

基于弹性和复杂网络模型的内向整流型钾通道 Kir3.2 的动力学及关键位点研究

赵迎春, 李春华*

北京工业大学环境与生命学部, 北京

收稿日期: 2023年4月24日; 录用日期: 2023年11月22日; 发布日期: 2023年11月29日

摘要

内向整流型钾通道蛋白 Kir3.2 能够调节钾离子的跨膜流动, 具有重要的生理功能。由于其与神经和心肌系统的疾病相关, 因此是一个重要的药物靶点。为研究该通道的动力学和功能性关键位点, 我们首先利用高斯网络模型 (GNM) 对该通道进行建模, 分析其结构的柔性, 及各功能区域间的运动相关性; 然后, 构建运动相关性加权的复杂网络模型, 通过依次敲除节点获得网络特征路径长度的变化来识别关键位点。结果发现, GNM 重现了通道各区域的柔性; 界面螺旋、跨膜螺旋和 CTD 区域间存在显著的运动正相关, 这促进了通道与配体的结合和结构的稳定; 所识别的关键残基对通道的激活、结构的稳定和变构信号交流起重要作用。本工作有助于加强对 Kir3.2 通道工作机制的理解, 所识别的功能位点可为药物设计提供有价值的信息。

关键词

内向整流型钾通道 Kir3.2, 高斯网络模型, 复杂网络模型, 关键残基

Study on the Kinetics and Key Sites of Inward Rectifier Potassium Channel Kir3.2 Based on the Elastic Network and Complex Network Models

Yingchun Zhao, Chunhua Li*

Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing

Received: Apr. 24th, 2023; accepted: Nov. 22nd, 2023; published: Nov. 29th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 赵迎春, 李春华. 基于弹性和复杂网络模型的内向整流型钾通道 Kir3.2 的动力学及关键位点研究[J]. 生物物理学, 2023, 11(4): 65-72. DOI: 10.12677/biphy.2023.114006

Abstract

The inward rectifier potassium channel Kir3.2 can regulate the flow of potassium ions across the cell membrane, playing important physiological functions. Due to its association with diseases of the nervous and myocardial systems, it is an important target for drug design. To study its kinetics and functional key sites, we first construct its GNM model, analyze the structural flexibility and the motion correlations between different functional regions. Then, the motion correlation-weighted complex network model is constructed, and the key sites are identified in terms of the changes of characteristic path lengths upon the nodes knocked one by one. The results found that the GNM model reproduces the flexibilities of different functional regions; evident positive correlations exist among the interfacial helices, transmembrane helices and CTD regions, which promotes channel-ligand binding and structural stability; the identified key residues play an important role in channel activation, structural stability and signal communication. This work helps to enhance the understanding of Kir3.2 channel's working mechanism, and the identified key sites can provide valuable information for drug design.

Keywords

Inward Rectifier Potassium Channel Kir3.2, Gaussian Network Model, Complex Network Model, Key Residues

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

内向整流型钾通道 Kir3.2 能够调节钾离子的跨膜流动, 是内向型整流钾离子通道家族的一员, 在许多生理过程中发挥重要作用[1]。Kir3.2 通道的突变可引起许多疾病, 包括原发性醛固酮增多症、安德森综合征、巴特综合征和先天性高胰岛素血症[2] [3]。实验发现, 该通道主要由 4 个相同的亚基组成, 它们构成了两个重要的功能区域: 跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)和胞质结构域(cytoplasmic domain, CTD) [4]。目前认为, 离子跨膜流动可能是由两个串联的门来调节的: 由 TMD 的内部螺旋形成的内螺旋门[5], 由 CTD 顶端的 G 环形成的 G 环门[6], 阴离子脂质磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸(phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate, PIP2)是该通道的激活剂[2] [7] [8]。目前, 尽管有一些工作在探讨该离子通道的门控机制, 并有所发现[9] [10], 但对其内在动力学如何调控通道的打开与关闭, 哪些残基在门控中发挥重要作用还不完全清楚[11]。

分子动力学与复杂网络模型方法结合已被广泛用于蛋白质变构信号交流、蛋白质折叠、关键残基识别和蛋白质相互作用的研究[12] [13]。Sethi 等人将全原子分子动力学(Molecular dynamics, MD)模拟与复杂网络模型结合, 构建了残基间运动相关性加权的动态复杂网络模型[14]。由于 MD 模拟非常耗时, 随后人们又发展了粗粒化的弹性网络模型(Elastic network model, ENM)方法, 用该方法获得的残基运动相关性进行加权构建的动态复杂网络模型已被用于一些大的分子机器的变构动力学研究。我们组曾利用该策略研究了 U1A-snRNA 结合偶联变构的动力学过程[15]。

