



Структурные закономерности потенциации и блокады тормозных *цис*-петельных рецепторов через трансмембранный домен

А.В. Россохин

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Аннотация

Анион-проводящие *цис*-петельные рецепторы, активируемые γ -аминомасляной кислотой и глицином (ГАМК_AР и ГлиР), ответственны за процессы торможения в головном и спинном мозге. Эти рецепторы являются мишенью для различных групп веществ, которые потенцируют или угнетают их функции. Многие из этих агентов являются клинически важными препаратами, используемыми для лечения неврологических и психических заболеваний. В обзоре представлены как собственные, так и литературные данные по электрофизиологическим, мутационным и биохимическим исследованиям, которые изучают как вещества, относящиеся к классам неконкурентных антагонистов, общих анестетиков, барбитуратов и фенаматов, модулируют ГАМК_AР и ГлиР. Большое внимание уделено собственным исследованиям с использованием методов молекулярного моделирования, которые позволили определить места и раскрыть основные характеристики связывания этих веществ в трансмембранном домене ГАМК_AР и ГлиР. Изучение структурных закономерностей связывания позволило нам выявить возможные молекулярные механизмы действия этих веществ.

Ключевые слова: ГАМК_A-рецептор; глициновый рецептор; положительные аллостерические модуляторы; неконкурентные антагонисты; молекулярное моделирование

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

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 105064, Москва, переулок Обуха, д. 5. ФГБНУ «Научный центр неврологии».
E-mail: alrossokhin@yahoo.com. Россохин А.В.

Для цитирования: Россохин А.В. Структурные закономерности потенциации и блокады тормозных *цис*-петельных рецепторов через трансмембранный домен. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2022; 16(4): 44–53.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.4.6>

Поступила 30.03.2022 / Принята в печать 25.12.2022 / Опубликована 30.09.2022

The structural patterns of the potentiation and the blockade of inhibitory *cys*-loop receptors through the transmembrane domain

Alexey V. Rossokhin

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Abstract

Anion-conducting *cys*-loop receptors activated by γ -aminobutyric acid (GABA_ARs) and glycine (GlyRs) have inhibitory activity in the brain and spinal cord. GABA_ARs and GlyRs are targets for various substances that potentiate or inhibit the receptor functions. Many of these substances are clinically significant agents to treat neurological and psychiatric conditions.

The review covers both our results and literature data on electrophysiology, mutations, and biochemistry of non-competitive antagonists, general anesthetics, barbiturates, and fenamates modulating GABA_ARs and GlyRs. We focused on our own molecular modeling to determine the sites and the characteristics of binding of these substances to the GABA_AR and GlyR transmembrane domain. With the structural patterns of the binding, we have identified possible molecular mechanisms of action for these substances.

Keywords: GABA_A receptor; glycine receptor; positive allosteric modulators; non-competitive antagonists; molecular modeling

Acknowledgment. Computing was performed by 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 author declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

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

For citation: Rossokhin A.V. The structural patterns of the potentiation and the blockade of inhibitory *cys*-loop receptors through the transmembrane domain. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2022; 16(4): 44–53. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.4.6>

Received 30.03.2022 / Accepted 25.12.2022 / Published 30.09.2022

Введение

Нарушение баланса между возбуждением и торможением является причиной широкого спектра заболеваний мозга [1, 2]. Процессы торможения в нервной системе опосредованы активацией рецепторов γ -аминомасляной кислоты А типа (ГАМК_AР) и глициновых рецепторов (ГлиР). Эти рецепторы не только участвуют в регуляции уровня нейрональной активности, но и являются мишенями для множества биологически активных веществ, в том числе лекарственных препаратов, способных связываясь с рецептором и модулировать его функции [1, 3, 4].

ГАМК_AР и ГлиР принадлежат к семейству *цис*-петельных лиганд-управляемых рецепторов, к которому также относятся катион-проводящие никотиновый, ацетилхолиновый и серотониновый рецепторы позвоночных [5], хлорные рецепторы, активируемые протонами, гистамином и глутаматом, у беспозвоночных [6]. У прокариот обнаружены пентамерные лиганд-управляемые каналы, в которых

в целом сохранена архитектура, свойственная семейству *цис*-петельных рецепторов [7, 8].

Цис-петельные рецепторы состоят из 5 субъединиц, симметрично или псевдосимметрично расположенных вокруг оси канала. Найдено 8 типов субъединиц ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, $\rho 1-3$, ϵ , π , δ и θ), из которых может быть построен ГАМК_AР, однако наиболее частой комбинацией в ЦНС является $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ с соотношением субъединиц 2 : 2 : 1 [9, 10]. ГлиР отличаются существенно меньшим разнообразием субъединиц: известны 4 типа α -субъединицы и 1 тип β -субъединицы [1]. ГлиР могут функционировать как $\alpha\beta$ -гетеромеры (соотношение субъединиц 2 : 3 или 4 : 1) или α -гомо-олигомеры [11–14].

В структуре *цис*-петельных рецепторов выделяют экстраклеточный (ЭКД) и трансмембранный (ТМД) домены [15, 16] (рис. 1, А). ЭКД включает место связывания агониста, а ТМД формирует ион-проводящую пору рецептора. ТМД каждой субъединицы состоит из 4 α -спиралей (M1–M4).

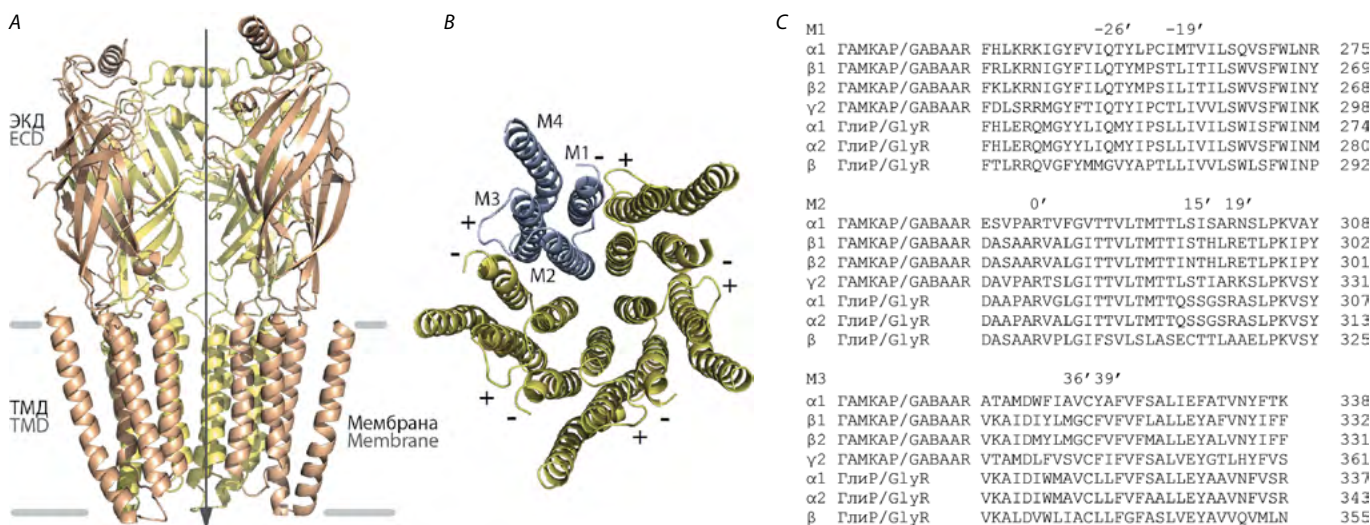


Рис. 1. Архитектура пентамерного лиганд-управляемого рецептора.

