

УДК 576.54

# Лиганды протон-активируемых каналов ASIC1a: механизмы действия и сайты связывания

Д. Б. Тихонов\*, Л. Г. Магазаник, Э. И. Нагаева

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223,

Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

\*E-mail: denistikhonov2022@yahoo.com

Поступила в редакцию 16.04.2018

Принята к печати 28.11.2018

**РЕФЕРАТ** Протон-активируемые катионные каналы семейства ASIC широко распространены в ЦНС позвоночных и играют важную роль в ряде физиологических и патологических процессов. Наиболее чувствительны к закислению внешней среды каналы ASIC1a, что и обуславливает интерес к их функции и лигандам. В последнее время список лигандов, потенцирующих или ингибирующих эти каналы, существенно расширился. Он включает неорганические катионы, большой ряд малых органических молекул как эндогенных, так и синтетических, а также группу пептидных токсинов. Информация о местах связывания и молекулярных механизмах действия лигандов приходит из результатов электрофизиологических исследований, данных, полученных путем направленных аминокислотных замен, и рентгеноструктурного анализа. В обзоре предпринята попытка обобщить эти разнородные результаты и представить целостную современную картину взаимодействий различных соединений с ASIC1a.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ASIC, ингибирование, механизмы лиганд-рецепторных взаимодействий, потенциация, сайты связывания, ЦНС.

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИЯ ASIC В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Протон-вызванные ионные токи были открыты Крышталем и Пидопличко в 1980 году [1], которые предположили, что понижение pH внеклеточной среды активирует популяцию управляемых протонами ионных каналов. Клонирование протон-активируемых ионных каналов в середине 90-х годов определило их как новое семейство (ASIC – acid-sensing ion channels), принадлежащее суперсемейству дегенерин эпителиальных натриевых каналов (DEG/ENaC) [2]. Гены, кодирующие ASIC, идентифицированы у многих видов позвоночных, начиная с круглоротых. На данный момент известны четыре гена *acsn1–4* млекопитающих, которые кодируют как минимум шесть различных субъединиц: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4. Эти субъединицы могут формировать как гомо-, так и гетеротримерные комплексы.

Протон-вызванные токи можно обнаружить в нейронах практически всех типов. Уровень экспрессии разных субъединиц ASIC заметно различается в зависимости от локализации. Так, субъединицы ASIC1a, -2a и -2b преимущественно обнаруживаются

в головном мозге [3–5], в то время как субъединицы ASIC1b и ASIC3 чаще можно встретить в сенсорных нейронах спинного мозга и спинальных ганглиях [6, 7]. На поверхности NG2-содержащих глиальных клеток гиппокампа обнаружена высокая плотность  $Ca^{2+}$ -проницаемых ASIC1a, сходных по своим функциональным и фармакологическим свойствам с ASIC нейронов гиппокампа [8]. При этом в гиппокампе ASIC находятся главным образом в интернейронах, а в пирамидных клетках поля CA1 протон-вызванные токи крайне малы [9]. В центральной нервной системе ASIC, предположительно, вовлечены в механизмы синаптической передачи и синаптической пластичности, а также в такие системные функции, как память и обучение [10], страх и депрессия [3]. Их роль можно обнаружить при изучении механизмов наркотической зависимости [11] и патогенеза ряда психических заболеваний [12].

Вкусовые, слуховые и фоточувствительные рецепторные клетки [13–15], клетки гладкой мускулатуры, выстилающие стенки сосудов [16], экспрессируют на своей поверхности ASIC, хотя и в гораздо меньшей степени. На периферии ASIC отвечают за восприятие болевых стимулов, сопровождающих воспаление,

переломы, опухоли, гематомы и послеоперационные раны, а также участвуют в механорецепции [17]. Процессы опухолевого роста также способствуют экспрессии ASIC [18].

Стоит отметить, что большинство сведений о физиологической роли протон-активируемых ионных каналов являются косвенными, поскольку основаны на экспериментальных данных, полученных на «нокаутных» животных. Устранение отдельных субъединиц ASIC позволило проследить их роль в возникновении определенных поведенческих фенотипов, а также вовлеченность ASIC в развитие разнообразных патологических процессов в нервной системе [19].

Лишь недавно появились прямые свидетельства участия ASIC в синаптической передаче. Содержимое синаптических везикул имеет pH ~5.2–5.7 [20]. Соответственно в момент освобождения содержимого везикул pH среды в синаптической щели может снижаться на короткий промежуток времени на 0.2–0.6 единиц и приводить к активации как пре-[21–23], так и постсинаптических ASIC. Однако вклад ASIC-опосредуемых постсинаптических токов оказывается в 15–20 раз меньше вклада постсинаптических токов, опосредованных глутаматом [11, 24, 25].

Среди экспрессируемых в ЦНС протон-активируемых каналов наибольшей чувствительностью к закислению среды обладают ASIC1a [26]. Кроме того, специфический ингибитор гомомеров ASIC1a PcTx1 убирает большую часть протон-вызванных токов в культурах гиппокампа и коры головного мозга [27, 28]. Таким образом, большинство протон-вызванных токов в мозге, вероятно, опосредуется гомомерами ASIC1a или ASIC1a-содержащими гетеромерами. Эти факты и объясняют повышенный интерес к свойствам ASIC1a и их лигандам.

Основная проблема, стоящая на сегодняшний день перед нейрофизиологами, изучающими ASIC, состоит в разрешении противоречия между очевидной ролью этих каналов в физиологических и патологических процессах и малыми значениями ASIC-опосредованных токов, наблюдаемых при синаптической передаче в эксперименте. Между тем, токи, вызываемые искусственным закислением внеклеточной среды в нейронах ЦНС *in vitro*, не уступают по амплитуде токам, вызываемым аппликацией глутамата, который является основным возбуждающим медиатором. Вторая проблема состоит в том, что ASIC, экспрессируемые в ЦНС, быстро десенситизируют даже при небольшом закислении, т.е. теряют способность проводить ток. Так, при закислении всего до pH 7.0 равновесная десенситизация ASIC1a достигает 80% и фактически выключает функцию этих каналов [26].

Возможным решением этих проблем могло бы являться наличие эндогенных соединений, модулирующих работу ASIC в физиологических условиях. Классическим примером такой модуляции является ионотропный рецептор глутамата NMDA-типа. Эффективная активация этих каналов возможна только в присутствии ко-агониста – глицина [29]. Именно поэтому поиск и изучение новых лигандов ASIC, в частности, способных существенно потенцировать ASIC, представляют большой интерес не только с точки зрения традиционных задач фармакологии, но и с точки зрения нейрофизиологии.

