



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Punktmutationen auf die Modulation von  
GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch ausgewählte Liganden der  
Benzodiazepin-Bindungsstelle

Verfasserin

Neda Panić

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Univ. Prof. Dr. Steffen Hering

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1. Allgemeiner Überblick.....   | 1  |
| 1.1. $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA).....   | 5  |
| 1.1.1. Funktion der GABA.....   | 5  |
| 1.1.2. Biosynthese der GABA.....  | 6  |
| 1.1.3. Metabolismus der GABA.....   | 6  |
| 1.2. GABA-aktivierte Rezeptoren.....  | 7  |
| 1.3. Der GABA <sub>A</sub> -Rezeptor.....   | 8  |
| 1.3.1. Struktur des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors.....   | 8  |
| 1.3.2. Einfluss der Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten auf<br>synaptische und extrasynaptische Übertragung..... | 9  |
| 1.3.3. Verteilung der Untereinheiten im Gehirn und die Häufigkeit einzelner<br>Rezeptor-Subtypen.....                   | 11 |
| 1.3.4. Die GABA-Bindungsstelle.....   | 14 |
| 1.4. Modulatoren von GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren.....   | 17 |
| 1.4.1. Benzodiazepine.....  | 17 |
| 1.4.1.1. Benzodiazepin-Bindungsstelle.....  | 17 |
| 1.4.1.2. Wirkmechanismus.....   | 21 |
| 1.4.1.3. Toleranzentwicklung.....   | 22 |
| 1.4.1.4. GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Subtypen vermitteln die verschiedenen<br>Effekte der Benzodiazepine.....           | 24 |
| 1.4.1.4.1. Sedierung.....   | 26 |
| 1.4.2. Z-drugs.....   | 27 |
| 1.4.3. Barbiturate.....   | 30 |
| 1.4.4. Anästhetika.....   | 32 |
| 1.4.5. Neurosteroiden.....  | 33 |
| 1.4.6. Alkohol.....   | 35 |
| 1.4.7. Diverse Modulatoren bzw. GABA <sub>A</sub> -Rezeptorliganden.....  | 37 |
| 1.4.7.1. Furosemid.....   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.7.2. Loreclezol.....   | 38 |
| 1.4.7.3. Zink.....   | 38 |
| 1.4.7.4. $\beta$ -Carboline.....   | 40 |
| 1.4.7.5. Mefenaminsäure.....   | 41 |
| 1.5. GABA <sub>B</sub> -Rezeptoren.....                                    | 42 |
| 2. Methoden.....   | 44 |
| 3. Problemstellung und Zielsetzung.....                                    | 48 |
| 3.1. Problemstellung.....  | 48 |
| 3.2. Zielsetzungen.....  | 49 |
| 4. Ergebnisse.....   | 50 |
| 4.1. Charakterisierung der GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Subtypen.....       | 50 |
| 4.2. Modulation von I <sub>GABA</sub> durch die ausgewählten Liganden..... | 53 |
| 4.2.1. Zopiclon.....   | 54 |
| 4.2.2. Diazepam.....   | 56 |
| 4.2.3. Clobazam.....   | 58 |
| 5. Diskussion.....   | 60 |
| 6. Zusammenfassung.....  | 63 |
| 7. Summary.....  | 64 |
| 8. Literaturverzeichnis.....   | 65 |
| 9. Lebenslauf.....   | 79 |

## 1. Allgemeiner Überblick

Die Informationsübertragung im zentralen Nervensystem (ZNS) erfolgt durch elektrische und chemische Signalübertragung zwischen Nervenzellen und ihren Zielzellen (Klinke und Silbernagel, 2001). Neurotransmitter werden aus einem präsynaptischen Neuron in den synaptischen Spalt freigesetzt. Sie binden an postsynaptische Rezeptoren und übertragen somit das physiologische Signal (Thews et al., 1999; Rang et al., 2003; Kaeser, 2011). Die klassischen Neurotransmitter, wie  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamat oder Acetylcholin aktivieren Ionenkanäle und vermitteln somit die synaptische Übertragung (Fon und Edwards, 2001; Rang et al., 2003, Aktories et al., 2010). Im Gegensatz dazu aktivieren Neuromodulatoren, wie Monoamine und Peptide, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Second-Messenger aktivieren (Fon und Edwards, 2001; Muller-Esterl, 2004).

Verglichen mit anderen Signalübertragungsformen, z. B. elektrischer Übertragung, ermöglicht die synaptische Übertragung höhere Flexibilität und größere Steuerungsmöglichkeiten. Die Stärke des durch Neurotransmission entstandenen chemischen Signals wird kaum beeinträchtigt. Das Signal kann in seiner Intensität, seiner Geschwindigkeit, in der Wirkung auf das Membranpotential und in der Modulation der Second-Messenger-Systeme variieren. Diese Flexibilität trägt zur synaptischen Plastizität bei und beeinflusst unter anderem Lern- und Gedächtnisprozesse. Die für die Neurotransmitterfreisetzung verantwortlichen biochemischen Prozesse spielen eine entscheidende Rolle bei der Informationsübertragung (Fon und Edwards, 2001).

Die ersten Einblicke in die Funktionsweise der Neurotransmitterfreisetzung lieferte Bernard Katz in seiner Arbeit über die Neurotransmission an der neuromuskulären Endplatte eines Frosches. Katz zeigte, dass die Freisetzung in Päckchen oder Quanten erfolgt (Fon und Edwards, 2001; Rang et al., 2003). Diese Päckchen enthalten Tausende von Neurotransmittermolekülen (Fon und Edwards, 2001). Ein Quantum entspricht der Freisetzung eines einzigen mit Neurotransmitter beladenen synaptischen Vesikels (SV) (Heuser, 1989). In SVs liegen Neurotransmitter in hohen Konzentrationen vor (Liu und Edwards, 1997). Synaptische Vesikel häufen sich in der unmittelbaren Nähe der Neurotransmitterfreisetzungstelle in präsynaptischen Neuronen an (Colakos und Scheller,

1996; Pang und Sudhof, 2010). Neuronale Aktivität löst Exozytose aus, SVs verschmelzen mit der präsynaptischen Membran und es kommt zu Neurotransmitterfreisetzung (Fon und Edwards, 2001; Rang et al., 2003; Pang und Sudhof, 2010).

Die Neurotransmitterfreisetzung umfasst zwei sich überlappende Prozesse, den Neurotransmitter- und den SV-Zyklus. Der Neurotransmitterzyklus umfasst Biosynthese, Speicherung, Wiederaufnahme und Abbau der Neurotransmitter. Verglichen mit der Konzentration im Cytoplasma sind in SVs hohe Neurotransmitterkonzentrationen enthalten. Da die klassischen Neurotransmitter im Cytoplasma entstehen, müssen sie durch aktiven Transport in Speichervesikel aufgenommen werden. Da in vielen Synapsen hohe Exozytoseraten beobachtet werden, ist eine konstante Aufnahme cytoplasmatischer Neurotransmitter in SVs notwendig. Obwohl verschiedene Transmitter de novo synthetisiert werden, kommt es zusätzlich zur Wiederaufnahme freigesetzter Transmitter. Bei der Entstehung neuer Speichervesikel spielt die Wiederaufnahme des Transmitters eine wichtigere Rolle als die Biosynthese (Fon und Edwards, 2001). Die Signalübertragung wird durch den enzymatischen Transmitterabbau und die Entfernung der Transmitter aus dem extrazellulären Raum durch die Wiederaufnahme beendet (Thews et al., 1999; Fon und Edwards, 2001).

Der SV-Zyklus umfasst den Transport der Vesikel zur Nervenendigung, wo es zum Andocken, zur Fusion, Endozytose und zum Recycling kommt (Fon und Edwards, 2001; Sudhof, 2004). Wegen der großen Entfernung vom Zellkörper ist es unmöglich, aus den Bestandteilen bereits freigesetzter Vesikel im Golgi-Apparat neue herzustellen (Fon und Edwards, 2001). In einem wesentlich höheren Ausmaß werden SVs lokal, in Nervenendigungen, recycelt. Der Grund dafür sind hohe Exozytoseraten, die eine effiziente Regenerierung der SVs in den Nervenendigungen benötigen. Dennoch beinhaltet das lokale Recycling die Sortierung der SV Proteine von der Plasmamembran, die Sortierung anderer Proteine, sowie das Andocken der SVs an der Plasmamembran und die durch ein intrazelluläres Signal hervorgerufene Fusion (Fon und Edwards, 2001). Bei diesem intrazellulären Signal handelt es sich normalerweise um eine erhöhte  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Fon und Edwards, 2001; Pang und Sudhof, 2010; Kaeser, 2011).

Läuft entlang eines Axons eine Serie von Aktionspotentialen, erreicht diese schließlich die neuronale Endigungen und depolarisiert den präsynaptischen Bereich. Bei dieser Depolarisation kommt es nicht nur, wie entlang des Axons, zum Einströmen von Natriumionen (Klinke und Silbernagel, 2001). Die Axonmembran verfügt daneben über spannungsabhängige Ca-Kanäle, durch die beim Ankommen eines Aktionspotentials Ca-Ionen in die synaptische Endigung einströmen (Klinke und Silbernagel, 2001; Pang und Sudhof, 2010). Aus dem endoplasmatischen Retikulum kann evtl. zusätzliches Ca freigesetzt werden (Klinke und Silbernagel, 2001).

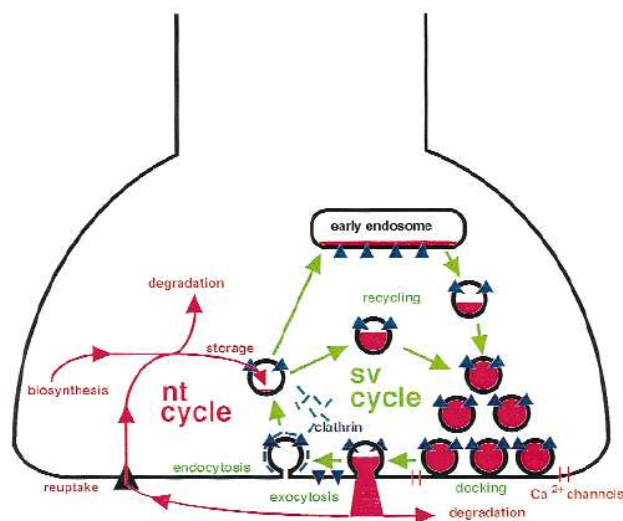
In der Nähe der präsynaptischen Membran liegt in der synaptischen Endigung eine große Zahl synaptischer Vesikel (Klinke und Silbernagel, 2001). Sie bestehen, ähnlich wie die Zellmembran, aus einer Phospholipid- Doppelschicht und enthalten eine Flüssigkeit, die mit dem Transmitter angereichert ist (Klinke und Silbernagel, 2001; Sudhof, 2004).

Die synaptischen Vesikel sind zum größten Teil über das Protein Synapsin an die Aktinfäden des Zytoskeletts fixiert und bilden ein Transmitterreservoir (Klinke und Silbernagel, 2001; Denker und Rizzoli, 2011). Ein kleinerer Teil der Vesikel ist, ebenfalls über spezifische Proteine, an die Innenseite der präsynaptischen Membran angedockt. Nur diese Vesikel stehen unmittelbar für die nächste Transmitterausschüttung zur Verfügung (Klinke und Silbernagel, 2001).

Ist nun nach dem Einlaufen eines Aktionspotenzials in der präsynaptischen Endigung die Ca-Konzentration gestiegen, werden zwei Vorgänge ausgelöst: An den bereits an der präsynaptischen Membran liegenden, „angedockten“ Vesikeln bindet das  $\text{Ca}^{2+}$  wahrscheinlich an das an der Vesikelmembran haftende Protein Synaptotagmin. Dadurch wird die Vesikelmembran entsperrt (Klinke und Silbernagel, 2001; Pang und Sudhof, 2010). In Studien an Synaptotagmin Knock-out-Mäusen wurde gezeigt, dass Synaptotagmin normalerweise die Transmitterfreisetzung hemmt, aber dass die erhöhte intrazelluläre Ca-Konzentration diese Synaptotagmin Wirkung aufhebt (Fon und Edwards, 2001). Dementsprechend vermindert die erhöhte Synaptotagmin-Expression die spontane Neurotransmitterfreisetzung, aber erhöht gleichzeitig die Ca-abhängige Freisetzung (Morimoto et al., 1998). Unter Vermittlung weiterer Proteine verschmilzt die Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran. Es entsteht eine Pore, durch die es zu Exozytose kommt, wobei das Protein rab 3 einen regulierenden Einfluss ausübt. Diese

Exozytose führt zur Ausschüttung des Transmitters in den synaptischen Spalt (Klinke und Silbernel, 2001). Rab-Proteine gehören zur ras-Superfamilie der kleinen Guanosintriphosatasen (GTPase) (Fon und Edwards, 2001). Sie kommen an verschiedenen Membrankompartimenten vor (Gonzalez und Scheller, 1999). An SVs dominiert die rab 3a Isoform (Geppert und Südhof, 1998). Ähnlich wie die anderen rab-Proteine wechselt auch rab 3a zwischen dem löslichen und dem membrangebundenen Zustand. In der GTP-gebundenen Form ist rab 3a mit dem Speichervesikel verknüpft. Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP dissoziiert rab 3a vom Vesikel. Dieser Prozess hängt vom GDI-Protein (guanin nucleotid dissociation inhibitor) ab (Ullrich et al., 1993; Fon und Edwards, 2001).

Der erhöhte Ca-Spiegel in der präsynaptischen Endigung aktiviert ferner die Ca-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II. In der präsynaptischen Endigung phosphoryliert dieses Enzym das Synapsin. Daraufhin werden betroffene Vesikel frei und können zur späteren Verwendung an die präsynaptische Membran andocken (Klinke und Silbernel, 2001).



**Abbildung 1.** Die Abbildung illustriert den Zusammenhang zwischen dem

Neurotransmitterzyklus (NT) und dem Zyklus der synaptischen Vesikel (SV). Zum NT Zyklus gehören Biosynthese, Lagerung, Wiederaufnahme und Abbau (rote Pfeile). Zum Zyklus der SVs gehören: Transport der Vesikel zur Nervenendigungen, wo Andocken, Fusion, Endozytose und Recycling stattfinden (grüne Pfeile) (Fon und Edwards, 2001).

## 1.1. $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)

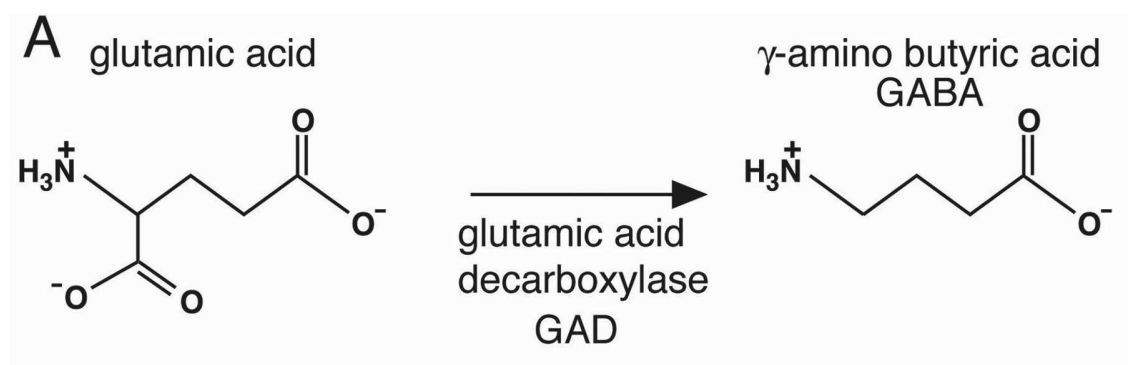
### 1.1.1. Funktion der GABA

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter (Lüddens et al., 1994; Bateson, 2004; Olsen und Sieghart, 2008b). Sie kommt in ca. 30% aller Synapsen im Gehirn vor (Bateson, 2004) und aktiviert sowohl ionotrope GABA Typ A ( $GABA_A$ -Rezeptoren) als auch metabotrope Rezeptoren GABA Typ B ( $GABA_B$ ) Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert (Owens und Kriegstein, 2002).

$GABA_A$ -Rezeptoren sind für  $HCO_3^-$  und  $Cl^-$  permeabel. In reifen Neuronen strömt  $Cl^-$  normalerweise in die Zelle ein und führt zu einer starken Hyperpolarisation. Der  $Cl^-$ -Gradient wird durch  $K^+$ - $Cl^-$ -Cotransporter aufrechterhalten. Interessanterweise kann abhängig von der intrazellulären  $Cl^-$ -Konzentration die Aktivierung von  $GABA_A$ -Rezeptoren auch zu einem  $Cl^-$ -Austrom und daher zu einer Depolarisation führen. Das passiert, z.B., während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung, weil  $K^+$ - $Cl^-$ -Cotransporter noch nicht im genügenden Ausmaß exprimiert sind, um  $Cl^-$  effizient aus der Zelle transportieren zu können (Goetz et al., 2007); aber auch weil die intrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration sehr hoch ist und das Ruhemembranpotenzial  $E_{Cl}$  (in erwachsenen Zellen liegt  $E_{Cl}$  zwischen -60 und -70 mV) signifikant niedriger ist. Eine weitere, wenn auch seltene Möglichkeit depolarisierender Aktivität über  $GABA_A$ -Rezeptoren entsteht wenn  $HCO_3^-$  durch den Chloridkanal des  $GABA_A$ -Rezeptors aus der Zelle strömt (Owens und Kriegstein, 2002).