А — вид на рецептор из плоскости мембраны. Фронтальная субъединица опущена, чтобы показать пору. Стрелка обозначает центральную ось рецептора. Обозначены трансмембранный и внеклеточный домены (ТМД и ЭКД);

В — вид из внеклеточного пространства на ТМД. На выделенной цветом субъединице показаны трансмембранные спирали M1–M4. При помощи знаков +/- обозначены межсубъединичные интерфейсы;

С — выравнивание аминокислотных последовательностей M1–M3 сегментов ГАМК_AР и ГлиР. Последовательности ГАМК_AР $\alpha 1$ P14867, ГАМК_AР $\beta 1$ P18505, ГАМК_AР $\beta 2$ P47870, ГАМК_AР $\gamma 2$ P18507, ГлиР $\alpha 1$ P23415, ГлиР $\alpha 2$ P23416, ГлиР β P48167 взяты из базы данных UniProt. Выравнивание произведено относительно высококонсервативных остатков Arg 0'. Остатки, относящиеся к межсубъединичным потенцирующим сайтам, обозначены над последовательностями номерами со штрихом.

Fig. 1. Ligand-activated pentamer receptor architecture.

A — the view of the receptor in the membrane plane. The frontal subunit is omitted to demonstrate a pore. The arrow indicates the receptor central axis. The transmembrane domain (TMD) and the extracellular domain (ECD) are pointed out;

B — the extracellular view of TMD. Transmembrane chains M1–M4 are indicated on the colored subunit. Intersubunit interfaces are pointed with + and -;

C — the alignment of GABA_AR and GlyR segment M1–M3 aminoacid sequences. The GABA_AR $\alpha 1$ P14867, GABA_AR $\beta 1$ P18505, GABA_AR $\beta 2$ P47870, GABA_AR $\gamma 2$ P18507, GlyR $\alpha 1$ P23415, GlyR $\alpha 2$ P23416, and GlyR β P48167 sequences were sourced from the UniProt Database and aligned relative to the highly conserved Arg 0' residues. Intersubunit potentiating site residues are marked with numbers and strokes above the sentences.

Пора рецептора формируется М2-спиралями (рис 1, В) и обеспечивает энергетически оптимальное перемещение ионов хлора через гидрофобный барьер мембраны.

Лиганд-управляемые рецепторы характеризуются тремя основными функциональными состояниями: закрытым (непроводящее, агонист-несвязанное), открытым (проводящее, агонист-связанное) и десенситизированным (непроводящее, агонист-связанное). Геометрия поры изменяется при конформационном переходе канала из одного состояния в другое.

Многие агонисты и модуляторы связываются в межсубъединичных интерфейсах ЭКД и ТМД ГАМК_AР и ГлиР [17–19]. При этом две стороны соседних субъединиц, которые часто обозначаются в литературе как principal/главная/+ и complementary/дополнительная/–, участвуют в формировании сайта связывания (рис. 1, В). В этой работе мы рассмотрим сайты и структурные детерминанты связывания положительных аллостерических модуляторов и блокаторов, расположенные в межсубъединичных интерфейсах ТМД и поре ГАМК_AР и ГлиР, а также обсудим возможные механизмы действия этих веществ.

Геометрия поры ГАМК_AР в различных функциональных состояниях

О строении поры можно судить по изображениям, полученным при помощи криогенной электронной микроскопии (крио-ЭМ), и рентгеновским структурам ГАМК_AР и ГлиР, доступным в Protein Data Bank [20–24]. Доступна информация о структуре ГлиР во всех функциональных состояниях [21], однако релевантной структуры открытого ГАМК_AР пока не существует. Ранее при помощи методов молекулярного моделирования мы изучили геометрию поры гетеромерного ГАМК_AР. Для этого мы построили модели α1β2γ2 ГАМК_AР по гомологии со структурами α3 ГлиР (5CFB, закрытый), α1 ГлиР (3JAE, открытый) и β3 ГАМК_AР (4COF, десенситизированный) [25, 26].

Выравнивание аминокислотных последовательностей М1–М3 сегментов ТМД различных субъединиц ГАМК_AР и ГлиР показано на рис. 1, С. Для облегчения сравнения различных субъединиц выработана единая система обозначения остатков [27]. Высококонсервативные остатки Arg в N-терминальной части М2-спирали принимаются за позицию 0'. Далее при движении в направлении внеклеточного вестибюля канала происходит увеличение номера остатка на единицу или уменьшение на единицу при движении в противоположном направлении (рис. 1, С). Боковые цепи остатков –2', 2', 6', 9', 13', 16' и 20' направлены внутрь поры. Остатки 9' является частью активационных ворот рецептора, а –2' — десенситизационных ворот [15, 28].

Мы использовали компьютерную программу «CAVER 3.0» [29] для определения диаметра и визуализации пространства внутри поры (рис. 2, А). Для того чтобы охарактеризовать пору рецептора, находящегося в различных функциональных состояниях, мы применили два подхода. В работе [26] мы использовали различные шаблоны как прокариотических, так и эукариотических пентамерных лиганд-управляемых рецепторов [20–22, 30–32] для оценки размеров поры моделей ГАМК_AР, построенных по гомологии. В работе [25] мы предложили методику протяжки сквозь пору сферы переменного радиуса для учёта в оценках гиб-

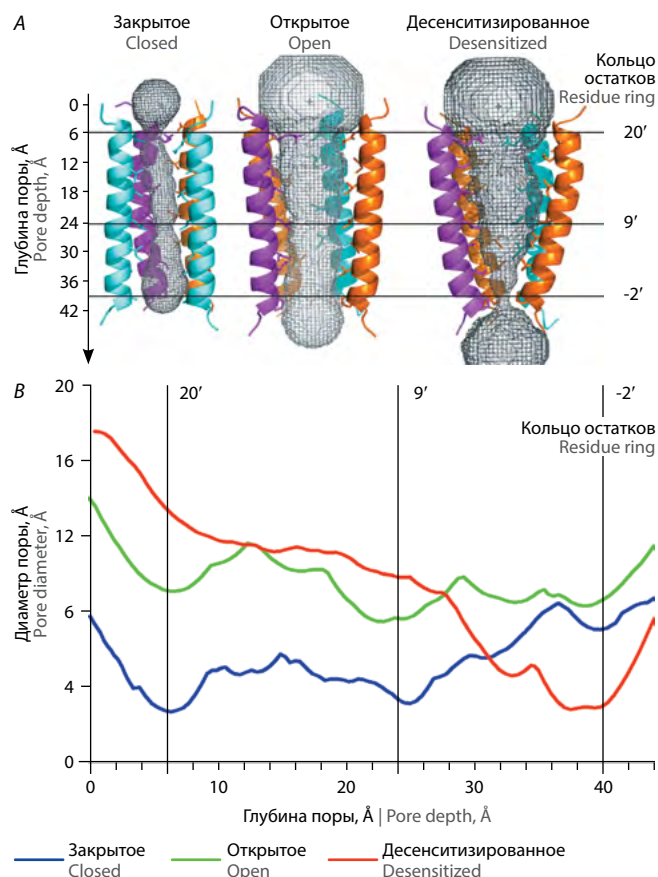


Рис. 2. Пора ГАМК_AР.
 А — визуализация пространства внутри поры моделей α1β2γ2 ГАМК_AР, построенных по гомологии со структурами закрытого α3 ГлиР (5CFB), открытого α1 ГлиР (3JAE) и десенситизированного β3 ГАМК_AР (4COF). Изображены только М2-сегменты различных субъединиц. Фронтальная субъединица удалена для ясности. Горизонтальные линии указывают на уровни остатков –2', 9' и 20', соответствующих основным сужениям поры. Отдельные субъединицы выделены сине-зелёным (α1), оранжевым (β2) и пурпурным (γ2) цветами;
 В — изменение диаметра от глубины поры в моделях, соответствующих закрытому, открытому и десенситизированному состояниям рецептора. Вертикальные линии указывают на уровни поры –2', 9' и 20'.

Fig. 2. GABA_A pore.
 A — visualized space inside the pore of the α1β2γ2 GABA_AR models that are homologous to the closed α3 GlyR (5CFB), open α1 GlyR (3JAE), and desensitized β3 GABA_AR (4COF) structures. Only M2 segments are depicted. The frontal subunit was omitted for clarity. Horizontal lines indicate residue levels –2', 9', and 20' for main pore constrictions. Some subunits are highlighted in cyan (α1), orange (β2), and purple (γ2);
 B — dependence of the pore diameter on the pore depth in the closed, open, and desensitized receptor states. Vertical lines indicate pore levels –2', 9', and 20'.

