

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И АСПИРИНА С КИСЛОТО-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ ИОННЫМИ КАНАЛАМИ *TRICHOPLAX ADHAERENS*

Кузнецов А.В.^{1,2}, Курченко В.М.¹, Воронин Д.П.¹, Завьялова О.С.¹

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: kuznet61@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0483

Аннотация. Кислото-чувствительные ионные каналы (ASICs) представляют семейство мембранных трёх-субъединичных белков DEG/ENaC, проводящих ионы Na⁺, которые встречаются у представителей многих таксономических групп [1]. DEG/ENaC-каналы включают такие структурные домены, как ладонь, β-шар, костяшка, указательный палец, большой палец и запястье [2]. Будучи каналами с протонной регуляцией, они участвуют во многих физиологических процессах, когда изменяется pH внеклеточной среды [3]. Каналы DEG/ENaC связаны с широким спектром клеточных функций, как ощущение боли и эпителиальный транспорт Na⁺ [4]. Эти каналы обладают различными свойствами стробирования, от почти постоянного открытия до быстрой инактивации, поэтому с нарушением работы этих каналов связано большое число патологий [5]. Традиционно изучение функций этих каналов осуществляли с применением токсинов [6]. Мы обнаружили 9 генов кислото-чувствительных ионных каналов и 12 гомологов с неизвестной функцией в геноме трихоплакса *Trichoplax adhaerens*, две аминокислотные последовательности, из которых (QEP99390.1 и XP_002115321.1) были свёрнуты в пространственные модели и использованы для докинга амилорида, аспирина и салициловой кислоты. Салицилаты имеют множественные сайты связывания на кислото-чувствительных рецепторах трихоплакса, в том числе в кислотном кармане – сенсоре протонов, что предполагает их возможное использование для модуляции активности ASIC-каналов трихоплакса.

Ключевые слова: Placozoa, геном, ASIC-каналы, гомологии, фолдинг, докинг.

ВВЕДЕНИЕ

Кислото-чувствительные ионные каналы (ASICs - Acid-sensing ion channels) широко экспрессируются в организме человека и принадлежат к суперсемейству эпителиальных натриевых каналов, которые чувствительны к внеклеточным протонам и могут ощущать как кратковременное, так и продолжительное закисление [7]. На сегодня известно пять типов субъединиц (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b и ASIC3), кодируемые тремя генами человека (*ACCN2*, *ACCN1* и *ACCN3*), которые могут объединяться в кислотно-активируемые каналы [8]. Поскольку катионные ASIC-каналы присутствуют почти во всех типах нейронов, а в некоторых синаптических пузырьках содержится кислота, участие протонов в синаптической передаче может быть общим явлением для всей центральной нервной системы [3]. ASIC-каналы играют важную роль в различных патологиях, затрагивающих как периферическую нервную систему (например, периферическая боль, диабетическая нейропатия), так и центральную нервную систему (например, инсульт, эпилепсия, мигрень, тревога, страх, депрессия, нейродегенеративные заболевания и т.д.) [5].

Катионные ASIC-каналы являются возможными целями для широкого спектра препаратов [9]. Развитие фармакологии ASIC-каналов основано на изучении их структуры, молекулярных и клеточных функций и физиопатологической роли. Соединения, взаимодействующие с этими каналами, оказывают ингибирующее или стимулирующее действие, а также обладают высокой селективностью или низкой специфичностью. К ним относятся лекарственные препараты и эндогенные регуляторы, природные соединения растительного происхождения и пептиды, выделенные из ядов животных. Так, например, псалмотоксин 1 (PcTx1) может ингибировать или активировать ASIC-каналы в зависимости от подтипа канала и вида животных, а амилорид имеет различные сайты адсорбции, связанные с его ингибирующим и стимулирующим эффектами. Следует отметить, что лиганды не обязательно нацелены на одни и те же подтипы ASIC-каналов, иногда возможны множественные мишени [10].

Структура кислото-чувствительного канала впервые изучена на примере куриного ASIC1a-канала в комплексе с MitTx токсином тегасской коралловой змеи [11]. Оказалось, что три субъединицы объединяются для формирования ионпроводящей поры. Каждая субъединица имеет два трансмембранных домена, один внеклеточный домен с 14 характеристическими остатками цистеина и несколько консервативных аминокислотных мотивов. Остатки Gly443 в селективном фильтре образуют кольцо из трёх карбонильных атомов кислорода с радиусом 3,6 Å, представляя собой энергетический барьер для гидратированных ионов натрия. Внутренняя динамика кислото-чувствительного ионного канала ASIC1 коррелирует с механизмом стробирования. Поворот внеклеточного домена и коллективные движения между большим и указательным пальцами, вызванные связыванием протонов, приводят к изменению конформации рецептора в направлении от

внутриклеточной части к трансмембранной части белка, вызывая так называемое "поворот-открытие" поры канала. Особенности деформаций в трансмембранном домене указывают на то, что вероятное положение ворот канала находится в районе Leu440 [12].

Показано, что Placozoa очень чувствительны к кислотному стрессу [13]. В *Trichoplax adhaerens* был описан кислото-зависимый канал утечки ионов Na^+ , семейства DEG/EpaC, называемый TadNaC6, который также блокируется ионами Ca^{2+} . Протонный блок усиливался при низкой внешней концентрации ионов Ca^{2+} , тогда как кальциевый блок интенсифицировался при малой внешней концентрации протонов, что указывает на конкурентное связывание этих двух лигандов с внеклеточными участками канального белка. TadNaC6 активируется общим блокатором DEG/EpaC-каналов амилоридом, что является редкой особенностью, о которой сообщалось только для кислотно-активируемого канала ASIC3 [14]. Известно, что устойчивый ток в ASIC3-канале блокируется также салициловой кислотой, аспирином и диклофенаком [15]. Амилорид и его дериваты имеют различные сайты связывания на ASIC-каналах, как например, в кислотном кармане – сенсоре протонов, в затворе катионного канала и в непротонном сайте связывания лигандов, называемом – ладонь [10].

