

Структурная фармакология ГАМК_A-рецепторов

А.В. Россохин, И.Н. Шаронова

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), основной тормозный нейромедиатор в центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих, активирует ионотропные рецепторы А типа (ГАМК_AР), обеспечивающие процессы быстрого торможения. ГАМК_AР являются основной мишенью для различных групп препаратов, широко используемых при лечении заболеваний ЦНС.

В обзоре представлены данные, позволяющие показать, как связаны физиологические эффекты, вызываемые активацией и модуляцией функций ГАМК_AР различными веществами (в том числе относящимися к лекарственным соединениям), со структурой рецептора и с взаимодействием этих веществ с конкретными модуляторными сайтами. Недавний прогресс в криоэлектронной микроскопии привёл к фундаментальным достижениям в понимании детальной организации и механизмов функционирования ГАМК_AР. Обзор основан как на современных структурных данных, полученных с помощью криоэлектронной микроскопии, так и на результатах исследований, выполненных при помощи биохимических и электрофизиологических методов, а также методов молекулярного моделирования.

Ключевые слова: ГАМК_A-рецептор; положительные аллостерические модуляторы; молекулярное моделирование; криоэлектронная микроскопия

Благодарность. Выполненные нами вычисления производились на базе центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

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

Адрес для корреспонденции: 105064, Москва, пер. Обуха, д. 5. ФГБНУ НЦН. E-mail: alrossokhin@yahoo.com. Россохин А.В.

Для цитирования: Россохин А.В., Шаронова И.Н. Структурная фармакология ГАМК_A-рецепторов. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2021; 15(4): 44–53.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2021.4.5>

Поступила 01.09.2021 / Принята в печать 17.09.2021

Structural pharmacology of GABA_A receptors

Alexey V. Rossokhin, Irina N. Sharonova

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS), activating the inotropic type A receptors (GABA_A receptors) to provide fast inhibition. GABA_A receptors are the main target for various groups of drugs that are widely used in the treatment of CNS disorders.

This review examines the relationship between the physiological effects of GABA_A receptor activation and modulation by various substances (including medicinal compounds), the receptor's structure, and the interaction of these substances with specific modulatory sites. Recent advances in cryogenic electron microscopy have led to fundamental improvements in understanding the detailed organization and function of GABA_A receptors. This review is based on both the latest structural data obtained from cryogenic electron microscopy and the results of biochemistry and electrophysiology studies, as well as molecular modelling.

Keywords: GABA_A receptor; positive allosteric modulators; molecular modelling; cryogenic electron microscopy

Acknowledgements. Our calculations were performed at the Supercomputer Resource Sharing Centre of the Lomonosov Moscow State University.

Source of funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, pereulok Obukha, 5. Research Center of Neurology. E-mail: alrossokhin@yahoo.com. Rossokhin A.V.

For citation: Rossokhin A.V., Sharonova I.N. [Structural pharmacology of GABA_A receptors]. *Annals of clinical and experimental neurology.* 2021; 15(4): 44–53. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2021.4.5>

Received 01.09.2021 / Accepted 17.09.2021

Введение

Быстрое торможение в ЦНС опосредуется активацией рецепторов γ -аминоасляной кислоты А типа (ГАМК_AР). Активация ГАМК_AР двумя молекулами агониста ГАМК переводит пору рецептора в открытое состояние, в котором обеспечивается энергетически оптимальный перенос ионов хлора внутрь клетки через гидрофобный барьер мембраны, что приводит к гиперполяризации мембраны и затрудняет генерацию нейронами потенциалов действия.

ГАМК_AР являются мишенью для большого числа как эндогенных, так и экзогенных модуляторов, регулирующих функции этих рецепторов, в том числе широко используемых в клинической практике. К таким модуляторам можно отнести химические соединения, принадлежащие к различным классам: антиконвульсанты, анксиолитики, общие анестетики, нейростероиды, конкурентные и неконкурентные антагонисты [1, 2].

Общие сведения о структуре ГАМК_AР

ГАМК_AР принадлежит к семейству цис-петельных лиганд-управляемых рецепторов, которые состоят из 5 субъединиц, симметрично (или псевдосимметрично) расположенных вокруг центральной оси и формирующих ион-проводящую пору. К этому семейству у позвоночных также относятся катион-проводящие никотиновый ацетилхолиновый и серотониновый рецепторы, анион-проводящий глициновый рецептор [3, 4].

Обнаружены 8 типов субъединиц: α 1–6, β 1–3, γ 1–3, ρ 1–3, ϵ , π , δ и θ , из которых может быть построен ГАМК_AР [5]. Наиболее часто в ЦНС встречаются ГАМК_AР, состоящие из двух α -, двух β - и одной γ - или δ -субъединицы [5, 6]. Рецепторы, содержащие γ -субъединицу, локализованы в постсинаптической мембране, где они опосредуют быстрые фазовые ответы, в то время как рецепторы, содержащие δ -субъединицу, локализованы вне синапсов и опосредуют медленные тонические токи. Синаптические и extrasинаптические рецепторы обладают различными биофизическими свойствами, включая кинетику десенситизации, а также проявляют различные фармакологические свойства [2, 5, 7].

В целом лиганд-управляемые рецепторы могут находиться в 3 основных функциональных состояниях: закрытом, открытом и десенситизированном. Закрытый рецептор не связан с агонистом и находится в непроводящем состоянии. В открытом агонист-связанном состоянии через пору рецептора свободно проходит ионный ток. В десенситизированном состоянии, несмотря на присутствие агониста, рецептор не проводит ионный ток и невосприимчив к новым стимулам.

В структуре ГАМК_AР можно выделить экстраклеточный и трансмембранный домены (ЭКД и ТМД соответственно) (рис. 1, А, В). ЭКД каждой субъединицы включает N-концевую α -спираль, за которой следуют 10 структур типа « β -тяж-петля- β -тяж», упакованных в β -сэндвич. ТМД состоит из 4 α -спиралей (M_1 – M_4) и различных по длине петель, соединяющих α -спиралей (рис. 1, В). Пору ГАМК_AР формируется 5 M_2 -сегментами различных субъединиц. Аминокислотный состав M_2 -спиралей определяет селективность и проводимость канала [8].

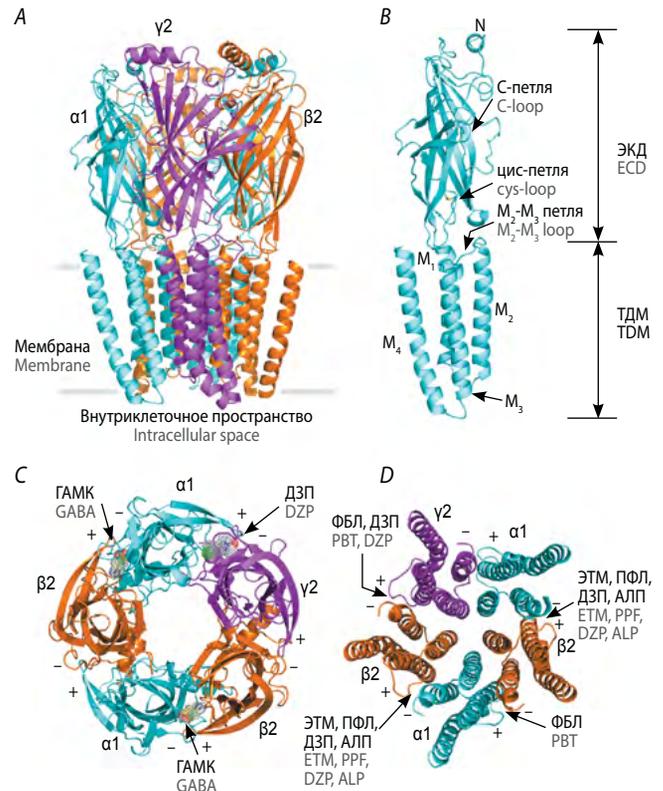


Рис. 1. Архитектура ГАМК_AР.

А — вид из плоскости мембраны на 2 : 2 : 1 α 1 β 2 γ 2-рецептор (6X3Z). Субъединицы выделены цветом и буквенным обозначением (α 1 — сине-зеленый, β 2 — оранжевый, γ 2 — пурпурный цвет). В — структура отдельной субъединицы. N и C — окончания аминокислотной цепи, С-петля и цис-петля ЭКД, M_1 – M_4 — трансмембранные спирали, M_2 – M_3 — петля ТМД.

С — вид из внутриклеточного пространства на ЭКД. Межсубъединичные интерфейсы выделены при помощи обозначений +/–. Показаны электронные плотности ГАМК и диазепама в β^+ / α^- и α^+ / γ^- -интерфейсах.

