

ГАМК_A-РЕЦЕПТОР КАК МИШЕНЬ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Иванов И.М.¹, Орлова А.Б.¹, Никифоров А.С.¹, Карташев В.А.¹, Юдин М.А.^{1,2}, Чепур С.В.¹

¹ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины» Министерства обороны Российской Федерации,

195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4

e-mail: gniiivm_15@mil.ru

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.
Мечникова» Минздрава Российской Федерации,

195067, г. Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, д. 47

e-mail: rectorat@szgmu.ru

Резюме. В обзоре рассмотрены строение, функционирование и особенности сайтов связывания лигандов с рецептором гамма-аминомасляной кислоты типа A (далее – ГАМК_AР) во внеклеточном и трансмембранном домене рецептора. Проанализированы доступные комплексы ГАМК_AР с ортосетрическими агонистами (ГАМК, THIP, гистамин) и антагонистами (бикукуллин), лигандами бензодиазепинового сайта (золпилом, диазепам, DMCD, флумазенил и Ro154513), барбитуратного сайта (фенобарбитал), сайтов общих анестетиков (этомидат, пропофол) и нейростероидами. Проведен частотный анализ паттернов взаимодействия этих лигандов с аминокислотными остатками мишеней и сравнение особенностей взаимодействия с ними агонистов и антагонистов. Визуализованы области связывания лигандов разных типов и оценено их взаиморасположение на рецепторе. Оценена возможность использования доступных трехмерных моделей ГАМК_AР в качестве мишеней для поиска новых лигандов с ГАМКергической активностью методами молекулярного моделирования и докинга.

Ключевые слова: ГАМК, ГАМК_A-рецептор, сайт связывания, бензодиазепины, барбитураты, общие анестетики, нейростероиды.

GABAA-RECEPTOR AS A TARGET FOR NEW DRUGS DEVELOPMENT

Ivanov I.M.¹, Orlova A.B.¹, Nikiforov A.S.¹, Kartashev V.A.¹, Yudin M.A.^{1,2}, Chepur S.V.¹

¹*Federal State Budgetary Establishment «State Scientific Research Test Institute of the military medicine» Defense Ministry of the Russian Federation, Russia 195043, Saint Petersburg, Lesoparkovaya street, house 4*

Tel. 8(812) 527-39-57, e-mail: gniiivm_15@mil.ru

²*Federal State-Funded Education Institution of Higher Professional Education North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov (NWSMU), Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 195067, St. Petersburg, Piskarevsky prospect, 47, tel. (812)303-50-00, e-mail: rectorat@szgmu.ru*

Abstract. The review examines the structure, functioning and features of ligand binding sites for the gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR) in the extracellular and transmembrane domain of the receptor. Available GABAAR complexes with orthosteric agonists (GABA, THIP, histamine) and antagonists (bicuculline), benzodiazepine site ligands (zolpidem, diazepam, DMCD, flumazenil and Ro154513), barbiturate site (phenobarbital), general anesthetic sites (etomidate, propofol) and neurosteroids were analyzed. A frequency analysis of the patterns of interaction of these ligands with target amino acid residues and a comparison of the characteristics of the interaction of agonists and antagonists with them were carried out. The binding regions of different types of ligands were visualized and their relative positions on the receptor were assessed. The possibility of using available three-dimensional GABAAR models as targets for searching for new ligands with GABAergic activity using molecular modeling and docking methods was assessed.

Keywords: GABA, GABAA-receptor, binding site, benzodiazepines, barbiturates, general anesthetics, neurosteroids.

Введение. Ионотропные рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК_A-рецепторы, ГАМК_AР) представляют собой лиганд-зависимые ионные каналы, экспрессирующиеся на пре- и постсинаптической мембране нервных клеток. Они проницаемы для ионов хлора и бикарбонатов, а их активация опосредует торможение передачи нервного импульса. Нарушения функционирования ГАМК-ергической системы играют существенную роль в патогенезе таких заболеваний и состояний, как тревожность и аффективные расстройства, шизофрения, расстройства аутистического спектра, депрессия и эпилепсия. При отравлении рядом токсикантов эта система имеет важнейшее значение как в реализации судорожного синдрома, так и в качестве основной мишени для противосудорожных средств. Структурная и функциональная сложность ГАМК_AР, который, помимо места, связывающего ГАМК, содержит аллостерические сайты, способные связывать бензодиазепины, барбитураты, спирты и общие анестетики, нейростероиды и судорожные агенты, а также его широкая вовлеченность в патогенез заболеваний и поражений центральной нервной системы (далее – ЦНС), делает эту белковую структуру привлекательной мишенью для разработки новых лекарственных средств из числа антиконвульсантов, анксиолитиков и седативных препаратов. Прогресс в области молекулярного моделирования и виртуального скрининга лекарственных препаратов на основе знаний о структуре мишени в известной степени облегчает первичный отбор соединений-кандидатов, в первую очередь, за счет применения методов молекулярного докинга. В тоже время структурная гетерогенность изоформ субъединиц рецептора, обилие сайтов связывания и комплексный характер внутрирецепторного, а также межрецепторного взаимодействия лигандов предъявляют повышенные требования к качеству и объему исходных данных о структуре мишени, строении сайтов связывания, характере взаимодействия лигандов с аминокислотными остатками, формирующими эти сайты. Наиболее полные данные по лиганд-рецепторным взаимодействиям представляют трехмерные структуры высокого разрешения (1-3 ангстрем и менее) комплексов рецептора с лигандом, получаемые методами криоэлектронной микроскопии, рентгенструктурного анализа и ядерно-магнитного резонанса. До недавнего времени в общедоступной литературе такие комплексы для ГАМК_AР отсутствовали, а источником данных о сайтах связывания лигандов, в основном, служили методы направленного мутагенеза и фотореактивных меток. Существенный прогресс в получении высокодетализированных трехмерных моделей комплексов ГАМК_AР с лигандами (агонистами и антагонистами сайта ГАМК, бензодиазепинами, барбитуратами, нейростероидами, общими анестетиками и блокаторами хлор-ионного канала) с одной стороны, с одной стороны, позволил расширить представления об особенностях связывания лигандов и сопоставить эти данные с результатами предшествующих косвенных оценок (мутагенез, фотореактивные метки), а с другой стороны, обеспечил прирост эффективности

виртуального скрининга лекарственных препаратов за счет качественно новых знаний о структуре мишени.

Цель настоящего исследования состояла в проведении анализа доступных комплексов ГАМК_AР с лигандами и уточнении особенностей строения сайтов рецептора и характера связывания с ними лигандов ГАМК_AР, позволяющих проводить поиск новых лекарственных средств методами молекулярного моделирования и докинга.

Материалы и методы. В исследовании выполнен анализ данных публикаций, посвященных структурным и функциональным особенностям сайтов связывания лигандов ГАМК_AР для определения мишеней, перспективных для использования в виртуальном скрининге новых лекарственных средств.

Результаты. *Общая характеристика рецепторов.* ГАМК_A-рецепторы относят к числу лиганд-зависимых рецепторов, проницаемых для ионов хлора и бикарбонатов [1]. Функционально ГАМК_AР состоит из пяти субъединиц, которые могут быть представлены 19 известными на сегодняшний день подтипами: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , и ρ_{1-3} . Вариативность субъединичного состава ГАМК_AР определяет их структурную и функциональную гетерогенность и различия в чувствительности к лигандам [2]. Наиболее распространённым в ЦНС подтипами субъединиц считают α_1 , β_{1-3} , и γ_2 , менее распространёнными δ , ϵ , π и θ [3]. Некоторые подтипы субъединиц и их сочетания характеризуются специфичными паттернами распространения в областях ЦНС, а также на синаптическом уровне [1]. Например, ГАМК_AР, содержащие α_{1-3} , β_{1-3} и γ_2 субъединицы, имеют преимущественно синаптическую локализацию, тогда как α_{4-6} и δ -содержащие – внесинаптическую [4]. Функциональное различие этих сочетаний субъединиц заключается в том, что синаптические ГАМК_AР опосредуют быстрые ингибирующие постсинаптические потенциалы, в то время как внесинаптические – стойкое тоническое торможение. К внесинаптическим типам ГАМК_AР отнесены композиции субъединиц $\alpha\beta$, $\alpha_4\beta\delta$, $\alpha_6\beta\delta$ и $\alpha_5\beta\gamma$ [5]. Установлено, что мутации в этих подтипах связаны с эпилепсией и бессонницей [6], а функционально они вовлечены в патогенез бессонницы, инсульта, синдромов Ангельмана и Мартина-Белл [7], постродовой депрессии, а также в формировании долговременной памяти [8], что определяет их существенное значение внесинаптических ГАМК_AР при рассмотрении мишеней для разработки новых лекарственных средств, несмотря на малое (в количественном выражении) распространение в ЦНС.

Локализация и функциональное значение различных субъединичных композиции ГАМК_AР. По существующим представлениям, большинство ГАМК_AР в головном мозге млекопитающих представлены пентамерами со следующим сочетанием субъединиц: две α_1 , две β_2 (или две β_3) и одна γ . Большинство рецепторов, содержащих не- α_1 субъединицу (т.е.

любую от α_2 до α_6), как правило, содержит только одну α -субъединицу. Обычно рецепторы, содержащие α - и γ -субъединицы, сохраняют консервативную стехиометрию состава, а именно $(\alpha)2(\beta)2(\gamma)1$. При этом взаиморасположение субъединиц в рецепторе идет по последовательности $\alpha1\gamma2\beta2\alpha1\beta2$ против часовой стрелки (вид изнутри клетки), тоже справедливо для рецепторов с β_3 и γ_1 и γ_3 субъединицами.

Состав рецепторов, содержащих δ -субъединицу, менее изучен. Показано, что они существуют в ансамбле с α_4 , α_6 и α_1 и любыми β -субъединицами. Наиболее вероятным считают сочетание $(\alpha)2(\beta)2(\delta)1$ [9]. Другие виды субъединиц практически не исследованы. К числу однозначно идентифицированных в ЦНС типов ГАМК_AР в настоящее время относят $\alpha1\beta2\gamma2$, $\alpha1\beta\gamma2$, $\alpha3\beta\gamma2$, $\alpha4\beta\gamma2$, $\alpha4\beta2\delta$, $\alpha4\beta3\delta$, $\alpha5\beta\gamma2$, $\alpha6\beta\gamma2$, $\alpha6\beta2\delta$, $\alpha6\beta3\delta$ и ρ [1]. Основные варианты субъединичного состава ГАМК_AР представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Основные известные варианты субъединичного состава ГАМК_AР, их распространенность, функциональное значение и особенности локализации в ЦНС [10]

Тип	Распространенность	Функциональное значение	Особенности локализации в ЦНС
$\alpha1\beta2\gamma2$	Основной набор субъединиц (до 60 % всех ГАМК _A Р)	Опосредуют седативный, амнестический и (в большей степени) противосудорожный эффект бензодиазепинов	Широко представлены в разных областях мозга, синаптические и внесинаптические
$\alpha2\beta3\gamma2$	«Минорный» набор (до 15-20 %)	Опосредует анксиолитическое действие бензодиазепинов	Широко представлены в разных областях мозга, в основном синаптические и внесинаптические
$\alpha3\beta(2,3)\gamma2$	«Минорный» набор (до 15-20 %)	Опосредует анксиолитическое действие бензодиазепинов (при высоких концентрациях лиганда)	Широко представлены в разных областях мозга, в основном синаптические. Внесинаптические в некоторых клетках миндалины и нижнего оливного ядра
$\alpha4\beta(2,3)\delta$	Редкий набор (менее 5 %)	Нечувствительны к классическим бензодиазепинам	Распространены в зубчатой извилине, таламусе, в основном внесинаптические
$\alpha5\beta3\gamma2$	Редкий набор (менее 5 %)	Опосредуют улучшение памяти, вызванный частичными обратными агонистами бензодиазепинового сайта	Наибольшее содержание в гиппокампе, существенно меньше в других отделах мозга. Внесинаптические в гиппокампе, коре мозжечка. Синаптические и внесинаптические в других структурах мозга
$\alpha6\beta(2,3)\gamma2$; $\alpha6\beta(2,3)\delta$	Редкий набор (менее 5 %).	Нечувствительны к классическим бензодиазепинам	Распространены в мозжечке с синаптическим и внесинаптическим расположением

Общая характеристика сайтов связывания лигандов. На ГАМК_AР локализован ряд сайтов связывания лигандов, в первую очередь – это ортостерический сайт связывания ГАМК и конкурентных агонистов/антагонистов – мусцимола, габоксадола, бикикулина и др. Кроме того обнаруживаются отдельные аллостерические сайты связывания бензодиазепинов, небензодиазепиновых лигандов, нейростероидов, спиртов, барбитуратов, общих анестетиков, блокаторов хлор-ионного канала (ХИК).