В этой связи, значительный теоретический интерес представляет изучение связывания низкомолекулярных лигандов с потенциальными ASIC-мишенями для модуляции чувствительности трихоплакс к низким значениям pH [16] с помощью компаундов, заменяющих амилорид, как например, салициловая кислота и аспирин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аминокислотные последовательности кислото-чувствительных ионных каналов (ASICs) *T. adhaerens* были выбраны из базы данных *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* [17].

Множественные выравнивания и построение деревьев гомологий аминокислотных последовательностей ASIC-каналов проводили на EMBL-EBI-сервере – European Bioinformatics Institute с использованием программы Clustal Omega (1.2.4) [18].

Построение 3D-моделей ASIC-каналов осуществляли на Phyte2-сервере методом сравнения гомологичных последовательностей с известными пространственными структурами белков. Оценивали достоверность и полноту покрытия исследуемых аминокислотных последовательностей [19].

Докинг лигандов с белками. Полученные 3D-модели ASIC-каналов и координаты атомов салициловой кислоты, аспирина или амилорида загружали на SwissDock-сервер. Изучали все возвращённые конформации связанных с белками лигандов и оценивали величину ΔG (ккал/моль) как разность свободной энергии Гиббса конечного состояния (в составе комплекса) и начального состояния (в свободном виде) [20].

Визуализацию молекулярных структур выполняли с использованием программы RasMol [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Амилорид представляет собой синтетическое производное пиразина (рис. 1в). Амилорид является модулятором кислото-чувствительных ASIC-каналов [10]. В частности, амилорид ингибирует натриевые каналы, расположенные в дистальных канальцах почек, тем самым предотвращая всасывание натрия. Салициловая кислота и аспирин, наряду с амилоридом также являются синтетическими модуляторами ASIC-каналов. Сообщалось, что в отличие от амилорида небольшие молекулы, не всегда являются ингибиторами ASIC-токов [10].

Салициловая кислота — это моногидроксibenзойная кислота, которая представляет собой бензойную кислоту с гидроксигруппой в орто-положении (рис. 1а). Салициловая кислота встречается в растениях в качестве естественного соединения. Она обладает противовоспалительными свойствами, действует как местное антибактериальное средство и играет роль ингибитора L-аскорбат пероксидазы (EC 1.11.1.11).

Аспирин или ацетилсалициловая кислота является нестероидным противовоспалительным средством (рис. 1б). Ацетилсалициловая кислота относится к неселективным ингибиторам циклооксигеназы, т.к. связывается и ацетирует остатки серина в циклооксигеназах. Это вещество обладает анальгетическими, жаропонижающими и антикоагулянтными свойствами.

В основе докинга, т.е. исследования взаимодействия лигандов с макромолекулами-мишенями *in silico*, в качестве стандарта были выбраны известные кристаллические структуры 4fz0 и 4fz1 [22] кислото-чувствительного ионного канала курицы *Gallus gallus* в комплексе с псалмотоксином 1 при низком значении pH (рис. 2). Координаты атомов макромолекул использовали в расчётах по связыванию низкомолекулярных лигандов (рис. 3, табл. 1). Из файла 4fz1.pdb удалили координаты атомов псалмотоксина, получив свободный мономер кислото-чувствительного ионного канала 4fz1 delta (рис. 2в, 2е).

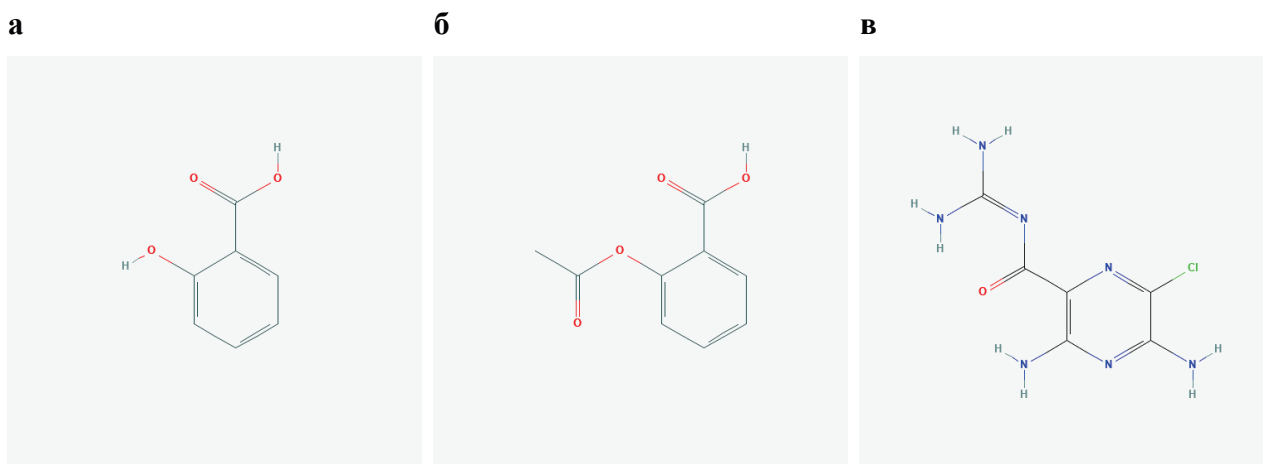


Рисунок 1. Структурные формулы салициловой кислоты (а), аспирина (б) и амилорида (в) в порядке их возрастающей сложности

