

## **Архитектура рецептор-управляемых ионных каналов биологических мембран**

П. Брежестовский

Средиземноморский институт нейробиологии, INSERM U-901, Марсель, Франция  
pbreges@inmed.univ-mrs.fr

### **АБСТРАКТ**

Ионные каналы биологических мембран являются ключевыми белками, обеспечивающими биоэлектрическое функционирование живых систем. Они являются гомо- или гетеро-олигомерами, состоящими из нескольких одинаковых или разных субъединиц. Понимание архитектурной организации и функционирования ионных каналов значительно расширилось с получением кристаллической структуры нескольких типов этих трансмембранных белков. В обзоре представлена краткая информация, полученная в результате расшифровки кристаллических структур калиевых, никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, АТФ-активируемых и других типов рецептор-управляемых ионных каналов. Несмотря на различие в функции, топологии, ионной избирательности, количестве субъединиц, необходимых для формирования функционального канала, обнаруживается высокое сходство в принципах организации этих сложных макромолекулярных комплексов.

### **ABSTRACT**

Ion channels of biological membranes are the key proteins, which provide bioelectric functioning of living systems. These proteins are homo- or hetero-oligomers assembled from several identical or different subunits. Understanding the architectural organization and functioning of ion channels has been significantly extended due to resolving the crystal structure of several types of voltage-gated and receptor-operated channels. This review summarizes information obtained from crystal structures of potassium, nicotinic acetylcholine receptor, P2X and other ligand-gated ion channels. Despite the differences in the function, topology, ionic selectivity and the subunit stoichiometry, a high similarity in the principles of organization of these macromolecular complexes is revealed.

Фундаментальными элементами клеток биологических организмов являются мембраны и ионные каналы. Возникшие в процессе эволюции липидные мембраны позволили природе решить чрезвычайно важную проблему: компартментализацию внутриклеточных компонент, необходимых для синтеза и функционирования огромного разнообразия жизненно важных молекул. Однако, решение этой задачи создавало другую, не менее трудную проблему: липидные мембраны представляют барьер, непреодолимый для проникновения в клетку и выхода из нее ионов и заряженных молекул. Электрическое поле вокруг иона вызывает его отталкивание от липидного бислоя клетки, известное как диэлектрический барьер. Природе нужно было решить сложнейшую задачу создания механизмов регулируемого прохождения заряженных частиц через мембрану.

Эта задачу природа успешно решила, создав огромное разнообразие ионных каналов и транспортеров. Такое решение не только позволило осуществить взаимодействие клетки с внешней средой, но и создать фундаментальный принцип биоэлектрического функционирования живых систем. Благодаря ионным каналам, обеспечивается строго регулируемый контроль потока ионов через клеточные мембраны. Этот ключевой сигнальный механизм, используется во всех царствах биологических организмов для поддержания потенциала покоя клеток и выполнения огромного числа физиологических функций.

### **Немного истории.**

Множество ионных каналов можно классифицировать на четыре основных категории: потенциал-управляемые, рецептор-управляемые, механо-активируемые и межклеточные каналы высокой проницаемости (1,2).

Ион-зависимая сигнализация особенно критична для функционирования нервной системы животных организмов, у которых электрические сигналы распространяются и обрабатываются с помощью потенциал-зависимых и рецептор-управляемых ионных каналов. Потенциал покоя клеток поддерживается благодаря активной работе насосов, асимметричному распределению ионов и функционированию  $K^+$  каналов. Электрический сигнал – потенциал действия – генерируется как результат кратковременной активации натриевых каналов и распространяется по аксону к нервному окончанию. Деполяризация пресинаптического окончания приводит к активации кальций-избирательных ионных каналов; входящий в пресинапс кальций запускает выброс квантов нейромедиатора. Выделившийся из пресинаптической клетки нейромедиатор взаимодействует со специфическими рецепторами, представляющими собой трансмембранные рецептор-управляемые каналы в постсинаптической мембране. Связывание лигандов с рецепторами приводит к открытию этих специализированных белковых комплексов, позволяя ионам проходить через мембрану, изменять потенциал клетки и, таким образом, осуществлять быструю передачу сигнала между клетками.

Сейчас это – азбучные истины. Их основы были заложены еще в середине 19-го века. В 1840-х годах в группе исследователей в основном, учеников Иоганна Питера Мюллера (Геймгольц, Дю Буа-Реймон, фон Брюк, Карл Людвиг) возникло предположение о существовании ионных пор. Они использовали этот термин в предлагаемых ими гипотезах для объяснения электрических (Дю Буа-Реймон открыл потенциал действия) и осмотических явлений в биологических организмах (1).

Важное расширение представлений о значении и функции предполагаемых ионных пор произошло на границе 19-го и 20-веков, когда пионер экспериментальной нейрофизиологии Юлиус Бернштейн предложил теорию биоэлектрических явлений, основанную на физико-химических концепциях Нернста и Оствальда (3). Бернштейн предполагал, что в состоянии покоя, благодаря существованию специализированных пор, клетка проницаема только для ионов калия. Во время возбуждения открываются поры, способные пропускать в равной степени небольшие ионы (натрия, хлора, калия), приводящие к кратковременному уничтожению потенциала покоя, т.е. генерации потенциала действия, амплитуда которого развивается в пределах от уровня отрицательного значения потенциала покоя (примерно -70 мВ) до нуля.

В 20-м веке анализу биоэлектрических явлений, расшифровке механизмов генерации электрических сигналов в клетках, доказательству существования специализированных пор (на современном языке — ионных каналов), посвящены работы многих замечательных ученых, в особенности, К. Амстронга, Б. Катца, Р. Миледи, Э. Неера, Б. Сакмана, А. Ходжкина, Э. Хаксли, Б. Хилле, Дж. Экклса. Важный вклад в эти исследования сделали советские ученые: П. Костюк, О. Крышталь, Г. Можяева, А. Наумов, Б. Ходоров, Л. Чайлахян. Объем данной работы не позволяет подробно излагать эти исследования, коснусь только нескольких ключевых вех.

Почти через 40 лет после опубликования, теория биологических явлений Бернштейна подверглась кардинальному пересмотру. В 1939 году, Ходжкин и Хаксли представили данные, указывающие на то, что возбуждение не просто приводит к уничтожению потенциала покоя, но вызывает его инверсию, т.е. потенциал клетки на короткое время становится положительным (4). Было доказано, что эта инверсия возникает благодаря избирательной кратковременной активации натриевых каналов. В 1952 году Ходжкин и Хаксли опубликовали количественное описание распространения потенциала действия в аксоне кальмара (5). За эти исследования они были удостоены Нобелевской премии в 1963 году.

Несмотря на то, что Ходжкин и Хаксли замечательно описали относительные изменения натриевой и калиевой проводимости при генерации потенциала действия, они не

предложили никакого механизма, объясняющего прохождение ионов через мембрану и высокую ионную избирательность этих процессов. Позднее, Ходжкин и Кейнис, исследуя трансмембранные потоки калия изотопным методом, высказали предположение, что ионы пересекают мембрану вдоль цепи отрицательных зарядов через «узкие трубы или каналы», в которых они вынуждены двигаться «в одном файле»: цепочкой, представляющей несколько ионов в канале в каждый момент времени (6). Более, чем через 40 лет, после получения первой кристаллической структуры калиевого канала (7) выяснилось, что это предположение оказалось пророческим. Ниже это будет освещено подробнее.

В 50-е годы представления о существовании клеточных мембран принимались в Советском Союзе с огромным сопротивлением. Важным фактором в преодолении этого сопротивления была опубликованная в 1959 году работа Е. А. Либермана и Л.М. Чайлахяна о природе потенциала действия (8). В этой статье и серии последующих работ был проведен критический анализ основных концепций механизмов генерации потенциалов в клетках биологических организмов, а также суммированы накопленные к тому времени доказательства существования биологических мембран и специфических ионных пор, обеспечивающих поддержание мембранного потенциала клеток и генерацию потенциала действия (9–12).

В начале 1970-х годов американские исследователи Клей Армстронг и Берт Хилле опубликовали серию работ, в которых были высказаны важные, основанные на экспериментальных наблюдениях, представления об ионных каналах:

- ионные каналы для натрия и калия — это разные белковые образования;
- ионные каналы имеют распахивающиеся (swinging) ворота, открывающиеся в результате кратковременной конформации белковой макромолекулы;
- архитектуру каналов можно изучать используя измерения воротных токов, проницаемость для разных ионов и с помощью блокаторов разной молекулярной организации.

На основании этих исследований Армстронг высказал плодотворную гипотезу, позволяющую объяснить механизм, обеспечивающий высокую избирательность калиевых и натриевых каналов. Предположение основывалось на исследованиях Б. Хилле по оценке размеров калиевого канала (13) и предполагающих дегидратацию ионов натрия в натриевом канале (14).

