

УДК 577.25

Храмов Алексей Парамонович
доцент, к.б.н. ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И.

Скрябина

Уграицкая Василиса Маратовна

Студентка 2 курса магистратуры

“Зоотехния”

ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И.

Скрябина

НЕКОТОРЫЕ ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЛИГАНДЫ ASIC КАНАЛОВ.

Аннотация: В этой статье приведены обзорные сведения о веществах, воздействующих и модулирующих активность ASIC каналов.

Ключевые слова: ASIC-каналы, лиганды, токсины, модуляция активности.

Authors:

Hramov Alexey Paramonovich

Russia, Moscow Associate

Professor, Candidate of Biological Sciences,

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow

state Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA by K.I.

Skryabin

Vasilisa Maratovna Ugraitskaya

2nd year student of the Master's degree in "Animal Science"

Abstract: This article provides an overview of substances that affect and modulate the activity of ASIC channels.

Keywords: ASIC channels, ligands, toxins, activity modulation.

Вступление

Наиболее сильно и избирательно на различные ASIC-каналы действуют соединения, полученные из различных ядов. На сегодняшний день открыто около десятка модуляторов активности ASIC-каналов, добытых из различных ядов.

Причём, на ASIC1 преимущественно действуют вещества из ядов змей и пауков, а на ASIC3 преимущественно действуют вещества из ядов морских анемонов. [5]

PcTx1.

Пожалуй, наиболее изученным модулятором активности ASIC каналов можно считать PcTx1.

Псалмотоксин - PcTx1 (также известный как π -TRTX-Pc1a) это пептид, выделенный из яда Тринидадского шевронного тарантула *Psalmoroeus cambridgei* (Escoubas et al., 2000). Этот белковый яд способен избирательно блокировать работу ASIC1a канала

Псалмотоксин состоит из 40 аминокислот. Трёхмерная структура состоит из компактного дисульфидно-связанного ядра, от которого отходят три петли и N- и C-концы. Основным элементом структуры является трехцепочечный антипараллельный β -лист. [10]

Этот яд может быть отнесён к ингибиторам цистинового узла (ICK) белка. Немало подобных ядов было выделено из улиток и скорпионов, но среди ИКК-токсинов псалмотоксин - единственный известный пептид, действующий на гомомерные каналы ASIC1. [9]

При связывании PcTx1 с ASIC1a увеличивает сродство этого протон-чувствительного канала к H⁺. При этом канал переходит в десенситизированное состояние при привычной концентрации протонов (рН = 7,4). При десенситизации канал связан со своим лигандом, с H⁺, но не способен пропускать через себя ионы.

PcTx1 был выделен как первый высокомолекулярный и селективный ингибитор гомомерного ASIC1a (крысиный ЛД50 ~1 нМ при рН 7,45 и ЛД50 ~3 нМ при рН 7,2). Впоследствии было показано, что PcTx1 также ингибирует токи в коэкспрессирующих ASIC1a/2b клетках (ЛД50 мыши ~3 нМ) и гетеротоки в гетеротоках. (~3 нМ) и гетеромерных крысиных каналов ASIC1a/2a (на ~35-85% при 50 нМ в состоянии при рН 6,95 в зависимости от состава тримера) (Joeres et al., 2016; Sherwood et al., 2011).

ЯМР-структура PcTx1 (Рис.1), которая была впервые раскрыта в 2003 году и уточнена в 2011 году, показала наличие ингибиторного цистеинового узла (ИКУ) и то, что доминирующая β-волосковая петля (петля 4), в которой представлены некоторые из ключевых фармакофорных остатков, является очень гибкой (Escoubas et al., 2003; Saez et al., 2011).

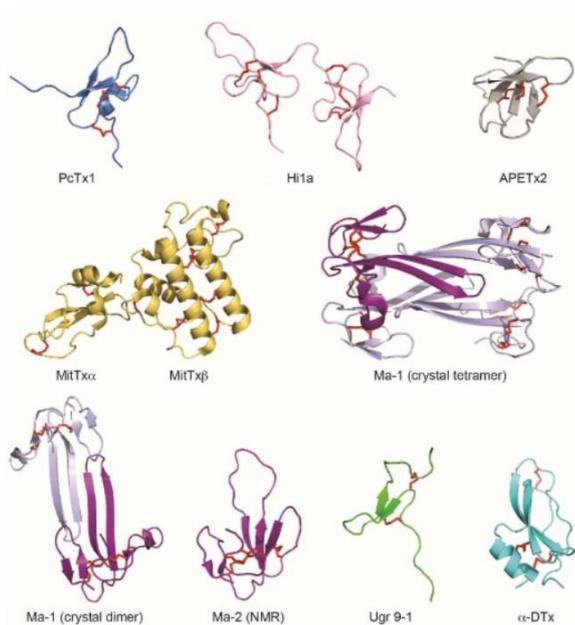


Рисунок 1. Модулирующие активность ASIC каналов пептидные вещества..

