

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПРОТОННОГО КАНАЛА ОТОР1

© 2024 г. К. Д. Сладков^{а, *}, С. С. Колесников^а

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

*e-mail: klimitrich@ya.ru

Поступила в редакцию 6.05.2024

После доработки 3.06.2024

Принята к публикации 10.06.2024

ОТОР1 — мембранный белок, функционирующий как протонный канал в ряде тканей. В частности, ОТОР1 вовлечен в трансдукцию кислых стимулов во вкусовых клетках млекопитающих. Структура белков семейства отопетринов представляет собой гомодимер из двух субъединиц, каждая из которых состоит из двух гомологичных α -бочек. В данном обзоре анализируется связь структуры и функции белка ОТОР1, рассматриваются предполагаемые пути транспорта протона, а также обсуждаются механизмы модуляции протонного тока и существующие кинетические модели ОТОР1. Имеющиеся данные позволяют рассматривать логический элемент исключающего ИЛИ (XOR) как функциональный эквивалент ОТОР1, который обеспечивает поток протонов, только если значения pH по разные стороны мембраны различаются.

Ключевые слова: ОТОР1, отопетрины, протонный канал, вкусовые клетки

DOI: 10.31857/S0233475524050047, **EDN:** cbwmef

ВВЕДЕНИЕ

Реакции протонирования—депротонирования определяют структуру и биологическую активность всех белков, а также регулируют метаболические реакции и заряд биологических мембран [1, 2]. Кроме того, в ряде физиологических процессов протон играет роль первичного медиатора [3]. Поэтому внутриклеточный гомеостаз протона и мониторинг внеклеточного pH являются важнейшими задачами физиологии клетки. Для мониторинга внеклеточного протона клетки используют несколько молекулярных сенсоров, включая гептаспиральные рецепторы нескольких типов и ионные каналы, активность которых зависит от pH внеклеточной среды, включая ASIC, TRP, K2P [4]. В механизмы, обеспечивающие гомеостаз протона, вовлечены транспортирующие протон системы нескольких типов, включая Na^+/H^+ -обменник, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортер, Na^+ -зависимый $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменник, H^+ -АТФ-азу вакуолярного типа [5] и протонные каналы [6]. До недавнего времени в геномах эукариот был идентифицирован единственный ген, кодирующий протонный канал, а именно H_v1 [7]. Однако исследования последних лет выявили, что белки отопетрины, открытые в 2003 году и функциональная роль которых была не вполне ясна [8], функционируют как протонные

каналы [9]. Данный обзор суммирует накопленные данные о структурно-функциональных характеристиках протонных каналов, формируемых отопетринами.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ ОТОР

Отопетрины были открыты при исследовании мышей линий *mlh* (порт. *mergulhador* «ныряльщик») и *tlh* (англ. *tilted* «наклонный»), у которых отсутствовали отолиты — кристаллы карбоната кальция, прикрепленные к волосковым клеткам вестибулярного аппарата. Смещения отолитов под действием силы тяжести или при ускорении тела служат сенсорным стимулом для механорецепторных волосковых клеток, которые обеспечивают мозг информацией о положении тела в пространстве. В отсутствие отолитов мыши утрачивали чувство равновесия, что проявлялось в неумении плавать и наклоне головы при сохранении морфологии улитки костного лабиринта, а также нормальной функции слуха и центральной вестибулярной системы. Генетический анализ выявил, что обе линии несут точечные мутации в гене, получившем название отопетрин-1 (*Otop1*) от греческих слов «*отос*» — ухо и «*петрос*» — камень [8]. Данные мутации приводят к неконсервативной замене аминокислоты в кодируемом белке ОТОР1, что ассоциируется

с нарушением процесса формирования отолитов. Роль OTOР1 в процессе формирования отолитов до сих пор неизвестна.

OTOР1 имеет два гомолога OTOР2 и OTOР3, для которых установлены 34 и 30% сходства аминокислотной последовательности с OTOР1 [8]. Наиболее изученным в семействе отопетринов является белок OTOР1, локализованный у мышей во внутреннем ухе, молочной железе, буром жире, а также во вкусовых клетках типа III. Гомологи OTOР1 также идентифицированы в организмах разных таксонов от дрозофилы до человека, и их функциональная роль в физиологии клетки окончательно не ясна.

Ряд фактов указывал, что OTOР1 вовлечен в процессы клеточного метаболизма, в частности в гомеостаз Ca^{2+} . Так, при гетерологичной экспрессии OTOР1 в клетках COS-7 наблюдалось уменьшение амплитуды их Ca^{2+} -ответов на АТР [10]. Исследование геномов людей с микродентией боковых резцов показало, что это нарушение развития коренных зубов чаще возникает у людей с точечной мутацией в гене *Otop1* [11]. Все эти факты поддерживают идею, что OTOР1 вовлечен в регуляцию внутриклеточного Ca^{2+} , хотя соответствующий механизм пока не идентифицирован. По всей видимости, физиологические функции OTOР1 этим не исчерпываются. Так, ген *Otop1* активно экспрессируется в бурой жировой ткани и тучных клетках мышей. Голодающие мыши с генетическим нокаутом гена *Otop1* испытывали достоверно большее понижение температуры тела и падение физической активности в сравнении с животными дикого типа. Усиление ответа на голодание исчезало, если нокаутные мыши ранее находились на высокожировой диете. Следствием инактивации гена *Otop1* был еще один феномен: максимальная скорость индуцированного FCCP дыхания митохондрий падала, хотя уровень потребления кислорода в покое сохранялся [12].

Демонстрация того, что OTOР1 и другие отопетрины функционируют как протонный канал, сместило акцент исследований с анализа их вклада в регуляцию внутриклеточного Ca^{2+} на выяснение их роли в гомеостазе протона. Хотя связь между двумя этими функциями пока не детализирована, таковая ясно прослеживается на примере мезенхимных клеток в личинках морского ежа, которые участвуют в формировании кальцитового скелета, нарабатывая аморфный CaCO_3 [13]. В этом процессе при создании 1 моль CaCO_3 вырабатывается 1.6 моль ионов H^+ . Было показано, что центральную роль в удалении избыточных протонов из клетки играет OTOР2 [13]. Возможно, OTOР1 играет

аналогичную роль в формировании отолитов, координируя изменения pH и концентрации кальция.

Во вкусовой почке млекопитающих вкусовые клетки типа III являются клеточными сенсорами кислых стимулов [14]. Оказалось, что именно эти клетки экспрессируют OTOР1, который является молекулярным детектором кислых веществ, функционируя как протонный канал [9]. Кислый стимул инициирует открытие OTOР1, тем самым обеспечивая поток протонов в цитозоль клетки и ее деполяризацию [9]. OTOР1 также может участвовать в формировании вкуса лакрицы, содержащей NH_4Cl , который при диссоциации в растворе высвобождает ион NH_4^+ . Плазмалемма клеток хорошо проницаема для NH_4^+ , который, проникая в цитозоль, вызывает ее защелачивание [15], тем самым создавая протонный градиент, достаточный, в случае вкусовых клеток, для инициации входящего тока H^+ через OTOР1. Таким образом, во вкусовых клетках OTOР1 функционирует как протонный канал, активирующийся либо при закислении среды вкусовой поры, либо при защелачивании цитозоля клеток типа III. В соответствии с электрохимическим градиентом протоны входят через активированный OTOР1 в клетку, деполяризуя ее, что запускает генерацию потенциалов действия, вход Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы и выброс нейротрансмиттера, кодирующего сенсорную информацию [16].