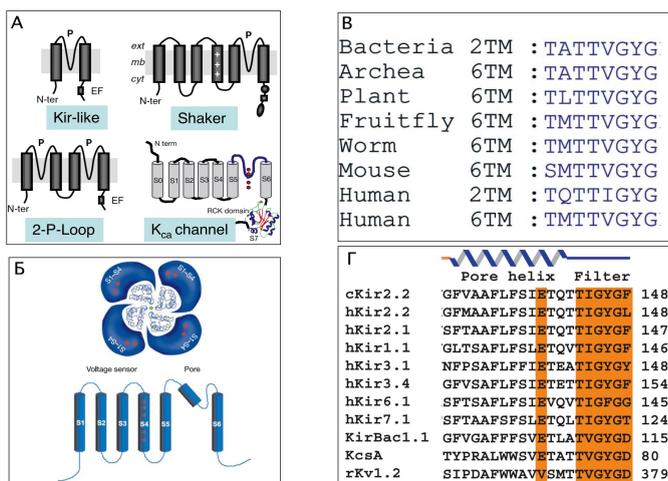
Идея заключалась в следующем. В цитоплазме или во внеклеточном пространстве ионы натрия и калия находятся в окружении воды, плотно взаимодействуя с ее кислородами. Армстронг предположил, что в устье  $K^+$  канала имеется кольцо из карбонильных кислородов. Диаметр этого кольца такого размера, что ион  $K^+$  (радиус 1.33 ангстрема), попадая в устье канала взаимодействует с этими кислородами так же плотно, как и с водным окружением. В результате, он дегидратируется без потери энергии и может легко двигаться через пору такого размера. Однако, ион натрия – значительно меньшего размера (радиус 0.95 ангстрема) и не может плотно взаимодействовать с кольцом карбонильных кислородов, представляющим для него высокий энергетический барьер (15–17).

Эти идеи, основанные на электрофизиологическом анализе потенциал-управляемых каналов, получили блестящее подтверждение после получения и расшифровки кристаллической структуры калиевого канала, осуществленной американским исследователем Родриком МакКинноном и его сотрудниками (7).

### **Кристаллическая структура $K^+$ канала.**

Для получения кристаллической структуры был выбран  $K^+$  канал ( $KcsA$ ) из прокариотического организма *Streptomyces lividans*. Анализ аминокислотной последовательности показывал, что субъединицы этого канала относительно просто организованы и имеют только два трансмембранных сегмента. В то же время, последовательность участка, предположительно выполняющего роль селективного фильтра, оказалась почти идентичной высоко консервативному участку для эукариотических  $K^+$  каналов (18), несмотря на то, что их размеры и топология могли

значительно различаться (Рис.1). Кристаллы KcsA канала были успешно получены и их структура была определена с разрешением в 3,2 ангстрема (7).



**Рис. 1. Основные классы K<sup>+</sup> каналов и консервативная организация селективного фильтра.**

**А**, Топология субъединиц основных семейств K<sup>+</sup> каналов.

*Kir-like.* Наиболее простую структуру представляют каналы у которых каждая субъединица имеет два трансмембранных (ТМ) домена и один “Р-домен” (pore domain). Четыре субъединицы формируют функциональный тетрамерный канал в котором Р-домены образуют селективный фильтр. К этому классу относятся, прежде всего, каналы аномального выпрямления (Kir), которые эффективно проводят токи входящего направления и активно функционируют

при гиперполяризации.

*2-P-Loop.* Субъединицы этих каналов (их ещё называют KСNK или K<sub>2P</sub>) имеют 4 ТМ домена и два Р-домена. Две субъединицы формируют функциональный канал. Большинство каналов этого семейства имеют слабую потенциал-зависимость и генерируют токи “утечки”.

*Shaker.* Это-прежде всего, каналы выходящего выпрямления (K<sub>v</sub> family), генерирующие потенциал-активируемые токи при деполяризации. Каждая субъединица имеет 6 ТМ доменов и один Р-домен. Как и для *Kir-like* семейства, функциональный канал формируется 4-мя субъединицами, в которых Р-домены образуют селективный фильтр.

*Kca channel.* Топология субъединиц кальций-активируемого K<sup>+</sup> канала большой проводимости (K<sub>ca</sub>) близка к топологии Shaker, но имеется еще один ТМ домен и, как следствие нечетного числа ТМ-доменов, N-конец расположен с наружной стороны мембраны. Предполагается, что RCK-домен является регулятором проводимости канала.

**Б**, Пример тетрамерной организации K<sub>v</sub> канала. Вверху: схематическое представление канала, сформированного из 4-х субъединиц. Внизу: топология одной субъединицы. S1-S4 – трансмембранные домены.

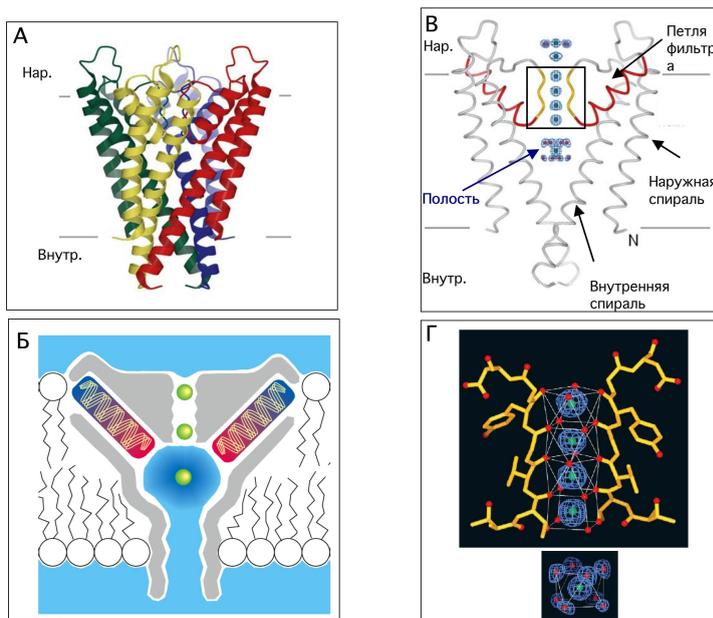
**В**, Примеры аминокислотных последовательностей селективного фильтра K<sup>+</sup> канала. Для всех трех царств биологической жизни организация фильтра высоко консервативна.

**Г**, Участок последовательностей, образующих альфа спираль и селективный фильтр Р-петли (схематически представлены вверху) для разных каналов аномального выпрямления. Цветом выделены гомологичные аминокислотные участки для всех каналов. (Адаптировано из (19, 23, 80).

Функциональный канал KcsA формируется четырьмя субъединицами, пересекающими мембрану и окружающими центральное отверстие для прохождения ионов (рис. 2,А). На рис. 2,В показаны две из четырех субъединиц с электронной плотностью ионов K<sup>+</sup> вдоль поры. Каждая субъединица имеет петлю для формирования селективного фильтра. Этот участок длиной в 12 ангстрем представляет собой узкую пору, с обращенными внутрь отрицательно заряженными кислородами (Рис. 2,Б-Г). Этот сегмент обеспечивает дегидратацию и избирательное прохождение ионов K<sup>+</sup>, препятствуя прохождению натрия, двухвалентных катионов или анионов.

Из анализа структуры KcsA следует выделить два поразительных факта. Во-первых, предсказательная сила косвенного, но чрезвычайно углубленного экспериментального анализа. Присутствие в поре выстроенных в цепочку четырех ионов находится в полном согласии с предсказаниями Ходжкина и Кейниса, опубликованными ещё в 1955 году. Обеспечение избирательного прохождение K<sup>+</sup> с помощью обращенных в узкую пору отрицательно заряженных кислорода и дегидратация K<sup>+</sup> в поре были предсказаны Армстронгом в 70-х годах. В этом плане кристаллическая структура только наглядно доказала то, что уже предполагалось.

**Рис. 2. Организация селективного фильтра KcsA канала на основании анализа его кристаллической структуры.**



**В**, Для наглядности представлено только две KcsA субъединицы из 4-х. Красным выделена альфа спираль поры. Селективный фильтр калиевого канала (показан желтым) имитирует гидратную оболочку вокруг иона калия. Показаны четыре иона  $K^+$  в селективном фильтре. Электронная плотность вокруг ионов  $K^+$  изображена синей сеткой.

**Г**, Детальная структура селективного фильтра  $K^+$  канала (часть, выделенная рамочкой на рис. 2,А), иллюстрирующая, как атомы кислорода (красный цвет) в селективном фильтре имитируют гидратную оболочку вокруг иона  $K^+$  (сине-зеленый цвет с синей сеткой электронной плотности). Для сравнения внизу показан ион  $K^+$  в окружении воды. Белые линии подчеркивают геометрию координат  $K^+$  в фильтре и в воде. Изображены участки селективного фильтра только двух субъединиц. (Из (23)).

Во-вторых, поразительное умение природы точно и эффективно использовать в своих эволюционных построениях физико-химические законы. В данном случае природа нашла элегантное и простое решение для преодоления диэлектрического барьера при прохождении иона через мембрану. В районе центральной части мембраны, субъединицы канала образуют полость диаметром около 10 ангстрем (рис. 2,Б). Эта полость заполнена водой и обеспечивает мгновенную гидратацию ионов  $K^+$  сразу же после прохождения относительно короткого участка селективного фильтра. Часть петли селективного фильтра имеет участок, представляющий альфа-спираль (выделенная красным на рис. 2,В). Карбонильные атомы кислорода альфа-спирали не участвуют в образовании водородных связей и поддержании вторичной структуры, а направлены так, чтобы стабилизировать ионы  $K^+$  в полости.

Решение высокоизбирательного и эффективного преодоления липидного барьера удивительно элегантно по простоте и точности. При этом нужно помнить, что  $K^+$  каналы (так же, как и многие другие) осуществляют трансмембранный перенос ионов не спонтанно, а в результате активации, отвечая на специализированные стимулы. Этими стимулами могут являться мембранный потенциал, ионы  $Ca^{2+}$  или другие вторичные посредники.

Общие принципы организации селективных фильтров разных калиевых каналов оказались удивительно сходными. Для большинства  $K^+$  каналов селективный фильтр представляет собой «каноническую» последовательность TXGYGDY, где X – алифатическая аминокислота (Рис. 1,В,Г). Это правило справедливо как для  $K^+$  каналов прокариотических клеток, так и для клеток многоклеточных организмов.