### 1.1.2. Biosynthese der GABA

GABA wird aus Glutamat unter Katalyse der zwei Glutamat-Decarboxylasen (GAD), GAD65 und GAD67, synthetisiert (Owens und Kriegstein, 2002). Glutamat-Decarboxylase wird im Zentralnervensystem ausschließlich in GABA-Neuronen exprimiert (Forth et al., 2005).

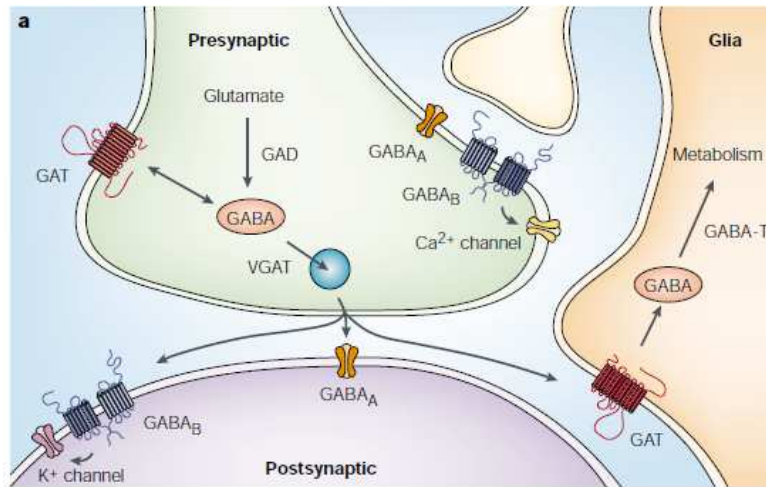


**Abbildung 2.** Synthese von GABA (Jorgensen, 2005)

Die Aufnahme von GABA in synaptische Vesikeln wird durch vesikuläre Neurotransmittertransporter vermittelt. Die Freisetzung aus den Nervenendigungen erfolgt durch Ca-abhängige Exozytose (Owens und Kriegstein, 2002). Die Freisetzung von GABA veranlasst sehr schnell die Hemmung der Impulsübertragung von Neuron zu Neuron (Lüllmann et al., 2006).

### 1.1.3. Metabolismus der GABA

Wie in den Glutamatneuronen gibt es auch in den GABA-Neuronen den Glutamincycclus: Freigesetzte GABA wird zum Teil in Gliazellen transportiert, dort in Glutamin überführt, das Glutamin wird in die GABAergen Nervenendigungen aufgenommen, durch Glutamase zu Glutamat hydrolysiert, das Glutamat schließlich wird wieder zu GABA decarboxyliert. Aus dem Axoplasma wird GABA in Speichervesikel aufgenommen (Forth et al., 2005). Die Aufnahme in benachbarte Gliazellen wird durch membranäre GABA-Transporter (GATs) vermittelt (Owens und Kriegstein, 2002).



**Abbildung 3.** Metabolismus und Transport der GABA (Owens und Kriegstein, 2002).

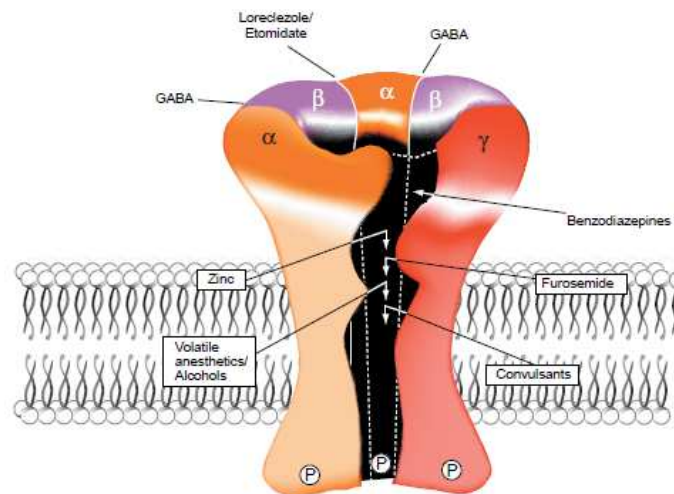
## 1.2. GABA-aktivierte Rezeptoren

Die Effekte von GABA können sowohl durch ionotrope als auch durch metabotrope Rezeptoren vermittelt werden. Diese Rezeptoren sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert (Whiting et al., 1999; Owens und Kriegstein, 2002).

### 1.3. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

#### 1.3.1. Struktur des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors

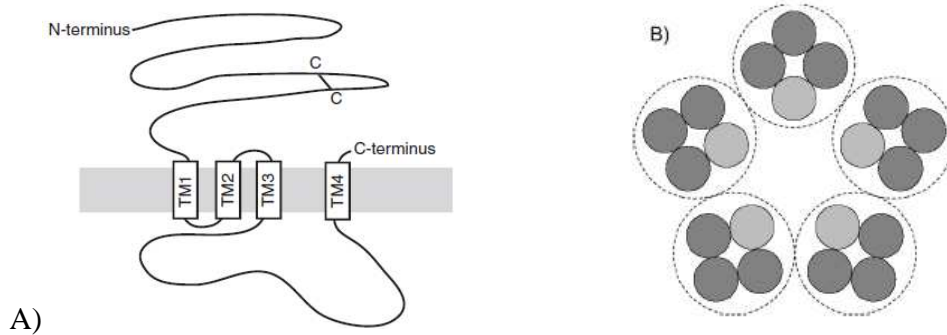
GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gehören zur Familie der LGIC (Cys-loop pentameric ligandgated channel) und besitzen daher strukturelle und funktionelle Homologie mit den anderen Vertretern dieser Familie (nikotinische Acetylcholinrezeptoren nAChRs, Glycinrezeptoren und Serotoninrezeptor Subtyp 3-5-HT<sub>3</sub>) (Owens und Kriegstein, 2002; Ernst et al., 2005; Jones-Davis et al., 2005; Sieghart und Olsen, 2008a). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind aus 5 Untereinheiten aufgebaut, die zu verschiedenen Klassen gehören. Es sind insgesamt 19 in ihrer Aminosäuresequenz verschiedene Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bekannt. Man ordnet sie in 6  $\alpha$  (1- 6), 3  $\beta$  (1- 3), 3  $\gamma$  (1- 3),  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  und 3  $\rho$  (1-3) Untereinheiten.



**Abbildung 4.** Struktur des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (aus Nutt, 2006)

Die fünf Untereinheiten bilden eine Pore. Jede Untereinheit besteht aus einer langen aminoterminalen extrazellulären hydrophilen Domäne, vier transmembranären (M)  $\alpha$ -Helices und einem kurzen extrazellulären Carboxyterminus. Die M2-Helix kleidet die Kanalpore aus (Sieghart und Olsen, 2008a). Ein weiteres typisches hochkonserviertes Motiv ist der sog. Cys-loop in der extrazellulären Domäne, der von 2 Cysteinresten, die

durch 13 Aminosäuren getrennt sind, gebildet wird (Whiting et al., 2006; siehe auch Abbildung 4).



**Abbildung 5.** **A)** Schematische Darstellung einer Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (Goetz et al., 2007); **B)** Schematische Darstellung des Rezeptors nach Kombination durch Untereinheiten (Whiting, 1999; Bateson, 2004)

Die pharmakologischen Eigenschaften der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsubtypen hängen von ihrer jeweiligen Untereinheitenzusammensetzung ab. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Regulation und Expression, und was besonders wichtig ist, Rezeptorsubtypen verschiedener Untereinheitenzusammensetzung werden spezifisch in bestimmten Hirnregionen exprimiert (Sieghart und Olsen, 2008a). Es sind viele Substanzen (u.a. Benzodiazepine, Barbiturate, Anästhetika und Neurosteroiden) bekannt, die als allosterische Modulatoren des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors wirken (Akabas, 2004).

Da sie im Nervensystem weit verbreitet sind, spielen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine wichtige Rolle in allen physiologischen Hirnfunktionen und dienen als Targets für viele Arzneistoffklassen, sowohl zur therapeutischen Anwendung als auch in der Forschung (Sieghart und Olsen, 2008a).

### **1.3.2. Einfluss der Untereinheitenzusammensetzung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf synaptische und extrasynaptische Übertragung**

Viele Faktoren beeinflussen den Typ des durch GABA-Rezeptoren vermittelten inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSCs): die Anzahl der GABA-Rezeptoren

an der Synapse, die Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten (beeinflussen die Kinetik), der Phosphorylierungszustand des Rezeptors, die unterschiedliche Regulation der synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren, das Cl-Umkehrpotential, die Ausschüttung von GABA in den synaptischen Spalt und die Modulation durch Neuromodulatoren (Goetz et. al, 2007).

Eine typische GABA-Freisetzung beträgt 0,3-1,0 mM, wobei der Stimulus in weniger als 1ms erfolgt (Mody und Pearce, 2004). Unter diesen Voraussetzungen werden alle synaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besetzt und es erfolgt eine maximale Antwort. Dabei beeinflusst die Untereinheitenzusammensetzung die Öffnungscharakteristika der Rezeptoren, weiters wie schnell es zu Deaktivierung und Desensibilisierung kommt und welche Effekte allosterische Modulatoren an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ausüben. GABA kann aus dem synaptischen Spalt diffundieren. In diesem Bereich liegt GABA in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen vor. Diese GABA-Konzentrationen sind vor allem entscheidend für die sehr GABA-sensitiven Rezeptoren (Goetz et. al, 2007), da beispielsweise die Empfindlichkeit von  $\alpha_1\beta_3$ - und  $\alpha_1\beta_3\delta$ -Rezeptoren signifikant höher ( $\text{EC}_{50}$  liegt ca. bei 2 bzw. 3,5  $\mu\text{M}$ ) als die Empfindlichkeit von  $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren ist ( $\text{EC}_{50}$  beträgt ca. 13  $\mu\text{M}$ ) (Fischer und Macdonald, 1997). Diese Rezeptorsubtypen können daher auch von diffundierender GABA aktiviert werden. In diesem Fall spricht man von tonischer Aktivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Möhler, 2006).

Die kinetischen Eigenschaften der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren hängen ebenfalls von seiner Untereinheitenzusammensetzung ab. Drei verschiedene kinetische Prozesse steuern den zeitlichen Ablauf der GABA-induzierten Chloridströme: Aktivierung, Desensibilisierung und Deaktivierung des Rezeptors. Während der Aktivierung (Bindung des Agonisten an den Rezeptor) kommt es zu einer schnellen Erhöhung der Stromstärke, da der Kanal sich öffnet. Im nächsten Schritt kommt es, obwohl der Agonist noch immer an den Rezeptor gebunden ist, zu einer Abnahme der Stromstärke. Diese Phase wird als Desensibilisierung bezeichnet und ist vor allem dadurch charakterisiert, dass der Rezeptor nicht erneut aktiviert werden kann und somit unempfindlich gegenüber dem Agonisten erscheint. Deaktivierung beschreibt die Abnahme der Stromamplitude, nach der Abdissoziation des Agonisten vom Rezeptor (Goetz et. al, 2007).

So spielt beispielsweise das Vorhandensein einer dritten Untereinheit ( $\gamma$  oder  $\delta$ ) eine wichtige Rolle bei der Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_1\beta_3$ - und  $\alpha_1\beta_3\delta$ -Rezeptoren langsamer aktivieren als  $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren (Haas und Macdonald, 1999). Auch die  $\alpha$ -Isoform hat einen Einfluss auf die Aktivierung des Rezeptors (Goetz et al., 2007), so öffnen  $\alpha_2\beta_1\gamma_2$ -Rezeptoren schneller als die  $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ -Rezeptoren (Lavoie et al., 1997). Desensibilisierung wird ebenfalls durch die Untereinheitenzusammensetzung beeinflusst (Goetz et al., 2007).  $\alpha_1\beta_3$ - und  $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren desensibilisieren schneller und vollständiger als die  $\alpha_1\beta_3\delta$ -Rezeptoren (Haas und Macdonald, 1999). Die  $\delta$ -Untereinheit vermindert die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Desensibilisierung. Da die  $\delta$ -Untereinheit hauptsächlich extrasynaptisch und perisynaptisch lokalisiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass ihre limitierte Desensibilisierung und hohe Empfindlichkeit für GABA bei der tonischen Inhibierung von Bedeutung ist. Die  $\alpha$ -Untereinheit spielt auch bei der Deaktivierung eine wichtige Rolle.  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren werden sechs- bis siebenmal langsamer deaktiviert als das bei den  $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren der Fall ist (Goetz et al., 2007).

### **1.3.3. Verteilung der Untereinheiten im Gehirn und die Häufigkeit einzelner Rezeptor-Subtypen**

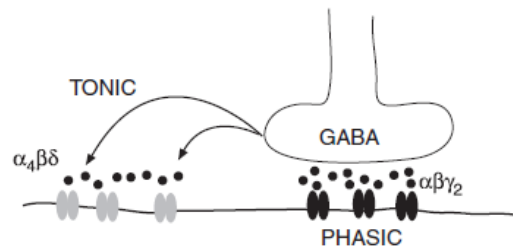
Die aus  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma_2$  aufgebauten Rezeptoren kommen in GABAergen Interneuronen im Hippocampus und anderen Hirnregionen vor, und es ist vermutlich der am häufigsten (siehe Abb. 5) vorkommende GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsubtyp im Gehirn (Sieghart und Olsen, 2008a).

$\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Untereinheit inkorporierende Rezeptoren kommen weniger häufig vor und werden vor allem in Hirnregionen exprimiert, in denen  $\alpha_1$  fehlt oder selten vorkommt. Die  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Untereinheiten werden oft gemeinsam mit  $\beta_3$  und  $\gamma_2$  exprimiert, z. B. in Pyramidenzellen des Hippocampus ( $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ ) und in cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn ( $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ ) oder in auch in der Amygdala ( $\alpha_2\beta_n\gamma_2$ ) (Möhler, 2006). Der  $\alpha_3$ -Rezeptor ist der in monoaminergen und cholinergen Neuronen im basalen Vorhirn am häufigsten vorkommende Rezeptorsubtyp (Gao et al., 1993).

$\alpha_5$ -Rezeptoren werden im Gehirn weniger häufig exprimiert, mit Ausnahme vom Hippocampus, wo sie etwa 15-20 % aller Diazepam-sensitiven  $GABA_A$ -Rezeptoren ausmachen. Sie kommen vorwiegend in Kombination mit  $\beta_3$ - und  $\gamma_2$ -Untereinheiten vor.

$\alpha_4$ -Rezeptoren sind v.a. im Thalamus und Gyrus dentatus zu finden. Etwa 30-50 % aller  $GABA_A$ -Rezeptoren der Granulaschicht im Kleinhirn enthalten  $\alpha_6$ -Untereinheiten. Der Großteil der  $\alpha_6$ -Rezeptoren exprimiert auch  $\gamma_2$ -Untereinheit in der Kombination  $\alpha_6\alpha_1\beta_2\gamma_2$ .

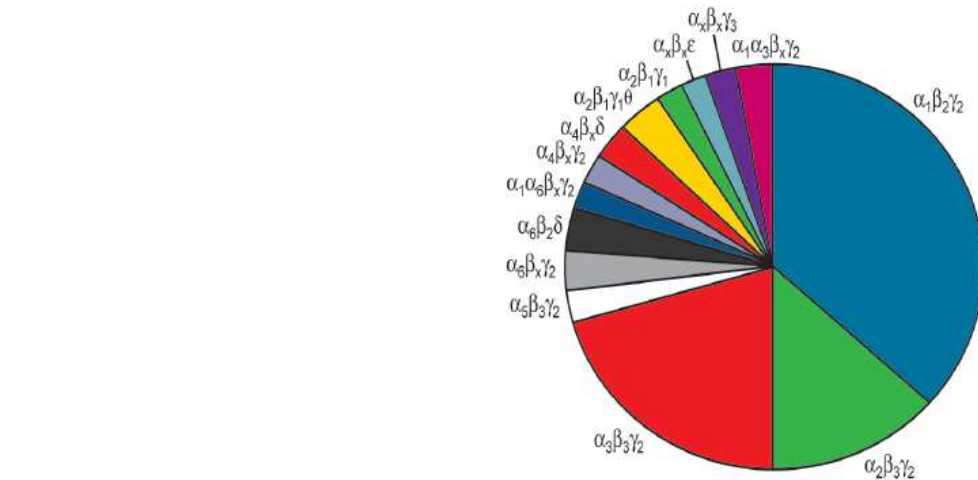
$\delta$ -Untereinheit kommt in extrasynaptischen Rezeptoren im Cerebellum und Gyrus dentatus vor. Diese Rezeptoren sind wegen ihrer hohen Affinität für GABA und langsamen Desensibilisierung für tonische Inhibition verantwortlich (Möhler, 2006).