В рецепторе выделяют внеклеточную область (ECD-домен), трансмембранную область (TMD-домен) и внутриклеточную область (ICD-домен). Ортостерический сайт связывания ГАМК и конкурентных агонистов/антагонистов расположен в ECD-домене, как и высокоаффинный сайт связывания бензодиазепинов и некоторых небензодиазепиновых лигандов. В TMD-домене локализованы низкоаффинные сайты связывания бензодиазепинов и сайты связывания других вышеперечисленных лигандов. В ICD-домене сайты связывания лигандов в настоящее время не обнаружены (рисунок 1).

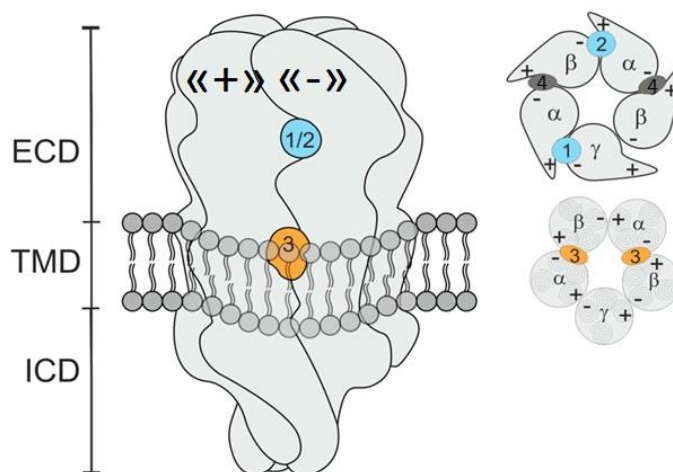


Рисунок 1. Общая структура ГАМК_AР. ECD – внеклеточный домен, TMD – трансмембранный домен, ICD – внутриклеточный домен.

Примечания:

- 1 – высокоаффинный сайт связывания бензодиазепинов (« α +/ γ »-интерфейс);
- 2 – сайт связывания некоторых небензодиазепиновых лигандов (в т.ч. пирозолхинолинонов) (« α +/ β »-интерфейс);
- 3 – сайт связывания этомидата, пропофола и низкоаффинный сайт бензодиазепинов (« β +/ α »-интерфейс в трансмембранном домене);
- 4 – сайт связывания ГАМК и конкурентных агонистов/антагонистов (« β +/ α » – интерфейс)

Сайты связывания лигандов ГАМК_AР, как правило, локализованы между двумя соседними субъединицами. При классификации этих сайтов принято указывать основную субъединицу, формирующую сайт, как «+» и комплементарную ей вспомогательную субъединицу как «-», а область между двумя субъединицами – как «+/-» или «-/+»-интерфейс. Учитывая, что субъединиц каждого типа в рецепторе может быть две и более, такой подход

позволяет однозначно идентифицировать локализацию рассматриваемой области связывания на рецепторе.

Характеристика ортостерического сайта связывания ГАМК и конкурентных агонистов/антагонистов. Сайт связывания ГАМК локализован в ECD-домене рецептора и расположен в « β^+/α^- »-интерфейсе, сформированном основной частью β -субъединицы и комплиментарной ей частью между α -субъединицы. В рецепторе насчитывается 2 сайта связывания ГАМК, которые идентичны по трехмерной структуре и по специфичности связывания лигандам. В то же время различия в чувствительности этих сайтов к лигандам наблюдаются в зависимости от присутствия в рецепторе γ - или δ -субъединиц [11].

При связывании ГАМК с одним из ортостерических сайтов происходит открытие канала рецептора, при этом взаимодействие с обоими сайтами существенно облегчает этот процесс [12]. В классическом сайте связывания ГАМК, расположенном в интерфейсе « β^+/α^- », аминокислотная группа ГАМК формирует водородные связи с остатками Tyr ($\beta 157$), Glu ($\beta 155$), Tyr ($\beta 97$) и π -катионные взаимодействия с Tyr ($\beta 205$), тогда как карбоксильная группа образует водородные связи с остатками Thr ($\alpha 129$) и Thr ($\beta 202$) и солевой мостик с Arg ($\alpha 66$). В ряде исследований показано, что ГАМК также может формировать π -катионные взаимодействия с остатком Tyr ($\beta 97$) вместо остатка Tyr ($\beta 205$) [13]. Остатки Tyr ($\beta 97$) и Glu ($\beta 155$), характерные только для β -субъединиц (в сравнении с соответствующими позициями α - и γ -субъединицах), в сочетании с Arg ($\alpha 66$) считают обязательными для связывания лигандов сайта ГАМК [14]. Замены высококонсервативного для α , β и γ -субъединиц остатка Tyr($\beta 157$) существенно снижают аффинность лигандов сайта ГАМК [15].

Для ГАМК_AR характерен феномен, когда определенный (как правило, редкий) субъединичный состав формирует дополнительные сайты связывания для отдельных лигандов. Например, соединение ТНП(4,5,6,7-тетрагидроизоксазол[5,4-с]пиридин-3-он, габоксадол), рассматриваемое для лечения бессонницы, в комплексе с ГАМК_AR состава $\alpha_4\beta_3\delta(\beta\alpha\delta\beta\beta)$ связывается как в «классическом» интерфейсе « β^+/α^- », так и в гомологичной области « δ^+/β^- »-интерфейса [16, 17]. Доказанный факт связывания этого агониста с двумя различными сайтами ГАМК_AR объясняет предыдущие наблюдения, в которых ТНП демонстрировал наибольшую эффективность в отношении рецепторов типа « $\alpha_4\beta_3\delta$ » в сравнении с другими сочетаниями субъединиц [18, 19]. Дальнейший анализ взаимодействия агониста с рецептором типа « $\beta_3\delta$ », в котором отсутствуют α -субъединицы и классические « β^+/α^- »-интерфейсы для связывания ГАМК (активируется гистамином, не ГАМК) указывал на связывание ТНП только в «не-классическом» интерфейсе « δ^+/β^- » [17].

Отмеченные наблюдения позволяют констатировать, что гетерогенность субъединичного состава ГАМК_AР может в ряде случаев определять мультимодальный результирующий ответ системы на введение лиганда.

Представления об аминокислотных остатках ГАМК_AР, формирующих структуру сайтов связывания лигандов, либо функционально вовлеченных в реализацию конформационных изменений рецептора после связывания с ними, по большей части, сформированы на основании данных, полученных методами направленного мутагенеза и фотореактивного мечения. В то же время наиболее точную характеристику взаимодействия лиганда с мишенью дает изучение системы лиганд-белок, проводимое методами рентген-структурного анализа, ЯМР-спектроскопии и криоэлектронной микроскопии. Сложный по структуре ГАМК_AР представляет собой трудный объект для анализа этими методами, в связи с чем число таких комплексов ограничено. Между тем именно они составляет основу для поиска новых соединений-лигандов рецептора методами молекулярного моделирования и докинга.

Средствами программного продукта PLIP [20] проводили анализ доступных в базе данных PDB Bank комплексов ГАМК_AР с лигандами ГАМК-сайта. Результаты представлены в таблицах 2-4.

Таблица 2.

Результаты анализа взаимодействия лигандов-агонистов с сайтом ГАМК в интерфейсе «β+/α-» или гомологичном интерфейсе «δ+/β-» ECD-домена

Тип рецептора [код PDB Bank], порядок субъединиц	Лиганд	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
интерфейс «β+/α-», тип α1β2γ2		
α1β2γ2 [6X3Z], βαγβα	ГАМК	α65, α118, β200, β205, β156, β202, α67
		α65, α118, β200, β205, β97, α130, β156, α67
α1β2γ2 [6D6T], βαγβα	ГАМК	α65, β157, β205, β97, β156, β202, α67
		α65, β157, β205, α130, α67
α1β2γ2 [6D6U], βαγβα	ГАМК	α65, β157, β205, α130, α67
		α65, β157, β205, β97, α67
α1β2γ2 [8DD2], βαγβα	ГАМК	α65, β156, β202, β205, α67
		α65, α118, β200, β97, β157, β205, α67
α1β2γ2 [6X3X], βαγβα	ГАМК	α65, β200, β205, β97, β156, α67
		α65, β200, β205, β156, β202, α67
α1β2γ2 [6X3U], βαγβα	ГАМК	α65, β157, β205, α130, α67
		α65, β157, β205, β97, α67
α1β2γ2 [6X40], βαγβα	ГАМК	α65, α118, β200, β205, β156, β202, α67
		α65, α118, β200, β205, β97, β156, α67
α1β2γ2 [6X3W], βαγβα	ГАМК	α65, β200, β205, α130, β156, β202, α67
		α65, α118, β200, β205, α130, β156, α67
α1β2γ2 [6X3V], βαγβα	ГАМК	β205, β97, β155, β157, α67
		α65, β205, β97, β155, β202, α67

Тип рецептора [код PDB Bank], порядок субъединиц	Лиганд	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3T] , $\beta\alpha\gamma\beta\alpha$	ГАМК	$\alpha 130, \beta 157, \beta 97, \beta 155, \beta 202, \alpha 67$
		$\alpha 118, \beta 157, \beta 205, \beta 97, \alpha 130, \alpha 67$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [8DD3] , $\beta\alpha\gamma\beta\alpha$	ГАМК	$\alpha 65, \alpha 118, \beta 200, \beta 97, \beta 156, \beta 202, \alpha 67$
		$\alpha 65, \beta 200, \beta 97, \beta 157, \alpha 67$
интерфейс « $\beta +/\alpha -$ », тип $\alpha 1\beta 3\gamma 2$		
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$ [6HUP] , $\beta\alpha\gamma\beta\alpha$	ГАМК	$\beta 157, \beta 200, \beta 205, \beta 97, \alpha 130, \beta 156, \alpha 67$
		$\alpha 65, \beta 157, \beta 205, \beta 97, \alpha 130, \beta 156, \beta 202, \alpha 67$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$ [6HUO] , $\beta\alpha\gamma\beta\alpha$	ГАМК	$\alpha 118, \beta 200, \beta 205, \alpha 130, \beta 156, \beta 202, \alpha 67$
		$\alpha 118, \beta 205, \alpha 130, \beta 156, \beta 202, \alpha 67$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$ [6HUJ] , $\beta\alpha\gamma\beta\alpha$	ГАМК	$\alpha 65, \beta 205, \alpha 130, \beta 156, \alpha 67$
		$\alpha 65, \beta 205, \alpha 130, \beta 156, \alpha 67$
интерфейс « $\beta +/\alpha -$ », тип $\alpha 1\beta 3$		
$\alpha 1\beta 3$ [7PBD] , $\alpha\alpha\beta\beta\beta$	ГАМК	$\beta 202, \beta 205, \beta 97, \beta 155, \beta 157, \alpha 67$
		$\alpha 118, \beta 200, \beta 97, \beta 156, \beta 202, \alpha 67$
$\alpha 1\beta 3$ [7PBZ] , $\alpha\alpha\beta\beta\beta$	ГАМК	$\alpha 65, \beta 200, \beta 205, \beta 97, \beta 155, \beta 157, \alpha 67$
		$\alpha 65, \alpha 118, \beta 157, \beta 205, \beta 97, \beta 155, \beta 202, \alpha 67$
интерфейс « $\beta +/\alpha -$ », тип $\alpha 4\beta 3\delta$		
$\alpha 4\beta 3\delta$ [7QNC] , $\beta\alpha\delta\beta\beta$	Габоксадол (THIP)	$\alpha 98, \beta 200, \beta 97, \alpha 100, \beta 157, \alpha 163$
$\alpha 4\beta 3\gamma 2$ [7QNA] , $\beta\beta\gamma\beta\alpha$	ГАМК	$\alpha 98, \beta 97, \beta 156, \alpha 163, \beta 202, \alpha 100$
$\alpha 4\beta 3\delta$ [7QN9] , $\beta\alpha\delta\beta\beta$	Гистамин	$\alpha 98, \beta 97, \alpha 100, \beta 155, \alpha 163$
$\alpha 4\beta 3\delta$ [7QN7] , $\beta\alpha\delta\beta\beta$	ГАМК	$\alpha 98, \beta 97, \beta 156, \alpha 163, \alpha 100$
дополнительный сайт связывания THIP на содержащих δ -субъединицу рецепторах, интерфейс « $\delta +/\beta -$ »		
$\alpha 4\beta 3\delta$ [7QNC] , $\beta\alpha\delta\beta\beta$	Габоксадол (THIP)	$\beta 62, \delta 229, \beta 43, \delta 183$
$\beta 3\delta$ [7QND] , $\beta\beta\beta\beta\delta$	Габоксадол (THIP)	$\beta 62, \delta 229, \beta 64, \delta 230$

Анализ данных таблицы 2 показывает, что наиболее исследованными на сегодняшний момент остаются рецепторы с сочетанием субъединиц $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (11 комплексов) и $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (3 комплекса), имеющие постсинаптическую локализацию и отражающие состав до 60 % всех ГАМК_AР в ЦНС. Существенно меньше примеров исследований бензодиазепин-нечувствительного внесинаптического рецептора типа $\alpha 4\beta 3\delta$ (4 комплекса), а также $\alpha 1\beta 3$ (2 комплекса) и не содержащих α -субъединицу рецепторов типа « $\beta 3\delta$ » (1 комплекс).

