

УДК 577.352.465

МОДЕЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОГО СЕНСОРА ПРОТОНА ВКУСОВЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. К. Д. Сладков^а, *, С. С. Колесников^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: klimitrich@ya.ru

Поступила в редакцию 11.01.2023 г.

После доработки 03.02.2023 г.

Принята к публикации 07.02.2023 г.

Семейство отопетринов (otopetrins) — это группа мембранных белков, формирующих протон-селективные ионные каналы. Один из его представителей, белок Otop1, является кандидатом на роль молекулярного сенсора кислого во вкусовых клетках типа III. Считается, что кислые стимулы инициируют входящий ток ионов H^+ через апикальную мембрану этих клеток, что приводит к их деполяризации и генерации серии потенциалов действия, инициирующих выброс афферентного нейротрансмиттера. Математическое моделирование является одним из подходов к анализу этого достаточно сложного динамического процесса, многие аспекты которого трудно исследовать экспериментально. В данной работе разрабатывалась математическая модель для описания динамических и транспортных характеристик молекулярного сенсора Otop1. Полученная модель адекватно описывает характеристики протонного тока, транспортируемого Otop1, и может быть использована в дальнейшем для теоретического анализа трансдукции кислых стимулов во вкусовых клетках.

Ключевые слова: вкусовые клетки, Otop1, протонный ток

DOI: 10.31857/S023347552303009X, **EDN:** EXKXJQ

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная единица периферической вкусовой системы млекопитающих — вкусовая почка — представляет собой гетерогенную популяцию 50–80 клеток, включая вкусовые клетки типа I, II, III и базальные клетки [1, 2]. Эти клетки отличаются морфологически, функционально, а также на молекулярном уровне, экспрессируя гены рецепторных, сигнальных и канальных белков в разных сочетаниях. Базальные клетки считаются прогениторными клетками вкусовой почки, способными дифференцироваться во взрослые вкусовые клетки различного типа. Примерно половину популяции клеток вкусовой почки составляют клетки типа I, которые выполняют преимущественно поддерживающую функцию [1, 2]. Вкусовые клетки типа II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, которые специализируются на распознавании горьких и сладких стимулов, а также стимулов категории умами (аминокислоты, рибонуклеотиды, пептиды). Они составляют 30–40% клеток вкусовой почки. Клетки типа III (10–15% популяции) распознают кислые и некоторые соленые стимулы [1, 2]. Хотя исследования последних лет выявили в группе III субпопуляцию клеток, способных отвечать на вещества категорий горькое, сладкое и умами [3], ос-

новная специализация клеток типа III — это рецепция кислых стимулов. В пользу этого свидетельствует тот факт, что при селективном удалении клеток типа III из вкусовой почки с использованием генно-инженерных методов у генно-модифицированных животных исчезают ответы вкусового нерва и поведенческие реакции на кислые стимулы, но не на горькие, сладкие и умами [4].

Ощущения кислого и соленого связаны преимущественно с простыми ионными стимулами: H^+ в первом случае и Na^+ (и некоторые другие катионы) во втором [5]. Специализированные ионные каналы, функционирующие на рецептирующей апикальной мембране вкусовых клеток, традиционно рассматривались как вероятные молекулярные сенсоры ионных стимулов [5]. В свете исследований последних лет, среди множественных кандидатов, предлагавшихся на роль молекулярного сенсора кислого, недавно открытый H^+ -селективный канал otopetrin1 (Otop1) представляется наиболее подходящим [6–8].