кости боковых цепей аминокислотных остатков, выстилающих стенки поры.

Мы показали, что ГАМК_AР имеет широкий внешний вестибюль, и по мере продвижения вглубь канала происходит немонотонное сужение поры. Диаметр внешнего вестибюля поры увеличивается по мере перехода канала из закрытого в открытое и затем в десенситизированное состояние. Наши модели предсказывают, что места наибольшего сужения поры ГАМК_AР расположены на уровнях остатков –2', 9' и 20' (рис. 2, В).

В закрытом состоянии кольца остатков 20' и 9' являются слишком узкими (2,9 и 3,3 Å соответственно) для прохождения гидратированного иона хлора, диаметр которого, по разным оценкам, варьирует от 3,6 до 4,4 Å [33, 34]. В открытом состоянии кольца 20' и 9' расширяются до 9,3 и 7,6 Å, что обеспечивает свободное прохождение даже полностью гидратированного иона хлора, диаметр которого составляет 6,6 Å [35]. Наиболее узким участком поры в десенситизированном состоянии является кольцо остатков -2' (3 Å), расположенное в районе внутриклеточного вестибюля (рис. 2, В). В открытом и закрытом состояниях диаметр этого кольца увеличивается, что подтверждает участие остатков -2' в механизме десенситизационных ворот ГАМК_AР.

Мы обнаружили также значительное сужение поры в закрытом ГАМК_AР на уровне кольца 20', которое формируется полярными и заряженными остатками (рис. 1, С). Диаметр этого кольца увеличивается почти в 3 раза в открытом канале, а в десенситизированном рецепторе сужение поры в этом месте практически исчезает (рис. 2, В). Зависимость диаметра кольца 20' от функционального состояния рецептора позволяет предположить участие остатков этого уровня в координации ионов хлора во внешнем вестибюле ГАМК_AР [36].

Неконкурентные антагонисты

Среди веществ, действующих как блокаторы ГАМК_AР и ГлиР, широко распространены неконкурентные антагонисты (НКА), которые связываются в поре рецептора, не конкурируя с агонистом за ортостерический сайт связывания. К НКА относятся пикротоксин, антибиотики β-лактамоного ряда, фуросемид, инсектициды, гинкголиды, бибобалид и др. Некоторые из этих веществ одновременно с блокадой поры влияют на аффинность агониста [4] и поэтому могут быть отнесены к негативным аллостерическим модуляторам. В этом разделе мы подробно рассмотрим блокирующее действие 3 НКА: алкалоида пикротоксина (ПТН), β-лактамоного антибиотика пенициллина (ПН) и диуретика фуросемида (ФУР).

ПТН представляет собой эквимольярную смесь двух изомеров — прикротоксинина и прикротина. Эти соединения имеют общую структуру, за исключением того, что прикротин содержит несколько больший по размеру диметилметанол на месте изопропенильной группы прикротоксинина (рис. 3, А). Прикротоксинин более эффективно блокирует ГАМК_AР и α2/3 ГлиР [4, 37], а при взаимодействии с α1 и α1β ГлиР показывает схожую эффективность с прикротином [37]. ПТН связывается с открытым рецептором и может быть заперт в поре закрытого канала (принцип ловушки), в этом случае для его диссоциации требуется повторная активация рецептора [38, 39]. ПТН уменьшает аффинность и ускоряет диссоциацию ГАМК [40, 41].

ПТН имеет форму приплюснутого эллипсоида, который идеально подходит для блокирования поры по принципу пробки в бутылочном горлышке. Крио-ЭМ структура α1β2γ2 ГАМК_AР (6X40) со связанным ПТН показала, что этот блокатор вызывает окклюзию поры, связываясь между кольцами остатков 2' и 6' [24] (рис. 3, А). Изопропенильная группа молекулы взаимодействует с гидрофобными остатками кольца 2' (рис. 1, С), а экзоциклические атомы кислорода образуют множественные водородные связи с полярными треонинами кольца 6' (рис. 3, А).

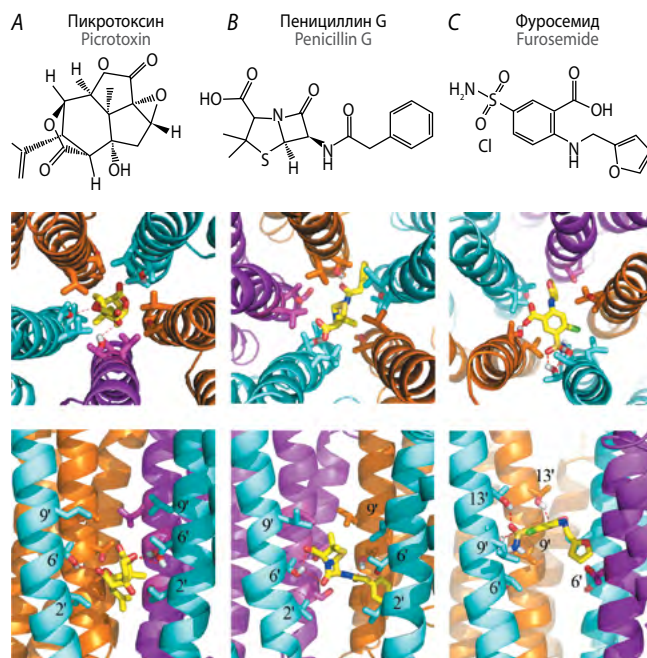


Рис. 3. Неконкурентные антагонисты ГАМК_AР.

А — крио-ЭМ структура ГАМК_AР (6X40) в комплексе с ПТН; В, С — связывание ПН и ФУР в поре модели ГАМК_AР, построенной по гомологии со структурой бактериального рецептора GLIC (3HEZ).

На фрагментах А–С представлен вид в двух проекциях: из экстраклеточного пространства (сверху) и из плоскости мембраны (снизу). На изображениях из плоскости мембраны фронтальная субъединица не показана для ясности. Показаны боковые цепи остатков 2', 6', 9' и 13', вносящих наибольший вклад во взаимодействие с блокаторами. Водородные связи изображены красными пунктирными линиями. Цветовое изображение субъединиц соответствует рис. 2.

Fig. 3. GABA_AR non-competitive antagonists.

А — cryo-EM structure of GABA_AR (6X40) complexed with picrotoxin; В, С — binding of penicillin and furosemide in the pore of the GABA_AR model that is homologous to the bacterial receptor GLIC (3HEZ) structure.

А–С present views from the extracellular space (top) and in the plane of membrane (bottom). The frontal subunit is omitted for clarity on the side-view images. The images show side chains of residues 2', 6', 9', and 13' that most significantly contribute to the blocker-receptor interaction. Hydrogen bonds are depicted as red dashed lines. Color subunit presentation complies with Fig. 2.

Интересно, что в структурах 6HUJ и 6HUG α1β3γ2 ГАМК_AР и 6UD3 α1 ГлиР изопропенильная группа ПТН направлена вверх и образует гидрофобные контакты с лейцинами активационных ворот 9', при этом треонины 6' также образуют водородные связи с атомами кислорода ПТН. Во всех известных структурах связывание ПТН осуществляется ниже активационных ворот рецептора, что является молекулярной основой механизма «ловушки». Данные мутационных экспериментов о вовлечённости остатков колец 2', 6' и 9' в связывание ПТН [42–44], а также построенные ранее структурные модели связывания ПТН в поре ГАМК_AР и ГлиР [25, 37, 45, 46] хорошо согласуются с полученными недавно крио-ЭМ структурами 6X40, 6HUJ, 6HUG и 6UD3.

