———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.25

# КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ СЕРДЕЧНЫХ ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ

# © 2021 г. Ю. Г. Качер<sup>1</sup>, М. Г. Карлова<sup>1</sup>, Г. С. Глухов<sup>1</sup>, Х. Чжан<sup>2</sup>, Е. В. Заклязьминская<sup>3</sup>, Ж. Лоуссарн<sup>4</sup>, О. С. Соколова<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия <sup>2</sup> Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, Китай <sup>3</sup> Российский научный центр хирургии им. ак. Б.В. Петровского, Москва, Россия <sup>4</sup> Научно-исследовательское подразделение института грудной клетки, Национальный институт здравоохранения и медицинских исследований, Нант, Франция

\*E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru Поступила в редакцию 03.09.2020 г. После доработки 15.09.2020 г. Принята к публикации 15.09.2020 г.

Мембранные белки, в частности ионные каналы, стали объектом пристального внимания структурной протеомики в середине XX века. Методы изучения ионных каналов разнообразны и включают в себя структурные (рентгеноструктурный анализ (PCA), криоэлектронная просвечивающая микроскопия (крио-ПЭМ), анализ с помощью рентгеновских лазеров на свободных электронах) и функциональные (пэтч-кламп). В обзоре рассмотрена эволюция подходов к изучению структуры сердечных ионных каналов, дано представление о новых приемах структурной биологии в приложении к каналам, в том числе об использовании липо- и нанодисков, обсуждается вклад электрофизиологических исследований, молекулярной динамики для получения полной картины о структуре и функционировании сердечных ионных каналов. За годы исследований многие методы были разработаны и адаптированы для изучения ионных каналов. Электрофизиологические исследования стали мощным инструментом для расшифровки механизмов ионной проводимости и селективности, стробирования и регулирования, а также тестирования ингибиторных молекул. Реконструкция атомной структуры ионных каналов стала возможной благодаря активному развитию сначала РСА и крио-ПЭМ, а в настоящий момент — за счет использования рентгеновских лазеров на свободных электронах.

DOI: 10.31857/S0023476121050076

#### ОГЛАВЛЕНИЕ

#### Введение

1. Сердечные ионные каналы и каналопатии: зачем нужно знать структуру ионных каналов?

2. Путь к структуре полноразмерного ионного канала

3. Структурно-функциональные исследования ионных каналов

4. Электронная микроскопия для исследования ионных каналов

5. Революция в структурной биологии – крио-ПЭМ структуры ионных каналов с высоким разрешением

6. Новые стратегии для выделения ионных каналов

6.1. Почему так сложно изучать мембранные белки?

6.2. Нанодиски

#### 6.3. Липодиски

7. Изучение динамики ионных каналов с помощью рентгеновских лазеров на свободных электронах

Заключение

#### введение

ХХ век ознаменовал расцвет структурной биологии — получено колоссальное количество данных, накоплен реальный потенциал для реконструкции всех процессов в живых организмах. Завершились два десятилетия ХХІ века, расшифровано более 160000 третичных и четвертичных структур белков; в их числе крупные молекулярные машины, рибосома [1], мембранные белки [2, 3], белки цитоскелета [4], ферменты и др. Оптимисты прогнозируют расшифровку архитектур всех известных белков и их функций через 30 лет. Это означает не только понимание структуры ин-



Рис. 1. Строение и функционирование ПЗ-каналов. Схема одной α-субъединицы Ку-канала (а). Обозначены трансмембранные сегменты S1–S6 и петля Р, формирующая пору канала. Заряженные аргинины на сегменте S4 обозначены плюсами. ПЧД – потенциал-чувствительный домен. Кристаллическая структура одной α-субъединицы канала Kv1.2 (PDB ID 2A79) (б). Схема сердечного ПД (в). Стрелками отмечены ПЗ-каналы, отвечающие за различные фазы ПД. ЭКГ в норме и при синдромах LQT и SQT (г).

дивидуальных макромолекул и их взаимодействий с лигандами, но и межмолекулярных взаимодействий в сложных белковых комплексах. Изменение конформационного состояния белка отражается на его функциональной активности [5]. Исчерпывающее знание структур всех доменов белковой молекулы дает возможность правильно интерпретировать ее конформационные изменения при активации и ингибировании и, более того, управлять этими процессами [6].

Вслед за геномикой, протеомикой, транскриптомикой и метаболомикой появилась отрасль науки "*структурная протеомика*". Понимание биологических механизмов на уровне атомного разрешения позволяет применять эту информацию в медицине и биотехнологии. Особенно это актуально для изучения мембранных белков, в частности ионных каналов и транспортеров, принимающих участие в регуляции жизнедеятельности каждой клетки организма, в особенности кардиомиоцитов.

Ионные каналы — большой функциональный класс интегральных трансмембранных белков. Большинство ионных каналов имеет ротационную симметрию, образованную несколькими идентичными субъединицами или гомологичными доменами, располагающимися вокруг поры канала. Наиболее распространенная классификация ионных каналов — по механизму управления — включает следующие группы: каналы, управляемые напряжением, лигандом/лигандами, липидами, температурой или светом, а также механически управляемые.

Управляемые напряжением или потенциалзависимые (ПЗ) ионные каналы — самая обширная группа. Их роль в возбудимых клетках заключается в деполяризации мембран в ответ на изменение потенциала. Их функционирование определяется слаженной работой трех структурных единиц: сенсора напряжения, поры и ворот канала (рис. 1а). Большинство ПЗ-каналов, проводящих ионы K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Na<sup>+</sup>, состоит из четырех трансмембранных доменов с шестью сегментами (рис. 1б), каждый из которых пересекает липидный бислой.

Потенциалы действия (ПД) в сердечных клетках существенно отличаются от обнаруженных в других типах клеток. Это связано с наличием особых *«сердечных»* ионных каналов (активнее всего экспрессирующихся в кардиомиоцитах) и кинетикой их работы. За деполяризацию мембраны миоцитов миокарда млекопитающих отвечают быстрые натриевые каналы, за фазу плато – кальциевые ионные каналы, важнейшую роль в определении потенциала покоя в фазе реполяризации ПД играют калиевые каналы (рис. 1в).

#### 1. СЕРДЕЧНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ И КАНАЛОПАТИИ: ЗАЧЕМ НУЖНО ЗНАТЬ СТРУКТУРУ ИОННЫХ КАНАЛОВ?

Ритмичные сокращения сердца на протяжении всей жизни человека обеспечиваются синхронной генерацией и распространением электрических импульсов, к которым приводит слаженная работа нескольких десятков ионных каналов. Катионные ПЗ-каналы, которые кодируются генами *KCNQ*1, *KCNH*2, *KCNE*1, *KCNE*2, *KCNJ*2, *TRPM*4, играют важную роль в реполяризации сердечных клеток и поддержании нормальной продолжительности сердечного ПД.

Семейство Ку7.х или КСПО включает в себя пять типов каналов Kv7.1-Kv7.5. Канал Kv7.1, кодируемый геном *КСNO*1, преимущественно экспрессируется в тканях сердца, а также в эпителиальных тканях и гладкой мускулатуре. Каналы Кv7.2-Кv7.5 (КСNQ2-5) в основном встречаются в тканях нервной системы [7]. В сердечной мышечной ткани Kv7.1 экспрессируется совместно с вспомогательными бета-субъединицами КСNE1, КСNE2 и КСNE3 для формирования функционально активного канала, обеспечивающего медленный ток реполяризации [8] и, следовательно. отвечающего за длительность сердечного ПД. К настоящему моменту описано 109 мутаций (в основном точечных замен), затрагивающих активность канала Kv7.1, изменяющих кинетику активации, взаимодействие с регуляторными субъединицами, либо нарушающих транспорт в мембрану клетки, приводящих к развитию синдрома удлиненного интервала QT (longQT, LQTS) на электрокардиограмме (ЭКГ) (рис. 1г) и синдрому внезапной смерти. Кроме LQTS некоторые из этих мутаций ассоциированы с синдромом Джервелла-Ланге–Нильсена [9], состоянием, при котором нарушения сердечного ритма сопровождаются нарушениями слуха. Для данного канала описаны также активирующие мутации, вызывающие увеличение тока и ведущие к укорочению ПД сердца (синдром укороченного интервала QT, shortQT, **SQTS**) и фибрилляции предсердий [10].