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Функция OTOР1 как протонного канала была верифицирована при изучении вкусовых клеток типа III мышей. Показано, что эти вкусовые клетки генерируют потенциалы действия (ПД) в ответ на понижение внеклеточного pH (pH_o) [17]. С целью выяснить механизмы этого явления, ионные токи через мембрану вкусовой клетки анализировались методом patch clamp при разных составах внеклеточного раствора [18]. В частности, показано, что величина входящего тока в ответ на различные кислоты, закислявшие внеклеточный раствор до pH_o 5, не зависела ни от типа аниона кислоты, ни от уровня экстраклеточного Na^+ . В то же время потенциал реверсии тока зависел от трансмембранного градиента протонов в соответствии с уравнением Нернста. При этом понижение pH_o сопровождалось уменьшением внутриклеточного pH (pH_i). В совокупности эти результаты свидетельствовали о высокой протонной проницаемости мембраны вкусовых клеток типа III, специализированных на детекции кислого. В 2018 году протонную проницаемость плазмалеммы вкусовых клеток типа III, придающую последним способность детектировать

кислое, удалось связать с экспрессией ОТОР1: вкусовые клетки мышей с *slt*-мутацией *Otop1* не генерировали электрические ответы на кислые стимулы [9].

Otop1 и его гомологи из разных организмов, включая дрозофилу *Drosophila melanogaster*, зебру-фиш *Danio rerio* и человека, были клонированы и гетерологично экспрессированы в клетках НЕК-293 и ооцитах лягушки *Xenopus tropicalis*. Рекombинантные отопетрины индуцировали в трансфицированных клетках отсутствующую в контроле протонную проводимость, которая по биофизическим свойствам была близка к таковой во вкусовых клетках типа III [9, 19, 20]. Это свидетельствовало о том, что электрофизиологические свойства протонного канала ОТОР1 эволюционно достаточно консервативны и слабо зависят от клеточного микроокружения.

Одним из ключевых свойств ОТОР1 является высокая протонная селективность, необходимая всем протонным каналам. Действительно, при нейтральном pH физиологические растворы содержат порядка 10^{-7} моль/л ионов H^+ и 0.1 моль/л Na^+ , т.е. на шесть порядков больше. Поэтому даже при относительно небольшой Na^+ -проницаемости протонный канал переносил бы преимущественно ионы Na^+ . Расчет относительной проницаемости канала из уравнения Гольдмана–Ходжкина–Катца показал, что при pH_o 5.5 проницаемость ОТОР1 для H^+ (P_H) по отношению к Na^+ (P_{Na}) не менее чем 2×10^5 [9]. Более того, отношение P_H/P_{Na} еще больше при щелочном pH_o, достигая 4×10^7 при pH_o 8.5 [21]. Эти оценки сопоставимы с таковыми, полученными для других протонных каналов, для которых $P_H/P_{Na} \approx 10^6$ [6].

При физиологических концентрациях ионов одиночные ионные каналы переносят токи в диапазоне 0.1–10 пА, в котором их можно детектировать с помощью современной электрофизиологической техники [22]. Величина протонного тока через одиночный канал ОТОР1 пока не оценена ни в прямых экспериментах (видимо, ток ниже детектируемого предела 0.1 пА), ни косвенно с использованием методов анализа флуктуаций [23]. Следует отметить, что транспорт ионов через ионный канал условно можно разбить на две стадии – независимую от потенциала диффузию иона к устью канала и перенос иона через пору канала под действием электрического поля. При малых концентрациях иона лимитирующей стадией является диффузия к устью, а при насыщающих – электродиффузия. Концентрация свободных протонов невысока, поэтому можно ожидать, что лимитирующей стадией, как и для большинства транспортирующих

протон белков, является диффузия. В этом случае ток через одиночный протонный канал при pH_o 7 должен быть порядка 10^{-4} пА [6].

Как и другие протонные каналы, ОТОР1 ингибируется ионами двухвалентных металлов во внеклеточном растворе, включая Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} и Cd^{2+} . Наиболее эффективный и обычно используемый при концентрации 1 мМ Zn^{2+} вызывает быстрое и обратимое подавление протонного тока через ОТОР1. ОТОР3 также ингибируется ионами Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} , причем в сопоставимой степени [24]. Подобно другим протонным каналам, ингибирование токов через ОТОР1 внеклеточным Zn^{2+} сильно pH-зависимо [19, 25]. Формально этот феномен мог бы объясняться конкуренцией между протоном и цинком за единый центр связывания. Вполне возможно, что протонирование какой-либо из аминокислот, участвующей в координационном связывании Zn^{2+} может уменьшить аффинность его связывания с ОТОР1. Кроме того, снижение протонного тока в присутствии Zn^{2+} может частично быть обусловлено тем, что связанный цинк экранирует отрицательный заряд мембраны, вследствие чего падает локальная примембранная концентрация протонов и уменьшается электродвижущая сила протонного тока. В последнем случае IC₅₀ для Zn^{2+} должна зависеть от эффективного поверхностного заряда мембраны, который не является инвариантом и отличается у клеток разных типов [26]. Во всяком случае, для клеток НЕК-293 IC₅₀ = 73 мкМ, а для вкусовых клеток IC₅₀ = 266 мкМ [19]. В целом, механизм ингибирования протонного тока через ОТОР1 ионами Zn^{2+} остается дискуссионным.

В отличие от протонного канала вирусов М2 и человеческого Hv1 протонный канал ОТОР1 является слабо потенциал-чувствительным [9]. Об этом свидетельствует линейная вольт-амперная зависимость протонного тока через ОТОР1, которая генерировалась при поляризации ОТОР1-экспрессирующих клеток как пилообразным напряжением, так и серией импульсных потенциалов [9]. В последнем случае ток менялся практически со скоростью фиксации потенциала, что свидетельствовало об отсутствии потенциалзависимой активации ОТОР1.

При импульсном закислении внеклеточного раствора клетки НЕК-293, гетерологично экспрессирующие ОТОР1 мыши (mOTOP1), человека (HsOTOP1), цыпленка (GgOTOP1) или зебры-фиш (DrOTOP1), отвечали сходным образом: стимуляция первоначально инициировала быстрый рост входящего тока протонов, который по достижению пика сменялся на относительно медленное падение (рис. 1a–1g, левые панели). После возвращения pH_o

к нейтральному значению ток быстро снижался и падал практически до нуля. Повышение pH_i раствором NH_4Cl приводило к появлению входящего тока со сходной динамикой в случае ОТОР1 мыши, человека, цыпленка и намного меньшему току в случае зебры-фиш (рис. 1а-1г, правые панели).

Следуя [27], постулируем, что величина интегрального тока протонов I_H определяется следующим выражением, являющимся эмпирическим аналогом закона Ома для ионных токов [28]:

$$I_H = g_H (V_m - E_H) \quad (1)$$

$$E_H = \frac{RT}{F} \ln \frac{10^{pH_o}}{10^{pH_i}} = \ln 10 \frac{RT}{F} (pH_o - pH_i) \quad (2)$$

где g_H – протонная проводимость мембраны, индуцированная протонным каналом, V_m – трансмембранный потенциал, E_H – равновесный потенциал для протонов. Из уравнений (1) и (2) видно, что сила $(V_m - E_H)$ растет, если при постоянном E_H потенциал клетки становится более отрицательным или если при постоянном V_m падает pH_o или растет pH_i .

Концепция протондвижущей силы позволяет правильно предсказать направление протонного тока через отопетрины при определенных мембранном потенциале и градиенте концентраций H^+ . Так, в мезенхимных клетках морского ежа потенциал покоя составляет всего -20 мВ, что позволяет протонам выходить из клетки через ОТОР2 по градиенту протонов [13]. Во вкусовых клетках потенциал покоя около -60 мВ [29], что эквивалентно примерно 10-кратному градиенту протонов, поэтому ток протонов через ОТОР1 в основном входящий, даже при умеренных щелочных стимулах.

