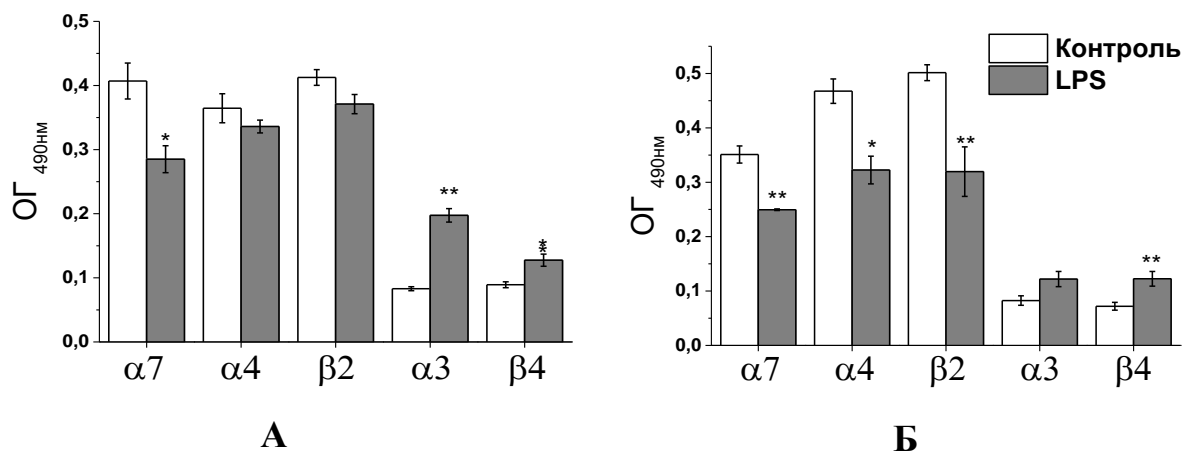


Рис 11. Рівень $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниць nAХР у не-мітохондрійній фракції (А) та фракції мітохондрій (Б) мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) у порівнянні з контрольною групою тварин (Контроль). *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.005$ у порівнянні з контролем.

У функціональному тесті, мітохондрії, виділені з мозку мишей, яким вводили ЛПС, вивільняли незначний рівень Цит С навіть без дії Ca^{2+} , що відображає їх нестабільний (перед-апоптотичний) стан. Вони також вивільняли більше Цит С при дії $0,9\text{мкМ}$ і $9,0\text{мкМ}$ Ca^{2+} і ставали менш чутливими до впливу $\alpha 7$ -специфічного агоніста PNU282987, ніж мітохондрії контрольних тварин (рис.12).

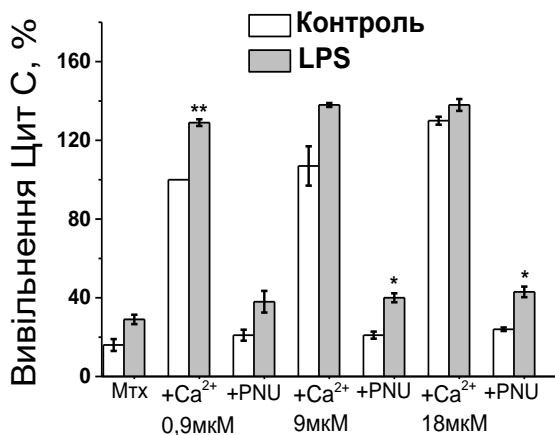


Рис. 12. Вивільнення Цит С з мітохондрій мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) у порівнянні з контрольними мишами при дії Ca^{2+} або Ca^{2+} +PNU282987. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.005$ у порівнянні з контролем.

Отримані нами дані показують, що мітохондрійні nAХР швидко реагують на стимули запалення, що робить мітохондрії менш стійкими до апоптогенного впливу і сприяє розвитку патологічних процесів в мозку.