在本工作中, 我们基于 Kir3.2 通道的三维结构构建了 GNM 模型, 预测了通道结构的柔性, 分析了残基间的运动偶联。之后, 构建了一个动态复杂网络模型来识别 Kir3.2 中参与变构和信号交流的关键残基。

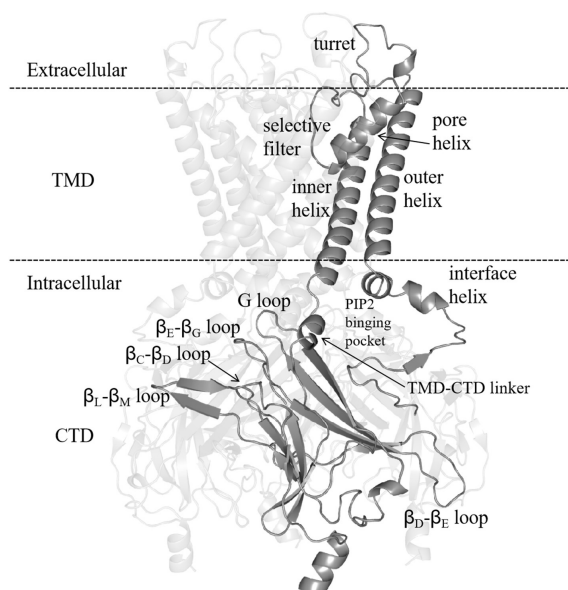


Figure 1. Cartoon diagram of Kir3.2 channel protein structure with the important functional regions labelled

图 1. Kir3.2 通道蛋白结构的卡通图, 标注了 Kir3.2 的重要功能区

2. 方法和体系

2.1. 研究体系

内向整流型钾通道 Kir3.2 的高分辨率结构来自蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB) [16], 其 PDB ID 为 3SYA, 该体系是 PIP2 结合态结构, 如图 1 所示。Kir3.2 通道主要由 4 个相同的亚基组成, 共有 1292 个残基, 每个亚基包含 323 个氨基酸。

2.2. 高斯网络模型(GNM)

高斯网络模型(Gaussian Network Model, GNM)是粗粒化弹性网络模型中的一种, 它将蛋白质的三维结构模拟成一个弹性的网络。其中, 氨基酸残基的 C α 原子被简化为网络中的节点, 节点间距离小于某一截断半径时, 认为它们之间存在相互作用, 并用弹性系数统一的弹簧进行连接。基于上述简化, 弹性网络模型总的势能为[17]:

$$V_{\text{GNM}} = \frac{1}{2} \gamma [\Delta R^T (\Gamma \otimes E) \Delta R] \quad (1)$$

其中, γ 为弹簧的弹性系数, 列向量 ΔR 代表蛋白质中 C α 原子的位置涨落, N 为氨基酸个数, 上标 **T** 表示向量的转置, Γ 表示 $N \times N$ 的基尔霍夫对称矩阵, 其矩阵元定义为:

$$\Gamma_{ij} = \begin{cases} -1 & \text{if } i \neq j \text{ and } R_{ij} \leq r_c \\ 0 & \text{if } i \neq j \text{ and } R_{ij} > r_c \\ -\sum_{i, j \neq i} \Gamma_{ij} & \text{if } i = j \end{cases} \quad (2)$$

其中, R_{ij} 是蛋白质中残基 i 和 j 间的距离, r_c 为截断半径。

残基 i 的均方涨落(Mean Square Fluctuation, MSF)和残基 i 与 j 间涨落的交叉相关性分别为:

$$\langle \Delta R_i \cdot \Delta R_i \rangle = \frac{3k_B T}{\gamma} [\Gamma^{-1}]_{ii} = \frac{3k_B T}{\gamma} \sum_{k=2}^N \lambda_k^{-1} [u_k]_i [u_k]_i \quad (3)$$

$$\langle \Delta R_i \cdot \Delta R_j \rangle = \frac{3k_B T}{\gamma} [\Gamma^{-1}]_{ij} = \frac{3k_B T}{\gamma} \sum_{k=2}^N \lambda_k^{-1} [u_k]_i [u_k]_j \quad (4)$$