В рамках концепции силы также объяснимо, почему в клеточном ответе на кислый стимул (рис. 1а-1г, левые панели) первоначальная фаза роста сменяется на убывание тока через ОТОР1-содержащую мембрану. После подачи кислого стимула в начальный момент времени протондвижущая сила постоянна, и динамика тока определяется кинетикой изменения проводимости g_H при переходе протонного канала в открытое состояние. Далее вход протонов в цитозоль клетки приводит к постепенному повышению внутриклеточной концентрации H^+ и падению протондвижущей силы, следствием чего является убывание тока при установившейся проводимости (уравнение (1)). Когда

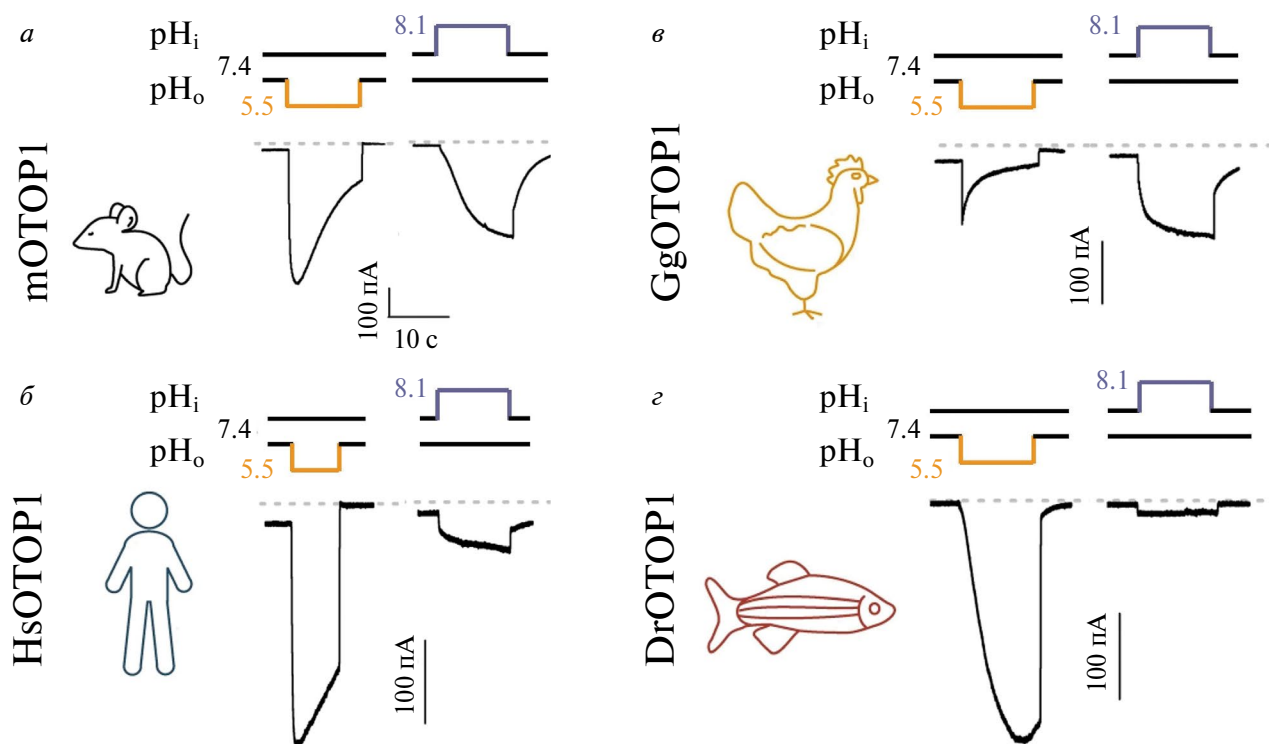


Рис. 1 Ответы клеток HEK-293, экспрессирующих ОТОР1 мыши (а), человека (б), цыпленка (в) или зебры-фиш (г) на аппликацию стимула с pH_o 5.5 или pH_i 8.1, как показано в (а) (модифицировано из [20] по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License).

внешний кислый стимул снимается, протонный градиент падает и становится даже меньше такового в покое за счет закисления цитоплазмы, что приводит в некоторых случаях к существенному уменьшению протондвижущей силы и к падению протонного тока до уровня ниже тока в покое (рис. 1а-1г, левые панели). Эксперименты [27] подтвердили, что убывание тока действительно может быть предсказано по изменению электродвижущей силы.

В 2022 году впервые было показано, что ОТОР1-положительные клетки отвечают не только на кислые, но и на щелочные стимулы [27]. Более поздняя работа той же лаборатории [21] подтвердила, что повышение pH_o приводит к появлению протонного тока в клетках НЕК-293, экспрессирующих рекомбинантный ОТОР1.

Измеряя величину пикового протонного тока, инициированного стимулами разной интенсивности в эксперименте [21, 27], можно оценить величину протонной проводимости, зная потенциал на плазмалемме клетки и pH по обе стороны мембраны (уравнения (1) и (2)). В то время как pH_o — это контролируемый параметр внеклеточного раствора, величина pH_i , вообще говоря, неизвестна, хотя достаточно точную оценку pH_i можно получить, определив потенциал реверсии протонных токов [21]. В случае стимулов, защелачивающих цитозоль с помощью NH_4Cl , pH_i определялся при помощи pH -чувствительного флуоресцентного красителя [20]. На рис. 2 представлены оценки ОТОР1-индуцированной проводимости на основе измерения пикового протонного тока при различных pH_o , выполненных в работах [20, 21, 27]. Полученный график зависимости интегральной H^+ -проводимости от трансмембранной разности pH (рис. 2) позволяет сделать ряд заключений.

При нейтральном pH_o , достаточно близком к pH_i , протонная проводимость мембраны ОТОР1-положительных клеток была мала [21], указывая на незначительную активность ОТОР1. При подаче щелочного стимула возникал выходящий протонный ток, величина которого возрастала по мере усиления стимула (рис. 2). Вычисленная по уравнению (1) величина проводимости выходила на плато уже при $pH_o \sim 8$, что ожидаемо, поскольку выходящий протонный ток определялся pH_i (pH 7–7.3), который не должен был значительно меняться за счет внутриклеточного протонного буфера за время аппликации щелочного стимула. При понижении pH_o проводимость нелинейно росла с увеличением концентрации внеклеточного протона на 3 порядка (рис. 2) [27]. Это указывает, что внеклеточный протон является не только носителем тока, но и активатором ОТОР1. При

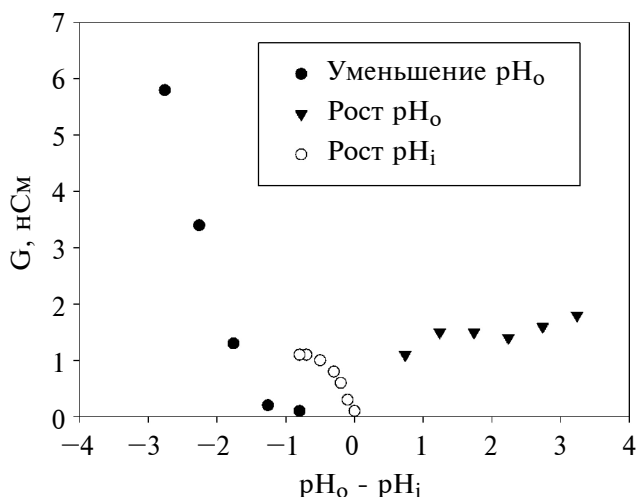


Рис. 2. Величина проводимости канала ОТОР1, экспрессированного в НЕК-293, при разных трансмембранных градиентах протона. Данные по кислым и щелочным стимулам [21] и NH_4^+ -стимулам [20] получены делением величины тока в пике на величину протондвижущей силы [21].

стимуляции клетки NH_4Cl ее протонная проводимость увеличивалась, хотя изменялся только pH_i [20]. Таким образом, активность ОТОР1 регулируется изменением концентрации протона по обе стороны мембраны.