**Abbildung 6.** Phasische und tonische GABAerge Inhibition (Goetz et al., 2007)

| <b>Zusammensetzung</b>                        | <b>Häufigkeit einzelner Rezeptor-Subtypen</b> | <b>Vorwiegende Regionale und neuronale Lokalisierung</b>                   | <b>Subzelluläre Lokalisierung</b>  |
|---|---|--|--|
| <b><math>\alpha 1\beta 2\gamma 2</math></b>   | 60% aller GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren;      | Großhirnrinde, Hippocampus, Cerebellum, Amygdala, Hirnstamm, usw.          | Synaptisch (Soma und Dendriten) und extrasynaptisch in allen Neuronen mit hoher Expression |
| <b><math>\alpha 2\beta 3\gamma 2</math></b>   | 15-20%  | Großhirnrinde, Hypothalamus, Amygdala, usw.                                | Hauptsächlich synaptisch   |
| <b><math>\alpha 3\beta \gamma 2</math></b>    | 10-15%;                                       | Großhirnrinde, Hippocampus, Amygdala, Kleinhirn...                         | Hauptsächlich synaptisch   |
| <b><math>\alpha 4\beta n\delta</math></b>     | < 5%;   | Gyrus dendatus, Thalamus   | Extrasynaptisch  |
| <b><math>\alpha 5\beta 3\gamma 2</math></b>   | < 5%;   | Hippocampus (Pyramidenzellen), Großhirnrinde, Hypothalamus, Amygdala, usw. | Synaptisch und extrasynaptisch   |
| <b><math>\alpha 6\beta 2,3\gamma 2</math></b> | < 5%;   | Kleinhirn  | Synaptisch und extrasynaptisch   |

**Tabelle 1.** Verteilung der Untereinheiten im Gehirn und die Häufigkeit einzelner Rezeptor-Subtypen (Möhler, 2006)



**Abbildung 7.** Vorkommen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Subtypen im Gehirn (Nutt, 2006)

#### 1.3.4. Die GABA-Bindungsstelle

Wie alle anderen Ionenkanäle wandeln auch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren chemische Signale in elektrische Signale um. In weniger als einer Millisekunde binden zwei GABA-Moleküle zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Baumann et al., 2003; Kash et al., 2004). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Öffnung des Kanals (Baumann et al., 2003). Die Bindungstasche befindet sich in der extrazellulären aminoterminalen Domäne (Holden-Kloda und Czajkowski, 2007). Die GABA-Bindungsstelle wird von 6 Loops von der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit gebildet. Die Loops A, B und C werden von der  $\beta$ -Untereinheit zur Verfügung gestellt, während Loops D, E und F von der  $\alpha$ - Untereinheit gebildet werden (Ernst et al., 2003).

Auf diesen Loops wurden in den letzten Jahren zahlreiche Aminosäuren identifiziert, die die GABA-Wirkung wesentlich beeinflussen. Diese Reste können entweder direkt mit GABA in Kontakt treten, die Struktur der Bindungsstelle per se aufrechterhalten oder auch durch Bindung des Agonisten induzierte lokale Konformationsänderungen zur Aktivierung oder Desensibilisierung weiterleiten (Holden-Kloda und Czajkowski, 2007).

Loop A umfasst die Region zwischen den Aminosäuren  $\beta_2$ W92-D101. Leucin in Position 99 und Tyrosin in Position 97 kleiden die GABA-Bindungsstelle aus (Boileau et al., 2002). Loop B umfasst den Bereich zwischen I154 und D163 der  $\beta_2$ -Untereinheit.  $\beta$ -Strang 9, Loop 10 und der Anfang vom  $\beta$ -Strang 10 bilden den Loop B.  $\beta_2$ T160 und  $\beta_2$ D163 kleiden die GABA-Bindungsstelle aus. Die E155C Mutation beeinflusst sowohl das Gating als auch das Binden des Agonisten (Newell et al., 2004). Der V199-S209 Bereich der  $\beta_2$ -Untereinheit bildet den Loop C. Die Aminosäurereste S204, Y205, R207 und S209 sind der Bindungsstelle des Agonisten zugewendet. Im Gegensatz dazu stehen die Aminosäuren F200, S201, T202 und G203 bei der Bindung des Agonisten nicht im direkten Kontakt mit dem Agonisten. Wenn sie jedoch mutiert werden, verändert sich die Empfindlichkeit für GABA gravierend. Loop C durchzieht die gesamte GABA-Bindungsstelle. Außerdem zeigt dieser Bereich keine reguläre Sekundärstruktur; möglicherweise handelt es sich hier um eine erweiterte Windung (coil) oder um einen Loop (Wagner and Czajkowski, 2001). Nach dem Binden des Agonisten bewegt sich Loop C nach innen zum Loop E (Unwin et al. 2002; Celie et al. 2004, Law et al. 2005). Der Bereich von  $\alpha_1$ Y59 bis K70 umfasst den Loop D. Es wurde bewiesen, dass F64, R66 und S68 die wichtigsten Aminosäuren für das Andocken von GABA sind (Boileau et al. 1999).

Loop E wird vom Bereich  $\alpha_1$ M113-L132 gebildet. Der Loop E berührt über einen aus 11 Aminosäuren bestehenden Rest den Loop A der Benzodiazepinbindungsstelle. Die folgenden im Loop E vorkommenden Aminosäurereste  $\alpha_1$ N115,  $\alpha_1$ L117,  $\alpha_1$ T129 und  $\alpha_1$ R131 sind für das Binden von GABA wichtig (Kloda and Czajkowski, 2006).

Loop F- vom Bereich  $\alpha_1$  P174-D91 gebildet- ist wenig konserviert in Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Für das Binden von GABA sind V178, V180 und D183 von Bedeutung. Der Loop F weist eine sog. „random coil“ Sekundärstruktur auf (Newell und Czajkowski, 2003). Liganden der  $\beta_2/\alpha_1$ -Bindungsstelle wirken allosterisch und induzieren ebenfalls Konformationsänderungen im Loop F der  $\beta_2$ - und  $\gamma_2$ -Untereinheiten. Bis jetzt konnte nicht bewiesen werden, ob Loop F beim Gating von Bedeutung ist (Wang et al., 2010).

Mehrere Regionen im GABA<sub>A</sub>-Rezeptor spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung des Liganden an die extrazelluläre Bindungsstelle. Dadurch wird die Konformation geändert,

sodass die Kanäle geöffnet werden. Loop 2, Loop 7, Loop 9 und prä-M1 im extrazellulären Bereich und das extrazelluläre Ende von M1 sowie das extrazelluläre Ende von M2 und M2-M3-Region („linker region“) sind an diesen Konformationsänderungen beteiligt (Kash et al., 2003; Mercado und Czajkowski, 2006). Die größte Bedeutung wird der prä-M1-Region der  $\alpha_1$ -Untereinheit zugeschrieben (Mercado und Czajkowski, 2008).

Studien bewiesen den Zusammenhang zwischen der GABA- und der Benzodiazepinbindungsstelle. Wenn z. B. Flurazepam an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bindet, kommt es zur Konformationsänderung der GABA-Bindungsstelle (Holden-Kloda und Czajkowski, 2007).

## 1.4. Modulatoren von GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren

### 1.4.1. Benzodiazepine

Im Jahre 1957 entdeckte Leo Sternbach durch einen Zufall eine neue Substanzklasse: die Benzodiazepine. Die erste entdeckte Verbindung war Chlordiazepoxid. Sechs Jahre später, 1963, wurde ebenfalls von Sternbach Diazepam (Valium®), der bekannteste Vertreter dieser Substanzklasse, entwickelt (Oransky, 2005). Die therapeutisch vorrangigen Effekte der Benzodiazepine sind Sedierung, Anxiolyse, antikonvulsive Wirkung und Muskelrelaxation (Goetz et al., 2007). Zu bekanntesten Vertretern dieser Arzneistoffklasse gehören Diazepam, Triazolam, Midazolam, Clobazam und Flunitrazepam.

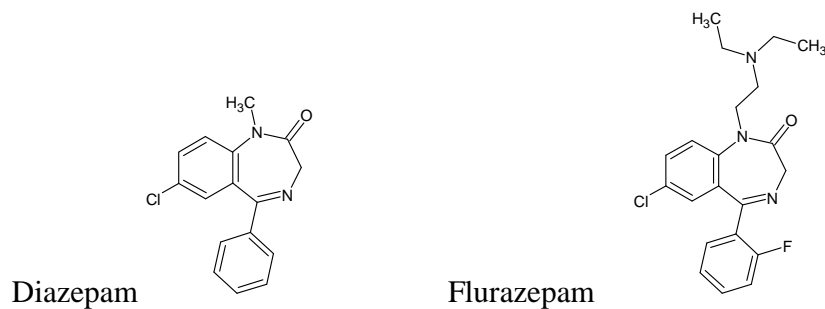


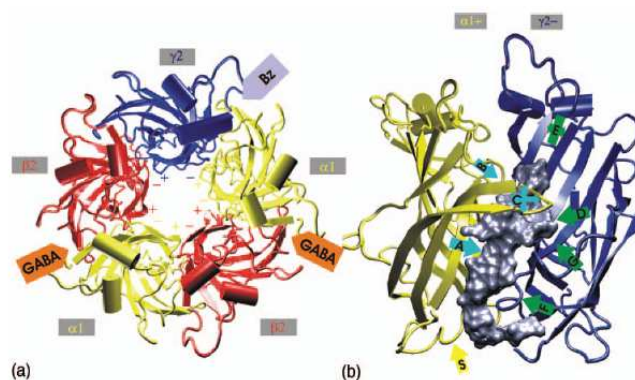
Abbildung 8. Diazepam und Flurazepam

#### 1.4.1.1. Benzodiazepin- Bindungsstelle

Benzodiazepine binden ausschließlich an  $\alpha\beta\gamma$ - Rezeptoren (e.g.,  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -,  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ - oder  $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren) (Goetz et al., 2007), wobei sich die Bindungsstelle zwischen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit befindet (Sigel und Buhr, 1997; Wingrove et al., 1997; Ernst et al., 2003; Ogris et al., 2004). Nicht alle Untereinheitskombinationen sind gleich empfindlich, so werden beispielsweise  $\alpha_4\beta\gamma_2$ - oder  $\alpha_6\beta\gamma_2$ -Rezeptoren nicht von Benzodiazepinen moduliert (Goetz et al., 2007). Interessanterweise weisen diese Rezeptorsubtypen aber eine hohe Affinität für Flumazenil, Ro15-4513 sowie Bretazenil auf (Korpi et al., 2002). An den  $\delta$ -Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren sind Benzodiazepine unwirksam. An die

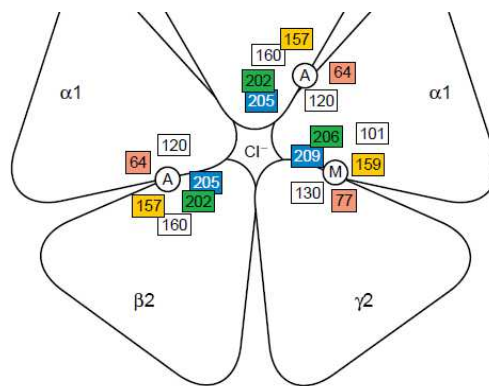
Benzodiazepinbindungsstelle binden nicht nur die klassischen Benzodiazepine, wie Diazepam und Flunitrazepam, sondern auch Substanzen, die zu Benzodiazepinen keine chemische Verwandtschaft besitzen, z. B. das Imidazopyridin Zolpidem. Abhängig vom Liganden vermittelt die Benzodiazepinbindungsstelle unterschiedliche Wirkungen. Benzodiazepinantagonisten, wie Flumazenil, hemmen sowohl Agonisten als auch inverse Agonisten. Klinisch wird Flumazenil bei der Benzodiazepin-Intoxikation verwendet (Goetz et al., 2007).

Die Benzodiazepinbindungstasche selbst ist größer als die GABA-Bindungstasche. Sie berührt den Cys-Loop der  $\alpha$ -Untereinheiten (Goetz et al., 2007). Die Empfindlichkeit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors für Benzodiazepine hängt von diesen beiden Untereinheiten ab. Obwohl die  $\beta$ -Untereinheit für die Expression von Rezeptoren notwendig ist, beeinflusst sie nicht die Sensitivität des Rezeptors für Benzodiazepine. Die klassischen Benzodiazepine binden bevorzugt an Rezeptoren, die  $\gamma_2$ -,  $\beta$ - und eine der folgenden  $\alpha$ -Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  oder  $\alpha_5$  enthalten (Olsen und Sieghart, 2008b). An Rezeptoren, die eine  $\gamma_1$ - (Sieghart, 1995; Khom et al., 2006) oder eine  $\gamma_3$ -Untereinheit inkorporieren, zeigen Benzodiazepine eine reduzierte Wirkung (Sieghart, 1995; Hevers und Luddens, 1998). Aminosäurereste an Loops A, B, C, D und D an der Kontaktstelle zwischen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit beeinflussen die Bindung, Wirkstärke und Wirksamkeit der Benzodiazepine (Goetz et al., 2007).



**Abbildung 9.** Ein Modell des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors; a) Hydrophile Pore des Rezeptors; GABA- und Benzodiazepin-Bindungsstelle b) Eine Seitensicht des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors; die Benzodiazepin-Bindungsstelle befindet sich zwischen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit (Ernst et al., 2003)

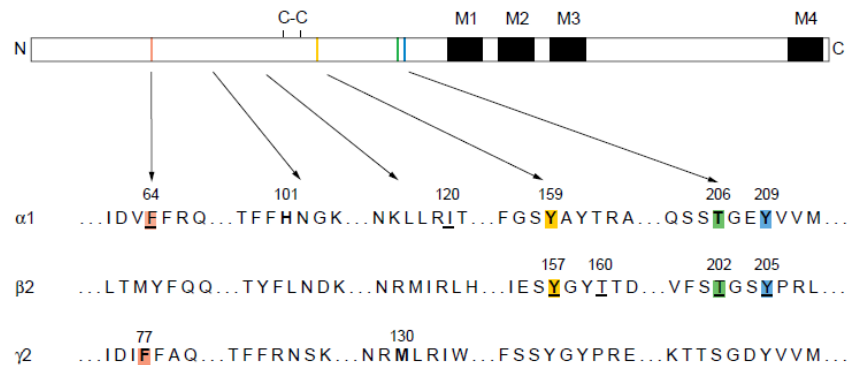
An der  $\alpha$ -Untereinheit wurden mehrere für die Bindung von Benzodiazepinen wichtige Aminosäurereste identifiziert. Am Loop A spielt der Histidinrest in Position 101 eine wichtige Rolle. Am Loop B sind 3 Aminosäuren besonders wichtig: Glycin in Position 157, Tyrosin in Position 159 sowie Threonin in Position 162. Loop C enthält mehrere Aminosäuren, die an der Bindung des Liganden beteiligt sind: G200, V202, S204, S205, T206, Y209 und V211. Am Loop D der  $\gamma$ -Untereinheiten sind F77, A79 und T81 wichtig. Methionin in Position 130 des Loop C der  $\gamma$ -Untereinheiten trägt bei der Bindung von Benzodiazepinen entscheidend bei (Hanson et al., 2008).



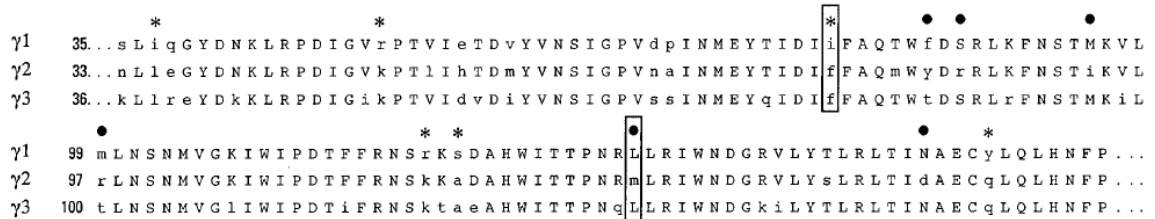
**Abbildung 10.** Model des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors; A- GABA-Bindungsstelle; B- Benzodiazepin-Bindungsstelle; die Aminosäurereste, die in der GABA- und der Liganden-Bindungstasche identisch bzw. homolog sind, sind in derselben Farbe dargestellt; Als Folge der Bindung des Liganden, kommt es zur Konformationsänderung der GABA-Bindungsstelle (Sigel und Buhr, 1997).

Der Austausch von Phenylalanin durch Isoleucin in Position 77 der  $\gamma_2$ -Untereinheiten führt dazu, dass Zolpidem, DMCM und Flumazenil nicht mehr binden, während Flunitrazepam weiterhin eine starke Affinität für diese Rezeptoren zeigt (Buhr et al., 1997; Wingrove et al., 1997; Goetz et al., 2007). Phenylalanin in Position 77 der  $\gamma_2$ -Untereinheiten ist homolog mit F64 der  $\alpha_1$ -Untereinheit. Phenylalanin in Position 64 der  $\alpha_1$ -Untereinheit ist ein wichtiger Teil der GABA-Bindungsstelle. Methionin in Position 130 der  $\gamma_2$ -Untereinheiten ist für die Bindung von Flunitrazepam, Triazolam und Clonazepam, jedoch nicht für die Bindung von Flumazenil oder Methyl- $\beta$ -carbolin-3-carboxylat verantwortlich. M130 beeinflusst nicht die Wirksamkeit der Benzodiazepine

(Wingrove et al., 1997). Diese Aminosäurereste befinden sich in den N-terminalen Domänen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten (Goetz et al., 2007).