其中, k_B 是波尔兹曼常数, T 为绝对温度。 Γ 矩阵的逆可分解为:

$$\Gamma^{-1} = U \Lambda^{-1} U^T = \sum_{k=2}^N \lambda_k^{-1} u_k u_k^T \quad (5)$$

其中, U 为正交矩阵, 每一列 u_k ($1 < k \leq N$) 为 Γ 的本征向量, 表示蛋白质的运动模式; Λ 为对角矩阵, 其矩阵元为 Γ 的特征值 λ_k 。根据 Debye-Waller 理论, B 因子可以通过下式计算:

$$B_i = \frac{8\pi^2}{3} \langle \Delta R_i \cdot \Delta R_i \rangle = \frac{8\pi^2 k_B T}{\gamma} \sum_{k=2}^N \lambda_k^{-1} [u_k]_i [u_k]_i \quad (6)$$

残基 i 和 j 之间归一化的运动交叉相关性为:

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta R_i \cdot \Delta R_j \rangle}{\left[\langle \Delta R_i^2 \rangle \times \langle \Delta R_j^2 \rangle \right]^{\frac{1}{2}}} \quad (7)$$

交叉相关性的取值范围为-1 到 1, 正值表示残基的运动方向相同, 负值表示运动方向相反。该值的绝对值越大表示两个残基间的运动相关性越强。

2.3. 氨基酸复杂网络模型

氨基酸复杂网络模型[18]已被用于研究蛋白质变构交流。在复杂网络模型中, 常用残基 $C\alpha$ 原子代表网络中的节点, 用一定的截断半径 r_c (这里为 7.0 Å) 来定义网络中节点间的连接[15], 当对边进行加权时, 复杂网络的邻接矩阵元素为:

$$A_{ij} = \begin{cases} w_{ij} & i \neq j \text{ and } R_{ij} < r_c \\ 0 & i = j \text{ and } R_{ij} \geq r_c \end{cases} \quad (8)$$

这里, r_{ij} 是残基 i 和 j 之间的距离, 权重来自残基间的运动相关性:

$$w_{ij} = -\log(|C_{ij}|) \quad (9)$$

网络特征路径长度(Characteristic Path Length, CPL)是网络中所有节点间路径长度的平均值, CPL 反映了网络内部节点间的连通性和信息传递效率。 k 节点对网络通信的贡献可用该节点敲除后网络 CPL 的变化来度量, 通常用 Z-score 来衡量:

$$Z\text{-score}_k = \frac{\Delta CPL_k - \langle \Delta CPL_k \rangle}{\sigma} \quad (10)$$

其中, ΔCPL_k 表示敲除节点 k 后特征路径长度的变化, $\langle \Delta CPL \rangle$ 表示所有节点依次敲除后特征路径长度变化的平均值, σ 是相应的标准差。 Z-score 值较大的节点往往在变构信号传导中起关键作用。

3. 结果与讨论

3.1. GNM 获得的理论与实验 B-Factor 的比较

温度因子(B-factor)可以反映生物大分子局部结构的柔性。本文在搭建 Kir3.2 的 GNM 模型时, 截断

半径 r_c 通过最大化理论和实验 B-factor 的皮尔森相关系数(Pearson correlation coefficient, PCC)来确定。最大化过程中, 截断半径在 6.0~13.0 Å 内变化, 步长为 1.0 Å。结果为 $r_c = 13.0$ Å 时, 理论和实验 B-factor 的 PCC 达到了最大 0.77。图 2 显示了在最优的截断半径下的理论和实验 B-factor 的比较图。由于 Kir3.2 是由同源四聚体组成的, 所以在此只显示了一个亚基的柔性。由图 2, GNM 可以很好地再现 Kir3.2 通道结构的柔性。跨膜螺旋(TM1 和 TM2)和 CTD 的 β 片层区域柔性最小, 一至于它们紧密堆积的折叠结构, 暗示了其高稳定性; 选择性过滤器、turret 和 CTD 的 β 片层环状区域柔性较大, 这有助于离子通道的开合运动, 与实验结果很好吻合[1]。