К НКА относятся также антибиотик ПН и диуретик ФУР (рис. 3, В, С). Эти вещества в миллимолярных концентрациях блокируют открытые ГАМК_AР и ГлиР [47–50]. Хотя очевидно, что анионные лиганд-управляемые рецепторы

не являются основной мишенью для этих препаратов, их передозировка может привести к нежелательным побочным эффектам. Эпилептогенные свойства ПН задокументированы с 1940-х гг. [51, 52].

При регистрации ГАМК-активируемых токов в изолированных клетках Пуркинье мозжечка крысы мы установили, что ПН и ФУР, в отличие от ПТН, действуют по механизму последовательного блока и препятствуют диссоциации агониста и переходу ГАМК_AР в закрытое состояние до диссоциации самого блокатора [49, 50]. Такой механизм, известный также под названием «нога в двери», был описан ранее для nAChR [53] и NMDA-рецепторов [54].

Используя метод Монте-Карло минимизации (МКМ) энергии [55], мы определили структурные детерминанты связывания ПН и ФУР в поре модели открытого $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ГАМК_AР, построенной по гомологии с бактериальным рецептором GLIC (2XQ3). Для этого мы осуществляли пошаговую протяжку молекулы лиганда через пору рецептора с одновременным поворотом молекулы вокруг своей оси и применяли на каждом шаге протокол МКМ [50, 56, 57]. Структурные модели связывания ПН и ФУР в поре $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ГАМК_AР, соответствующие минимуму энергии лиганд-рецепторных взаимодействий, показаны на рис. 3, В, С.

ПН связывается между кольцами остатков 2' и 9', образует водородные связи с полярными остатками кольца 6' и взаимодействует с гидрофобными остатками кольца 9' (рис. 3, В). Фенильное кольцо ПН заходит в межсубъединичный интерфейс и, таким образом, препятствует переходу рецептора в закрытое состояние. ФУР, в отличие от ПН и ПТН, связывается выше на уровне колец остатков 6'–13', образует водородные связи с полярными треонинами 13' и взаимодействует с гидрофобными лейцинами 9' (рис. 3, С), влияя на активационные ворота рецептора.

ПТН, ПН и ФУР вызывают окклюзию поры, однако при этом молекулярные механизмы их действия кардинально различаются. Если ПТН, запертый в поре, в отсутствие ГАМК стабилизирует закрытое состояние, то ПН и ФУР стабилизируют открытое блокированное состояние рецептора.

Общие анестетики, барбитураты и фенаматы: от потенциации к торпозению

Внутривенные/общие анестетики (этомидат — ЭТМ и пропофол — ПФЛ) и барбитураты (фенобарбитал — ФБЛ) оказывают анестетическое действие на ЦНС. Эти вещества в низких микромольных концентрациях потенцируют ГАМК_AР [58, 59], эффективные концентрации для потенциации ГлиР — примерно на порядок больше [60, 61]. Фенаматы (мефенамовая и нифлумовая кислота, МФК и НФК) широко применяются в клинической практике как нестероидные противовоспалительные средства [62], однако они легко проникают через гематоэнцефалический барьер и могут взаимодействовать с нейрональными рецепторами [63].

Общие анестетики и барбитураты оказывают двойственное влияние на ГАМК- и глицинергические токи: в низких концентрациях они усиливают вызванные аппликацией агониста токи, а при увеличении концентрации начинают превалировать блокирующий эффект [60, 64]. Кривая доза—ответ

фенаматов по отношению к ГАМК-активируемым токам также имеет колоколообразный вид [65–67]. НФК слабее других фенаматов потенцирует ГАМК_AР [68] и оказывает только блокирующее действие на ГлиР [69]. Все указанные соединения (за исключением НФК) в высоких концентрациях способны активировать ГАМК_AР в отсутствие ГАМК [59, 64, 67, 70], и только ПФЛ вызывает прямую активацию ГлиР [60, 61]. ЭТМ, ПФЛ, ФБЛ и МФК при потенциации ГАМК_AР увеличивают аффинность агониста [4, 67, 71].

Общие анестетики, барбитураты и фенаматы сходным образом влияют на кинетику ГАМК- и глицин-активируемых токов. Аппликация ЭТМ, ПФЛ и ФБЛ приводила к увеличению длительности ГАМК- и глицинергических мТПСТ за счёт увеличения постоянной времени деактивации рецептора [72–75]. Исследования одиночных ГАМК_AР показали, что эти вещества не изменяют проводимость рецепторов, но увеличивают как вероятность перехода, так и время жизни рецептора в открытом состоянии [76–78]. Мы показали, что МФК и НФК также увеличивают постоянную времени спада ТПСТ в изолированных клетках Пуркинье [67] и срезах мозжечка крысы [79].

Фенаматы и общие анестетики действуют на ГАМК_AР сходным образом. Рецепторы, содержащие $\beta 2/3$ -субъединицу, потенцируются МФК и ЭТМ значительно эффективнее по сравнению с рецепторами с $\beta 1$ -субъединицей [65, 80]. Это различие связано с остатком 15' М2-спирали (рис. 1, С). Замена у $\alpha 1\beta 2(N15'S)\gamma 2$ -рецепторов значительно снижала потенцирующий эффект, а при обратной замене у $\alpha 1\beta 1(S15'N)\gamma 2$ -рецепторов потенцирующий эффект, наоборот, усиливался.

В экспериментах с [³H]ази-ЭТМ были выявлены 2 остатка $\beta 2$ -М3 Met36' и $\alpha 1$ -М1 Met(-19'), которые участвуют в связывании общих анестетиков [82]. Мутационные эксперименты подтвердили важность этих остатков для потенцирующего действия ЭТМ и ПФЛ на ГАМК_AР [71, 83, 84]. Боковые цепи остатков $\beta 2$ Asn15', Met36' и $\alpha 1$ Met(-19') направлены в интерфейс между этими субъединицами. Недавно полученные крио-ЭМ-структуры 6X3V и 6X3T ГАМКАР подтвердили, что потенцирующий сайт связывания ЭТМ и ПФЛ расположен в трансмембранном $\beta(+)/\alpha(-)$ -интерфейсе [24].

R.F. Halliwell с соавт. предположили, что ЭТМ и МФК могут иметь общий сайт связывания [65]. Мы исследовали потенцию ГАМК-активируемых токов в изолированных клетках Пуркинье при совместной аппликации МФК и ЭТМ и установили, что их потенцирующие эффекты не являются аддитивными [67]. Следовательно, наши данные подтверждают, что эти вещества действуют через общий сайт связывания.

D.J. Laurie и соавт. показали, что в клетках Пуркинье мозжечка крыс экспрессируется наиболее распространённый в ЦНС тип $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$ ГАМК_AР [85]. Основываясь на этих данных, мы построили модель $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ГАМК_AР по гомологии со структурой открытого 3JAE $\alpha 1$ ГлиР [67], а также использовали структуру 6HUP десенситизированного $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМКАР [86]. Мы установили, что размер и геометрия трансмембранных $\beta(+)/\alpha(-)$ -интерфейсов в части, включающей сайт связывания общих анестетиков и фенаматов, в открытом и десенситизированном рецепторе хорошо совпадают.