А, «Ленточное» представление структуры KcsA канала: вид сбоку. Четыре субъединицы представлены разным цветом. Б, Схематический срез внутренней структуры KcsA канала, демонстрирующий механизм снижения диэлектрического барьера для  $K^+$ . Только два иона показаны в области селективного фильтра. Заполненная полость находится в центре мембраны. Альфа спирали направляют отрицательные концы к полости, стабилизируя положительно заряженный ион  $K^+$ . Без полости и спиралей ион  $K^+$  не смог бы пересечь центр мембраны.

Недавно была получена кристаллическая структура  $K^+$  канала входящего выпрямления, Kir2.2 (19). Несмотря на то, что аминокислотная последовательность этого канала всего на 20% совпадает с прокариотической, селективный фильтр очень близок по составу к каноническому (Рис.1,Г). Таким образом, однажды найденное природой решение для высокой  $K^+$  избирательности используется во всех последующих эволюционных построениях.

Более того, общая структура Kir2.2 очень близка к прокариотической. Однако, наружный участок Kir2.2 имеет выраженную, высоко структурированную « башню » (19). Ее окружение, видимо, защищает пору от входа больших молекул. Этим, возможно, объясняется резистентность каналов входящего выпрямления к токсинам, эффективно ингибирующим другие типы  $K^+$  каналов (20, 21).

В последнее десятилетие были определены структуры нескольких типов  $K^+$  каналов (19, 22,23), а также анион-избирательного канала (24), позволившие выяснить молекулярную природу их избирательности. За цикл работ по кристаллизации ионных каналов Р. МакКиннон был удостоен Нобелевской премии в 2003 году.

### **Рецептор-управляемые каналы.**

Особый интерес представляет выяснение структуры и функции рецептор-управляемых ионных каналов, многие из которых являются ключевыми белками, определяющими быструю синаптическую передачу. Эти белковые комплексы объединяют в одной структуре ион-проводящий участок (канал) и специализированные рецепторы, контролирующие открытие канала при взаимодействии со специфическими лигандами.

Рецептор-управляемые ионные каналы в системе позвоночных представлены четырьмя основными супер-семействами: глутаматные, « цис-петельные », АТФ-активируемые и ц-нуклеотид-активируемые каналы. В последние несколько лет были получены важные экспериментальные данные, позволившие прояснить ряд волновавших исследователей на протяжении десятилетий вопросов об устройстве и функции этих белковых комплексов.

### **Супер-семейство « цис-петельных » каналов.**

В нервной системе позвоночных супер-семейство « цис-петельных » каналов включает ионотропные рецепторы ацетилхолина, серотонина (5-НТЗ), гамма-аминомасляной кислоты (GABA<sub>A</sub> и GABA<sub>C</sub>) и глицина. Эти каналы представляют собой гомо- или гетеромерные ансамбли из 5 белковых субъединиц, формирующих центральную ионную пору (25,26,27). Каждая субъединица имеет 4 ТМ домена (ТМ1-ТМ4), цитоплазматический домен, соединяющий ТМ3 и ТМ4, а также большой наружный N-терминальный сегмент из более 200 аминокислот (28, 29,30). В наружном домене каждой субъединицы имеется консервативный участок из 13 аминокислот ограниченный цистеинами. Соединенные ковалентно цистеины формируют « цис-петлю » ("Cys-loop"), расположенную между рецепторным (лиганд связывающим) и трансмембранным доменами белковой субъединицы.

Одной из основных функций « цис-петельных » каналов является участие в быстрой нервно-мышечной и нейро-нейрональной синаптической передаче. Эффективность их работы регулируется через наружные, внутриклеточные и трансмембранные домены. Ионная пора этого семейства белков формируется пятью ТМ2 доменами (по одному от каждой субъединицы). Особенности аминокислотного состава ТМ2 сегментов определяют ионную избирательность каналов. Семейство "цис-петельных" рецепторов делится на катион- и анион-избирательные каналы, которые определяют, соответственно, возбуждение и торможение. В нервной системе позвоночных возбуждающими являются ацетилхолин- и серотонин-активируемые каналы, а ГАМК- и глицин-активируемые рецепторы составляют подсемейство тормозных каналов.

Результаты исследований последних лет предполагают, что « цис-петельные » каналы широко распространены в биологических организмах, от одноклеточных организмов, моллюсков, насекомых и до млекопитающих (31, 32). Функциональные свойства этих рецепторов, в особенности рецептора ацетилхолина, интенсивно

исследуются на протяжении многих десятилетий с использованием методов биофизики, биохимии и молекулярной биологии. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) являются ключевыми белками в нервно-мышечных синапсах позвоночных и функционировании центральной нервной системы.

В 1960—70-х годах изучением функции ацетилхолиновых рецепторов в мембране нервно-мышечного синапса занимался Л.М. Чайлахян и его сотрудники. Была предложена гипотеза «переходных процессов», анализ которой позволил предсказать, что такие агонисты АХ рецептора, как карбахолин (КХ), ацетилхолин (АХ) и суберилхолин (СХ) открывают каналы на разное время в следующем соотношении:  $T_{КХ} < T_{АХ} < T_{СХ}$  (33) и что время открытого состояния будет возрастать при снижении температуры (34,35,36). Эти предсказания вскоре получили экспериментальное подтверждение в опытах на концевой пластинке лягушки с использованием методов мембранных шумов (37,38) и пэтч-кламп регистрации (39). Следует отметить, что работа Неера и Сакмана (39) была основной в серии исследований, за которые они были удостоены Нобелевской премии в 1991 году.

Основная информация о молекулярной организации нАХР была получена за последние 30 лет. Первый подтип нАХР был выделен из электрического органа рыбы *Torpedo californica* (40). В последующие годы только у позвоночных было идентифицировано 17 субъединиц нАХР (альфа 1–10, бета 1–4, гамма, дельта и эпсилон). Гомо- или гетеропентамерные комбинации этих рецепторов представляют многообразное семейство с различными функциональными и фармакологическими свойствами (25, 26, 41, 42, 43).

Эти катион-избирательные каналы являются также проницаемыми для ионов  $Ca^{2+}$  (44, 45), что играет важную роль в инициации мышечного сокращения, модуляции освобождения медиаторов и функционирования нейрональных сетей. Для разных типов нАХР степень проницаемости для  $Ca^{2+}$  варьирует в пределах двух порядков, от 0,1 до 10% (см. более подробно в обзоре (43)).

Мышечные нАХР локализованы постсинаптически, где они принимают участие в быстрой передаче сигналов с нерва на мышцу. Нейрональные гетеромерные нАХР формируются из комбинации альфа2-альфа6 и бета2-бета4 субъединиц. Гомомерные рецепторы формируют альфа7-альфа9 субъединицы и альфа10 может создавать гетеромер с альфа9. Из гомомерных нАХР рецепторов только формируемый альфа7 субъединицей широко распространен в мозге млекопитающих (46), где он, возможно, может формировать и гетеромерные комплексы (43,47).

Нейрональные нАХР экспрессированы в различных отделах центральной нервной системы и на периферии. Они могут быть расположены как пост-, так и пресинаптически, а также внесинаптически. Пресинаптически расположенные нАХР играют важную роль в модуляции выброса нейромедиаторов в холинергических, глутаматергических, ГАМК-ергических и других синапсах ЦНС (48). Экспрессированные постсинаптически нАХР участвуют в регуляции нейрональной активности, активации вторичных посредников (прежде всего из-за входа  $Ca^{2+}$ ), экспрессии генов, клеточной дифференцировке и др. (46). Более подробная информация о свойствах нейрональных нАХР представлена в обзоре (43).

### **Структура «цис-петельных» каналов.**

Чтобы понять, как функционируют рецептор-управляемые каналы, важно знать их структуру и переходы в разные конформационные состояния, включая закрытое (отсутствие агониста), открытое (в присутствии агониста) и десенситизированное (непроводящее состояние канала в присутствии агониста).

Понимание молекулярной структуры "цис-петельных" каналов значительно расширилось благодаря нескольким важным результатам, полученным в последнее десятилетие. Во-первых, открытие ацетилхолин-связывающего белка (АхСБ) из пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* и определение его кристаллической структуры с разрешением 2,7 ангстрем (49). Это позволило использовать структуру АхСБ для гомологического моделирования рецепторных центров всего семейства "цис-петельных"

каналов. Во-вторых, определение структуры полного ацетилхолинового канала из *Torpedo* с разрешением 4 ангстрема (27). Это позволило уточнить топологию "цис-петельных" каналов и локализовать положение многих атомов и боковых цепей. В-третьих, определение с высоким разрешением (1,94А) кристаллической структуры экстраклеточного домена альфа1 субъединицы nАХР мыши, связанного с альфа-бунгаротоксином (50). Это позволило уточнить многие детали молекулярной организации этого участка АХР. И в-четвертых, получение кристаллической структуры двух прокариотических каналов, имеющих гомологическое сродство с «цис-петельными» рецепторами. Один канал, из бактерии *Erwinia chrysanthemi*, был кристаллизован в закрытом состоянии, что позволило выяснить его структуру с разрешением 3,3 А (51). Кристаллическая структура другого канала из бактерии *Gleobacter violaceus* была определена в открытом состоянии независимо двумя группами (52,53) с разрешением, соответственно, в 2,9А и 3,1А. Это позволило сравнить два состояния каналов и высказать предположения о молекулярных деталях изменений конформации, приводящих к открытию ионных пор.

Результаты этих исследований будут кратко обсуждены ниже. Дополнительную информацию можно получить также из недавних работ и обзоров (54,55,56).

