

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-233

**ПИКОВЫЕ И СТАЦИОНАРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ОТВЕТОВ ASIC2A  
ИМЕЮТ РАЗНУЮ ИОННУЮ СЕЛЕКТИВНОСТЬ \*****PEAK AND STEADY-STATE COMPONENTS OF THE RESPONSE  
HAVE DIFFERENT ION SELECTIVITY**

К. К. Евланенков

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург*

К. К. Evlanenkov

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg*

✉ konstantin361@iephb.ru

**Аннотация**

Протон-активируемые ионные каналы (ASICs) широко представлены в центральной и периферической нервной системе позвоночных животных. В данной работе было показано, что ASIC2a-каналы обладают двумя открытыми состояниями с разной ионной селективностью.

**Abstract**

Acid-sensing ion channels (ASICs) are widely expressed in the central and peripheral nervous system of vertebrates. In this work, it has been shown that ASIC2a channels possess two open states with different ionic selectivity.

Протон-активируемые ионные каналы активируются быстрым падением pH внеклеточной среды [1]. Они вовлечены во многие физиологические и патологические процессы, такие как синаптическая передача, синаптическая пластичность, память, обучение, страх, восприятие боли, депрессия, эпилепсия, инсульт и др. [2]. Изучение структурных особенностей протон-активируемых ионных каналов и механизмов действия их модуляторов необходимо для направленного синтеза высокоселективных лигандов, которые могут использоваться в физиологических исследованиях и, в конечном итоге, в медицинской практике. Одним из важных различий между ASIC1a и ASIC2a является наличие у последних стационарного компонента ответа на закисление [3].

Ранее нами было установлено, что пиковый и стационарный компоненты ответа ASIC2a-каналов имеют разную чувствительность к блокатору диминазена и потенциатору Ru-1355 [4]. Целью данного исследования было сравнение пикового и стационарного компонентов по ионной селективности.

Эксперименты проводились на рекомбинантных рецепторах, трансфицированных в клетках линии CHO. Клетки культивировались в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> и контроле относительной влажности. Среда для роста клеток состояла из DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), эмбриональной коровьей сыворотки (10 %) и антибиотика гентамицина (50 мкг/мл). Транфекция проводилась с помощью реагента Lipofectamine 2000 согласно протоколу производителя. Регистрация токов осуществлялась методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка». Состав стандартных растворов — содержимое микропипетки (в mM): CsF 100, CsCl 40, NaCl 5, CaCl<sub>2</sub> 0.5, EGTA 5, HEPES 10; внеклеточный раствор (в mM): NaCl 143, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1, D-glucose 18, MES 10, HEPES 10. Состав инвертированных растворов — содержимое микропипетки (в mM): NaCl 150, HEPES 10, EGTA 10; внеклеточный раствор (в mM): KCl 150, HEPES 10, MES 10, CaCl<sub>2</sub> 2.5. Растворы с низкими значениями pH, которые использовали для активации ASICs, получали добавляя HCl во внеклеточный раствор.

Поскольку ASICs имеют преимущественно натриевую проводимость, в стандартных растворах потенциал реверсии находится в положительном диапазоне значений, в которых регистрация токов усложнена. Сопоставление пиковых и стационарных токов при потенциалах 0 мВ и –80 мВ показало, что их отношение составляет  $0,27 \pm 0,07$  и  $0,12 \pm 0,04$ . Данное различие косвенно свидетельствует о различии потенциалов реверсии. Чтобы точно измерить потенциалы реверсии, необходимо было подобрать внеклеточный и внутриклеточный растворы так, чтобы потенциал реверсии оказался в отрицательном диапазоне значений, где измерения стабильны и надежны. Это было достигнуто за счет применения инвертированных растворов, описанных выше.

\* Исследование было выполнено в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

Ответы ASIC2a при разных потенциалах в инвертированных растворах. При потенциале  $-15$  мВ пиковый и стационарный компоненты имеют разную направленность, что прямо свидетельствует о различной ионной селективности

Исследование ответов ASIC2a при разных потенциалах позволило построить вольтамперные кривые обоих компонентов ответа и определить их потенциалы реверсии. Оказалось, что для стационарного компонента ответа потенциал реверсии составляет  $-14 \pm 6$  мВ, а для пикового  $-33 \pm 6$  мВ. Это означает, что пиковый компонент обладает большей избирательностью для ионов натрия, чем стационарный компонент. Более того, оказалось возможным всегда подобрать такой потенциал, при котором пиковый компонент ответа является выходящим током, а стационарный — входящим (см. рисунок). Это прямое доказательство различной ионной селективности. Различия ионной селективности пикового и стационарного компонентов ответа являются уникальным свойством ASIC2a. У других типов ионных каналов стационарный компонент является недесенситизирующей фракцией пикового ответа и, соответственно, обладает той же ионной селективностью.

### Литература

1. Waldmann R. et al. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // *Nature*. 1997. Vol. 386, No. 6621. P. 173–177.
2. Storozhuk M. et al. Acid-sensing ion channels: focus on physiological and some pathological roles in the brain // *Current neuropharmacology*. 2021. Vol. 19, No. 9. P. 1570.
3. Hesselager M., Timmermann D. B., Ahring P. K. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, No. 12. P. 11006–11015.
4. Evlanenkov K. K. et al. Derivatives of 2-aminobenzimidazole potentiate ASIC open state with slow kinetics of activation and desensitization // *Frontiers in Physiology*. 2023. Vol. 14. P. 1018551.