СТРУКТУРА

Структура белков семейства отопетринов была расшифрована с использованием криоэлектронной микроскопии. В 2019 году Саотоме и др. изучали ОТОР1 зебры-фиш (*Danio rerio*) и ОТОР3 курицы (*Gallus gallus*) [30], а Чен и др. исследовали структуру ОТОР3 тропической лягушки (*Xenopus tropicalis*) XtОТОР3 [31]. Полученные структурные данные свидетельствуют, что четвертичная структура отопетринов представляет собой гомодимер из двух субъединиц [32]. Каждая субъединица включает 12 трансмембранных α -спиралей, образующих два структурно сходных домена по 6 спиралей, называемых N- и С-доменами (рис. 3а). Трансмембранные спирали обоих доменов расположены подобно доскам бочки. Таким образом, каждая субъединица ОТОР1 состоит из двух α -спиральных бочек (рис. 3б). Из-за высокой подвижности петель, соединяющих трансмембранные спирали, их структура разрешена слабо.

Внеклеточные и внутриклеточные петли отопетринов играют важную роль в функционировании белка. В каждой субъединице 12 трансмембранных спиралей соединяются 11 петлями, которые принято обозначать как $La-b$, где a и b — номера

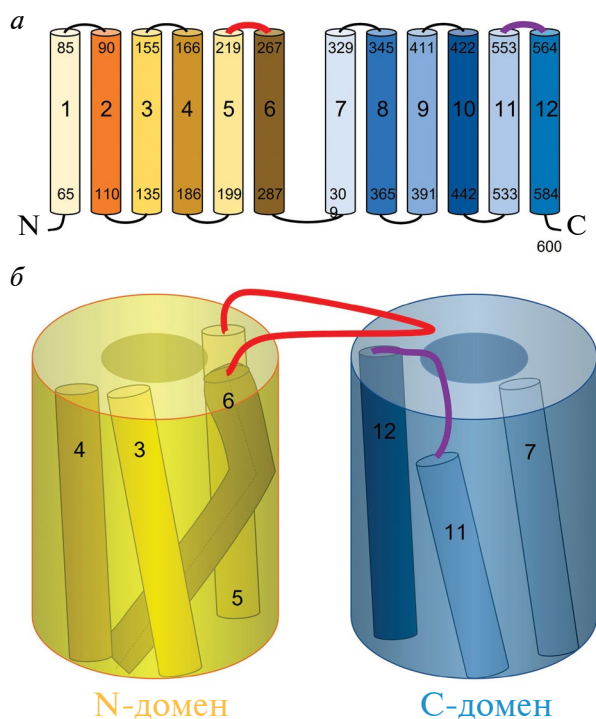


Рис. 3. *а* – ОТОР1 содержит 12 трансмембранных спиралей. *б* – Схематическое изображение образуемых спиралями α -бочек и петель, соединяющих трансмембранные спирали 5–6 (показано красным) и 11–12 (фиолетовым).

соединяемых петель. Аминокислотные замены гистидина H229 в петле L5–6 на глутамин, цистеин или глутаминовую кислоту приводили к существенному уменьшению величины протонной проводимости, индуцированной экспрессией ОТОР1 [15]. Аналогичное влияние оказывали мутации E568Q, D570N, E574Q, E575Q в петле L11–12 [15]. Роль этих петель прослеживается и в других отопетриках – в химерных каналах, полученных заменой L5–6 ОТОР3 на аналогичную петлю L5–6 ОТОР2, усиливается блокада протонного тока цинком [24]. Замена других петель не приводит к столь выраженным эффектам, что свидетельствует о ключевой роли L5–6 и L11–12 в модуляции тока через ОТОР1.

ТРАНСПОРТНЫЕ ПУТИ

Механизм переноса протона в протонных каналах до сих пор не вполне ясен. Согласно классическому механизму Гротгуса протон переносится по цепочке молекул воды по эстафетному механизму [33]. В некоторых транспортирующих протон белках водные цепочки прерываются аминокислотой, которая протонируется и депротонируется в процессе переноса протона [6]. Поскольку неизвестны протонные каналы, не имеющие водной

цепочки в транспортном пути протона, одним из способов идентификации потенциальных транспортных путей протона в канальном белке является поиск водных цепочек в его структуре. Такой поиск, опирающийся на моделирование методом молекулярной динамики, показал наличие водных цепочек внутри доменов субъединицы ОТОР1 и их отсутствие между субъединицами, где их образованию препятствуют липиды мембраны [30]. В каждой субъединице ОТОР1 идентифицировано три водные цепочки, которые теоретически могли бы формировать трансмембранные пути для транспорта протона через ОТОР1.

Увеличение активности в ответ на любое отклонение pH_0 от нейтрального – уникальная особенность ОТОР1. Из литературы известен лишь один пример подобной pH -зависимости – это двупоровый (two-pore domain) K^+ -канал, формируемый гетеродимеризацией субъединиц TREK1 и TREK2 и активирующийся в ответ на закисление и защелачивание внеклеточного раствора [34]. Гетеродимер TREK1/TREK2 увеличивает K^+ -проводимость мембраны при отклонении pH_0 в обе стороны от нейтрального. В структуре ОТОР1 также имеются два домена, которые могут формировать протонную пору между собой (пути 2 и 8 на рис. 4) и/или формировать транспортный путь протона внутри домена (пути 1 и 3, 7 и 9 на рис. 4). При нейтральных pH_0 внеклеточная поверхность N-домена заряжена в среднем положительно, а С-домена – отрицательно [15], что может определять особенности взаимодействия протонов с доменами. Если, подобно TREK1/TREK2, транспортный канал в ОТОР1 формируется в междоменном/субъединичном пространстве (пути 2 и 8/4–6 на рис. 4), его эффективность должна зависеть от кооперативного взаимодействия обоих доменов. Если транспортный путь протонов существует в каждом из доменов, то ОТОР1 мог бы функционировать как два независимых протонных канала, каждый из которых активируется при соответствующих отклонениях pH_0 от нейтрального. Экспрессия отдельных доменов ОТОР1 в гетерологичной системе могла бы проверить эту гипотезу.

Верификация потенциальных транспортных путей возможна с использованием блокаторов. Влияние мембранного потенциала на блокаду токов позволяет локализовать место связывания блокатора: если блокатор связывается внутри транспортной поры, ожидается, что блокада потенциал-зависима, отсутствие таковой говорит, что блокатор, скорее всего, связывается на внемембранных петлях канального белка. Как уже отмечалось, ток через ОТОР1 ингибируется внеклеточным цинком – специфическим блокатором протонных каналов.

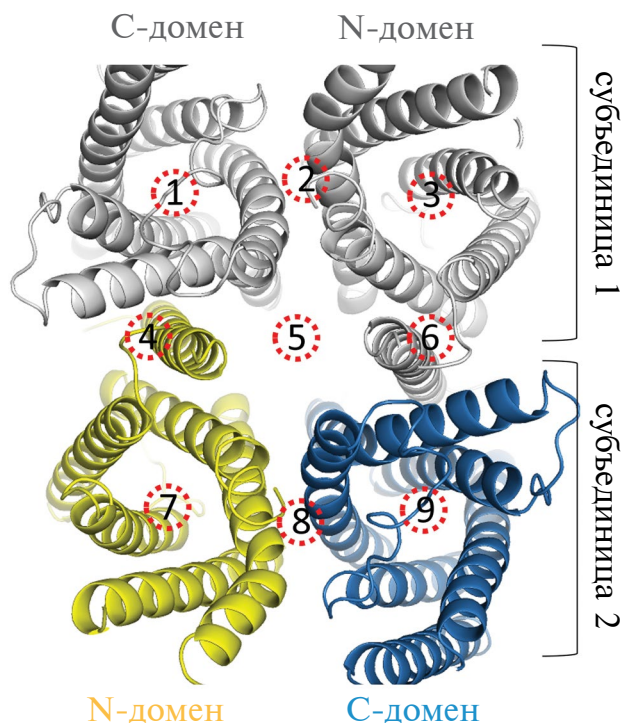


Рис. 4. Структура OTOP1 (вид с наружной стороны мембраны). Возможные транспортные пути протона отмечены цифрами 1–9. Как показано в работе [30], пути 4–6 закрыты молекулами холестерина, остальные пути образуют водные цепочки.