В наступній серії експериментів ми вивчали, чи можна поліпшити стан мітохондрій, порушений запаленням. Як фармакологічний препарат було обрано N-стеароїлетаноламін (NSE), природний компонент мембран клітин ссавців, який стабілізує клітинні мембрани та впливає на активність різних іонних каналів, в тому числі $\alpha 7$ nAHP [Oz, 2006]. Було показано, що двократне введення ЛПС протягом місяця суттєво погіршувало епізодичну пам'ять мишей: індекс дискримінації (DI) в тесті «Розпізнавання нового об'єкту» знизився майже у 5 разів (рис. 13), а вживання NSE запобігало погіршенню пам'яті за дії ЛПС.

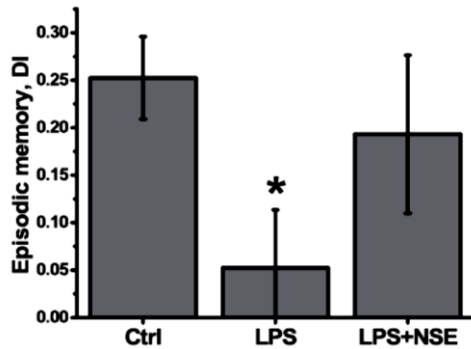


Рис. 13. Вплив N-стеароїлетаноламіну (NSE) на епізодичну пам'ять мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) або ЛПС та NSE (LPS + NSE) DI – дискримінантний індекс. Кожна колонка відповідає середньому значенню \pm стандартна похибка. * - $p < 0.05$ порівняно з інтактною групою мишей (Ctrl).

Введення ЛПС дещо знижувало рівень $\alpha 7$ nAHP в мітохондріях мозку мишей і сприяло накопиченню в них патогенної форми $A\beta(1-42)$, а вживання NSE запобігало обом процесам (рис. 14).

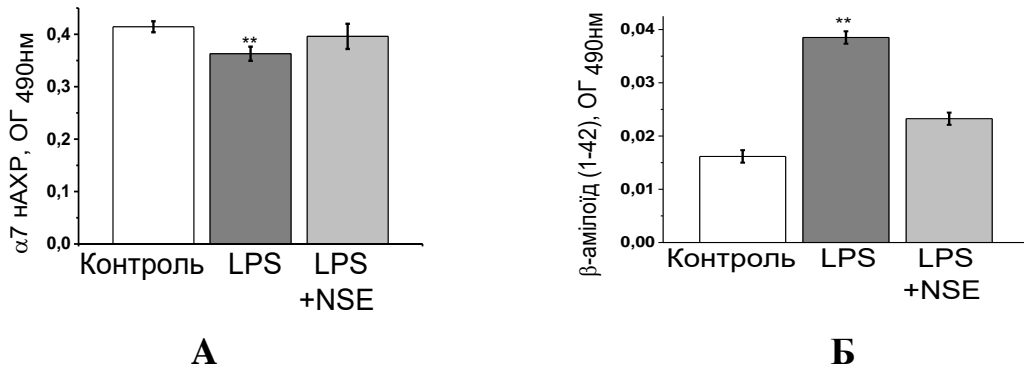


Рис. 14. Вплив N-стеароїлетаноламіну (NSE) на рівень $\alpha 7$ nAHP (А) та β -амілоїду (1-42) (Б) у мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) або ЛПС та NSE (LPS + NSE). ** - $p < 0.005$ у порівнянні з Контролем.

У функціональному тесті мітохондрії мозку мишей, що отримували ЛПС, вивільняли значно більше Цит С як самі по собі, так і у відповідь на $0,9 \text{ мкМ Ca}^{2+}$, і гірше відповідали на $\alpha 7$ -специфічний агоніст PNU282987, ніж мітохондрії контрольних мишей. Вживання NSE запобігало погіршенню стану мітохондрій мозку і, фактично, повертало їх до стану контрольних (рис. 15). Таким чином, препарат NSE поліпшував когнітивний стан мишей за дії ЛПС, в тому числі, стабілізуючи мітохондрії мозку.