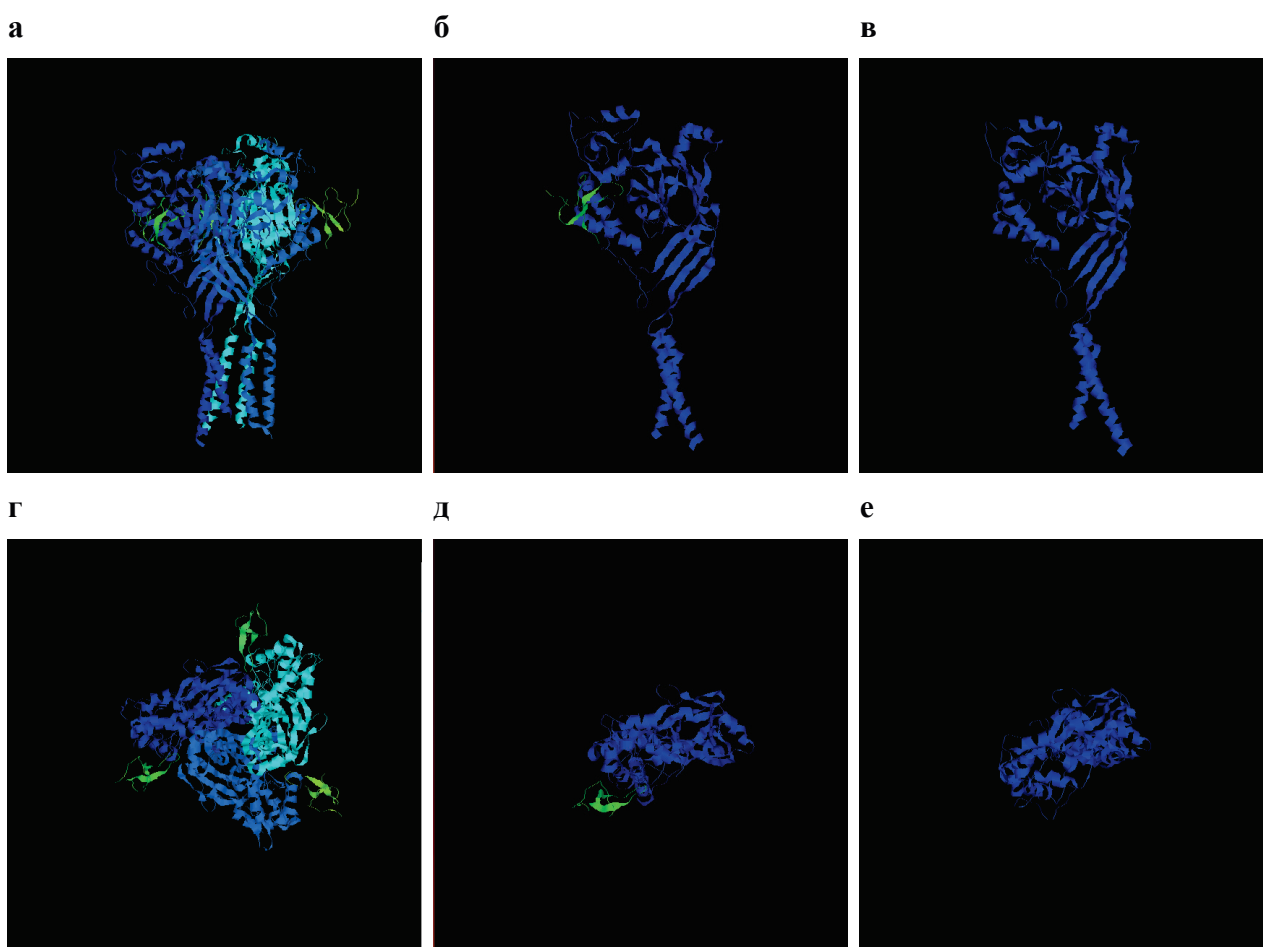


Рисунок 2. Трёхмерные структуры кислото-чувствительного ионного канала курицы *G. gallus* в двух проекциях, тример (4fz0) в комплексе с тремя молекулами плазматоксина (вид сбоку - а, вид сверху - г), мономер (4fz1) в комплексе с плазматоксином (б, д) и мономер без плазматоксина (в, е), ионный канал обозначен голубым цветом, плазматоксин – зелёным

Результаты докинга салициловой кислоты и аспирина с одной субъединицей кислото-чувствительного ионного канала курицы в присутствии плазматоксина (4fz1) и без него (4fz1delta) выявили множественные места связывания для всех вариантов экспериментов (рис. 3). Интересно отметить, что в присутствии плазматоксина, в области кислотного кармана связывалось больше молекул салициловой кислоты или аспирина (рис. 3а, 3в), чем в отсутствие плазматоксина (рис. 3б, 3г), что согласуется с данными по активации этого канала плазматоксином [22].