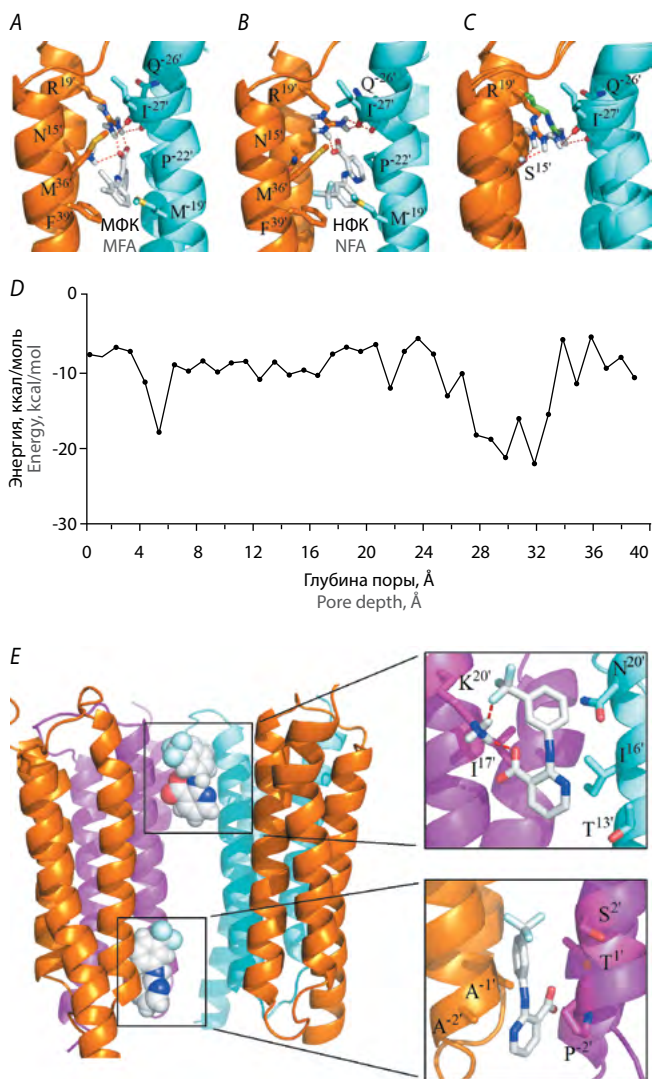


Рис. 4. Потенциация и торможение ГАМК_AР фенаматами. Потенцирующие сайты связывания МФК (А) и НФК (В) в β(+)/α(-)-трансмембранном интерфейсе модели α1β2γ2 ГАМК_AР, построенной по гомологии со структурой 3JAE α1 ГлиР. С — наложение моделей α1β1γ2 и α1β2γ2 ГАМК_AР в области β(+)/α(-)-интерфейса. Боковая цепь R19' в β₂-субъединице окрашена в зелёный цвет; D — энергетический профиль НФК в поре модели α1β2γ2 ГАМК_AР; E — структурные модели связывания НФК в поре в верхней и нижней частях.

На фрагментах А, В и Е показаны боковые цепи остатков, которые вносят значительный вклад (> 1 ккал/моль) в энергию лиганд-рецепторных взаимодействий. Водородные связи показаны красными пунктирными линиями. Цветовое представление субъединиц такое же, как на рис. 2.

Fig. 4. Fenamate GABA_AR potentiation and inhibition. The potentiating sites of binding meclofenamic acid (MFA; A) and niflumic acid (NFA; B) in β(+)/α(-) transmembrane interface of the α1β2γ2 GABA_AR model that is homologous to the 3JAE α1 GlyR structure. C — superposition of the α1β1γ2 and α1β2γ2 GABA_AR models in the β(+)/α(-) interface region. R19' side chain in β₂ subunit is green; D — NFA energy profile in the pore of the α1β2γ2 GABA_AR model; E — structural models of NFA binding in the pore at the upper and lower sites. A, B, and E present residue side chains that significantly contribute (>1 kcal/mol) to the energy of ligand-receptor interaction. Hydrogen bonds are depicted as red dashed lines. Color presentation of subunits complies with Fig. 2.

Структурные модели связывания МФК и НФК в β(+)/α(-)-интерфейсе ГАМК_AР показаны на рис. 4, А, В. Важную роль при связывании отрицательно заряженных при физиологических рН МФК и НФК играет взаимодействие с положительно заряженным Arg19' и полярным Asn15' остатками β₂-субъединицы, с которыми у лигандов формируются водородные связи. Фенаматы стабилизируются в сайте связывания также через ван-дер-ваальсовы взаимодействия с гидрофобными остатками β₂-M3 Met36', Phe39' и α1-M1 Pro(-22'), Met(-19'). НФК менее глубоко проникает в сайт связывания со стороны поры из-за анион-π отталкивания между тремя атомами фтора, несущими отрицательные парциальные заряды, и остатком β₂ Phe39' (рис. 4, В). В результате МФК сильнее взаимодействует с остатками Arg19' и Asn15', что, как мы покажем ниже, может влиять на потенциацию ГАМК_AР [67].

В обзоре 2021 г. мы подробно рассмотрели особенности связывания общих анестетиков и барбитуратов с потенцирующими сайтами ГАМК_AР [87]. ЭТМ, как и МФК, взаимодействует с полярным остатком β₂ Asn15' [24, 86]. ЭТМ и ПФЛ, как и фенаматы, формируют сильные ван-дер-ваальсовы связи с остатками β₂ M3 Phe39', Met36' и α1 M1 Met(-19'), Pro(-22'), Leu(-23').

ФБЛ связывается в трансмембранных γ(+)/β(-) и α(+)/β(-)-интерфейсах ГАМК_AР [24]. Сайт связывания ФБЛ гомологичен сайту общих анестетиков/фенаматов и находится на уровне остатка M2 15'. Гомологом Asn15' β₂-субъединицы является Ser в α1- и γ2-субъединицах (рис. 1, С). Структурные модели связывания ФБЛ предсказывают, что замещение Ser на Asn в позиции 15' приводит к стерическому конфликту с лигандом, что должно препятствовать его попаданию в β(+)/α(-)-интерфейс. ФБЛ стабилизирован в своих сайтах связывания в основном за счёт ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с гидрофобными остатками обеих субъединиц.

Как мы уже указывали выше, с ростом концентрации фенаматов потенцирующий эффект сменяется торможением ГАМК_AР [67]. Связывание МФК и НФК происходит в поре, на что указывают потенциал-зависимость блока и появление кратковременных хвостовых токов при диссоциации лиганда [66, 67]. Мы также продемонстрировали наличие быстрой и медленной кинетики блока, что предполагает существование нескольких сайтов связывания в поре ГАМК_AР [67]. При блокаде ГлиР НФК также связывается в поре [69].

Энергетический профиль НФК в поре модели α1β2γ2 ГАМК_AР показан на рис. 4, D. При определении блокирующих сайтов мы протягивали молекулу фенамата через пору с одновременным вращением вокруг её длинной оси и в каждой точке сетки применяли протокол МКМ для определения энергии взаимодействия лиганд-рецептор [67]. Два минимума на кривой указывают на сайты связывания НФК, расположенные в верхней и нижней частях поры (рис. 4, E).

Наши модели предсказывают, что НФК в верхнем сайте формирует водородную связь с остатком γ₂ Lys20' и взаимодействует с полярными α1 Asn20', Thr13' и гидрофобными γ₂ Ile17', α1 Ile16' остатками (рис. 4, E). В нижнем сайте преобладают ван-дер-Ваальсовы контакты между НФК и гидрофобными остатками колец -2' - 2'. Для полной окклюзии поры необходимы 2 молекулы НФК.

Возможные механизмы потенциации ГАМК_AР и ГлиР общими анестетиками, барбитуратами и фенатами

Остатки $\beta 2$ Arg19' и $\alpha 1$ Gln(-26') являются высококонсервативными среди ГАМК_AР и ГлиР, исключением является только β -субъединица ГлиР (рис. 1, С). Наши модели предсказывают важность этих остатков при потенциации ГАМК_AР фенатами. Массивная боковая цепь аргинина в открытом состоянии рецептора направлена внутрь трансмембранного $\beta(+)/\alpha(-)$ -интерфейса, образует водородные связи с кислородами основной цепи остатков Gln(-26') и Pe(-27') $\alpha 1$ -субъединицы (рис. 4, А, В) и по принципу «нога в дверь» препятствует переходу канала в закрытое состояние. Боковая цепь остатка Gln(-26') направляет боковую цепь Arg19' внутрь $\beta(+)/\alpha(-)$ -интерфейса. МФК и НФК, находясь в сайте связывания, стабилизируют положение боковой цепи Arg19' и потенцируют рецептор, увеличивая время его жизни в открытом состоянии.