Основная задача вкусовой трансдукции — это хомоэлектрическое сопряжение, т.е. стимул-зависимая генерация электрического сигнала, управляющего выбросом афферентного нейротрансмиттера, кодирующего сенсорную информацию. Многие аспекты этого процесса окончательно не

ясны, в частности, потому что вклад различных элементов трансдукционной машинерии в ее динамические характеристики невозможно определить экспериментально. Математическое моделирование сложных динамических систем часто является ключевым подходом для анализа их свойств. Задачу математического моделирования трансдукции кислого можно разделить на подзадачи, одной из которых является моделирование динамических и транспортных характеристик молекулярного сенсора Otop1. Данная работа посвящена разработке кинетической модели H^+ -селективного канала Otop1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аксиоматика модели

По первичной последовательности белки Otop существенно отличаются от других изученных канальных белков [9, 10], указывая на то, что семейство Otop представляет собой особую группу ионных каналов со специфической структурой и физиологической функцией. Использование криоэлектронной микроскопии позволило установить пространственную структуру Otop1 рыбы-зебры, Otop3 цыпленка и Otop3 лягушки *Xenopus* [9, 10]. Оказалось, что для этих ортологов Otop характерна консервативная топология. В частности, было показано, что в мембране они формируют гомодимеры, в которых каждая субъединица включает 12 трансмембранных сегментов (S1–S12), формирующих два домена: N (S1–S6) и C (S7–S12) [9, 10]. N- и C-домены формируют топологически сходные бочкообразные структуры (рис. 1а). Механизмы, которые обеспечивают рН-зависимую активацию каналов Otop и трансмембранный перенос протонов, во многом не ясны. В недавнем исследовании Otop1 человека было показано, что экстраклеточная петля S5–S6 в домене N (рис. 1а) играет ключевую роль в его функционировании. Гистидин H229 в петле S5–S6 является первичным H^+ -сенсором, и его протонирование инициирует конформационные изменения петли, что обеспечивает доступ к протонной поре в домене C [11].

Следует отметить, что практически для всех исследованных одиночных ионных каналов характерно чередование периодов молчания и относительно продолжительной активности (burst), внутри которой наблюдаются быстрые переходы между открытым и закрытым состояниями, так называемый фликеринг (flickering) (например, [12]). Хотя ток через одиночный канал Otop1 не исследовался, можно думать, что его активность также характеризуется сложной кинетикой: относительно медленные рН-зависимые конформационные изменения в петле S5–S6 могут обеспечивать переход Otop1 в активное состояние, в котором он способен транспортировать протон,

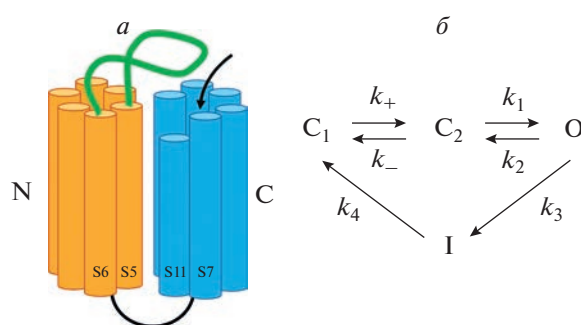


Рис. 1. Модель протонного канала Otop1. а – Схематичное изображение структуры канала Otop1. Стрелка указывает на предполагаемую локализацию протонной поры. б – Схема переходов между состояниями Otop1.

тогда как конформационные флуктуации протонной поры вызывают ее фликеринг. Следует также отметить, что внутриклеточный Ca^{2+} является не только универсальным регулятором, но и медиатором клеточной гибели [13, 14]. В силу этого Ca^{2+} -проницаемые ионные каналы плазмалеммы обычно “охвачены” отрицательной обратной связью, которая приводит к ингибированию входа Ca^{2+} при опасном уровне Ca^{2+} в цитозоле [15–19]. Вход протона через Otop1 приводит к закислению цитоплазмы вкусовой клетки до опасного уровня, вызывая массовое изменение биохимических реакций. Представляется поэтому правдоподобным, что, по аналогии с Ca^{2+} -зависимой регуляцией Ca^{2+} -каналов, Otop1 должен инактивироваться при понижении внутриклеточного рН. Исходя из приведенных соображений, мы рассмотрели следующую кинетическую схему рН-зависимых переходов Otop1 между различными состояниями (рис. 1б). Здесь символы C_1 , C_2 , O и I означают два закрытых, открытое и инактивированное состояния, соответственно. Конформационные изменения, инициируемые в петле S5–S6 протонированием, переводят канал из неактивного состояния C_1 в активированное, но закрытое состояние C_2 , из которого возможны переходы в открытое состояние O, – фликеринг. Из открытого состояния канал может переходить в инактивированное состояние I со скоростью, зависящей от внутриклеточного рН. Выход из инактивированного состояния возможен только в состояние C_1 .