### ЛИГАНДЫ ASIC1a

Исследования связи между структурами и молекулярными механизмами действия модуляторов ASIC1a важны как для выяснения их физиологической роли, так и для появления нового класса лекарственных веществ. Среди модуляторов ASIC1a встречаются синтетические соединения, эндогенные органические вещества и катионы, а также ряд пептидных токсинов из компонентов природных ядов. Структуры некоторых низкомолекулярных лигандов приведены на рис. 1.

#### Амилорид

K<sup>+</sup>-сберегающее диуретическое средство, назначаемое при гипертонической болезни и сердечной недостаточности, было первым обнаруженным блокатором протон-активируемых ионных каналов [30, 31]. Амилорид действует как неселективный блокатор ASIC с низким сродством к сайту связывания (IC<sub>50</sub> = 5–100 мкМ), способный к тому же блокировать другие ионные каналы и ионообменники [32]. Интересно, что при более высоких концентра-



Рис. 1. Химические структуры низкомолекулярных лигандов ASIC1a

циях амилорида его ингибирующее действие сменяется потенцирующим или даже активирующим. Апликация амилорида ( $EC_{50} = 560$  мкМ) совместно с нейтральным физиологическим раствором (рН 7.4) активирует гомомерные ASIC3- и гетеромерные ASIC3/ASIC1b-каналы, а также синергически усиливает токи через эти каналы в ответ на умеренное закисление внеклеточной среды [33]. Таким образом, очевидно, что существует двойное разнонаправленное действие амилорида на протон-активируемые ионные каналы.

### 2-Гуанидин-4-метилхиназолин (GMQ)

Открытие необычного действия амилорида на протон-активируемые ионные каналы вдохновило исследователей на синтез похожих по структуре соединений, содержащих гуанидиновую группу и гетероциклическое кольцо [34, 35]. Среди всех этих соединений специфичностью своего активирующего действия выделяется 2-гуанидин-4-метилхиназолин (GMQ). GMQ был первым синтетическим активатором ASIC3, отличным от протонов, что позволило предположить существование других синтетических/эндогенных активаторов ASIC. В высоких концентрациях ( $EC_{50} = 1$  мМ) GMQ способен вызывать стационарный недесенситизирующий ток через ASIC3-каналы, который во много раз превосходит по амплитуде недесенситизирующий ток, возникающий под действием насыщающей концентрации естественного агониста – протонов. При этом действие GMQ зависит от внеклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  и увеличивается со снижением содержания этого иона в среде [36, 37]. Помимо активирующего действия на ASIC3, GMQ специфически взаимодействует и с ASIC1a. Воздействие состоит в том, что рН-зависимости активации и равновесной десенситизации сдвигаются в сторону более кислых значений на величину порядка 0.2 единицы. Оба эффекта имеют конкурентно-подобный характер, т.е. и равновесная десенситизация, и активация развиваются полностью, хотя и при более низких значениях рН [38].

### 4-Аминопиридин

Еще одной небольшой молекулой, способной блокировать гомомерные ASIC1a-каналы ( $IC_{50} \sim 760$  мкМ) и гетеромеры, содержащие субъединицы ASIC1a, ASIC1b и ASIC2a, является известный блокатор калиевых каналов 4-аминопиридин. Место связывания 4-аминопиридина в ASIC и других дегенерин эпителиальных каналах, как и в случае с калиевыми каналами, находится в области поры, поскольку его действие отличается выраженной потенциалзависимостью [39].

### Ионы металлов

ASIC ингибируются различными ионами металлов [40–42]. Показано, что сродство  $H^+$  к каналу напрямую зависит от концентрации кальция в среде [43, 44] – чем меньше  $Ca^{2+}$ , тем больше сродство протонов и соответственно больше ответы.

### Спермин

Эндогенный полиамин, усиливающий протон-вызванные токи через каналы ASIC1a и ASIC1a/2a [45]. Механизм потенциации ASIC1a-каналов состоит из нескольких компонентов и включает в себя замедление инактивации, т.е. активированный канал остается открытым более продолжительное время; снижение сродства протонов к рецептору и, следовательно, увеличения их ответов в условиях пониженного фонового рН; сокращение времени восстановления канала в условиях повторяющейся стимуляции. Все эти изменения приводят к увеличению входа  $Ca^{2+}$  внутрь нейрона через ASIC1a в условиях ишемического воздействия и, как следствие, к гибели клетки. Показано, что как блокада эндогенного синтеза спермина, так и выключение ASIC1a-каналов, значительно увеличивали процент выживших нейронов в *in vivo* и *in vitro* моделях ишемии на мышцах [45].

### FMRF-амиды

FMRF-амиды (Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>), преобладающие в нервной системе беспозвоночных, и родственные им пептиды, обнаруженные в нервной системе млекопитающих, являются активаторами некоторых представителей семейства дегенерин эпителиальных  $Na^+$ -каналов [46]. Они не способны сами активировать ASICs, однако могут значительно потенцировать ответы ASIC1a- и ASIC3-каналов на закисление среды [47, 48]. Эти пептиды действуют непосредственно на канал и замедляют десенситизацию рецептора, увеличивая время пребывания канала в открытом состоянии [49, 50]. Существенное влияние эти пептиды оказывают и на равновесную десенситизацию, смещая ее в сторону более сильных закислений [48]. Эндогенные опиатные нейропептиды – динорфин А и большой динорфин, также смещают равновесную инактивацию, усиливая ответы ASIC1a при слабом закислении [51].

### Псалмотоксин-1 (PcTx1)

Полипептидный токсин, выделенный из яда южноамериканского тарантула *Psalmopoeus cambridgei*, является первым описанным специфическим ингибитором ASIC1a-каналов ( $IC_{50} \sim 1$  нМ) [52]. PcTx1 состоит из 40 аминокислот, он образован тремя антипараллельными  $\beta$ -листами, скрученными в три петли,

в центре которых лежит компактное ядро из трех дисульфидных мостиков [53]. Псалмотоксин-1 ингибирует ASIC1a-каналы, увеличивая чувствительность рецептора к протонам, но при этом сдвигая кривую инактивации рецептора к менее кислым значениям pH [54]. Поскольку ASIC1a активируются в ответ на незначительное повышение концентрации протонов, даже небольшое увеличение сродства H<sup>+</sup> к протонсвязывающим сайтам оказывается достаточным для перевода большинства рецепторов в десенситизированное состояние. В результате в присутствии PcTx1 при pH 7.4 основное количество ASIC1a становится неактивным вследствие десенситизации. Токсин наилучшим образом связывается с десенситизированным каналом и стабилизирует его в этом состоянии [55].