Обобщение частотного анализа взаимодействий лигандов-агонистов с «классическим» сайтом ГАМК в интерфейсе « $\beta +/\alpha -$ » представлено в таблице 3. При анализе установлено, что паттерны взаимодействий с лигандами-агонистами у $\alpha 1$ -содержащих подтипов ГАМК_AР были

схожими. Позицию $\alpha 67$ определяли, как обязательную, позиции $\beta 205$ и $\alpha 65$ как очень частые, позиции $\beta 97$, $\beta 157$ и $\beta 156$ как частые. Паттерны взаимодействия ГАМК и агонистов с рецепторами, содержащими $\alpha 4$ -субъединицу, формировались за счет связывания с позициями аминокислот $\alpha 98$, $\alpha 100$ и $\alpha 163$, которое не наблюдали в $\alpha 1$ -содержащих рецепторах, по-видимому, в связи с различиями в длине и структуре аминокислотной последовательности субъединиц $\alpha 1$ и $\alpha 4$ -субъединиц. Существенных различий между $\alpha 1$ и $\alpha 4$ -содержащими рецепторами по взаимодействию ГАМК и агонистов с β -субъединицей не отмечали.

Таблица 3.

Обобщение частотного анализа взаимодействий лигандов-агонистов с сайтом ГАМК в интерфейсе « $\beta +/\alpha -$ » ECD-домена

Встречаемость	Взаимодействия с лигандами-агонистами (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)				
	$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (11 комплексов)	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (3 комплекса)	$\alpha 1\beta 3$ (2 комплекса)	$\alpha 1$ -содержащие ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, $\alpha 1\beta 3$)	$\alpha 4$ -содержащие ($\alpha 4\beta 3\delta$, $\alpha 4\beta 3\gamma 2$)
единичная (эксклюзивная)	-	-	$\beta 156$	-	$\beta 200, \beta 157,$ $\beta 202, \beta 155$
<25% (редкая)	$\beta 155$	-	-	$\beta 155$	-
25-49% (распространённая)	$\alpha 118, \beta 202,$ $\alpha 130$	$\beta 157, \beta 200,$ $\beta 97, \alpha 118$	-	$\beta 202, \alpha 118,$ $\beta 200, \alpha 130$	-
50-74% (частая)	$\beta 200, \beta 156,$ $\beta 97, \beta 157$	$\alpha 65, \beta 202$	$\alpha 118, \beta 200,$ $\alpha 65$	$\beta 97, \beta 157,$ $\beta 156$	$\beta 156$
75-99% (очень частая)	$\alpha 65, \beta 205$	-	$\beta 202, \beta 205,$ $\beta 155, \beta 157$	$\beta 205, \alpha 65$	-
100% (обязательная)	$\alpha 67$	$\beta 205, \alpha 130,$ $\beta 156, \alpha 67$	$\beta 97, \alpha 67$	$\alpha 67$	$\alpha 98, \beta 97,$ $\alpha 100, \alpha 163$

Кроме классических ортостерических сайтов связывания ГАМК в интерфейсе « $\beta +/\alpha -$ » в ряде работ рассматриваются дополнительные сайты нейромедиатора в гомологичных интерфейсах, в частности в интерфейсе « $\alpha +/\beta -$ » рецептора типа $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ [6DW1] с паттерном взаимодействия с остатками $\alpha 159$, $\alpha 209$, $\beta 128$, $\alpha 206$ и в интерфейсе « $\beta +/\gamma -$ » рецептора типа $\beta 3\gamma 2$ [7QNB] с паттерном взаимодействия с позициями $\beta 205$, $\beta 97$, $\beta 156$, $\beta 202$, $\gamma 142$ [17, 21]. Ввиду малой доказательной базы (на примере единичных комплексов) и без подтверждения функционального значения этих сайтов их использование в качестве мишеней в виртуальном скрининге лекарственных средств не оправдано.

Взаимодействия лигандов-антагонистов с сайтом ГАМК в интерфейсе « $\beta +/\alpha -$ » ECD-домена ГАМК_AR менее исследованы и в настоящее время доступны только два комплекса с бикикуллином (таблица 4).

Таблица 4.

**Результаты анализа взаимодействия лигандов-антагонистов с сайтом ГАМК в
интерфейсе «β+/α-» ECD-домена**

Тип рецептора [код PDB Bank]	Лиганд	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
α1β3γ2 [6HUK]	Бикукуллин	α65, α130, β200
		α65, α130, α67, β202, β155, β200
α1β2γ2 [6X3S]	Бикукуллин	α65, α130, α67, β200, β157
		α65, α130, α67, β200, β157

При их анализе выявлены эксклюзивные позиции β202 и β155, характерные для типа «α1β3γ2», частые (β157) и очень частые (α67), а также три обязательные позиции α65, α130 и β200, которые обнаруживались во всех комплексах. При сравнении паттернов взаимодействия агонистов и антагонистов с ГАМК-сайтом рецепторов, содержащих α1-субъединицу, отмечали общие позиции для обоих типов лигандов β155, β202, β200, α130, β157, α65 и α67. Дополнительно к этим позициям агонисты, в отличие от антагонистов, связывались с позициями α118, β97, β156 и β205. Вероятно, отсутствие этих взаимодействий в случае конкурентных антагонистов (на примере бикукулина) препятствует формированию конформационных изменений, вызывающих активацию рецептора.

Отдельного внимания заслуживают взаимодействия гистамина с ГАМК_AР. Результаты функциональных исследований указывают на то, что гистамин способен активировать ГАМК_AР и усиливать эффекты ГАМК. Эти наблюдения позволяют предположить, что сайты связывания гистамина на ГАМК_AР функциональны и опосредуют его активацию. Гистамину в ЦНС отводят роль «медиатора бодрствования» с основной мишенью – гистаминовыми рецепторами, однако показано его влияние и на другие мишени, в частности на NMDA-рецепторы [22] и ГАМК_AР [23]. При оценке селективности гистамина к ГАМК_AР получены подтверждения его преимущественного влияния на внесинаптические и некоторые синаптические подтипы [24]. Показано что на всех композициях субъединиц гистамин способен потенцировать эффекты ГАМК на рецепторы с различными сочетаниями α1-6, β1-3, γ1-3 и δ-субъединиц, однако наибольшую величину усиления (в 4 раза) наблюдали с типами «α4β3» и «α4β3γ», «α4β3δ». Гистамин в меньшей степени влиял на тип «α4β3γ2» в условиях высокой концентрации ГАМК. При этом взаимодействие ГАМК/гистамин на уровне рецептора наиболее вероятно при низких концентрациях ГАМК (т.е. во «внесинаптических» условиях), а результирующий эффект может быть как ингибирующим (через увеличение тонического торможения, опосредуемого внесинаптическими рецепторами), так и прямым возбуждающим (через усиление пресинаптической ГАМК-ергической передачи), так и непрямым возбуждающим (через ингибирование ГАМК-ергических интернейронов) [25].

Выявленные особенности межмедиаторного взаимодействия гистамина и ГАМК, а также доступность целого ряда комплексов специфических подтипов ГАМК_AР с гистамином открывают возможности для направленного поиска новых средств для повышения бодрствования с использованием методов молекулярного моделирования и докинга. Результаты анализа взаимодействия гистамина с ГАМК_AР в «классическом» сайте ГАМК (в высоких концентрациях) и в гомологе сайта ГАМК в интерфейсе «β+/β-» ECD-домена в котором содержится три и более β-субъединиц представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Результаты анализа взаимодействия гистамина с гомологом сайта ГАМК в интерфейсе «β+/β-» ECD-домена ГАМК_AР

Тип рецептора [код PDB Bank], последовательность субъединиц	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
α4β3δ [7QN7], βαδββ	β-62, β+97, β+200
	β-62, β+97, β+200
β3δ [7QN8], ββββδ	β-62, β+200, β-64, β+97, β+155
	β-62, β-64, β+97, β+155, β+200
	β-62, β-64, β+97, β+155, β+200
α4β3δ [7QN9], βαδββ	β+97, β+155, β-62
	β+97, β+155
α4β3δ [7QNC], βαδββ	β-64, β+97, β+155, β-62, β+200
	β+97, β+155, β-62
β3δ [7QND], ββββδ	β+205, β-64, β+97, β+157, β+200
	β-64, β+97, β+155, β+200
	β-64, β+97, β+155, β-62, β+200
β3 [6QFA], βββββ	β-62, β+97, β+202

В результате анализа установлено присутствие обязательной позиции β+97, очень частых взаимодействий с β-62 и частых с β+200, β-64 и β+155. Позиции β+205, β+157 и β+202, характерные для «β3» и «β3δ» подтипов, не содержащих α-субъединицу, были интерпретированы как эксклюзивные. Однако их отнесение к эксклюзивным, по-видимому, связано с малым числом наблюдений, тем более что аналогичные позиции связывания лигандов на β-субъединице наблюдали ранее при анализе связывания ГАМК с «β+/α-» интерфейсом. Паттерн взаимодействия с «основной» частью интерфейса – «β+»-субъединицей был практически идентичен тому, что наблюдали в «классическом» «β+/α-» интерфейсе при связывании ГАМК. Спектр взаимодействий с «комплементарной» частью интерфейса – «β-»-субъединицей, описывал взаимодействие с областью, гомологичной α-субъединице.

Следует подчеркнуть, что исследованные типы рецепторов «α4β3δ», «β3δ» и «β3», для которых выявлено взаимодействие с гистамином, - относят к внесинаптическим типам ГАМК_AР, которые, несмотря на малую (в количественном отношении) распространённость в

ЦНС, вовлечены в реализацию ряда специфических функций (в частности, регуляцию бодрствования). Ввиду особенностей субъединичного состава они лишены многих аллостерических сайтов (бензодиазепиновый, барбитуратный, часть нейростероидных), что дополнительно повышает возможность достижения селективного эффекта и определяет значимость этих мишеней для разработки лекарственных средств.

Сайты связывания бензодиазепинов

Бензодиазепины связываются с двумя группами сайтов на ГАМК_AР, из которых основной высокоаффинный сайт локализован в « α +/ γ -»-интерфейсе ECD-домена, а дополнительные низкоаффинные сайты в « β +/ α -»-интерфейсах TMD-домена [26].

ГАМК_AР, содержащие « α_x / γ_y »-интерфейс, где $x = 1, 2, 3, 5$ и $y = 1-3$, формируют высокоаффинные сайты связывания классических бензодиазепинов и более современных так называемых «Z-препаратов» различной химической структуры (золпидем и т.д.), а также целого ряда других химических соединений [27]. При этом рецепторы с $\gamma 1$ или $\gamma 3$ -субъединицей менее чувствительны к этим лигандам [28]. Сайты, формируемые $\alpha 4$ и $\alpha 6$ -субъединицами чувствительны лишь к ограниченному числу лигандов, поэтому их традиционно обозначают как «дiazepam-нечувствительные» [29]. Кроме того, еще целый ряд менее распространенных комбинаций субъединиц ГАМК_AР также характеризуется низкой чувствительностью к бензодиазепинам [30]. Проводили анализ доступных в базе данных PDB Bank комплексов лигандов (агонистов и антагонистов) с высокоаффинным сайтом бензодиазепинов в « α +/ γ -»-интерфейсе ECD-домена. Отмечали, что агонисты формировали больше связей с рецептором, в отличие от антагонистов (таблица 6).

Таблица 6.