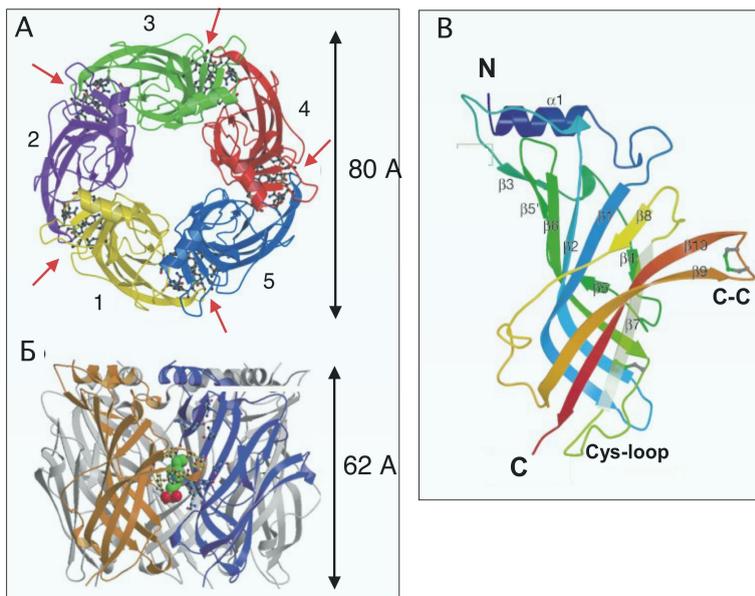
### **Ацетилхолин-связывающий белок из *Lymnaea Stagnalis*.**

На протяжении последних двух десятилетий много лабораторий пытались определить структуру nАХР. В основном, в качестве исходного материала использовался электрический орган ската (*Torpedo*). Прорыв произошел совершенно неожиданно, когда группе голландских ученых удалось не только идентифицировать ацетилхолин-связывающий белок в нервной системе пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовика), но и определить его кристаллическую структуру (49,57).

В нервной системе *Lymnaea stagnalis* имеется два типа холинергических синапсов, экспрессирующих на постсинаптической мембране катион-избирательные или анион-избирательные nАХР (58,59,60). Большой вклад в исследование свойств nАХР в идентифицированных нейронах прудовика сделан российскими исследователями. Впервые показана экспрессия ацетилхолиновых рецепторов в нейронах (61), идентифицирована анионная избирательность (58), представлены доказательства конформационных изменений nАХР при активации агонистом (62) и другие ключевые работы.

АхСБ производится глиальными клетками, расположенными вблизи от холинергических синапсов моллюска. Предполагается, что АхСБ функционально выполняет роль, подобную холинэстеразе в нервной системе позвоночных. Секретирующийся из глиальных клеток АхСБ связывает часть ацетилхолина, выбрасываемого из пресинаптических окончаний и таким образом, модулирует эффективность и временные характеристики синаптической передачи в холинергических синапсах (57,63).

АхСБ состоит из 210 аминокислот. Он имеет 15–20% аминокислот, идентичных с рецепторами ГАБА<sub>A</sub>, глицина и серотонина. Наибольшее сходство имеется с субъединицами никотиновых рецепторов: 20–25% идентичности (63). При этом почти все высоко консервативные аминокислотные остатки в семействе nАХР присутствуют в АхСБ. Более того, он связывает такие конкурентные агонисты и антагонисты, как никотин, д-тубокурарин и альфа-бунгаротоксин (49). Таким образом, оказалось, что АхСБ представляет собой гомолог лиганд-связывающего домена nАХР позвоночных, но не имеющий трансмембранного и цитоплазматического доменов. Именно отсутствие трансмембранных участков облегчило получение кристаллической структуры АхСБ.



**Рис. 3. Кристаллическая структура АхСБ.**

**А**, вид сверху. Каждая субъединица гомопентамера показана разным цветом и отмечена цифрами (1–5). Красные стрелки указывают на лиганд-связывающие участки.

**Б**, вид сбоку. Цветом выделены только две субъединицы. В «ball and stick» конфигурации показаны аминокислотные остатки лиганд-связывающего участка.

**В**, «Ленточное» представление структуры одной субъединицы АхСБ. Градиент цветовой раскраски указывает направление от N-конца (синий цвет) до С-конца (красный цвет). (Адаптировано из 49)).

На рис. 3 представлена общая структура АхСБ. Он имеет форму цилиндра диаметром 80Å и высотой 62Å с центральным каналом диаметром 18Å (рис.3). Сверху структура напоминает игрушечную вертушку с пятью лепестками (рис.3,А). Размеры белка близко соответствуют размерам наружного N-домена альфа субъединицы nAHP из *Torpedo*. Каждая из 5-ти субъединиц АхСБ имеет размеры 62х47х34 Å и состоит из альфа спирали в N-конце, двух коротких спиралей, а также «тела» образуемого десятью бета-листами (beta-strands), соединенными петлями и связанными цис-петлей (рис.3,В).

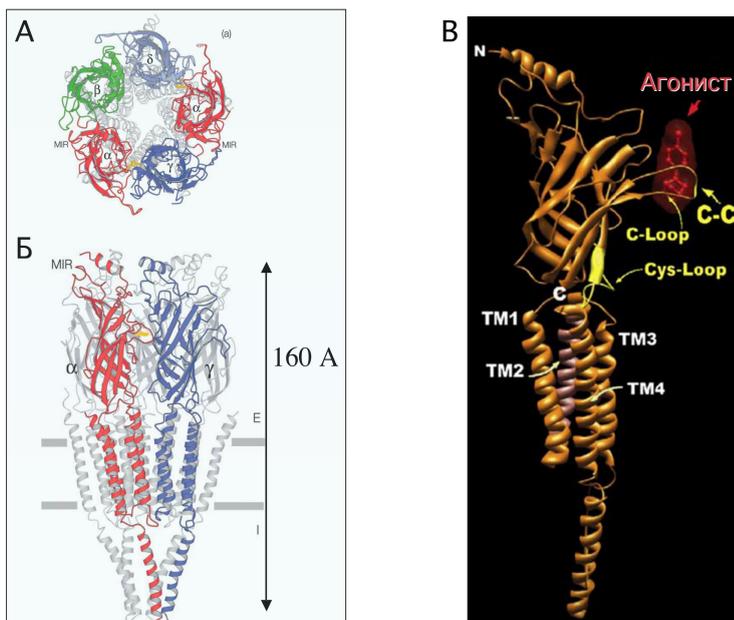
Рецепторные участки, т.е. места связывания с агонистом, находятся в щели, на границе двух субъединиц, формируемой серией петель и бета-листами от одной и другой субъединицы. Эти щели находятся ближе к наружной части пентамерного кольца (рис.3А). Они характеризуются присутствием ароматических и гидрофобных аминокислотных остатков, делающих вклад двух субъединиц. Детали АХ-связывающего центра представлены в недавнем обзоре (56).

Подобные АхСБ гены были обнаружены у других моллюсков (*Aplysia californica*, *Vulinus truncatus*) и у иявки *Haementeria ghilianii*. Несмотря на то, что их последовательности очень сильно различаются (идентичность всего 20–24%, сохраняются положения ключевых аминокислот), 3-мерная организация АхСБ из этих организмов имеет поразительное сходство. Более того, эти белки конструктивно близки по устройству к наружным участкам nAHP из *Torpedo* и мыши (56). Это является еще одним из многих примеров того, как в природе реализуются идеи структурной организации молекулярных комплексов с использованием сильно различающегося аминокислотного состава.

#### **Структура nAHP с разрешением 4Å.**

Важная информация об общей организации nAHP была получена из анализа постсинаптических мембран электрического органа ската *Torpedo* с использованием метода электронной микроскопии. Английский исследователь Нигель Унвин опубликовал серию работ, в которых были представлены элегантные эксперименты и скрупулезный анализ, позволяющие выяснить много деталей об устройстве nAHP и его возможных состояниях в открытой и закрытой конформации (27,64). К сожалению, метод электронной микроскопии не позволяет добиться такого высокого разрешения, которое возможно при рентгено-структурном анализе кристаллов белков. Тем не менее, используя этот подход удалось описать структуру nAHP с разрешением 4Å (27). Это позволило уточнить топологию "цис-петельных" каналов, локализовать положение многих атомов и

боковых цепей и высказать аргументированные предположения о конформационных переходах, приводящих к активации этого рецептор-управляемого канала.



**Рис. 4. Диаграмма nAChR рецептора с разрешением 4А.**

**А**, вид сверху; **Б**, вид сбоку. Для ясности, в **(Б)** цветом выделены только две субъединицы.

**В**, ленточное представление одной субъединицы ориентированной поперек мембраны. Из сравнения с рис. 3, **В** видно сходство структурной организации экстраклеточного домена nAChR и A $\chi$ СБ. Часть цитоплазматического домена не показана, т.к. этот участок не имеет регулярной упаковки при электронно-микроскопическом анализе образцов. (Адаптировано из 27)).

Никотиновый АХР из электрического органа

относится к подтипу нервно-мышечных синаптических рецепторов. Это гликопротеин размером в 290 кДа, составленный 5-ю субъединицами в порядке: альфа, гамма, альфа, бета и дельта (рис. 4, А). Как и для всех рецепторов « цис-петельного » супер-семейства его структуру можно разделить на три домена : большой экстраклеточный N-домен, 4 трансмембранных домена и небольшой внутриклеточный домен. Канальный комплекс представляет несколько сужающийся к цитоплазме конус высотой 160А. Два лиганд-связывающих рецепторных участка расположены на расстоянии 40А от поверхности мембраны. Пора представляет собой узкий, заполненный водой участок. Внутриклеточный домен формирует небольшую полость, имеющую узкие латеральные отверстия для прохождения ионов. Экстраклеточный домен также имеет полость с доминирующими отрицательными зарядами, которые, возможно, способствуют преимущественному прохождению катионов через канал (27).