При концентрации 1 мМ цинк снижает протонный ток на 80% [9]. Имеющаяся информация о потенциал-чувствительности цинковой блокады OTOP1 противоречива. В более ранней работе [21] утверждается, что эффективность ингибирования протонных токов в OTOP1-положительных клетках НЕК-293 ионами Zn^{2+} остается равным 70–80% при изменении потенциала с -40 до $+40$ мВ. Более поздняя работа констатирует, что ингибирование цинком протонного тока в клетках СНО, экспрессирующих рекомбинантный OTOP1, наоборот, снижается с 75 до 55% при росте потенциала от -100 до -40 мВ [35].

Согласно работе [24], ионы двухвалентных металлов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} также блокируют протонный ток в mOTOP3, при этом ни один из ионов не дает эффективности блокады выше 80% при концентрации вплоть до 1 мМ. Такая неспецифическая чувствительность к двухвалентным катионам и неполное ингибирование наводят на мысль, что имеет место аллостерическое ингибирование, при котором сайт связывания двухвалентных ионов лежит вне транспортного пути протона. Возможно также, что связывание сильно ослаблено конкуренцией с протоном. С другой стороны, краситель cibacron blue 3G-A ингибирует токи на 90% при

концентрации 100 мкМ с $IC_{50} = 5$ мкМ в широком диапазоне pH и потенциал-независимо [35]. Вероятно, краситель связывается на внеклеточной поверхности белка и перекрывает транспортные пути протона, являясь специфичным ингибитором OTOP1. Нельзя исключить возможность существования нескольких путей транспорта протона через OTOP1, которые в разной степени чувствительны к блокаторам.

Определить место связывания блокатора можно, сравнивая функциональные характеристики белка дикого типа и его мутантов. Известно, что реагент MTSET не связывается с остатком D558 у вершины С-домена OTOP1, но связывается с цистеином в том же положении при мутации D558C. Оказалось, что предварительная обработка MTSET приводит к падению тока через OTOP1 D558C, инициируемого кислыми стимулами, но не через OTOP1 дикого типа. Это позволило авторам сделать вывод, что транспортный путь протона при аппликации кислого стимула должен быть локализован в положительно-заряженном С-доме [15]. Дальнейший мутагенез и анализ влияния точечных мутаций на активность OTOP1 могут ответить на вопрос о связи структуры и функции этого белка, включая вопрос о пути переноса протона.

ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ

Внесение точечных мутаций в первичную структуру белка позволяет идентифицировать аминокислоты, которые играют ключевую роль в формировании его пространственной топологии и функциональной активности. Таблица 1 суммирует описанные в литературе точечные мутации белков семейства отопетринов с указанием их положения в структуре и ассоциированных изменений функции мутированного белка. Указан в основном эффект точечных мутаций в ответах на кислые стимулы. Это связано с тем, что большая часть этих работ опубликована до 2022 года, когда появились первые сведения об активации OTOP1 щелочными стимулами.

Предполагается, что ключевые для функционирования аминокислоты должны быть консервативны для разных отопетринов. Действительно, замена положительно заряженного аргинина R586E в mOTOP1 и эквивалентных R667A в XhOTOP3 и R598P в HsOTOP1 на отрицательно заряженные или незаряженные остатки приводит к нарушению функции канала во всех трех вариантах белка [11, 30, 31].

REY-триада, включающая аргинин, глутаминовую кислоту и тирозин, участвует в формировании протонного пути в Hv1, бактериородопсина и потенциал-чувствительном домене Kv1 [37].

Таблица 1. Точечные мутации в ОТОР1*

Аналог в mOTOP1	Мутация	Положение	Влияние	Ссылка
A151E	A151E	N-домен, наружу TM3,	Смещает локализацию белка с апикальной ближе к базальной, tlt-мутация.	[36]
A151E	A151E	N-домен, наружу TM3,	Устраняет токи в ответ на кислые и щелочные стимулы, tlt-мутация.	[21]
E219K	E219K	N-домен, наружу TM5,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
K221A	K221A	N-домен, наружу L5-6,	Приводит к исчезновению токов в ответ на щелочные стимулы, но сохраняет токи в ответ на кислые.	[21]
H222A	H222A	N-домен, наружу L5-6,	Не приводит к исчезновению токов в ответ на щелочные стимулы.	[21]
H222A	mOTOP3 H234A	N-домен, наружу L5-6,	Устраняет потенциацию цинком токов в ответ на кис-лый стимул.	[24]
E226A	mOTOP3 E238A	N-домен, наружу L5-6,	Устраняет потенциацию цинком токов в ответ на кис-лый стимул.	[24]
H227 Q/C/E	HsOTOP1 H229 Q/C/E	N-домен, наружу L5-6,	Приводит к падению чувствительности в ответ на кислый стимул.	[15]
H227 R/K	HsOTOP1 H229 R/K	N-домен, наружу L5-6,	Не приводит к падению чувствительности к кислым стимулам.	[15]
E274A	DrOTOP1 E267A	N-домен, посередине TM6,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
E274Q	XtOTOP3 E321Q	N-домен, посередине TM6,	Устраняет токи в ответ на кислые стимулы.	[31]
E274D	XtOTOP3 E321D	N-домен, посередине TM6,	Не устраняет токи в ответ на кислые стимулы.	[31]
R292A	R292A	N-домен, в цитозоль L6-7,	Устраняет токи в ответ на NH ₄ -стимулы. Меняет скорость убывания тока в ответ на кислые стимулы.	[20]
Y330A	HsOTOP1 Y332A	C-домен, наружу L7-8,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]
Y349C	HsOTOP1 Y351C	C-домен, наружу TM8,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]
D388N	D388N	C-домен, в цитозоль L8-9,	Меняет скорость убывания тока в ответ на кислые стимулы.	[31]
L408Q	L408Q	C-домен, наружу TM9,	Устраняет токи в ответ на кислые и щелочные стимулы, mlh-мутация.	[21]
L408Q	L408Q	C-домен, наружу TM9,	Сдвигает локализацию белка с апикальной ближе к базальной, mlh-мутация.	[36]
E433R	E433R	C-домен, внутри TM10,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
E433R+R586E	E433R+R586E	C-домен, внутри TM10,	Не меняет токи в ответ на кислые стимулы.	[30]
Q437 N/E	XtOTOP3 Q558 N/E	C-домен, внутри TM10,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]
R554A	R554A	C-домен, наружу L11-12,	Устраняет токи в ответ на щелочные стимулы, но сохраняет токи в ответ на кислые.	[21]
R554H	R554H	C-домен, наружу L11-12,	Усиливает потенциацию цинком токов в ответ на кислый стимул.	[24]
D558N	HsOTOP1 D570N	C-домен, наружу L11-12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]

Таблица 1. Окончание

D558C+MTSET	HsOTOP1 D570C+MTSET	С-домен, наружу	L11-12,	Устраняет токи в ответ на кислые стимулы при обработке MTSET.	[15]
Y585 A/Q	XtOTOP3 Y666 A/Q	С-домен, внутри	TM12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]
R586E	R586E	С-домен, внутри	TM12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
R586P	HsOTOP1 R598P	С-домен, внутри	TM12,	Приводит к микродентии боковых резцов.	[11]
R586A	XtOTOP3 R667A	С-домен, внутри	TM12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]
H588A	DrOTOP1 H574A	С-домен, внутри	TM12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
H588A	HsOTOP1 H600A	С-домен, внутри	TM12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]
H588 D/E/K/N/Q/R	HsOTOP1 H600 D/E/K/N/Q/R	С-домен, внутри	TM12,	Не меняет токи в ответ на кислые стимулы.	[15]
H588 A/Q	XtOTOP3 H669 A/Q	С-домен, внутри	TM12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]

*Имеющиеся данные получены при использовании различных изоформ OTOP1 (человеческий HsOTOP1, мышиный mOTOP1, зебра-фиш DrOTOP1) и даже для разных представителей семейства (OTOP1, OTOP2, OTOP3). Поэтому в таблице также приводятся аминокислоты, расположенные в положении, аналогичном ее положению в последовательности белка mOTOP1 (UniProt идентификатор Q80VM9). Аналогичное положение определялось выравниванием последовательностей веб-инструментом Align на сайте UniProt.