Мы проанализировали направление боковых цепей этих остатков среди всех доступных в Protein Data Bank структур ГАМК_AР и ГлиР и обнаружили, что в структурах рецепторов, соответствующих открытому/десенситизированному состоянию, боковая цепь остатка Arg19' с главной/(+) стороны межсубъединичного интерфейса предпочтительно направлена в сторону интерфейса, а боковая цепь остатка Gln(-26') с дополнительной/(-) стороны интерфейса — в противоположную сторону (рис. 5, А). В структурах рецепторов, соответствующих закрытому состоянию, наблюдается обратное направление боковых цепей этих остатков (рис. 5, В).

Предложенный нами механизм позволяет объяснить специфичность эффекта потенциации ГАМК_AР фенатами по отношению к β -субъединице рецептора [65, 81]. Мы построили модель $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ ГАМК_AР и обнаружили, что боковая цепь Arg19' может быть захвачена водородными связями более короткой боковой цепью Ser15' (рис. 4, С). При этом Arg19' теряет способность образовывать водородные связи с остатками противоположной субъединицы.

Крио-ЭМ структуры 6X3V, 6X3T и 6X3W $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ГАМК_AР в связанном с ЭТМ, ПФЛ и ФБЛ состоянии не выявили взаимодействие этих лигандов с остатком Arg19' с главной/(+) стороны межсубъединичного интерфейса [24]. Мы предполагаем, что эти лиганды, заходя в свой сайт связывания со стороны мембраны, а не поры, вытесняют боковую цепь Arg19' из интерфейса, подменяя ее собой. Так, ПФЛ и ФБЛ в сайте связывания сами образует водородную связь с атомом кислорода основной цепи остатка M1 (-27') с дополнительной/(-) стороны интерфейса.

Arg19' и Gln(-26') играют важную роль в стабилизации открытого состояния гомо-олигомерных ГлиР [88, 89]. Установлено, что наследственные мутации R19'Q, R19'L и Q(-26')E являются причиной такого неврологического заболевания, как гиперэксплексия, при котором повышенный рефлекс испуга проявляется совместно с усилением мышечного тонуса в ответ на внезапные внешние раздражители [90]. А. Vode и соавт. предположили, что мутации остатка Arg19' приводят к потере возможности образования водородных связей с Gln(-26') и, как следствие, к дестабилизации открытого состояния ГлиР [88].

Общие анестетики и барбитураты потенцируют ГлиР менее эффективно по сравнению с ГАМК_AР [60]. Основываясь на

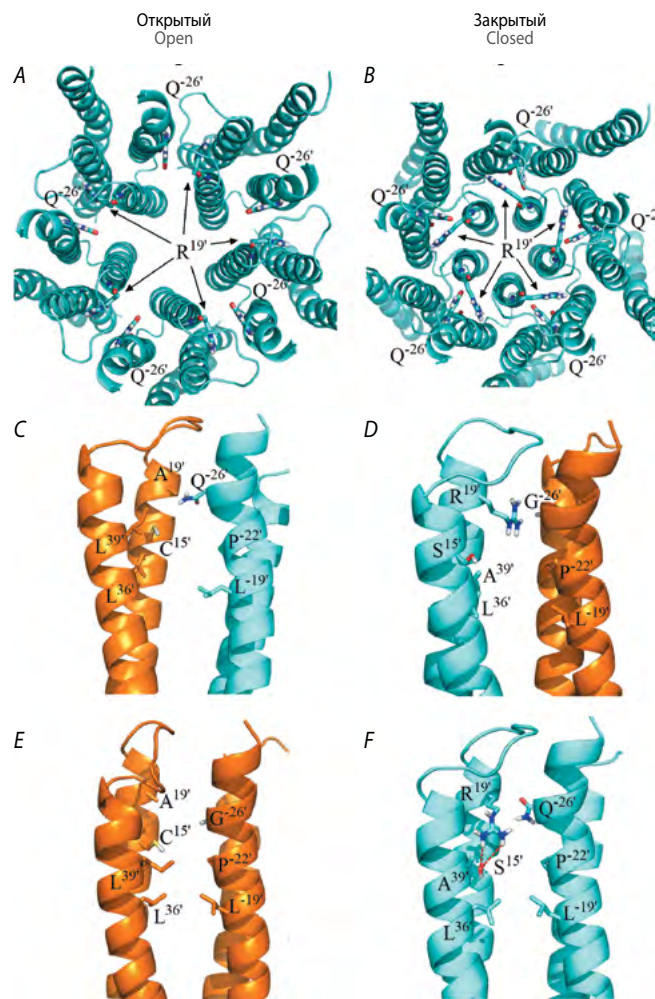


Рис. 5. Структурные детерминанты потенциации ГлиР. А, В — ТМД $\alpha 1$ ГлиР в открытом (3JAE) и закрытом (3JAD) состояниях. Показаны боковые цепи остатков R19' и Q(-26'). Структуры 3JAE и 3JAD показаны, как выложены в Protein Data Bank, без предварительной минимизации энергии. С–Е — вид из плоскости мембраны на трансмембранные $\beta(+)/\alpha(-)$ (С), $\alpha(+)/\beta(-)$ (D) and $\beta(+)/\beta(-)$ (E) интерфейсы модели $\alpha 1\beta$ ГлиР, построенной по гомологии со структурой 3JAE. Показаны участки M1–M3 спиралей и боковые цепи остатков, гомологичных участвующим в связывании МФК в $\beta(+)/\alpha(-)$ -интерфейсе $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ГАМК_AР. Водородные связи показаны красными пунктирными линиями. Отдельные субъединицы выделены сине-зеленым ($\alpha 1$) и оранжевым (β) цветами.

Fig. 5. Structural determinants of GlyR potentiation. A, B — TMD of $\alpha 1$ GlyR in open (3JAE) and closed (3JAD) states. The images present residue side chains R19' and Q(-26'). 3JAE and 3JAD structures are shown as they are laid out in Protein Data Bank without preliminary energy minimization. C–E — view of the transmembrane $\beta(+)/\alpha(-)$ (C), $\alpha(+)/\beta(-)$ (D), and $\beta(+)/\beta(-)$ (E) interfaces of the $\alpha 1\beta$ GlyR model in the membrane plane that are homologous to the 3JAE structure. The figure presents the parts of the M1–M3 helices and the residue side chains that are homologous to those involved in MFA binding on the $\beta(+)/\alpha(-)$ interface of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A R. Hydrogen bonds are depicted as red dashed lines. Some subunits are highlighted in cyan ($\alpha 1$) and orange (β).

предложенном нами молекулярном механизме потенциации, мы проанализировали структуру межсубъединичных интерфейсов $\alpha 1$ и $\alpha 1\beta$ ГлиР. В $\alpha\beta$ ГлиР (с соотношением субъединиц 2 : 3) существуют три типа межсубъединичных интерфейсов: $\beta(+)/\alpha(-)$, $\alpha(+)/\beta(-)$ и $\beta(+)/\beta(-)$ [12].

Мы построили модель гетеро-олигомерного $\alpha\beta$ ГлиР по гомологии со структурой ЗЖАЕ $\alpha 1$ ГлиР. Интересно отметить, что β -субъединица ГлиР в области M2-сегмента имеет необычно низкую гомологию по отношению к другим субъединицам ГАМК_AР и ГлиР (рис. 1, С). В $\beta(+)/\alpha(-)$ - и $\beta(+)/\beta(-)$ -интерфейсах ГлиР в позициях 15' и 19' β -субъединицы с главной/(+) стороны интерфейса находятся Cys и Ala соответственно (рис. 5, С, Е). Боковая цепь Ala19' не может выполнять функцию стабилизации открытого состояния рецептора по принципу «нога в дверь». В $\alpha(+)/\beta(-)$ -интерфейсе позицию 19' $\alpha 1$ -субъединицы занимает Arg, однако в β -субъединице в позиции -26' находится Gly (рис. 5, D). Боковая цепь глицина, представленная одним атомом водорода, не может ограничивать подвижность боковой цепи аргинина, для которого оказывается энергетически более выгодным повернуть боковую цепь в сторону анион-проводящей поры.