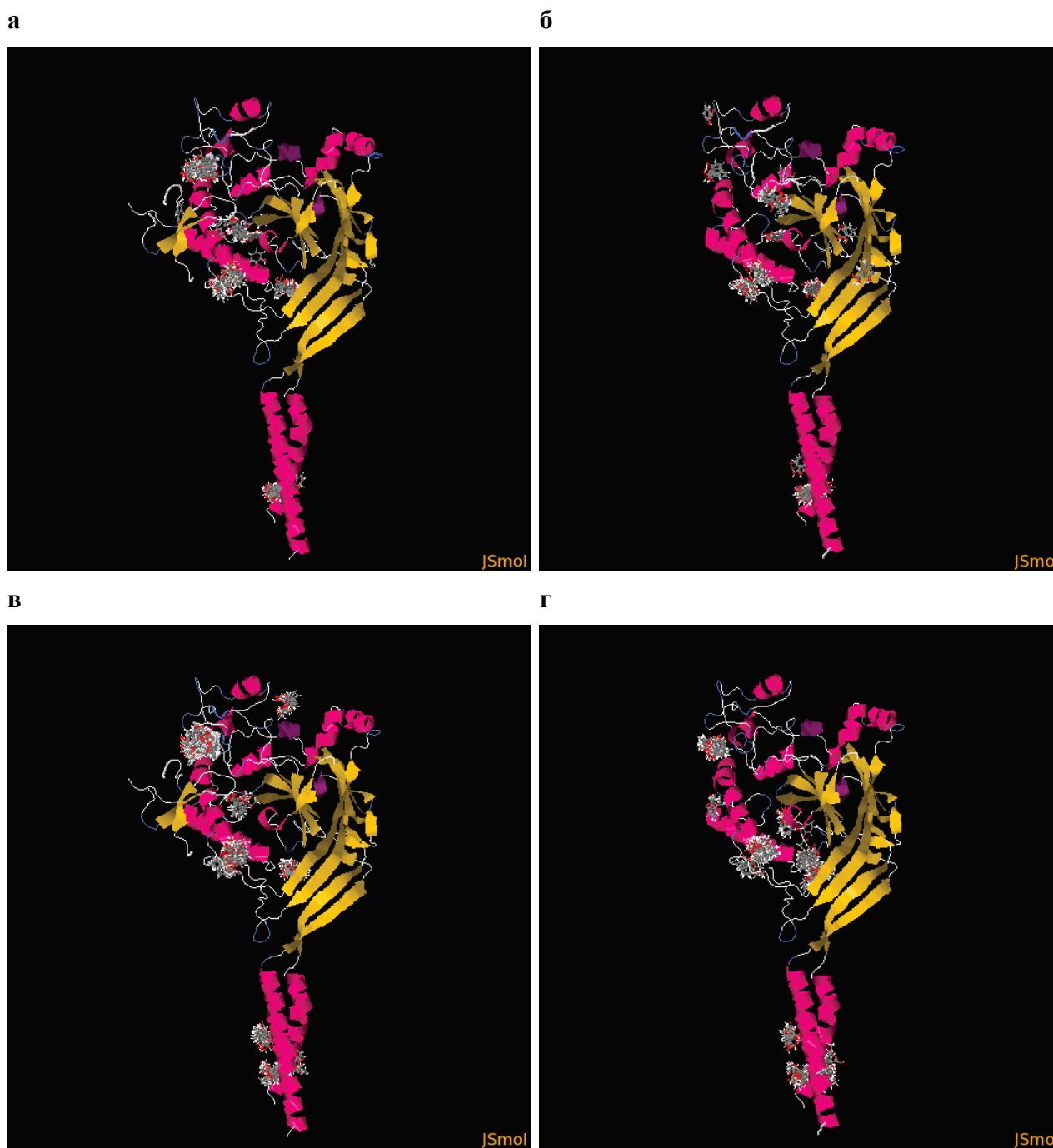


Рисунок 3. Связывание салициловой кислоты (а, б) и аспирина (в, г) с одной субъединицей кислото-чувствительного ионного канала курицы 4fz1 в присутствии плазмотоксина, что не показано (а, в) и без него (б, г), α -спирали отмечены пурпурным цветом, β -слои – жёлтым, суперпозиции связывания лигандов – белыми облаками

Расчёт энергетических характеристик связывания низкомолекулярных лигандов с макромолекулами показывает наибольшую специфичность для простейшего из используемых низкомолекулярных компаундов, салициловой кислоты (рис. 1а), при взаимодействии с ASIC1a-каналом курицы без плазмотоксина (рис. 3в, 3г), где положение, как кластер 0 и элемент 0, величина полного соответствия $-2633,93$ ккал/моль и расчётное значение ΔG $-6,56$ ккал/моль (табл. 1) согласуются с [10].

Биоинформационный поиск в геноме трихоплакса *T. adhaerens* по запросу, основанному на аминокислотной последовательности ASIC1a-канала курицы без плазмотоксина 4fz1delta, выявил 9 кислото-чувствительных ионных каналов и 12 гомологов с неопределённой функцией, направляющие деревья гомологий которых приведены на рисунке 4, где видно, что аннотированные белковые последовательности перемежаются с неаннотированными последовательностями протеинов (рис. 4в). Данное обстоятельство позволяет присвоить последним гипотетические функции ASIC-каналов, как было сделано ранее для опсинов трихоплаксов и мнемипсиса [23].

Таблица 1. Анализ взаимодействия одной субъединицы кислото-чувствительного ионного канала курицы (4fz1) в присутствии плазматоксина и без него (4fz1delta) с салициловой кислотой и аспирином

рН-зависимый ионный канал	Лиганд	Кластер	Элемент	Полное соответствие, ккал/моль	Расчётное значение ΔG , ккал/моль
в присутствии плазматоксина	салициловая кислота	0	0	-2785,85	-6,59
		1	0	-2785,57	-6,79
в присутствии плазматоксина	аспирин	1	0	-2777,05	-6,52
		14	0	-2773,69	-6,91
без плазматоксина	салициловая кислота	0	0	-2633,93	-6,56
		0	0	-2633,93	-6,56
без плазматоксина	аспирин	1	0	-2625,11	-6,52
		1	3	-2622,01	-6,77