3-х-мерная структура показывает, что внутренняя выстилка полости содержит много отрицательно заряженных групп. По-видимому, функционально она является дополнительным инструментом, формирующим ионную избирательность канала и эффективность прохождения ионов. Это предположение усиливается тем фактом, что у анион-избирательных каналов (рецепторы ГАБА и глицина) эквивалентные участки цитоплазматического домена имеют противоположные заряды. Более того, для рекомбинантного гомомерного рецептора серотонина было показано, что точечные мутации в этом участке цитоплазматического домена приводят к изменению проводимости канала более, чем в 40 раз (65).

Таким образом, полость цитоплазматического домена, возможно, играет роль, прежде всего, электростатического фильтра, отсекающего ионы « не нужного » заряда и размера. У некоторых представителей « цис-петельного » супер-семейства этот домен может также контролировать проводимость каналов.

В закрытом состоянии основные агонист-связывающие субъединицы (альфа-субъединицы) стабилизированы внутри- и между-субъединичными взаимодействиями. Связывание агониста с рецептором вызовет локальную переориентацию основных лиганд-связывающих субъединиц. Переход в эту « открытую » конформацию, вызывает, через систему промежуточных микродоменов, запуск синхронной переориентировки всех трансмембранных спиралей, формирующих пору. Воротное движение очень небольшое. Поворот спиралей происходит всего на 7–8 градусов и энергетически эти повороты ограничиваются гидрофобным окружением поры (27). Анализ этого процесса

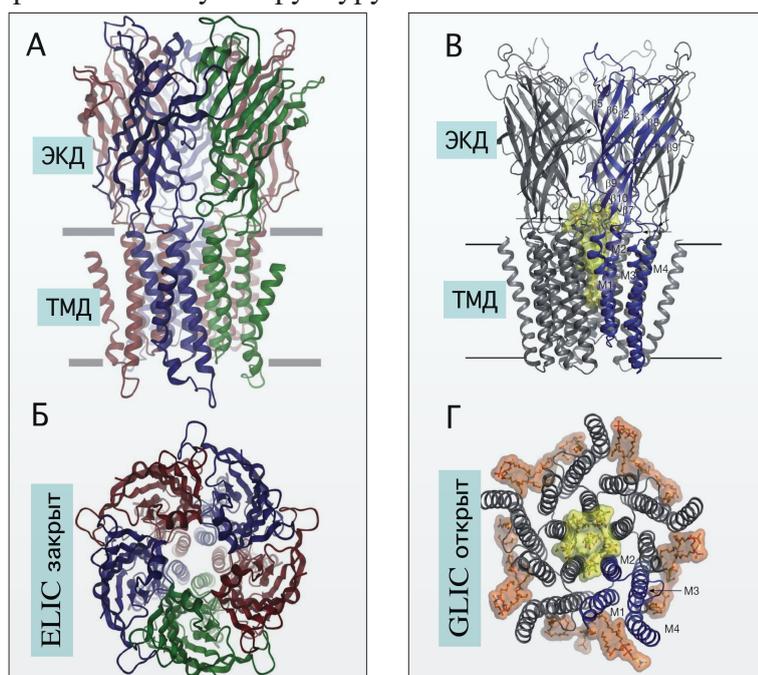
называемого «конформационной волной» позволил получить динамическое описание активации нАХР, что внесло важное дополнение к статической информации, получаемой из кристаллов и электронной микроскопии (66,67,68).

Таким образом, переход в открытое состояние нАХР представляет собой быстрое, кооперативное и очень ограниченное движение спиралей поры, в то время, как агонист-связывающие домены функционируют как контролирующее устройство, запускающее кооперативный конформационный переход в ответ на взаимодействие с лигандом. Отрицательно заряженная выстилка полостей в наружном и цитоплазматическом доменах, по-видимому, играет важную роль в облегчении избирательного транспорта ионов через канал.

Высокая степень консервативности ключевых аминокислот и анализ, проведенный с использованием химерных каналов, точечных мутаций и моделирования, позволяют предполагать, что эти принципы организации и активации ионных каналов являются общими для всего семейства «цис-петельных» рецепторов.

### Структура прокариотических 4-ТМ каналов.

До недавнего времени предполагалось, что рецептор-управляемые 4-ТМ каналы являются прерогативой многоклеточных эукариотических организмов. Однако, сравнительный анализ полных геномов прокариотических организмов, позволил выявить 15 возможных гомологов эукариотических рецептор-управляемых каналов из «цис-петельного» супер-семейства. Все прокариотические гомологи имели 4 трансмембранных домена и большой N-концевой экстраклеточный домен (31). Это открытие стимулировало несколько лабораторий анализировать свойства этих каналов и попытаться получить их кристаллическую структуру.



**Рис. 5. Кристаллическая структура прокариотических 4-ТМ каналов.**

**А, Б,** Ленточное представление структуры ELIC канала закристаллизованного в закрытом состоянии: вид сбоку (**А**) и сверху мембраны (**Б**). ЭКД — экстраклеточный домен; ТМД — трансмембранные домены.

**В, Г,** аналогичное представление GLIC канала закристаллизованного в открытом состоянии. (Из 51 и 52)).

Электрофизиологический анализ ионного канала из цианобактерии *Gloeobacter violaceus* позволил доказать французским ученым, что это – протон-активируемый, катион-избирательный канал, активирующийся при закислении внешней среды. Активация на 50 % (EC50) наблюдалась при pH 5,1 (69). Этот канал был назван GLIC (*Gloeobacte* *L*igand *I*onic *C*hannel). Его структура в открытом состоянии (кристаллизация при pH 4 – 4,6), была вскоре получена и проанализирована с разрешением около 3А независимо двумя группами из Франции и Швейцарии (52,53). За несколько месяцев до этого швейцарским исследователям удалось получить кристаллическую структуру гомолога GLIC из бактерии *Erwinia chrysanthemi* (51). Канал был кристаллизован в закрытом состоянии и назван ELIC (*Erwinia* *L*igand *I*on *C*hannel). Несмотря на низкую

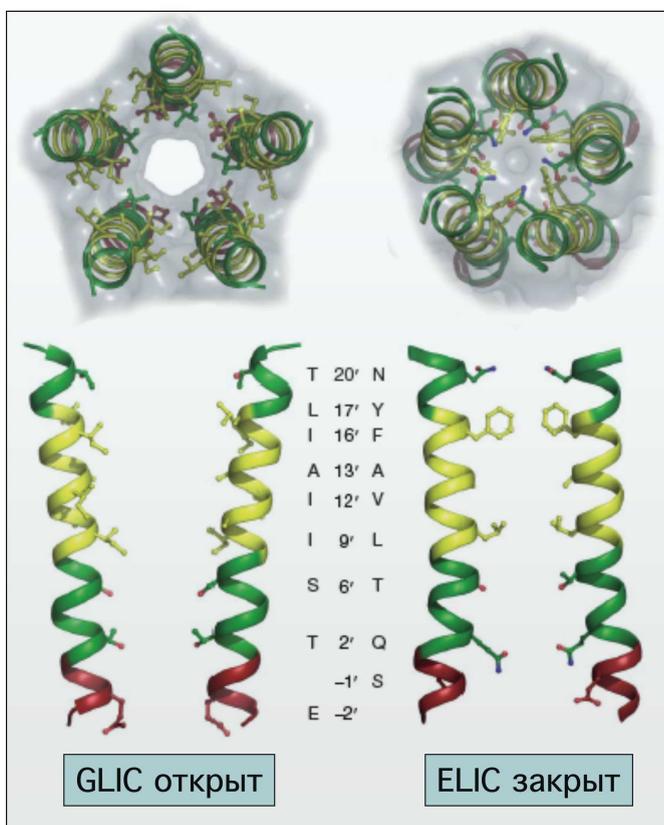
гомологию аминокислотных последовательностей этих каналов (18% идентичности), их структура оказалась не только близкой друг другу (рис. 5), но и близко соответствующей архитектуре НАХР, т.е. архитектуре «цис-петельных» каналов позвоночных.

Следует подчеркнуть, что до настоящего времени не были ещё получены кристаллические структуры высокого разрешения ни для одного канала в открытом и закрытом состояниях. Поэтому структуры ELIC и GLIC, полученные, по-видимому, в этих разных состояниях, являются чрезвычайно важными для понимания конформационных преобразований, приводящих к открытию ионных пор.

Оба канала являются пентамерами, т.е. состоят из 5-ти субъединиц, формирующих центральную пору (рис.5). Субъединицы плотно взаимодействуют друг с другом на площади в несколько тысяч квадратных микрон. Оба канала имеют цилиндрическую форму с размерами (для ELIC) 95x110 ангстрем.

Центральная часть экстраклеточного домена напоминает заполненный водой цилиндр, диаметр которого для ELIC составляет 16А. Эта полость сужается у входа в мембрану и максимальный диаметр гидрофобной поры составляет 7А (53). Это, по-видимому, размер канала, находящегося в закрытом состоянии.

Основные структурные различия между ELIC и GLIC наблюдаются в геометрии поры. Для GLIC, в открытом состоянии канала, пора представляет собой конус, диаметр которого у входа составляет 12А, а в нижней части мембраны, обращенной к цитоплазме - всего 5А (52). Рис. 6 иллюстрирует эти различия в конформации трансмембранных доменов.



**Рис. 6. Иллюстрация положения TM2 доменов в открытом и закрытом состояниях.**

Вверху — только TM2 домены пентамера, вид сверху.