### MitTx

Был выделен в 2011 году из яда техасского аспида *Micrurus tener tener* [56]. Токсин, напоминающий по своей структуре β-бунгаротоксин, состоит из двух нековалентно связанных субъединиц. MitTx не ингибирует ASICs, но активирует как гомо-, так и гетеротримерные каналы [56, 57]. Наиболее чувствительны к его действию гомомеры ASIC1a и ASIC1b (EC<sub>50</sub> ~ 9 и 23 нМ соответственно), ASIC3 гораздо менее чувствительны (EC<sub>50</sub> ~ 830 нМ). При совместной аппликации с нейтральным раствором MitTx практически не оказывает действия на ASIC2a-каналы, однако сильно потенцирует протон-вызванные токи через эти каналы за счет сдвига кривой активации в сторону менее кислых значений.

### Мамбалгины

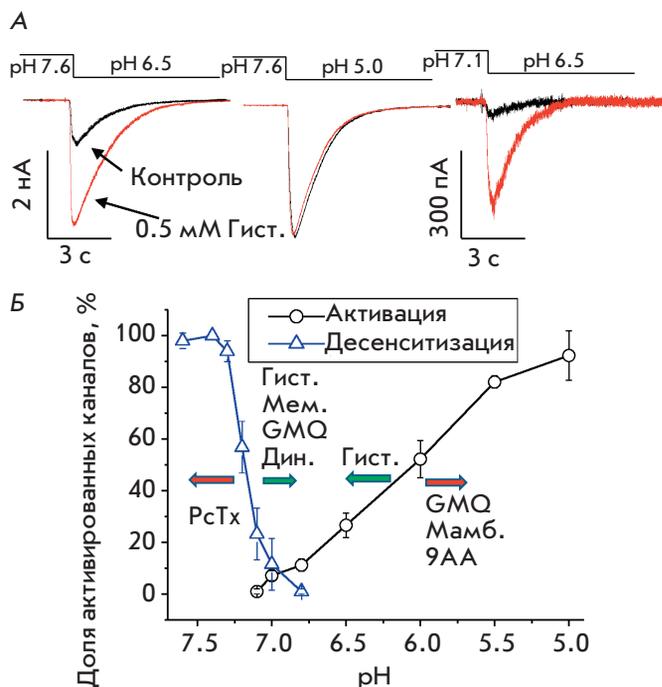
Это группа из трех токсинов длиной 57 аминокислот. Два из них, мамбалгины-1 и -2, отличающиеся только одной аминокислотой в положении 4, выделены в 2012 году из яда африканской черной мамбы *Dendroaspis polylepis polylepis* [58]. Мамбалгин-3 был выделен из яда зеленой мамбы *D. angusticeps* и назван так, поскольку от двух предыдущих его отличает только один аминокислотный остаток в положении 23 [59]. Все три белка по структуре относятся к семейству трехпальцевых токсинов, имеют сходные фармакологические характеристики и ингибируют ASIC1a [59]. Мамбалгин-1 ингибирует ASIC1a по следующему механизму: он предпочтительнее связывается с закрытым каналом и сильно сдвигает кривую pH-зависимости активации в сторону более кислых значений pH. В то же время токсин умеренно сдвигает кривую инактивации в щелочную сторону, стабилизируя тем самым десенситизированное состояние канала и усиливая ингибирование [58].

### Гидрофобные моноамины

Недавно в лаборатории биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН было обнаружено, что соединения с простой химической структурой, содержащие гидрофобное/ароматическое ядро и аминогруппу (гидрофобные моноамины), являются модуляторами нативных и рекомбинантных ASIC [60, 61]. Из четырех соединений, протестированных на первом этапе, только ИЭМ-1921 не проявил активности в отношении гомомерных ASIC1a-каналов даже в концентрации 1000 мкМ. Три других – 9AA, ИЭМ-2117 и мемантин вызывали концентрационно-зависимый ингибирующий эффект разной степени выраженности [60]. Наиболее активным ингибитором оказался 9-аминоакридин. В концентрации 1000 мкМ это соединение вызывало  $67 \pm 8\%$  ( $n = 6$ ) ингибирования при совместной аппликации с активирующим раствором с pH 6. Действие 9-аминоакридина оказалось pH-зависимым: 300 мкМ ингибировали ответ, вызванный слабым (pH 6.8) закислением, на 80%, а при активации сильным закислением (pH 5.0) ингибирующий эффект сокращался до 12%. Таким образом, ингибирующее действие 9-аминоакридина обусловлено смещением кривой активации ASIC1a. Особенностью действия мемантина было резкое ускорение десенситизации ответа. Подобный эффект мемантин оказывал и на ASIC1b [61]. Более подробное исследование механизма действия мемантина позволило установить, что в этом случае ингибирующее действие обусловлено блокадой открытого канала. Данный вывод основан на том, что эффект мемантина оказался потенциалзависимым, но не зависел от конкретной величины активирующего pH [62].

Проведенный в дальнейшем структурно-функциональный анализ [63] позволил обнаружить и потенциаторы ASIC1a. Оказалось, что встраивание метиленовой группы между фенилциклогексильным кольцом и аминогруппой ИЭМ-1921 приводило к появлению слабой потенцирующей активности у этого соединения, а введение второй группы усиливало потенциацию (соединение ИЭМ-2044).

Обнаружение потенцирующей активности у ИЭМ-2044 позволило расширить поиск новых потенциально активных препаратов. Химическая структура этого соединения имеет сходство со структурой гистамина, ряда лигандов рецепторов гистамина и иных эндогенных аминов, например тирамина и триптамина. Гистамин [64] и его производные, альфа-метилгистамин и 1-метилгистамин [65] оказались сильными и избирательными потенциаторами ASIC1a. Потенцирование осуществляется за счет смещения кривой активации, так как ответ на глубокое закисление не увеличивается. Среди лигандов рецепторов гистамина подобным действием обладали тиоперамид



**Рис. 2.** Механизмы действия лигандов ASIC1a. А – действие гистамина на ASIC1a. Гистамин не потенцирует ответ на максимальное закисление (с 7.6 до 5.0), но потенцирует ответ на неполное закисление (с 7.6 до 6.5), особенно в условиях частичной десенситизации (с 7.1 до 6.5). Б – pH-зависимости активации и равновесной десенситизации ASIC1a. Стрелки показывают направление сдвигов кривых под действием соответствующих лигандов

и димаприт. А вот соединение A943931 вызывало ингибирование, зависевшее от величины потенциала, но не от величины активирующего pH, что говорит о каналоблокирующем механизме действия [65].