Д — вид из внеклеточного пространства на ТМД. Показаны трансмембранные межсубъединичные интерфейсы, в которых связываются положительные аллостерические модуляторы: β^+ / α^- — общие анестетики (этомидат — ЭТМ и пропофол — ПФЛ), бензодиазепины (диазепам — ДЗП), нейростероиды (аллопрегнанолон — АЛП); α^+ / β^- — барбитураты (фенбарбитал — ФБЛ); β^- / γ^- — барбитураты (ФБЛ), бензодиазепины (ДЗП).

Fig. 1. GABA_A receptor architecture.

A — view parallel to the membrane plane towards 2:2:1 α 1 β 2 γ 2 receptor (6X3Z). The subunits are marked with colours and letters (α 1 is blue-green, β 2 is orange, and γ 2 is magenta).

B — structure of a single subunit. N and C — amino acid chain terminals, ECD C-loop and cys-loop, M_1 – M_4 — transmembrane helices, M_2 – M_3 — TMD loop.

C — view from the intracellular space towards the ECD. Intersubunit interfaces are marked with +/–. The electronic densities of GABA and diazepam in β^+ / α^- and α^+ / γ^- interfaces are shown.

D — view from the extra space towards the TMD. Transmembrane intersubunit interfaces to which positive allosteric modulators bind are shown: β^+ / α^- — general anaesthetics (etomidate (ETM) and propofol (PPF)), benzodiazepines (diazepam (DZP)), neuroactive steroids (allopregnanolone (ALP)); α^+ / β^- — barbiturates (phenobarbital (PBT)); β^- / γ^- — barbiturates (PBT), benzodiazepines (DZP).

Каждая субъединица «соприкасается» с соседними субъединицами основной (+) и вспомогательной (–) сторонами. Система обозначений +/– используется для маркировки межсубъединичных интерфейсов рецептора. ГАМК_AР имеет два β^+ / α^- -интерфейса, и по одному α^+ / β^- , α^+ / γ^- и γ^- / β^- -интерфейсу (рис. 1, С, Д).

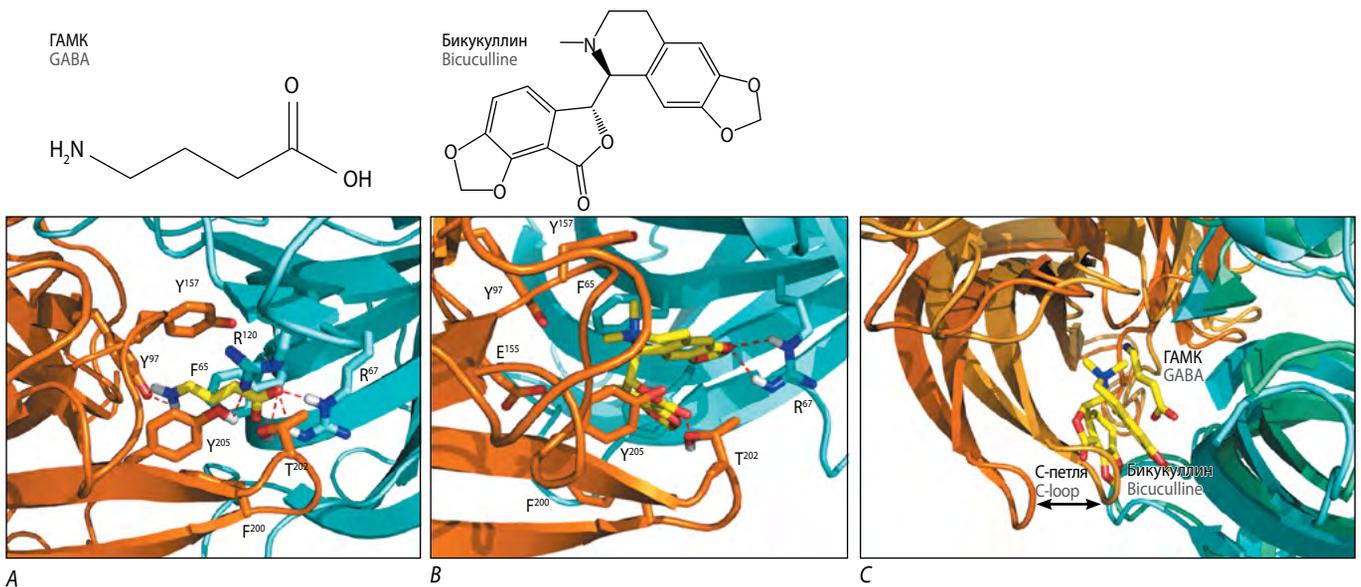


Рис. 2. Ортостерический сайт в ЭКД со связанными ГАМК (А) и конкурентным антагонистом бикукуллином (В). Показаны боковые цепи остатков, вносящих наибольший вклад во взаимодействие с лигандом. Водородные связи и полярные контакты изображены красными пунктирными линиями. Показаны только полярные атомы водорода. С — наложение 2 крио-ЭМ-структур ГАМК_AP со связанными ГАМК (PDB ID 6X3Z) и бикукуллином (PDB ID 6X3S). ТМД и некоторые структурные элементы ЭКД $\alpha 1$ - и $\beta 2$ -субъединиц не показаны для ясности. Цветовое изображение субъединиц соответствует рис. 1, при этом на фрагменте С для структуры 6X3Z использован более светлый тон. Стрелка указывает на изменение конформации С-петли.

Fig. 2. Orthosteric site in the ECD with bound GABA (A) and the competitive antagonist bicuculline (B). Side chains of the residues, which play the biggest role in ligand interaction, are demonstrated. Hydrogen bonds and polar contacts are shown as red dashed lines. Only the polar hydrogen atoms are shown. C — overlay of the two cryo-EM structures: GABA_A receptor with bound GABA (PDB ID 6X3Z) and with bicuculline (PDB ID 6X3S). The TMD and some structural elements of the ECD $\alpha 1$ and $\beta 2$ subunits are not shown for clarity purposes. The subunit colours correspond to those in Fig. 1, but a lighter shade is used for the 6X3Z structure in the C fragment. The arrow indicates the change in the C-loop conformation.

Агонисты и модуляторы, связывающиеся в ЭКД ГАМК_AР

ГАМК и конкурентные антагонисты

ГАМК взаимодействуют с двумя структурно эквивалентными сайтами связывания, расположенными в β^+ / α^- -межсубъединичных интерфейсах ЭКД ГАМК_AР (рис. 1, С) [9, 10]. На рис. 2, А, В показаны фрагменты криоэлектронно-микроскопических (крио-ЭМ) структур $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -ГАМК_AР со связанными ГАМК (код Protein Data Bank (PDB ID) — 6X3Z) и конкурентным антагонистом бикукуллином (PDB ID 6X3S).

ГАМК связывается внутри так называемой «ароматической коробочки», формируемой боковыми цепями ароматических аминокислотных остатков Phe65 ($\alpha 1$, петля D) и Tyr97 ($\beta 2$, петля А), Tyr157 ($\beta 2$, петля В), Tyr205, Phe200 ($\beta 2$, петля С) (рис. 2, А). В сайте связывания формируются электростатические и катион- π взаимодействия между аминогруппой ГАМК и остатками $\beta 2$ -Tyr97 и Tyr205. Кроме того, карбоксильная группа ГАМК образует солевой мостик с Arg67 ($\alpha 1$, петля D) и водородную связь с Thr202 ($\beta 2$, петля С). Таким образом, ГАМК координируется в основном за счёт гидрофильных взаимодействий в β^+ / α^- -интерфейсах ЭКД.

Несмотря на то что алкалоид растительного происхождения бикукуллин является значительно более крупной молекулой по сравнению с ГАМК, он также связывается в β^+ / α^- -интерфейсах ЭКД ГАМК_AР (рис. 2, В). При этом гидрофобная природа фталидного и изохинолинового колец бикукулина определяет характер его взаимодействий с ароматическими остатками. Фталидное кольцо бикукулина участвует в π -стэкинг-взаимодействиях с Phe200 ($\beta 2$,

петля С) и стабилизирует петлю С в более открытой конформации (рис. 2, С). Наложение двух структур — 6X3Z и 6X3S — показывает, что петля С в структуре 6X3S отогнута примерно на 4,5 Å по сравнению со структурой 6X3Z.

Важно отметить, что боковые цепи остатков Arg67 ($\alpha 1$, петля D) и Arg120 ($\alpha 1$, петля E), участвующих в связывании ГАМК и стабилизации открытого состояния рецептора, изменяют свою конформацию и поворачиваются от мембраны, чтобы сайт связывания вместил более крупный антагонист. Водородная связь между остатками Arg120 ($\alpha 1$, петля E) и Tyr205 ($\beta 2$, петля С), которая стабилизирует положение петли С в открытой конформации рецептора (рис. 2, А), разрушается при связывании бикукулина.