Правильная работа ионных каналов может быть нарушена в результате мутаций, влияющих на количество экспрессируемых белковых субъединиц, первичную и вторичную структуру, а также посттрансляционные модификации белка. В результате генетически детерминированных изменений суммарная проницаемость через канал для ионов может увеличиваться (нарушается механизм инактивации или закрывания канала, увеличивается экспрессия) либо уменьшаться (нарушается активация, пропускная способность, снижается экспрессия белка). Примечательно, что различные по своему функциональному эффекту мутации могут приводить к клинически противоположным ЭКГ-феноменам, и соответствующие аритмогенные синдромы формируют аллельные серии заболеваний. Одним из хорошо изученных примеров аллельной серии заболеваний служат синдромы, развивающиеся в результате различных мутаций в гене KCNH2. Мутации, реализующиеся по типу "loss of function" (потеря функции) (например, замены N410D, A561T, G610S, A614V, N996I и др.), приводят к снижению суммарного исходящего калиевого тока из клетки, что задерживает время реполяризации и выражается удлинением интервала QT [11]. Эта генетическая форма представляет собой второй по частоте подтип наследственного синдрома LQT, заболевания с высоким риском развития желудочковой тахикардии типа "пируэт" и внезапной сердечной смерти [12]. На мутации в этом гене приходится ~35% всех случаев генетически подтвержденных случаев заболевания [13].

Мутации в гене *KCNH*2, реализующиеся по типу "gain of function" (усиление функции), ведут к тому, что выведение из клетки положительно заряженных ионов калия увеличивается, что приводит к ускорению реполяризации и проявляется укорочением интервала QT на ЭКГ (рис. 1г). Электрокардиографические и клинические проявления таких мутаций более многообразны, включают синдром SQT (замена T618I), синдром Бругада (например, T152I, R164C, W927G, R1135H и т.д.), семейную фибрилляцию предсердий (замена N588K) [14–16].

Функционирование канала Kv11.1 (кодируемого геном КСNH2) может быть нарушено не только мутациями, но и взаимодействием с широким спектром лекарственных препаратов. Блокирование канала Kv11.1 с развитием вторичного удлинения сердечного ПД (и, как следствие, увеличение продолжительности интервала QT) представляет собой один из очень опасных побочных эффектов широкого круга лекарств. Первым препаратом, выведенным в 1998 г. с фармакологического рынка в связи с блокадой канала Kv11.1 и риском развития желудочковых аритмий, был блокатор Н1-гистаминовых рецепторов терфенадин, а сейчас таких препаратов насчитывается не менее десятка [17]. В настоящее время все новые фармацевтические субстанции тестируются на их способность блокировать сердечные ионные каналы, главным образом Kv11.1. Понимание особенностей строения и функционирования ионных каналов, в частности Kv11.1, очень важно для рационального дизайна новых лекарственных средств любой направленности. Было показано, что некоторые аминокислоты в S6-домене (Tyr652, Phe656) и в основании поровой спирали (Thr623, Ser624, Val625) особенно чувствительны к лекарственным взаимодействиям [18]. Независимо от того, в какую сторону смещается продолжительность реполяризации кардиомиоцита, основной угрозой для носителей мута-



**Рис. 2.** Путь к структуре Кv-канала дрозофилы *Shaker*. Слева направо: 1992 г. – показано, что канал является тетрамерным [20]; 1998 г. – появление данных о водной поре канала; к 1999 г. опубликованы структуры порового домена (гомологичный канал KcsA [21]) и тетрамеризационного домена [22]; 2000 г. – гипотеза "*висячей гондолы*" [23]; 2001 г. – первая ПЭМ-структура канала [24] подтвердила упомянутую выше гипотезу; 2005 г. – кристаллическая структура химерного полноразмерного Kv1.1/1.2-канала с β-субъединицей [25].

ций в гене *KCNH*2 является повышенный риск развития желудочковых нарушений ритма и внезапной смерти.

Эффективность лечения разных наследственных сердечных каналопатий различна. В настоящее время доступны как хирургические (имплантация антиаритмических устройств и левосторонняя стеллэктомия), так и медикаментозные подходы. При синдроме LQT высокую (но не абсолютную) эффективность показали  $\beta$ -блокаторы [19]. Однако успехи лекарственной терапии других каналопатий (семейные нарушения проводимости, синдром Бругада, SQT) не столь велики. Поэтому детальное изучение структурных и функциональных изменений нормальных и мутантных ионных каналов необходимо для разработки новых молекул, способных восстановить или компенсировать генетический дефект.

Повышение доступности высокоэффективного секвенирования привело к экспоненциальному росту выполняемых генетических тестов. Естественным результатом роста выполняемых диагностик стало выявление большого числа новых, не охарактеризованных редких вариантов, клиническое значение которых трудно интерпретировать. Детальное понимание структуры ионных каналов, понимание функциональной значимости каждого аминокислотного остатка помогут разработать предиктивные модели, способные достоверно прогнозировать значение новых уникальных вариантов.

#### 2. ПУТЬ К СТРУКТУРЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ИОННОГО КАНАЛА

К концу XX века были успешно клонированы многие гены, кодирующие ДНК ионных каналов эукариотического происхождения, а также их бактериальных аналогов. Однако четвертичная структура большинства ионных каналов долгое время оставалась неизвестной, так как они с большим трудом поддаются трехмерной кристаллизации. Выводы о структуре и функционировании каналов делались на основе непрямых данных мутационного анализа, электрофизиологии и молекулярной динамики (МД) (рис. 2).

В отсутствие прямых структурных данных были разработаны комплексные подходы, позволяющие решить сложнейшую задачу определения процессов, лежаших в основе активации Ку-каналов. Эта задача частично была решена к началу 90-х годов XX века, когда были предложены первые модели активации ПЗ Ку-каналов (обзор [26]). По данным цистеинового сканирования и электрофизиологии установили, что Ку-канал является тетрамером (рис. 2); при активации канала сенсор потенциала S4 под действием изменения трансмембранного потенциала движется поперек мембраны [27]; спираль S4 тянет линкер S4-S5, что приводит к нарушению взаимодействия S4-S5/S6 и открытию поры канала [28] (рис. 3а). Однако некоторые модели активации, как потом выяснилось, были ошибочны [29]. Для их валидации необходимы были реальные структурные ланные.

Первая кристаллическая структура бактериального (*Streptomyces lividans*) ионного канала KcsA с разрешением 3.2 Å была получена в лаборатории будущего Нобелевского лауреата Р. МакКиннона и опубликована в 1998 г. [21]. Эта работа за прошедшие 22 года была процитирована более 7000 раз. Так как структура поры гомологична у большинства катионных каналов [30], структура КсsA открыла неоценимые возможности для структурных биологов и биофизиков (рис. 4).

Атомная структура КсsA позволила использовать МД для моделирования конформаций не только этого канала [31], но и гомологичных каналов эукариот [32, 33] (рис. 3в). Для получения хорошо дифрагирующих кристаллов авторы удалили внутриклеточные С-концы субъединиц канала KcsA. Поэтому необходимо было доказать функциональность полученной конструкции начался ренессанс методов электрофизиологии.



**Рис. 3.** Две модели соединения между сенсором напряжения и поровыми субъединицами ионных ПЗ-каналов: а – механистическая модель, характерная для каналов семейства *Shaker*; б – лиганд-рецепторная модель, характерная для каналов EAG, ERG, KCNQ. Рисунок адаптирован из [28].



**Рис. 4.** Кристаллическая структура бактериального pH-зависимого калиевого канала KcsA позволила провести молекулярное моделирование гомологичного канала. Три иона калия расположены на внешней и внутренней позициях селективного фильтра (S1 и S3) и в центре водной полости (а). Выравнивание последовательностей канала KcsA, *Shaker* и гомологичного CNG1-канала (б). Модель конформационных изменений в CNG1-канале при открытии и закрытии ворот канала, построенная на основе МД (в) [33].

# 3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Фундаментальное понимание того, как структура катионных каналов меняется при мутациях, возможно только при сочетании структурных исследований с функциональными (электрофизиологическими) подходами. Характеристика активности ионных каналов с помощью электрофизиологических методов является основным источником знаний как в физиологическом, так и патофизиологическом контексте, что, в свою очередь, помогает в разработке соответствующих фармакологических препаратов.

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

Электрофизиология в XX веке внесла огромный вклад в расшифровку молекулярных механизмов ионной проводимости, ионной селективности, стробирования каналов, а также регулирования ионных каналов дополнительными белками [34–39].