Первоначальное исследование [64] не выявило влияния гистамина на десенситизацию ASIC1a. Однако более подробный анализ показал, что при исходных значениях pH (pH 7.1, т.е. в условиях частичной десенситизации) эффект гистамина усиливается (рис. 2). Подобный эффект оказывали также тирамин и триптамин, которые не вызывали смещения кривой активации [66]. Даже мемантин – ингибитор открытых ASIC1a-каналов, проявлял потенцирующую активность при аппликации между активациями канала при подкислении pH до 7.1, т.е. в условиях взаимодействия только с закрытыми и десенситизированными каналами [65]. Таким образом, различные моноамины вызывают сдвиг кривой равновесной десенситизации ASIC1a в стороны более сильных закислений.

### Обобщение данных по механизмам модуляции ASIC1a

Соотнести разнообразные данные и гипотезы о действии конкретных лигандов достаточно сложно. Однако накопление большого числа экспериментальных данных позволяет выявить некоторые закономерности.

По совокупности признаков ряд соединений можно отнести к блокаторам поры ASIC1a. К лигандам этого типа относятся амилорид, мемантин, 4-аминопиридин. Связывание этих соединений в поре приводит к ингибированию транспорта ионов независимо от степени активации и десенситизации рецептора. Блокаторы пор катионных каналов являются, как правило, катионами, и в этом случае их действие зависит от потенциала на мембране.

Второй распространенный тип действия лигандов – смещение кривой активации, которое приводит к ингибированию или потенцированию токов (рис. 2Б). Пептидный токсин мамбалгин и низкомолекулярные соединения GMQ и 9AA сдвигают кривую в сторону более сильных закислений, а гистамин, наоборот, позволяет каналу активироваться при более высоких значениях pH. Особенностью этого механизма является выраженность действия лигандов при низких уровнях закисления, когда активация ASIC1a невелика. Смещение кривой активации может реализовываться за счет аллостерического влияния на средство рецептора к протонам или за счет прямого взаимодействия с протонсвязывающим сайтом. В последнем случае лиганды этого типа выступают как агонисты или как конкурентные антагонисты в зависимости от направленности действия.

Третий тип действия – изменение равновесной десенситизации ASIC1a (рис. 2Б). В качестве наиболее известного примера соединения, усиливающего десенситизацию можно привести псалмотоксин. Спермин и моноамины ослабляют десенситизацию, позволяя ASIC1a функционировать в условиях длительного закисления среды. Ряд лигандов, например GMQ и гистамин, одновременно влияет на активацию и десенситизацию. При этом не наблюдается корреляции между этими эффектами. Так, GMQ смещает обе кривые в сторону более глубокого закисления, а гистамин смещает кривую активации в сторону меньших закислений (рис. 2А). Псалмотоксин, хорошо известный как промотор десенситизации, может приводить к активации канала при щелочных значениях pH.

Вопрос о сайтах связывания еще более сложен. Традиционным методом выявления сайта связывания лиганда считается направленный мутагенез рецептора. Однако этот подход не позволяет получить однозначно интерпретируемые результаты. Мутации

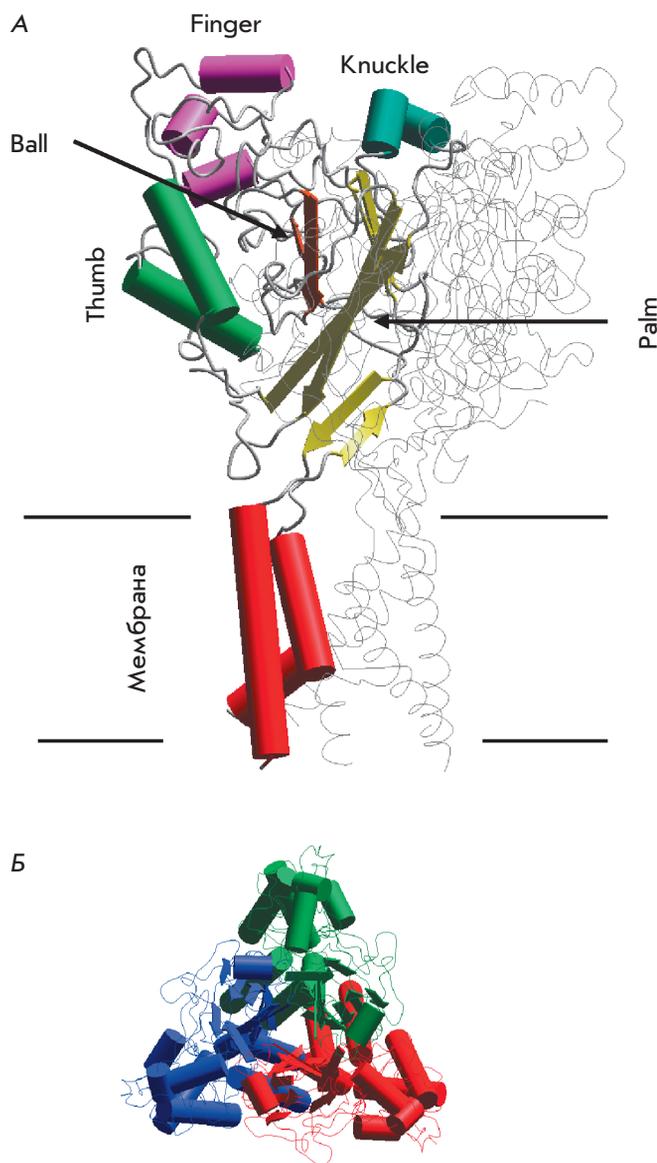
могут влиять непосредственно на сайт связывания лиганда, если мутируемые аминокислоты входят в его состав, или аллостерически, меняя сродство рецептора к лиганду путем изменения его конформации. Кроме того, мутации могут существенно влиять на работу самого канала, его активацию и десенситизацию, что также затрудняет интерпретацию данных. В некоторых случаях мутации приводят к полной потере функциональности канала, и тогда не представляется возможным выяснить эффект мутации на связывание лиганда. Таким образом, несмотря на высокую ценность данных, полученных с помощью направленных мутаций, к их структурной интерпретации надо подходить с большой осторожностью. Эту проблему можно решать только с учетом данных о строении ASIC и о молекулярных механизмах их активации и десенситизации.