Изменение положения петли С в бикукуллин-связанной структуре приводит к конформационным изменениям в β -сэндвиче (петли D, CYS, F) $\beta 2$ -субъединицы, которые влияют на репозиционирование петли M₂-M₃ ТМД (рис. 1, В), что в итоге приводит к изменению конформации (из открытой в закрытую) активационных ворот ГАМК_AР.

Агонисты и антагонисты бензодиазепинового сайта

Бензодиазепины (БЗД) представляют собой класс лекарственных препаратов, обладающих анксиолитическими, противосудорожными, седативными, снотворными и миорелаксантами свойствами. БЗД были введены в клиническое использование в 1960-х гг. и вскоре получили широкое распространение в качестве лекарств, назначаемых в терапевтических целях [1, 11]. Интересно, что ГАМК_AР сначала был выделен как бензодиазепиновый рецептор [12, 13].

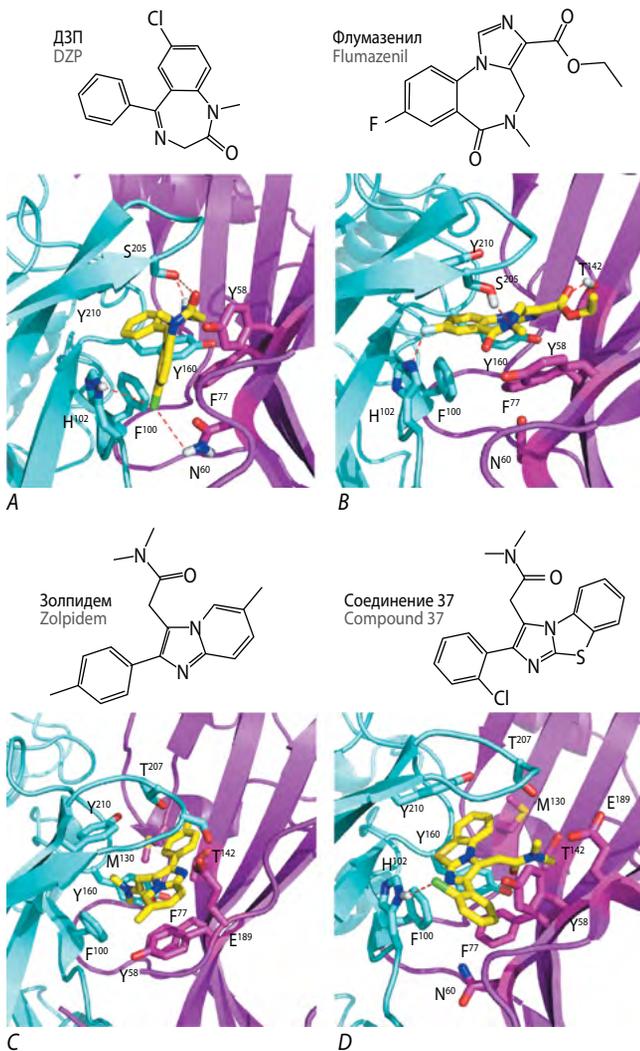


Рис. 3. Сайт связывания БЗД в α^+/γ^- -интерфейсе ЭКД. *A, B* — крио-ЭМ-структуры со связанными ДЗП (6X3X) и флумазенилом (6X3U). *C, D* — структурные модели связывания золпидема и тиазольного аналога имидазопиридинов (соединения 37) в α^+/γ^- -интерфейсе ЭКД. Обозначения в *A–D* соответствуют подписям к рис. 1 и 2.

Fig. 3. BZD binding site in the ECD α^+/γ^- interface. *A, B* — cryo-EM structures with bound DZP (6X3X) and flumazenil (6X3U). *C, D* — structural models of zolpidem and the thiazole analogue imidazopyridine (compound 37) binding in the ECD α^+/γ^- interface. Labels in *A–D* correspond to the terms in Fig. 1 and 2.

Эффективность БЗД варьирует среди ГАМК_AР различного субъединичного состава [14–16]. Рецепторы, содержащие $\alpha 1$ - 3 -, $\alpha 5$ - и $\gamma 1$ - 3 -субъединицы, формируют высокоаффинный сайт связывания БЗД [15]. Более того, с селективностью по α -субъединице связаны различные клинические эффекты этих препаратов: $\alpha 1$ -субъединица участвует в седативном и противосудорожном действии; $\alpha 2$ — в анксиолитическом; $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - и $\alpha 5$ -субъединицы — в миорелаксантном; $\alpha 1$ - и $\alpha 5$ -субъединицы — в развитии амнезии и когнитивных нарушений [17, 18].

Структура БЗД сайта ГАМК_AР хорошо охарактеризована [10, 19]. В ЭКД ГАМК_AР в интерфейсе между α - и

γ -субъединицами находится высокоаффинный сайт связывания БЗД. Сайты связывания БЗД с более низким сродством обнаружены также в ТМД в интерфейсах между β - и α -, а также между β - и γ -субъединицами.

В PDB представлены крио-ЭМ-структуры $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ - и $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -ГАМК_AР в комплексе с ГАМК и ДЗП: 6X3X и 6HUP соответственно [10, 19]. Конформации диазепама в α^+/γ^- -интерфейсе ЭКД хорошо совпадают в 6X3X и 6HUP структурах. Доступны также крио-ЭМ-структуры $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -ГАМК_AР в комплексе с другим классическим БЗД алпрозоламом (6HUU) и $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -ГАМК_AР в комплексе с антагонистом БЗД сайта флумазенилом (6X3U). БЗД сайт ГАМК_AР в α^+/γ^- -интерфейсе ЭКД со связанными диазепамом (6X3X) и флумазенилом (6X3U) показан на рис. 3, *A, B*.

Как и в ортостерическом сайте ГАМК (рис. 2, *A*), в сайте связывания БЗД важную роль играют ароматические остатки Phe100, His102, Tyr160, Tyr210 $\alpha 1$ -субъединицы и Tyr58, Phe77 $\gamma 2$ -субъединицы (рис. 3, *A*). Атом хлора ДЗП является акцептором водородной связи, образуемой с остатками His102 ($\alpha 1$) и Asn60 ($\gamma 2$). Также ДЗП выступает одновременно и донором, и акцептором водородной связи с Ser205, расположенным на изгибе С-петли $\alpha 1$ -субъединицы (рис. 3, *A*). Интересно, что His102 представлен в $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - и $\alpha 5$ -, но не в $\alpha 4$ - и $\alpha 6$ -субъединицах [15]. В последних 2 субъединицах эквивалентную позицию занимает аргинин, боковая цепь которого стерически препятствует связыванию классических БЗД [17, 20].

Антагонист БЗД-сайта флумазенил демонстрирует кардинально отличную от ДЗП моду связывания (рис. 3, *A, B*). Флумазенил имеет плоскую конформацию и связывается глубже относительно остатка $\gamma 2$ Asn60, определяющего нижнюю границу БЗД-сайта. Вероятно, это связано с наличием дополнительной водородной связи с Thr142 ($\gamma 2$) [19].

Классические БЗД аллостерически стабилизируют молекулу ГАМК в ортостерическом сайте связывания [10, 21, 22]. Флумазенил конкурирует с БЗД за общий сайт связывания, однако, взаимодействуя преимущественно с остатками $\alpha 1$ -субъединицы, вызывает антагонистический эффект. J.J. Kim с соавт., изучая крио-ЭМ-структуры ГАМК_AР в комплексе с ГАМК (PDB ID 6X3Z), ГАМК+ДЗП (6X3X) и ГАМК+флумазенил (6X3U), определили, что конформация 6X3X-рецептора наиболее стабильна [10, 23]. Анализ 6X3U-структуры в комплексе с использованием метода молекулярной динамики показал, что связывание флумазенила в α^+/γ^- -интерфейсе ЭКД дестабилизирует как ЭКД, так и ТМД $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -ГАМК_AР [10]. Последнее хорошо согласуется с использованием флумазенила в клинике при передозировке как ДЗП, так и пропофола или изофлурана (связываются исключительно в ТМД) [24].

Помимо классических БЗД, α^+/γ^- -интерфейс ЭКД является сайтом связывания также для имидазопиридинов, которые оказывают минимальное негативное влияние на когнитивные и психомоторные функции, а также вызывают меньшее привыкание у пациентов [25]. Золпидем принадлежит к соединениям этого класса и широко применяется как снотворное средство. В отличие от ДЗП золпидем обладает наибольшим сродством к ГАМК_AР, содержащим $\alpha 1$ -субъединицу, более низким сродством к $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -содержащим рецепторам и практически не взаимодействует с $\alpha 5$ -ГАМК_AР [14, 26].