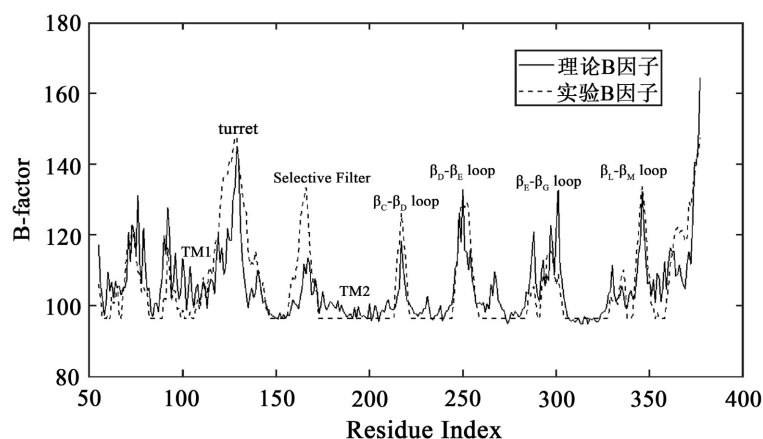


Figure 2. Comparison between the theoretical (solid line) and experimental (dotted line) B-factors of Kir3.2 chain A

图 2. Kir3.2 的 A 链理论(实线)和实验(虚线) B 因子的比较

3.2. 基于 GNM 的 Kir3.2 残基运动相关性分析

残基涨落的运动相关性可以反映分子功能结构域间的偶合运动, 提供对分子功能性运动的洞察。GNM 的慢运动模式代表了与蛋白质功能相关的大规模集体运动[19], 因此为探究体系功能性运动, 选取 GNM 的前 340 个慢运动模式(对残基涨落的贡献超过 50%), 按照公式(7)计算了残基运动交叉相关性, 如图 3(b)所示。因 Kir3.2 是由同源四聚体组成的, 所以在此只分析了 A 和 B 两个相邻亚基的运动相关性, 如图 3(a)所示。由图 3(a)可见, A 链的界面螺旋和 B 链 CTD 的多个相邻 β 片层的环状区域间存在较强的运动正相关性, 如图中标号为 1 的区域所示, 这说明它们之间存在强的相互作用, 这可促使通道激活过程中 CTD 的旋转运动; 标号为 2 的区域显示了 A 和 B 链的跨膜螺旋间呈现显著的强运动正相关性, 这说明不同亚基间的跨膜螺旋存在强相互作用以维持 TMD 的稳定性, 并促进内螺旋的倾斜运动; 标号为 3 的区域反映了结合口袋区域, 即 A 链的中间 linker 区和 B 链 CTD 的 3 个 β 片层环的 Loop 区域之间存在强的运动正相关性, 我们推测这有助于两个区域间的变构信号交流, 促使两个亚基的 CTD 产生旋转运动, 进而引起通道门的运动[1]。

3.3. 基于氨基酸复杂网络模型识别 Kir3.2 的关键位点

以 GNM 慢运动模式下残基运动的交叉相关性为边权, 对 Kir3.2 通道建立了加权的氨基酸复杂网络模型。通过依次敲除节点, 计算了网络特征路径长度的变化, 来识别对蛋白质变构和信号交流起重要作用的关键残基, 结果见图 4。由图 4(a), 有 23 个残基(功能残基簇的中心)有较高的 Z-score 值($Z\text{-score} \geq 1.0$), 其在结构上的位置分布如图 4(b)所示。接下来, 将根据现有的实验和理论数据对这些残基的功能进行讨论。