**Abbildung 11.** Homologie der Aminosäurereste, die die Bindung der Agonisten und die Modulation des Rezeptors beeinflussen (Sigel und Buhr, 1997)



**Abbildung 12.** Zusammensetzung (Aminosäuresequenz) humaner  $\gamma 1$ -,  $\gamma 2$ - und  $\gamma 3$ - Untereinheit. Die Aminosäuresequenz zwischen N33 (Asparagin) und P159 (Prolin) der  $\gamma 2$ - Untereinheit (und der Vergleich den anderen zwei  $\gamma$ -Untereinheiten mit  $\gamma 2$ ). In Blockschrift konservierte Sequenzen; \*, Aminosäurereste, die nur in  $\gamma 2$ - und  $\gamma 3$ -Untereinheit vorkommen; ●, Aminosäurereste zwischen  $\gamma 2$ Q80 (Glutamin) und  $\gamma 2$ P159, die in  $\gamma 2$ -Untereinheit nicht gleich sind wie in  $\gamma 1$ - und  $\gamma 3$ -Untereinheit (unabhängig davon, ob sich diese Reste in  $\gamma 1$ - und  $\gamma 3$ -Untereinheit unterscheiden oder nicht); Kästchen, Positionen  $\gamma 1$ I79/ $\gamma 2$ F77 und  $\gamma 1$ L132/ $\gamma 2$ M130 (Wingrove et al., 1997)

#### 1.4.1.2. Wirkmechanismus

Benzodiazepine und analoge Verbindungen verstärken die hemmende Funktion GABAerger Neurone. Durch Interaktion von Benzodiazepine mit ihren Bindungsstellen wird die Affinität von GABA zu deren Bindungsstelle erhöht. Die Benzodiazepine steigern somit durch allosterische Wechselwirkung die Bindungsfähigkeit von GABA zu ihren Rezeptoren und verstärken dadurch die GABA- Wirkung. Diese Wirkung kommt dadurch zustande, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit von Chloridkanälen erhöht wird, wodurch vermehrt Chloridionen in die Zelle einströmen (Serfozo und Cash, 1992; Lavoie und Twyman, 1996). Dieser Effekt entspricht einer Zunahme der Affinität von GABA für den Rezeptor, die sich in einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für GABA widerspiegelt (Baburin et al., 2008). Der verstärkte Einstrom von Chloridionen führt zu einer Hyperpolarisation der entsprechenden Zellen mit der Folge einer verminderten Erregbarkeit (Mutschler et al., 2008; Tan et al, 2011).

Innerhalb der GABA-aktivierten Synapsen ist die Intensität der Benzodiazepinwirkung nicht einheitlich. In Synapsen, die eine niedrige Konzentration von GABA enthalten, ist die Verstärkung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors durch Benzodiazepine sehr viel stärker ausgeprägt als in Synapsen, in denen die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch eine hohe Konzentration von GABA nahezu maximal aktiviert sind.

Während Benzodiazepine eine schwache GABA-Antwort verstärken, wird ein starker GABA-induzierter Strom nicht über das physiologische Maximum hinaus verstärkt (Selbstlimitierung). Diese Qualität der Wirkung erklärt vermutlich, warum die Wirkung der BZD selbst bei hohen Dosen nicht lebensbedrohlich ist (es sei denn in Kombination mit anderen Sedativa) (Forth et al., 2005). Im Gegensatz zu BZD sind z. B. Barbiturate, Neurosteroidoide und Mefenaminsäure in der Lage den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor direkt zu aktivieren (Coyne et al., 2007).

Eine Spezifizierung der Benzodiazepinwirkung ergibt sich auch aus dem Ausmaß der Besetzung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit Benzodiazepinen. Anxiolytische Wirkungen werden schon mit niedrigen Dosen von Benzodiazepinen ausgelöst, während höhere Dosen für die muskelrelaxierende und hypnotische Wirkung erforderlich sind und sehr

hohe Dosen zur Unterdrückung eines Status epilepticus notwendig werden (Forth et al., 2005).

#### **1.4.1.3. Toleranzentwicklung**

Benzodiazepine können bei Anwendung als Hypnotika oder Tranquillantien/Anxiolytika zur psychischen schließlich sogar physischen Abhängigkeit führen. Die Benzodiazepin-Abhängigkeit kann sich bei regelmäßiger Einnahme in wenigen Wochen ausbilden. Der Abhängige sucht die beruhigende und euphorisierende Wirkung. Bei Gewöhnung treten im Laufe der Zeit häufig nicht mehr sedativ-hypnotische, sondern erregende Wirkungen auf. Es kommt zur Abnahme der Selbstkontrolle, des Konzentrationsvermögens sowie zu Ataxie, Tremor und vegetativen Dysfunktionen.

Psychische Abhängigkeit wird nach abruptem Absetzen durch zum Teil schwere Entzugsserscheinungen mit Delir und Krämpfen erkennbar (Ähnlichkeit zum Alkoholentzug), in anderen, sich länger hinziehenden Fällen durch subjektiv quälende, insbesondere visuelle Wahrnehmungsstörungen. In der Regel treten Entzugsserscheinungen je nach Halbwertszeit des Benzodiazepins oder aktiver Metaboliten 2 bis 10 Tage nach dem Absetzen auf und dauern ca. 5 Tage bis 2 Wochen. Entzugssyndrome motivieren häufig zum Wiedergebrauch von Benzodiazepinen, allein um den Entzug zu kompensieren.

Diese Entzugssymptomatik unterscheidet sich deutlich von der Absetzsymptomatik bei noch nicht physisch Abhängigen. Hierbei kann es zu Ruhelosigkeit, Schlafstörung und Angst kommen, die in der Regel nur einige Tage andauern, wenn es sich nicht um die originäre Krankheitssymptomatik handelt. Somit können nach Absetzen dieselben Phänomene beobachtet werden, die Anlass zur Einnahme von Benzodiazepinen waren. Die oben geschilderten Entzugsserscheinungen dagegen waren vor Einnahme der Benzodiazepine noch nicht vorhanden. Längere Einnahme von Benzodiazepinen führt zur Toleranz. Ursache der Toleranz sind Adaptionsvorgänge im Gehirn (pharmakodynamische Toleranz), nicht der schnelle Abbau (pharmakokinetische Toleranz). Die sedierende und antikonvulsive Wirkung lässt deutlicher nach als die anxiolytische Wirkung (Forth et al., 2005). Wichtig ist, dass nicht nur ein Rezeptorsubtyp

für die Toleranzentwicklung gegen Benzodiazepine verantwortlich ist, so wird die sedierende Wirkung von Diazepam durch  $\alpha_1$ -Rezeptoren vermittelt, während für die Toleranzentwicklung sowohl  $\alpha_1$ - als auch  $\alpha_5$ -Rezeptoren verantwortlich (Möhler, 2006, Tan et al., 2011).

Bei der überwiegenden Mehrzahl der Abhängigen fehlt allerdings der Zwang zur Dosissteigerung („low dose dependency“), es tritt aber eine Entzugssymptomatik bei Absetzen auf. Umgekehrt kann es zu „high dose dependency“ bei polyvalenter Abhängigkeit kommen (Forth et al., 2005).

#### 1.4.1.4. GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Subtypen vermitteln die verschiedenen Effekte der Benzodiazepine

Die klassischen Benzodiazepine, wie z.B. Diazepam und Flunitrazepam (siehe Abb. 7), interagieren bevorzugt mit Rezeptoren, die aus  $\alpha_1\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta\gamma_2$  oder  $\alpha_5\beta\gamma_2$  aufgebaut sind. Sie zeigen keine Wirkung an  $\alpha_4$  und  $\alpha_6$  bzw. geringere Wirkung an den  $\gamma_1$  und  $\gamma_3$  enthaltenden Rezeptoren. Die klassischen Benzodiazepine können zwischen den Bindungsstellen verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nicht unterscheiden, aber es wurden im Laufe der Zeit einige Verbindungen entwickelt, wie z. B. Quazepam, Cinolazepam und Zolpidem, die hauptsächlich an  $\alpha_1\beta\gamma_2$ -Rezeptoren binden. Der Großteil dieser Verbindungen zeigt auch *in vivo* sedative und hypnotische Wirkungen. Andere Verbindungen, z. B. TPA023 (7-(1,1-Dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazin), zeigen eine gewisse Selektivität für  $\alpha_2\beta\gamma_2$ - und  $\alpha_1\beta\gamma_2$ -Rezeptoren und daher auch anxiolytische Wirkung. Eine der wenigen nicht-sedierend, anxiolytisch wirkenden Substanzen, die keine Selektivität zu  $\alpha_2$  zeigt, ist Ocinafon.

Wie bereits erwähnt, benötigen die klassischen Benzodiazepine für die Bindung an den Rezeptor ein Histidin in Position 101 der  $\alpha_1$ -Untereinheit. Mutiert man dieses Histidin gegen ein Arginin (Aminosäure in korrespondierender Position in der  $\alpha_4$ -Untereinheit) werden Rezeptoren mit mutierter  $\alpha$ -Untereinheit nicht mehr von Diazepam moduliert.

Tragen nun Mäuse diese Mutation und vergleicht man die Effekte von Diazepam an diesen Tieren mit nicht-mutierten Mäusen, kann man auf die Bedeutung der einzelnen Untereinheiten schließen (nach Diazepamgabe sind bestimmte Benzodiazepin-vermittelte Effekte schwächer ausgeprägt oder fehlen vollständig) (Rudolph et al., 1999; Möhler, 2006; Sieghart und Olsen, 2008a). So konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_1$ -Rezeptoren für sedative Wirkung, anterograde Amnesie und zum Teil auch für anticonvulsive Wirkung von Diazepam verantwortlich sind. Die anxiolytische Wirkung von Diazepam wird vorwiegend über  $\alpha_2$ -Rezeptoren ausgeübt und wenn viele Rezeptoren besetzt sind, auch über  $\alpha_3$ -Rezeptoren.  $\alpha_2$ -Rezeptoren sind auch für die Muskel-relaxierende Wirkung verantwortlich (Sieghart und Olsen, 2008a).

Die  $\alpha_2$ -Rezeptoren sind im zentralen Nucleus der Amygdala bekannt. Die Amygdala ist der Schlüsselbereich für die Kontrolle von Emotionen. In diesem Bereich werden keine  $\alpha_1$ -Rezeptoren exprimiert (Möhler, 2006).

| Wirkungen von Benzodiazepinen       | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\alpha_3$ | $\alpha_5$ | $\gamma_2$ | $\beta_2$ | $\beta_3$ | $\delta$ |
|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|----------|
| Sedierung                           | +          | -          | -          | -          |            | +         |           |          |
| Anxiolyse                           | -          | +          | -/+        | -          |            |           |           |          |
| Amnesie                             | +          |            |            | +          |            |           |           |          |
| Muskelrelaxation                    | -          |            | +          |            |            |           |           |          |
| Motorische Beeinträchtigung         | -          | -          | -          |            |            |           |           |          |
| Antikonvulsive Wirkung              | +          | -          | -          | -          |            |           |           |          |
| Verstärkung der Wirkung von Ethanol | -          |            |            | +          |            |           |           |          |
| Anästhetische Wirkungen             | +          |            |            |            |            | +         | +         | +        |
| Angst                               |            |            |            |            | +          |           |           |          |
| Lernen/ Gedächtnis                  |            |            |            | +          |            |           |           | +        |
| Analgesie*                          |            |            | +          |            |            |           |           |          |

**Tabelle 2.** Wirkungen der Benzodiazepine an GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Subtypen (Nutt, 2006; \*Knabl et al., 2008)

#### 1.4.1.4.1. Sedierung

Oft wird Sedierung als Ersatzmarker für hypnotische Aktivität verwendet. Die sedierende Komponente der Benzodiazepine, die durch die Reduktion lokomotorischer Aktivität gemessen wird, ist dem  $\alpha_1$ -Rezeptor zuzuordnen. Diazepam übt keine sedierende Wirkung bei Mäusen mit der Punktmutation [ $\alpha_1$ (H101R)] aus. Liganden, die bevorzugt eine Affinität für  $\alpha_1$ -Rezeptoren zeigen, wie z. B. Zolpidem und Zaleplon, werden als Hypnotika eingesetzt. Die durch klassische Benzodiazepine verursachten Unterschiede in der Schlafarchitektur (die Unterdrückung des REM-Schlafs) und den EEG-Frequenzprofilen (Reduktion der langsamen Schlafwellen, Erhöhung der schnellen  $\beta$ -Frequenzen) sind nicht auf  $\alpha_1$ -Rezeptoren zurückzuführen. Wenn  $\alpha_2$ -Rezeptoren durch die Punktmutation [ $\alpha_2$ (H101R)] unsensibel für Diazepam gemacht werden, werden die Diazepam induzierte Unterdrückung von  $\delta$ -Wellen, die Erhöhung der schnellen  $\beta$ -Wellen im Non-REM-Schlaf und die Diazepam induzierte Erhöhung der  $\theta$ -Wellen im REM-Schlaf stark abgeschwächt (Möhler, 2006).

### 1.4.2. Z-drugs

Trotz der vielen Nebenwirkungen der Benzodiazepine (anterograde Amnesie, hohes Abhängigkeitspotential usw. siehe auch Tan et al., 2011) werden sie auch heute noch am häufigsten in der Therapie von Schlafstörungen eingesetzt. Eine neue Gruppe von sedativ-hypnotisch wirkenden GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Liganden ohne Benzodiazepin-Partialstruktur (die sog. Z-drugs: Zolpidem, Zaleplon und Zopiclon) zeigen eine höhere Selektivität für  $\alpha_1$ -Rezeptoren. Folglich haben sie auch weniger Nebenwirkungen (Crestani et al., 2000).

Zaleplon, Zolpidem und Zopiclon sind chemisch nicht verwandt. Diese drei Arzneistoffe unterscheiden sich in der Bioverfügbarkeit, dem Verteilungsvolumen und der Eliminationshalbwertszeit. Zaleplon wird schnell eliminiert. Im Vergleich dazu werden Zolpidem und Zopiclon langsamer eliminiert, sodass es zu protrahierten Effekten kommen kann. Das kann die Ursache für residuale Sedierung und Nebenwirkungen sein. Jedoch können Zolpidem und Zopiclon auch in der Dauertherapie der Insomnie eingesetzt werden (da es weniger oft zum Aufwachen kommt). Obwohl die Bioverfügbarkeit von Zaleplon bei 30% und von Zolpidem und Zopiclon bei 70% liegt, sind die therapeutischen Dosen gleich. Der Grund dafür ist die hohe Wirkstärke von Zaleplon (Dover, 2004). Psychomotorische Funktionen und Gedächtnis sind bei der Anwendung der Z-drugs weniger beeinträchtigt als bei der Anwendung von Benzodiazepinen. Zolpidem und Zopiclon sind eine gute Option in der Dauertherapie der Insomnie, da sie nur wenig Abhängigkeitspotential aufweisen und weil es nur langsam zu Toleranzentwicklung kommt. Da die Z-drugs eine minimale respiratorische Depression verursachen, sind sie bei Patienten mit respiratorischen Erkrankungen zu empfehlen (Wagner und Wagner, 2000). Zolpidem wirkt selektiv an den  $\alpha_1$ -Rezeptoren. Der Austausch von Phenylalanin durch Isoleucin in Position 77 der  $\gamma_2$ -Untereinheit führt dazu, dass Zolpidem an den Rezeptor nicht mehr binden kann (Cope et al., 2004).

Zaleplon ist ein Pyrazolopyrimidin-Derivat, das zur Behandlung von Patienten mit Schlaflosigkeit und Einschlafstörungen zugelassen wurde. In Tierexperimenten konnten alle von Zaleplon-induzierten durch Applikation des Benzodiazepin-Antagonisten

Flumazenil aufgehoben werden. Nach peroraler Aufnahme wird Zaleplon schnell und nahezu vollständig resorbiert, wobei ein maximaler Plasmaspiegel nach ca. einer Stunde erreicht wird. Die absolute Bioverfügbarkeit liegt bei etwa 30 Prozent. Zaleplon wird schließlich vorwiegend (ca. 70 Prozent) über den Harn ausgeschieden. Nur etwa 30 Prozent werden über die Faeces eliminiert. Zaleplon wird wie die meisten Arzneistoffe über das Cytochrom P 4503A4-System, metabolisiert, daher sind Wechselwirkungen mit Substanzen, die ebenfalls über dieses Enzymsystem metabolisiert werden, möglich.

Zaleplon hat eine Halbwertszeit von etwa 1 Stunde, daher gibt es im Gegensatz zu anderen Sedativa wie z.B. Flurazepam, Zolpidem, Triazolam oder Zopiclon keine Hinweise für eine psychomotorische Beeinträchtigung am nächsten Tag. Weiters kommt es nach Zaleplon-Gabe zu keiner Veränderung des Schlafprofils wie auch zu keiner Reduktion des REM-Schlafes (diese treten vorwiegend in der zweiten Nachthälfte auf). Außerdem tritt nach dem Absetzen von Zaleplon keine signifikante Rebound-Insomnie auf. Auch nennenswerte Entzugserscheinungen konnten nicht beobachtet werden (Schulz, 2000).