Внизу — TM2 домены (только для 2-х субъединиц), вид сбоку. Показаны боковые радикалы аминокислот, смотрящие в пору. Гидрофобные, полярные и отрицательно заряженные остатки окрашены, соответственно, желтым, зеленым и красным цветами. Посередине указаны аминокислоты, остатки которых смотрят в пору в открытом или закрытом состояниях. (Из (52)).

Из сравнения двух конформационных состояний, можно предполагать, что TM2 домены закрытого канала находятся в конфигурации, когда гидрофобные окончания обращены к центральной части поры и препятствуют прохождению ионов. При этом отрицательно заряженные остатки глутаматов в нижней части канала обращены в пространство вне поры

(рис.6, слева). При переходе в открытое состояние происходит вращательное поворотное перемещение положения субъединиц и, следовательно, трансмембранных спиралей. Наружный домен вращается по часовой стрелке, в то время, как трансмембранный домен производит движение против часовой стрелки (52). В результате происходит увеличение диаметра входа в устье канала, уход гидрофобных окончаний из центральной части поры (в верхней части TM2 домена) и резкое сужение нижней части канала с поворотом остатков глутамата в устье поры (отмечены красным цветом на рис. 6).

Важно подчеркнуть, что такой характер конформационных преобразований предполагает динамический характер формирования катион-селективного фильтра в момент открывания поры. В закрытом состоянии отрицательно заряженные остатки глутамата находятся на большом расстоянии друг от друга и не могут препятствовать движению отрицательных ионов. Однако, в этом состоянии канал представляет барьер для всех ионов благодаря обращенным в устье гидрофобным аминокислотным остаткам (рис. 6, справа). Селективный фильтр формируется динамически при переходе канала в открытое состояние. В этот момент отрицательные заряды глутаматов нижнего кольца становятся точно в положение, обеспечивающее избирательное прохождение только катионов.

Несомненно, получение кристаллической структуры одного рецептор-управляемого канала в открытом и закрытом состоянии может привести к уточнению, а возможно, и изменению этой картины. Однако, выводы, сделанные из сравнения ELIC и GLIC, представляются достаточно убедительными.

В архитектуре и функциональной организации этих 4-ТМ каналов прокариот мы вновь встречаем элегантные, эффективные и идейно повторяющиеся решения, которые природа находит на молекулярном уровне при создании биологических конструкций. Особенно яркими примерами реализации повторяющихся архитектурных решений являются недавно полученные структуры рецептор-управляемых “тримерных” каналов: АТФ-активируемого P2X4 канала из зебра рыбки и протон (H<sup>+</sup>)-активируемого ASIC-канала из цыпленка. В данном изложении будет описан АТФ-активируемый канал и его краткое сравнение с ASIC.

#### **Кристаллическая структура АТФ-активируемого канала.**

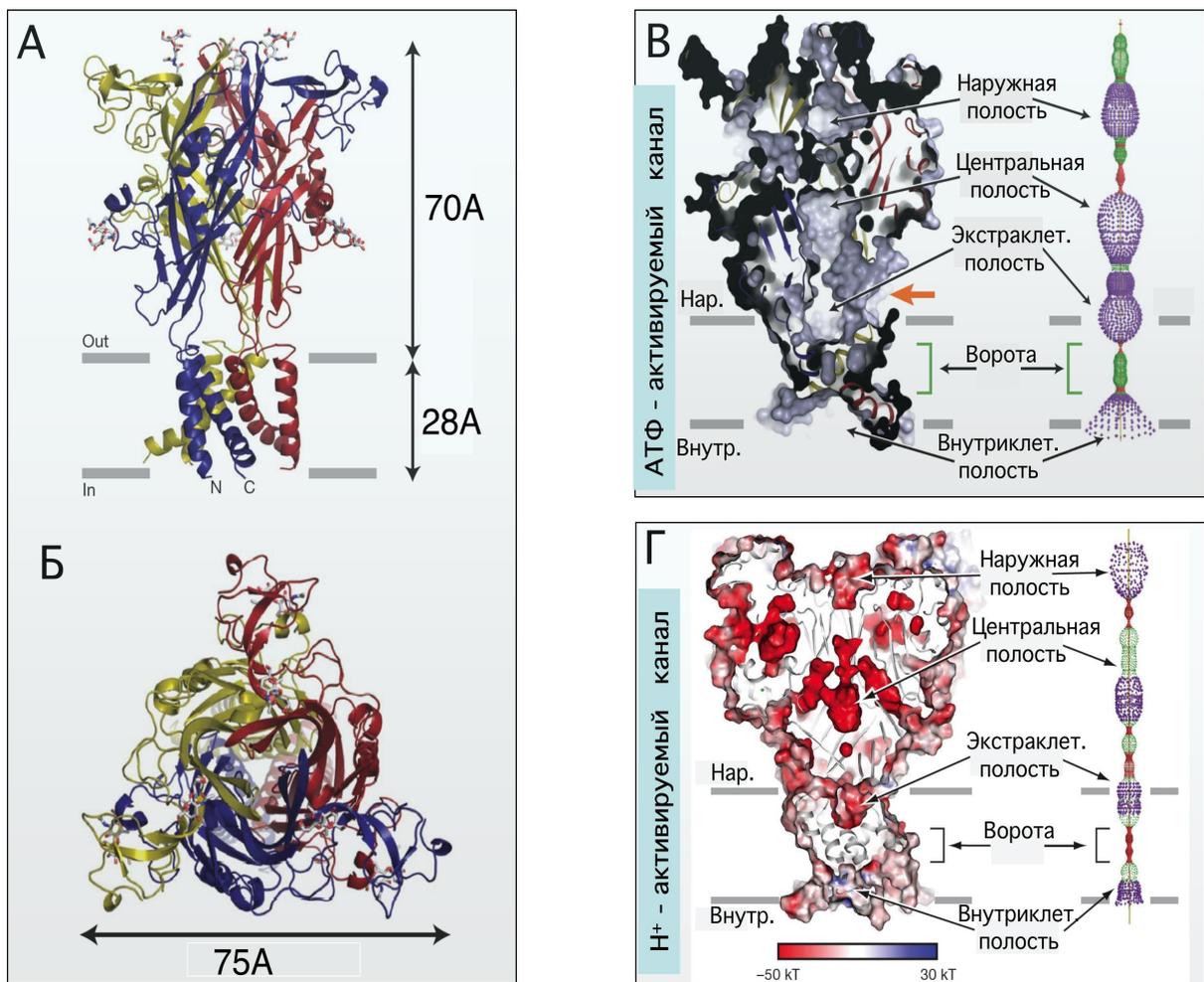
Гипотеза о существовании пуриnergической синаптической передачи была высказана английским исследователем Джеффри Барнстоком в 1970 г. на основании анализа сокращения гладких мышц нескольких видов животных (70). Позднее, основываясь на функциональном анализе действия АТФ, было предложено разделить рецепторы АТФ на два подкласса: ионотропные P2X рецепторы и метаботропные P2Y рецепторы (71).

Взрыв интереса к этим рецептор-управляемым каналам возник с 1994 года, когда был клонирован первый P2X рецептор (72). С тех пор было идентифицировано 7 генов P2X рецепторов. Анализ молекулярной организации показал, что они представляют новый класс рецептор-управляемых каналов (73). P2X гены (P2RX1-P2RX7), кодирующие P2X рецепторы (P2X1-P2X7), обнаружены у многих организмов от паразитирующих червей трематод до млекопитающих (73,74), указывая на то, что АТФ сигнализация через P2X рецепторы является общим механизмом у многоклеточных организмов.

АТФ-активируемые каналы являются катион-избирательными, проницаемыми для ионов Ca<sup>2+</sup> (от 2,7 до 12,4%) (75). Анализ аминокислотных последовательностей позволяет предположить, что каждая субъединица P2X имеет большой экстраклеточный домен и два трансмембранных домена. Данные электронной-микроскопии (76), анализ кинетики одиночных каналов и другие исследования указывают, что эти рецепторы – тримеры, т.е. функциональный канал формируется тремя субъединицами (74).

Очень важной для понимания устройства и механизмов работы рецептор-управляемых каналов явилось получение кристаллической структуры АТФ-активируемого канала P2X4 из зебра рыбки *Danio Rerio* (77) в закрытом состоянии с разрешением 3,1 ангстрема. Высокое атомное разрешение подтвердило предположения, что эти каналы являются тримерами и что каждая субъединица имеет 2 ТМ альфа спиральных домена, внутриклеточный конец и большой экстраклеточный домен, богатый дисульфидными связями.

Гомомерный P2X4 рецептор имеет чашеобразную форму с выступающим на 70А над мембраной экстраклеточным доменом и относительно коротким трансмембранным участком в 28А (рис. 7А). Максимальный наружный диаметр тримера составляет примерно 75А (рис. 7Б).



**Рис. 7. Основные принципы структурной организации АТФ-активируемого канала P2X и протон-активируемого канала ASIC1.**

**А, Б,** Ленточная иллюстрация структуры гомомерного P2X<sub>4</sub> канала. Вид сбоку (А) и сверху (Б). Каждая субъединица тримера представлена разным цветом.

**В** (слева), Сагиттальный срез P2X<sub>4</sub> канала, иллюстрирующий внутреннюю организацию поры в закрытой конформации. Ворота находятся примерно посередине мембранного бислоя. Вдоль центральной молекулярной оси расположены четыре полости (вестибуля) различающихся форм и размеров: наружная, центральная, экстраклеточная и внутриклеточная. Экстраклеточная полость связана с наружным раствором через щель (показана оранжевой стрелкой).

**В** (справа), Иллюстрация полостей и центрального пространства в канальном комплексе. Каждый цвет представляет разные диапазоны радиусов, измеренных от центральной оси (красный: <1,15 Å, зеленый: 1,15–2,3 Å, пурпурный: >2,3 Å).