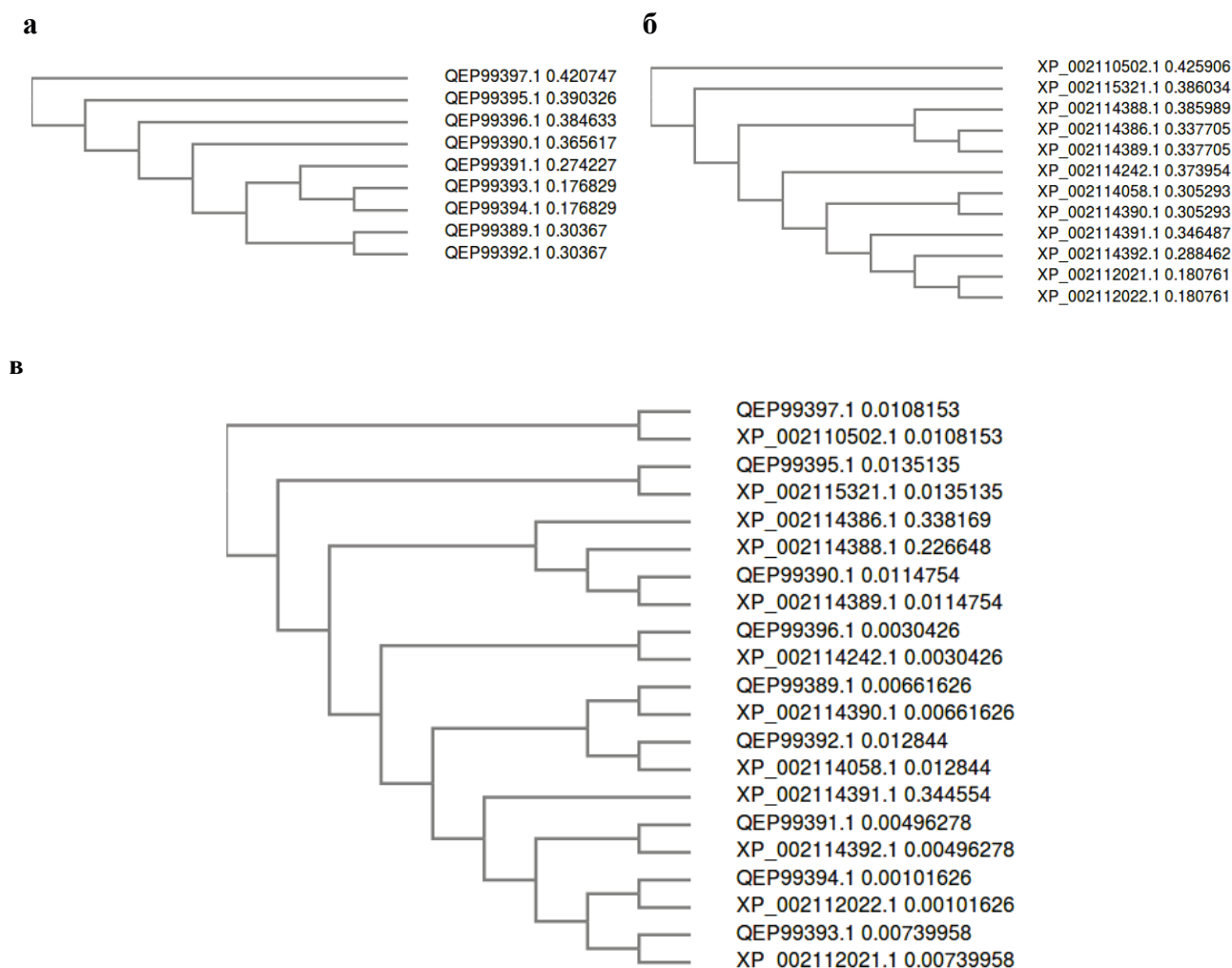


Рисунок 4. Направляющие деревья аминокислотных последовательностей кислото-чувствительных ионных каналов *T. adhaerens* (а), их гипотетических гомологов (б) и общего множества этих протеинов (в), цифры справа – дистанции между листьями

Результаты гомологичного выравнивания с наибольшим покрытием 98% ($E_v=2e^{-70}$, длина 523 аа) для субъединицы кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и покрытием 97% ($E_v=1e^{-81}$, длина 555 аа) для гипотетического белка XP_002115321.1, соответственно, были использованы для фолдинга протеинов с целью получения их 3D-моделей (рис. 5).

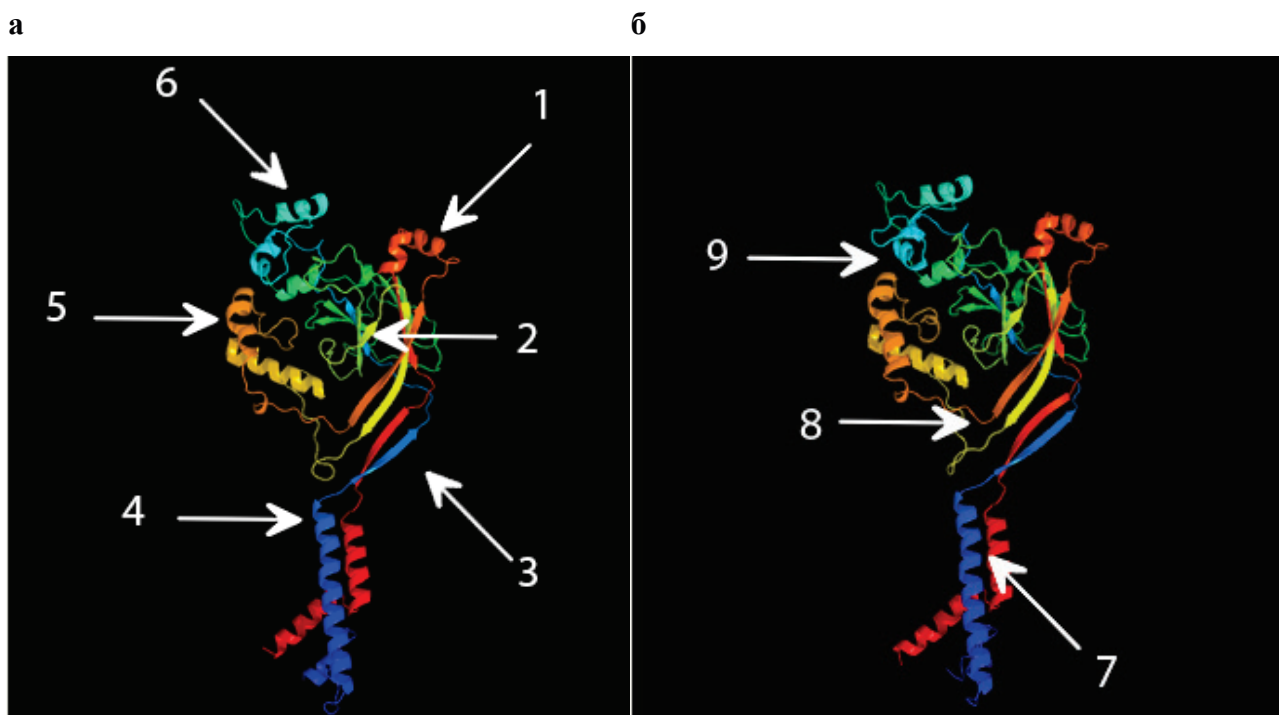


Рисунок 5. Пространственные модели одной из трёх субъединиц кислотно-чувствительного ионного канала QER99390.1 (а) и гипотетического белка XP_002115321.1 (б) из *T. adhaerens*, включающие типичные структурные домены, как костяшка (1), β -шар (2), ладонь (3), запястье (4), большой палец (5) и указательный палец (6) в соответствии с моделью левой руки, держащей мяч [2], ворота канала (7), непротонный сайт (8), протонный карман (9) [10], N-конец – голубой, С-конец – красный

Пространственная модель канального протеина QER99390.1 длиной 425 аминокислотных остатков построена с высоким счётом, достоверностью 100% и охватом 81%. Модель гипотетического белка XP_002115321.1 длиной 438 аминокислотных остатка рассчитана на основе того же высококачественного шаблона sbv1C. Стоит отметить, что для клонированного кислото-чувствительного ионного канала TadNaC6 (TadASIC6, QER99393.1, MK547547) длиной 492 aa из работы [14] полнота покрытия составила 96%, а $E_v=3e^{-45}$.