В контексте патофизиологии ионных каналов электрофизиологические инструменты, в частности метод пэтч-кламп [40], использовались в тысячах исследований для подтверждения того, что варианты генов, кодирующие часть комплекса ионных каналов, являются причиной различных патологий. Хорошим примером в данном случае является синдром LQT. Довольно простая схема моногенного наследования заболевания, вероятно, обусловила то, что оно долгое время находилось в центре внимания научной общественности после идентификации нескольких мутаций, в основном в генах *KCNQ1*, *KCNH2* и *SCN5A* [41, 42]. Во многих биофизических исследованиях идентифицированная замена была введена в плазмиду, кодирующую канал, и проведены эксперименты *in vitro* с помощью метода пэтч-кламп для проверки того, приводит ли мутация к модификации ионного тока.

Значительные достижения в области высокопроизводительного секвенирования и геномного анализа позволили исследовать более сложные формы наследственных заболеваний, такие как синдром Бругада [43]. Этот синдром характеризуется фибрилляцией желудочков и повышенным риском внезапной сердечной смерти, как и при синдроме LQT, но патофизиология несколько отличается, и ЭКГ-мониторинг позволяет легко отличить синдром LQT от синдрома Бругада (подъем сегмента ST на кардиограмме). При синдроме LQТ большинство случаев связано со специфической мутацией, в основном в генах КСNQ1, *КСNH*<sup>2</sup> и *SCN*<sup>5</sup>*A*. При синдроме Бругада мутация в генах была идентифицирована только у 20% пациентов, несмотря на очевидное семейное происхождение патологии. Ситуация осложнена тем, что во многих случаях при идентифицированных в семье мутациях (в основном ген SCN5A, кодирующий ПЗ-натриевый канал Nav1.5) некоторые члены семьи являются лишь ее носителями (неполная пенетрантность), а другие члены семьи имеют патологию (фенокопию) [44]. В этом случае методы электрофизиологии представляют еще больший интерес, чем в случае синдрома LQT, так как они позволяют выяснить, приводит ли обнаруженная мутация к дисфункции канала и может ли она частично участвовать в патогенезе.

Что касается патофизиологии ионных каналов, инструменты электрофизиологии также полезны для определения того, как нарушение молекулярного механизма может привести к конкретной патологии. Например, исследования пэтч-кламп показали, что для активности ПЗ-каналов Kv7.1 и Kv11.1 требуется фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (**PI(4,5)P2**) и что некоторые мутации при синдроме LQT изменяют взаимодействие этого полярного липида с каналом, что приводит к потере каналом своей функции [45–47].

Наконец, изучение внутримолекулярных взаимодействий в ПЗ-каналах с помощью электрофизиологических методов привело к разработке пептидов, имитирующих эти взаимодействия и либо ингибирующих, либо активирующих целевую группу ионных каналов [48—51]. Такие исследования могут в долгосрочной перспективе привести к разработке новых терапевтических средств.

Во всех аспектах, обсуждаемых выше, могут быть также полезны высокопроизводительные аналоги пэтч-клампа. Интерес к функциональной валидации каналов в сочетании с многократным увеличением количества тестируемых вариантов гена (более 1000 в канале Kv11.1 (hERG)) позволил разработку методов фенотипирования генов [52, 53].

Важно упомянуть об ограничениях техники пэтч-кламп, особенно потому, что это может приводить к неправильной интерпретации функшии ионных каналов. Типичным случаем может служить субъединица КСNE1, первоначально названная MinK; она ошибочно считалась ионным каналом на основании того, что при экспрессии в ооцитах Xenopus наблюдали медленно активирующийся ПЗ-калиевый ток. Несмотря на очень осторожную интерпретацию результатов в первой статье, дальнейшие публикации подтвердили эту гипотезу [54, 55]. Однако ток можно было наблюдать только тогда, когда РНК вводили в ооциты Xenopus, но не в других моделях, что все же вызвало некоторые сомнения [56]. Только клонирование гена канала КСЛО1 (первоначально названного KVLOT1) и демонстрация того, что этот канал изначально присутствует в ооцитах Xenopus и генерирует медленно активирующийся ток, управляемый напряжением только в присутствии KCNE1, определенно продемонстрировали, что КСNE1 не кодирует порообразующую субъединицу [38, 39], а является дополнительной субъединицей канала КСNO1.

#### 4. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ

В 90-х годах XX века для исследования структуры ионных каналов начинают применять электронную микроскопию. Каналы выделяют из мембран клеток с использованием детергентов (DDM, CHAPS, Digitonin и других), наносят на углеродные сетки для последующей окраски солями тяжелых металлов (рис. 2д) [24, 57–60] либо используют появившийся в 80-х годах XX века метод криоэлектронной просвечивающей микроскопии (**крио-ПЭМ**) [61, 62].

Преимуществом крио-ПЭМ является то, что белковые молекулы находятся в водном окружении, поэтому их форма и конформация сохраняются. Частицы во льду не имеют преимущественной ориентации по сравнению с частицами на поверхности углерода. В то же время в крио-ПЭМ соотношение сигнал/шум, как правило, низкое, поскольку низок контраст исследуемых объектов. Для того чтобы повысить контраст, необходимо объединить данные, полученные от очень большого числа проекций. Реконструкция макромолекул по данным крио-ПЭМ продолжается уже более четырех десятилетий, однако на начальных этапах она позволяла получать трехмерные структуры с разрешением 15–18 Å только очень больших белков ионных каналов, таких как рианодинчувствительный рецептор (RyR) [63, 64].

Радиационное повреждение образцов является существенным препятствием для получения изображений с высоким разрешением [65]. Для снижения радиационного повреждения во время выбора зоны съемки, выравнивания и фокусировки пучка электронов применяются специальные системы "низкой дозы", чтобы блокировать луч до последнего шага – получения изображения. Малые выдержки приводят к потере разрешения, шумным изображениям и, как следствие, недостатку данных с высоким разрешением. Это, в свою очередь, усложняет последующий процесс обработки изображений для определения трехмерной структуры объекта. Определение углов ориентации глобулярных молекул особенно чувствительно к шумам на необработанных изображениях, а также к ошибкам в процедурах выравнивания и классификации. Недостаточные размеры Ку-каналов (10-15 нм в диаметре) приводили к потере контраста изображения в микроскопе и падению разрешения реконструкции.

Для очень коротких выдержек становится критически важной способность детектора воспринимать каждый попавший на него электрон. Такие устройства были сконструированы в XXI веке, они позволяют напрямую детектировать электроны (прямой детектор электронов, ПДЭ) и получить за секундную выдержку от 16 до 400 кадров. Благодаря специальной процедуре обработки изображения одной и той же белковой частицы со всех полученных кадров можно выровнять относительно друг друга и сложить для увеличения соотношения сигнал/шум. Таким образом, компенсируется движение частиц во льду, происходящее за время даже секундной выдержки [66].

#### 5. РЕВОЛЮЦИЯ В СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ – КРИО-ПЭМ-СТРУКТУРЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ

За 15 лет после опубликования первой кристаллической структуры ионного канала исследователям с помощью рентгеноструктурного анализа (**PCA**) удалось расшифровать атомную структуру некоторого количества прокариотических [21, 67, 68], архейных [69] и эукариотических (рис. 2е) каналов [70–72].

Революция в структурной биологии мембранных белков началась с опубликования в 2013 г. первой атомной структуры ионного канала TRP

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

[73], *de novo* полученной с помощью крио-ПЭМ, что, в частности, связано с началом серийного выпуска камер ПДЭ. Разработка нового программного обеспечения для 3D-реконструкции [74] ускорила во много раз сбор и анализ сотен тысяч и миллионов изображений отдельных частиц каналов. В 2015 г. метод крио-ПЭМ был объявлен методом года по версии журнала Nature, а еще через 2 года, в 2017 г., трое ученых-основателей метода – Р. Хендерсон, Ж. Дюбуше и Й. Франк – удостоились Нобелевской премии. И это было только начало. В течение последующих 4 лет технический прорыв позволил получить многие до того неизвестные структуры ионных каналов, включая сердечные каналы KCNQ1 и КСNE2 [75, 76].

Первые крио-ПЭМ-исследования с высоким разрешением каналов семейства ЕАG показали, что модель активации, основанная на данных о структуре каналов семейства *Shaker* [26, 77], не подходит для описания работы семейств каналов, кодируемых генами *KCNH* [3, 49, 75, 78].