Zopiclon ist ein sedierend-hypnotisch wirkendes Cyclopyrrolon, das seit 1987 auf dem Markt ist. Eszopiclon ist der S-Isomer von Zopiclon. Nach der oralen Verabreichung wird Zopiclon schnell resorbiert und im Körper verteilt. Die maximalen Plasmakonzentrationen werden 1-1,6 Stunden nach der Verabreichung von 3 mg Zopiclon erreicht. Die mittlere Eliminationshalbwertszeit beträgt 6 Stunden. Die Halbwertszeit steigt mit dem Alter; bei Patienten ab 65 Jahren liegt sie bei ca. 9 Stunden. Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Eszopiclon werden bei Patienten mit Nierenversagen oder schwachen bis mittelschweren Leberfunktionsstörungen unbedeutend verändert. Jedoch sollte die Dosis bei Patienten mit starker hepatischer Insuffizienz reduziert werden. In randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten, bis zu sechs Monaten dauernden Studien wurde festgestellt, dass Patienten nach der Dosis von 2 oder 3 mg Eszopiclon weniger über Schlafstörungen klagten. Diese Studien zeigten, dass Zopiclon zu einer signifikanten Reduktion der Einschlafzeit, der Zahl des Erwachens während der Nacht und der Dauer bis zum Wiedereinschlafen nach Aufwachen führt. Die Gesamtschlafzeit konnte verlängert und die Schlafqualität

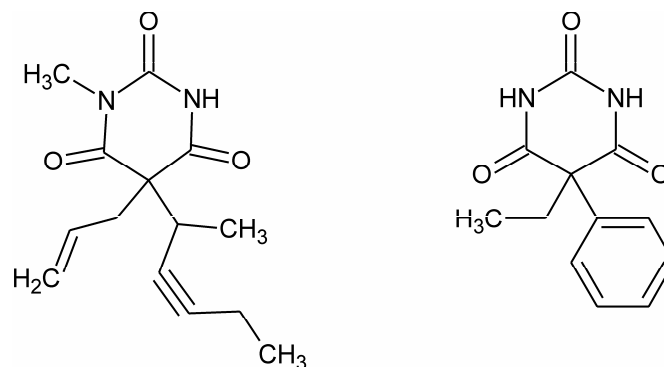
verbessert werden. Studien bestätigten auch die Wirksamkeit von Eszopiclon bei der chronischen primären Insomnie. Im Unterschied zu Benzodiazepinen kommt es bei Eszopiclongabe zu keinen signifikanten Änderungen des sog. slow-wave- und des REM-Schlafs. Das Auftreten einer Insomnie nach dem Absetzen von Eszopiclon wurde in nur einer Studie beobachtet. Die Unterbrechung der Therapie führte vor allem bei jüngeren Patienten zum Wiederauftreten der Insomnie. Studien zeigen dass die Verabreichung von Eszopiclon über einen längeren Zeitraum (bis zu 12 Monaten) das Einschlafen und die Aufrechterhaltung des Schlafs positiv beeinflusst, ohne dass es dabei zur Toleranzentwicklung kommt. Die häufigsten Nebenwirkungen waren unangenehmer oder bitterer Geschmack, Kopfschmerzen, Dyspepsie, Schmerzen, trockener Mund, Schmerzen, Diarrhoe, Infektionen der oberen Atemwege, Harnwegsinfektionen und Schwindel. Obwohl noch keine Studien veröffentlicht wurden, die die Abhängigkeit und Suchtpotential von Eszopiclon bewiesen, zeigen unpublizierte Daten, dass Eszopiclon in Dosen von 6 und 12 mg euphorisierend wirkt. Diese Wirkung ähnelt der Wirkung von 20 mg Diazepam bei Benzodiazepinsüchtigen.

Die verfügbaren Daten zeigen also, dass Eszopiclon in der Therapie der primären chronischen Insomnie effektiv und sicher eingesetzt werden kann. Es kam zur keiner Toleranzentwicklung bei einer bis zur 12-monatigen Anwendung. Folglich kann Eszopiclon nicht nur kurzfristig angewendet werden, sondern auch bei Patienten, die eine längere Behandlung brauchen (Monti und Pandi-Perumal, 2007).

### 1.4.3. Barbiturate

Deutscher Chemiker Adolf von Baeyer entdeckte 1864 die Barbitursäure. Emil Fischer, ehemaliger Assistent von Adolf von Baeyer, untersuchte dann am Anfang des 20. Jahrhunderts die hypnotische Wirkung von Barbital (Barbitursäure-diethyl-ester). Er führte zahlreiche Experimente an Hunden durch und brach dann im Januar 1903 diese neue Substanz unter dem Namen Veronal® auf den Markt. Im letzten Jahrhundert wurden insgesamt mehr als 2500 verschiedene Vertreter dieser Wirkstoffklasse synthetisiert (Lopez-Munoz et al., 2005).

Barbiturate wirken über  $GABA_A$ -Rezeptoren, greifen jedoch an einer anderen Bindungsstelle als die Benzodiazepine an. Sie wirken durch die Verlängerung der Öffnungszeit des Chloridkanals, haben aber keinen Einfluss auf die Frequenz der  $GABA$ -bedingten Öffnungen des Kanals. In Konzentrationen über  $50 \mu M$  öffnen sie  $GABA_A$ -Rezeptoren direkt (d. h. in Abwesenheit von  $GABA$ ). In höheren Konzentrationen verändern sie die Desensibilisierung des Rezeptors. Interessanterweise sind sedativ-hypnotisch wirkende Barbiturate, z.B. Pentobarbital und Phenobarbital (siehe Abbildung 12), auch an homooligomeren  $GABA_A$ -Rezeptoren, die entweder  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\delta$ -Untereinheit enthalten, wirksam (Henschel et al., 2008).



**Abbildung 13.** Strukturformeln ausgewählter Barbiturate (Pentobarbital, Phenobarbital)

Die Empfindlichkeit des  $GABA_A$ -Rezeptors für Barbiturate hängt unter anderem von den Aminosäuren der TM2 Domäne der  $\beta$ -Untereinheit ab. An  $\beta_3N265M$  mutierten homomeren Rezeptoren ist Pentobarbital als allosterischer Modulator faktisch

unwirksam, ebenso an homomeren  $\beta_1$ -Rezeptoren (Cestari et al., 2000). Dagegen konnte die agonistische Aktivität nicht von der Art der  $\beta$ -Untereinheit abhängig gemacht werden (Hill-Venning et al., 1997; Sanna et al., 1995, Cestari et al., 2000). Studien an  $\beta_3$ N265M-Mäusen (Austausch von Asparagin durch Methionin) zeigten, dass die narkotische Wirkung von Phenobarbital ausschließlich durch die  $\beta_3$ -Untereinheit inkorporierenden  $GABA_A$ -Rezeptoren vermittelt wird. Im Unterschied dazu wird die hypnotische Wirkung von Phenobarbital nur teilweise durch diesen Rezeptor-Subtyp vermittelt (Zeller et al., 2007).

$GABA_A$ -Rezeptoren, die aus  $\rho$ -Untereinheiten aufgebaut sind, sind unempfindlich für Barbiturate (Korpi et al., 2002). Durch Austausch einer einzelnen Aminosäure der TM3 Region ( $\rho$ 1W328) kann der homomere Rezeptor von Pentobarbital moduliert werden (Amin, 1999). Ähnlich ist es auch bei der  $\rho$ 1(I314S)-Mutation in der TM2 Domäne. Durch diese Mutation wird der Kanal für Pentobarbital, aber nicht für Propofol und Pregnanolon empfindlich (Belelli et al, 1999). Ein weiterer Rest, der eine wichtige Rolle bei der modulierenden und auch bei der agonistischen Aktivität der Barbiturate (und auch Propofol) spielt, ist ein Glycinrest im extrazellulären Teil der TM1 Domäne der  $\beta_2$ -Untereinheit (Carlson et al., 2000). Die Bindungstasche von Pentobarbital befindet sich vermutlich in der Mitte der TM2 Domäne (in Richtung extrazellulärer Raum). Welche Aminosäuren für die Bildung der Bindungsstelle bzw- auch für das Gating essentiell sind, ist noch nicht vollständig geklärt und wird zur Zeit intensiv untersucht (Korpi et al, 2002). In heteromeren Rezeptoren spielt  $\alpha$ -Untereinheit eine wichtige Rolle bei der direkten Aktivierung durch Barbiturate (Fisher et al., 1997), so sind  $\alpha_6$ -Rezeptoren dreimal empfindlicher als andere  $\alpha$ -Rezeptoren (Korpi et al, 2002).

Die Nebenwirkungen der Barbiturate umfassen die Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen in der Leber und die Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeitssymptomen. Aufgrund der Toxizität bei höheren Dosen werden Barbiturate nicht mehr als Tranquilizer und Hypnotika verwendet, sondern ausschließlich als Antiepileptika und Anästhetika (Lopez-Munoz et al., 2005; Zeller et al., 2007).

#### 1.4.4. Anästhetika

Erst Mitte des 19. Jahrhunderts wurde begonnen, Operationen unter Verwendung von Anästhesie durchzuführen. Das revolutionierte die gesamte Chirurgie (Zeller et al., 2007).

In klinisch relevanten Konzentrationen modulieren Anästhetika die Aktivität verschiedener Ionenkanäle. Während Inhalationsanästhetika (e.g., Halothan, Enfluran oder Isofluran) als positive Modulatoren an den rekombinanten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wirken, binden sie in vivo wahrscheinlich auch an K-Kanäle. Injektionsanästhetika (z.B., Barbiturate, Propofol und Etomidat) verstärken die Wirkung von GABA am Rezeptor, aktivieren aber in höheren Konzentrationen auch in Abwesenheit von GABA den Rezeptor. Studien an Knock-in-Mäusen, die eine für Propofol und Etomidat unempfindliche  $\beta$ -Untereinheit exprimierten, zeigten, dass Propofol und Etomidat ihre Wirkung fast vollständig an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ausüben.

Für die Wirkung von Propofol und Etomidat sind Reste in TM2 und TM3 der  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Untereinheit notwendig. Der Austausch von Asparagin durch Methionin in der Position 265 (N265M) in der zweiten transmembranären Domäne der  $\beta_3$ -Untereinheit hebt die Modulation und somit direkt auch die Wirkung von Etomidat und Propofol in rekombinanten Rezeptoren auf. Eine Mutation von Asparagin in der gleichen Position der  $\beta_2$ -Untereinheit hebt die Wirkung von Etomidat auf. Mäuse, die die Punktmutation  $\beta_3$ N265M tragen, erreichen weiters nach Propofol- und Etomidat-Gabe typische Endpunkte der Anästhesie (d.h. Schmerz-induzierte Bewegung bzw. stark verkürzte Dauer des sog. „loss of righting reflex“) nicht mehr. Dies weist darauf hin, dass Propofol und Etomidat hauptsächlich an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ihre Wirkung ausüben und tiefe Anästhesie durch die  $\beta_3$ -Untereinheit vermittelt wird. Andere Wirkungen von Propofol und Etomidat können durch die  $\beta_2$ -Untereinheit exprimierende Rezeptoren vermittelt werden. Die an  $\beta_2$ N265S Mäusen durchgeführten Studien deuten an, dass die  $\beta_2$ -Untereinheit für die sedierende Wirkung und die  $\beta_3$ -Untereinheit für die narkotische Wirkung von Etomidat (Bewusstseinsverlust) verantwortlich ist (Goetz et al., 2007). Neben dieser Aminosäure in der  $\beta$ -Untereinheit, konnte auch ein weiterer für die Bindung essentieller Rest in der  $\alpha_1$ -Untereinheit ( $\alpha_1$ M236) identifiziert werden (Li et al., 2009).

#### 1.4.5. Neurosteroide

In den 1940er Jahren entdeckte Hans Selye, dass bestimmte Metabolite des Hormons Progesteron sedative und anästhetische Wirkungen zeigen und daher schnell wirken. Das weist darauf hin, dass diese Substanzen nicht an nukleären Rezeptoren angreifen (Lambert et al., 2003).

Diese Liganden werden in Neuronen und Gliazellen entweder *de novo* (aus Cholesterol) oder aus dem peripher entstandenen Progesteron synthetisiert (Lambert et al., 2003). Nach der Abspaltung der Seitenkette des Cholesterols entsteht Pregnenolon. Pregnenolon ist der wichtigste Präkursor (Vorläufersubstanz) der inhibitorischen Steroide, sowohl von Pregnenolonsulfat (PS) und Dihydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), als auch von Progesteron. Das Enzym 21- $\beta$ -Hydroxylase katalysiert die Umwandlung von Progesteron zu Deoxycorticosteron. Diese beiden Steroide sind die wichtigsten Vorläufer der 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP und 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THDOC (Rupprecht and Holsboer, 1999; Tsutsui, 2006).

Nach der Biosynthese werden Neurosteroiden im Gehirn parakrin freigesetzt. In niedrigen nanomolaren Konzentrationen, welche unter Stress (Purdy et al., 1991), infolge einer Alkoholintoxikation (Kumar et al., 2004) und während der Schwangerschaft bzw. des Menstruationszyklus (Concas et al., 1999) entstehen können, verstärken Neurosteroiden die Wirkung von GABA und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Zhu and Vicini, 1997; Belelli and Herd, 2003; Stell et al., 2003). In sub- bzw. mikromolaren Konzentrationen (z.B. während der Geburt) können Neurosteroiden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auch direkt aktivieren (Concas et al., 1999; Stoffel-Wagner, 2003). Die Erhöhung der Konzentration der Neurosteroiden im ZNS verursacht anxiolytische, antidepressive, sedierende/hypnotische, antikonvulsive sowie anästhetische Wirkungen, und unterdrückt die Aktivität von der Hypothalamisch-hypophysären-Adrenalin-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA). HPA spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Stressantwort (Bitran et al., 1995; Barbaccia, 2004). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen den Unterschieden in der Plasmakonzentration der Neurosteroiden und der prämenstruellen dysphorischen Störung (Backstrom et al., 2003; Maguire et al., 2005), Panikstörung (Brambilla et al., 2003; Eser et al., 2006), Depression (Uzunova et al., 2006), Schizophrenie sowie der bipolaren

Störung (manisch-depressive Erkrankung) (Marx et al., 2006). Da die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren für die Kontrolle der Erregbarkeit von den mit diesen Krankheitszuständen assoziierten Neuronen wesentlich sind, können Beeinträchtigungen ihrer Funktion (infolge der Änderung der Plasmakonzentration von Neurosteroiden) Erkrankungen hervorrufen (Lambert et al., 2003).

Neurosteroide modulieren GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in vielen Hirnregionen. Das Enzym 5 $\alpha$ -Reduktase wandelt Progesteron in 5 $\alpha$ -DPH um, das wiederum durch 3 $\alpha$ -Hydroxysteroidoxidoreductase zu Allopregnanolon reduziert wird. Allopregnanolon ist potentieller Modulator des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Neurosteroide weisen keine absolute Spezifität für bestimmte GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtypen auf (Goetz et al., 2007). Viele GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind empfindlich für den Steroid Tetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC), aber die  $\delta$ -Untereinheit enthaltende Rezeptoren zeigen besonders große Empfindlichkeit- 30nM THDOC verstärken Ströme durch  $\alpha_1\beta_3\delta$ -Rezeptoren um bis zu 800%; Ströme anderer Rezeptor-Subtypen, z.B., der  $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren, werden in geringerem Ausmaß verstärkt (Mihalek et al., 1999; Wohlfarth et al., 2002; Stell et al., 2003). Dementsprechend kann das endogene Allopregnanolon an den extrasynaptischen  $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren die inhibierende Wirkung verstärken. Mäuse, die keine funktionelle  $\delta$ -Untereinheit haben, sind weniger empfindlich für sedative/hypnotische, anxiolytische und pro-absence-Effekte von Neurotransmittern (Goetz et al., 2007).

#### 1.4.6. Ethanol

In pharmakologisch und physiologisch relevanten Konzentrationen beeinflusst Ethanol viele neuronale Signalkaskaden (Harris, 1999; Korpi et al., 1998). Ethanol beeinflusst die Aktivität zahlreicher Ionenkanäle, unter anderem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Glutamatrezeptoren (Hanchar et al., 2005). Niedrige Ethanolkonzentrationen verstärken die Wirkung von GABA an in *Xenopus* Oozyten exprimierten  $\alpha_4\beta\delta$ - und  $\alpha_6\beta\delta$ -Rezeptoren (Sundstrom-Poromaa et al., 2002; Wallner et al., 2003; Hanchar et al., 2004, 2005). Für diesen Effekt ist die  $\beta$ -Untereinheit verantwortlich; die maximale Empfindlichkeit für Ethanol wird durch die  $\beta_3$ -Untereinheit vermittelt (Wallner et al., 2003). Ein Glas Wein kann, via  $\alpha_4\beta_3\delta$ - und  $\alpha_6\beta_3\delta$ -Rezeptoren, die GABAerge tonische (extrasynaptische) Inhibierung im Striatum und im Cerebellum verstärken (Hanchar et al., 2005). Auf der anderen Seite zeigen die  $\alpha_6^{-/-}$ -Mäuse die gleiche Empfindlichkeit für Ethanol wie Wildtyp-Mäuse (Korpi et al., 1999).

Nicht alle Strukturen des Gehirns sind gleich empfindlich für Ethanol. Ein Grund dafür liegt in der Heterogenität der Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Proctor et al., 1992; Weiner et al., 1997).