### СТРОЕНИЕ ASIC

В 2007 году впервые был проведен рентгеноструктурный анализ канала ASIC1a курицы [67], что позволило установить основные элементы его строения (рис. 3). Позже с более низким разрешением (3 Å) получили кристаллическую структуру функционирующего мутанта, у которого отсутствовала С-концевая область, но сохранилась N-концевая область и входящий в нее участок, необходимый для открытия канала [68]. Оба белка были кристаллизованы при низких значениях pH. В таких условиях канал ASIC1a находится в десенситизированном состоянии. Позднее были получены структуры ASIC1a в открытом и закрытом состояниях [69], что позволило установить механизмы активации и десенситизации.

ASIC представляют собой тримеры, субъединицы которых симметрично расположены вокруг центральной поры канала. Экстраклеточный домен (ЭКД) каждой субъединицы напоминает сжатую человеческую руку, которая крепится к мембранным сегментам посредством подвижного «запястья» [67]. Видимо, учитывая такое сходство, авторы статьи о первой кристаллической структуре описали ЭКД в терминах человеческой кисти, держащей мяч. Впоследствии эта терминология стала общепринятой, поскольку оказалась довольно удобной. ЭКД можно разделить на пять субдоменов: «ладонь» – palm-домен, «палец» – finger-домен, «большой палец» – thumb-домен, «сустав» – knuckle и домен под названием «бета-болл» (β-ball) (рис. 3).

Важная особенность структуры ЭКД – наличие так называемого «кислотного кармана» (acidic pocket) – скопление кислых аминокислот в одном небольшом участке. Он располагается на расстоянии 45 Å от трансмембранного участка и образован взаимодействиями между thumb-, β-ball- и finger-



**Рис. 3.** Принципиальное строение ASIC1a по данным рентгеноструктурного анализа. А – вид сбоку, в одной субъединице выделены основные структурные элементы: Finger (палец), Knuckle (сустав), Ball (мяч), Thumb (большой палец), Palm (ладонь). Б – вид в плоскости мембраны. ASIC представляет собой тример, в котором субъединицы (показаны разным цветом) окружают пору канала в центре

доменами одной субъединицы и частью palm-домена соседней субъединицы. Внутри этого кармана три пары кислых аминокислотных остатков (Асп<sup>238</sup>-Асп<sup>350</sup>, Глу<sup>239</sup>-Асп<sup>346</sup> и Глу<sup>220</sup>-Асп<sup>408</sup>) находятся на близком расстоянии. Электростатическое отталкивание между отрицательными зарядами боковых

цепей этих пар аминокислотных остатков удерживает кислотный карман в развернутом состоянии, канал при этом закрыт. При закислении внешней среды происходит связывание протонов между парами карбоксилатов, что приводит к стягиванию кармана в более компактную структуру. Это вызывает конформационные изменения в thumb-домене, что, в свою очередь, приводит к изменениям в «запястье» и далее в трансмембранном домене. Таким образом, кислотный карман является местом связывания протонов, необходимых для активации канала [69].

Однако, помимо «карманных» аминокислот, в нижней части palm-домена есть еще несколько аспарагиновых, глутаминовых и гистидиновых остатков,  $pK_a$  которых находится также в пределах pH, активирующих ASIC1-каналы [70]. Кроме того, полное удаление всех трех пар «карманных» аминокислот резко снижает чувствительность рецептора к протонам, но не устраняет его способность активироваться в ответ на сильное закисление внеклеточной среды [71]. В связи с этим считается, что в пределах одной субъединицы существует несколько участков, ответственных за связывание протонов и дальнейшую активацию канала.

Трансмембранный домен ASIC образован шестью  $\alpha$ -спиралями – по две (TM1 и TM2) от каждой из трех субъединиц, входящих в состав функционального ASIC. Трансмембранные сегменты каждой субъединицы участвуют в формировании поры канала. TM2 непосредственно выстилает просвет ионной поры, в то время как TM1 выполняет опорную роль, контактируя с липидным бислоем и образуя множество связей с TM2 той же молекулы и сегментами TM2 и TM1 соседней субъединицы. Только небольшая часть C-концевого участка TM1-сегмента непосредственно выстилает пору канала [72].

### САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ МОДУЛЯТОРОВ ASIC

Наиболее точные данные о местах связывания лигандов получены с помощью рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. В настоящее время имеется несколько структур ASIC высокого разрешения в комплексе с такими лигандами, как псалмотоксин, MitTx и амилорид [73, 74].

С помощью активирующего токсина MitTx была получена структура ASIC1a в открытом состоянии. Каждый гетеродимер токсина связывается с субъединицей канала, т.е. всего связываются три молекулы токсина, формирующие множественные контакты по всей длине thumb-домена от поверхности мембраны до knuckle-домена (рис. 4А). Хотя молекула токсина обнаруживается вблизи «кислотного кармана», непосредственно в него MitTx не проникает. Таким образом, токсин механически стабилизирует откры-