Докинг салициловой кислоты и аспирина с 3D-моделями макромолекул кислото-чувствительного ионного канала QER99390.1 и гипотетического белка XP_002115321.1 из *T. adhaerens* выявил множественные места связывания низкомолекулярных лигандов на непротонном сайте связывания лигандов в домене ладонь, в протонном кармане и в области ворот канала, как было определено в [10]. Так, например, аспирин связывался преимущественно в районе канального затвора и в основании ладони, но в меньшей степени в районе большого пальца, указательного пальца и костяшек для QER99390.1, тогда как он в меньшей степени адсорбировался в районе указательного пальца и не взаимодействовал с большим пальцем и костяшками XP_002115321.1. Напротив, салициловая кислота почти не связывалась со шлюзом канала QER99390.1 и не взаимодействовала с большим пальцем XP_002115321.1, но связывалась со всеми другими доменами, включая β -шар (рис. 6).

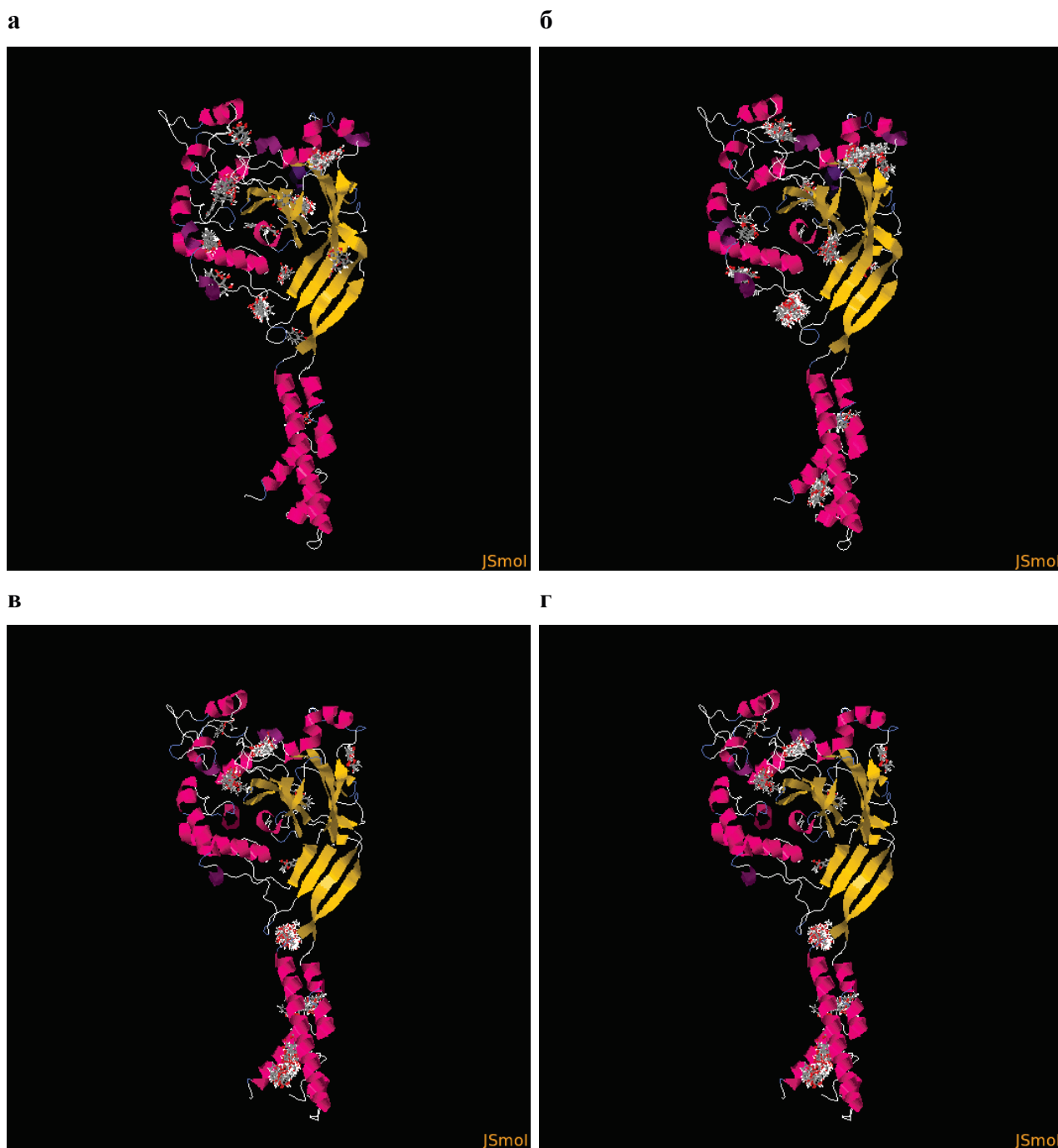


Рисунок 6. Связывание салициловой кислоты (а, б) и аспирина (в, г) с одной субъединицей пространственной модели кислотно-чувствительного ионного канала QER99390.1 (а, в) и гипотетического белка XP_002115321.1 (б, г) из *T. Adhaerens*

Наибольшее абсолютное значение свободной энергии Гиббса (ΔG) равное 6,51 и 6,73 ккал/моль, зафиксировано для связывания аспирина с белком QER99390.1 в районе основания ладони. Салициловая кислота менее интенсивно связывалась в области β -шара со значениями ΔG равными -6,39 и -6,45 ккал/моль. Специфическое связывание отмечено для пары аспирин-XP_002115321.1 со значением $\Delta G=-6,37$ ккал/моль и пары салициловая кислота-QER99390.1 с показателем $\Delta G=-6,29$ ккал/моль (рис. 6, табл. 2).