Поскольку на сегодняшний день не существует крио-ЭМ- или рентгеновской структуры ГАМК_AР в комплексе с золпидемом, мы использовали методику молекулярного моделирования для построения структурной модели связывания этого вещества. При помощи метода Монте-Карло минимизации [27] энергии и компьютерной программы ZMM [28–33] мы осуществили докинг и нашли энергетически оптимальную конформацию золпидема в БЗД-сайте связывания $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -ГАМК_AР (рис. 3, С) [34]. Наша модель предсказывает, что золпидем взаимодействует с остатками петель E (Met130) и F (Glu189) $\gamma 2$ -субъединицы, с которыми практически не взаимодействуют классические БЗД (рис. 3, А–С). Важность остатков Met130 и Glu189 для связывания золпидема была ранее установлена в мутационных экспериментах [35, 36].

В настоящее время ведётся активный поиск новых классов модуляторов БЗД-сайта ГАМК_AР, ориентированный на получение высокоактивных, малотоксичных соединений с минимальными побочными эффектами. В рамках этого направления исследований были сконструированы и испытаны в экспериментах по вытеснению меченого флуниотразапама, а также в электрофизиологических экспериментах тиазолные аналоги имидазопиридинов [34]. В результате этой работы были выделены соединения-лидеры, обладающие наибольшей потенцирующей активностью. На рис. 3, D показана структурная модель связывания в α^+/γ^- -интерфейсе ЭКД соединения-лидера 37, полученная нами при помощи метода Монте-Карло минимизации. Интересно отметить, что соединение 37, как и ДЗП, взаимодействует с остатками His102 ($\alpha 1$) и Asn60 ($\gamma 2$) (рис. 3 А, D), а также с остатками Met130, Thr142 и Glu189 $\gamma 2$ -субъединицы, характерными для связывания золпидема (рис. 3, С, D).

Потенциация ГАМК_AР через межсубъединичные трансмембранные интерфейсы

Общие анестетики и барбитураты

Барбитураты начали применяться в медицинской практике ещё в начале XX в. в качестве успокаивающих и снотворных средств, однако в настоящее время их применение ограничено из-за высокой вероятности случайной передозировки, возникновения привыкания и лекарственной зависимости [37, 38]. ФБЛ является противоэпилептическим лекарственным средством, общие анестетики (ЭТМ и ПФЛ) используются в медицинской практике в качестве анестезирующих средств [37, 39].

Общие анестетики и барбитураты являются положительными аллостерическими модуляторами (ПАМ) ГАМК_AР. В низких концентрациях они усиливают вызванные ГАМК токи [40–43], а в высоких концентрациях способны в отсутствие агониста активировать ГАМК_AР [38, 44, 45]. Эксперименты по фотохимическому мечению [46–49], с использованием SCAMP-метода [48, 50, 51] и по направленному мутагенезу [52–55] показали, что сайты связывания этих веществ находятся в межсубъединичных интерфейсах ТМД.

Для облегчения сравнения различных субъединиц в области ТМД используется единая система обозначения остатков [56]. Высококонсервативные остатки Arg в N-терминальной части M₂-спирали принимаются за пози-

M1		-22'	
GABAAR_α1	FHLKRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSVQVSWLNR		275
GABAAR_γ2	FDLRRMGYFTIQTYIPCTLIVLWSVSWWINK		298
GABAAR_β2	FKLKRNIQYFILQTYMPSLITILSWVSWWINY		268
GABAAR_β3	FRLKRNIQYFILQTYMPSLITILSWVSWWINY		269
GlyR_α3	FHLERQMGYYLIQMYIPSLILVILSWVSWWINM		279
GlyR_α1	FHLERQMGYYLIQMYIPSLILVILSWVSWWINM		274
M2		0' 9'	
GABAA_α1	ESVPARTVFGVTTVLTMTTSLISARNSLPKVAY		309
GABAA_γ2	DAVPARTSLGITTTLTMTTSLTIARKSLPKVSY		331
GABAA_β2	DASAARVALGITTTLTMTTINTHLRETLPKIPY		301
GABAA_β3	DASAARVALGITTTLTMTTINTHLRETLPKIPY		302
GlyR_α3	DAAPARVALGITTTLTMTTQSSGSRASLPKVS		312
GlyR_α1	DAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASLPKVS		303
M3		36' 39'	
GABAAR_α1	ATAMDWFIACVAFVFSALIEFATVNYFTK		338
GABAAR_γ2	VTAMDLFVSVCFIFVFSALVEYGLHYFVS		361
GABAAR_β2	VKAIDMYLMGCFVVFVFMALLEYALVNYIFF		331
GABAAR_β3	VKAIDMYLMGCFVVFVFMALLEYAFVNYIFF		332
GlyR_α3	VKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSR		342
GlyR_α1	VKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSR		337

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей M₁–M₃-сегментов различных субъединиц ГАМК_AР и глицинового рецептора. Последовательности взяты из базы данных UniProt с идентификационными номерами ГАМК_A α1 P14867, ГАМК_A β2 P47870, ГАМК_A β3 P28472, ГАМК_A γ2 P18507, GlyR α1 O93430, GlyR α3 O75311. Выравнивание произведено относительно высококонсервативных остатков Arg в цитоплазматической части M₂-спирали (0'). Цифры справа обозначают номер последнего остатка в последовательности.

Fig. 4. Alignment of the amino acid sequences of the M₁–M₃ segments in the various subunits of the GABA_A receptor and glycine receptor. The sequences are taken from the UniProt database with the identification numbers GABA_A α1 P14867, GABA_A β2 P47870, GABA_A β3 P28472, GABA_A γ2 P18507, GlyR α1 O93430 and GlyR α3 O75311. The alignment was performed relative to the highly-conserved Arg residues in the cytoplasmic part of the M₂ helices (0'). The numbers on the right indicate the number of the last residue in the sequence.

цию 0'. Далее при движении в направлении внеклеточного вестибюля канала происходит увеличение номера остатка на единицу, или уменьшение — при движении в противоположном направлении (рис. 4).

В M₁-сегменте в позиции 22' различных субъединиц циспепельных рецепторов (рис. 4) находится высококонсервативный остаток Pro, выше которого образуется короткий отрезок π-спирали. В ней каждый остаток связан водородной связью не с 4-м, как в α-спирали, а с 5-м по ходу спирали остатком. В результате у M₁-спирали образуется изгиб, который расширяет проход из липидного бислоя в трансмембранный интерфейс в верхней (экстраклеточной) части ТМД (рис. 5, А–D). Таким образом, у ГАМК_AР образуются 5 гомологичных полостей, в которых могут связываться небольшие молекулы ПАМ. Недавно были опубликованы крио-ЭМ-структуры $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -ГАМК_AР в комплексе с ЭТМ (6X3V), ПФЛ (6X3T) и ФБЛ (6X3W) [10]. ЭТМ и ПФЛ обнаружены в β^+/α^- , а ФБЛ — в γ^+/β^- и α^+/β^- -трансмембранных интерфейсах.

Связывание ЭТМ исключительно в β^+/α^- -интерфейсе подтверждается экспериментальными исследованиями [46, 52, 57]. В сайте связывания фенильное кольцо ЭТМ ориентировано в сторону ЭКД, метильная и имидазольная группы — к оси канала, а этиловый эфир — в сторону липидного бислоя (рис. 5, А). Электростатические взаимодействия формируются между амидным азотом боковой цепи