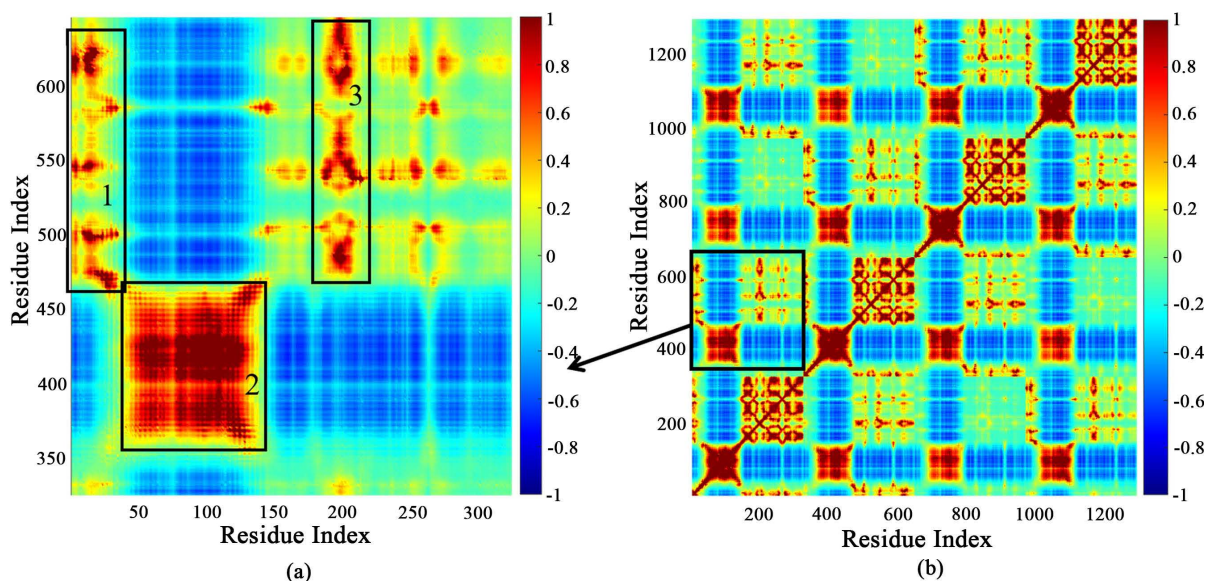


Figure 3. Cross-correlations of Kir3.2 residues calculated based on GNM. (a) Cross-correlations of residues in chain A and chain B. (b) Cross-correlations of the whole Kir3.2 channel residues

图 3. 基于 GNM 计算的 Kir3.2 残基的运动交叉相关性, (a) 为 A 链和 B 链残基的交叉相关性, (b) 为整个 Kir3.2 通道残基的运动交叉相关性

位于界面螺旋及其附近的功能残基簇的中心为 Val72、Thr74、Tyr78、Thr85、Val87、Leu89 和 Asn94。Tyr78 与相邻亚基 β_C - β_D 环上的 Leu229 形成氢键, 稳定了 TMD-CTD 结合界面, 对通道的生物学功能实现有重要作用[20]。位于界面螺旋附近的 Asn94 与界面螺旋 Leu86 形成了氢键, 稳定了界面螺旋的位置, 在控制通道活性中起重要作用[1]。其余的残基位于 PIP2 结合口袋和界面螺旋的中间位置, 我们认为它们对配体结合很重要, 在促使界面螺旋运动和通道的激活中起关键作用。

位于内螺旋上的功能残基簇的中心为 Gly180、Ala185、Val188、Phe192 和 Lys194。Val188 的侧链在通道激活时发生轻微偏转, 通过溶剂化作用参与了钾离子的转运[11]。Phe192 侧链的苯环参与了内螺旋门的形成, 处于通道的狭窄部分, 对钾离子的跨膜流动有重要作用[11]。Lys194 参与了与 PIP2 的结合, 对识别 PIP2 和发送变构信号到 TMD 起重要作用[1]。另外两个残基 Gly180 和 Ala185 位于 TMD 的内螺旋上, 我们推测其可能作为变构信号传导的枢纽, 对信号向上传到选择性过滤器和 turret 区域发挥重要作用。

位于孔螺旋上的中心残基是 Glu152, 该残基紧邻选择性过滤器, 可能对稳定选择性过滤器结构, 并帮助其发挥生物学功能有重要的作用。

位于 TMD-CTD 铰链区附近的中心残基为 Gln197 和 Thr204。这两个残基位于铰链区两端的 loop 上且在 PIP2 结合位点附近, 可能作为变构信号传输的重要枢纽对 Kir3.2 的激活和 CTD 的扭转运动有重要作用。

位于 G 环门附近的功能残基簇的中心为 Gly318。该残基紧邻负责 G 环门的 Met319, 可能作为信号交流的枢纽对信号传到 Met319 并激活 G 环门起重要作用。另外, Gly318 主链羰基和 Thr320 侧链氧原子位于通道孔, 对形成亲水孔允许水合 K 离子通过起重要作用[1] [21]。

最后, 识别到的其他关键残基 Ser208、Asp217、Asp261、Asn263、Asp270、His283、Gln322 和 Ser326 位于 CTD 上。目前尚未有实验数据证实它们在 Kir3.2 变构中的重要作用。CTD 是通道功能发挥不可缺少的结构域, 这些残基潜在的功能还需实验证实。