Результаты анализа взаимодействия лигандов с высокоаффинным сайтом бензодиазепинов в « α +/ γ -»-интерфейсе ECD-домена

Тип рецептора [код PDB Bank]	Лиганд	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
агонисты		
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [8DD2]	золпидем	$\gamma 56, \gamma 58, \gamma 77, \alpha 100, \alpha 203, \alpha 205, \alpha 160, \alpha 210$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3X]	дiazepam	$\gamma 58, \gamma 77, \alpha 100, \alpha 160, \alpha 203, \alpha 210, \alpha 205, \alpha 206, \alpha 102$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$ [6HUP]	дiazepam	$\gamma 58, \gamma 77, \alpha 100, \alpha 160, \alpha 203, \alpha 210, \alpha 205, \alpha 206, \alpha 102$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$ [6HUO]	альпразолам	$\gamma 58, \gamma 77, \alpha 100, \alpha 203, \alpha 210, \alpha 205, \alpha 206, \alpha 160, \alpha 102$
антагонисты		
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [8DD3]	DMCM	$\gamma 77, \alpha 100, \gamma 142, \alpha 160, \alpha 210$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [7QNE]	Ro154513	$\gamma 58, \gamma 79, \alpha 100, \alpha 159, \alpha 205, \gamma 77, \alpha 210$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6D6U]	флумазенил	$\gamma 58, \alpha 210, \gamma 77$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6D6T]	флумазенил	$\gamma 58, \alpha 210, \gamma 77$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3U]	флумазенил	$\alpha 100, \gamma 142, \alpha 205, \gamma 77, \alpha 210$

Высокую степень сходства паттерна взаимодействия трех бензодиазепинов отмечали с высокоаффинным сайтом (малое число эксклюзивных и редких позиций). В частности, выявляли эксклюзивную позицию $\gamma 56$ (комплекс « $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ » с золпидемом). К очень частым по встречаемости позициям относили $\alpha 206$ и $\alpha 102$. Обязательные позиции $\gamma 58$, $\gamma 77$, $\alpha 100$, $\alpha 203$, $\alpha 205$, $\alpha 160$ и $\alpha 210$ были характерны для всех комплексов с агонистами бензодиазепинового сайта. При анализе связывания антагонистов выявляли эксклюзивные позиции $\alpha 160$ (для DMCM в связи с « $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ » с), $\gamma 79$ и $\alpha 159$ (для Ro154513 в комплексе с « $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ »), распространённые - $\gamma 142$, $\alpha 205$, частые - $\alpha 100$ и $\gamma 58$, а также обязательные - $\gamma 77$ и $\alpha 210$.

При сравнении паттернов взаимодействия агонистов и антагонистов с ГАМК_AР, отмечали следующие особенности: совпадающие позиции для агонистов и антагонистов высокоаффинного сайта бензодиазепинов соответствовали $\gamma 58$, $\gamma 77$, $\alpha 100$, $\alpha 205$, $\alpha 160$ и $\alpha 210$; различающиеся - $\gamma 56$, $\alpha 206$, $\alpha 102$, $\alpha 203$ (встречались только у агонистов) и $\gamma 79$, $\alpha 159$, $\gamma 142$ (обнаруживались только у антагонистов).

Неклассические сайты бензодиазепинов в ECD-домене

В ECD-домене ГАМК_AР интерфейс « $\alpha +/\beta -$ » структурно сходен с каноническим для бензодиазепинов « $\alpha +/\gamma -$ », поэтому неудивительно, что ряд лигандов высокоаффинного сайта бензодиазепинов способны связываться в этой области [31]. В частности, производное пиразолхинолинонов (CGS 8216) действует как антагонист в интерфейсе « $\alpha +/\gamma -$ » и как позитивный аллостерический модулятор в « $\alpha +/\beta -$ » [32]. Экспериментально показано формирование высокоаффинных и полностью функциональных сайтов для диазепама в « $\beta +/\gamma -$ » интерфейсе ECD-домена в редко встречающихся подтипах рецепторов, состоящих только из β - и γ -субъединиц, например типы $\beta 2\gamma 2$, $\beta 1\gamma 2$, $\beta 3\gamma 2$ [33], однако в настоящее время трехмерные модели комплексов таких типов рецептора с бензодиазепиновыми лигандами отсутствуют в открытом доступе для анализа.

Для частичного обратного агониста Ro154513 показано связывание как с « γ »-, так и « δ »-содержащими рецепторами (на примере типов « $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ » и « $\alpha 4\beta 3\delta$ »). Один из специфических эффектов Ro154513 – это блокирование потенцирования ГАМК_AР низкими дозами алкоголя (не характерно для флумазенила), что опосредовано экстраинаптическим расположением рецепторов типами « $\alpha 4/6\beta 3\delta$ » [34]. Однако, комплексы Ro154513 и других антагонистов бензодиазепинов с « δ »-содержащими рецепторами в настоящее время отсутствуют, что не позволяет однозначно локализовать сайт связывания и отнести его к высокоаффинным (в интерфейсе « $\alpha +/\delta -$ » ECD-домена), либо к низкоаффинным (в « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсе TMD-домена). При этом функциональные данные указывают на высокоаффинное связывание Ro154513 с ГАМК_AР, что подкрепляется конкурентным характером взаимодействия этанола и бензодиазепамина с типом « $\alpha 4\beta 3\delta$ » ГАМК_AР [35].

Сайты бензодиазепинов в TMD-домене

В TMD-домене ГАМК_AP обнаруживаются не гомологичные классическому сайту низкоаффинные области связывания бензодиазепинов. В рецепторе с сочетанием субъединиц « $\alpha 1\beta\gamma 2$ » обнаруживается 4 низкоаффинных области связывания диазепама [36]. Результаты анализа связывания агонистов и антагонистов с доступными моделями низкоаффинных сайтов бензодиазепинов в « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсе TMD-домена представлены в таблице 7.

Таблица 7.

**Результаты анализа взаимодействия лигандов с низкоаффинным сайтом
бензодиазепинов в « $\beta +/\alpha -$ »-интерфейсе TMD -домена**

Тип рецептора [код PDB Bank]	Лиганд	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
агонисты		
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [8DD2]	золпидем	$\alpha 233, \alpha 236, \beta 262, \beta 269, \beta 285, \beta 289$
		$\alpha 228, \alpha 233, \beta 262, \alpha 265, \beta 289$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3X]	диазепам	$\alpha 233, \beta 262, \beta 265, \alpha 265, \alpha 269, \beta 285, \beta 289$
		$\alpha 233, \beta 262, \alpha 269, \beta 285, \beta 289$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$ [6HUP]	диазепам	$\alpha 233, \beta 262, \beta 285, \beta 289$
		$\alpha 233, \beta 262, \alpha 269, \beta 285, \beta 289$
антагонисты		
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [8DD3]	DMCM	$\alpha 233, \alpha 236, \beta 262, \beta 289, \alpha 265$
		$\alpha 233, \alpha 236, \beta 289, \beta 265, \alpha 265$

При исследовании взаимодействий агонистов с низкоаффинным сайтом бензодиазепинов в « $\beta +/\alpha -$ »-интерфейсе TMD-домена выявлены эксклюзивные позиции связывания золпидема с подтипом « $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ » ($\alpha 236, \beta 269, \alpha 228, \alpha 228$) диазепама с подтипом « $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ » ($\beta 265$). К числу распространенных отнесены $\alpha 265$, частых - $\alpha 269$, очень частых - $\beta 285$, обязательных - $\alpha 233, \beta 262, \beta 289$. Среди лигандов, обладающих свойствами антагонистов бензодиазепинов (DMCD, флумазенил и Ro154513), только для DMCD показано взаимодействие с низкоаффинным сайтом. С учетом малого количества наблюдений частоту встречаемости тех или иных позиций аминокислот, взаимодействующих с DMCD в низкоаффинном сайте, можно определить лишь условно. С учетом этого, к обязательным остаткам отнесены $\alpha 233, \alpha 236, \beta 289, \alpha 265$, а к частым - $\beta 262$ и $\beta 265$. Паттерн взаимодействия антагониста был весьма сходным с диазепамом и золпидемом, за исключением отсутствия связей с $\beta 285$ и $\alpha 269$ и формирования связей с $\alpha 236$ и $\beta 265$, которые у агонистов наблюдали крайне редко. Вероятно, эти особенности согласуются с представлениями о том, что DMCD является полным обратным агонистом бензодиазепинов [37].

При анализе связывания диазепама с подтипом « $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ » (PDB ID 6X3X) помимо высокоаффинного сайта в ECD-домене и двух низкоаффинных сайтов в TMD-домене

обнаруживали предположительно дополнительный низкоаффинный сайт бензодиазепинов в интерфейсе « $\gamma + \beta$ » TMD-домена, который частично перекрывался с барбитуратным сайтом. Паттерн взаимодействия в этом сайте включает остатки аминокислот в позициях $\beta 223$, $\beta 227$, $\beta 231$, $\gamma 284$ и $\gamma 280$, однако функциональное и фармакологическое значение этого сайта в настоящее время не установлено.

Сайты связывания барбитуратов

Барбитураты обладают рядом опосредованных ГАМК_AР эффектов, включая седативный, анксиолитический, гипнотический и противосудорожный. В частности, фенobarбитал применяют в качестве противосудорожного средства, в низких концентрациях он потенцирует эффекты ГАМК на ГАМК_AР, а в высоких обеспечивает прямое аллостерическое открытие канала за счет связывания в области трансмембранного домена [38]. В настоящее время доступен только один комплекс ГАМК_AР типа « $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ » с фенobarбиталом и ГАМК, полученный методом криоэлектронной микроскопии [39]. В нем идентифицированы две эквивалентных модели связывания фенobarбитала в « $\gamma + \beta$ » и « $\alpha + \beta$ » интерфейсах трансмембранного домена, сформированных участками M1, M2 и M3-петель. Фенobarбитал стабилизирован в сайте связывания преимущественно силами Ван-дер-Ваальса, а также формирует один электростатический контакт между кислородом лизина в позиции $\beta 223$ и атомом азота барбитуровой кислоты. Хотя эти две модели связывания (по положению и позе лиганда) установлены в результате исследований с применением аффинного мечения [40], они входят в противоречие с результатами исследований *in vivo* [41]. Так показано, что нокаутные по $\beta 3$ -субъединице мыши (мутация (N265M) в позиции 265 $\beta 3$ -субъединицы, которая относится к « $\beta + \alpha$ » интерфейсу) обладают низкой чувствительностью к фенobarбиталу. При анализе связи фенobarбитала с рецептором в « $\beta + \alpha$ » интерфейсе каких-либо значимых взаимодействий обнаружено не было. При этом мутации в предполагаемом интерфейсе « $\beta + \alpha$ » не приводили к изменению чувствительности рецептора к фенobarбиталу, в отличие от мутаций в гомологичном положении интерфейсов « $\gamma + \beta$ » и « $\alpha + \beta$ », что подтверждало наличие лишь двух сайтов в последних интерфейсах. На рисунке 2 представлено графическое отображение локализации сайтов связывания фенobarбитала в интерфейсах « $\gamma + \beta$ » и « $\alpha + \beta$ » TMD-домена ГАМК_AР. Результаты анализа взаимодействия лиганда с рецептором представлены в таблице 8.

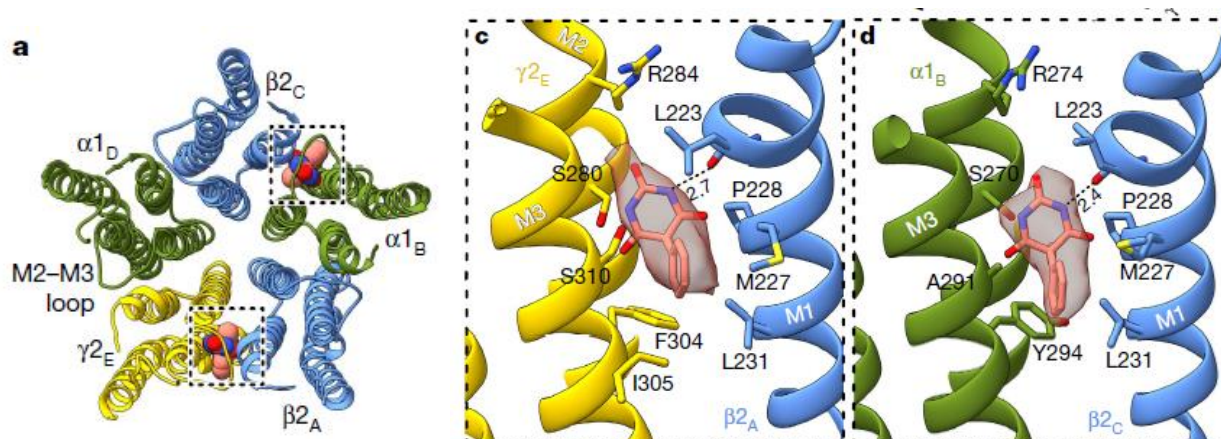


Рисунок 2. Локализация сайтов связывания фенобарбитала в интерфейсах « γ^+/β^- » (c) и « α^+/β^- » (d) TMD-домена [42]

Таблица 8.