Таблица 2. Анализ взаимодействия 3D-модели субъединицы кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и гипотетического белка XR_002115321.1 из *T. adhaerens* с салициловой кислотой и аспирином

рН-зависимый ионный канал	Лиганд	Кластер	Элемент	Полное соответствие, ккал/моль	Расчётное значение ΔG , ккал/моль
QEP99390.1	салициловая кислота	2	0	-2589,92	-6,29
		2	0	-2589,92	-6,29
QEP99390.1	аспирин	1	0	-2581,81	-6,51
		3	0	-2580,11	-6,73
XR_002115321.1	салициловая кислота	0	0	-2668,00	-6,39
		1	1	-2667,73	-6,45
XR_002115321.1	аспирин	0	0	-2658,40	-6,37
		0	0	-2658,40	-6,37

Контрольное взаимодействие амилорида с субъединицей 4fz1delta курицы *G. gallus* оказалось более специфично, чем с 3D-моделями кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и гипотетического белка XR_002115321.1 из *T. adhaerens* (Пр. 1). Так амилорид преимущественно связывался в области ворот канала, протонного сайта связывания лиганда и в районе протонного кармана между большим и указательным пальцами субъединицы 4fz1delta ASIC1a-канала курицы (Пр. 1a), что согласуется с [2,10]. Максимальные абсолютные значения энергии Гиббса ΔG в районе протонного сайта связывания лиганда составляли 7,33 и 7,39 ккал/моль (Пр. 2).

В свою очередь, при взаимодействии с пространственной моделью QEP99390.1, амилорид наиболее эффективно связывался в районе указательного пальца и костяшек со значениями ΔG равными -7,65 и -7,07 ккал/моль, соответственно (Пр. 1, 2), а также в протонном кармане, протонном сайте связывания лигандов и в области ионных ворот (Пр. 1).

При взаимодействии с 3D-моделью XR_002115321.1, амилорид интенсивно связывался в месте расположения β -шара со значениями ΔG равными -7,57 и -6,98 ккал/моль. Кроме того, связывание отмечено в протонном кармане, протонном сайте связывания лигандов и, особенно, в области ворот канала. Помимо этого, выявлены участки связывания в запястье, между указательным пальцем и костяшками, а также в районе костяшек и β -шара.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, компьютерное моделирование показало, что салицилаты имеют множественные сайты связывания на кислото-чувствительных рецепторах трихоплакса в том числе в кислотном кармане – сенсоре протонов [24], что позволяет надеяться на модуляцию состояния животных в лабораторных экспериментах и обнаружение ярких физиологических эффектов, как например, активация или ингибирование образования розеток при закислении среды [16].

Авторы считают своим долгом выразить благодарность Булкову В.А. и Хавронюку И.С. за содействие, а также Ратникову В.Д., Рыбаковой К.А., Втюриной Д.Н., Халаимовой А.В. и Капранову С.В. за обсуждение рукописи. Работа выполнена в рамках проекта Сириус «Трихоплакс для бионики II».

Список литературы / References:

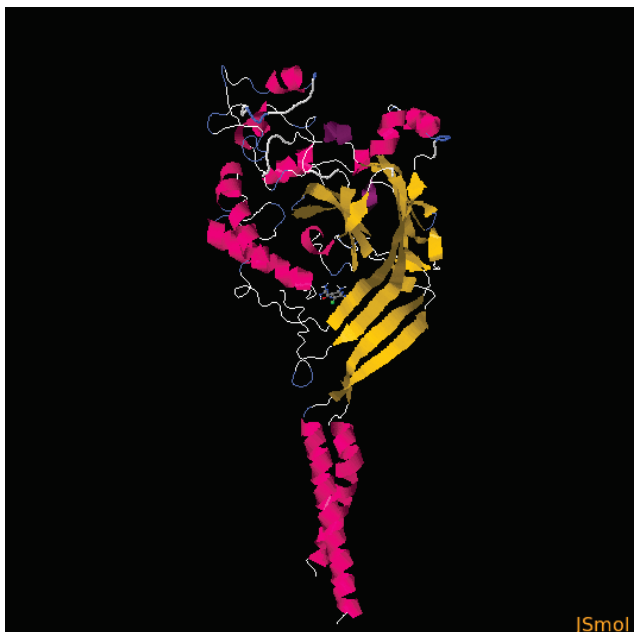
1. Wichmann L., Althaus M. Evolution of epithelial sodium channels: current concepts and hypotheses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2020, vol. 319, no. 4, pp. 387-400, doi: 10.1152/ajpregu.00144.2020.
2. Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, 2007, vol. 449, no. 7160, pp. 316-323, doi: 10.1038/nature06163.
3. González-Inchauste C., Gobetto M.N., Uchitel O.D. Modulation of acid sensing ion channel dependent protonergic neurotransmission at the mouse calyx of Held. *Neuroscience*, 2020, vol. 439, pp. 195-210, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.04.023.
4. Hanukoglu I., Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*, 2016, vol. 579, no. 2, pp. 95-132, doi: 10.1016/j.gene.2015.12.061.
5. Radu B.M., Banciu A., Banciu D.D., Radu M. Acid-Sensing Ion Channels as Potential Pharmacological Targets in Peripheral and Central Nervous System Diseases. *Adv. Protein. Chem. Struct. Biol.*, 2016, vol. 103, pp. 137-167, doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.10.002.