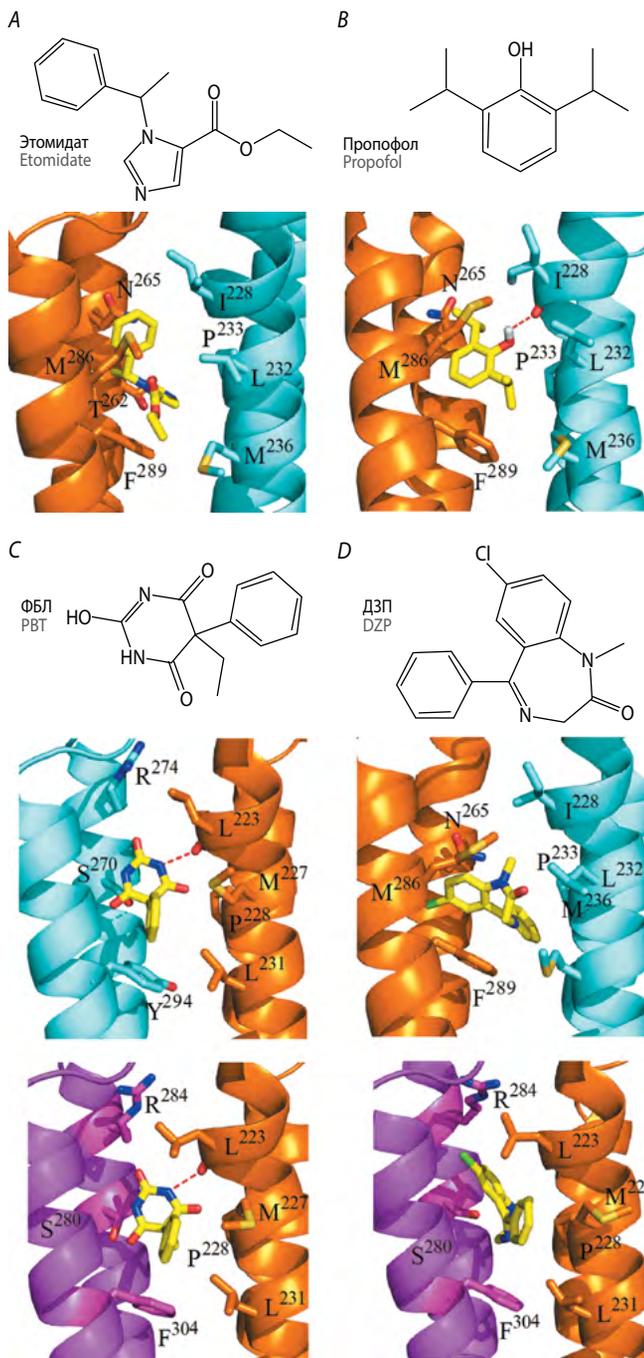


Рис. 5. Связывание внутривенных анестетиков в ТМД.
A, B — ЭТМ (6X3V) и ПФЛ (6X3T) в β^+/α^- -интерфейсе.
C — сайты связывания ФБЛ (6X3V) в α^+/β^- - (вверху) и β^-/γ^+ - (внизу) интерфейсах.
D — сайты связывания ДЗП (6X3X) в β^+/α^- - (вверху) и β^-/γ^+ - (внизу) интерфейсах.
 В *A–D* показаны только фрагменты $M_1–M_3$ -спиралей. Обозначения в *A–D* соответствуют подписям к рис. 1 и 2.

Fig. 5. Intravenous anaesthetic binding in the TMD.
A, B — ETM (6X3V) and PPF (6X3T) in the β^+/α^- interface.
C — binding sites of PBT (6X3V) in the α^+/β^- (top) and the β^-/γ^+ (bottom) interfaces.
D — binding sites of DZP (6X3X) in the β^+/α^- (top) and the β^-/γ^+ (bottom) interfaces.
A–D show only fragments of the $M_1–M_3$ helices. Labels in *A–D* correspond to the terms in Fig. 1 and 2.

остатка β_2 -Asn265 (15') и π -электронами фенильного кольца ЭТМ. С остатком β_2 -Asn15' связана специфичность потенцирующего эффекта ЭТМ по отношению к рецептору, содержащим $\beta_2/3$ -субъединицу. Мутация Asn15'Ser (гомологичный остаток в β_1 -субъединице) значительно снижала, а Asn15'Met полностью устраняла потенцирующее действие ЭТМ [52]. Сильные ван-дер-Ваальсовы взаимодействия формируются с гидрофобными остатками M_3 -спирали β_2 -Phe289 (39'), Met286 (36') и M_1 -спирали α_1 -Met236 (-19'), Pro233 (-22').

Данные биохимических исследований указывают, что ПФЛ с различной аффинностью может связываться не только в β^+/α^- , но также в α^+/β^- и γ^+/β^- -интерфейсах ГАМК_AР [48, 58]. Однако в крио-ЭМ-структуре 6X3T связывание ПФЛ было обнаружено только в β^+/α^- -интерфейсах [10]. ПФЛ формирует ван-дер-Ваальсовы контакты с гидрофобными остатками M_3 -спирали β_2 -Phe289 (39'), Met286 (36'), а также M_1 -спирали α_1 -Pro233 (-22'), Leu232 (-23'), Ile228 (-27'). ПФЛ образует водородную связь с атомом кислорода основной цепи остатка α_1 -Ile228 (-27') (рис. 5, *B*). В отличие от ЭТМ, ПФЛ не формирует электростатических контактов с β_2 -Asn15', а мутация последнего на Ser слабо влияла на его эффективность [59]. Однако мыши с внедрённой мутацией β_3 -Asn15'Met были нечувствительны к иммобилизирующему действию ПФЛ [60].

ФБЛ, в отличие от ЭТМ и ПФЛ, связывается в γ^+/β^- и α^+/β^- -трансмембранных интерфейсах (рис. 5, *C*). Моды связывания ФБЛ в двух различных интерфейсах полностью совпадают, кольцо барбитуровой кислоты глубоко заходит в интерфейс, а фенильное кольцо направлено от оси канала. Сайт связывания ФБЛ гомологичен сайтам ЭТМ и ПФЛ и находится на уровне остатка M_2 15'. ФБЛ стабилизирован в сайте связывания в основном за счёт ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с гидрофобными остатками обеих субъединиц и формирует водородную связь с атомом кислорода основной цепи остатка -27' β_2 -Leu223 (рис. 5, *C*). Гомологами остатка β_2 - M_2 -Asn15' являются Ser270 в α_1 -субъединице и Ser280 в γ_2 -субъединице. Структурные модели связывания ФБЛ в γ^+/β^- и α^+/β^- -интерфейсах предсказывают, что замещение Ser на Asn в позиции 15' приведёт к стерическому конфликту с ФБЛ.

Общие анестетики и барбитураты сходным образом влияют на кинетику ГАМК-токов. Аппликация ЭТМ, ПФЛ и ФБЛ приводила к увеличению длительности ГАМКергических постсинаптических токов за счёт увеличения постоянной времени деактивации рецептора [44, 61, 62]. Исследования одиночных ГАМК_AР показали, что эти вещества не изменяют проводимость канала, но увеличивают вероятность перехода в открытое состояние [42, 61, 63, 64].

Все рассмотренные крио-ЭМ-структуры (6X3V, 6X3T и 6X3W) соответствуют десенситизированному состоянию ГАМК_AР. Они характеризуются значительным сужением поры на уровне десенситизационных ворот (диаметр кольца -2' не превышает 3,3 Å) и значительным расширением поры (от 7,2 до 10,6 Å) на уровне активационных ворот за счёт поворота боковых цепей остатков Leu9' от оси поры. Таким образом, можно предположить, что связывание внутривенных анестетиков в трансмембранных интерфейсах влияет на геометрию M_2 -спиралей и способствует переходу активационных ворот рецептора к более открытой конформации.

Бензодиазепины

Наряду с высокоаффинным сайтом связывания ДЗП в α^+/γ^- -интерфейсе ЭКД были предсказаны низкоаффинные сайты связывания в ТМД ГАМК_AР [65]. В недавно опубликованных крио-ЭМ-структурах $\alpha 1\beta 2\gamma 2-$ (6НУР) и $\alpha 1\beta 2\gamma 2-$ (6Х3Х) ГАМК_AР сайты связывания ДЗП были обнаружены в β^+/α^- [19] и в β^+/α^- и γ^+/β^- -межсубъединичных интерфейсах [10] соответственно. Сайт связывания ДЗП в β^+/α^- -интерфейсе перекрывается с сайтами связывания общих анестетиков, а сайт связывания в γ^+/β^- -интерфейсе перекрывается с одним из сайтов связывания барбитуратов.

Моды связывания ДЗП в структурах 6НУР и 6Х3Х в β^+/α^- -межсубъединичных интерфейсах полностью совпадают, фенильное кольцо направлено к оси поры, бензольное кольцо частично заходит в интерфейс между М₂- и М₃-спиралями β -субъединицы (рис. 5, D). В сайте связывания ДЗП стабилизирован в основном за счёт гидрофобных взаимодействий с остатками $\beta 2/3$ -М₃ Phe289 (39'), Met286 (36') и $\alpha 1$ -М₁ Pro233 (-22'), Leu232 (-23'), Met236 (-19'). Интересно, что ДЗП в γ^+/β^- -интерфейсе является энантиомером по отношению к его положению в β^+/α^- -интерфейсе. ДЗП связывается выше остатка $\gamma 2$ -Ser280 (15'), фенильное кольцо направлено от оси поры и взаимодействует с остатками $\gamma 2$ -М₃ Phe304 (39') и $\beta 2$ -М₁ Pro228 (-22'), а бензольное кольцо располагается рядом с М₂-спиралью $\gamma 2$ -субъединицы (рис. 5, D).

Связывание ДЗП с 4 сайтами (1 в ЭКД и 3 в ТМД) делает открытое состояние ГАМК_AР более стабильным. J.J. Kim с соавт. [10] установили, что структура ГАМК_AР 6Х3Х (+ ГАМК, + 4ДЗП) стабильнее структуры 6Х3Z (+ ГАМК) и намного более стабильна, чем структура 6Х3U (+ ГАМК + флумазенил).

Интересно, что ни биохимические исследования, ни крио-ЭМ не показали возможности связывания ПАМ в α^+/γ^- -трансмембранном межсубъединичном интерфейсе. Этот интерфейс в литературе шуточно прозвали orphan site (сирота). Предполагается, что он занят или блокирован молекулами липидов [10].