В структуре OTOP1 есть высококонсервативная пара аминокислот из этой триады, находящихся близко друг к другу внутри обоих N- и С-доменов [30]. В С-домене мутации аргинина и глутаминовой кислоты по отдельности приводили к потере токов в ответ на кислое, в то время как двойная мутация E433R+R586E не затрагивала транспортную функцию канала. Это указывает на участие REY-триады в формировании транспортного пути протона в С-домене. Аналогичные точечные замены в N-домене приводили к уменьшению токовых ответов на кислые стимулы, и этот функциональный эффект сохранялся и при двойной мутации [30]. С другой стороны, аминокислоты, мутации в которых приводят к исчезновению токов в ответ на щелочные стимулы, находятся и в N-, и в С-домене, но вблизи междоменной поверхности. Возможно, при повышении pH_o открывается транспортный путь между доменами.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ OTOP1

Анализ механизмов регуляции OTOP1 осложняется тем, что протон является носителем тока через отопетрины и одновременно их модулятором. Как уже отмечалось (рис. 1), при ступенчатом закислении внеклеточного раствора протонный ток сначала растет (активация тока), потом величина тока убывает до некоторой постоянной величины, и после прекращения стимуляции релаксирует

к первоначальному уровню. Активацию тока обычно связывают с увеличением протонной проводимости мембраны, а его убывание и релаксацию — с изменением протондвижущей силы.

Активация тока отражает переход протонного канала в открытое состояние под действием внеклеточного протона [27]. Первоначальная фаза роста тока удовлетворительно описывается одной экспоненциальной зависимостью, предполагая единственную лимитирующую стадию при переходе канала в открытое состояние. Ее характерное время зависит от pH_o : чем кислее подаваемый внеклеточный раствор, тем быстрее активируется канал [27]. В случае щелочного стимула, включение тока также pH_o -зависимо и происходит за сопоставимые времена порядка 100 мс [21] (рис. 4).

Последовательность внутримолекулярных событий, приводящих к активации отопетринов при отклонении pH_o от нейтрального, пока неизвестна в деталях. Мало сомнения в том, что остатки гистидина во внеклеточных петлях белка важны для регуляции активности отопетринов, поскольку pK_a этой аминокислоты находится в области нейтральных pH. В статье Li предположено [15], что регуляцию OTOP1 обеспечивают петли L5–6 и L11–12. Сравнение аминокислотных последовательностей OTOP1 разных видов животных показало высокую консервативность гистидина H227, расположенного в петле L5–6. Точечные

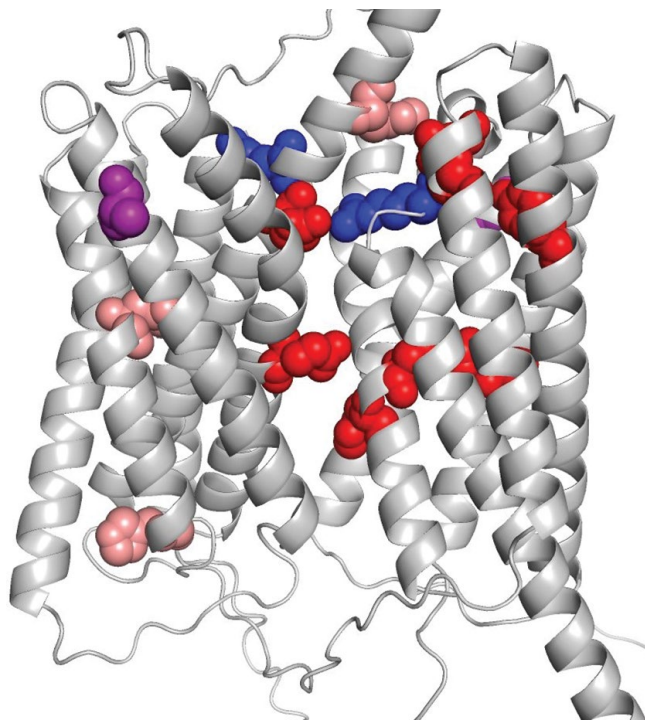


Рис. 5. Аминокислоты, точечные мутации в которых приводят к изменению функции канала ОТОР1, выделены цветом. Аминокислотные остатки, выделенные красным, приводят к исчезновению токов, инициированных кислыми стимулами, синим — щелочными. Выделенные розовым остатки модулируют ответы на кислые стимулы, а выделенные фиолетовым — меняют уровень экспрессии белка.

мутации H227Q/C/E с потерей положительного заряда приводят к исчезновению ответов ОТОР1 на кислые стимулы, в то время как сохранение заряда при заменах H227R/K сохраняет ответы. Протонирование гистидина, которое происходит при тех же кислотностях раствора, что и активация канала, меняет способность гистидина образовывать связи с E563 или F568 в петле L11–12, что, предположительно, влияет на положение внеклеточных петель, перекрывающих транспортные пути [15]. Экспериментально это трудно проверить, поскольку в криоэлектронных структурах ОТОР1 петли не разрешены в силу их высокой подвижности. Тем не менее подвижность петель и наличие в них консервативных аминокислот, изменяющих состояние при смене pH_o , являются необходимыми условиями для выполнения ими роли воротного механизма в транспортной системе ОТОР1.

Активность отопетринов модулируется ионами Zn^{2+} сложным образом, проявляющимся в форме ингибирования протонного канала, его потенциации или модуляции его активации [24]. Ингибирование подробно рассмотрено выше, потенциация заключается в увеличении величины тока после удаления внеклеточного цинка, а модуляция

проявляется как изменение времени достижения пикового тока в присутствии Zn^{2+} . Модуляция и потенциация предполагаются различными процессами, поскольку точечные мутации H222A и E226A расположенных в петле L5–6 остатков ОТОР3 снижают эффективность цинковой потенциации, но не меняют время достижения пикового тока [24].

Из ограниченных данных следует, что Zn^{2+} потенцирует ОТОР1 рН-зависимым образом — эффект наблюдается при pH_o 5.5 и отсутствует при pH_o 6.0. В то же время точечная мутация R554H в петле L11–12 приводит к тому, что Zn^{2+} потенцирует ОТОР1 и при pH_o 5.5. Это подтверждает роль петли L11–12 в модуляции токов через отопетрины. Некоторую роль в потенциации цинком играет и петля L5–6: соседний с H227 аминокислотный остаток глутаминовой кислоты E226 участвует в связывании ОТОР3 с Zn^{2+} , так как его мутация приводит к ослабеванию потенциации [24]. Возможно, потенциация связана с тем, что связывание Zn^{2+} инициирует такие конформационные перестройки молекулы отопетрина, которые открывают дополнительные транспортные пути, которые в норме недоступны для протона или менее эффективны.