Предположение о том, что k_+ зависит от концентрации внеклеточного протона H_o связано с тем, что в эксперименте наблюдалась более быстрая активация тока через Otop1 при аппликации более кислого стимула [7]. Введение рН-зависимой константы перехода из C_1 в C_2 в форме $k_+(H_o) = k_+^0 \frac{H_o}{H_{1/2}^o + H_o}$ позволило правильно описать кинетику активации протонного тока. В ран-

них работах предполагалось отсутствие инактивации Otop1 при закислении клетки, и уменьшение протонного тока со временем объяснялось только убыванием потенциала реверсии [7]. Это предположение согласуется с выявленными в эксперименте экспоненциальным законом уменьшения тока через Otop1 и линейной зависимостью между скоростью уменьшения тока и величиной пикового тока [20]. Однако оказалось, что при больших концентрациях внеклеточного протона степень уменьшения тока была выше, чем можно было предсказать по убыванию потенциала реверсии. В этой связи мы постулировали, что имеет место инактивация Otop1, зависящая от внутриклеточного pH. В модели такая инактивация описывается тем, что константа скорости перехода в инактивированное состояние k_3 определялась как функция H_i в соответствии с уравнением

$$k_3(H_i) = k_3^0 \frac{H_i}{H_{1/2}^i + H_i}, \text{ что позволило правильно}$$

предсказать степень инактивации протонного тока.

Следует также отметить, что нами рассматривалось несколько кинетических схем, среди которых минимальная модель (рис. 1б) оказалась наиболее адекватной для реконструкции основополагающих экспериментальных фактов, характеризующих функционирование Otop1.

Уравнения модели

Электрофизиологический анализ Otop1 в экспрессионной системе показал, что протонный ток через этот канал описывается линейными вольт-амперными характеристиками со сдвигом потенциала реверсии, зависящим от экстраклеточного pH [7]. Это означает, что, по сути, Otop1 является потенциал-независимым каналом и что транспортируемый протонный ток практически подчиняется закону Ома. В этой связи интегральный протонный ток, транспортируемый ансамблем N каналов Otop1 описывался нами выражением:

$$I = \gamma NP_0(V - E_r) = \gamma NP_0 \left(V - \frac{RT}{F} \lg \left(\frac{H_o}{H_i} \right) \right), \quad (1)$$

где γ — величина проводимости одиночного открытого канала Otop1, N — общее число протонных каналов, P_0 — потенциал-независимая вероятность найти канал в открытом состоянии, V — потенциал клетки, а E_r — потенциал реверсии тока, который можно рассчитать из уравнения Нернста через H_o и H_i , концентрации свободных протонов вне и внутри клетки, R — универсальная газовая постоянная, T — температура, F — число Фарадея.

В экспериментах с рекомбинантным Otop1 было установлено, что при скачкообразном за-

кислении внеклеточной среды протонный ток сначала резко возрастает за 100–250 мс, после чего величина тока экспоненциально убывает до некоторого значения в течение нескольких секунд [7]. Резкий рост тока связывался с переходом канала в открытое состояние под действием внеклеточного протона, а его убывание объяснялось закислением цитозоля и уменьшением потенциала реверсии [7]. Для описания динамических характеристик протонного тока мы использовали следующую систему дифференциальных уравнений, соответствующую переходам Otop1 между состояниями в соответствии с кинетической схемой (рис. 1б):

$$\begin{aligned} \dot{C}_1 &= k_4 I + k_- C_2 - k_+ (H_o) C_1, \\ \dot{C}_2 &= k_+ (H_o) C_1 - (k_- + k_1) C_2 + k_2 O, \\ \dot{O} &= k_1 C_2 - (k_2 + k_3(H_i)) O, \\ \dot{I} &= -k_4 I + k_3(H_i) O, \end{aligned} \quad (2)$$