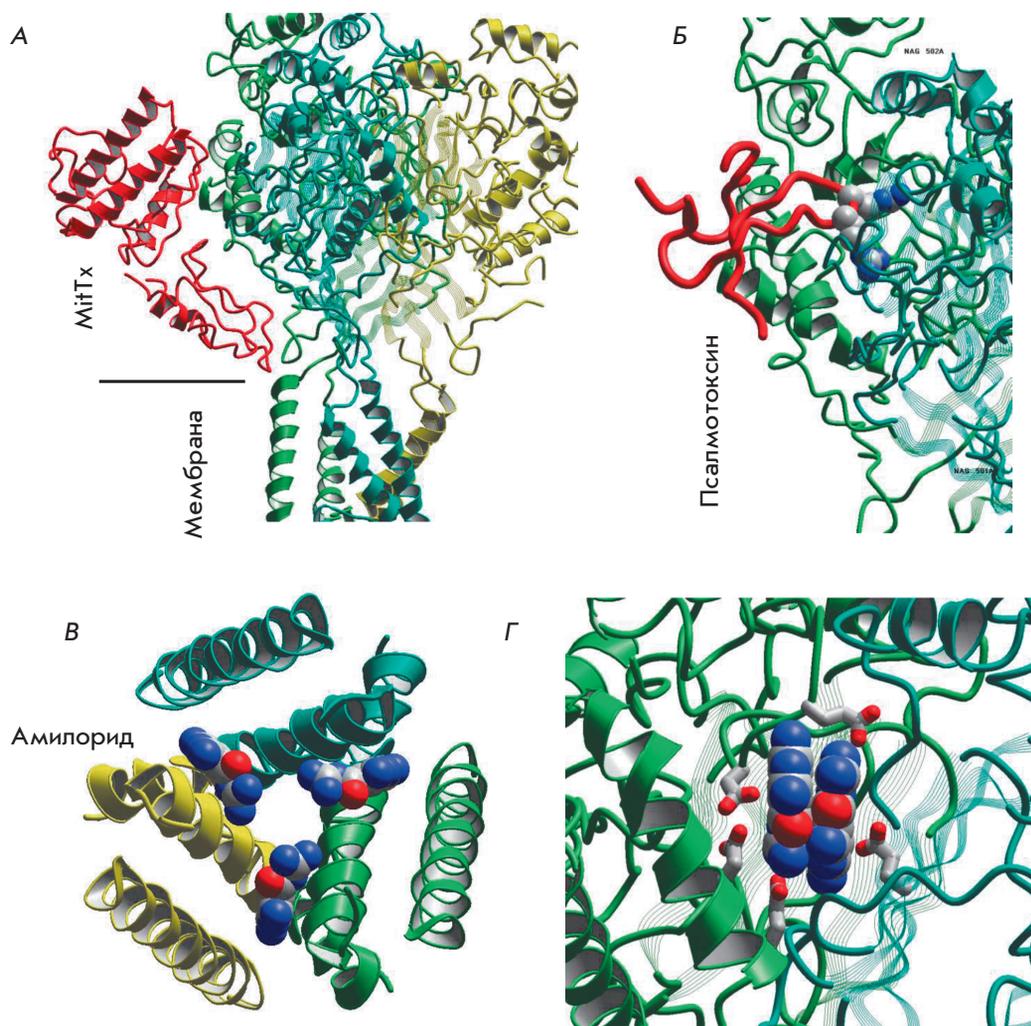
тое состояние канала, не влияя напрямую на протонсвязывающий центр.

Помимо пептидного токсина в той же структуре разрешен комплекс ASIC1a с амилоридом. Три молекулы амилорида расположены в верхней части канала, в интерфейсах между субъединицами (рис. 4В). Их заряженные группы выставлены в пору. С другой стороны, данные мутагенеза свидетельствуют о более глубоком залегании места связывания амилорида в пору [75]. Авторы предполагают, что место связывания, обнаруженное в рентгеновской структуре, отражает промежуточное положение амилорида, и одна молекула может проходить глубже, стерически блокируя канал. Второе место связывания амилорида расположено в кислотном кармане (рис. 4Г). Две молекулы образуют димер, стабилизируемый посредством стекинг-взаимодействия ароматических группировок и противоположно ориентированных гуанидиновых групп. В настоящий момент не известно, какую функциональную нагрузку несет это место связывания, но представляется вероятным, что оно имеет отношение к способности амилорида активировать ASIC [33].

Сайт связывания псалмотоксина, выявленный Vasonguis и соавт. [73], в значительной степени перекрывается с регионом связывания MitTx. Однако средняя петля молекулы псалмотоксина заходит в кислотный карман, где положительно заряженные остатки токсина напрямую взаимодействуют с кислотными остатками рецептора (рис. 4Б), т.е. механизмы стабилизации открытого состояния токсином MitTx и десенситизированного состояния псалмотоксином принципиально различны: псалмотоксин воздействует на рецептор протонов, а MitTx – на исполнительный механизм активации.

Вероятные места связывания других лигандов ASIC можно установить по косвенным свидетельствам, анализируя совокупность механизмов их действия, влияние точечных мутаций и данные о конкуренции с лигандами, места связывания которых известны. Например, сведения о совпадении регионов связывания MitTx и псалмотоксина хорошо согласуются с данными о взаимоисключающем действии этих токсинов [56]. Согласно последним данным [76], мамбалгины также связываются вблизи кислотного кармана, как и псалмотоксин.

К псалмотоксину можно «привязать» еще несколько типов лигандов. Так, согласно [45], анализ совместного действия спермина и псалмотоксина позволяет предполагать, что эти два соединения могут конкурировать за общий сайт связывания, хотя модулируют функцию ASIC1a в противоположных направлениях. Псалмотоксин и кальций также находятся в конкурентных отношениях [54], при этом



**Рис. 4.** Сайты связывания лигандов ASIC1a. А – токсин MitTx, переводящий канал в открытое состояние, связывается вдоль palm-домена. Б – псалмотоксин связывается с верхней частью palm-домена, а его центральная петля проникает в кислотный карман. В – три молекулы амилорида связываются в интерфейсах между трансмембранными сегментами. Г – две молекулы амилорида образуют димер, связывающийся в области кислотного кармана

известно, что кальций конкурирует с протонами [43, 77]. Конкуренция с псалмотоксином показана также для динорфина [51]. Исходя из изложенного можно предположить, что лиганды, влияющие на pH-зависимость активации и равновесной десенситизации ASIC1a, связываются в области кислотного кармана рецептора и непосредственно влияют на его функциональные компоненты. Поскольку кислотный карман содержит несколько отрицательно заряженных аминокислотных остатков, различия в характере взаимодействия разных лигандов с этой областью могут определять конкретную моду действия каждого лиганда.