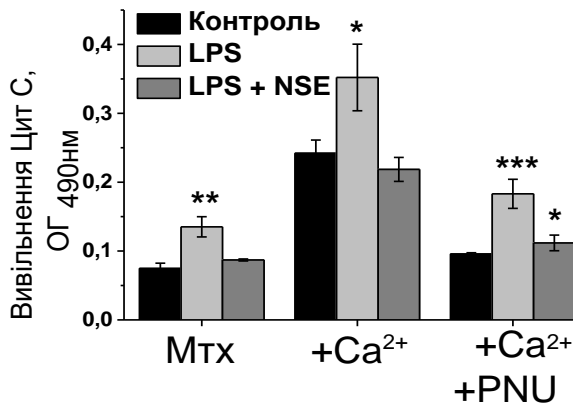


Рис. 15. Вплив N-стероїлетаноламіну (NSE) на вивільнення Цит С з мітохондрій мозку мишей, яким вводили ліпополісахарид (LPS) або ЛПС та NSE (LPS + NSE), при дії Ca^{2+} у присутності чи відсутності PNU282987 (PNU) * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.005$ у порівнянні з Контролем.

Дослідження впливу аміксину і агматину на вивільнення цитохрому с під дією Ca^{2+} з мітохондрій. Аміксин (тілорон) та агматин широко використовуються у фармакології, в тому числі в якості протизапальних препаратів. Було показано їх деяку спорідненість до $\alpha 7$ нАХР. Тому ми поставили завдання дослідити вплив аміксину і агматину на нАХР мітохондрій. Як аміксин, так і агматин чинили слабкий проти-апоптичний ефект, знижуючи кількість Цит С, вивільненого із мітохондрій мозку і печінки під дією Ca^{2+} , але запобігаючи дії агоністу $\alpha 7$ нАХР PNU282987. Ці дані свідчили про те, що аміксин і агматин зв'язуються з $\alpha 7$ нАХР поблизу сайту зв'язування ортостеричного агоністу і здатні впливати на мітохондрійні нАХР, викликаючи певні конформаційні зміни в його молекулі. Таким чином, розглядаючи фармакологічні ефекти аміксину і агматину, слід брати до уваги їх стабілізуючий вплив на мітохондрії.

ВИСНОВКИ

Робота присвячена дослідженню будови, механізмів сигналювання та біологічної ролі нікотинних ацетилхолінових рецепторів, локалізованих у мітохондріях. В результаті проведених досліджень показано, що склад вуглеводного компоненту може бути тим сигналом, що спрямовує нАХР до різних компартментів клітини. Показано, що наявність гетеромерних субтипів нАХР забезпечує ефективний захист мітохондрій від апоптозу у відповідь на дію апоптогенних чинників різної природи. Встановлена участь мітохондрійних нАХР у біологічних процесах, що потребують підвищеної виживаності клітин.

1. Мітохондрійні $\alpha 7$ нАХР, порівняно з $\alpha 7$ нАХР плазматичної мембрани, містять більше сіалових кислот та фукози, що може бути одним із сигналів для направлення нАХР до мітохондрій. Вживання нікотину збільшує фукозилювання мітохондрійних $\alpha 7$ нАХР та сприяє їх направленню до мітохондрій, однак робить нАХР мітохондрій менш чутливими до дії специфічних лігандів.
2. $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниці нАХР функціонально пов'язані з різними внутрішньомітохондрійними кіназами. Сигналювання мітохондрійних нАХР є конформаційно-залежним і може бути стимульоване зв'язуванням

позаклітинного ортостеричного або трансмембранного алостеричного сайту.