где O , C_1 , C_2 , I — вероятности найти канал в открытом, закрытых и инактивированном состояниях, k_i — соответствующие константы скоростей перехода.

Хотя при входе в клетку протоны связываются с протонным буфером и частично откачиваются протонными насосами во внеклеточную среду, протонный ток приводит к закислению цитозоля [7]. Чтобы смоделировать этот процесс, использовалось соотношение (3). Первое равенство в (3) выражает связь между падением внутриклеточного pH и ростом тотальной концентрации протонов (как свободных, так и связанных) через коэффициент β . Если бы свободные протоны не связывались с буфером, протонный ток в 10 пА за секунду приводил бы к изменению внутриклеточного pH в клетке объемом около 150 фл с начальных 6.9 до 3.5 менее чем за 1 с. Однако имеющиеся данные указывают на более медленные изменения pH цитозоля вкусовых клеток [20]. На основе этих данных и предполагая, что буфер линейный, величина β была оценена нами как 54 мМ на единицу pH.

Второе равенство в (3) описывает транспорт протонов через мембрану: первое слагаемое описывает рост концентрации внутриклеточных протонов H_i из-за поступающих через Otop1 протонов, а второе слагаемое — откачку H^+ протонными помпами:

$$-p\dot{H}_i = \frac{\dot{H}^{\text{tot}}}{\beta} = \frac{1}{\beta} \left(\frac{I}{FV} - \frac{H_i^2}{H_i + H_{0.5}} \frac{1}{\tau_{\text{out}}} \right), \quad (3)$$

Таблица 1. Параметры модели, при которых симулировались токи (рис. 2)

Параметр	Величина, мс^{-1}	Параметр	Величина
k_+^0	0.002	V	177 фл
k_-	0.002	$H_{1/2}^o$	8 мкМ
k_1	1	$H_{1/2}^i$	10 мкМ
k_2	1	$H_{0.5}$	0.5 мкМ
k_3^0	1	τ_{out}	2 мс
k_4	0.1	β	54 мМ/рН

где V — объем клетки, H^{tot} — общая концентрация обмениваемых протонов в цитозоле, $H_{0.5}$ — концентрация свободных ионов H^+ , при которой скорость их откачки равна половине от максимальной, τ_{out} — характерное время откачки H^+ из клетки.

Величины параметров в данной модели подбирались таким образом, чтобы параметры протонного тока, полученные в вычислительных экспериментах, соответствовали параметрам, определенным экспериментально, включая зависимость времен активации и инактивации тока от интенсивности кислого стимула H_o [7, 21, 22].

Чтобы моделировать динамические свойства тока через Otop1 при скачкообразном закислении внеклеточной среды, уравнения (1)–(3) решались

численно методом Эйлера с шагом в 0.025 мс. Вычисления производились с использованием авторской программы на языке Python. Уменьшение шага интегрирования вдвое не приводило к заметному изменению результатов. При физиологических pH_o 7.4 и pH_i 6.9 положение равновесия достигалось при вероятности обнаружить канал в состоянии C_1 , равной 0.994. Поэтому при моделировании система помещалась около положения равновесия ($C_1(t=0) = 0.99$) и находилась возле него до подачи стимула.