Однако ряд данных не вполне согласуется с этой концепцией. Во-первых, как отмечено выше, кислотный карман не является единственной областью связывания протонов, необходимых для активации канала [70, 71]. Замены аминокислотных остатков в palm-домине влияют на десенситизацию и действие ряда лигандов. В недавней работе [78] было система-

тически изучено взаимное влияние эффектов GMQ, амилорида, псалмотоксина и мамбалгина. Оказалось, что влияние GMQ и мамбалгина на кривую активации ASIC1a полностью аддитивно, что предполагает независимость механизмов действия. Напротив, влияние GMQ и псалмотоксина на равновесную инактивацию взаимосвязано, поскольку между ними существует отрицательная кооперативность. Таким образом, вопрос о точных местах связывания лигандов, влияющих на активацию и десенситизацию ASIC1a, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные о влиянии разнообразных лигандов на ASIC1a выявляют три основные моды действия: блокада поры канала, смещение pH-зависимости активации и смещение pH-зависимости десенситизации канала. Многие лиганды одновременно влияют на две последние характеристики. Вероятно, влия-

ния такого типа определяются связыванием лигандов с внеклеточным сайтом, управляющим активационными и инактивационными характеристиками ASIC1a. Хотя величины сдвигов этих кривых обычно не превосходят 0.2–0.5 единицы рН, они оказывают сильное влияние на функционирование канала поскольку активация ASIC1a происходит в диапазоне между рН 7.0 и 5.0, а равновесная десенситизация развивается между рН 7.5 и 7.0. Такие характеристики существенно ограничивают возможности активации ASIC1a в физиологических условиях. В частности, даже небольшое общее закисление вызывает десенситизацию и потерю функциональности канала. С этой точки зрения перспективным представляется поиск эндогенных лигандов, смещающих десенситизацию в сторону более кислых значений рН, а активацию – наоборот, в сторону меньших за-

кислений. В присутствии таких лигандов ASIC1a могли бы активироваться небольшими закислениями внешней среды, имеющими место при синаптической передаче. В этом случае умеренное закисление среды не приводило бы к десенситизации, а, наоборот, усиливало ответ и, таким образом, вклад ASIC1a в возбудимость нейрона. Если принять во внимание, что усиление активации ASIC1a способно оказывать благоприятное влияние на течение ряда патологических процессов, то обнаружение лигандов, потенцирующих ASIC1a, обретает клинический смысл. ●

*Авторы выражают благодарность  
В.Ю. Штейникову за предоставленные записи  
действия гистамина в разных условиях.  
Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-00122.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. // *Neuroscience*. 1980. V. 5. № 12. P. 2325–2327.
- Kellenberger S., Schild L. // *Pharmacol. Rev.* 2015. V. 67. № 1. P. 1–35.
- Wemmie J.A., Askwith C.C., Lamani E., Cassell M.D., Freeman J.H., Welsh M.J. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 13. P. 5496–5502.
- Coryell M.W., Wunsch A.M., Haenfler J.M., Allen J.E., Ziemann A.E., Cook M.N., Dunning J.P., Margaret P., Rainier J.D., Liu Z., et al. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 17. P. 5381–5388.
- Price M.P., Gong H., Parsons M.G., Kundert J.R., Reznikov L.R., Bernardinelli L., Chaloner K., Buchanan G.F., Wemmie J.A., Richerson G.B., et al. // *Genes, Brain Behav.* 2014. V. 13. № 2. P. 179–194.
- Delaunay A., Gasull X., Salinas M., Noel J., Friend V., Lingueglia E., Deval E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 32. P. 13124–13129.
- Deval E., Lingueglia E. // *Neuropharmacology*. 2015. V. 94. P. 49–57.
- Lin Y.C., Liu Y.C., Huang Y.Y., Lien C.C. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 9. P. 735–744.
- Bolshakov K.V., Essin K.V., Buldakova S.L., Dorofeeva N., Skatchkov S.N., Eaton M.J., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. // *Neuroscience*. 2002. V. 110. № 4. P. 723–730.
- Wemmie J.A., Chen J., Askwith C.C., Hruska-Hageman A.M., Price M.P., Nolan B.C., Yoder P.G., Lamani E., Hoshi T., Freeman J.H., et al. // *Neuron*. 2002. V. 34. № 3. P. 463–477.
- Kreple C.J., Lu Y., Taugher R.J., Schwager-Gutman A.L., Du J., Stump M., Wang Y., Ghobbeh A., Fan R., Cosme C.V., et al. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 8. P. 1083–1091.
- Baldwin D.S., Hou R., Gordon R., Huneke N.T.M., Garner M. // *CNS Drugs*. 2017. V. 31. № 4. P. 307–317.
- Lin W., Ogura T., Kinnamon S.C. // *J. Neurophysiol.* 2002. V. 88. P. 133–141.
- Ettaiche M., Guy N., Hofman P., Lazdunski M., Waldmann R. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 5. P. 1005–1012.
- Ugawa S., Inagaki A., Yamamura H., Ueda T., Ishida Y., Kajita K., Shimizu H., Shimada S. // *Neuroreport*. 2006. V. 17. № 12. P. 1235–1239.
- Grifoni S.C., Jernigan N.L., Hamilton G., Drummond H.A. // *Microvasc. Res.* 2008. V. 75. № 2. P. 202–210.
- Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J. // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. № 10. P. 578–586.
- Damaghi M., Wojtkowiak J.W., Gillies R.J. // *Front. Physiol.* 2013. V. 4. P. 370.
- Lin S.H., Sun W.H., Chen C.C. // *Neuropharmacology*. 2015. V. 94. P. 99–118.
- Miesenböck G., De Angelis D.A., Rothman J.E. // *Nature*. 1998. V. 394. № 6689. P. 192–195.
- DeVries S.H. // *Neuron*. 2001. V. 32. № 6. P. 1107–1117.
- Palmer M.J., Hull C., Vigh J. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 36. P. 11332–11341.
- Vessey J.P. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 16. P. 4108–4117.
- Du J., Reznikov L.R., Price M.P., Zha X.M., Lu Y., Moninger T.O., Wemmie J.A., Welsh M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 24. P. 8961–8966.
- González-Inchauste C., Urbano F.J., Di Guilmi M.N., Uchitel O.D. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 10. P. 2589–2599.
- Hesselager M., Timmermann D.B., Ahring P.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 12. P. 11006–11015.
- Baron A., Waldmann R., Lazdunski M. // *J. Physiol.* 2002. V. 539. Pt 2. P. 485–494.
- Coryell M.W., Ziemann A.E., Westmoreland P.J., Haenfler J.M., Kurjakovic Z., Zha X.M., Price M., Schnizler M.K., Wemmie J.A. // *Biol. Psychiatry*. 2007. V. 62. № 10. P. 1140–1148.
- Kleckner N., Dingledine R. // *Science*. 1988. V. 241. № 4867. P. 835–837.
- Waldmann R., Champigny G., Voilley N., Lauritzen I., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 18. P. 10433–10436.
- Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M. // *Nature*. 1997. V. 386. № 6621. P. 173–177.
- Kleyman T.R., Cragoe E.J. // *J. Membr. Biol.* 1988. V. 105. № 1. P. 1–21.
- Li W.G., Yu Y., Huang C., Cao H., Xu T.L. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 49. P. 42635–42646.
- Chen X., Orser B.A., MacDonald J.F. // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 648. № 1–3. P. 15–23.
- Kuduk S.D., Chang R.K., Wai J.M.C., Di Marco C.N., Cofre V., DiPardo R.M., Cook S.P., Cato M.J., Jovanovska A., Urban M.O., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. № 15. P. 4059–4063.