**Г** (слева), Структурная организация протон-активируемого канала ASIC1, закристиализованного в десенситизированном состоянии. Срез, иллюстрирующий внутреннюю организацию канала. Цветом представлено распределение электростатического потенциала поверхности среза. Красный — отрицательный потенциал, синий — положительный.

**Г** (справа), Иллюстрация радиусов полостей ASIC1 канала. Цветное представление как на (рис.7,В). Следует отметить подобие в архитектурной организации P2X и ASIC1 каналов. (Адаптировано из 77 и 78).

Форма трансмембранного участка напоминает песочные часы, сформированные шестью альфа спиральными ТМ доменами (два от каждой из 3-х субъединиц). ТМ спирали каждой субъединицы ориентированы примерно антипараллельно относительно друг друга и под углом около 45° по отношению к оси мембраны.

Субъединицы плотно взаимодействуют друг с другом, особенно наружные домены. Площадь взаимодействия для каждой из них составляет примерно 3750 квадратных

ангстрем. Центральный участок рецепторного комплекса устроен значительно сложнее, чем, например, у калиевого KcsA канала. У P2X<sub>4</sub> рецептора он представляет собой несколько следующих друг за другом полостей (рис. 7,В), функциональное назначение которых, по-видимому, состоит в создании эффективного пути для прохождения ионов.

Анализ структуры позволяет предположить два дополняющих друг друга механизма катионной избирательности P2X канала и путей, по которым ионы из внеклеточного раствора могли бы пересекать мембрану. Первый путь обеспечивают три полости, локализованные непосредственно над трансмембранными доменами. Эти полости, диаметр которых достигает 8Å, имеют выстилку из преобладающих отрицательных зарядов. Присутствие нескольких «кислых» аминокислотных остатков, обращенных к центральному вестибюлю непосредственно над порой может создавать отрицательный электростатический потенциал, который обеспечивает повышение концентрации катионов возле наружного входа в канал. Такой механизм может обеспечивать доступ в канал преимущественно для катионов (калия, натрия, кальция). Второй механизм — непосредственное и специфическое взаимодействие проникающих ионов с атомами кислорода основной и боковой цепей в трансмембранном участке канала.

Очень важными для понимания функционирования рецептор-управляемого канала являются выяснение расположения рецепторного участка и молекулярной организации блоков, обеспечивающих открытие канала при действии агониста. Однако локализация АТФ-связывающего рецепторного домена точно ещё не определена. Предполагается, что АТФ связывается с участком, представляющим собой глубокую щель на границе соседних субъединиц, расположенную в 45 ангстремах от ионной поры. Взаимодействие агониста с рецептором вызывает конформационные изменения субъединиц, распространяющиеся на консервативный участок, локализованный в интерфейсе между трансмембранным и экстраклеточным доменами. Этот процесс приводит к открытию поры.

Одновременно с опубликованием структуры P2X канала, американский исследователь Эрик Гуо с сотрудниками представил кристаллическую структуру «тримерного» протон-активируемого канала ASIC (Acid-Sensing Ion Channel) (78). Эти каналы являются потенциал-независимыми, натрий избирательными рецептор-управляемыми каналами, относящимися к семейству эпителиальных натриевых каналов (79). Кристаллическая структура ASIC была получена для канала в десенситизированном состоянии и проанализирована с разрешением 3Å.

ASIC и P2X каналы имеют различные аминокислотные составы без проявления явной гомологии даже в высоко консервативных участках. Несмотря на это, в общей архитектуре и принципах организации этих молекулярных комплексов, в особенности ион-проводящего пути, проявляется удивительное сходство.

Оба канала имеют подобную трансмембранную топологию, представленную двумя ТМ доменами для каждой субъединицы и являются тримерами, т.е. три субъединицы формируют функциональный канал. Анализ показал, что в обоих молекулярных комплексах ТМ домены пересекают мембрану под близким углом, около 45–50 градусов. В результате, общая конформационная организация этих доменов в закрытом состоянии (P2X) и в десенситизированном состоянии (ASIC) оказались сходными.

Оба рецептора имеют подобные полости и вестибюли примерно одинаковых размеров (ср. рис. 7,В и Г). Более того, выстилки полостей имеют сильные отрицательные потенциалы в экстраклеточных доменах обоих каналов (рис. 7,В,Г). По-видимому, эти образования играют важную роль в создании эффективной катион-избирательности.

Дальнейшие исследования необходимы для более глубокого выяснения деталей создания механизма избирательного прохождения ионов через этот канал, определения организации агонист-связывающих участков и конформационных переходов при активации каналов. Однако, как уже отмечалось выше, из представленного краткого изложения структурной организации ионных каналов биологических мембран видно, что найденные природой важные конструктивные решения реализуются с необходимыми модификациями в разных, но близких по функциональному назначению молекулярных комплексах. В отношении рецептор-управляемых ионных каналов это проявляется в создании полостей на пути прохождения ионов, в архитектурном решении формирования

ионной поры трансмембранными альфа-спиральными доменами и формировании лиганд-связывающих рецепторных участков на границе субъединиц.

С того времени, когда Л.М. Чайлахян и его единомышленники отстаивали существование биологических мембран, прошло полвека. За это время наши представления о функциях мембран и ионных пор не просто расширились, но стали конкретными, глубоко аргументированными. Мы знаем не только аминокислотный состав, но и общую архитектуру многих видов каналов, их субъединичный состав, устройство разных доменов, внутреннюю организацию этих сложных белковых ансамблей. Однако, механизмы приводящие к открытию каналов, их переход в десенситизированное состояние, устройство рецепторных участков, а также многие тонкие детали функционирования каналов еще требуют своего выяснения. И это создает вдохновляющие перспективы для исследователей.

**БЛАГОДАРНОСТИ.** Автор выражает глубокую благодарность Е.А. Вульфюс за ценные замечания при подготовке рукописи. Работа выполнена при поддержке INSERM и Европейской программы FP-7 « Neurosupres ».

## Список литературы

1. Hille B. in *Ionic Channels of Excitable Membranes*// Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1992.
2. Panchin YV. Evolution of gap junction proteins—the pannexin alternative// *J Exp Biol.* 2005. V. 208:1415–1419.
3. Bernshtein J. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. *Pflügers arch// Ges. Physiol.* 1902. V. 92. P. 521–562
4. Hodgkin A.L., Huxley, A.F. Action potentials recorded from inside a nerve fibre// *Nature (London).* 1939. V. 144. P. 710
5. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve// *J. Physiol.* 1952. V.117. P. 500–544 ).
6. Hodgkin A.L., Keynes R.D. The potassium permeability of a giant nerve fibre// *J Physiol.* 1955. V. 128. P. 61–88.
7. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity// *Science.* 1998.V. 280. V. 69–77.
8. Либерман Е.А., Чайлахян Л.М. О природе потенциала действия // *Биофизика*, 1959, Т. 4, 5, С. 622–639.
9. Либерман Е.А., Чайлахян Л.М. Природа биопотенциалов нервных и мышечных волокон. I. Современная теория и ее трудности // *Цитология*, 1963а, Т. 5, 3, С. 311–318.
10. Либерман Е.А., Чайлахян Л.М. Природа биопотенциалов нервных и мышечных волокон. II. Преимущества и недостатки современной теории биопотенциалов // *Цитология*, 1963б, Т. 5, 4, С. 440–448.
11. Либерман Е.А., Чайлахян Л.М. Две основные концепции о природе биопотенциалов нервных и мышечных волокон // В сб.: "Физико-химические основы происхождения потенциалов и их роль в функциях". Труды МОИП, 1964, Т. 9, С. 55–73.
12. Либерман Е.А., Чайлахян Л.М. Механизмы возникновения биопотенциалов // *Руководство по физиологии*, 1969, Т 2, гл. 1, С. 5–36.
13. Hille B. Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations// *J. Gen. Physiol.* 1973. V. 61. P. 669–686.
14. Hille, B. The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve// *J. Gen. Physiol.* 1971. V. 58. P. 599–619.
15. Armstrong C.M. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons// *J. Gen. Physiol.* 1971. V. 59. P. 413.
16. Armstrong C.M. Potassium pores of nerve and muscle membranes// *Membranes.* 1975 V. 3. P. 325–58.
17. Hille B., Armstrong C.M., MacKinnon R. Ion channels: from idea to reality// *Nat Med.* 1999. V. 5 P. 1105–1109.
18. MacKinnon R., Cohen S.L., Kuo A., Lee A., Chait B.T. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels// *Science.* 1998. V. 280 P. 106–109.
19. Tao X., Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution// *Science.* 2009. V. 326 P. 1668–1674
20. Imredy J.P., Chen C., MacKinnon R. A snake toxin inhibitor of inward rectifier potassium channel ROMK1// *Biochemistry.* 1998. V.37. P.14867–14874.
21. Harvey A.L., Robertson B. Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels// *Curr Med Chem.* 2004. V. 11. P. 3065–3072.
22. Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution// *Nature.* 2001. V.414. P. 43–48.
23. MacKinnon R. Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction// *Biosci Rep.* 2004. V. 24. P.75–100.
24. Dutzler R., Campbell E.B., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. X-ray structure of a Cl<sup>-</sup> chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity// *Nature.* 2002. V. 415. P. 287–294.
25. Corringer, P.J., Le Novère, N., Changeux, J.P. Nicotinic receptors at the amino acid level// *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000. V. 40. P. 431–458.
26. Karlin, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors// *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 102–114.
27. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution// *J. Mol. Biol.* 2005. V. 346. P. 967–989.