Как следует из эксперимента, инактивация тока через Otop1 связана преимущественно с закислением цитозоля, и этот процесс происходит медленно в сравнении с его активацией [7, 20]. Это позволяет на малых временах пренебречь инактивацией каналов и оценить значение пикового то-

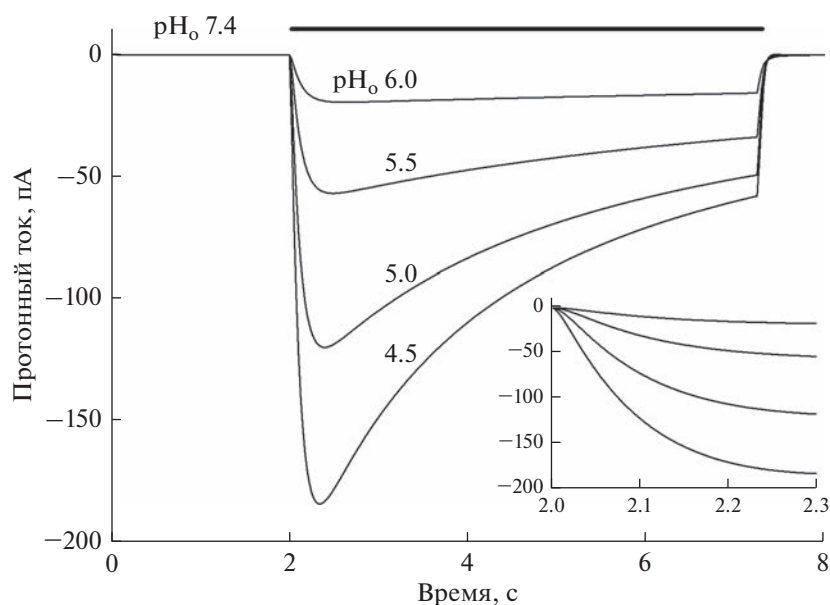


Рис. 2. Динамика протонного тока через Otop1 в ответ на кислые стимулы разной интенсивности. Момент стимуляции показан отрезком линии выше кривых тока, цифры над кривыми указывают рН кислого стимула. Вставка в уменьшенном масштабе времени иллюстрирует ускорение активации тока при уменьшении рН стимула.

ка из условия равенства нулю производной тока. Фактически это соответствует стационарному состоянию для системы (2), что дает следующее выражение для пикового тока как функции концентрации внеклеточного протона H_o :

$$I_{\text{peak}} = \gamma N \times \frac{1}{1 + \frac{k_3}{k_4} + \frac{k_2 + k_3}{k_1} + \frac{1}{k_+ (H_o)} \left(\frac{k_- (k_2 + k_3)}{k_1} + k_3 \right)} \times \left(V - \frac{RT}{F} \lg \left(\frac{H_o}{H_i} \right) \right). \quad (4)$$

Эта зависимость позволяет непосредственное сравнить предсказания модели и экспериментальные данные [7, 20–22].

Таким образом, предлагаемая модель (рис. 1б) адекватно описывает основные свойства тока через протонный канал Otop1 и может в дальнейшем быть использована для моделирования процесса трансдукции кислых стимулов во вкусовых клетках типа III.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при частичной поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00032.