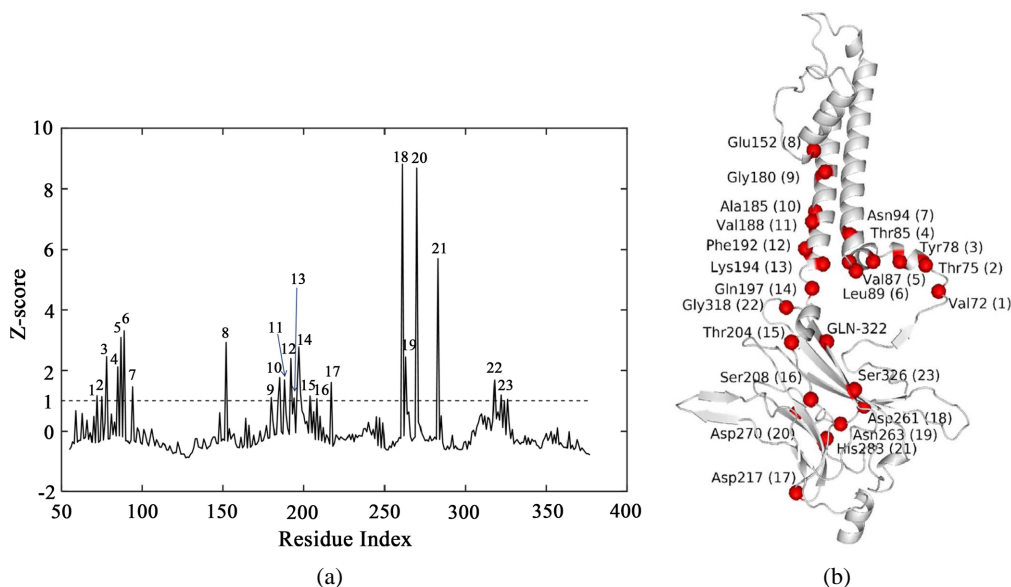


Figure 4. Identification of key residues in chain A based on Z-score. (a) Z-score values of residues; (b) Distribution of the 23 central residue clusters on Kir3.2 channel

图 4. 基于 Z-score 识别到的 A 链上的关键残基。(a) 残基的 Z-score 值; (b) 23 个中心残基簇在 Kir3.2 结构上的分布

4. 结论

Kir3.2 是一种内向整流型钾离子通道, 在神经和心肌系统中发挥重要作用。本工作首先利用 GNM 对 Kir3.2 进行建模, 成功再现了通道结构的柔性。结果发现, 跨膜螺旋和 CTD 的 β 片层区域结构比较刚性, 一致于其折叠紧密的结构; 位于 TMD 顶端的 turret 和 CTD 上的 β 片层环柔性较大, 这有助于离子通道的开合运动, 与实验结果吻合。接着, 计算了 Kir3.2 的残基运动相关性, 发现不同亚基的跨膜螺旋之间以及 CTD 的 β 片层环和 linker 区域间存在较强的正相关, 这暗示了这些区域间的强相互作用, 进而说明它们可能对结构的稳定和通道的激活有重要作用。最后, 基于加权的氨基酸网络模型预测到了 Kir3.2 上与实验数据高度吻合的功能性关键残基, 另外也识别到了一些尚未被实验证实的关键位点, 它们可为未来实验研究提供重要信息。本工作有助于深入理解 Kir3.2 通道的工作机制, 对药物设计具有指导意义。

基金项目

国家自然科学基金项目(31971180, 32271294)。

参考文献

- [1] Whorton, M.R. and Mackinnon, R. (2011) Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K^+ Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP2, and Sodium. *Cell*, **147**, 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.046>
- [2] Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., *et al.* (2010) Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, **90**, 291-366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- [3] Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., *et al.* (2011) K^+ Channel Mutations in Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Hypertension. *Science*, **331**, 768-772. <https://doi.org/10.1126/science.1198785>
- [4] Mathihran, Y.K., Glaaser, I.W., Zhao, Y., *et al.* (2021) Structural Insights into GIRK2 Channel Modulation by Cholesterol and PIP(2). *Cell Reports*, **36**, Article ID: 109619. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109619>
- [5] Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., *et al.* (2002) The Open Pore Conformation of Potassium Channels. *Nature*, **417**, 523-526. <https://doi.org/10.1038/417523a>
- [6] Nishida, M., Cadene, M., Chait, B.T., *et al.* (2007) Crystal Structure of a Kir3.1-Prokaryotic Kir Channel Chimera.