Гомо-олигомерный $\alpha 1-3$ ГлиР имеет 5 одинаковых $\alpha(+)/\alpha(-)$ -интерфейсов, в которых в позициях 19' и -26' с (+)- и (-)-стороны интерфейса находятся Arg и Gln соответственно (рис. 1, С). Однако в позиции 15' находится Ser. Как мы показали выше, Ser может захватить боковую цепь Arg через образование водородных связей (рис. 5, F) и таким образом сделать потенцирующее действие положительных аллостерических модуляторов менее эффективным.

У $\alpha\beta$ ГлиР отсутствуют структурные детерминанты, необходимые для потенциации через трансмембранные межсубъединичные интерфейсы. Однако проблема со стехиометрическим соотношением субъединиц в $\alpha\beta$ ГлиР не разрешена окончательно. Ранее сообщалось о возможности сборки $\alpha\beta$ ГлиР со стехиометрией субъединиц 3 : 2 [91, 92], также опубликована крио-ЭМ структура рецептора с соотношением субъединиц 4 : 1 [14]. В этом случае у ГлиР появляются один или несколько $\alpha(+)/\alpha(-)$ -интерфейсов, через которые может осуществляться потенциация в соответствии с предложенным нами механизмом.

Заключение

ГАМК_AР и ГлиР являются мишенью для различных групп препаратов, действующих как положительные или отрицательные аллостерические модуляторы. В настоящем обзоре на основе анализа собственных и литературных данных мы рассмотрели основные характеристики связывания и возможные механизмы действия НКА, общих анестетиков, барбитуратов и фенаматов, которые оказывают модулирующее действие через ТМД. В эти группы веществ входят клинически важные препараты. Более глубокое понимание структурных закономерностей и молекулярных механизмов взаимодействия этих агентов с ГАМК_AР и ГлиР будет способствовать разработке новых лекарств для лечения различных неврологических и психических заболеваний и минимизации их побочных эффектов.

Список источников / References

- Webb T.I., Lynch J.W. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr. Pharm. Des.* 2007; 13(23): 2350–2367. DOI: 10.2174/138161207781368693
- Braat S., Kooy R.F. The GABA_A receptor as a therapeutic target for neurodevelopmental disorders. *Neuron.* 2015; 86(5): 1119–1130. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.03.042
- 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
- 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
- Hille B. Ionic channels of excitable membrane. 3 ed. Sunderland; 2001.
- Jones A.K., Sattelle D.B. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics.* 2007; 8: 327. DOI: 10.1186/1471-2164-8-327
- Corringer P.J., Baaden M., Bocquet N. et al. Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues. *J. Physiol.* 2010; 588(Pt 4): 565–572. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.183160
- Jaitoh M., Taly A., Henin J. Evolution of pentameric ligand-gated ion channels: pro-loop receptors. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151934. DOI: 10.1371/journal.pone.0151934
- 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
- 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
- Aroeira R.I., Ribeiro J.A., Sebastiao A.M. et al. Age-related changes of glycine receptor at the rat hippocampus: from the embryo to the adult. *J. Neurochem.* 2011; 118(3): 339–353. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07197.x
- Dutertre S., Becker C.M., Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(48): 40216–40223. DOI: 10.1074/jbc.R112.408229
- Jonsson S., Morud J., Pickering C. et al. Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development. *Brain Res.* 2012; 1446: 12–21. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.01.050
- Yu H., Bai X.C., Wang W. Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors. *Neuron.* 2021; 109(17): 2707–2716 e2706. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.08.019
- Miller P.S., Smart T.G. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2010; 31(4): 161–174. DOI: 10.1016/j.tips.2009.12.005
- Sauguet L., Shahsavari A., Poitevin F. et al. Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(3): 966–971. DOI: 10.1073/pnas.1314997111
- 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
- Breitinger U., Breitinger H.G. Modulators of the inhibitory glycine receptor. *ACS Chem. Neurosci.* 2020. 11(12): 1706–1725. DOI: 10.1021/acscchemneuro.0c00054
- 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.tibs.2021.01.011
- Miller P.S., Aricescu A.R. Crystal structure of a human GABA_A receptor. *Nature.* 2014; 512(7514): 270–275. DOI: 10.1038/nature13293
- Du J., Lu W., Wu S. et al. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature.* 2015; 526(7572): 224–229. DOI: 10.1038/nature14853
- Huang X., Chen H., Michelsen K. et al. Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine. *Nature.* 2015; 526(7572): 277–280. DOI: 10.1038/nature14972
- Laverty D., Desai R., Uchanski T. et al. Cryo-EM structure of the human $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A receptor in a lipid bilayer. *Nature.* 2019; 565(7740): 516–520. DOI: 10.1038/s41586-018-0833-4
- 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
- Rossokhin A.V., Zhorov B.S. Side chain flexibility and the pore dimensions in the GABA_A receptor. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2016; 30(7): 559–567. DOI: 10.1007/s10822-016-9929-9
- Rossokhin A.V. Homology modeling of the transmembrane domain of the GABA_A receptor. *Biophysics.* 2017; 62(5): 708–716. DOI: 10.1134/s0006350917050190

