

ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТЕРОВ ГАМК И ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА КРИО-ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 3D-СТРУКТУРЫ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ГАМК ТРАНСПОРТЕРА

Н. А. Лукашенко

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, kapustsin@bsu.by
Научный руководитель — М. А. Капустин*

В данной работе рассмотрена базовая классификация нейротрансмиттеров (НТ) и, в частности, классификация переносчиков гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Описана локализация транспортеров ГАМК в клетках центральной нервной системы, показана роль аномалий структуры и функции транспортера ГАМК в генезе патологических процессов. Рассмотрен общий подход к анализу структуры везикулярного транспортера ГАМК методом крио-электронной микроскопии.

Ключевые слова: нейротрансмиттеры; везикулярный транспорт; ГАМК; транспортеры; крио-электронная микроскопия; структура белка.

Нейротрансмиттеры (НТ) представлены главным образом низкомолекулярными соединениями, базово относящимися к 5 группам [1, 3]. 1. Аминокислоты: глутамат (анион глутаминовой кислоты) – основной возбуждающий нейромедиатор; гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) – основной тормозной нейромедиатор центральной нервной системы. 2. Пептиды: окситоцин – выполняет в головном мозге роль нейротрансмиттера, участвует в регуляции социального поведения, привязанности, полового размножения; эндорфины – тормозят передачу сигналов от болевых рецепторов, формируют состояние эйфории. 3. Моноамины: эпинефрин; гистамин; дофамин; серотонин. 4. Пурины: аденозин – играет роль нейромодулятора, участвует в регуляции сна; аденозинтрифосфорная кислота – принимает участие в передаче сигналов от сенсорных систем, в сигналинге между нейронами и глиальными клетками. 5. Ацетилхолин – принимает участие в передаче сигналов в синапсах как в центральном, так и в периферическом отделах нервной системы, вовлечен в процессы формирования памяти и когнитивных функций.

Синаптическая передача сигналов включает захват клеткой нейромедиатора (НМ), выделившегося в синаптическую щель при инициации передачи сигнала. НМ синтезируются в цитоплазме и для нормального функционирования синаптической передачи должны транспортироваться в синаптические пузырьки. Поэтому клетке

необходимо осуществлять регулируемый экзоцитоз, сопряженный с формированием и транспортом везикул, заполненных НМ [1].

Для каждого из этих процессов (трансмембранный перенос НМ и везикулярный транспорт) существуют свои транспортные системы, обладающие различной локализацией в клетках нервной ткани. Для ряда НТ (ацетилхолин, соединения группы моноаминов и пр.) идентифицированы белки – везикулярные транспортеры. Для многих транспортеров установлены гены, кодирующие первичную структуру белка и с использованием программного обеспечения рассчитана пространственная структура *in-silico*. С использованием методов рентгеноструктурного анализа, ЯМР и крио-электронной микроскопии установлена структура некоторых белков-транспортеров [3].

По природе переносимых субстратов, представляющих собой растворенные низкомолекулярные соединения, транспортеры НТ входят в состав суперсемейства SLC (solute carrier) – транспортеров растворенных веществ [1, 3]. Суперсемейство SLC транспортеров включает около 68 семейств, насчитывающих около 400 транспортеров. Многие из них обладают перекрестной субстратной специфичностью (по классам органических и неорганических соединений). Так, например, транспорт аминокислот может осуществляться членами семейств SLC1, SLC3/7, SLC6, SLC15, SLC16, SLC17, SLC32, SLC36, SLC38 и SLC43. Другие представители суперсемейства SLC регулируют потоки ионов на плазматической мембране или транспорт растворенных веществ в клеточные органеллы и из них. Для некоторых транспортеров семейства SLC физиологическая функция еще не определена. Внутри суперсемейства SLC наблюдается высокая вариативность и разнообразие пространственной структуры [3].

В связи с участием в выполнении ключевых физиологических функций SLC транспортеры являются важными мишенями для разработки лекарственных субстанций. Поиск таких лекарственных соединений основан на обработке и анализе данных о мишенях их действия – SLC-переносчиках, что требует описания их структуры, динамики и механизма взаимодействия с низкомолекулярными лигандами и ионами. Определение структуры SLC транспортеров и их гомологов у человека в сочетании с улучшенными вычислительными возможностями и методами прогнозирования позволит эффективно применять вычислительные методы разработки лекарств для модуляции функций транспортеров и коррекции патофизиологических состояний [3].