Структура мембранного домена каналов семейства *Shaker* имеет характерную особенность, открытую после расшифровки кристаллической структуры химерного канала Kv1.1/Kv1.2 [71], – ПЧД взаимодействует не со своим поровым доменом, а с доменом, принадлежащим соседней субъединице (рис. 5а, 5в).

Такая архитектура получила называние "domain swapped" – доменный обмен. Подобная организация трансмембранных спиралей была возможна из-за длинного S4—S5 линкера у каналов семейства Shaker. Формирование доменного обмена оказалось невозможно для каналов EAG, так как у них оказался очень короткий S4—S5 линкер, и спираль S5 взаимодействует со своим же ПЧД (рис. 56, 5г) [75].

Сравнение структуры каналов: химерного Kv1.2/2.1 [71] и Kv11.1 в открытой конформации [3] с каналом Kv10.1, пора которого была закрыта за счет взаимодействия с кальмодулином (**CaM**) [75], привело исследователей к новой гипотезе функционирования каналов семейства EAG (рис. 6). Отличие ее от предыдущей модели состоит в том, что линкеру отводится меньшая роль, а основное изменение конформации S6 происходит за счет латерального смещения S4- и S5-сегментов. Роль шарнира, который обеспечивает изменение конформации S6, выполняет остаток глицина (G648 у Kv11.1 и G460 у Kv10.1) [3].

В результате было выдвинуто предположение, что активация каналов семейства EAG происходит по лиганд-рецепторному механизму (рис. 36). В данном случае линкер S4—S5 действует как внешний лиганд, который связывает нижнюю часть спирали S6 и блокирует канал в закрытом состоянии, когда спирали S4 ПЧД находятся в со-



Рис. 5. Различия в расположении доменов у различных Ку-каналов по данным РСА и крио-ПЭМ: а – канал Kv1.1/1.2 [25]; б – канал Kv10.1 [75]; в, г – схематическое изображение взаимодействия поровых доменов и ПЧД в соответствующих каналах.

стоянии "внизу" при отрицательном потенциале. Когда спирали S4 находятся в состоянии "вверху", линкер S4–S5 выходит из кармана связывания с S6, и канал открывается. Этот молекулярный механизм хорошо согласуется с результатами электрофизиологических экспериментов [79], сделанных, в частности, на каналах hERG [49].

### 6. НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ

#### 6.1. Почему так сложно изучать мембранные белки?

Структурные исследования требуют получения целевого белка в большом количестве и с высокой степенью чистоты. К настоящему времени разработано множество различных подходов к наработке и очистке белков. Тем не менее для мембранных белков именно подготовка образца является узким местом при определении структуры, в особенности экстракция целевого белка из клеточных мембран. Детергент, который неподходящим образом имитирует гидрофобное окружение исследуемого белка, может также значительно изменить его структуру.

В таких условиях субнанометрового разрешения реконструкции 30 лет назад позволяла достичь лишь электронная кристаллография: структуры бактериородопсина в пурпурной мембране [80] и ацетилхолинового рецептора в электрическом органе ската *Torpedo marmorata* [81] были получены этим методом. Позднее научились моделировать природные двумерные кристаллы, вместо нативных мембран использовали очищенные молекулы каналов и путем диализа удаляли детергент из смеси, заменяя его на липиды, однако этот подход оказался достаточно сложен для воспроизведения и до сих пор применяется лишь в нескольких лабораториях в мире.

Для получения реконструкций белков каналов в мембранном окружении разрабатывались и другие специальные полходы, такие, например, как сферическая реконструкция [82]. После вставки в маленькую сферическую везикулу из липидов мембранный белок приобретал строго определенную ориентацию относительно мембраны, и его положение на проецируемом изображении везикулы напрямую определяло два из трех определяемых углов Эйлера. Анализ изображений везикул во льду показал, что их плотность хорошо описывается простой моделью рассеяния электронов на мембране. Компьютерное моделирование показало, что этот метод теоретически может улучшить реконструкцию мембранных белков. В [83] его применили для изучения кластеризации грамицидина в липосомах, однако высокого разрешения этот метод достичь не позволил.

Значение липидов ближайшего окружения показано для многих белков, например, взаимодействие PI(4,5)P2 с Kv7 [45] и взаимодействие KscA с анионными липидами [84]. Удаление этих липидов при солюбилизации детергентами может приводить не только к функциональным нарушениям, но и к структурным перестройкам. В связи с этим постоянно ведется как поиск новых детергентов, так и разработка принципиально новых подходов к солюбилизации мембранных белков. Относительно недавно были разработаны два похожих, однако основанных на различных соединениях подхода — использование нанодисков и липодисков в структурных исследованиях мембранных белков.

#### 6.2. Нанодиски

Нанодиски – это альтернативный и более эффективный подход к выделению мембранных белков. Это имитаторы мембранного окружения (мембраномиметики), которые можно использовать для поддержания мембранных белков в растворимой форме для дальнейших структурных исследований. Как следует из названия, нанодиски представляют собой дискообразные наноразмерные бислои фосфолипидов, окруженные молекулами амфипатического α-спирального белка MSP, который выступает в роли пояса, ограничивающего размер диска (рис. 7а, 7в).

Изначально метод был основан на использовании аполипопротеина АроА1 человека. ЛипопроhERG/EAG1

linker

(a)





**Рис. 6.** Сравнение структур закрытого и открытого Ку-каналов. Различия в структурах трансмембранной части и прилегающих к поре цитоплазматических доменов открытого канала Kv11.1 (темно-серый) и закрытого канала Kv10.1 (светло-серый) (а). Сравнения профилей поры каналов, структуры которых получены в открытом (hERG и Kv1.2/2.1) и закрытом (EAG1) состоянии (б). Схема активации каналов семейства EAG (в).

теины высокой плотности состоят из липидов и холестерина, основной аполипопротеин ApoA1 может принимать различные структурные формы. Он синтезируется в печени, затем из формы без липидов постепенно обретает вид шарика из липидов, холестерина и сложных эфиров холестерина, проходя через временную дискоидную стадию. Именно диски и стали прототипом водорастворимых наночастиц [87].

Включение мембранного белка в нанодиск происходит самопроизвольно, так как он взаимодействует с гидрофобными хвостами липидов. Нанодиски могут использоваться в большом диапазоне концентраций при комнатной и физиологических температурах и храниться в течение не-

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

скольких месяцев при 4°С с минимальной агрегацией. При соблюдении правильных условий можно добиться монодисперсных образцов с контролируемым размером по сравнению с липосомами, бицеллами, мицеллами. На данный момент существует множество модифицированных вариантов белка MSP [88], в том числе коммерчески доступных.

Количественный и качественный состав фосфолипидов нанодисков можно варьировать для имитации биологических особенностей тех или иных мембран. Самые популярные синтетические липиды, используемые для сборки нанодисков — фосфатидилхолин (**POPC**), димиристоилфосфатидилхолин (**DMPC**), дипальмитоилфос-



Рис. 7. Строение комплексов нанодиска и липодиска с мембранным белком. Схематическое представление нанодиска (а) и липодиска (б) с инкорпорированным мембранным белком. Внизу — суммарные крио-ПЭМ-проекции каналов в нано- и липодиске: в — канал dORAI в MSP [85]. Стрелка указывает на дополнительную плотность, соответствующую нанодиску; г — канал ASIC в SMA [86]. Отметим, что липодиск не образует дополнительной плотности вокруг мембранной части канала в отличие от нанодиска.

фатидилхолин (**DPPC**), а также смеси с заряженными фосфолипидами, такими как PI(4,5)P2, фосфатидилсерин (**PS**), фосфатидил-глицерин (**PG**), фосфатидилэтаноламин (**PE**).

Публикации многих структур ионных каналов, выделенных в нанодисках за последние 5 лет, однозначно говорят об успешности метода (табл. 1). Возникли новые варианты нанодисков, которые адаптированы, в том числе, для больших белков и комплексов [89, 90], поскольку размер нанодиска может иметь решающее значение для поддержания нативного олигомерного состояния белка, инкорпорированного в нанодиски. Более того, для многих типов нанодисков уже опубликованы оптимизированные протоколы [91] и подобраны оптимальные молярные отношения смеси липидов.