(А) Аминокислотная последовательность пептидов сгруппированных с гомологами, где они присутствуют. Различия в последовательностях обозначены серыми рамками, а активные сайты - треугольниками над фармакофорными остатками. а активные сайты - треугольниками над фармакофорным остатком. (В) Трехмерная структура PcTx1 (PDB код 2KNI; (Saez et al., 2011)), APETx2 (PDB код 2MUB; [11], Hi1a (PDB-код 2N8F; (Chassagnon et al., 2017)), Ma-1 (PDB-коды 5DU1, 5DZ5; (Mourier et al., 2016)), Ma-2 (PDB код 2MFA; (Schroeder et al., 2014)), MitTx (PDB код 4NTW; (Baconguis

et al., 2014)), Ugr 9-1 (PDB код 2LZO; (Osmakov et al., 2013)), и α -DTx (PDB-код 1DTX; (Skarżyński, 1992)).

Hm3a

Помимо псалмотоксина, учёные смогли выделить также другой интересный модулятор активности ASIC каналов - π -TRTX-Hm3a (Hm3a). Этот модулятор был выделен из яда Тоголезского звездно-полосатого тарантула (*Heteroscodra maculata*)

Структура этого яда отличается от структуры псалмотоксина на пять аминокислот и короче на три остатка на С-конце.

Hm3a чрезвычайно стабилен в человеческой сыворотке в течение 48 часов (оставалось ~87%), в то время как PcTx1 оставалось в течение того же времени ~35%. Hm3a практически не разрушается в течение 48 часов при 55 °С, а PcTx1 разрушается (~24%).

Превосходная стабильность Hm3a по сравнению с PcTx1, в сочетании с аналогичной фармакологией пептидов делает Hm3a потенциально более привлекательным инструментом для исследований ASIC in vivo. [5]

H1a

Этот модулятор активности ASIC каналов был найден относительно недавно при анализе транскриптома ядовитых желез австралийского воронковидного паука (*Hadronyche infensa*).

N-концевой участок этого соединения имеет высокое сходство в строении с PcTx1 (62% идентичности). При этом H1a почти вдвое длиннее псалмотоксина и состоит из 75 аминокислотных остатков.

С-концевой домен H1a тоже очень схож с строением псалмотоксина (50% идентичности). [4]

В исследованиях 2010 года было показано, что H1a является очень сильным ингибитором ASIC1a (LD50 400-500 мкМ) и имеет два последовательно расположенных ИСК мотивов, аналогично агонисту TRPV1 DkTx [2]

В отличие от PcTx1 и Hm3a, которые влияют на десенситизацию ASIC1 в pH-зависимой и быстро обратимой манере, H1a селективно ингибирует активацию ASIC1a в медленно обратимой манере и оказывает незначительное влияние на ASIC1b до 1 мкМ.

APETx2

APETx2 - это пептид, состоящий из 42 аминокислотных остатков. Его выделили из экстрактов морского анемона *Anthopleura elegantissima*.

Этот пептид стал первым мощным селективным ингибитором ASIC3 субъединиц - ЛД50 63 нМ для гомомерных rASIC3 и 0,1-2 мкМ для гетеромерных rASIC3-содержащих каналов [8].

APETx2 ингибирует типичный рН-индуцированный ток; устойчивый ток, вызванный рН 7,0 ASIC3 [7], а также щелочно-индуцируемый ток hASIC3.[6] При этом, APETx2 не способен ингибировать сильный ток, который наступает при снижении рН ниже 5,0. [8]

В состав APETx2 входят: компактное гидрофобное ядро, которое состоит из четырёхцепочечного β -листа, в котором находятся три дисульфидные связи [3] [11]

В 2012 году было показано, что фармакофор APETx2 для ASIC3 представляет собой непрерывную поверхность, состоящую из петель 2 и 4 и N-конца (рис.2)