Как уже отмечалось выше, убывание протонного тока в присутствии стимула (рис. 1) может быть объяснено качественно и количественно падением протондвижущей силы вследствие закисления цитозоля входящим потоком протонов, т.е. не требует изменения активности ОТОР1. Между тем замена аргинина-292 на аланин на внутриклеточной стороне ОТОР1 заметно замедляет убывание протонного тока [20], указывая на существование внутриклеточного механизма его регуляции. Представляется, что R292 является молекулярным сенсором pH_i , ответственным за уменьшение активности канала в ответ на закисление цитозоля.

Следует отметить, что при мутации R292A защелачивание цитозоля раствором NH_4Cl перестает инициировать ток через ОТОР1. Перенос NH_4^+ через мембрану связывается с его частичной диссоциацией во внеклеточном растворе до аммиака и диффузией газообразного NH_3 через мембрану в цитозоль, что приводит к росту pH_i [20]. Однако механизм такого переноса может быть несколько сложнее. В растворах NH_4^+ близок к K^+ по ряду свойств (ионный радиус, подвижность в воде, гидратируемость) и может заменять его в транспортных процессах, осуществляемых K^+ -каналами и переносчиками, например в Na^+ - K^+ -2Cl- котранспортере. NH_4^+ также может заменять H^+ при Na^+/H^+ -обмене [38]. Тем не менее изменение pH_i с помощью флуоресцентных зондов

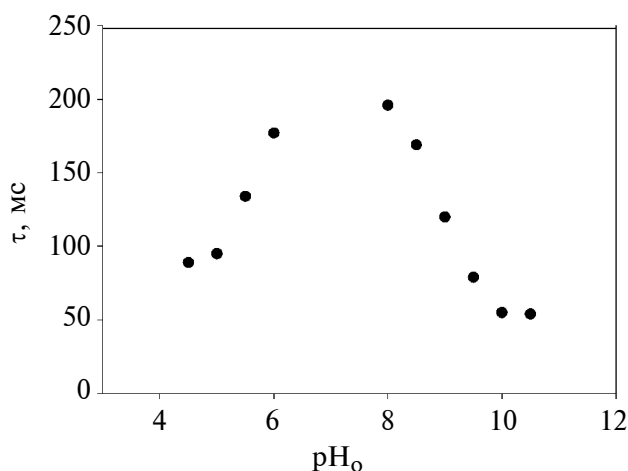


Рис. 6. Постоянные времени активации тока через ОТОР1, инициированного стимулами с различным pH_0 .

подтвердило, что внеклеточные NH_4^+ -стимулы защелачивают цитозоль [20]. Следовательно, неспособность R292A-мутантов ОТОР1 активироваться в ответ на NH_4Cl подтверждает идею, что R292 является молекулярным сенсором внутриклеточного протона, ответственным за снижение активности канала при понижении pH_i и его активацию при повышении pH_i . Влияние pH_i на проводимость ОТОР1 во вкусовых клетках может играть роль в известном с XIX века эффекте [39], что сильные и слабые кислоты, инициирующие разные изменения pH_i , воспринимаются на вкус как вещества с разной кислотностью при одинаковых pH_0 .

МОДЕЛИ

На сегодняшний день в литературе представлены две кинетические модели функционирования ОТОР1, предложенные в работе Тенга и соавторов [24] и в статье Сладкова [40]. Обе модели используют упрощающую аксиоматику, постулируя, что величина протонного тока определяется законом Ома, т.е. пропорциональна величине проводимости и протондвижущей силе (уравнение (1)). Разумеется, закон Ома является упрощением реального транспортного процесса, в то время как уравнение Гольдмана—Ходжкина—Катца точнее описывает ток через ионный канал в условиях заметного трансмембранного концентрационного градиента носителей. Хотя обе модели используют выражение для протондвижущей силы в виде разности мембранного потенциала и потенциала Нернста при данном протонном градиенте, модель Тенга предполагает величину потенциала реверсии постоянной. В противоположность этому, модель Сладкова предполагает, что потенциал реверсии

может меняться из-за закисления клетки. В связи с этим отличается объяснение убывания тока: модель Тенга предполагает, что убывание тока в ответ на кислый стимул обусловлено внутренней системой инактивации, связанной с освобождением активирующего сайта от цинка. В другой модели предполагается, что убывание тока связано с закислением цитозоля и убыванием электродвижущей силы. Обе модели постулируют, что разность потенциалов на мембране клетки влияет только на величину электродвижущей силы, но не на вероятность открытого состояния, т.е. пренебрегают потенциал-чувствительностью канала. Кроме того, в модели Тенга предполагается наличие одного места связывания протона и двух мест связывания цинка: связывание с одним приводит к мгновенной блокаде канала, связывание со вторым ускоряет переход в открытое состояние. Вторая модель — модель марковских переходов между состояниями, количество которых в ОТОР1 не верифицировано. Следует отметить, что обе модели неверно описывают активацию канала в ответ на щелочные стимулы. Требуется их модификация, чтобы адекватно описать феноменологию активности ОТОР1, имеющуюся на данный момент.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытое в 2018 г. свойство ОТОР1 переносить через мембрану протоны, возникающее при закислении внеклеточного раствора, было впоследствии дополнено обнаружением способности ОТОР1 активироваться в ответ на защелачивание раствора по обе стороны от мембраны. Полученные в 2019 г. структуры ОТОР1 обозначили структурные единицы, которые могут определять функционал белка, установленный в экспериментах. Полученные данные обогатили представление о том, как ОТОР1 преобразует информацию о трансмембранном протонном градиенте в величину протонной проводимости плазмалеммы клетки. Пока трансмембранный градиент близок к нулевому, канал закрыт. Изменение pH_0 или pH_i в любую сторону от нейтрального приводит к открыванию канала и переносу протона через мембрану. Когда pH по обе стороны плазмалеммы выравнивается, канал снова закрывается. Если рассмотреть регуляторную систему ОТОР1 как логический элемент, получающий на вход информацию о закислении раствора внутри и снаружи клетки и определяющий вероятность открытого состояния протонного канала, такой элемент выполняет операцию исключающего ИЛИ — логической бинарной операции, также известной как XOR [41]. Совершение регуляторной системой операции исключающего ИЛИ позволяет ОТОР1

активироваться только при наличии трансмембранного протонного градиента и деактивироваться при его исчезновении. Это свойство позволяет OTOPI выполнять на мембране вкусовых клеток не только функцию сенсора кислого, но и служить элементом системы адаптации к кислому.