Der Mechanismus der Ethanolwirkung auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Es wurde vermutet, dass die Wirkung von niedrigen Ethanolkonzentrationen auf den Rezeptor auf die Anwesenheit der  $\gamma_{2L}$ -Untereinheit zurückzuführen ist (Wafford et al., 1991; Wafford and Whiting, 1992; Harris et al., 1995a;). Die  $\gamma_{2L}$ -Untereinheit hat acht Aminosäuren mehr als die  $\gamma_{2S}$ -Untereinheit. Im intrazellulären Loop zwischen TM3 und TM4 der  $\gamma_{2L}$ -Untereinheit befindet sich eine Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase C (PKC) (Whiting et al., 1990; Kofuji et al., 1991). Einige Autoren glaubten, dass Ethanol an diese Phosphorylierungsstelle bindet und dadurch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren direkt beeinflusst. In höheren Konzentrationen dürfte Ethanol seine Wirkung aber an einer anderen Bindungsstelle des Rezeptors ausüben (Michic et al., 1994). Studien an mutierten Mäusen schienen diese Theorie zu bestätigen. Die keine  $\gamma$ -Isoform der PKC exprimierenden Mäuse zeigten verminderte Empfindlichkeit für Ethanol (Harris et al., 1995b). Allerdings zeigten mehrere Studien

keinen Unterschied in der Ethanolwirkung auf  $\gamma_{2L}$ - und  $\gamma_{2S}$ -Rezeptor Subtypen (Kurata et al., 1993; Siegel et al., 1993; Mihic et al., 1994b). Der Zusammenhang zwischen der [<sup>3</sup>H]Zolpidem-Wirkung in bestimmten Hirnregionen, die Erhöhung der Empfindlichkeit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors für Ethanol und dem Vorkommen der  $\alpha_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\gamma_2$ -Untereinheiten wurden beobachtet. Die Verstärkung der Ethanolwirkung in den  $\gamma_{2L}$ -Untereinheit enthaltenden Hirnregionen wurde nicht festgestellt (Criswell et al., 1993). Die Ethanoleffekte bei den mutierten, nur  $\gamma_{2S}$ -Untereinheit enthaltenden Mäusen waren den Effekten der Wildtyp-Mäusen (Kontrollmäusen) ähnlich. Die hypnotische Wirkung der Benzodiazepine war etwas protrahiert (Homanics et al., 1999). Diese Daten zeigen, dass die  $\gamma_{2L}$ -Untereinheit für die Ethanolwirkung an dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor nicht notwendig ist (Korpi et al., 2002).

Zwei spezifische Aminosäurereste in den TM2 und TM3 Domänen des GABA<sub>A</sub>- und des Glycin-Rezeptors (S270 und A291 in der  $\alpha_1$ -Untereinheit) sind für die allosterische Modulation durch Ethanol und auch für die Wirkung von Inhalationsanästhetika entscheidend (Mihic et al., 1997).

## 1.4.7. Diverse Modulatoren von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

### 1.4.7.1. Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid hemmt das K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Cotransportsystem vor allem im dicken, aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife, aber auch in unreifen Neuronen (Korpi et al., 2002). Daher kommt es durch Fehlen des für die hyperpolarisierende Wirkung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren notwendigen Cl<sup>-</sup>-Gradienten zu einer verminderten GABAergen Inhibition (Rivera et al., 1999). Daneben konnte gezeigt werden, dass Furosemid als reversibler Antagonist an den α<sub>6</sub>β<sub>2/3</sub>γ<sub>2</sub>-Rezeptoren wirkt, nicht aber an α<sub>6</sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub>- und α<sub>1</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>-Rezeptoren (Korpi et al., 1995). Ein anderer K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Cotransportsystem-Blocker, Bumetanid, weist interessanterweise diesen Effekt nicht auf. Furosemid ist daher der erste Subtyp-selektive Antagonist des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (Korpi et al., 2002).

Furosemid könnte deswegen als Leitstruktur der Entwicklung von neuen, an verschiedenen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtypen selektiv wirkenden Substanzen dienen. Arginin in der Position 100 der α<sub>6</sub>-Untereinheit bestimmt die fehlende Wirkung der Benzodiazepine an diesem Rezeptorsubtyp. Diese Aminosäure ist aber für die Wirkung von Furosemid nicht von Bedeutung. An den α<sub>6</sub>(R100H)β<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>-Rezeptoren wurde die dem Wildtyp ähnliche antagonistische Wirkung von Furosemid beobachtet. Umgekehrt konnte auch an α<sub>1</sub>H101Rβ<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>-Rezeptoren keine antagonistische Wirkung beobachtet werden (Korpi et al., 2002). Ein 258 bp Fragment der α<sub>6</sub>-Untereinheit ist ausreichend für die durch Furosemid hervorgerufene Hemmung der GABA-induzierten Ströme in den chimären α<sub>1</sub>β<sub>3</sub>γ<sub>2</sub>-Rezeptoren. Dagegen sind die das 258 bp Fragment von der α<sub>1</sub>-Untereinheit enthaltenden α<sub>6</sub>β<sub>3</sub>γ<sub>2</sub>-Rezeptoren, unempfindlich für Furosemid (Jackel et al., 1998). Diese Daten weisen darauf hin, dass diese Domäne der α<sub>6</sub>-Untereinheit für die antagonistische Wirkung von Furosemid verantwortlich ist (Korpi et al., 2002).

#### 1.4.7.2. Loreclezol

Loreclezol ist ein sedativ und antikonvulsiv wirkender Agonist des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (Wingrove et al., 1994). Loreclezol und Etomidat binden an die  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Untereinheit enthaltende Rezeptoren, nicht aber an die  $\beta_1$ -Untereinheit enthaltende Rezeptoren. Für ihre Wirkung ist  $\alpha$ -Untereinheit nicht von Bedeutung. Vermutlich ist der gleiche Aminosäurerest sowohl für die Loreclezol- als auch für die Etomidate-Empfindlichkeit des Rezeptors verantwortlich. Dieser Aminosäurerest befindet sich wahrscheinlich in der extrazellulären Hälfte der TM2-Domäne. Die durch den Austausch von Asparagin durch Serin in Position 290 mutierte  $\beta_1$ -Untereinheit der  $\alpha_1/\beta_{xy}\gamma_2$ -Rezeptoren ist für Etomidat empfindlich. Die GABA-Wirkung an diesen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wurde verstärkt und Etomidat kann die mutierten Rezeptoren direkt aktivieren. Im Unterschied dazu zeigen die  $\beta_3$ (N289S) Mutanten keine Empfindlichkeit für Loreclezol und Etomidat. Interessanterweise sind  $\alpha_2\beta_3$ (M286W) $\gamma_2$ -Rezeptoren unempfindlich für Loreclezol, aber empfindlich für Etomidat (Korpi et al., 2002).

#### 1.4.7.3. Zink

Zn<sup>2+</sup> hemmt GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. In verschiedenen Hirnregionen wird Zn<sup>2+</sup> gemeinsam mit GABA und dem Glutamat freigesetzt. Die synaptische Aktivität von Zn<sup>2+</sup> wurde am besten in den Moosfasern des Hippocampus untersucht. Zn<sup>2+</sup> wirkt auch als potentieller Modulator GABAerger Funktion in den Basalganglien. Es kann die Amplitude reduzieren, die Anstiegszeit verlangsamen und die Dämpfung des mIPSCs beschleunigen. Die inhibitorische Wirkstärke des Zn<sup>2+</sup> an den rekombinanten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ist bis zu 400 mal höher an  $\alpha\beta$  als an  $\alpha\beta\gamma_2$ . Somit steht fest, dass das Vorhandensein einer  $\gamma_2$ -Untereinheit die Empfindlichkeit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors für Zn<sup>2+</sup> mindert. Die Wirkstärke von Zn<sup>2+</sup> hängt aber auch von der  $\alpha$ - und  $\delta$ -Untereinheit ab (Goetz et. al, 2007).

Das zweiwertige Kation Zn<sup>2+</sup> ist ein endogener Modulator synaptischer Transmission (Xie und Smart, 1994; Harrison und Gibbons, 1994). Seine Fähigkeit natürliche GABA-Rezeptoren zu modulieren, variiert jedoch in Abhängigkeit vom Typ der Nervenzellen,

dem Alter und der Aktivität (Xie und Smart, 1994; Kapur und Macdonald, 1997). Studien an rekombinanten Rezeptoren weisen darauf hin, dass die inhibitorische Wirkung von  $Zn^{2+}$  auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren von der Zusammensetzung der Untereinheiten abhängig ist (Draguhn et al., 1990; Smart et al., 1991). Die  $\alpha\beta$ -Rezeptoren sind hochempfindlich gegen  $Zn^{2+}$  (IC<sub>50</sub> Werte liegen zwischen 0.1 und 1  $\mu$ m) (Draguhn et al., 1990; Smart et al., 1991; Woollorton et al., 1997; Horenstein und Akabas, 1998). Die  $\alpha\beta X$ -Rezeptoren (X steht für  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\varepsilon$  oder  $\pi$ ) sind weniger empfindlich. Die  $\pi$ -Untereinheit enthaltenden Rezeptoren haben einen IC<sub>50</sub> Wert von ca. 2  $\mu$ m (Neelands und Macdonald, 1999), bei den  $\delta$ -Untereinheit enthaltenden Rezeptoren liegt der IC<sub>50</sub> Wert zwischen 5 und 16  $\mu$ m (Saxena und Macdonald, 1996; Krishek et al., 1998), und bei den  $\varepsilon$ -Untereinheit enthaltenden bei ca. 40  $\mu$ m (Whiting et al., 1997; Neelands et al., 1999). Noch einen höheren Effekt auf die Empfindlichkeit der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gegen  $Zn^{2+}$  hat die  $\gamma$ -Untereinheit, was aus den IC<sub>50</sub> Werten, die zwischen 20 und 600  $\mu$ m liegen, ersichtlich wird (Saxena und Macdonald, 1996; Burgard et al., 1996; Krishek et al., 1998).

Funktionelle Domänen, die für die Zinksensitivität verantwortlich sind, wurden sowohl in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten entdeckt. Das extrazelluläre Ende des M2 Segments der  $\beta$ -Untereinheit ist hauptverantwortlich dafür, dass die  $\beta$ -homologen und  $\alpha\beta$ -Rezeptoren für Zink empfindlich sind (Woollorton et al., 1997; Horenstein und Akabas, 1998). Der M2-M3 extrazelluläre Loop der  $\alpha_6$ -Untereinheit verleiht den  $\alpha_6\beta_3\gamma_{2L}$ -Rezeptoren höhere Empfindlichkeit für Zink (verglichen mit den  $\alpha_1\beta_3\gamma_{2L}$ -Rezeptoren) (Fisher und Macdonald, 1998).

Im äußeren Teil des Rezeptors, in der  $\gamma_2$ -Untereinheit wurde eine funktionelle Domäne lokalisiert, die für die schwache Empfindlichkeit gegenüber Zink verantwortlich ist. Diese Domäne besteht aus den Resten im M2 Segment und dem M2-M3 Loop. Die andere für die schwache Zink-Empfindlichkeit verantwortliche Domäne wurde im extrazellulären N-Terminus lokalisiert. Gemeinsam scheinen die beiden funktionellen Domänen die Basis für den Unterschied in der Rezeptorempfindlichkeit zwischen den  $\alpha\beta\gamma$ - und  $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren darzustellen (Nagaya und Macdonald, 2001).

#### 1.4.7.4. $\beta$ -Carboline

Eine weitere Substanzklasse, die am  $GABA_A$ -Rezeptor über die Benzodiazepinbindungsstelle angreift, sind die  $\beta$ -Carboline. Vertreter dieser Substanzklasse können unterschiedliche Effekte hervorrufen. Inverse Agonisten wie Methyl- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure ( $\beta$ -CCM) und Methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure (DMCM) hemmen die Wirkung von GABA, so dass die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $GABA_A$ -Rezeptoren vermindert und die Zelle stimuliert wird. Auf diese Weise wirken sie angstverstärkend.  $\beta$ -Carboline können auch als partielle inverse Agonisten (z. B. Ethyl- $\beta$ -carbolin-3-carboxylat), Antagonisten (z. B. Ethyl-4-methyl-5-methoxy- $\beta$ -carbolin-3-carboxylat), partielle Agonisten (z. B. Ethyl-5-benzyloxy-4-methoxymethylen- $\beta$ -carbolin-3-carboxylat) sowie als Agonisten (z. B. 6-Benzyloxy-4-methoxymethylen- $\beta$ -carbolin-3-carboxylat) wirken (Evans und Lowry, 2007).

Methyl- $\beta$ -carbolin (Harman), 1-Methyl-7-methoxy-3,4-dihydro- $\beta$ -carbolin (Harmalin) und 9H-Pyrido[3,4-b]indole (Norharman) wurden in hohen Konzentrationen im Blut von starken Rauchern, Alkoholikern, Heroinabhängigen, Patienten mit essentiellen Tremor und Parkinsonpatienten gefunden. Sie sind am pathophysiologischen Geschehen verschiedener ZNS-Störungen beteiligt. Es ist bekannt, dass  $\beta$ -Carboline aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) neurotoxisch wirken. In Tierversuchen ruft 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) Parkinson-ähnliche Symptome hervor. Harmaline zeigen auch cytotoxische Wirkung. Interessanterweise wirken  $\beta$ -Carboline auch neuroprotektiv gegen excitotoxische Effekte von Dopamin und Glutamat (Splettstoesser et al., 2005).

#### **1.4.7.5. Mefenaminsäure**

Mefenaminsäure ist ein Nichtsteroidales Antiphlogistikum. NSAIDs sind die weltweit am häufigsten verwendete Arzneistoffe. Vertreter dieser Arzneistoffklasse hemmen die Cyclooxygenase und damit die Prostaglandinsynthese (Coyne et al., 2007). Dadurch werden analgetische, antiinflammatorische (entzündungshemmende), antiphlogistische und kardioprotektive Wirkung hervorgerufen. Mefenaminsäure darüberhinaus verstärkt und inhibiert GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in vitro und zeigt anti-convulsive und pro-convulsive Effekte in vivo. Asparagin (N) in Position 290 in der zweiten transmembranären Domäne (TM2) der  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Untereinheit beeinflusst die modulatorische Wirkung der Mefenaminsäure. Die heteromeren  $\beta_1$ -Untereinheit enthaltenden Rezeptoren sind unempfindlich für Mefenaminsäure, während die  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Untereinheit inkorporierenden Rezeptoren durch Mefenaminsäure direkt aktiviert werden. Das pharmakologische Profil der Mefenaminsäure ähnelt dem von Loreclezol und Etomidat und diese Substanzen wirken vermutlich an der gleichen oder an den sich überlappenden Bindungsstellen der  $\beta_2/\beta_3$ -Untereinheit (Halliwell et al., 1999). Mefenaminsäure bewirkt außerdem eine Zunahme der Affinität von GABA für den Rezeptor, die sich in einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve widerspiegelt (Coyne et al., 2007).

## 1.5. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren

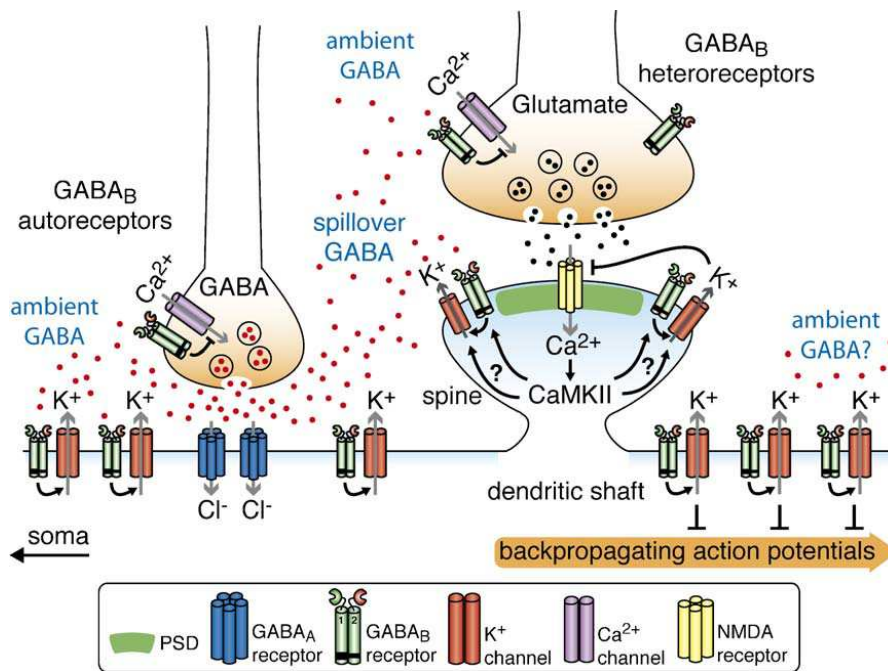
Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sind Heterodimere, die aus einer R1- und einer R2-Untereinheit aufgebaut sind. Durch die Aktivierung von G<sub>ai</sub>- und G<sub>ao</sub>-heteromeren G-Proteinen vermittelt der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor die langsame und protrahierte Wirkung von GABA (Terunuma et al., 2010). GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren aktivieren postsynaptisch lokalisierte K-Kanäle (K<sub>IR</sub>-inward rectifier). Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation. Präsynaptisch hemmen sie spannungsabhängige N/P/Q-Typ-Ca-Kanäle und vermindern dadurch die Freisetzung der Neurotransmitter (Couve et al., 2000, 2004; Bettler et al., 2004, 2006). Durch die Aktivierung von G<sub>ai</sub> wird Adenylatcyclase inhibiert und folglich auch die PKA-Signalkaskade (Terunuma et al., 2010).

Studien an nativen und rekombinanten Rezeptoren zeigten, dass es bei GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren zu keiner Agonist-induzierten Internalisierung kommt und sie keine Substrate der GRK (G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase) sind. Biochemische Studien zeigten, dass GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren an mehreren Resten der cytoplasmatischen Domänen der beiden (R1 und R2) Untereinheiten durch cAMP-abhängige Proteinkinase und 5'AMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden (Terunuma et al., 2010).

Ein selektiver GABA<sub>B</sub>-Agonist ist das Baclofen (Goudet et al., 2009).