- EMBO Journal*, **26**, 4005-4015. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601828>
- [7] Luscher, C. and Slesinger, P.A. (2010) Emerging Roles for G Protein-Gated Inwardly Rectifying Potassium (GIRK) Channels in Health and Disease. *Nature Reviews Neuroscience*, **11**, 301-315. <https://doi.org/10.1038/nrn2834>
- [8] Rifkin, R.A., Moss, S.J. and Slesinger, P.A. (2017) G Protein-Gated Potassium Channels: A Link to Drug Addiction. *Trends in Pharmacological Sciences*, **38**, 378-392. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.007>
- [9] Huang, C.L., Feng, S. and Hilgemann, D.W. (1998) Direct Activation of Inward Rectifier Potassium Channels by PIP2 and Its Stabilization by Gbetagamma. *Nature*, **391**, 803-806. <https://doi.org/10.1038/35882>
- [10] Sui, J.L., Petit-Jacques, J. and Logothetis, D.E. (1998) Activation of the Atrial KACH Channel by the Betagamma Subunits of G Proteins or Intracellular Na⁺ Ions Depends on the Presence of Phosphatidylinositol Phosphates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 1307-1312. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1307>
- [11] Bernsteiner, H., Zangerl-Plessl, E., Chen, X., *et al.* (2019) Conduction through a Narrow Inward-Rectifier K⁺ Channel Pore. *Journal of General Physiology*, **151**, 1231-1246. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912359>
- [12] Yan, W., Zhou, J., Sun, M., *et al.* (2014) The Construction of an Amino Acid Network for Understanding Protein Structure and Function. *Amino Acids*, **46**, 1419-1439. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1710-6>
- [13] Zhou, J., Yan, W., Hu, G., *et al.* (2016) Amino Acid Network for Prediction of Catalytic Residues in Enzymes: A Comparison Survey. *Current Protein & Peptide Science*, **17**, 41-51. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150923105312>
- [14] Sethi, A., Eargle, J., Black, A.A., *et al.* (2009) Dynamical Networks in tRNA: Protein Complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 6620-6625. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810961106>
- [15] Shao, Q., Gong, W. and Li, C. (2020) A Study on Allosteric Communication in U1A-snRNA Binding Interactions: Network Analysis Combined with Molecular Dynamics Data. *Biophysical Chemistry*, **264**, Article ID: 106393. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106393>
- [16] Burley, S.K., Bhikadiya, C., Bi, C., *et al.* (2021) RCSB Protein Data Bank: Powerful New Tools for Exploring 3D Structures of Biological Macromolecules for Basic and Applied Research and Education in Fundamental Biology, Biomedicine, Biotechnology, Bioengineering and Energy Sciences. *Nucleic Acids Research*, **49**, D437-D451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>
- [17] Bahar, I., Atilgan, A.R. and Erman, B. (1997) Direct Evaluation of Thermal Fluctuations in Proteins Using a Single-Parameter Harmonic Potential. *Folding & Design*, **2**, 173-181. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(97\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(97)00024-2)
- [18] Di Paola, L., De Ruvo, M., Paci, P., *et al.* (2013) Protein Contact Networks: An Emerging Paradigm in Chemistry. *Chemical Reviews*, **113**, 1598-1613. <https://doi.org/10.1021/cr3002356>
- [19] Bahar, I., Atilgan, A.R., Demirel, M.C., *et al.* (1998) Vibrational Dynamics of Folded Proteins: Significance of Slow and Fast Motions in Relation to Function and Stability. *Physical Review Letters*, **80**, 2733-2736. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.80.2733>
- [20] Tao, X., Avalos, J.L., Chen, J., *et al.* (2009) Crystal Structure of the Eukaryotic Strong Inward-Rectifier K⁺ Channel Kir2.2 at 3.1 Å Resolution. *Science*, **326**, 1668-1674. <https://doi.org/10.1126/science.1180310>
- [21] Niu, Y., Tao, X., Touhara, K.K., *et al.* (2020) Cryo-EM Analysis of PIP(2) Regulation in Mammalian GIRK Channels. *Elife*, **9**, e60552. <https://doi.org/10.7554/eLife.60552>