3. На моделі мишей, нокаутних за генами різних субодиниць nAChR, встановлено, що за відсутності певних субодиниць nAChR, стійкість мітохондрій до дії Ca^{2+} критично не знижується завдяки компенсаторній експресії $\alpha 9$ та/або $\beta 4$ субодиниць. Вперше показано наявність $\alpha 9\beta 4$ субтипу nAChR у мітохондріях.
4. Мітохондрійні nAChR є важливими для підтримки виживання клітин печінки після часткової гепатектомії. Через 3 години після ЧГЕ відбувається перерозподіл загального клітинного пулу nAChR на користь мітохондрій, що підвищує стійкість мітохондрій до дії апоптогенних чинників.
5. Нейрозапалення, навіть за короткочасної дії бактерійного ліпополісахариду, впливає на експресію мітохондрійних nAChR мозку, що робить мітохондрії менш стійкими до апоптогенного впливу. Вживання N-стероїлетаноламіну запобігає патогенній дії ЛПС на мітохондрії мозку експериментальних тварин і підтримує їх когнітивні здібності.
6. Аміксин та агматин, зв'язуючись поблизу ортостеричного сайту $\alpha 7$ nAChR, чинять слабкий проти-апоптичний ефект, знижуючи кількість цитохрому *c*, вивільненого із мітохондрій під дією Ca^{2+} .

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors support liver cells viability after partial hepatectomy. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, Vol. 9, Article 626, p.1-12. doi: 10.3389/fphar.2018.00626. *(Особистий внесок здобувача: отримання препаратів мітохондрій печінки мишей, оцінка чистоти мітохондрійної та не-мітохондрійної фракцій, вивчення впливу апоптогенних факторів/агоністів та антагоністів nAChR на вивільнення цитохрому c. Статистична обробка та аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті).*

2. **Uspenska K**, Lykhmus O, Arias HR, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M. Positive allosteric modulators of $\alpha 7^*$ or $\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors trigger different kinase pathways in mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018, Vol. 9, p. 226–235. *(Особистий внесок здобувача: отримання препаратів мітохондрій печінки мишей, оцінка чистоти мітохондрійної фракції, вивчення впливу $\alpha 7$ - та $\beta 2$ -специфічних алостеричних модуляторів nAChR на вивільнення цитохрому *c*, розрахунок величин IC_{50} . Статистична обробка та аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті).*

3. Arias HR, Lykhmus O, **Uspenska K**, Skok M. Coronaridine congeners modulate mitochondrial $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors with different potency and through distinct intra-mitochondrial pathways. *Neurochemistry International*, 2018, Vol.114 p. 26-32. *(Особистий внесок здобувача: отримання препаратів мітохондрій печінки та мозку мишей, оцінка чистоти мітохондрійної фракції, вивчення впливу похідних коронаридину на вивільнення цитохрому *c*, розрахунок величин IC_{50} . Статистична обробка та аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті).*

4. **Uspenska K**, Lykhmus O, Gergalova G, Chernyshov V, Arias HR, Komisarenko S, Skok M. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to selective ligands. *Neurosci Lett.*, 2017, Vol.656, p.43-50. *(Особистий внесок здобувача: розробка експерименту, отримання препаратів мітохондрій печінки мишей, оцінка чистоти мітохондрійної та не-мітохондрійної фракцій, створення моделі хронічного вживання нікотину, проведення ДСН-електрофорезу, вивчення впливу алостеричних модуляторів на вивільнення цитохрому с. Статистична обробка та аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті).*

5. Lykhmus O, **Uspenska K**, Koval L, Lytovchenko D, Voytenko L, Horid'ko T, Kosiakova H, Gula N, Komisarenko S, Skok M. N-stearoylethanolamine protects the brain and improves memory of mice treated with lipopolysaccharide or immunized with the extracellular domain of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Int Immunopharmacol*, 2017, Vol. 52, p.290-296. *(Особистий внесок здобувача: отримання препаратів мітохондрій мозку мишей, вивчення впливу апоптогенних факторів та агоністу $\alpha 7$ nAChR на вивільнення цитохрому с, участь у написанні статті).*