Einige Studien zeigten, dass GABA<sub>B</sub>-Agonisten und allosterische Modulatoren zur Entwöhnung von Cocain, Opiaten, Nicotin und Ethanol eingesetzt werden können (Filip und Frankowska, 2008; Frankowska et al., 2009; Addolorato et al., 2009). Wiederholte Aufnahme von Cocain führt zur Erhöhung der extrazellulären GABA-Konzentration im Nucleus accumbens und zur Dephosphorylierung der R2-Untereinheit (Xi et al., 2003). Da prolongierte Aktivierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren die cAMP-Entstehung und PKA-Aktivierung durch G<sub>iα</sub> vermindert, kann die erhöhte extrazelluläre GABA-Konzentration bei wiederholter Aufnahme von Cocain die S892-Phosphorylierung steuern (Terunuma et al., 2010).

Die Phosphorylierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren durch AMPK (AMP-activated protein kinase) hat möglicherweise eine neuroprotektive Wirkung für GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren (Kuramoto et al., 2007). AMPK kommt in Neuronen im ganzen Gehirn vor. Bei Ischämie, Hypoxie und Hypoglykämie kommt es zur schnellen AMPK-Aktivierung (Culmsee et al., 2001; Gadalla et al., 2004; Kahn et al., 2005; Carling, 2005; Spasic et al., 2009). Bei den durch MCAO (Okklusion der mittleren zerebralen Arterie) verursachten ischämischen Ausfällen kommt es zur Phosphorylierung von S783, aber nicht von S892 in der R2-Untereinheit im Gyrus dentatus. Der Austausch von Serin durch Alanin in Position 783 vermindert signifikant die Überlebensrate von Neuronen verglichen mit dem Wildtyp (Terunuma et al., 2010).



**Abbildung 14.** Lokalisation und physiologische Rolle der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren kommen an prä-, post- und extrasynaptischen Membranen vor. Präsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren vermitteln Neurotransmitterfreisetzung durch die Down-Regulierung der spannungsabhängigen Ca-Kanälen oder durch die direkte Hemmung der Freisetzung. GABA<sub>B</sub>-Autorezeptoren hemmen die Freisetzung von GABA, während die Glutamat-Freisetzung durch GABA<sub>B</sub>-Heterorezeptoren gehemmt wird. Postsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren aktivieren Kir3-Kanäle (Bettler und Tiao, 2006).

## 2. Methoden

Zur Untersuchung von elektrischen Membranvorgängen werden in der Elektrophysiologie verschiedene Messtechniken verwendet. Für meine Untersuchungen wurde die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gewählt. Diese Technik ermöglicht es, transmembranäre Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential zu messen (Crawley et al., 2007) .

Rekombinante GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheiten-Kombinationen wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. *Xenopus* Oozyten sind heute ein Standardobjekt für die Expression und funktionelle Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren.

Gurdon et al. entdeckten schon 1971 die Fähigkeit funktioneller Expression exogener mRNA-Spezies durch Injektion der mRNA in das Zytoplasma der Froschoozyten.

### Oozytenpräparation

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) wurden 15-30 min lang in einer 0,25 % Lösung von *Ethyl-3-aminobenzoat-methylsulfonat* anästhetisiert. Daraufhin wurde vorsichtig mit einer Pinzette Follikelgewebe operativ entnommen.

Das Follikelgewebe wurde in einer Petrischale mit OR2- Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES; pH=7,5 (1M NaOH)) übergeführt, und zuerst mechanisch zerkleinert und danach für etwa 90 min in Collagenase- Lösung inkubiert (2mg Collagenase Sigma Typ IA/ml OR2), um Bindegewebe und Follikelzellen zu entfernen (Goldin 1993).

Durch diese Collagenasebehandlung konnte rasch eine große Anzahl von einzelnen Oozyten präpariert werden. Da Calcium durch die Aktivierung unspezifischer Proteasen toxisch wirkt (Goldin, 1993), mussten die Oozyten vor, vor allem aber nach der Collagenase- Behandlung gründlich mit OR2-Lösung gewaschen werden. Danach wurden sie in ND96-Lösung (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES; pH=7,4 (1M NaOH)) transferiert.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von einigen Stunden wurden Stadium V-VI Oozyten (Durchmesser 1000-1200  $\mu\text{M}$ ) ausgewählt, da diese sich am besten zur Injektion eignen (Goldin, 1993).

### **cRNA- Vorbereitung**

Poly(A<sup>+</sup>)cRNA-Transkripte von linearisierter cDNA wurden in pCMV-Vektor kloniert. cRNAs, die für die einzelnen Untereinheiten kodierten, wurden in DEPC5 (Diethylpyrocarbonat) gelöst.

### **Injektion von cRNA**

Bei der Injektion von cRNA in den Oozyten musste auf ausreichende, mechanische Stabilität geachtet werden, um die Oozyten nicht zu verletzen. Vor der Injektion wurden die einzelnen cRNA, die für die verschiedenen Untereinheiten kodieren, im Verhältnis 1:1:10 ( $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$  und  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$ ) gemischt.

Etwa 10 bis 50 nl dieser Lösung wurden mithilfe eines pneumatischen Injektionsgeräts in die einzelnen Oozyten injiziert (d.h. bis der Oozyt deutlich an Größe zugenommen hatte). Nach der Injektion wurden die Oozyten für weitere 24 Stunden bei 18° in ND96 + Penicillin/Streptomycin (100 I.E./ ml und 100 $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und konnten danach für die Messungen verwendet werden.

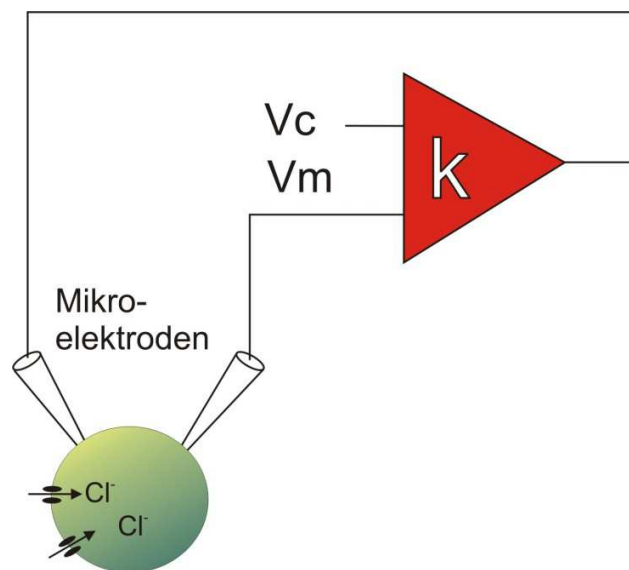
### **Messlösungen:**

Von den zu untersuchenden Substanzen (Strukturformeln Abb.) wurden Stammlösungen (Konzentration 10 mM) in 100 % DMSO hergestellt. Eine 1 mM GABA-Stammlösung wurde jeden Tag frisch zubereitet (5.15 mg GABA in 50 ml ND 96). Bei den Testlösungen war zu beachten, dass die DMSO-Konzentration 0,3% nicht überstieg. Lösungen für die Messungen mussten ebenfalls täglich frisch zubereitet werden.

## 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Der Versuchsaufbau für die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik von *Xenopus laevis* Oozyten ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

Die Versuchsanordnung besteht aus einer intrazellulären Elektrode (V) zur Messung des transmembranären Potentials, einem Rückkopplungsverstärker, der die Abweichung des tatsächlichen Potential zum benötigten Potentials (Haltepotential) misst und einer zweiten, intrazellulären Elektrode (I), die den um das Haltepotential zu erreichen bzw. konstant zu halten benötigten Strom in den Oozyten injiziert („voltage clamp“-Prinzip). Der Verstärker funktioniert nach dem Prinzip der negativen Rückkoppelung, da der über die zweite Mikroelektrode injizierte Strom jeweils mit umgekehrtem Vorzeichen zum von der Zellmembran generierten Aktionsstrom fließt (Hille, 1992).



**Abbildung 15.** Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

## Perfusionssystem

Die Messungen wurden in einer modifizierten Messkammer eines schnellen Perfusionssystems nach Hering (1998) durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt schematisch den Aufbau der Messkammer.

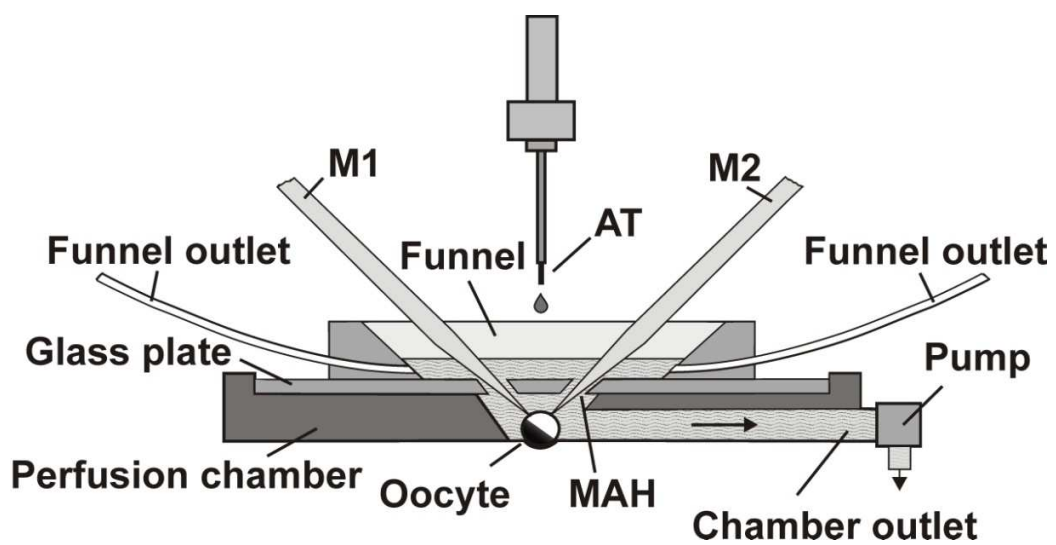


Abbildung 16. Messkammer (Khom et al., 2006)

### 3. Problemstellung und Zielsetzung

#### 3.1 Problemstellung

Die Bindungsstelle der Benzodiazepine an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren befindet sich zwischen der  $\alpha_{1,2,3}$  oder 5 und der  $\gamma_2$ -Untereinheit.

Während GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\gamma_2$ -Untereinheiten im Gehirn ubiquitär vorkommen, findet man GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\gamma_1$ -Untereinheiten nur an wenigen Stellen wie z.B. in der Amygdala, im Globus pallidus und dem Bettkern der Stria terminalis.

Die Amygdala und der Bettkern der Stria terminalis spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Angst, daneben ist die Amygdala auch bei der Funktion des Gedächtnisses und der Wiedererkennung von Situationen beteiligt.

Die klinische Wirkung der meisten Benzodiazepine beruht auf einer potenten und effizienten Modulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\gamma_2$ -Untereinheiten, während GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\gamma_1$ -Untereinheiten von den meisten Benzodiazepinen nicht moduliert werden.

Zahlreiche, an der Bindung der Benzodiazepine an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren beteiligte bzw. für die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen ( $I_{GABA}$ ) essentielle Aminosäuren sind bereits identifiziert worden: Eine wesentliche Rolle spielen dabei ein Histidin-Rest der Benzodiazepin-sensitiven  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha 102H$ ; Duncalfe et al., 1996), ein Phenylalanin- bzw. ein Methionin-Rest der  $\gamma_2$ -Untereinheit ( $\gamma_2 F77$  und  $\gamma_2 1M30$ ) (Wingrove et al., 1997). In den homologen Positionen der Benzodiazepin-insensitiven  $\gamma_1$ -Untereinheit findet man dagegen einen Isoleucin- ( $\gamma_1 I79$ ) bzw. einen Leucin-Rest ( $\gamma_1 L132$ ).

Daher stellt sich die Frage: Sind diese beiden Reste für die verminderte bzw. fehlende Modulation von  $I_{GABA}$  durch Benzodiazepine verantwortlich bzw. kann man durch Mutation dieser Reste ( $\gamma_1 I79F$  bzw.  $\gamma_1 I79F \times L132M$ ) eine mit  $\gamma_2$  vergleichbare Modulation von  $I_{GABA}$  erreichen?

### 3.2 Zielsetzungen

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten die Wirkung von Zopiclon, Diazepam und Clobazam auf  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  Rezeptoren untersucht werden. Dafür sollten folgende Experimente durchgeführt werden:

- Expression von  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten und Messung von  $I_{GABA}$  mittels der 2-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik;
- Erstellung von GABA<sub>A</sub>-Konzentrations-Wirkungskurven für die genannten Rezeptoren und Bestimmung der wichtigsten pharmakologischen Parameter ( $EC_{50}$ ;  $EC_{5-10}$ );
- Erstellung einer Zopiclon Konzentrations- Wirkungskurve an  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  Rezeptoren und Vergleich der potentiell unterschiedlichen Effekten an verschiedenen Rezeptor-Subtypen bzw. mutierten Rezeptoren;
- Erstellung einer Diazepam Konzentrations-Wirkungskurve an  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  Rezeptoren und Vergleich der Effekte an den zwei natürlich vorkommenden Rezeptor-Subtypen ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  und  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ) und zwei mutierten Rezeptoren;
- Erstellung einer Clobazam Konzentrations-Wirkungskurve an  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  Rezeptoren und Vergleich der potentiell unterschiedlichen Effekten an verschiedenen Rezeptor-Subtypen bzw. mutierten Rezeptoren.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung der GABAA Rezeptor Subtypen

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte der Effekt ausgewählter Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle auf Wildtyp und mutierte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren untersucht werden. Dafür wurden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von I<sub>GABA</sub> mithilfe der 2-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik untersucht.

Da die Experimente bei konstanter und geringer GABA-Konzentration durchgeführt werden sollten, mussten im Vorfeld eine GABA Dosis-Wirkungskurve erstellt und die Parameter EC<sub>5-10</sub> und EC<sub>50</sub> ermittelt werden.

Die gemittelten Amplituden wurden nach folgender Formel normiert:

$$\frac{\text{Amplitude}_x}{\text{Amplitude}_{\max}} \times 100$$

Amplitude<sub>x</sub>... Amplitude bei jeweiliger Konzentration

Amplitude<sub>max</sub>... Amplitude induziert von 1mM GABA

und die Werte in ein Koordinatensystem (siehe Abbildung 15) eingetragen. Durch die Datenpunkte konnte danach eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung angepasst werden (Verwendetes Programm Origin, siehe Abbildung 15A). Die EC<sub>50</sub>, d.h. jene Konzentration, die 50% des maximalen Effekts auslöst, wurde ermittelt.

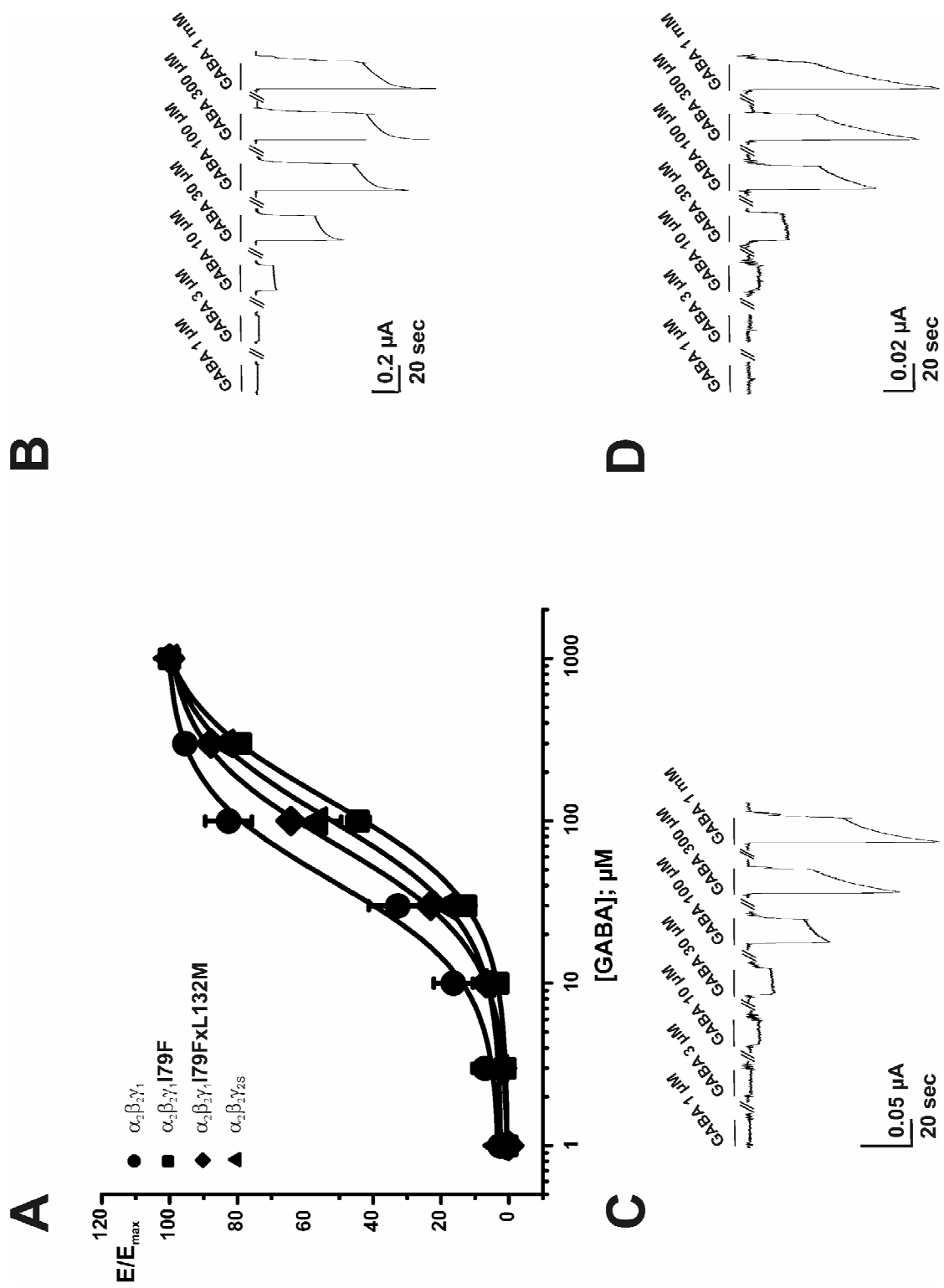
| Subtyp  | EC <sub>50</sub> ; μM | EC <sub>5-10</sub> , μM | n <sub>H</sub> | n |
|---|-----------------------|-------------------------|----------------|---|
| α <sub>2</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>2</sub>            | 120.14 ± 24.02        | 7 - 17                  | 1,35 ± 0,14    | 4 |
| α <sub>2</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>1</sub>            | 42,63 ± 8,05          | 3 - 7                   | 1,44 ± 0,28    | 4 |
| α <sub>2</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>1</sub> I79F       | 134.95 ± 11.7         | 14 - 24                 | 1,35 ± 0,08    | 4 |
| α <sub>2</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>1</sub> I79FxL132M | 71.68 ± 3.29          | 8 - 14                  | 1,37 ± 0,06    | 4 |