Результаты анализа взаимодействия фенобарбитала с барбитуратным сайтом в гомологичных « γ^+/β^- » и « α^+/β^- » интерфейсах TMD -домена

Тип рецептора [код PDB Bank]	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
« γ^+/β^- » интерфейс	
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3W]	$\beta 223$, $\beta 228$, $\beta 231$, $\gamma 305$, $\gamma 280$
« α^+/β^- » интерфейс	
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3W]	$\beta 228$, $\alpha 291$, $\alpha 294$, $\beta 223$

Анализ частоты встречаемости позиций аминокислотных остатков при взаимодействии с фенобарбиталом бы затруднён малым числом наблюдений и несовпадающей нумерацией остатков в α - и γ -субъединиц ввиду их неполной гомологии. Позиции на β -субъединице $\beta 223$ и $\beta 228$ можно охарактеризовать как обязательные. Также авторы работы указывают в качестве вероятных позиций, задействованных в связывании фенобарбитала, в « γ^+/β^- » интерфейсе $\beta 227$, $\gamma 284$, $\gamma 310$ и $\gamma 304$, а в « α^+/β^- » интерфейсе - $\beta 227$, $\beta 231$, $\alpha 274$, $\alpha 270$ и $\alpha 291$ [42].

Сайт связывания общих анестетиков (этомидата и пропофола)

Пропофол широко применяют в клинической практике как общий анестетик [43]. Этомидат предшествовал пропофолу и до сих пор находит применение ввиду меньших дыхательных и сосудистых осложнений [44]. Исследования мутагенеза *in vitro* показали, что оба лиганда связываются в « β^+/α^- » интерфейсе TMD-домена в позициях, эквивалентных низкоаффинному сайту связывания диазепама. Эти сайты связывания опосредуют потенцирование эффектов ГАМК этими лигандами, а также способствуют прямой активации рецептора при использовании соединений в высоких концентрациях. Существуют доказательства того, что этомидат связывается исключительно в « β^+/α^- » интерфейсе [45, 46, 47]. Фотореактивное мечение и исследования мутагенеза с пропофолом предполагали, что помимо « β^+/α^- » сайта [48, 49, 50] могут быть дополнительные сайты на интерфейсах между

другими субъединицами и/или в области соединения TMD и ECD [51, 52]. Исследования с нокаутированием генов и мутагенезом субъединиц ГАМК_AР позволили однозначно сопоставить иммобилизирующий и седативный эффект обоих препаратов с сайтом « β +/ α -» рецепторов, содержащих β 3 и β 2-субъединицы, и дали менее однозначные результаты по другим сайтам [53, 54].

В исследовании методами криоэлектронной микроскопии получены трехмерные модели ГАМК_AР в комплексе с пропофолом и этомидатом, которые позволили установить по два идентичных сайта связывания для каждого соединения в « β +/ α -» интерфейсе TMD-домена, сформированные петлями M1-M3. Среди других взаимодействий фенильное кольцо лиганда предположительно формирует электростатическую связь с остатком в положении β 265 (β 15'), мутации в котором приводят к существенному снижению чувствительности рецептора к этомидату [45]. Имидазольное кольцо этомидата расположено между остатками β 289 и α 233. Предполагается большое количество ван-дер-ваальсовых взаимодействий в этой области, в особенности с боковой цепью остатка β 286, мутации в котором приводят к значительной утрате чувствительности [46]. При оценке комплекса ГАМК_AР с пропофолом установлено его позиционирование в обоих « β +/ α -» интерфейсах TMD-домена, в области, перекрывающейся с сайтом связывания этомидата (рисунок 3).

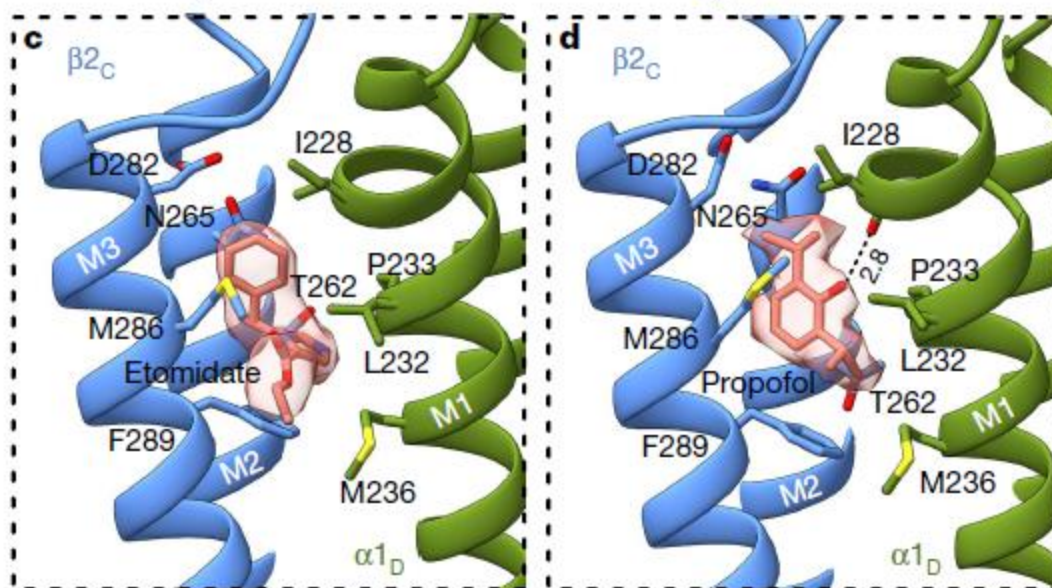


Рисунок 3. Область связывания этомидата (с) и пропофола (d) в « β +/ α -» интерфейсе TMD-домена ГАМК_AР [42]

Молекула пропофола симметрична и меньше по размеру, чем у этомидата, и формирует меньше контактов с рецептором. В качестве вероятных указывают гидрофобный контакт с остатком α 233, и ван-дер-ваальсовы связи с позицией β 265, замена в которой на серин снижает чувствительность к этомидату, но не влияет на чувствительность к пропофолу [54], что

объясняется различиями в размерах двух анестетиков. В противоположность этому, замена на метионин в этой позиции $\beta 3$ -субъединицы приводит к утрате чувствительности мышей к иммобилизирующему действию пропофола [55]: длинная гидрофобная боковая цепь метионина препятствует связыванию лиганда с карманом. Указывают на формирование водородной связи лиганда [56] с остатком $\alpha 228$. Важным для формирования кармана считают остаток $\beta 286$, ответственный за обмен связанных анестетиков с липидами мембраны. Мутации этого остатка существенно снижают чувствительность рецептора как к пропофолу [57], так и к этомидату [46]. Симуляция молекулярной динамики связывания пропофола в других гомологичных « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсу областях TMD-домена других субъединиц показали меньшую стабильность комплексов. Хотя полностью опровергнуть возможность связывания там пропофола нельзя [58], совокупность полученных разными методами взаимосогласованных данных указывают, что высокоаффинное связывание этомидата и пропофола наблюдается только в « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсе TMD. Примечательно, что в комплексах ГАМК_AР с общими анестетиками гомологичные основному сайту связывания интерфейсы « α / β » и « α / γ » между другими субъединицами были заняты липидами мембраны.

Установлено, что сайты связывания нейростероидов и общих анестетиков в « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсе TMD-домена не перекрываются, что объясняет взаимное потенцирование их эффектов [59]. При анализе взаимодействий этомидата и пропофола с сайтом общих анестетиков в « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсе TMD-домена выявлены эксклюзивные позиции $\alpha 236$, $\beta 282$ (при взаимодействии пропофола с « $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ »), частые позиции - $\beta 285$, $\beta 290$ и очень частые - $\beta 265$, $\alpha 228$, а также обязательная позиция $\beta 289$. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9.

Результаты анализа взаимодействия этомидата и пропофола сайтом общих анестетиков в гомологичных в « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсе TMD -домена

Тип рецептора [код PDB Bank]	Лиганд	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3V]	Этомидат	$\beta 265$, $\beta 285$, $\beta 290$, $\beta 289$
		$\alpha 228$, $\beta 265$, $\beta 285$, $\beta 290$, $\beta 289$
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6X3T]	Пропофол	$\beta 289$, $\alpha 228$
		$\alpha 236$, $\beta 265$, $\beta 282$, $\beta 289$, $\alpha 228$

В сравнении с паттерном взаимодействий бензодиазепинов с низкоаффинным сайтом, который также располагается в « $\beta +/\alpha -$ » интерфейсе отмечены некоторые отличия. Общие позиции для обоих сайтов (анестетиков и бензодиазепинов) включали $\alpha 236$, $\alpha 228$, $\beta 265$, $\beta 285$ и $\beta 289$, в то время как несовпадающие позиции включали $\beta 269$, $\alpha 265$, $\alpha 269$, $\alpha 233$, $\beta 262$, $\beta 282$ и $\beta 290$. При этом среди общих обнаруживалась только одна обязательная позиция $\beta 289$, две очень частых - $\alpha 228$ и $\beta 265$ и одна частая - $\beta 285$. Обращало на себя внимание, что для

бензодиазепинов было характерно большее число обязательных позиций ($\alpha 233$, $\beta 262$ и $\beta 289$) в сравнении с анестетиками ($\beta 289$). Полученные данные указывали на то, что сайты связывания бензодиазепинов и анестетиков в TMD-домене перекрываются, но не идентичны (рисунок 4).

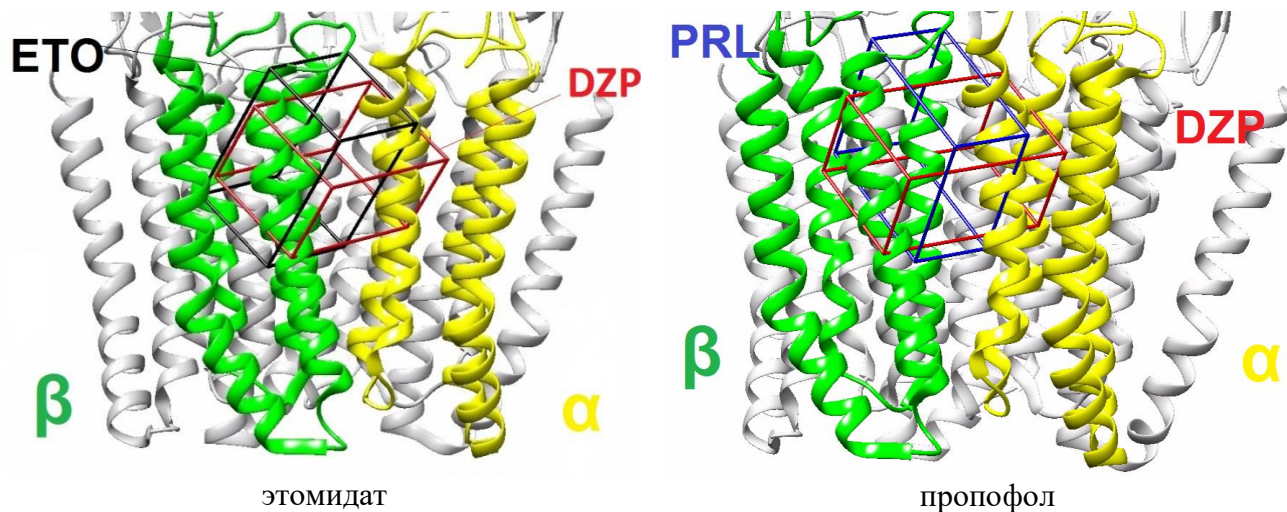


Рисунок 4. Визуализация низкоаффинной области связывания бензодиазепинов (на примере диазепама (DZP)) и общих анестетиков (на примере пропофола (PRL) и этомидата (ETO)) в двух в « $\beta + / \alpha -$ » интерфейсах TMD-домена ГАМК_AР [DPB ID 6X3X]. Прямоугольные области захватывают все аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с лигандом

Сайты связывания нейростероидов

3α -ОН нейростероиды на примере аллопрегнанолона ($3\alpha 5\alpha$ -Р) и тетрагидродеоксикортикостерона (ТНДОС) считают позитивными аллостерическими модуляторами (ПАМ) ГАМК_AР, которые увеличивают чувствительность рецепторов к пороговым концентрациям ГАМК. Эффект проявляется в увеличении частоты и продолжительности открытия канала [60]. В радиолигандных исследованиях показано, что нейростероидные ПАМ увеличивают связывание мусцимола с ортостерическим сайтом ГАМК и флунитразепама с бензодиазепиновым сайтом [61, 62] и уменьшают связывание неконкурентного блокатора ХИК t-бутилбициклофосфотионата [63].

3β -ОН нейростероид эпи-аллопрегнанолон ($3\beta 5\alpha$ -Р) считают негативным аллостерическим модулятором (НАМ) ГАМК_AР, который переводит рецептор в закрытое состояние, характеризующееся увеличением связывания ортостерического лиганда мусцимола и снижением равновесного тока хлора, вызываемого эффективными концентрациями ГАМК [64]. Анализ проводимости в синапсе [65] и через одиночный изолированный рецептор [64] позволяет заключить, что НАМ 3β -ОН нейростероиды стабилизируют десенситизированное состояние рецептора. $3\beta 5\alpha$ -Р неконкурентно блокирует эффекты нейростероидных ПАМ, что позволяет предположить отдельные сайты для стероидных НАМ и ПАМ [65].