6. Skok M, Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, **Uspenska K**. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria: subunit composition, function and signaling. *Neurotransmitter*, 2016, Vol.3: e1290. *(Особистий внесок здобувача: отримання препаратів мітохондрій та плазматичних мембран мозку щурів, постановка Сендвіч-лектин аналізу зі зв'язування лектинів з рецепторами в препаратах мітохондрій та плазматичних мембран. Статистична обробка та аналіз експериментальних даних, участь у написанні статті).*

7. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, **Uspenska K**, Komisarenko S, Soreq H, Skok M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2016, Vol. 9, 19, pp. 1-13. *(Особистий внесок здобувача: отримання препаратів мітохондрій мозку мишей, вивчення впливу Ca^{2+} на вивільнення цитохрому с, участь у написанні статті).*

8. **Uspenska KR**, Gergalova GL, Lykhmus OYu, Skok MV. The effect of amixin and agmatine on cytochrome c release from isolated mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 2016, Vol. 88 (1), pp. 5-10. *(Особистий внесок здобувача: отримання препаратів мітохондрій мозку та печінки мишей, порівняння впливу Ca^{2+} на вивільнення цитохрому с з мітохондрій мозку та печінки мишей, проведення експериментів з вивчення впливу аміксину та агматину на мітохондрії. Статистична обробка та аналіз експериментальних даних, написання статті).*

9. **Середницька К.Р.**, Гергалова Г.Л., Лихмус О.Ю., Скок М.В. Препарати Аміксин та агматин впливають на функціонування нікотинового ацетилхолінового рецептора мітохондрій. *Матеріали XI з'їзду Українського біохімічного товариства*; 2014 Жов 6-10; Україна, Київ; *Ukr.Biochem.J.*, 2014; 86(5,Suppl.2), с. 137.

10. **Успенська К.Р.**, Лихмус О.Ю. Субодиничний склад та функціонування нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях мишей нокаутних за генами $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ або $\beta 4$ субодиниць. *Матеріали конф.-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016»*; 2016 Трав 26-27; Україна, Київ; 2016. с. 53.

11. Skok M, Lykhmus O, Koval L, **Uspenska K**. The key role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in neuroinflammation and memory impairment. *Матеріали міжнр. симп. «XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms»*; 2016 Жов 16-20; Франція, Марсель, 2016. с. 35.

12. **Uspenska K**, Lykhmus O, Arias HR, Maskos U, Skok MV. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria: structure, origin, mode of functioning.

Матеріали міжнр. конгресу «41st FEBS Congress». The FEBS Journal, 2016; 283(Suppl. 1), 2016. с. 434.

13. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok M. Functioning and physiological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. Матеріали міжнр. конф. «Conference of Young Scientists»; 2017 Чер 6-9; Україна, Київ. Ukr.Biochem.J. 2017, 89(3), с.111.

14. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok M. Nicotine facilitates nicotinic acetylcholine receptor targeting to mitochondria but makes them less susceptible to specific ligands. Матеріали міжнр. конгресу «42nd FEBS Congress»; 2017 Вер 10-14; Ізраїль, Єрусалим; The FEBS Journal, 2017, 284 (Suppl. 1), с. 151.

15. **Uspenska K**, Lykhmus O, Obolenska M, Maskos U, Skok M. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors: physiological value and mechanism of functioning. Матеріали міжнр.конф. “Nicotinic Acetylcholine Receptors 2017”; 2017 Тра 7-11; Греція, Крит; 2017, с. S47.

16. **Uspenska KR**. Biological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria. Матеріали міжнр. конф. мол. уч. «FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference»; 2018 Вер 3-5; Україна, Київ. – Ukr. Biochem. J., 2018, 90(3), с. 106.

17. **Uspenska K**, Lykhmus O, Skok MV. Role of Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors in Knock-Out Mice and after Partial Hepatectomy in Rats. Матеріали міжнр. симп. мол. уч. “15th Horizons in molecular biology”; 2018 Вер 10-13; Німеччина, Геттінген; 2018, с. 175.