Нейроактивные стероиды

Нейростероиды представляют собой стероидные гормоны, которые синтезируются в центральной и периферической нервной системе либо *de novo* из холестерина, либо путём метаболизма предшественников, переносимых кровью непосредственно в нервной ткани [66]. Нейростероиды являются эффективными модуляторами как синаптических, так и экстраинаптических ГАМК_AР [67, 68]. Различные нейростероиды могут оказывать как потенцирующее, так и ингибирующее действие на ГАМК_AР. Мы ограничимся в этом обзоре обсуждением механизмов действия потенцирующих нейростероидов ввиду их важности для медицинской практики.

Интерес к терапевтическим свойствам потенцирующих нейростероидов связан с возможностью их использования в качестве анестетиков, противосудорожных препаратов и для лечения некоторых неврологических и психиатрических заболеваний [69]. В последние десятилетия некоторые синтетические нейростероиды были введены в терапевтическую практику [70], а в 2019 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медика-

ментов (США) одобрило использование в клинической практике нейростероида АЛП для лечения посттравматической депрессии [71].

АЛП является эндогенным ПАМ ГАМК_AР. АЛП потенцировал вызванные ГАМК токи в культурах нейронов гиппокампа и спинного мозга крысы [72, 73] и при этом усиливал связывание агониста ГАМК_AР ³Н-мусцимола и агониста сайта БЗД ³Н-флунитрапеама [40, 72]. Интересно, что относительно высокие концентрации (>100 нМ) нейростероидов могут непосредственно активировать ГАМК_AР в отсутствие ГАМК [67, 72].

Экспериментальные данные указывают на то, что сайт связывания нейростероидов отличается от сайтов связывания ГАМК, общих анестетиков, барбитуратов и БЗД. Эффекты, вызываемые барбитуратами и нейростероидами на связывание ³Н-мусцимола или ³Н-флунитрапеама, являются аддитивными [40, 73]. G.D. Li с соавт. показали, что АЛП усиливает, а не подавляет фотохимическое мечение ГАМК_AР ³Н-азидомидатом [74]. Фотохимическое мечение гомо-олигомерного $\beta 3$ -ГАМК_AР при помощи 6-азипрегналлона выявило остаток М₃-сегмента Phe301 (51'), который расположен на 4 витка спирали ниже остатка Met36', участвующего в связывании ЭТМ [75].

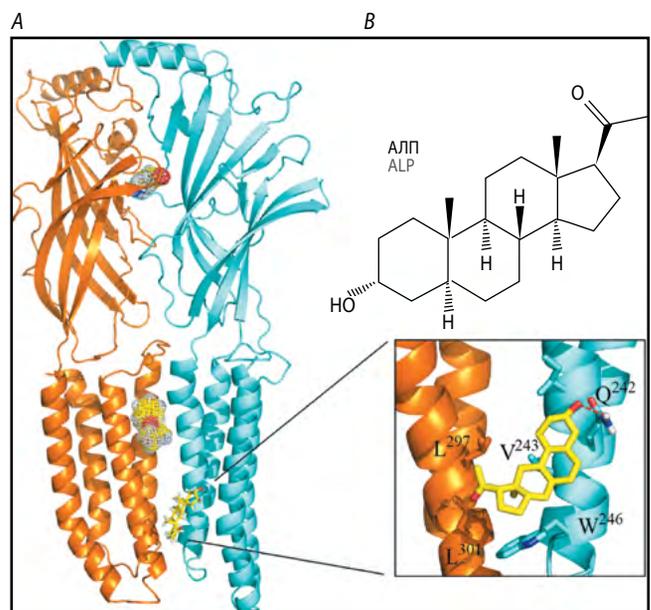


Рис. 6. Связывание нейростероида АЛП в β^+/α^- -трансмембранном межсубъединичном интерфейсе.

А — полноразмерный β^+/α^- -межсубъединичный интерфейс модели открытого $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -ГАМК_AР, построенной по гомологии с $\alpha 1$ -глициновым рецептором (ЗЖЕ). Показано место связывания АЛП и электронные плотности, соответствующие ГАМК (ЭКД) и ЭТМ (ТМД).

В — сайт связывания АЛП в укрупнённом виде. Показаны фрагменты М₁-М₃-спиралей ТМД.

Обозначения в А, В соответствуют подписям к рис. 1 и 2.

Fig. 6. Binding of the neuroactive steroid ALP in the β^+/α^- transmembrane intersubunit interface.

A — a full size β^+/α^- intersubunit interface of an open $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -GABA_A receptor model, based on homology with the $\alpha 1$ glycine receptor (ЗЖЕ). The ALP binding site and the electron densities corresponding to GABA (ECD) and ETM (TMD) are shown.

B — ALP binding site, magnified. Fragments of TMD M₁-M₃ helices are shown.

Labels in A and B correspond to the terms in Fig. 1 and 2.

В 2017 г. были опубликованы рентгеновские структуры химерных гомо-олигомерных $\beta 3$ - $\alpha 5$ -ГАМК_AР и GLIC- $\alpha 1$ -ГАМК_AР в связанном с нейростероидами АЛП и тетрагидродезоксикортикостероном состоянии [76, 77]. В обоих рецепторах место связывания нейростероидов оказалось в цитоплазматической части β^+ / α^- -трансмембранного интерфейса. Основываясь на этих данных, при помощи метода Монте-Карло минимизации мы построили структурную модель связывания АЛП в $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -ГАМК_AР. Наша модель предсказывает, что АЛП связывается между М₁- и М₃-спиралями в β^+ / α^- -межсубъединичном интерфейсе ТМД, формирует водородную связь с остатком $\alpha 1$ -M₁ Gln242 (-13'), а также образует сильные ван-дер-Ваальсовы связи с гидрофобными остатками $\alpha 1$ -M₁-Trp246 (-9'), Val243 (-14'), Ile239 (-16') и $\beta 2$ -M₃ Leu297 (47'), Leu301 (51') (рис. 6, А, В).

Как и БЗД, нейростероиды увеличивают частоту открываний одиночных каналов, а также, подобно внутривенным анестетикам, увеличивают длительность открытого состояния канала [68, 78]. Кроме того, нейростероиды увеличивают время спада ГАМКергических постсинаптических токов [79]. Поскольку АЛП связывается и взаимодействует с М₁- и М₃-сегментами в районе десенситизационных ворот ГАМК_AР [80–82], можно предположить смещение равновесия в кинетике перехода рецептора из открытого в десенситизированное состояние в сторону открытой конформации, что должно приводить к увеличению времени жизни канала в открытом состоянии.

Список источников / References

- Sieghart W. Allosteric modulation of GABA_A receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol* 2015;72:53–96. DOI: 10.1016/bs.apha.2014.10.002. PMID: 25600367.
- Olsen R.W. GABA_A receptor: positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* 2018;136(Pt A):10–22. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.01.036. PMID: 29407219.
- Hille B. *Ionic channels of excitable membrane*. 3rd ed. Massachusetts, 2001.
- Nemecz A., Prevost M.S., Menny A. et al. Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligand-gated ion channels. *Neuron* 2016;90(3):452–470. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.03.032. PMID: 27151638.
- Sieghart W. Structure, pharmacology, and function of GABA_A receptor subtypes. *Adv Pharmacol* 2006;54:231–263. DOI: 10.1016/s1054-3589(06)54010-4. PMID: 17175817.
- Hevers W., Luddens H. The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol* 1998;18(1):35–86. DOI: 10.1007/BF02741459. PMID: 9824848.
- Mortensen M., Patel B., Smart T.G. GABA Potency at GABA_A receptors found in synaptic and extrasynaptic zones. *Front Cell Neurosci*. 2011;6:1. DOI: 10.3389/fncel.2012.00001. PMID: 22319471.
- Keramidas A., Moorhouse A.J., Schofield P.R. et al. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004;86(2):161–204. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.09.002. PMID: 15288758.
- Laverty D., Desai R., Uchanski T. et al. Cryo-EM structure of the human $\alpha 5\beta\gamma$ GABA_A receptor in a lipid bilayer. *Nature*. 2019;565(7740):516–520. DOI: 10.1038/s41586-018-0833-4. PMID: 30602789.
- Kim J.J., Gharpure A., Teng J. et al. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature*. 2020. 585(7824):303–308. DOI: 10.1038/s41586-020-2654-5. PMID: 32879488.
- Sternbach L.H. The benzodiazepine story. *J Med Chem*. 1979;22(1):1–7. DOI: 10.1021/jm00187a001. PMID: 34039.
- Sigel E., Mamalaki C., Eric A.B. Isolation of a GABA receptor from bovine brain using a benzodiazepine affinity column. *FEBS Lett*. 1982;147(1):45–48. DOI: 10.1016/0014-5793(82)81008-9. PMID: 6291997.
- Sigel E., Stephenson F.A., Mamalaki C. et al. A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J Biol Chem*. 1983;258(11):6965–6971. PMID: 6304068.
- Sieghart W., Savic M.M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABA_A receptor subtype- and function-selective ligands: key issues in translation to humans. *Pharmacol Rev*. 2018;70(4):836–878. DOI: 10.1124/pr.117.014449. PMID: 30275042.