28. Ortells M.O., Lunt G.G. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors// *Trends Neurosci.* 1995. V.18. P. 121–127.
29. Galzi J.L., Changeux J.P. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations// *Neuropharmacology.* 1995. V. 34. P.563–582.
30. Laube B., Maksay G., Schemm R., Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses?// *Trends Pharmacol Sci.* 2002. V. 23. P. 519–527.
31. Tasneem, A., Iyer, L. M., Jakobsson, E., Aravind, L. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels// *Genome Biol.* 2005. V. 6, R4 .
32. Kehoe J., Buldakova S., Acher F., Dent J., Bregestovski P., Bradley J. Aplysia cys-loop glutamate-gated chloride channels reveal convergent evolution of ligand specificity// *J Mol Evol.* 2009. V. 69. P. 125–141
33. Dunin-Barkovskii, V. L., Kovalev, S. A., Magazanik, L. G., Potapova, T. V. & Chailakhian, L. M. Equilibrium potentials of postsynaptic membrane activated by various cholinomimetics during changes in extracellular ionic medium// *Biofizika.* 1969. V. 14. P. 485–494.
34. Bregestovski P.D., Chailakhian L.M., Dunin-Barkovskii B.L., Potapova T.B., Veprintsev B.N. Effect of temperature on the equilibrium end-plate potential// 1972, *Nature.* V. 236. P. 433–454.
35. Bregestovski P.D., Vulfius E.A., Dunin-Barkovskii B.L., Zherelova O.M., Potapova T.B., Chailakhian L.M. Effect of temperature on membrane conductance induced by acetylcholine and some cholinomimetics// In: *Biophysics of membrane*, Kaunas. 1972. P. 82–92.
36. Bregestovski P.D., Veprintsev B.N., Dunin-Barkovskii B.L., Kovalev S., Potapova T.B., Chailakhian L.M. On the mechanism of postsynaptic membrane activation in skeletal muscle// In: *Biophysics of Living Cell.* Puschino. 1972. P.69–82.
37. Katz, B. & Miledi, R. The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components// *J. Physiol.* 1972. V. 224. P. 665–699.
38. Katz B., Miledi R. The characteristics of 'end-plate noise' produced by different depolarizing drugs// *J Physiol.* 1973. V. 230. P. 707–717
39. Neher E., Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres// *Nature.* 1976. V. 260. P. 799–802.
40. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani, Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T., Numa S. Primary structure of a-subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence// *Nature.* 1982. V. 299. P. 793–797.
41. Gotti C., Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology// *Prog. Neurobiol.* 2004. V. 74. P. 363–396.
42. Gahring L. C., Rogers, S. W. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells// *AAPS J.* 2005. V. 7. P. E885–E894.
43. Вульфийс Е.А.  $\alpha 7$ -подтип нейрональных никотиновых рецепторов ацетилхолина: структура, свойства, распространение, функции// *Биологические мембраны.* 2006, Т. 23. С. 111–118.
44. Bregestovski P.D., Miledi R., Parker I. Calcium conductance of acetylcholine-induced endplate channels// *Nature.* 1979. V. 279. P.638–639
45. Fucile S.  $Ca^{2+}$  permeability of nicotinic acetylcholine receptors// *Cell Calcium.* 2004. V.35. P.1–8.
46. Dani J.A., Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system// *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007. V. 47. P. 699–729.
46. Sudweeks S.N., Yakel, J.L. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic Ach receptors in rat CA1 hippocampal neurons// *J. Physiol. (London).* 2000 V. 527. P. 515–528
47. Anand R., Peng X., Lindstrom J. Homomeric and native alpha 7 acetylcholine receptors exhibit remarkably similar but non-identical pharmacological properties, suggesting that the native receptor is a heteromeric protein complex// *FEBS Lett.* 1993. V. 327. P. 241–246
48. Wonnacott S., Barik J., Dickinson J., Jones I.W. Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS: nicotinic modulation of transmitters// *J Mol Neurosci.* 2006. V. 30. P. 137–140.
49. Brejc K., van Dijk W. J., Klaassen R. V., Schuurmans M., van Der Oost J., Smit A. B., Sixma T. K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors// *Nature.* 2001. V.411. P. 269–276.
50. Dellisanti C. D., Yao Y., Stroud J. C., Wang Z. Z., Chen, L. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR  $\alpha 1$  bound to  $\alpha$ -bungarotoxin at 1.94 Å resolution// *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. P. 953–962.
51. Hilf R. J., Dutzler R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel// *Nature.* 2008. V. 452. P. 375–379.

52. Bocquet N., Nury H., Baaden M., Le Poupon C., Changeux J.P., Delarue M. et al. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation// *Nature*. 2009. V. 457. P. 111–114.
53. Hilf R.J., Dutzler R. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel// *Nature*. 2009. V. 457. P. 115–118.
54. Tsetlin V., Hucho F. Nicotinic acetylcholine receptors at atomic resolution. *Curr Opin Pharmacol*// 2009. V. 9. P. 306–310.
55. Zouridakis M., Zisimopoulou P., Poulas K., Tzartos S.J. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors// *IUBMB Life*. 2009. V. 61. P. 407–423.
56. Rucktooa P., Smit A.B., Sixma T.K. Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures// *Biochem Pharmacol*. 2009. V. 78. P. 777–787.
57. Smit A. B., Syed N. I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K. S., Lodder H., van der Schors R. C., van Elk R., Sorgedraeger B., Brejc K., Sixma T. K., Geraerts W. P. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission// *Nature*. 2001. V. 411 P. 261–268.
58. Kislov A.N., Kazachenko V.N. Ion current of excited cholinergic membrane of the giant isolated snail neurons// In: G.M. Frank (Ed.), *Biophysics of a Living Cell*. 1974. V. 4, USSR Academy of Sciences, Pushchino, P. 39–44.
59. Vulfius C.A., Tumina O.B., Kasheverov I.E., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. Diversity of nicotinic receptors mediating Cl<sup>-</sup> current in *Lymnaea* neurons distinguished with specific agonists and antagonist// *Neurosci Lett*. 2005. V. 373. P. 232–236.
60. van Nierop P., Keramidas A., Bertrand S., van Minnen J., Gouwenberg Y., Bertrand D., Smit A.B. Identification of molluscan nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits involved in formation of cation- and anion-selective nAChRs// *J Neurosci*. 2005. V.25. P.10617–10626.
61. Vulfius E.A., Veprintsev B.N., Zeimal E.V., Michelson M.J. Arrangement of cholinergic receptors on the neuronal membrane of two pulmonate gastropods// *Nature*. 1967. V. 216. P. 400–401.
62. Bregestovski P.D., Iljin V.I., Jurchenko O.P., Veprintsev B.N., Vulfius C.A. Acetylcholine receptor conformational transition on excitation masks disulphide bonds against reduction// *Nature*. 1977. V. 270. P.71–73.
63. Sixma, T. K., Smit, A. B. Acetylcholine binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels// *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003. V. 32. P. 311–334.
64. Unwin N. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy// *FEBS Lett*. 2003 V. 555. P.91–95.
65. Kelley S. P., Dunlop J. I., Kirkness E. F., Lambert J. J., Peters, J. A. A cytoplasmic region determines single channel conductance in 5-HT<sub>3</sub> receptors// *Nature*. 2003. V. 424. P. 321–324.
66. Grosman C., Zhou M., Auerbach A. Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating// *Nature*. 2000. V. 403. P.773–776.
67. Jha A., Cadugan D.J., Purohit P., Auerbach A. Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: the cys-loop and M2–M3 linker// *J Gen Physiol*. 2007. V. 130. P. 547–558.
68. Purohit P., Mitra A., Auerbach A. A stepwise mechanism for acetylcholine receptor channel gating// *Nature*. 2007. V. 446. P. 930–933.
69. Bocquet N., Prado de Carvalho L., Cartaud J., Neyton J., Le Poupon C., Taly A. et al. A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family// *Nature*. 2007. V.445. P.116–119.
70. Burnstock G., Campbell G., Satchell D., Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by nonadrenergic inhibitory nerves in the gut// *Br. J. Pharmacol*. 1970. V. 40. P. 668–688.
71. Burnstock, G., Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>- purinoceptor?// *Gen. Pharmacol*. 1985. V.16. P. 433–440.
72. Valera S., Hussy N., Evans R.J., Adami,N., North R.A., Surprenant A., Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P<sub>2x</sub> receptor for extracellular ATP// *Nature*., 1994. V. 371. P. 516–519.
73. North, R.A. Molecular physiology of P<sub>2X</sub> receptors// *Physiol. Rev*. 2002. V. 82. P. 1013–1067.
74. Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P<sub>2X</sub> receptors// *Annu Rev Physiol*. 2009. V. 71. P.333–359.
75. Egan T.M, Khakh B.S. Contribution of calcium ions to P<sub>2X</sub> channel responses// *J Neurosci*. 2004. V. 24. P. 3413–3420.
76. Mio K., Kubo Y., Ogura T., Yamamoto T., Sato C. Visualization of the trimeric P<sub>2X2</sub> receptor with a crown-capped extracellular domain// *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. V. 337. P. 998–1005.

77. Kawate T., Michel J.C., Birdsong W.T., Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state// *Nature*. 2009. V. 460. P.592–598.
78. Gonzales E.B., Kawate T., Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors// *Nature*. 2009. V. 460. P. 599–604.
79. Kellenberger S., Schild, L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure// *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. P. 735–767.
80. Ruta V., Jiang Y., Lee A., Chen J., MacKinnon R. Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K<sup>+</sup> channel// *Nature*. 2003. V. 422. P. 180–185.