ГАМК является основным тормозным нейромедиатором в центральной нервной системе. Синтез ГАМК происходит в ГАМК-продуцирующих нейронах путем ферментативного декарбоксилирования глутамата [1]. Синтезированная ГАМК затем депонируется в везикулах, в

которые она транспортируется везикулярным транспортером ГАМК (VGAT). ГАМК высвобождается из этих везикул в синаптическую щель путем экзоцитоза. Этот процесс регулируется потенциал-зависимыми Ca^{2+} каналами, активирующимися при деполяризации. ГАМК сигналинг terminates путем удаления ГАМК из синаптической щели в ходе обратного захвата в соседние пресинаптические нейроны и глиальные клетки транспортерами ГАМК (GATs). GATs представляют собой мембраносвязанные симпортеры ГАМК/ Na^+ , принадлежащие к семейству SLC-6. Будучи Na^+/Cl^- зависимыми переносчиками, они обеспечивают котранспорт двух ионов Na^+ и одного иона Cl^- [1, 3]. Показано, что четыре изоформы GAT имеют различное распределение в ЦНС. GAT1 – наиболее распространенный транспортер из четырех подтипов GATs – в основном присутствует на пресинаптических ГАМК эргических нейронах, тогда как GAT3 находится в астроцитах. Иммуноцитохимические исследования показали, что GAT2 в основном локализован в лептоменингеальных клетках [1, 3].

Активность ГАМК-транспортеров, расположенных преимущественно на нейронах (GAT-1), клетках глии (GAT-3) или на клетках обоих типов (GAT-2, BGT-1), служит для прекращения фазовой ГАМК-эргической передачи, поддержания низких внеклеточных концентраций ГАМК, и позволяет повторно использовать ГАМК нейронами [1].

GAT1 является преобладающим транспортером ГАМК в головном мозге и встречается преимущественно на окончаниях пресинаптических нейронов и в гораздо меньшей степени на дистальных отростках астроцитов, расположенных вблизи окончаний аксонов. GAT3 располагается преимущественно на дистальных окончаниях астроцитов, близких к ГАМК-эргическому синапсу. BGT1 занимает экстрасинаптическую локализацию, возможно, вместе с GAT2, экспрессия которого в мозге низка [1]. Разработка высокоселективных лигандов к GATs может быть особенно полезна для лечения таких патологий как шизофрения, болезнь Паркинсона, эпилепсия, поскольку было показано, что при этих заболеваниях GATs играют важную патофизиологическую роль [3]. Установлено, что ингибиторы GATs обладают противосудорожными свойствами. На основе проведенного скрининга разработан противоэпилептический лекарственный препарат «тиагабин» – ингибитор GAT1 [3].

Везикулярный транспортер ГАМК (VGAT) (также называемый везикулярным ингибирующим переносчиком аминокислот (VIAAT)) является единственным представителем семейства SLC32 и транспортирует ГАМК и глицин в синаптические везикулы [1, 3]. VGAT входит в состав группы транспортеров аминокислот-полиаминов-органокатионов (APC), состоящей из семейств транспортеров SLC32,

SLC36 и SLC38.VGAT действует как антипортер для ГАМК/глицина и протонов. Накопление ГАМК и глицина внутри везикул обусловлено как химическим (ΔpH), так и электрическим ($\Delta \psi$) компонентами протонного электрохимического градиента ($\Delta \mu H^+$), создаваемого вакуолярной H^+ -АТФазой. Также имеются работы, показывающие, что VGAT является котранспортером Cl^- /GABA [1].

Пространственная атомарная структура VGAT окончательно не установлена. Первоначально предполагалось, что в структуре транспортера присутствует 10 трансмембранных сегментов (ТМ) с цитоплазматическими N- и C-концами. Однако впоследствии сообщалось об альтернативной структуре с 9 ТМ, в которой N-конец обращен к цитоплазме, а C-конец расположен в люмене синаптического пузырька [1].

В связи с этим актуальным представляется разработка и оптимизация техники анализа структуры VGAT для получения 3D-модели атомарной структуры транспортера с последующим определением потенциальных сайтов модуляции его активности.

Перспективным для определения 3D-структуры белков является метод криоэлектронной микроскопии (Cryo-ЕМ), принцип которого предполагает использования двумерных изображений, содержащих минимальную информацию, для генерации трехмерной структуры высокого разрешения. Для получения двумерных изображений применяют два подхода: анализ единичных частиц и криоэлектронная томография. В первом случае изучаемый объект (изолированную одиночную молекулу) сканируют под различными углами к электронному пучку, получая ряд двумерных изображений. Во втором случае получают изображения двумерных проекций тысяч единиц изучаемого объекта (молекулы), ориентированных случайным образом, которые затем сортируют и усредняют. В большинстве современных приложений криоэлектронной микроскопии используется комбинация обоих методов. С использованием Cryo-ЕМ возможно получить 3D-структуры с разрешением в 3,5 Å высокого качества и без артефактов, возможных иметь место быть при применении метода рентгеноструктурного анализа [3].

Библиографические ссылки

1. Structure, function, and plasticity of GABA transporters / A. Scimemi // Front. Cell. Neurosci. 2014. Vol. 8. P. 1–14.
2. Principles of cryo-EM single-particle image processing / F. J. Sigworth // Microscopy. 2016. Vol. 65, iss. 1. P. 57–67.
3. Visualizing GABA transporters in vivo: an overview of reported radioligands and future directions / N. Knippenberg [et al.] // EJNMMI Res. 2023. Vol. 13, iss. 42. P. 1–21.