Заключение

Ионотропные ГАМК_AР являются основной мишенью для различных групп препаратов, которые действуют как общие анестетики, анксиолитики и антиконвульсанты. Механизмы модуляции ГАМК_AР этими соединениями, локализация мест их связывания на рецепторе и вызываемые ими физиологические эффекты продолжают оставаться предметом многочисленных исследований.

В обзоре рассмотрены последние достижения в понимании структуры, функций и фармакологии ГАМК_AР, современные данные о молекулярных механизмах и локализации мест связывания таких клинически значимых препаратов, как БЗД, общие анестетики, барбитураты, нейростероиды и др. Представленные данные иллюстрируют, как эти фармакологические соединения взаимодействуют с ГАМК_AР, модулируя его конформацию и функцию. Молекулярные взаимодействия и последующие фармакологические эффекты, вызываемые этими веществами, сложные из-за структурной гетерогенности ГАМК_AР и существования многочисленных аллостерически взаимосвязанных сайтов. Выявление и характеристика различных сайтов связывания на ГАМК_AР позволяет получить важную информацию для разработки фармацевтических препаратов, которые могут быть использованы для лечения широкого спектра неврологических заболеваний и психических расстройств.

- Sigel E., Ernst M. The benzodiazepine binding sites of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39(7):659–671. DOI: 10.1016/j.tips.2018.03.006. PMID: 29716746.
- Castellano D., Shepard R.D., Lu W. Looking for novelty in an “old” receptor: recent advances toward our understanding of GABA_ARs and their implications in receptor pharmacology. *Front Neurosci*. 2020;14:616298. DOI: 10.3389/fnins.2020.616298. PMID: 33519367.
- Tan K.R., Rudolph U., Luscher C. Hooked on benzodiazepines: GABA_A receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci*. 2011;34(4):188–197. DOI: 10.1016/j.tins.2011.01.004. PMID: 21353710.
- Jacob T.C. Neurobiology and therapeutic potential of alpha5-GABA Type A receptors. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:179. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00179. PMID: 31396049.
- Masiulis S., Desai R., Uchanski T. et al. GABA_A receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*. 2019;565(7740):454–459. DOI: 10.1038/s41586-018-0832-5. PMID: 30602790.
- Wieland H.A., Luddens H., Seeburg P. A single histidine in GABA_A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem*. 1992;267(3):1426–1429. PMID: 1346133.
- Baur R., Sigel E. Benzodiazepines affect channel opening of GABA_A receptors induced by either agonist binding site. *Mol Pharmacol*. 2005;67(4):1005–1008. DOI: 10.1124/mol.104.008151. PMID: 15657366.
- Campo-Soria C., Chang Y., Weiss D.S. Mechanism of action of benzodiazepines on GABA_A receptors. *Br J Pharmacol*. 2006;148(7):984–990. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706796. PMID: 16783415.
- Kim J.J., Hibbs R.E. Direct structural insights into GABA_A receptor pharmacology. *Trends Biochem Sci*. 2021;46(6):502–517. DOI: 10.1016/j.tics.2021.01.011. PMID: 33674151.
- Safavynia S.A., Keating G., Speigel I. et al. Effects of gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation by flumazenil on emergence from general anesthesia. *Anesthesiology*. 2016;125(1):147–158. DOI: 10.1097/ALN.0000000000001134. PMID: 27111534.
- Sanger D.J. The pharmacology and mechanisms of action of new generation, non-benzodiazepine hypnotic agents. *CNS Drugs*. 2004;18(Suppl 1):9–15; discussion 41, 43–15. DOI: 10.2165/00023210-200418001-00004. PMID: 15291009.
- Hanson S.M., Morlock E.V., Satyshur K.A. et al. Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the gamma-aminobutyric acid type-A (GABA_A) receptor are different. *J Med Chem*. 2008;51(22):7243–7252. DOI: 10.1021/jm800889m. PMID: 18973287.