АНОТАЦІЯ

Успенська К.Р. Механізми сигналювання та біологічна роль нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях. - Рукопис

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2018.

Дисертацію присвячено дослідженню будови, механізмів сигналювання та біологічної ролі нікотинових ацетилхолінових рецепторів у мітохондріях. Виявлено, що мітохондрійні nAChR містять більше вуглеводних залишків, ніж ті, що направляються до плазматичної мембрани. Склад вуглеводного компоненту молекули рецептора може бути тим сигналом, що спрямовує nAChR до різних компартментів клітини. Встановлено, що за відсутності $\alpha 3$, $\alpha 7$ та $\beta 2$ субодиниць nAChR стійкість мітохондрій до дії Ca^{2+} критично не знижується завдяки компенсаторній експресії $\alpha 9$ та/або $\beta 4$ субодиниць. Вперше показано наявність гетеромерного $\alpha 9\beta 4$ субтипу nAChR у мітохондріях. Виявлено, що конформаційні зміни, викликані зв'язуванням лігандів у трансмембранному домені (переважно, між різними субодиницями), є достатніми для залучення до сигналювання внутрішньомітохондрійних кіназ. Встановлено, що $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ та $\beta 4$ субодиниці nAChR функціонально пов'язані з різними кіназами. Отримані

результати демонструють біологічний сенс наявності гетеромерних форм nAChR у мітохондріях для впливу на різні сигнальні шляхи апоптозу. Це забезпечує надійний захист мітохондрій від апоптогенних факторів різного походження, що надзвичайно важливо для біологічних процесів, які потребують підвищеного виживання клітин. Зокрема показано роль мітохондрійних nAChR під час фази ініціації регенерації печінки після часткової гепатектомії. Продемонстровано патогенний вплив нейрозапалення на експресію та функціонування мітохондрійних nAChR мозку та дію N-стероїлетаноламіну для запобігання цьому ефекту.

Ключові слова: нікотинний ацетилхоліновий рецептор, мітохондрії, апоптоз, позитивні алостеричні модулятори, цитохром с, часткова гепатектомія, нейрозапалення.

SUMMARY

Uspenska K.R. "The mechanisms of signaling and the biological role of nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria". – Manuscript.

Thesis for scientific degree of candidate in biological sciences (Doctor of Philosophy), specialty 03.00.04 – Biochemistry. – O. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis describes the study of the structure, mechanisms of signalling and biological role of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in mitochondria. It was found that mitochondrial nAChRs contain more carbohydrate residues than those targeted to the cell plasma membrane. The carbohydrate component composition can be that signal, which that directs nAChRs to different cellular compartments. It was found that the absence of $\alpha 3$, $\alpha 7$ or $\beta 2$ nAChR subunits does not critically affect the mitochondria resistance to the effect of Ca^{2+} due to the compensatory expression of $\alpha 9$ and/or $\beta 4$ nAChR subunits. The presence of a heteromeric $\alpha 9\beta 4$ nAChR subtype was shown in mitochondria for the first time. It was found that conformational changes caused by the ligand binding in the transmembrane domain of the receptor (mainly, between two different subunits) are sufficient for engaging the intra-mitochondrial kinases. It has been established that $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\beta 2$ and $\beta 4$ nAChR subunits are functionally linked to different intra-mitochondrial kinases. The study demonstrates the role of mitochondrial nAChRs during the initiation phase of liver regeneration, which requires support of the cell viability after partial hepatectomy. It also shows the pathogenic effect of neuroinflammation on the expression and functioning of nAChRs in the brain mitochondria, as well as a therapeutic effect of N-stearoylethanolamine to support mitochondria upon neuroinflammation.

Keywords: nicotinic acetylcholine receptors, mitochondria, apoptosis, positive allosteric modulators, cytochrome c, partial hepatectomy, neuroinflammation.