Сайты связывания нейростероидных ПАМ

В настоящее время методами фотореактивных меток, рентген-структурного анализа и направленного мутагенеза идентифицировано три независимых сайта связывания нейростероидов в TMD-домене ГАМК_AР, которые, по-видимому, ответственны за эффекты нейростероидных НАМ и ПАМ:

- «β+/α-» межсубъединичный сайт (основной), селективно связывающий 3α-ОН нейростероиды (ПАМ) и опосредующий позитивный модулирующий эффект [66, 67, 68, 69, 70, 71];
- «β»-внутрисубъединичный сайт (дополнительный), связывающий как 3α-ОН (ПАМ), так и 3β-ОН (НАМ), в обоих случаях опосредующий эффект десенситизации (негативной аллостерической модуляции);
- «α»-внутрисубъединичный сайт (дополнительный), связывающий как 3α-ОН (ПАМ), так и 3β-ОН (НАМ) с противоположными эффектами (позитивный и негативный, соответственно).

Перечисленные сайты независимы друг о друга, аллостерически не связаны, и результирующий эффект на ГАМК_AР зависит от суммы этих взаимодействий [72, 73]. При замене аминокислот выявлен феномен связывания нейростероидов без развития эффекта, что указывало на важность формирования правильной ориентации лиганда в гидрофобном кармане.

В «β+/α-» межсубъединичном сайте выявлены важные для связывания нейростероидных ПАМ позиции, в частности α1 (Q242) [74], а также α1 (W246) и β3 (F301), замена которых существенно влияет на выраженность эффекта нейростероидов [75]. При этом формирование водородной связи между 3α-ОН радикалом лиганда и остатком α1 (Q242) считают ключевым.

Установлено, что в формировании «α»-внутрисубъединичного сайта участвуют остатки α1 (N408) и α1 (Y415) на петле TM4 и α1 (V227) на петле TM1. При этом «β»-внутрисубъединичный сформирован остатками β3 (Y442) и β3 (V290) на β3-субъединице между петлями TM3 и TM4.

Отмечено, что замена аминокислот в позициях α1 (V227W), α1 (N408A) и α1 (Y411F) на α1-субъединице нивелировало эффекты 3α5α-Р. Тогда как замены в β-субъединице практически не влияли на эффекты 3α5α-Р, что позволило сделать предположение, что сайт внутри β-субъединицы ответственен за десенситизацию.

Представления о структуре этих сайтов, предполагаемых моделях связывания и функциональной реакции ГАМК_AР на связывания с позитивными и негативным модуляторами стероидной природы обобщены на рисунке 5.

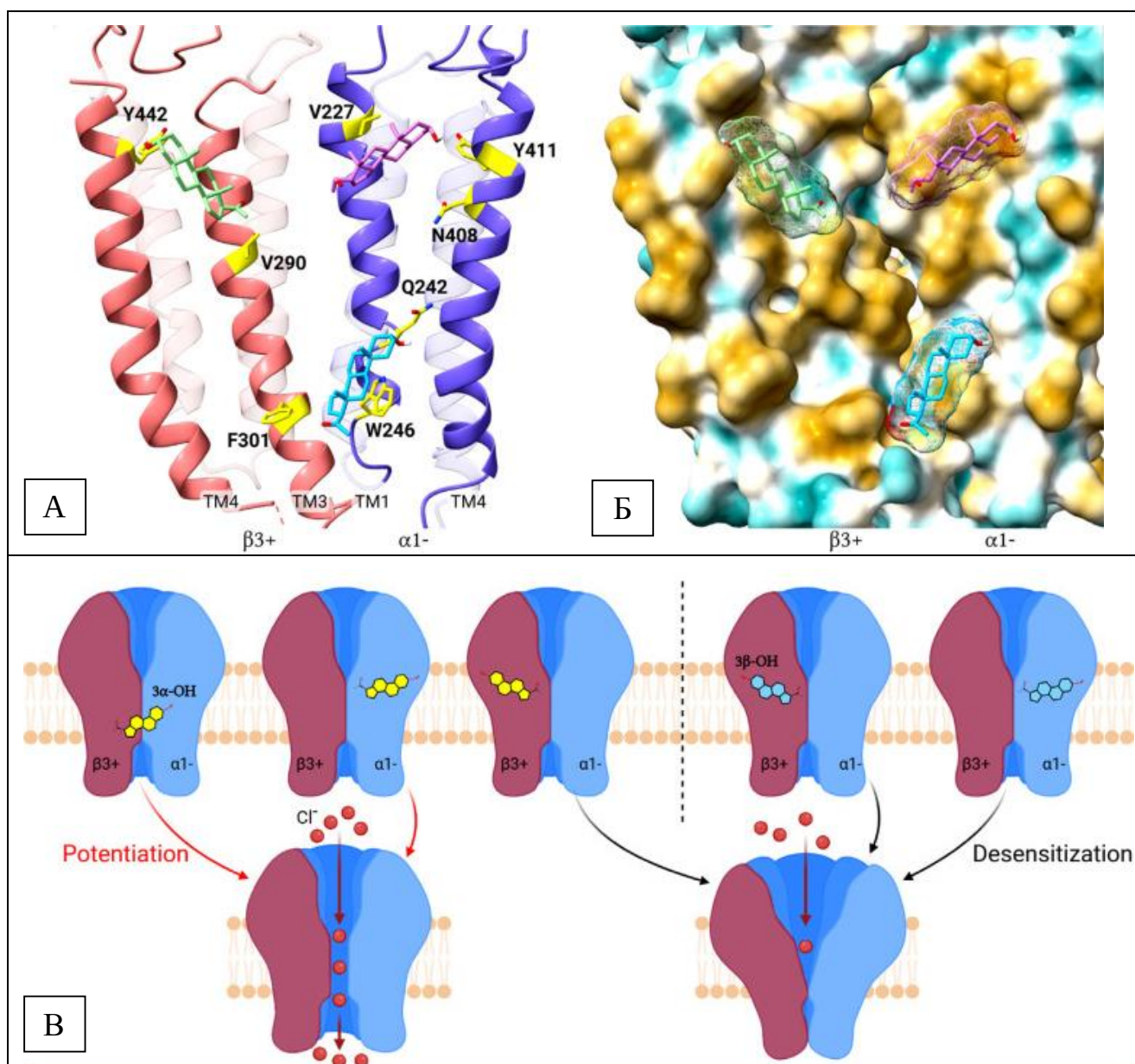


Рисунок 5. Предполагаемые модели связывания и функциональной реакции ГАМК_AР на связывания с позитивными и негативным модуляторами стероидной природы (пояснения в тексте) [76]

На рисунке представлены модели сайтов связывания нейростероидов на ГАМК_AР типа « $\alpha 1\beta 3$ » и их влияние на работу ХИК. Рисунок 5.А - ленточные диаграммы интерфейсов между $\beta 3-$ (розовый цвет) и $\alpha 1-$ субъединицей (сиреневый цвет) ГАМК_AР (на основе PDB ID 6HUU) в комплексе с нейростероидом $3\alpha 5\alpha\text{-P}$, локализованном в следующих сайтах:

1. β -внутрисубъединичный сайт между $\beta 3(\text{V290})$ петли TM3 и $\beta 3(\text{Y442})$ петли TM4;
2. межсубъединичный « $\beta +/\alpha -$ » сайт между остатками $\alpha 1(\text{Q242})$ и $\alpha 1(\text{W246})$ петли TM1 и $\beta 3(\text{F301})$ петли TM3;
3. α -внутрисубъединичный сайт между $\alpha 1(\text{V227})$ петли TM1 и $\alpha 1(\text{Y411})$ и $\alpha 1(\text{N408})$ петли TM4.

На рисунке 5.Б представлена карта гидрофобной поверхности рецептора в комплексе с $3\alpha 5\alpha$ -Р (желтым цветом отмечены более гидрофобные области), иллюстрирующая связывание нейростероидов в области гидрофобных трансмембранных спиралей поверхности рецептора, что, по-видимому, включает взаимодействие как с белком, так и с окружающими его липидами.

На рисунке 5.В отражена схема взаимодействия 3α (желтым цветом) и 3β (голубым цветом) нейростероидов с рецептором: связывание $3\alpha 5\alpha$ -Р в межсубъединичном сайт « β +/ α -» и/или α -внутрисубъединичном сайте способствует активации рецептора. В противоположность этому, связывание в β -внутрисубъединичном сайте как $3\alpha 5\alpha$ -Р, так и $3\beta 5\alpha$ -Р, а также связывание $3\beta 5\alpha$ -Р в α -внутрисубъединичном сайте ингибирует рецептор путем десенситизации.

Особенности связывания 3β -ОН-нейростероидов как негативных аллостерических модуляторов

Все идентифицированные сайты связывания нейростероидов расположены на поверхности рецептора, контактирующей с клеточной мембраной, поэтому эти лиганды могут взаимодействовать с рецептором только после растворения в мембране и латеральной диффузии в сторону сайтов связывания [77], в связи с этим липидный состав клеточной мембраны влияет на кинетику нейростероидов и их эффекты [78]. Установлено, что собственная аффинность нейростероидов к сайтам ГАМК_AР низкая, а растворимость их в липидах имеет существенное влияние на выраженность и продолжительность анестезии.

В частности, нейростероидные ПАМ более эффективны в отношении ГАМК_AР, окруженных бедной холестерином мембраной (в сравнении с насыщенной холестерином), что позволяет предположить конкуренцию с холестерином за сайты связывания [79]. Возможность связывания холестерина с сайтами нейростероидов и конкурентный характер этого процесса подтверждены методами молекулярной симуляции и докинга, а также в биохимических исследованиях с гомологичными ГАМК_AР ионными каналами цианобактерий [80, 81]. Несмотря на общие для аллопрегнанолона и холестерина липофильные карманы связывания на гомологе ГАМК_AР, ориентация лигандов в них различная, как и паттерн взаимодействия с аминокислотными остатками.

Предложенная модель предполагает сложные фармакологические взаимодействия аналогов нейростероидов с тремя отдельными сайтами с вариативными эффектами (позитивная или негативная аллостерическая модуляция или конкурентный антагонизм). Остается неясным, существуют ли другие сайты связывания нейростероидов на γ - и δ -субъединицах, а также отсутствуют данные о специфичности и селективности этих сайтов, формируемых изоформами $\alpha 1$ - $\alpha 6$ и $\beta 1$ - $\beta 3$ субъединиц. Следует отметить, что НАМ-эффект

сульфатированных нейростероидов не изменяется при мутациях аминокислот в идентифицированных сайтах связывания нейростероидов [68], что позволяет предположить существование дополнительных сайтов.

В настоящее время нативные ГАМК_AР в комплексе с нейростероидами недоступны ввиду методических сложностей кристаллизации трансмембранного домена рецептора, однако получен ряд химерных рецепторов с гомопентамерным TMD-доменами от $\alpha 5$ - или $\alpha 1$ -субъединицы, в частности 5O8F (с прегнанолоном), 5OSC (с прегненалона сульфатом), 5OSB (с тетрагидродеоксикортикостероном, THDOC) и 6CDU (с альфаксалоном). Эти химерные молекулы воспроизводят трансмембранный домен ГАМК_AР, что позволяет их использовать для докинга.

Во всех доступных комплексах связывание нейростероидных ПАМ (прегнанолон, THDOC, альфаксалон) наблюдается в аналоге « $\beta +/\alpha -$ » межсубъединичного сайта. В α -внутрисубъединичном сайте взаимодействие отмечено только со стероидным НАМ - прегненалон сульфатом, а в β -внутрисубъединичном - не выявлено, что, возможно, обусловлено химерной природой исследованной белковой мишени [64]. Ввиду того, что химерные рецепторы представляют собой гомопентамеры α -субъединиц, в них межсубъединичный сайт (« $\beta +/\alpha -$ ») TMD-домена представлен аналогом « $\alpha +/\alpha -$ », сформированным принципиальной (« $+$ ») и комплементарной (« $-$ ») частью соседних субъединиц. Анализ доступных в базе данных PDB Bank комплексов нейростероидных ПАМ с « $\alpha +/\alpha -$ »-межсубъединичным сайтом (аналог « $\beta +/\alpha -$ ») TMD-домена представлен в таблице 10.

Таблица 10.