27. Li Z., Scheraga H.A. Monte Carlo-minimization approach to the multiple-minima problem in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(19):6611–6615. DOI: 10.1073/pnas.84.19.6611. PMID: 3477791.
28. Zhorov B.S. Vector method for calculating derivatives of energy of atom-atom interactions of complex molecules according to generalized coordinates. *J Struct Chem*. 1981; 22:4–8.
29. Rossokhin A., Teodorescu G., Grissmer S. et al. Interaction of d-tubocurarine with potassium channels: molecular modeling and ligand binding. *Mol Pharmacol*. 2006;69(4):1356–1365. DOI: 10.1124/mol.105.017970. PMID: 16391240.
30. Garden D.P., Zhorov B.S. Docking flexible ligands in proteins with a solvent exposure- and distance-dependent dielectric function. *J Comput Aided Mol Des*. 2010;24(2):91–105. DOI: 10.1007/s10822-009-9317-9. PMID: 20119653.
31. Rossokhin A., Dreker T., Grissmer S. et al. Why does the inner-helix mutation A413C double the stoichiometry of Kv1.3 channel block by emopamil but not by verapamil? *Mol Pharmacol*. 2011;79(4):681–691. DOI: 10.1124/mol.110.068031. PMID: 21220411.
32. Rossokhin A. V., Sharonova I. N., Dvorzhak A. et al. The mechanisms of potentiation and inhibition of GABA_A receptors by non-steroidal anti-inflammatory drugs, mefenamic and niflumic acids. *Neuropharmacology*. 2019;160:107795. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107795. PMID: 31560908.
33. Rossokhin A. The general anesthetic etomidate and fenamate mefenamic acid oppositely affect GABAAR and GlyR: a structural explanation. *Eur Biophys J*. 2020;49(7):591–607. DOI: 10.1007/s00249-020-01464-7. PMID: 32940715.
34. Tikhonova T. A., Rassokhina I. V., Kondrakhin E. A. et al. Development of 1,3-thiazole analogues of imidazopyridines as potent positive allosteric modulators of GABA_A receptors. *Bioorg Chem*. 2020;94:103334. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103334. PMID: 31711764.
35. Buhr A., Sigel E. A point mutation in the gamma2 subunit of gamma-aminobutyric acid type A receptors results in altered benzodiazepine binding site specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(16):8824–8829. DOI: 10.1073/pnas.94.16.8824. PMID: 9238062.
36. Sancar F., Ericksen S.S., Kucken A.M. et al. Structural determinants for high-affinity zolpidem binding to GABA-A receptors. *Mol Pharmacol*. 2007;71(1):38–46. DOI: 10.1124/mol.106.029595. PMID: 17012619.
37. Franks N.P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(Suppl 1):S72–S81. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706441. PMID: 16402123.
38. Löscher W., Rogawski M.A. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia*. 2012;53(Suppl 8):12–25. DOI: 10.1111/epi.12025. PMID: 23205959.
39. Forman S. A. Clinical and molecular pharmacology of etomidate. *Anesthesiology*. 2011;114(3):695–707. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181f72b5. PMID: 21263301.
40. Peters J.A., Kirkness E.F., Callachan H. et al. Modulation of the GABA_A receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol*. 1988;94(4):1257–1269. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11646.x. PMID: 2850060.
41. Hales T.G., Lambert J.J. The actions of propofol on inhibitory amino acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurones. *Br J Pharmacol*. 1991;104(3):619–628. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12479.x. PMID: 1665745.
42. Yang J., Uchida I. Mechanisms of etomidate potentiation of GABA_A receptor-gated currents in cultured postnatal hippocampal neurons. *Neuroscience*. 1996;73(1):69–78. DOI: 10.1016/0306-4522(96)00018-8. PMID: 8783230.
43. Krasowski M.D. Contradicting a unitary theory of general anesthetic action: a history of three compounds from 1901 to 2001. *Bull. Anesth. Hist*. 2003;21(3):1–24. PMID: 17494361. DOI: 10.1016/s1522-8649(03)50031-2.
44. Zhang Z.X., Lü H., Dong X.P. et al. Kinetics of etomidate actions on GABA_A receptors in the rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Res*. 2002;953(1–2):93–100. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)03274-2. PMID: 12384242.
45. Ruesch D., Neumann E., Wulf H. et al. An allosteric coagonist model for propofol effects on alpha1beta2gamma2L gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Anesthesiology*. 2012;116(1):47–55. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31823d0c36. PMID: 22104494.
46. Li G.D., Chiara D.C., Sawyer G.W. et al. Identification of a GABA_A receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *J Neurosci*. 2006;26(45):11599–11605. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3467-06.2006. PMID: 17093081.
47. Chiara D.C., Dostalova Z., Jayakar S.S. et al. Mapping general anesthetic binding site(s) in human $\alpha_1\beta_3\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors with [³H]TDBzI-etomidate, a photoreactive etomidate analogue. *Biochemistry*. 2012;51(4):836–847. DOI: 10.1021/bi201772m. PMID: 22243422.
48. Forman S.A., Miller K.W. Mapping general anesthetic sites in heteromeric γ -aminobutyric acid type A receptors reveals a potential for targeting receptor subtypes. *Anesth Analg*. 2016;123(5):1263–1273. DOI: 10.1213/ANE.0000000000001368. PMID: 27167687.
49. Jayakar S.S., Zhou X., Chiara D.C. et al. Identifying drugs that bind selectively to intersubunit general anesthetic sites in the $\alpha_1\beta_3\gamma$ GABA_A R transmembrane domain. *Mol Pharmacol*. 2019;95(6):615–628. DOI: 10.1124/mol.118.114975. PMID: 30952799.
50. Bali M., Akabas M.H. Defining the propofol binding site location on the GABA_A receptor. *Mol Pharmacol*. 2004;65(1):68–76. DOI: 10.1124/mol.65.1.68. PMID: 14722223.
51. Stewart D.S., Hotta M., Li G.D. et al. Cysteine substitutions define etomidate binding and gating linkages in the alpha-M1 domain of gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors. *J Biol Chem*. 2013;288(42):30373–30386. DOI: 10.1074/jbc.M113.494583. PMID: 24009076.
52. Belelli D., Lambert J.J., Peters J.A. et al. The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(20):11031–11036. DOI: 10.1073/pnas.94.20.11031. PMID: 9380754.
53. Krasowska M.D., Nishikawac K., Nikolaeva N. et al. Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABA_A receptor β subunit controls a binding cavity for propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacology*. 2001;41(8):952–964. DOI: 10.1016/s0028-3908(01)00141-1. PMID: 11747900.
54. Siegwart R., Krahenbuhl K., Lambert S. et al. Mutational analysis of molecular requirements for the actions of general anaesthetics at the gamma-aminobutyric acidA receptor subtype, alpha1beta2gamma2. *BMC Pharmacol*. 2003;3:13. DOI: 10.1186/1471-2210-3-13. PMID: 14613517.
55. Stewart D., Desai R., Cheng Q. et al. Tryptophan mutations at azi-etomidate photo-incorporation sites on alpha1 or beta2 subunits enhance GABA_A receptor gating and reduce etomidate modulation. *Mol Pharmacol*. 2008;74(6):1687–1695. DOI: 10.1124/mol.108.050500. PMID: 18805938.
56. Miller C. Genetic manipulation of ion channels: a new approach to structure and mechanism. *Neuron*. 1989;2(3):1195–1205. DOI: 10.1016/0896-6273(89)90304-8. PMID: 2483110.
57. Siegwart R., Jurd R., Rudolph U. Molecular determinants for the action of general anesthetics at recombinant alpha2beta3gamma2 gamma-aminobutyric acid A receptors. *J Neurochem*. 2002;80(1):140–148. DOI: 10.1046/j.0022-3042.2001.00682.x. PMID: 11796752.
58. Eaton M.M., Germann A.L., Arora R. et al. Multiple non-equivalent interfaces mediate direct activation of GABA_A receptors by propofol. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(7):772–780. DOI: 10.2174/1570159x14666160202121319. PMID: 26830963.
59. Reynolds D.S., Rosahl T.W., Cirone J. et al. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA_A receptor isoforms. *J Neurosci*. 2003;23(24):8608–8617. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-24-08608.2003. PMID: 13679430.
60. Jurd R., Arras M., Lambert S. et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA_A receptor beta3 subunit. *FASEB J*. 2003;17(2):250–252. DOI: 10.1096/fj.02-0611he. PMID: 12475885.
61. Orser B.A., Wang L.Y., Pennefather P.S. et al. Propofol modulates activation and desensitization of GABA_A receptors in cultured murine hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1994;14(12):7747–7760. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-12-07747.1994. PMID: 7996209.
62. Mathers D.A., Wan X., Puil E. Barbiturate activation and modulation of GABA_A receptors in neocortex. *Neuropharmacology*. 2007;52(4):1160–1168. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2006.12.004. PMID: 17289092.
63. Parker I., Gundersen C.B., Mileti R. Actions of pentobarbital on rat brain receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci*. 1986;6(8):2290–2297. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.06-08-02290.1986. PMID: 2875136.
64. Kitamura A., Sato R., Marszalec W. et al. Halothane and propofol modulation of gamma-aminobutyric acidA receptor single-channel currents. *Anesth Analg*. 2004;99(2):409–415. DOI: 10.1213/01.ANE.0000131969.46439.71. PMID: 15271715.
65. Walters R.J., Hadley S.H., Morris K.D. et al. Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci*. 2000;3(12):1274–1281. DOI: 10.1038/81800. PMID: 11100148.
66. Baulieu E.E. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res*. 1997;52:1–32. PMID: 9238846.
67. Belelli D., Lambert J.J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(7):565–575. DOI: 10.1038/nrn1703. PMID: 15959466.
68. Belelli D., Hogenkamp D., Gee K.W. et al. Realising the therapeutic potential of neuroactive steroid modulators of the GABA_A receptor. *Neurobiol Stress*. 2020;12:100207. DOI: 10.1016/j.yjnstr.2019.100207. PMID: 32435660.
69. Reddy D.S., Estes W.A. Clinical potential of neurosteroids for CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(7):543–561. DOI: 10.1016/j.tips.2016.04.003. PMID: 27156439.
70. Reddy D.S. Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol*. 2003;15(3–4):197–234. DOI: 10.1615/critrevneurobiol.v15.i34.20. PMID: 15248811.
71. Zorumski C.F., Paul S.M., Covey D.F. et al. Neurosteroids as novel anti-depressants and anxiolytics: GABA_A receptors and beyond. *Neurobiol Stress*. 2019;11:100196. DOI: 10.1016/j.yjnstr.2019.100196. PMID: 31649968.
72. Majewska M.D., Harrison N.L., Schwartz R.D. et al. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. 1986;232(4753):1004–1007. DOI: 10.1126/science.2422758. PMID: 2422758.
73. Turner D.M., Ransom R.W., Yang J.S.J. et al. Steroid anesthetics and naturally-occurring analogs modulate the gamma-aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;248(3):960–966. PMID: 2539464.

74. Li G.D., Chiara D.C., Cohen J.B. et al. Neurosteroids allosterically modulate binding of the anesthetic etomidate to gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem.* 2009;284(18):11771–11775. DOI: 10.1074/jbc.C900016200. PMID: 19282280.
75. Chen Z.W., Manion B., Townsend R.R. et al. Neurosteroid analog photolabeling of a site in the third transmembrane domain of the beta3 subunit of the GABA_A receptor. *Mol Pharmacol.* 2012;82(3):408–419. DOI: 10.1124/mol.112.078410. PMID: 22648971.
76. Lavery D., Thomas P., Field M. et al. Crystal structures of a GABA_A-receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(11):977–985. DOI: 10.1038/nsmb.3477. PMID: 28967882.
77. Miller P.S., Scott S., Masiulis S. et al. Structural basis for GABA_A receptor potentiation by neurosteroids. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(11):986–992. DOI: 10.1038/nsmb.3484. PMID: 28991263.

Информация об авторах

Россохин Алексей Владимирович — к.ф.-м.н., в.н.с. лаб. функциональной синаптологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, orcid.org/0000-0001-7024-7461

Шаронова Ирина Николаевна — д.б.н., в.н.с. лаб. функциональной синаптологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, orcid.org/0000-0001-9955-1870

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

78. Twyman R.E., Macdonald R.L. Neurosteroid regulation of GABA_A receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *J Physiol.* 1992;456:215–245. DOI: 10.1113/jphysiol.1992.sp019334. PMID: 1338096.
79. Lambert J.J., Belelli D., Peden D.R. et al. Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Prog Neurobiol.* 2003;71(1):67–80. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2003.09.001. PMID: 14611869.
80. Gielen M., Thomas P., Smart T.G. The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nat Commun.* 2015;6:6829. DOI: 10.1038/ncomms7829. PMID: 25891813.
81. Rossokhin A.V., Zhorov B.S. Side chain flexibility and the pore dimensions in the GABAA receptor. *J Comput Aided Mol Des.* 2016;30(7):559–567. DOI: 10.1007/s10822-016-9929-9. PMID: 27460059.
82. Rossokhin A.V. Homology modeling of the transmembrane domain of the GABA_A receptor. *Biophysics.* 2017;62(5):708–716. DOI: 10.1134/s0006350917050190.

Information about the authors

Alexey V. Rossokhin — Cand. Sci. (Phys.-Math.), leading researcher, Laboratory of functional synaptology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, orcid.org/0000-0001-7024-7461

Irina N. Sharonova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of functional synaptology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, orcid.org/0000-0001-9955-1870

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.