#### 6.3. Липодиски

Одним из новейших методов выделения белков в естественном липидном окружении является использование сополимера стирола и малеиновой кислоты (SMA). Особенностью данного полимера является способность переходить между линейной и спиральной конформациями в зависимости от pH и ионной силы среды. Чередующиеся гидрофобные (стирольные) и гидрофильные (остатки малеиновой кислоты) фрагменты SMA делают его амфипатическим и, следовательно, способным встраиваться в биологические мембраны. Встраиваясь в мембрану, полимер разрушает ее и формирует фрагменты мембраны округлой формы размером 10-40 нм, окруженные поясом полимера [106] (рис. 7б). Такие частицы назвали SMALP – липидные частицы, образованные сополимером малеиновой кислоты (SMA lipidp articles). Термин Lipodisg® (липодиск) был введен компанией Malvern Cosmeceutics Ltd. для обозначения патентованных смесей полимер/липид, разрабатывавшихся как носители для доставки гидрофобных фармацевтических субстанций. В настоящее время термин "липодиск" или "нативный нанодиск" в основном применяется в отношении дисковидных мембранных структур, образованных полимерами, в противовес термину "нанодиск", который используется для обозначения структур, сформированных производными аполипопротеинов.

Влияние состава полимера (соотношение остатков стирола и малеиновой кислоты), pH среды и ионной силы раствора на эффективность растворения модельной мембраны подробно исследовано в [107]. Полимер остается растворимым в лиапазоне pH 7–9. при понижении pH начинает агрегировать. Однако полимер с соотношением остатков стирола и малеиновой кислоты 1.4:1 выдерживает понижение рН среды до 4. Высокая ионная сила раствора снижает растворимость полимера, однако повышает эффективность солюбилизации мембран. Интересно, что диаметр формируемых липодисков зависит в большей степени от липидного состава мембраны, чем от характеристик полимера [108]. Длина молекул полимера при заданном соотношении остатков стирола и малеиновой кислоты влияет не столько на размеры частиц, сколько на их стабильность [109]. На модельной системе (липосомы, образованные смесью РОРС/РОРС в соотношении 9:1) было показано, что на размер формируемых липодисков влияет соотношение массы липида и полимера: после достижения критической концентрации полимера, необходимой для полного разрушения везикул, дальнейшее увеличение концентрации полимера приводит к уменьшению размеров липодисков [110].

Влияние липидного состава бислоя на кинетику формирования SMALP исследовано в [111, 112]. Показано, что длина ацильной части липидов практически не влияет на размер, однако определяет кинетику формирования SMALP. При растворении мембран решающее значение имеют особенности упаковки — фаза, толщина мембраны, латеральное давление, плотность заряда, температура, ионная сила раствора. Более тонкие мембраны с низким латеральным давлением, низкой плотностью заряда на поверхности

# КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ СТРУКТУРЫ

Ионный канал	Год	Частицы MSP	Липиды	Метод	Разрешение, Å	Литера- тура
KCC4	2020	MSP1D1	DOPE, POPC, POPS	крио-ПЭМ	3.65	[92]
VSD4-NavAb	2020	MSP1E3	DMPC	ПЭМ		[93]
KCNQ1 + KCNE3	2020	MSP2N2	полярные липиды сои	крио-ПЭМ	3.1	[94]
V/A-typeATPase	2019	MSP1E3D1	POPC и полярные липиды <i>T. thermophilus</i>	крио-ПЭМ	3.5	[95]
TMEM16F	2019	MSP2N2	полярные липиды сои, POPC, POPE, POPS	крио-ПЭМ	~4	[96]
AdeB	2019	MSP 1E3D1	липидный экстракт <i>E. coli</i>	крио-ПЭМ	2.98	[97]
LRRC8A	2019	MSP1E3D1	POPC	крио-ПЭМ	4.18	[98]
Н <sup>+</sup> -АТФаза	2019	MSP1E3D1	вакуолярные липиды дрожжей	ПЭМ		[99]
Orai	2019	MSP1E3D1	POPC,POPG, POPE	крио-ПЭМ	5.7	[85]
TRPM4	2018	MSP2N2	полярные липиды сои	крио-ПЭМ	~3	[100]
OSCA1.2	2018	MSP2N2	полярные липиды сои	крио-ПЭМ	3.1	[88]
TPC1	2018	MSP E3D1 и сапозин А	полярные липиды сои	крио-ПЭМ	3.7	[101]
Kv1.2–2.1	2018	MSP1E3D1	POPC, POPG, POPE	крио-ПЭМ	3.3	[102]
VDAC-1	2018	DCND	POPC, POPG с холестерином	ПЭМ		[90]
Kv7.1	2017	MSP2N2	без экзогенных липидов	ПЭМ	25	[103]
TcdA1	2016	MSP1D1	POPC	крио-ПЭМ	3.46	[104]
TRPV1	2016	MSP2N2 и MSP1E3	липиды сои	крио-ПЭМ	без лиганда — 3.2, с агонистом — 2.9, с антагонистом — 3.4	[105]
CorA	2016	MSP1D1	POPC, POPG	крио-ПЭМ	3.8	[102]

<b>Taominga I.</b> From the Kanandi, Creykryphi Korophia nony tendi b nanodnek	Таблица	1.	Ионные каналы,	структуры которых	получены в нанодиска
--	---------	----	----------------	-------------------	----------------------

Примечание. DMPG – димиристоил-глицеро-фосфорилглицерин, POPG – пальмитоил-олеоил-глицеро-фосфоглицерин, POPE – пальмитоил-олеоил-глицерофосфоэтаноламин, POPS – 1-пальмитоил-олеоил-глицерофосфосерин, DOPE – диолеоил-фосфатидил-этаноламин.

и при высокой концентрации NaCl растворяются быстрее и с большим выходом SMALP. Показано, что полимер не имеет сродства к каким-либо определенным липидам и в SMALP соотношение липидов остается таким же, как было в исходной мембране. Термодинамика процесса формирования SMALP исследована в [113] на модельных мембранах. Влияние липидного состава на формирование SMALPs отражено в кинетике солюбилизации эукариотических клеток: по данным флуоресцентной микроскопии внутриклеточные мембраны в присутствии SMA разрушаются быстрее и эффективнее, чем плазматическая мембрана [114]. Более медленное разрушение плазматической мембраны может быть отчасти связано с присутствием большого количества структурных белков.

Если мембрана содержит молекулы белка, то при добавлении полимера белки оказываются заключены в формирующиеся липодиски, т.е. мембранный белок оказывается вырезан из мембраны с сохранением некоторого слоя окружающих

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

белок липидов. Первоначально это было продемонстрировано для липосом, образованных DMPC и содержащих бактериородопсин [115]. Позже при помощи полимера SMA были экстрагированы ABC-транспортеры из мембранных фракций различных клеток [116], комплекс IV из митохондрий клеток дрожжей [117], калиевый ПЗ-канал человека Kv7.1 из нефракционированных эукариотических клеток [118] и другие белки. Мембранные белки, заключенные в липодиски, оказываются достаточно стабильными и могут быть очищены и проанализированы различными биохимическими методами.

Значительным преимуществом использования SMA является полное отсутствие детергента в протоколе очистки. Как следствие, выделенные таким образом белки могут быть извлечены вместе с их естественной липидной средой и лигандами. Такой подход позволяет повысить стабильность и сохранить функциональную активность белков и белковых комплексов, что было показано при очистке аденозинового рецептора челове-

Ионный канал	Год	Разрешение, Å	Литература
KimA (Bacillus subtilis)	2020	3.7	[120]
ASIC1	2020	2.8, 3.7	[86]
AcrB (Salmonella Typhimurium)	2020	4.6	[127]
AcrB (E. coli)	2018	8.8	[128]
AcrB (E. coli)	2018	3.2	[129]
Alternative complex III (ACIII) (Flavobacterium johnsoniae)	2018	3.4	[130]

Таблица 2. Ионные каналы, структуры которых получены в SMA с помощью крио-ПЭМ

ка A2A [119], калиевого ПЗ-канала KcsA [120], транспортера AcrB *E. coli* [121], фотосинтетических реакционных центров *Rhodobacter* (*Rba.*) *sphaeroides* [122]. Часто SMA повышает общий выход солюбилизированного белка, а также позволяет провести очистку в одну стадию [116, 118].

Сохранение ближайшего липидного окружения при экстрагировании белков полимером SMA открывает широкие возможности для анализа их естественного липидного окружения и поиска липид-белковых взаимодействий [123– 125]. В [126] совместное экстрагирование липидов с мембранными белками было использовано для определения липидного состава микродоменов мембран *Saccharomyces cerevisiae*.