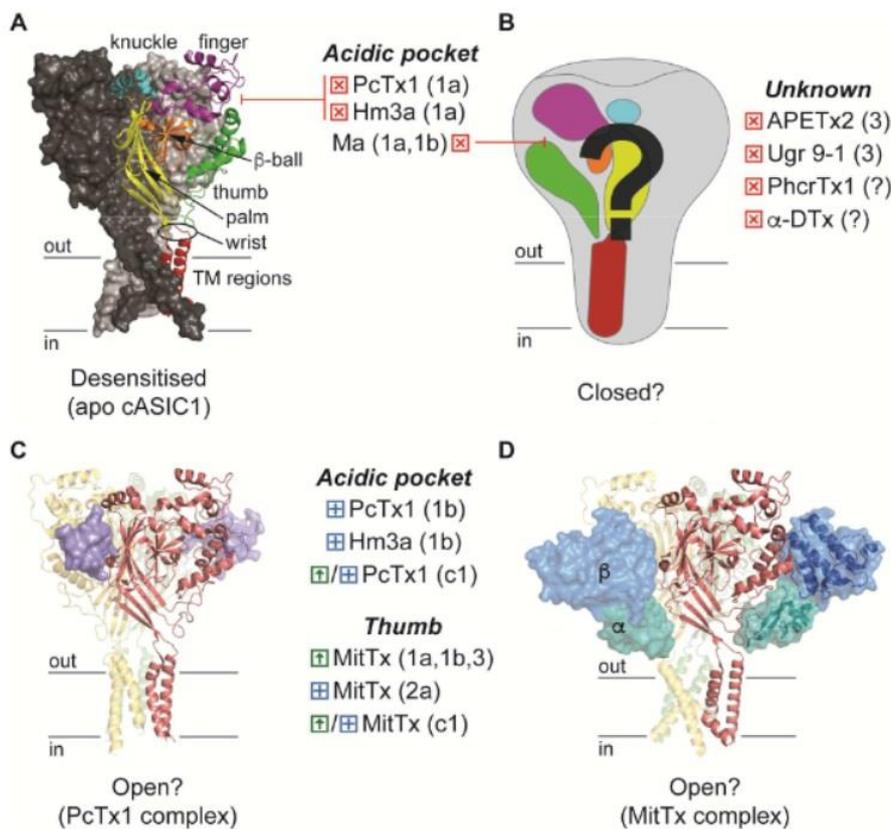


Рисунок 2.

Пока ещё не были в полной мере раскрыты молекулярные детали взаимодействия между APETx2 и ASIC3. Предполагается, что APETx2 смещает видимое сродство канала к протонам [1]

Так как APETx2 является самым мощным лигандом из доступных учёным для изучения ASIC3 субъединиц, однозначное определение места его связывания и механизма действия очень важно для последующей разработки более селективных аналогов и для дальнейшего понимания структуры и функции ASIC3 каналов *in vivo*.

Источники:

1. Baron, A., Diochot, S., Salinas, M., Deval, E., Noël, J., Lingueglia, E., 2013. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 75, 187-204.
2. Bohlen, C. J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J., Julius, D., 2010. A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell* 141, 834-845
3. Chagot, B., Escoubas, P., Diochot, S., Bernard, C., Lazdunski, M., Darbon, H., 2005. Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels. *Protein Sci.* 14, 2003-2010 ;
4. Chassagnon, I. R., McCarthy, C. A., Chin, Y. K., Pineda, S. S., Keramidas, A., Mobli, M., Pham, V., De Silva, T. M., Lynch, J. W., Widdop, R. E., Rash, L. D., King, G. F., 2017.
5. Cristofori-Armstrong, B., & Rash, L. D. (2017). *Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: Insights from spider, snake and sea anemone venoms. Neuropharmacology*, 127, 173–184. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.
6. Delaunay, A., Gasull, X., Salinas, M., Noel, J., Friend, V., Lingueglia, E., Deval, E., 2012. Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 13124-13129.
7. Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M., Lingueglia, E., 2011. Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J. Neurosci.* 31, 6059-6066.
8. Diochot, S., Baron, A., Rash, L. D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M., 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 23, 1516-1525.
9. Escoubas P, Bernard C, Lambeau G, Lazdunski M, Darbon H (July 2003). "Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels". *Protein Science*. **12** (7): 1332–43. doi:10.1110/ps.0307003. PMC 2323924. PMID 12824480.
10. Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, Moinier D, Ménez A, Lazdunski M (August 2000). "Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels". *The Journal of Biological Chemistry*. **275** (33): 25116–21.
11. Jensen, J. E., Cristofori-Armstrong, B., Anangi, R., Rosengren, K. J., Lau, C. H., Mobli, M., Brust, A., Alewood, P. F., King, G. F., Rash, L. D., 2014. Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: the analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores. *J. Med. Chem.* 57, 9195-9203