Результаты анализа взаимодействия нейростероидных ПАМ с « $\alpha +/\alpha -$ »-межсубъединичным сайтом (аналог « $\beta +/\alpha -$ ») TMD-домена

Тип рецептора [код PDB Bank]	Лиганд	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
химерный ECD от $\beta 3$ + TMD от $\alpha 5$ [5O8F]	Прегнанолон	α -242, α -246, α -249, α +305, α +308
		α -242, α -246, α -249, α +308
		α -242, α -246, α -249, α +308
		α -242, α -246, α -249, α +305, α +308
		α -242, α -246, α -249, α +305, α +308
химерный ECD от GLIC + TMD от $\alpha 1$ [5OSB]	THDOC	α -238, α -242, α -245, α +304, α -400
		α -238, α -242, α -245, α +304, α -241
		α -238, α -242, α -245, α +304, α -400, α -241
		α -238, α -242, α -245, α +304, α -400
		α -238, α -242, α -245, α +304, α -241
химерный ECD от ELIC и TMD от $\alpha 1$	Альфаксалон	α -242, α -243, α -246, α -397
		α -243, α -246, α +305, α +309, α -397
		α -243, α -246, α +305, α -401, α -397

[6CDU]		α -239, α -243, α -246, α +305, α -401
		α -239, α -243, α -246, α +305, α +309, α -401
		α -239, α -243, α -246, α +305
		α -239, α -243, α -246, α +302, α -397
		α -239, α -242, α -243, α -246, α +302, α +309
		α -243, α -246, α +305, α +309
		α -243, α -246, α -242

Эксклюзивных позиций не выявлено, отмечены редкие - α -400, α -241, α -397, α +309, α -401 и α +302, распространённые - α -249, α +305, α +308, α -238, α -245, α +304 и α -239, частые - α -242, α -243 и очень частые - α -246. Обязательных позиций не выявлено.

Средствами ПО PLIP проводили анализ доступных в базе данных PDB Bank комплексов прегнанолон сульфата с « α »-внутрисубъединичным сайтом TMD-домена. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11.

**Результаты анализа взаимодействия прегнанолон сульфата с « α +/ α -»-
межсубъединичным сайтом (аналог « β +/ α -») TMD-домена**

Тип рецептора [код PDB Bank]	Взаимодействия (субъединица и номер позиции аминокислотного остатка)
ECD от GLIC, TMD от α 1-субъединицы [5OSC]	α 394, α 398, α 399, α 316
	α 398, α 399, α 316
	α 295, α 398, α 399, α 298
	α 398, α 399, α 316
	α 398, α 399, α 316

Выявлены эксклюзивные позиции α 394, α 295 и α 298 (взаимодействия с отдельными субъединицами), очень частые - α 316 и обязательные α 398, α 399. На рисунке 6 представлена визуализация сайтов связывания стероидных НАМ и ПАМ и диазепама в TMD-домене ГАМК_AР, которая подтверждает различия в локализации сайтов связывания нейростероидов (как НАМ, так и ПАМ) и бензодиазепинов.

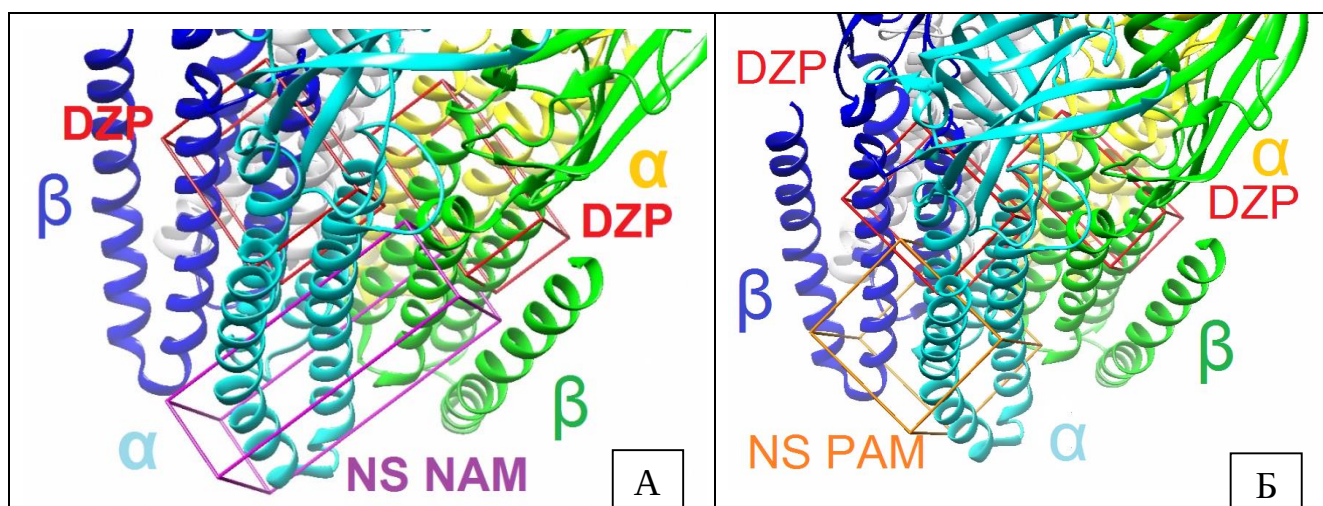


Рисунок 6. Визуализация низкоаффинной области связывания бензодиазепинов (на примере диазепама (DZP)) в двух в « β/α -»-интерфейсах и нейростероидных НАМ (NS НАМ) в « α »-внутрисубъединичном сайте (А) и ПАМ (NS ПАМ) в « β/α -»-межсубъединичном сайте ТМД-домена ГАМК_AР (DPB ID 6X3X) (Б). Прямоугольные области захватывают все аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с лигандом

Закключение. В результате проведенного обзора рассмотрены строение, функционирование и особенности сайтов связывания лигандов ГАМК_AР. Показано, что во внеклеточной области (ECD-домен) рецептора локализованы сайты связывания ГАМК и конкурентных агонистов/антагонистов (« β/α -» интерфейс) и высокоаффинный сайт связывания бензодиазепинов (« α/γ -» интерфейс).

Даны представления о «неклассических» сайтах связывания в ECD-домене, в частности ГАМК (в интерфейсе « α/β -» рецептора типа $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ и в интерфейсе « β/γ -» рецептора типа $\beta 3\gamma 2$) и ТНIP (в интерфейсе « δ/β -» рецепторов типа $\alpha 4\beta 3\delta$ и $\beta 3\delta$, содержащих δ -субъединицу). Функциональные значения этих сайтов требуют подтверждения. Охарактеризовано взаимодействие гистамина с ГАМК_AР внесинаптического типа (в интерфейсе « β/β -» рецептора типа $\alpha 4\beta 3\delta$, $\beta 3\delta$ и $\beta 3$), который может иметь важное значение в разработке новых средств повышения бодрствования. Затронут вопрос существования сайта связывания небензодиазепиновых лигандов (производных пиразолхинолинонов) в интерфейсе « α/β -», а также бензодиазепинов – в интерфейсе « β/γ -» и « α/δ -», однако отсутствие в открытом доступе комплексов с лигандами в этих интерфейсах затрудняет использование этих знаний в разработке новых лекарственных средств.

Показано, что в трансмембранной области (ТМД-домен) рецептора локализованы низкоаффинные сайты связывания бензодиазепинов (интерфейс « β/α -»), барбитуратов (интерфейсы « γ/β -» и « α/β -»), общих анестетиков (интерфейс « β/α -»), позитивных и негативных нейростероидных модуляторов (межсубъединичный сайт в интерфейсе « β/α -» и внутрисубъединичные сайты в « β » и « α »-субъединицах).

Проведенный анализ комплексов позволил выявить обязательные и частые позиции аминокислотных остатков мишени, с которыми происходит взаимодействие лигандов разных классов, что может быть использовано для построения оценочных функций (по подобию паттерна взаимодействия с референтными лигандами) для селекции результатов молекулярного докинга потенциальных лекарственных средств с этими областями связывания.

При сравнении агонистов и антагонистов ГАМК-сайта установлены дополнительные позиции связывания агонистов - $\alpha 118$, $\beta 97$, $\beta 156$ и $\beta 205$, не наблюдаемые в случае конкурентных антагонистов (бикукуллина). Вероятно, отсутствие этих связей препятствует формированию конформационных изменений, вызывающих активацию рецептора.

При сравнении паттернов взаимодействия с рецептором агонистов и антагонистов высокоаффинного бензодиазепинового сайта в « $\alpha + / \gamma -$ » интерфейсе ECD-домена помимо совпадающих позиций для агонистов были характерны контакты с $\gamma 56$, $\alpha 206$, $\alpha 102$, $\alpha 203$, а для антагонистов – с $\gamma 79$, $\alpha 159$, $\gamma 142$, что, по-видимому, следует учитывать при оценке результатов докинга новых лигандов этого сайта. Среди лигандов со свойствами антагонистов бензодиазепинов (DMCD, флумазенил и Ro154513) только DMCD взаимодействовал с низкоаффинным сайтом, что подкрепляет представления о его активности как полного обратного агониста бензодиазепинов [37].

Массив литературных данных постулирует современные представления о модели фармакологических взаимодействий нейростероидных лигандов с тремя отдельными сайтами ГАМК_AР, включая межсубъединичный « $\beta + / \alpha -$ » и два внутрисубъединичных (α и β), с вариативным результирующим эффектом (позитивная или негативная аллостерическая модуляция или конкурентный антагонизм). Представления о существенном влиянии липидного окружения рецептора на выраженность и кинетику связывания нейростероидов с ГАМК_AР [77, 78], а также об их низкой собственной аффинности к белковому компоненту рецепторно-липидного комплекса определяют большой вес критерия липофильности при анализе результатов докинга новых соединений с потенциальной нейростероидной активностью.

В настоящее время модели ГАМК_AР с нейростероидными лигандами доступны только в виде химерных структур с TMD-доменами от $\alpha 5$ - или $\alpha 1$ -субъединицы, в которых связывание идентифицировано в аналоге « $\beta + / \alpha -$ » межсубъединичного сайта (селективен к позитивным модуляторам), и в « α »-внутрисубъединичном сайте (на примере негативного модулятора прегненалона сульфат). С учетом неизученности вопроса реализации негативного модулирующего эффекта сульфатированных нейростероидов [68], вышеперечисленный доступный набор мишеней пригоден преимущественно для поиска соединений с положительной аллостерической модулирующей активностью.

По факту связывания в « $\beta + / \alpha -$ » интерфейсе TMD-домена сразу нескольких групп лигандов (бензодиазепины, общие анестетики и нейростероиды) установлено, что сайты связывания бензодиазепинов и общих анестетиков в TMD-домene перекрываются, но не идентичны. Существенные различия в локализации сайтов связывания нейростероидов (как НАМ, так и ПАМ) и бензодиазепинов отмечены в TMD-домene, а отсутствие перекрывания сайтов связывания нейростероидов и общих анестетиков в « $\beta + / \alpha -$ » интерфейсе TMD-домена подтверждается и взаимным потенцированием их эффектов [59].

Таким образом, доступные на сегодняшний день трехмерные структуры ГАМК_AР в комплексе с лигандами разных фармакологических группы с учетом выявленных особенностей и ограничений обеспечивают возможность поиска на их основе новых физиологически активных веществ методами молекулярного моделирования и докинга.

Литература.

1. Olsen R.W., Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. Pharmacological reviews. 2008; 60(3): 243-260.
2. D'Hulst C., Attack J.R., Kooy R.F. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. Drug discovery today. 2009; 14(17-18): 866-875.
3. Sieghart W., Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Current topics in medicinal chemistry. 2002; 2(8): 795-816.
4. Belelli D., Harrison N.L., Maguire J. et al. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. Journal of Neuroscience. 2009; 29(41): 12757-12763.
5. Lee V., Maguire J. The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. Frontiers in neural circuits. 2014; 8: 3.
6. Feng H.J., Kang J.Q., Song L. et al. Delta subunit susceptibility variants E177A and R220H associated with complex epilepsy alter channel gating and surface expression of $\alpha 4\beta 2\delta$ GABAA receptors. Journal of Neuroscience. 2006; 26(5): 1499-1506.
7. Brickley S.G., Mody I. Extrasynaptic GABAA receptors: their function in the CNS and implications for disease. Neuron. 2012; 73(1): 23-34.
8. Meltzer-Brody S., Colquhoun H., Riesenberger R. et al. Brexanolone injection in post-partum depression: two multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. Lancet. 2018; 392(10152): 1058-1070.
9. Kaur K.H., Baur R., Sigel E. Unanticipated structural and functional properties of delta-subunit-containing GABAA receptors. Journal of biological chemistry. 2009; 284(12): 7889-7896.
10. Fritschy J.M., Brünig I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. Pharmacology & therapeutics. 2003; 98(3): 299-323.
11. Meera P., Wallner M., Otis T.S. Molecular basis for the high THIP/gaboxadol sensitivity of extrasynaptic GABAA receptors. Journal of neurophysiology. 2011; 106(4): 2057-2064.
12. Baumann S.W., Baur R., Sigel E. Individual properties of the two functional agonist sites in GABA A receptors. The Journal of Neuroscience. 2003; 23(35): 11158-11166.