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Whitten S.T., García-Moreno E.B., Hilser V.J. 2005. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **102** (12), 4282–4287.
- Baca J.M., Ortega A.O., Jiménez A.A., Principal S.G. 2022. Cells electric charge analyses define specific properties for cancer cells activity. *Bioelectrochem.* **144**, 108028.
- Soto E., Ortega-Ramírez A., Vega R. 2018. Protons as messengers of intercellular communication in the nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 342.
- Pattison L.A., Callejo G., St John Smith E. 2019. Evolution of acid nociception: ion channels and receptors for detecting acid. *Philos. Trans. R. Soc. B*. **374** (1785), 20190291.
- Ruffin V.A., Salameh A.I., Boron W.F., Parker M.D. 2014. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Front. Physiol.* **5**, 74282.
- Decoursey T.E. 2003. Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol. Rev.* **83** (2), 475–579.
- DeCoursey T.E. 2018. Voltage and pH sensing by the voltage-gated proton channel, H_{V1} . *J. R. Soc. Interface*. **15** (141), 20180108.
- Hurle B., Ignatova E., Massironi S.M., Mashimo T., Rios X., Thalmann I., Thalmann R., Ornitz D.M. 2003. Non-syndromic vestibular disorder with otoconial agenesis in tilted/mergulhador mice caused by mutations in otopenin 1. *Hum. Mol. Genet.* **12** (7), 777–789.
- Tu Y.H., Cooper A.J., Teng B., Chang R.B., Artiga D.J., Turner H.N., Mulhall E.M., Ye W., Smith A.D., Liman E.R. 2018. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science*. **359**, 1047–1050.
- Hughes I., Saito M., Schlesinger P.H., Ornitz D.M. 2007. Otopenin 1 activation by purinergic nucleotides regulates intracellular calcium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **104** (29), 12023–12028.
- Kim S., Ahn H., Kim D., Cho S.W., Kim S. 2024. OTOPI: A new candidate gene for non-syndromic peg lateral. *Research Square*. doi 10.21203/rs.3.rs-3811797/v1.
- Tu Y.H., Liu N., Xiao C., Gavrilova O., Reitman M.L. 2023. Loss of Otopenin 1 affects thermoregulation during fasting in mice. *Plos One*. **18** (10), e0292610.
- Chang W.W., Matt A.S., Schewe M., Musinszki M., Grüssel S., Brandenburg J., Garfield D., Bleich M., Baukowitz T., Hu M.Y. 2021. An otopenin family proton channel promotes cellular acid efflux critical for biomineralization in a marine calcifier. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **118** (30), e2101378118.
- Liman E.R., Kinnamon S.C. 2021. Sour taste: Receptors, cells and circuits. *Curr. Opin. Physiol.* **20**, 8–15.
- Li B., Wang Y., Castro A., Ng C., Wang Z., Chaudhry H., Agbaje Z., Ulloa G.A., Yu Y. 2022. The roles of two extracellular loops in proton sensing and permeation in human Otopenin 1 proton channel. *Commun. Biol.* **5**, 1110.
- Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foksett J.K. 2021. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **473**, 3–13.
- Yoshida R., Miyauchi A., Yasuo T., Jyotaki M., Murata Y., Yasumatsu K., Shigemura N., Yanagawa Y., Obata K., Ueno H., Margolske R.F. 2009. Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *J. Physiol.* **587** (18), 4425–4439.
- Chang R.B., Waters H., Liman E.R. 2010. A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **107**(51), 22320–22325.
- Teng B., Wilson C.E., Tu Y.H., Joshi N.R., Kinnamon S.C., Liman E.R. 2019. Cellular and neural responses to sour stimuli require the proton channel Otopenin 1. *Curr. Biol.* **29** (21), 3647–3656.
- Liang Z., Wilson C.E., Teng B., Kinnamon S.C., Liman E.R. 2023. The proton channel OTOPI is a sensor for the taste of ammonium chloride. *Nat. Comm.* **14** (1), 6194.
- Tian L., Zhang H., Yang S., Luo A., Kamau P.M., Hu J., Luo L., Lai R. 2023. Vertebrate OTOPI is also an alkali-activated channel. *Nat. Comm.* **14** (1), 26.
- Sakmann B., Neher E. (ed.). 2009. *Single-channel recording*. 2nd ed. New York etc.: Springer-Science and Business Media. 700 p.
- Machtens J.-Ph., Fahlke C., Kovermann P. 2011. Noise analysis to study unitary properties of transporter-associated ion channels. *Channels*. **5** (6), 468–474.
- Teng B., Kaplan J.P., Liang Z., Chyung K.S., Goldschen-Ohm M.P., Liman E.R. 2023. Zinc activation

- of OTOP proton channels identifies structural elements of the gating apparatus. *Elife*. **12**, e85317.
25. Bushman J.D., Ye W., Liman E.R. 2015. A proton current associated with sour taste: Distribution and functional properties. *FASEB J.* **29**, 3014–3026.
 26. Hughes M.P. 2024. The cellular zeta potential: cell electrophysiology beyond the membrane. *Integr. Biol.* **16**, 1–11.
 27. Teng B., Kaplan J.P., Liang Z., Krieger Z., Tu Y.H., Burendei B., Ward A.B., Liman E.R. 2022. Structural motifs for subtype-specific pH-sensitive gating of vertebrate otopetrin proton channels. *eLife*. **11**, 77946.
 28. Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 607 p.
 29. Ohtubo Y. 2021. Slow recovery from the inactivation of voltage-gated sodium channel Nav1.3 in mouse taste receptor cells. *Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol.* **473** (6), 953–968.
 30. Saotome K., Teng B., Tsui C.C., Lee W.H., Tu Y.H., Kaplan J.P., Sansom M.S.P., Liman E.R., Ward A.B. 2019. Structures of the otopetrin proton channels Otop1 and Otop3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 518–525.
 31. Chen Q., Zeng W., She J., Bai X.C., Jiang Y. 2019. Structural and functional characterization of an otopetrin family proton channel. *Elife*. **8**, e46710.
 32. Delemotte L. 2019. Outlining the proton-conduction pathway in otopetrin channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26** (7), 528–530.
 33. Kratochvil H.T., Watkins L.C., Mravic M., Thomaston J.L., Nicoludis J.M., Somberg N.H., Liu L., Hong M., Voth G.A., DeGrado W.F. 2023. Transient water wires mediate selective proton transport in designed channel proteins. *Nat. Chem.* **15** (7), 1012–1021.
 34. Levitz J., Royal P., Comoglio Y., Wdziekonski B., Schaub S., Clemens D.M., Isacoff E.Y., Sandoz G. 2016. Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **113** (15), 4194–4199.
 35. Islam M.M., Sasaki O., Yano-Nashimoto S., Okamatsu-Ogura Y., Yamaguchi S. 2023. Cibacron blue 3G-A is a novel inhibitor of Otopetrin 1 (OTOP1), a proton channel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **665**, 64–70.
 36. Kim E., Hyrc K.L., Speck J., Salles F.T., Lundberg Y.W., Goldberg M.P., Kachar B., Warchol M.E., Ornitz D.M. 2011. Missense mutations in Otopetrin 1 affect subcellular localization and inhibition of purinergic signaling in vestibular supporting cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **46** (3), 655–661.
 37. Kariev A.M., Green M.E. 2019. Quantum calculation of proton and other charge transfer steps in voltage sensing in the Kv1.2 channel. *The Journal of Physical Chemistry B*, **123** (38), 7984–7998.
 38. Weiner I.D., Verlander J.W. 2017. Ammonia transporters and their role in acid-base balance. *Physiol. Rev.* **97** (2), 465–494.
 39. Richards T.W. 2002. The relation of the taste of acids to their degree of dissociation. *J. Phys. Chem.* **4** (3), 207–211.
 40. Сладков К.Д., Колесников С.С. 2023. Модель молекулярного сенсора протона. *Биол. мембраны*. **40** (3), 188–193.
 41. Graham I., Duke T. 2005. The logical repertoire of ligand-binding proteins. *Phys. Biol.* **2** (3), 159.

Structure and Function of the Proton Channel OTOPI

© 2024 г. К. Д. Сладков¹, *, С. С. Колесников¹

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

*e-mail: klimitrich@ya.ru

OTOP1 belongs to the otopetrin family of membrane proteins that form proton channels in cells of diverse types. In mammals, OTOPI is involved in sour transduction in taste cells and contributes to otoconia formation in the inner ear. From the structural point of view, otopetrins, including OTOPI, represent a quasi-tetramer consisting of four α -barrels. The exact transport pathways mediating proton flux through the OTOPI channel and gating units modulating its activity are still a matter of debate. This review discusses current data on structural and functional features of OTOPI. Suggested proton transport pathways, regulatory mechanisms, and key amino acid residues determining functionality of the otopetrins are considered. The existing kinetic models of OTOPI are discussed as well. Based on revealed functional properties, OTOPI is suggested to operate as a logical XOR element that allows for proton flux only if transmembrane pH gradient exists.

Keywords: OTOPI, otopetrins, proton channel, taste cells