6. Cristofori-Armstrong B., Rash L.D. Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: Insights from spider, snake and sea anemone venoms. *Neuropharmacology*, 2017, pp. 173-184, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.042.
7. Gründer S., Pusch M. Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology*, 2015, vol. 94, pp. 9-18, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.016.
8. Gründer S., Geissler H.S., Bässler E.L., Ruppertsberg J.P. A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport*, 2000, vol. 11, no. 8, pp. 1607-11, doi: 10.1097/00001756-200006050-00003.
9. Sluka K.A., Winter O.C., Wemmie J.A. Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2009, vol. 12, no. 5, pp. 693-704.
10. Baron A., Lingueglia E. Pharmacology of acid-sensing ion channels – Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology*, 2015, vol. 94, pp. 19-35, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.01.005.
11. Bacongus I., Bohlen C.J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel. *Cell*, 2014, vol. 13, no. 156, pp. 717-729, doi: 10.1016/j.cell.2014.01.011.
12. Yang H., Yu Y., Li W.G., Yu F., Cao H., Xu T.L., Jiang H. Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism. *PLoS Biol.*, 2009, vol. 7, no. 7, e1000151, doi: 10.1371/journal.pbio.1000151.
13. Schleicherová D., Dulias K., Osigus H.J., Paknia O., Hadrys H., Schierwater B. The most primitive metazoan animals, the placozoans, show high sensitivity to increasing ocean temperatures and acidities. *Ecol. Evol.*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 895-904, doi: 10.1002/ece3.2678.
14. Elkhatib W., Smith C.L., Senatore A. A Na(+) leak channel cloned from *Trichoplax adhaerens* extends extracellular pH and Ca(2+) sensing for the DEG/ENaC family close to the base of Metazoa. *J. Biol. Chem.*, 2019, vol. 294, no. 44, pp. 16320-16336, doi: 10.1074/jbc.RA119.010542.
15. Dorofeeva N.A., Barygin O.I., Staruschenko A., Bolshakov K.V., Magazanik L.G. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J. Neurochem.*, 2008, vol. 106, no. 1, pp. 429-441, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05412.x.
16. Булков В.А., Савченко Е.В., Кузнецов А.В. Placozoa как лакмусовая бумажка закисления океанов. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021», материалы XVI Междунар. науч. конф., г. Севастополь, 13-17 сентября 2021 г., с. 206-207. [Bulkov V.A., Savchenko E.V., Kuznetsov A.V. Placozoa as a litmus test for ocean acidification. *Proceedings of XVI International Scientific Conference «Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2021»*, Sevastopol, 2021, pp. 206-207. (In Russ.)]
17. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M.L., Signorovitch A.Y., Moreno M.A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I.V., Buss L.W., Schierwater B., Dellaporta S.L., Rokhsar D.S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, no. 7207, pp. 955-960, doi: 10.1038/nature07191.
18. Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, no. 1, pp. 636-641, doi: 10.1093/nar/gkz268.
19. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.*, 2015, vol. 10, no. 6, pp. 845-858, doi: 10.1038/nprot.2015.053.
20. Bitencourt-Ferreira G., de Azevedo W.F. Jr. Docking with SwissDock. *Methods Mol Biol.*, 2019, vol. 2053, pp. 189-202, doi: 10.1007/978-1-4939-9752-7_12.
21. Sayle R., Milner-White E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci.*, 1995, vol. 20, no. 9, pp. 374, doi: 10.1016/s0968-0004(00)89080-5.
22. Bacongus I., Gouaux E. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature*, 2012, vol. 20, no. 489, pp. 400-405, doi: 10.1038/nature11375.
23. Хавронюк И.С., Мамонтов А.А., Булков В.А., Воронин Д.П., Кузнецов А.В. Присваивание функций опсинам трихоплаксов *Trichoplax adhaerens* и *Trichoplax* sp. H2. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 4, с. 686-694. [Khavronyuk I.S., Mamontov A.A., Burkov V.A., Voronin D.P., Kuznetsov A.V. Assignment of functions to opsins of *Trichoplax adhaerens* and *Trichoplax* sp. H2. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 686-694. (In Russ.)]
24. Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. Gating mechanisms of acid-sensing ion channels. *Nature*, 2018, vol. 15, no. 555, pp. 397-401, doi: 10.1038/nature25782.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Связывание амилорида с одной субъединицей ASIC1а-канала 4fz1delta курицы *Gallus gallus* (а) и с 3D-моделями субъединиц кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 (в) и гипотетического белка XP_002115321.1 (д) из *Trichoplax adhaerens*, соответственно суперпозиции связывания (б, г, е)

а



б



в



г



д

е



Приложение 2. Анализ взаимодействия амилорида с субъединицей ASIC1a-канала 4fz1delta курицы *Gallus gallus*, а также с 3D-моделями одной субъединицы кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и субъединицы гипотетического белка XP_002115321.1 из *Trichoplax adhaerens*

рН-зависимый ионный канал	Кластер	Элемент	Полное соответствие, ккал/моль	Расчётное значение ΔG , ккал/моль
4fz1delta	0	0	-2683,97	-7,33
QEP99390.1	0	2	-2683,83	-7,39
	0	0	-2641,16	-7,07
	6	0	-2637,51	-7,65
XP_002115321.1	0	0	-2714,18	-6,98
	1	3	-2707,04	-7,57

PECULIARITIES OF SALICYLIC ACID AND ASPIRIN BINDING TO ACID-SENSITIVE ION CHANNELS OF *TRICHOPLAX ADHAERENS*

Kuznetsov A.V.^{1,2}, Kurchenko V.M.¹, Voronin D.P.¹, Zavyalova O.S.¹

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences

Nakhimov ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: kuznet61@gmail.com

Received 10.05.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0483

Abstract. Acid-sensitive ion channels (ASICs) represent a family of membrane three subunits' DEG/ENaC proteins that transport Na^+ ions and are found in representatives of many taxonomic groups [1]. DEG/ENaC channels include such structural domains as the palm, β -ball, knuckle, finger, thumb and wrist [2]. They are involved in many physiological processes as proton-regulated channels, when the pH of the extracellular environment changes [3]. DEG/ENaC channels are associated with a wide range of cellular functions, such as pain sensation and epithelial Na^+ transport [4]. These channels have different gating properties, from almost constant opening to rapid inactivation, so numerous pathologies are associated with damage to these channels [5]. Traditionally, the functions of these channels have been studied using toxins [6]. We found 9 acid-sensitive ion channel genes and 12 homologs with unknown function in the *Trichoplax adhaerens* genome, of which two amino acid sequences (QEP99390.1 and XP_002115321.1) were folded into 3D-models and used to dock amiloride, aspirin and salicylic acid. Salicylates have multiple binding sites on the acid-sensitive trichoplax receptors, including the acid pocket that is a proton sensor, which suggests their possible application in modulating the activity of the ASIC-channels of *T. adhaerens*.

Key words: Placozoa, genome, ASIC channels, homology, folding, docking.