27. 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
28. Gielen M., Corringer P.J. The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *J. Physiol.* 2018; 596(10): 1873–1902.
DOI: 10.1113/JP275100
29. Chovancova E., Pavelka A., Benes P. et al. CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS Comput. Biol.* 2012; 8(10): e1002708.
DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002708
30. Hilf R. J., Dutzler R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*. 2008; 452(7185): 375–379.
DOI: 10.1038/nature06717
31. Bocquet N., Nury H., Baaden M. et al. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature*. 2009; 457(7225): 111–114.
DOI: 10.1038/nature07462
32. Hibbs R.E., Gouaux E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*. 2011; 474(7349): 54–60.
DOI: 10.1038/nature10139
33. Shannon R.D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A*. 1976; 32(5): 751–767.
DOI: 10.1107/s0567739476001551
34. Lang P.F., Smith B.C. Ionic radii for Group 1 and Group 2 halide, hydride, fluoride, oxide, sulfide, selenide and telluride crystals. *Dalton Trans.* 2010; 39(33): 7786–7791.
DOI: 10.1039/c0dt00401d
35. Conway D.E. Ionic hydration in chemistry and biophysics. New York; 1981.
36. Michalowski M.A., Kraszewski S., Mozrymski J.W. Binding site opening by loop C shift and chloride ion-pore interaction in the GABA_A receptor model. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017; 19(21): 13664–13678.
DOI: 10.1039/c7cp00582b
37. Yang Z., Cromer B.A., Harvey R.J. et al. A proposed structural basis for picrotoxin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J. Neurochem.* 2007; 103(2): 580–589.
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04850.x
38. Wang D.S., Mangin J.M., Moonen G. et al. Mechanisms for picrotoxin block of alpha2 homomeric glycine receptors. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(7): 3841–3855.
DOI: 10.1074/jbc.M511022200
39. Bali M., Akabas M.H. The location of a closed channel gate in the GABA_A receptor channel. *J. Gen. Physiol.* 2007; 129(2): 145–159.
DOI: 10.1085/jgp.200609639
40. Chang Y., Weiss D.S. Site-specific fluorescence reveals distinct structural changes with GABA receptor activation and antagonism. *Nat. Neurosci.* 2002; 5(11): 1163–1168.
DOI: 10.1038/nn926
41. Goutman J.D., Calvo D.J. Studies on the mechanisms of action of picrotoxin, quercetin and pregnanolone at the GABA rho 1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 141(4): 717–727.
DOI: 10.1038/sj.bjp.0705657
42. Xu M., Covey D.F., Akabas M.H. Interaction of picrotoxin with GABA_A receptor channel-lining residues probed in cysteine mutants. *Biophys. J.* 1995; 69(5): 1858–1867.
DOI: 10.1016/s0006-3495(95)80056-1
43. Chen L., Durkin K.A., Casida J.E. Structural model for gamma-aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structures fit the same site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(13): 5185–5190.
DOI: 10.1073/pnas.0600370103
44. Sedelnikova A., Erkkila B.E., Harris H. et al. Stoichiometry of a pore mutation that abolishes picrotoxin-mediated antagonism of the GABA_A receptor. *J. Physiol.* 2006; 577(2): 569–577.
DOI: 10.1113/jphysiol.2006.120287
45. Zhorov B.S., Bregestovski P.D. Chloride channels of glycine and GABA receptors with blockers: Monte Carlo minimization and structure-activity relationships. *Biophys. J.* 2000; 78(4): 1786–1803.
DOI: 10.1016/s0006-3495(00)76729-4
46. Erkkila B.E., Sedelnikova A.V., Weiss D.S. Stoichiometric pore mutations of the GABA_A reveal a pattern of hydrogen bonding with picrotoxin. *Biophys. J.* 2008; 94(11): 4299–4306.
DOI: 10.1529/biophysj.107.118455
47. Tokutomi N., Agopyan N., Akaie N. Penicillin-induced potentiation of glycine receptor-operated chloride current in rat ventro-medial hypothalamic neurones. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 106(1): 73–78.
DOI: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14295.x
48. Kumamoto E., Murata Y. Action of furosemide on GABA- and glycine currents in rat septal cholinergic neurons in culture. *Brain Res.* 1997; 776: 246–249.
DOI: 10.1016/s0006-8993(97)01083-4
49. Kolbaev S.N., Sharonova I.N., Vorobjev V.S. et al. Mechanisms of GABA_A receptor blockade by millimolar concentrations of furosemide in isolated rat Purkinje cells. *Neuropharmacology*. 2002; 42(7): 913–921.
DOI: 10.1016/s0028-3908(02)00042-4
50. Rossokhin A.V., Sharonova I.N., Bukanova J.V. et al. Block of GABA receptor ion channel by penicillin: Electrophysiological and modeling insights toward the mechanism. *Mol. Cell Neurosci.* 2014; 63: 72–82.
DOI: 10.1016/j.mcn.2014.10.001
51. Curtis D.R., Game C.J., Johnston G.A. et al. Convulsive action of penicillin. *Brain Res.* 1972; 43(1): 242–245.
DOI: 10.1016/0006-8993(72)90288-0
52. Chow K.M., Hui A.C., Szeto C.C. Neurotoxicity induced by beta-lactam antibiotics: from bench to bedside. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 24(10): 649–653.
DOI: 10.1007/s10096-005-0021-y
53. Neher E., Steinbach J.H. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J. Physiol.* 1978; 277: 153–176.
DOI: 10.1113/jphysiol.1978.sp012267
54. Vorobjev V.S., Sharonova I.N. Tetrahydroaminoacridine blocks and prolongs NMDA receptor-mediated responses in a voltage-dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 253(1–2): 1–8.
DOI: 10.1016/0014-2999(94)90750-1
55. 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
56. 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
57. 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
58. Franks N.P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 1: S72–S81.
DOI: 10.1038/sj.bjp.0706441
59. Loscher 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
60. Pistis M., Bellelli D., Peters J.A. et al. The interaction of general anaesthetics with recombinant GABA_A and glycine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes: a comparative study. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 122(8): 1707–1719.
DOI: 10.1038/sj.bjp.0701563
61. Germann A.L., Shin D.J., Manion B.D. et al. Activation and modulation of recombinant glycine and GABA_A receptors by 4-halogenated analogues of propofol. *Br. J. Pharmacol.* 2016; 173(21): 3110–3120.
DOI: 10.1111/bph.13566
62. Frolich M., Lachinsky N., Moolenaar A.J. The influence of combined cyproterone acetate-ethinyl oestradiol therapy on serum levels of dehydroepiandrosterone, androstenedione, and testosterone in hirsute women. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*. 1977; 84(2): 333–342.
DOI: 10.1530/acta.0.0840333
63. Woodward R.M., Polenzani L., Milei R. Effects of fenamates and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat brain GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; 268(2): 806–817.
64. 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
65. Halliwell R.F., Thomas P., Patten D. et al. Subunit-selective modulation of GABA_A receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11(8): 2897–2905.
DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00709.x
66. Sharonova I.N., Dvorzhak A.Y. Blockade of GABA_A receptor channels by niflumic acid prevents agonist dissociation. *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biol.* 2013; 7(1): 37–44.
DOI: 10.1134/s1990747812050169
67. 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
68. Coyne L., Su J., Patten D. et al. Characterization of the interaction between fenamates and hippocampal neuron GABA_A receptors. *Neurochem. Int.* 2007; 51(6–7): 440–446.
DOI: 10.1016/j.neuint.2007.04.017
69. Maleeva G., Peiretti F., Zhorov B.S. et al. Voltage-dependent inhibition of glycine receptor channels by niflumic acid. *Front. Mol. Neurosci.* 2017; 10: 125.
DOI: 10.3389/fnmol.2017.00125
70. 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
71. 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

72. 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.
73. Lu H., Xu T.L. The general anesthetic pentobarbital slows desensitization and deactivation of the glycine receptor in the rat spinal dorsal horn neurons. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(44): 41369–41378. DOI: 10.1074/jbc.M206768200
74. 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
75. Wakita M., Kotani N., Akaike N. Effects of propofol on glycinergic neurotransmission in a single spinal nerve synapse preparation. *Brain Res.* 2016; 1631: 147–156. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.030
76. Parker I., Gundersen C.B., Miledi 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
77. 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
78. Kitamura A., Sato R., Marszalec W. et al. Halothane and propofol modulation of gamma-aminobutyric acid A receptor single-channel currents. *Anesth. Analg.* 2004; 99(2): 409–415. DOI: 10.1213/01.ANE.0000131969.46439.71
79. Dvorzhak A.Y. Effects of fenamate on inhibitory postsynaptic currents in Purkinje's cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145(5): 564–568. DOI: 10.1007/s10517-008-0144-0
80. 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: 11031–11036. DOI: 10.1073/pnas.94.20.11031
81. Smith A.J., Oxley B., Malpas S. et al. Compounds exhibiting selective efficacy for different beta subunits of human recombinant gamma-aminobutyric acid A receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 311(2): 601–609. DOI: 10.1124/jpet.104.070342
82. 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
83. Krasowska M.D., Nishikawa K., Nikolaeava 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
84. 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
85. Laurie D.J., Seeburg P.H., Wisden W. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J. Neurosci.* 1992; 12(3): 1063–1076. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.12-03-01063.1992
86. Rossokhin A. The general anesthetic etomidate and fenamate mefenamic acid oppositely affect GABA_A and GlyR: a structural explanation. *Eur. Biophys. J.* 2020; 49(7): 591–607. DOI: 10.1007/s00249-020-01464-7
87. Rossokhin A.V., Sharonova I.N. Structural pharmacology of GABA_A receptors. *Ann. Clin. Exp. Neurol.* 2021; 15(4): 44–53. DOI: 10.54101/acen.2021.4.5
88. Bode A., Lynch J.W. Analysis of hyperekplexia mutations identifies transmembrane domain rearrangements that mediate glycine receptor activation. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(47): 33760–33771. DOI: 10.1074/jbc.M113.513804
89. Scott S., Lynch J.W., Keramidas A. Correlating structural and energetic changes in glycine receptor activation. *J. Biol. Chem.* 2015; 290(9): 5621–5634. DOI: 10.1074/jbc.M114.616573
90. Bode A., Lynch J.W. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol. Brain.* 2014; 7: 2. DOI: 10.1186/1756-6606-7-2
91. Durisic N., Godin A.G., Wever C.M. et al. Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J. Neurosci.* 2012; 32(37): 12915–12920. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2050-12.2012
92. Low S.E., Ito D., Hirata H. Characterization of the zebrafish glycine receptor family reveals insights into glycine receptor structure function and stoichiometry. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 11: 286. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00286

Информация об авторах

Россохин Алексей Владимирович — к.ф.-м.н., в.н.с. лаб. функциональной синнаптологии Института мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7024-7461>

Information about the authors

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