Преимущества полимера SMA при солюбилизации мембранных белков делают его перспективным в структурных исследованиях. В табл. 2 приведены данные о структурах белков, полученных в составе липодисков, опубликованные за период 2018–2020 гг. Несмотря на сравнительно небольшое количество статей, исследования каналов с помощью SMA становятся популярны и позволяют получить субнанометровое разрешение реконструкций.

#### 7. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИОННЫХ КАНАЛОВ С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛАЗЕРОВ НА СВОБОДНЫХ ЭЛЕКТРОНАХ

С появлением рентгеновских лазеров на свободных электронах (РЛСЭ) и микрофокусных станций на синхротронных источниках излучения серийная кристаллография становится важнейшим методом для исследования мембранных белков [131]. Новый подход к получению дифракционных данных позволяет собрать структурную информацию с нано- и микрокристаллов при комнатной температуре с минимальным влиянием радиационного разрушения при помощи ультрабыстрого сбора данных за время, меньшее, чем характерное время глобального радиационного повреждения кристалла. Сочетание огромной яркости вспышки свыше 10 Вт/см<sup>2</sup> (сфокусированной на область ~100 нм<sup>2</sup>) и короткой длительности порядка 10 фс приводит к уникальным принципиальным возможностям этого инструмента в структурной биологии.

Мембранные белки при попытках кристаллизовать их часто имеют тенденцию к образованию очень маленьких кристаллов, размером около микро- или нанометра. Качество дифракции таких кристаллов обычно значительно хуже по сравнению с кристаллами растворимых белков аналогичного размера. В таких случаях добиться лучшего разрешения кристаллической структуры можно увеличением мощности рентгеновского источника. причем протяженность импульса должна быть меньше характерного времени разрушения кристалла, т.е. несколько фемтосекунд. Не так давно для кристаллизации мембранных белков стали использовать липидную кубическую фазу (LQP) [132]. Этот подход и разработка специальных инжекторов для вязких растворов позволили разработать метод серийной фемтосекундной кристаллографии (рис. 8а). Он заключается в сборе данных дифракции со множества микрокристаллов в LQP, причем с каждого кристалла успевают получить только одну картину дифракции в одной ориентации. Большой массив ланных совмешается в один набор. Этот метод позволил получить структуры таких каналов, как GPCR-рецептор [133] и бактериородопсин [134]. Светоиндуцированная изомеризация ретиналя бактериородопсина является одной из самых быстрых реакций, известных в биологии, но теперь с помощью РЛСЭ оказалось возможно наблюдать сверхбыстрые фотохимические реакции, включая индуцированные светом молекулярные движения внутри ретиналя в пределах фемтосекунд с атомным разрешением (рис. 8б) [134].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы являемся свидетелями бурного развития структурных исследований ионных каналов. За последние 5 лет с помощью крио-ПЭМ получено более 50 новых структур различных ионных каналов, что в несколько раз больше, чем полученных с помощью PCA за 20 лет. Крио-ПЭМ дает возможность получать реконструкции полноразмерных белков,



**Рис. 8.** Времяразрешенная серийная фемтосекундная кристаллография: а – схема установки, б – светоиндуцированная изомеризация ретиналя бактериородопсина [134].

которые ранее было невозможно закристаллизовать целиком из-за их размера и сложной организации, например рецептора глютамата [135].

С развитием структурной биологии электрофизиология получила новое развитие и используется для валидации новых структур. Функциональные исследования легко проводить в реальном времени: открытие и закрытие канала занимает секунды. Можно исследовать динамику сердечных каналов, что очень важно для понимания причин тяжелых заболеваний, которые вызывают мутации в генах ионных каналов. Кардиомиоциты, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, экспрессируют многие белки, которые присутствуют и в зрелых кардиомиоцитах, что позволяет получить данные одновременно для десятков и сотен сердечных ионных каналов.

До сих пор результатом структурных исследований являлось дискретное количество "застывших" конформаций, которые могли быть приведены в движение только благодаря МД с ограничением по времени порядка микросекунд. Однако и эти ограничения, оказалось, можно преодолеть. С развитием лазеров на свободных электронах метод серийной кристаллографии с временным разрешением позволил получить динамические картины активации ионных каналов [134].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в части ионных каналов в SMA (грант № 18-504-12045), в части структуры и физиологии каналов KCNH2 и KCNQ1 (грант № 20-54-15004). Ж. Лоуссарн получил поддержку в рамках гранта CNRS PRC RUSSIE 2019 (PRC № 2773).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Natchiar S.K., Myasnikov A.G., Kratzat H. et al. // Nature. 2017. V. 551. № 7681. P. 472. https://doi.org/10.1038/nature24482

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

- Suo Y., Wang Z., Zubcevic L. et al. // Neuron. 2020.
   V. 105. № 5. P. 882. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.023
- 3. *Wang W., MacKinnon R.* // Cell. 2017. V. 169. № 3. P. 422.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.048

- 4. *Chakraborty S., Jasnin M., Baumeister W.* // Protein Sci. 2020. V. 29. № 6. P. 1302. https://doi.org/10.1002/pro.3858
- 5. *Owji A.P., Qingqing Z., Changyi J. et al.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2020. V. 27. № 4. P. 382. https://doi.org/10.1038/s41594-020-0402-z
- 6. *Schmid S., Hugel T.* // Elife. 2020. V. 9. https://doi.org/10.7554/eLife.57180
- Jespersen T., Grunnet M., Olesen S.P. // Physiology (Bethesda). 2005. V. 20. P. 408. https://doi.org/10.1152/physiol.00031.2005
- Peroz D., Rodriguez N., Choveau F. et al. // J. Physiol. 2008. V. 586. № 7. P. 1785. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.148254
- 9. Duggal P., Vesely M.R., Wattanasirichaigoon D. et al. // Circulation. 1998. V. 97. № 2. P 142. https://doi.org/10.1161/01.cir.97.2.142
- Chen Y.H., Xu S.-J., Bendahhou S. et al. // Science. 2003. V. 299. № 5604. P. 251. https://doi.org/10.1126/science.1077771
- Smith J.L., Anderson C.L., Burgess D.E. et al. // J. Arrhythm. 2016. V. 32. № 5. P. 373. https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.11.009
- Koponen M., Havulinna A.S., Marjamaa A. et al. // BMC Med. Genet. 2018. V. 19. № 1. P. 56. https://doi.org/10.1186/s12881-018-0574-0
- *Tester D.J., Ackerman M.J.* // Methodist Debakey Cardiovasc. J. 2014. V. 10. № 1. P. 29. https://doi.org/10.14797/mdcj-10-1-29
- Hu D., Yang L., Jiancheng Z. et al. // JACC Clin. Electrophysiol. 2017. V. 3. № 7. P. 727. https://doi.org/10.1016/j.jacep.2016.11.013
- 15. *Wang Q.I., Seiko O., Ding W.-G. et al.* // J. Cardiovasc. Electrophysiol. 2014. V. 25. № 5. P. 522. https://doi.org/10.1111/jce.12361