Соответствие принципам этики. В работе не проводились эксперименты с животными и людьми.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Roper S.D., Chaudhari N. 2017. Taste buds: Cells, signals and synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 485–497.
- Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foskett J.K. 2021. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **473**, 3–13.
- Banik D.D., Benfey E.D., Martin L.E., Kay K.E., Loney G.C., Nelson A.R., Ahart Z.C., Kemp B.T., Kemp B.R., Torregrossa A., Medler K.F. 2020. A subset of broadly responsive Type III taste cells contribute to the detection of bitter, sweet and umami stimuli. *PLoS Genet.* **16**, e1008925.
- Huang A.L., Chen X., Hoon M.A., Chandrashekar J., Guo W., Trankner D., Ryba N.J., Zuker C.S. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature.* **442**, 934–938.
- Lindemann B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature.* **413**, 219–225.
- Ishimaru Y. 2015. Molecular mechanisms underlying the reception and transmission of sour taste information. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 171–176.
- Tu Y.H., Cooper A.J., Teng B., Chang R.B., Artiga D.J., Turner H.N., Mulhall E.M., Ye W., Smith A.D., Liman E.R. 2018. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science* **359**, 1047–1050.
- Liman E.R., Kinnamon S.C. 2021. Sour taste: receptors, cells and circuits. *Curr. Opin. Physiol.* **20**, 8–15.
- Chen Q., Zeng W., She J., Bai X.C., Jiang Y. 2019. Structural and functional characterization of an otopenin family proton channel. *Elife.* **8**, e46710.
- Saotome K., Teng B., Tsui C.C.A., Lee W.H., Tu Y.H., Kaplan J.P., Sansom M.S.P., Liman E.R., Ward A.B. 2019. Structures of the otopenin proton channels Otop1 and Otop3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 518–525.
- Li B., Wang Y., Castro A., Ng C., Wang Z., Chaudhry H., Agbaje Z., Ulloa G.A., Yu Y. 2022. The roles of two extracellular loops in proton sensing and permeation in human Otop1 proton channel. *Commun. Biol.* **5**, 1110.
- Geng Y., Magleby K.L. 2015. Single-channel kinetics of BK (Slo1) channels. *Front. Physiol.* **5**, 532.
- Cerella C., Diederich M., Ghibelli L. 2010. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 546163.
- Shi H., Gu J. 2021. Calcium signaling mediates cell death and crosstalk with autophagy in kidney disease. *Cells.* **10**, 3204.
- Budde T., Meuth S., Pape H.C. 2002. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 873–883.
- Halling D.B., Aracena-Parks P., Hamilton S.L. 2005. Regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by calmodulin. *Sci. STKE.* **315**, re15.
- Mullins F.M., Park C.Y., Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Aldrich R.W. 2009. Stim1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 15495–15500.
- Parekh A.B. 2017. Regulation of CRAC channels by Ca^{2+} -dependent inactivation. *Cell Calcium.* **63**, 20–23.
- Limpitkul W.B., Greenstein J.L., Yue D.T., Dick I.E., Winslow R.L. 2018. A bilobal model of Ca^{2+} -dependent inactivation to probe the physiology of L-type Ca^{2+} channels. *J. Gen. Physiol.* **150**, 1688–1701.
- Bushman J.D., Ye W., Liman E.R. 2015. A proton current associated with sour taste: Distribution and functional properties. *The FASEB J.* **29**, 3014–3026.
- Teng B., Wilson C.E., Tu Y.H., Joshi N.R., Kinnamon S.C., Liman E.R. 2019. Cellular and neural responses to sour stimuli require the proton channel Otop1. *Current Biology.* **29** (21), 3647–3656.
- Teng B., Kaplan J.P., Liang Z., Krieger Z., Tu Y.H., Burendei B., Ward A.B., Liman E.R. 2022. Structural motifs for subtype-specific pH-sensitive gating of vertebrate otopenin proton channels. *eLife* **11**, 77946.

Model of a Molecular Proton Sensor in Taste Cells

K. D. Sladkov^{1, *}, S. S. Kolesnikov¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: klimitrich@ya.ru*

Otopetrins represents a group of membrane proteins that function as proton-selective ion channels. Existing evidence indicates that Otop1, the eponym of the family, is a likely molecular sensor of protons involved in detecting acid stimuli in taste cells of type III. Acid stimuli is believed to initiate an inward current carried by protons through receptive apical membrane to depolarize a type III cell and trigger a train of action potentials driving afferent neurotransmission. While many details of this rather complicated process have not been uncovered yet, mathematical modelling could provide a sufficient insight into sour transduction. Here we present a mathematical model for describing dynamic and transport properties of Otop1 channel. The elaborated model appropriately describes proton currents through Otop1 under different conditions, and it could be employed for further modeling of sour responses of taste cells.

Keywords: taste cells, Otop1, proton current