13. Padgett C.L., Hanek A.P., Lester H.A. et al. Unnatural amino acid mutagenesis of the GABA(A) receptor binding site residues reveals a novel cation-pi interaction between GABA and beta 2Tyr97. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27(4): 886-892.
14. Newell J.G., McDevitt R.A., Czajkowski C. Mutation of glutamate 155 of the GABAA receptor beta2 subunit produces a spontaneously open channel: a trigger for channel activation. *Journal of Neuroscience*. 2004; 24(50): 11226-11235.
15. Lummis S.C. Locating GABA in GABA receptor binding sites. *Biochemical Society Transactions*. 2009; 37: 1343-1346.
16. Lee H.J., Absalom N.L., Hanrahan J.R. et al. A pharmacological characterization of GABA, THIP and DS2 at binary alpha4beta3 and beta3delta receptors: GABA activates beta3delta receptors via the beta3(+)-delta(-) interface. *Brain research*. 2016; 1644: 222-230.
17. Sente A., Desai R., Naydenova K. et al. Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signalling. *Nature*. 2022; 604(7904): 190-194.
18. Storustovu S.I., Ebert B. Pharmacological characterization of agonists at delta-containing GABAA receptors: functional selectivity for extrasynaptic receptors is dependent on the absence of gamma2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006; 316(3): 1351-1359.
19. Brown N., Kerby J., Bonnert T.P. et al. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *British journal of pharmacology*. 2002; 136(7): 965-974.
20. Salentin S., Schreiber S., Haupt V.J. et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*. 2015; 43: 443-447.
21. Phulera S., Zhu H., Yu J. et al. Cryo-EM structure of the benzodiazepine-sensitive $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$ tri-heteromeric GABAA receptor in complex with GABA. *Elife*. 2018; 7: e39383.
22. Bekkers J.M. Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science*. 1993; 261(5117): 104-106.
23. Saras A., Gisselmann G., Vogt-Eisele A.K. et al. Histamine action on vertebrate GABAA receptors: direct channel gating and potentiation of GABA responses. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(16): 10470-10475.
24. Saper C.B., Scammell T.E., Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005; 437(7063):1257-1263.
25. Bianchi M.T., Clark A.G., Fisher J.L. The wake-promoting transmitter histamine preferentially enhances α -4 subunit-containing GABAA receptors. *Neuropharmacology*. 2011; 61(4): 747-752.

26. Sigel E., Ernst M. The benzodiazepine binding sites of GABAA receptors. Trends in pharmacological sciences. 2018; 39(7): 659-671.
27. Richter L., De Graaf C., Sieghart W. et al. Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. Nature chemical biology. 2012; 8(5): 455-464.
28. Wafford K.A., Bain C.J., Whiting P.J., Kemp J.A. Functional comparison of the role of α subunits in recombinant human γ -aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors. Molecular pharmacology. 1993; 44(2): 437-442.
29. Wong G., Skolnick P. High affinity ligands for 'diazepam-insensitive' benzodiazepine receptors. European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology. 1992; 225(1): 63-68.
30. Sigel E., Steinmann M.E. Structure, function and modulation of GABAA receptors. Journal of Biological Chemistry. 2012; 287(48): 40224-40231.
31. Ramerstorfer J., Furtmüller R., Sarto-Jackson I. et al. The GABAA receptor α + β - interface: a novel target for subtype selective drugs. Journal of Neuroscience. 2011; 31(3): 870-877.
32. Baur R., Tan K.R., Lüscher B.P. et al. Covalent modification of GABAA receptor isoforms by a diazepam analogue provides evidence for a novel benzodiazepine binding site that prevents modulation by these drugs. Journal of neurochemistry. 2008; 106(6): 2353-2363.
33. Wongsamitkul N., Maldifassi M.C., Simeone X. et al. α subunits in GABAA receptors are dispensable for GABA and diazepam action. Scientific reports. 2017; 7(1): 15498.
34. Sente A., Desai R., Naydenova K. et al. Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signalling. Nature. 2022; 604(7904): 190-194.
35. Olsen R.W., Hancher H.J., Meera P., Wallner M. GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. Alcohol. 2007; 41(3): 201-209.
36. Maldifassi M.C., Baur R., Sigel E. Molecular mode of action of CGS 9895 at $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA receptors. Journal of neurochemistry. 2016; 138(5): 722–730.
37. Evans A.K., Lowry C.A. Pharmacology of the β -Carboline FG-7142, a Partial Inverse Agonist at the Benzodiazepine Allosteric Site of the GABAA Receptor: Neurochemical, Neurophysiological, and Behavioral Effects. CNS Drug Reviews. 2007; 13: 475-501.
38. Löscher W., Rogawski M.A. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. Epilepsia. 2012; 53: 12-25.
39. Zhu S., Noviello C.M., Teng J. et al. Structure of a human synaptic GABAA receptor. Nature. 2018; 559(7712): 67-72.
40. Chiara D.C., Jayakar S.S., Zhou X. et al. Specificity of intersubunit general anesthetic-binding sites in the transmembrane domain of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. Journal of Biological Chemistry. 2013; 288(27), 19343-19357.

41. Zeller A., Arras M., Jurd R., Rudolph U. Identification of a molecular target mediating the general anesthetic actions of pentobarbital. *Molecular pharmacology*. 2007; 71(3): 852-859.
42. Kim J.J., Gharpure A., Teng J. et al. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature*. 2020; 585(7824): 303-308.
43. Gropper M.A., Miller R.D., Cohen N.H. et al. *Miller's anesthesia*. 2020.
44. Forman S.A. Clinical and molecular pharmacology of etomidate. *Anesthesiology*. 2011; 114: 695-707.
45. Belelli D., Lambert J.J., Peters J.A. et al. The interaction of the general anesthetic etomidate with the γ -aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94(20): 11031-11036.
46. Siegwart R., Jurd R., Rudolph U. Molecular determinants for the action of general anesthetics at recombinant $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ -aminobutyric acidA receptors. *Journal of neurochemistry*. 2002; 80(1): 140-148.
47. Li G.D., Chiara D.C., Sawyer G.W. et al. Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26(45): 11599-11605.
48. Krasowski M.D., Koltchine V.V., Rick C.E. et al. Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the γ -aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Molecular pharmacology*. 1998; 53(3): 530-538.
49. Jayakar S.S., Zhou X., Chiara D.C. et al. Multiple propofol-binding sites in a γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR) identified using a photoreactive propofol analog. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(40): 27456-27468.
50. Bali M., Akabas M.H. Gating-induced conformational rearrangement of the γ -aminobutyric acid type A receptor β - α subunit interface in the membrane-spanning domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(33): 27762-27770.
51. Jayakar S.S., Zhou X., Chiara D.C. et al. Identifying drugs that bind selectively to intersubunit general anesthetic sites in the $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ GABAAR transmembrane domain. *Molecular pharmacology*. 2019; 95(6): 615-628.
52. Yip G.M., Chen Z.W., Edge C.J. et al. A propofol binding site on mammalian GABAA receptors identified by photolabeling. *Nature chemical biology*. 2013; 9(11): 715-720.
53. Jurd R., Arrasa M., Lambert S. et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABAA receptor $\beta 3$ subunit. *The FASEB Journal*. 2003; 17(2): 250-252.
54. Reynolds D.S., Rosahl T.W., Cirone J. et al. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABAA receptor isoforms. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23(24): 8608-8617.

55. Sieghart W., Savić M.M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABAA receptor subtype- and function-selective ligands: key issues in translation to humans. *Pharmacological reviews*. 2018; 70(4): 836–878.
56. Krasowski M.D., Hong X., Hopfinger A.J., Harrison N.L. 4D-QSAR analysis of a set of propofol analogues: mapping binding sites for an anesthetic phenol on the GABAA receptor. *Journal of medicinal chemistry*. 2002; 45(15): 3210-3221.
57. Krasowski M.D., Nishikawa K., Nikolaeva N. et al. Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABAA receptor beta subunit controls a binding cavity for propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacology*. 2001; 41: 952-964.
58. Eaton M.M., Germann L.A., Arora R. et al. Multiple non-equivalent interfaces mediate direct activation of GABAA receptors by propofol. *Current Neuropharmacology*. 2016; 14(7): 772-780.
59. Li G.D., Chiara D.C., Cohen J.B., Olsen R.W. Neurosteroids Allosterically Modulate Binding of the Anesthetic Etomidate to γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 11771-11775.
60. Akk G., Bracamontes J.R., Covey D.F. et al. Neuroactive steroids have multiple actions to potentiate GABAA receptors. *The Journal of Physiology*. 2004; 558(1): 59-74.
61. Lan N.C., Gee K.W., Bolger M.B., Chen J.S. Differential responses of expressed recombinant human gamma-aminobutyric acidA receptors to neurosteroids. *Journal of neurochemistry*. 1991; 57(5): 1818-1821.
62. Akk G., Germann A.L., Sugawara Y. et al. Enhancement of muscimol binding and gating by allosteric modulators of the GABAA receptor: relating occupancy to state functions. *Molecular pharmacology*. 2020; 98(4): 303-313.
63. Sapp D.W., Witte U., Turner D.M. et al. Regional variation in steroid anesthetic modulation of [35S] TBPS binding to gamma-aminobutyric acidA receptors in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992; 262(2): 801-808.
64. Sugawara Y., Cheng W.W., Bracamontes J.R. et al. Site-specific effects of neurosteroids on GABAA receptor activation and desensitization. *eLife*. 2020; 9: e55331.
65. Wang M., He Y., Eisenman L.N. et al. 3beta-hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA(A) receptor antagonists. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22(9): 3366-3375.
66. Chen Z.W., Bracamontes J.R., Budelier M.M. Multiple functional neurosteroid binding sites on GABAA receptors. *PLoS Biol*. 2019; 17(3): e3000157.

67. Jayakar S.S., Chiara D.C., Zhou X. et al. Photoaffinity labeling identifies an intersubunit steroid-binding site in heteromeric GABA type A (GABAA) receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2020; 295(33): 11495-11512.
68. Laverty D., Thomas P., Field M. et al. Crystal structures of a GABAA-receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. *Nature structural & molecular biology*. 2017; 24(11): 977-985.
69. Miller P.S., Scott S., Masiulis S. Structural basis for GABAA receptor potentiation by neurosteroids. *Nature structural & molecular biology*. 2017; 24(11): 986-992.
70. Chen Q., Wells M.M., Arjunan P. et al. Structural basis of neurosteroid anesthetic action on GABAA receptors. *Nature Communications*. 2018; 9(1): 3972.
71. Ziemba A.M., Szabo A., Pierce D.W. Alphaxalone binds in inner transmembrane beta+-alpha- interfaces of alpha1beta3gamma2 gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Anesthesiology*. 2018; 128(2): 338-351.
72. Germann A.L., Pierce S.R., Tateiwa H. et al. Intrasubunit and intersubunit steroid binding sites independently and additively mediate $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptor potentiation by the endogenous neurosteroid allopregnanolone. *Molecular pharmacology*. 2021; 100(1): 19-31.
73. Sugasawa Y., Bracamontes J.R., Krishnan K. et al. The molecular determinants of neurosteroid binding in the GABA(A) receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2019; 192: 105383.
74. Hosie A.M., Wilkins M.E., da Silva H.M., Smart T.G. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*. 2006; 444(7118): 486-489.
75. Akk G., Li P., Bracamontes J. et al. Mutations of the GABA-A receptor $\alpha 1$ subunit M1 domain reveal unexpected complexity for modulation by neuroactive steroids. *Molecular pharmacology*. 2008; 74(3): 614-627.
76. Wang L., Covey D.F., Akk G., Evers A.S. Neurosteroid Modulation of GABAA Receptor Function by Independent Action at Multiple Specific Binding Sites. *Current Neuropharmacology*. 2022; 20(5): 886-890.
77. Chisari M., Eisenman L.N., Krishnan K. et al. The influence of neuroactive steroid lipophilicity on GABAA receptor modulation: Evidence for a low-affinity interaction. *Journal of neurophysiology*. 2009; 102(2): 1254-1264.
78. Li P., Shu H.J., Wang C. et al. Neurosteroid migration to intracellular compartments reduces steroid concentration in the membrane and diminishes GABA-A receptor potentiation. *The Journal of Physiology*. 2007; 584(3): 789-800.

79. Sooksawate T., Simmonds M.A. Influence of membrane cholesterol on modulation of the GABA(A) receptor by neuroactive steroids and other potentiators. *British journal of pharmacology*. 2001; 134(6): 1303-1311.
80. Lee A.G. Interfacial binding sites for cholesterol on GABAA receptors and competition with neurosteroids. *Biophysical Journal*. 2021; 120(13): 2710-2722.
81. Budelier M.M., Cheng W.W.L., Chen Z.W. et al. Common binding sites for cholesterol and neurosteroids on a pentameric ligand-gated ion channel. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2019; 1864(2) :128-136.