- 16. *Hong K., Bjerregaard P., Gussak I. et al.* // J. Cardiovasc. Electrophysiol. 2005. V. 16. № 4. P. 394. https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2005.40621.x
- 17. *Hishigaki H., Kuhara S. //* Database (Oxford). 2011. P. bar017.
- https://doi.org/10.1093/database/bar017 18. Sanguinetti M.C., Chen J., Fernandez D. et al. // Novar-
- tis Found Symp. 2005. V. 266. P. 159.
  19. *Etheridge S.P., Asaki S.Y., Niu M.C.* // Curr. Opin. Cardiol. 2019. V. 34. № 1. P. 46.
- https://doi.org/10.1097/HCO.000000000000587 20. Li M., Jan Y.N., Jan L.Y. // Science. 1992. V. 257.
- No 5074. P. 1225. https://doi.org/10.1126/science.1519059
- Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A. et al. // Science. 1998. V. 280. № 5360. P. 69. https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69
- Kreusch A., Pfaffinger P.J., Stevens C.F. et al. // Nature. 1998. V. 392. № 6679. P. 945. https://doi.org/10.1038/31978
- 23. *Kobertz W.R., Williams C., Miller C. //* Biochemistry. 2000. V. 39. № 34. P. 10347. https://doi.org/10.1021/bi001292j
- 24. Sokolova O., Kolmakova-Partensky L., Grigorieff N. // Structure. 2001. V. 9. № 3. P. 215. https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00578-0
- Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. // Science. 2005. V. 309. № 5736. P. 897. https://doi.org/10.1126/science.1116269
- 26. *Grizel A.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S.* // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 4. P. 10.
- 27. Glauner K.S., Mannuzzu L.M., Gandhi C.S., Isacoff E.Y. // Nature. 1999. V. 402. № 6763. P. 813. https://doi.org/10.1038/45561
- Ferrer T., Rupp J., Piper D.R., Tristani-Firouzi M. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 18. P. 12858. https://doi.org/10.1074/jbc.M513518200
- 29. Lee S.Y., Lee A., Chen J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. V. 102. № 43. P. 15441. https://doi.org/10.1073/pnas.0507651102
- 30. *Yellen G.* // Nature. 2002. V. 419. № 6902. P. 35. https://doi.org/10.1038/nature00978
- 31. *Holyoake J., Domene C., Bright J. et al.* // Eur. Biophys. J. 2004. V. 33. № 3. P. 238. https://doi.org/10.1007/s00249-003-0355-2
- Jensen M., Jogini V., Borhani D. et al. // Science. 2012.
   V. 336. № 6078. P. 229. https://doi.org/10.1126/science.1216533
- 33. Flynn G.E., Zagotta W.N. // Neuron. 2001. V. 30. № 3. P. 689. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00324-5
- 34. MacKinnon R., Yellen G. // Science. 1990. V. 250. № 4978. P. 276. https://doi.org/10.1126/science.2218530
- 35. Yool A.J., Schwarz T.L. // Nature. 1991. V. 349. № 6311. P. 700. https://doi.org/10.1038/349700a0
- Liu Y., Holmgren M., Jurman M. et al. // Neuron. 1997.
   V. 19. № 1. P. 175. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80357-8

- 37. Schroede B.C., Waldegger S., Fehr S. et al. // Nature. 2000. V. 403. № 6766. P. 196. https://doi.org/10.1038/35003200
- Barhanin J., Lesage F., Guillemare E. et al. // Nature. 1996. V. 384. № 6604. P. 78. https://doi.org/10.1038/384078a0
- 39. Sanguinetti M.C., Curran M., Zou A. et al. // Nature. 1996. V. 384. № 6604. P. 80. https://doi.org/10.1038/384080a0
- Loussouarn G., Baró I., Escand D. // Methods Mol. Biol. 2006. V. 337. P. 167. https://doi.org/10.1385/1-59745-095-2:167
- 41. *Keating M.* // Circulation. 1992. V. 85. № 6. P. 1973. https://doi.org/10.1161/01.cir.85.6.1973
- 42. *Tester D.J., Will M., Haglund C. et al.* // Heart Rhythm. 2005. V. 2. № 5. P. 507. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2005.01.020
- Gourraud J.B., Barc J., Thollet A. et al. // Front. Cardiovasc. Med. 2016. V. 3. P. 9. https://doi.org/10.3389/fcvm.2016.00009
- 44. *Probst V., Wilde A., Barc J. et al.* // Circ. Cardiovasc. Genet. 2009. V. 2. № 6. P. 552. https://doi.org/10.1161/CIRCGENET-ICS.109.853374
- 45. Loussouarn G., Park K.-H., Bellocq C. et al. // EMBO J. 2003. V. 22. № 20. P. 5412. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg526
- 46. *Rodriguez N., Amarouch M., Montnach J. et al.* // Biophys. J. 2010. V. 99. № 4. P. 1110. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.013
- 47. Park K.H., Piron J., Dahimene S. et al. // Circ. Res. 2005. V. 96. № 7. P. 730. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000161451.04649.a8
- 48. *Choveau F.S., Rodriguez N., Abderemane F. et al.* // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. № 1. P. 707. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.146324
- 49. *Malak O.A., Es-Salah-Lamoureux Z., Loussouarn G. //* Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 113. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00155-2
- 50. *Malak O.A., Gluhov G., Grizel A. et al.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. № 16. P. 6506. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007626
- Malak O.A., Abderemane-Ali F., Wei Y. et al. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 5852. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62615-6
- 52. *Ng C.A., Perry M.D., Liang W. et al.* // Heart Rhythm. 2020. V. 17. № 3. P. 492. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2019.09.020
- 53. *Vanoye C.G., Desai R., Fabreet K. Et al.* // Circ. Genom. Precis. Med. 2018. V. 11. № 11. P. e002345. https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.118.002345
- 54. Takumi T., Ohkubo H., Nakanishi S. // Science. 1988. V. 242. № 4881. P. 1042. https://doi.org/10.1126/science.3194754
- 55. Ben-Efraim I., Bach D., Shai Y. // Biochemistry. 1993. V. 32. № 9. P. 2371. https://doi.org/10.1021/bi00060a031
- 56. *Lesage F., Attali B., Lakey J. et al.* // Receptors Channels. 1993. V. 1. № 2. P. 143.

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

- 57. van Huizen R., Czajkowsky D., Shi D. et al. // FEBS Lett. 1999. V. 457. № 1. P. 107. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01021-2
- 58. Li M., Li M., Unwin N. et al. // Curr. Biol. 1994. V. 4. № 2. P. 110. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(94)00026-6
- 59. Orlova E.V., Papakosta M., Booy F. et al. // J. Mol. Biol. 2003. V. 326. № 4. P. 1005. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00708-8
- 60. Sokolova O., Accardi A., Gutierrez D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003. V. 100. № 22. P. 12607. https://doi.org/10.1073/pnas.2235650100
- Wolf M., Eberhart A., Glossmann H. et al. // J. Mol. Biol. 2003. V. 332. № 1. P. 171. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00899-4
- Jiang Q.X., Wang D.N., MacKinnon R. // Nature. 2004. V. 430. № 7001. P. 806. https://doi.org/10.1038/nature02735
- Samsó M., Wagenknecht T., Allen P.D. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. № 6. P. 539. https://doi.org/10.1038/nsmb938
- 64. *Serysheva I.I., Ludtke S., Baker M. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. V. 105. № 28. P. 9610. https://doi.org/10.1073/pnas.0803189105
- Mishyna M., Volokh O., Danilova Y. et al. // Micron. 2017. V. 96. P. 57. https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.02.004
- 66. Brilot A.F., Chen J., Cheng A. et al. // J. Struct. Biol. 2012. V. 177. № 3. P. 630. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.02.003
- Corringer P.J., Baaden M., Bocquetet N. et al. // J. Physiol. 2010. V. 588. Pt. 4. P. 565. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.183160
- Kuo A., Gulbis J., Antcliff J. et al. // Science. 2003.
   V. 300. № 5627. P. 1922. https://doi.org/10.1126/science.1085028
- 69. Jiang Y., Lee A., Chenet J. et al. // Nature. 2003. V. 423. № 6935. P. 33. https://doi.org/10.1038/nature01580
- Kawate T., Michel J., Birdsong W., Gouaux E. // Nature. 2009. V. 460. № 7255. P. 592. https://doi.org/10.1038/nature08198
- 71. Long S.B., Tao X., Campbell E., MacKinnon R. // Nature. 2007. V. 450. № 7168. P. 376. https://doi.org/10.1038/nature06265
- 72. Brohawn S.G., del Mármol J., MacKinnon R. // Science. 2012. V. 335. № 6067. P. 436. https://doi.org/10.1126/science.1213808
- 73. Liao M., Cao E., Julius D. et al. // Nature. 2013. V. 504. № 7478. P. 107. https://doi.org/10.1038/nature12822
- 74. *Scheres S.H.* // Methods Enzymol. 2016. V. 579. P. 125. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.012
- Whicher J.R., MacKinnon R. // Science. 2016. V. 353. № 6300. P. 664. https://doi.org/10.1126/science.aaf8070
- 76. Sun J., MacKinnon R. // Cell. 2017. V. 169. № 6. P. 1042. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.019