36. Yu Y., Chen Z., Li W., Cao H., Feng E., Yu F., Liu H., Jiang H., Xu T. // *Neuron*. 2010. V. 68. P. 61–72.
37. Yu Y., Li W.G., Chen Z., Cao H., Yang H., Jiang H., Xu T. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 28. P. 24996–25006.
38. Alijevic O., Kellenberger S. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 43. P. 36059–36070.
39. Boiko N., Kucher V., Eaton B.A., Stockand J.D. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 13. P. 9418–9427.
40. Staruschenko A., Dorofeeva N.A., Bolshakov K.V., Stockand J.D. // *Dev. Neurobiol.* 2007. V. 67. № 1. P. 97–107.
41. De Weille J., Bassilana F. // *Brain Res.* 2001. V. 900. № 2. P. 277–281.
42. Chu X.P., Wemmie J.A., Wang W.Z., Zhu X.M., Saugstad J.A., Price M.P., Simon R.P., Xiong Z.G. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 40. P. 8678–8689.
43. Babini E., Paukert M., Geisler H.S., Gründer S. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 41597–41603.
44. Immke D.C., McCleskey E.W. // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. № 9. P. 869–870.
45. Duan B., Wang Y.Z., Yang T., Chu X.P., Yu Y., Huang Y., Cao H., Hansen J., Simon R.P., Zhu M.X., et al. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 6. P. 2101–2112.
46. Lingueglia E., Deval E., Lazdunski M. // *Peptides*. 2006. V. 27. № 5. P. 1138–1152.
47. Askwith C.C., Cheng C., Ikuma M., Benson C., Price M.P., Welsh M.J. // *Neuron*. 2000. V. 26. № 1. P. 133–141.
48. Sherwood T.W., Askwith C.C. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 4. P. 1818–1830.
49. Deval E., Baron A., Lingueglia E., Mazarguil H., Zajac J.M., Lazdunski M. // *Neuropharmacology*. 2003. V. 44. № 5. P. 662–671.
50. Frey E.N., Pavlovicz R.E., Wegman C.J., Li C., Askwith C.C. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 8. e71733.
51. Sherwood T.W., Askwith C.C. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 45. P. 14371–14380.
52. Escoubas P., De Weille J.R., Lecoq A., Diochot S., Waldmann R., Champigny G., Moinier D., Menez A., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 33. P. 25116–25121.
53. Escoubas P., Bernard C., Lambeau G., Lazdunski M., Darbon H. // *Protein Sci.* 2003. V. 12. № 7. P. 1332–1343.
54. Chen X., Kalbacher H., Gründer S. // *J. Gen. Physiol.* 2005. V. 126. № 1. P. 71–79.
55. Chen X., Kalbacher H., Gründer S. // *J. Gen. Physiol.* 2006. V. 127. № 3. P. 267–276.
56. Bohlen C.J., Chesler A.T., Sharif-Naeini R., Medzihradzky K.F., Zhou S., King D., Sánchez E.E., Burlingame A.L., Basbaum A.I., Julius D. // *Nature*. 2011. V. 479. № 7373. P. 410–414.
57. Bohlen C.J., Julius D. // *Toxicon*. 2012. V. 60. № 3. P. 254–264.
58. Diochot S., Baron A., Salinas M., Douguet D., Scarzello S., Dabert-Gay A.S., Debayle D., Friend V., Alloui A., Lazdunski M., et al. // *Nature*. 2012. V. 490. № 7421. P. 552–555.
59. Baron A., Diochot S., Salinas M., Deval E., Noël J., Lingueglia E. // *Toxicon*. 2013. V. 75. P. 187–204.
60. Tikhonova T.B., Nagaeva E.I., Barygin O.I., Potapieva N.N., Bolshakov K.V., Tikhonov D.B. // *Neuropharmacology*. 2015. V. 89. P. 1–10.
61. Nagaeva E.I., Potapieva N.N., Tikhonov D.B. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 25. P. 95–101.
62. Shteinikov V.Y., Tikhonova T.B., Korkosh V.S., Tikhonov D.B. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018. V. 38. № 4. P. 869–881.
63. Nagaeva E.I., Potapieva N.N., Nikolaev M.V., Gmiro V.E., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. // *Eur. J. Pharmacol.* 2016. V. 788. P. 75–83.
64. Nagaeva E.I., Tikhonova T.B., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. // *Neurosci. Lett.* 2016. V. 632. P. 136–140.
65. Shteinikov V.Y., Korosteleva A.S., Tikhonova T.B., Potapieva N.N., Tikhonov D.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 490. № 4. P. 1314–1318.
66. Barygin O.I., Komarova M.S., Tikhonova T.B., Korosteleva A.S., Nikolaev M.V., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. // *Channels*. 2017. V. 11. № 6. P. 648–659.
67. Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E. // *Nature*. 2007. V. 449. № 7160. P. 316–323.
68. Gonzales E.B., Kawate T., Gouaux E. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7255. P. 599–604.
69. Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. // *Nature*. 2018. V. 55. № 7696. P. 397–401.
70. Liechti L.A.L., Bernèche S., Bargeton B., Iwaszkiewicz J., Roy S., Michielin O., Kellenberger S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 21. P. 16315–16329.
71. Li T., Yang Y., Canessa C.M. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 7. P. 4689–4694.
72. Li T., Yang Y., Canessa C.M. // *Nat. Commun.* 2011. V. 2. № 399. P. 1–7.
73. Baconguis I., Gouaux E. // *Nature*. 2012. V. 489. № 7416. P. 400–405.
74. Baconguis I., Bohlen C.J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. // *Cell*. 2014. V. 156. № 4. P. 717–729.
75. Kellenberger S., Gautschi I., Schild L. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 64. № 4. P. 848–856.
76. Schroeder C.I., Rash L.D., Vila-Farrés X., Rosengren K.J., Mobli M., King G.F., Alewood P.F., Craik D.J., Durek T. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014. V. 53. № 4. P. 1017–1020.
77. Immke D.C., McCleskey E.W. // *Neuron*. 2003. V. 37. № 1. P. 75–84.
78. Besson T., Lingueglia E., Salinas M. // *Neuropharmacology*. 2017. V. 125. P. 429–440.