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

- 77. *Jiang Y., Ruta V., Chen J. et al.* // Nature. 2003. V. 423. № 6935. P. 42. https://doi.org/10.1038/nature01581
- Lörinczi É., Camilo Gómez-Posada J., de la Peña P. et al. // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 6672. https://doi.org/10.1038/ncomms7672
- 79. Ferrer T., Rupp J., Piper D. et al. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 18. P. 12858. https://doi.org/10.1074/jbc.M513518200
- Schertler G.F., Villa C., Henderson R. // Nature. 1993.
   V. 362. № 6422. P. 770. https://doi.org/10.1038/362770a0
- 81. Unwin N. // Nature. 1995. V. 373. № 6509. P. 37. https://doi.org/10.1038/373037a0
- Jiang Q.X., Chester D.W., Sigworth F.J. // J. Struct. Biol. 2001. V. 133. № 2–3. P. 119. https://doi.org/10.1006/jsbi.2001.4376
- 83. Antonenko Y.N., Gluhov G., Firsov A. et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2015. V. 17. № 26. P. 17461. https://doi.org/10.1039/c5cp02047f
- 84. Marius P.S., East Alvis J., Lee A. // Biophys. J. 2005. V. 89. № 6. P. 4081. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.070755
- Liu X., Wu G., Yu Y. et al. // PLoS Biol. 2019. V. 17. № 4. P. e3000096. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000096
- 86. *Yoder N., Gouaux E.* // Elife. 2020. V. 9. https://doi.org/10.7554/eLife.56527
- Peters-Libeu C.A., Newhouse Y., Hall S. et al. // J. Lipid. Res. 2007. V. 48. № 5. P. 1035. https://doi.org/10.1194/jlr.M600545-JLR200
- 88. Johansen N.T., Tidemand F., Nguyen Tam T. et al. // FEBS J. 2019. V. 286. № 9. P. 1734. https://doi.org/10.1111/febs.14766
- 89. Zhao Z., Zhang M., Hogle J. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140. № 34. P. 10639. https://doi.org/10.1021/jacs.8b04638
- 90. Nasr M.L., Baptista D., Strauss M. et al. // Nat. Methods. 2017. V. 14. № 1. P. 49. https://doi.org/10.1038/nmeth.4079
- 91. Hagn F., Nasr M.L., Wagner G. // Nat. Protoc. 2018. V. 13. № 1. P. 79. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.094
- 92. Reid M.S., Kern D.M., Brohawn S.G. // Elife. 2020. V. 9. https://doi.org/10.7554/eLife.52505
- 93. Gardill B., Huang J., Tu L. et al. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 1130.
  - https://doi.org/10.1038/s41598-020-58002-w
- 94. *Sun J., MacKinnon R.* // Cell. 2020. V. 180. № 2. P. 340. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.003
- 95. Zhou L., Sazanov L.A. // Science. 2019. V. 365. № 6455. https://doi.org/10.1126/science.aaw9144
- 96. Feng S., Dang S., Han T. et al. // Cell. Rep. 2019. V. 28. № 2. P. 567e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.023
- 97. Su C.C., Morgan C., Kambakam S. et al. // mBio. 2019. V. 10. № 4. https://doi.org/10.1128/mBio.01295-19

- 98. *Kern D.M., Oh S., Hite R. et al.* // Elife. 2019. V. 8. https://doi.org/10.7554/eLife.42636
- 99. Sharma S., Oot R., Khan M., Wilkens S. // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. № 16. P. 6439. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007577
- 100. Autzen H.E., Myasnikov A., Campbell M. et al. // Science. 2018. V. 359. № 6372. P. 228. https://doi.org/10.1126/science.aar4510
- 101. *Kintzer A.F., Green E., Dominik P. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2018. V. 115. № 39. P. E9095. https://doi.org/10.1073/pnas.1805651115
- 102. *Matthies D., Dalmas O., Borgnia M. et al.* // Cell. 2016. V. 164. № 4. P. 747. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.055
- 103. Shenkarev Z.O., Karlova M., Kulbatskii D. et al. // Biochemistry (Mosc), 2018. V. 83. № 5. P. 562. https://doi.org/10.1134/S0006297918050097
- 104. *Gatsogiannis C., Merino F., Prumbaum D. et al.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. V. 23. № 10. P. 884. https://doi.org/10.1038/nsmb.3281
- 105. *Gao Y., Cao E., Julius D., Cheng Y.* // Nature. 2016. V. 534. № 7607. P. 347. https://doi.org/10.1038/nature17964
- 106. *Tonge S.R.*, *Tighe B.J.* // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2001. V. 53. № 1. P. 109. https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00223-x
- 107. Scheidelaar S., Koorengevel M., van Walree C. et al. // Biophys. J. 2016. V. 111. № 9. P. 1974. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.09.025
- 108. Colbasevici A., Voskoboynikova N., Orekhov P. et al. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2020. V. 1862. № 5. P. 183207. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183207
- 109. Domínguez Pardo J.J., Koorengevel M., Uwugiaren N. et al. // Biophys. J. 2018. V. 115 (1). P. 129. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.05.032
- 110. *Zhang R., Sahu I., Liu L. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. № 1. Pt. B. P. 329. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.008
- 111. Scheidelaar S., Koorengevel M., Dominguez Pardo J. et al. // Biophys. J. 2015. V. 108. № 2. P. 279. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.3464
- 112. Dominguez Pardo J.J., Dörr J., Iyer A. et al. // Eur. Biophys. J. 2017. V. 46. № 1. P. 91. https://doi.org/10.1007/s00249-016-1181-7
- 113. Cuevas Arenas R., Klingler J., Vargas C., Keller S. // Nanoscale. 2016. V. 8. № 32. P. 15016. https://doi.org/10.1039/c6nr02089e
- 114. Dörr J.M., van Coevorden-Hameete M., Hoogenraad C., Killian J. // Biochim. Biophys. Acta. Biomembr. 2017. V. 1859. № 11. P. 2155. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.08.010
- 115. *Knowles T.J., Finka R., Smith C. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. № 22. P. 7484. https://doi.org/10.1021/ja810046q
- 116. Gulati S., Jamshad M., Knowles T. et al. // Biochem. J. 2014. V. 461. № 2. P. 269. https://doi.org/10.1042/BJ20131477
- 117. Long A.R., O'Brien C., Malhotra K. et al. // BMC Biotechnol. 2013. V.13. P. 41. https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-41

- 118. Karlova M.G., Voskoboynikova N., Gluhov G. et al. // Chem. Phys. Lipids. 2019. V. 219. P 50. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.01.013
- 119. Jamshad M., Charlton J., Lin Y. et al. // Biosci. Rep. 2015. V. 35. № 2. https://doi.org/10.1042/BSR20140171
- 120. Dörr J.M., Koorengevel M., Schäfer M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2014. V. 111. № 52. P. 18607. https://doi.org/10.1073/pnas.1416205112
- 121. Postis V., Rawson S., Mitchell J. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. № 2. P. 496. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.018
- 122. Swainsbury D.J., Scheidelaar S., van Grondelle R. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014. V. 53. № 44. P. 11803. https://doi.org/10.1002/anie.201406412
- 123. Schmidt V, Sidore M., Bechara C. et al. // Biochim. Biophys. Acta. Biomembr. 2019. V. 1861. № 2. P. 431. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.017
- 124. Swainsbury D.J.K., Proctor M., Hitchcock A. et al. // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2018. V. 1859. № 3. P. 215. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2017.12.005
- 125. Prabudiansyah I., Kusters I., Caforio A., Driessen A. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. № 10. Pt. A. P. 2050. https://doi.org/10.1016/i.bbamem.2015.06.024
- 126. van 't Klooster J.S., Cheng T., Sikkema H. et al. // Elife. 2020. V. 9. https://doi.org/10.7554/eLife.57003
- 127. *Parmar M., Rawson S., Scarff C. et al.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2018. V. 1860. № 2. P. 378. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.005
- 128. *Hernando M., Orriss G., Perodeau J. et al.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2020. V. 1862. № 5. P. 183191. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183191
- 129. Johnson R.M., Fais C., Parmar M. et al. // Microorganisms. 2020. V. 8. № 6. P. 943. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060943
- 130. Sun C., Benlekbir S., Venkatakrishnan P. et al. // Nature. 2018. V. 557. № 7703. P. 123. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0061-y
- 131. Standfuss J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2019. V. 57. P. 63. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.001
- 132. Caffrey M., Cherezov V. // Nat. Protoc. 2009. V. 4. № 5. P. 706. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.31
- 133. Cherezov V., Rosenbaum D., Hanson M. et al. // Science. 2007. V. 318. № 5854. P. 1258. https://doi.org/10.1126/science.1150577
- 134. Nogly P., Weinert T., James D. et al. // Science. 2018. V. 361. № 6398. P. eaat0094. https://doi.org/10.1126/science.aat0094
- 135. Twomey E.C., Sobolevsky A.I. // Biochemistry. 2018. V. 57. № 3. P 267. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00891

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

696