n<sub>H</sub>.... Hill-Koeffizient

n.....Anzahl der Experimente

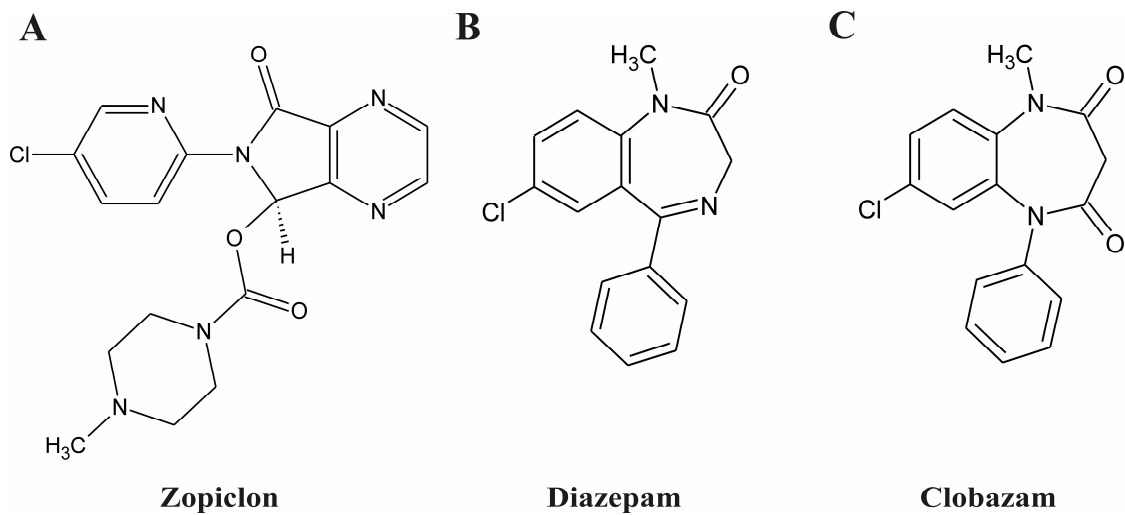
**Tabelle 3.** Zusammenfassung der Parameter EC<sub>50</sub>; EC<sub>5-10</sub>, n<sub>H</sub> und Anzahl der Experimente der GABA-Dosis-Konzentrationskurven durch die angeführten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren-Subtypen.

**Abbildung 17.** (A) GABA-Konzentrations-Wirkungskurven für (●) α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>1</sub>, (■) α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>1</sub>I79F, (◆) α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>1</sub>I79FxL132M und (▲) α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>2S</sub> Rezeptoren. Typisches Experiment für GABA-induzierte Chloridströme durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bestehend aus (B) α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>1</sub>, (C) α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>1</sub>I79F und (D) α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>1</sub>I79FxL132M Untereinheiten werden gezeigt (siehe Seite 52).



## 4.2. Modulation von $I_{GABA}$ durch die ausgewählten Liganden

Nach der Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften der  $GABA_A$ -Rezeptor-Subtypen  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ ,  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  (inkl. Ermittlung der  $EC_{50}$ - bzw.  $EC_{5-10}$ -Konzentrationen), konnte nun in weiterer Folge der Einfluß der Punktmutationen auf die Modulation von  $I_{GABA}$  durch die ausgewählten Liganden (siehe Abbildung 16) untersucht werden.



**Abbildung 18.** Strukturformeln der untersuchten Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle

### 4.2.1. Zopiclon

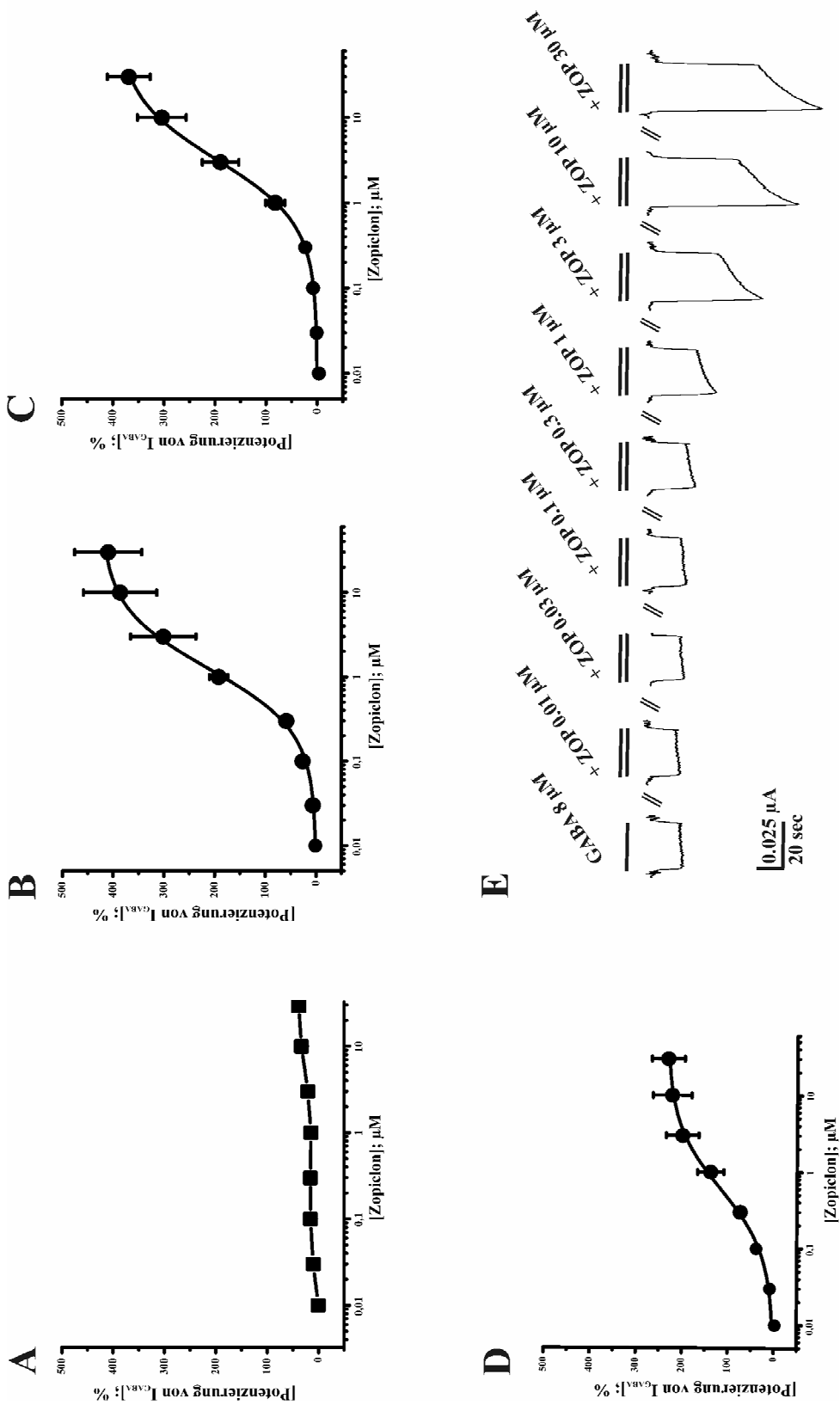
Bevor der Einfluss der Punktmutation  $\gamma_1I79F$  bzw. der Doppelmuation auf die Modulation von  $I_{GABA}$  durch Zopiclon untersucht wurde, musste zuerst der Effekt von Zopiclon auf  $\gamma_1$ - und  $\gamma_{2S}$ -Rezeptoren untersucht werden.

Wie in Abb.17A gezeigt, konnte bei  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ -Rezeptoren kein signifikanter Effekt von Zopiclon auf  $I_{GABA}$  ( $EC_{5-10}$ ) beobachtet werden ( $p>0.05$ ;  $n=8$ ). Dagegen induzierte Zopiclon eine starke, dosis-abhängige Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren. Erste signifikante Effekte ( $p<0.05$ ) waren bereits bei Konzentrationen  $\geq 10$  nM zu beobachten. Die maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  lag dabei bei  $232.75 \pm 29.73$  % und die  $EC_{50}$  betrug  $0.60 \pm 0.22$   $\mu$ M ( $n=9$ ; siehe Abbildung 17D).

Wurde nun die  $\gamma_1$  mutiert ( $\gamma_1I79F$ ) und diese Untereinheit in Kombination mit  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert, konnte eine deutliche Modulation von  $I_{GABA}$  beobachtet werden. Die maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  lag dabei bei  $423.09 \pm 56.73$  % und die  $EC_{50}$  betrug  $1.25 \pm 0.34$   $\mu$ M ( $n=7$ ; siehe Abbildung 17B).

An Rezeptoren, die die Doppelmuation  $\gamma_1I79FxL132M$  trugen, kam es bereits zu ersten signifikanten Effekten ( $p<0.05$ ) bei Konzentrationen  $\geq 10$  nM. Ein Maximum wurde bei einer Konzentration von 30  $\mu$ M erreicht, die Stimulation von  $I_{GABA}$  lag dabei bei  $392.42 \pm 55.84$  % und die  $EC_{50}$  betrug  $3.19 \pm 1.26$   $\mu$ M ( $n=5$ , siehe Abbildung 17C).

**Abbildung 19.** Konzentrationsabhängige Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch (A)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ , (B)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ , (C)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  und (D)  $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren durch Koapplikation einer GABA  $EC_{5-10}$  und Zopiclon in den gezeigten Konzentrationen. Ein typisches Experiment für die Potenzierung von GABA-induzierten Chloridströme durch  $GABA_A$ -Rezeptoren bestehend aus  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$  wird in (E) gezeigt (siehe Seite 55).



#### 4.2.2. Diazepam

Der nächste Ligand, der im Rahmen meiner Diplomarbeit getestet wurde, war Diazepam. Auch hier wurde zuerst der Effekt auf  $I_{GABA}$  ( $EC_{5-10}$ ) durch  $GABA_A$ -Rezeptoren bestehend aus  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$  und  $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$  Untereinheiten untersucht.

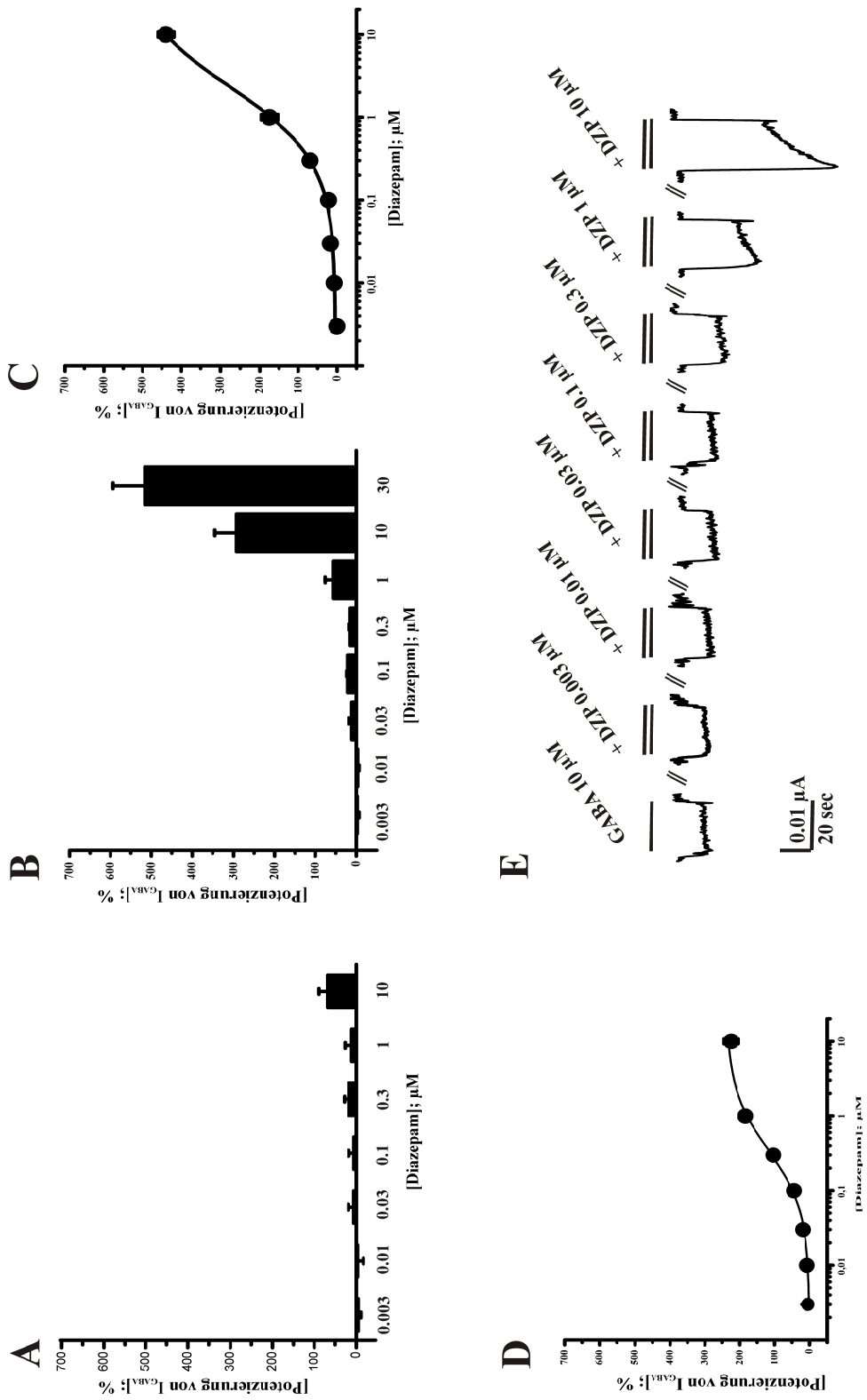
Wie in Abbildung 18 illustriert, konnte keine signifikante positive allosterische Modulation von  $I_{GABA}$  durch  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$   $GABA_A$ -Rezeptoren beobachtet werden ( $p > 0.05$ ;  $n=5$ ).

Im Gegensatz dazu - und wie bereits aus der Literatur bekannt - kam es an  $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren zu einer signifikanten, dosisabhängigen Stimulation von  $I_{GABA}$  ( $EC_{5-10}$ ) durch Diazepam ( $p < 0.05$ ). Erste signifikante Effekte ( $p < 0.05$ ) waren bereits bei Konzentrationen  $\geq 3$  nM zu beobachten. Die maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  ( $EC_{5-10}$ ) lag dabei bei  $239.01 \pm 22.96$  % und die  $EC_{50}$  betrug  $0.36 \pm 0.10$   $\mu$ M ( $n=4$ , siehe Abbildung 18D).

Bei punktmultierten  $GABA_A$ -Rezeptoren ( $\gamma_1I79F$ ) konnte nur bei den letzten beiden Konzentrationen (10 und 30  $\mu$ M) ein signifikanter Effekt von Diazepam auf  $I_{GABA}$  ( $EC_{5-10}$ ) beobachtet werden (Potenzierung von  $I_{GABA}$  bei 30  $\mu$ M:  $515,88 \pm 77,32$ ;  $n=7$ ,  $p < 0.05$ ).

Durch das Einführen der Doppelmutation  $\gamma_1I79FxL132M$  kam es zu einer dosisabhängigen Modulation von  $I_{GABA}$  durch Diazepam im Gegensatz zu den einfach mutierten Rezeptoren ( $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ ). Die  $EC_{50}$  lag bei diesem Rezeptorsubtyp bei  $2,30 \pm 1,34$   $\mu$ M und die maximale Stimulation erreichte  $545,27 \pm 98,9$ % ( $n=4$ ; siehe Abbildung 18C).

**Abbildung 20.** Diazepam moduliert konzentrationsabhängig  $I_{GABA}$  durch (A)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ , (B)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ , (C)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$  und (D)  $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren durch Koapplikation einer GABA  $EC_{5-10}$  und Diazepam in den gezeigten Konzentrationen. (E) zeigt ein typisches Experiment für die Diazepam-induzierte Modulation von  $I_{GABA}$  durch  $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$  (siehe Seite 57).



### 4.2.3. Clobazam

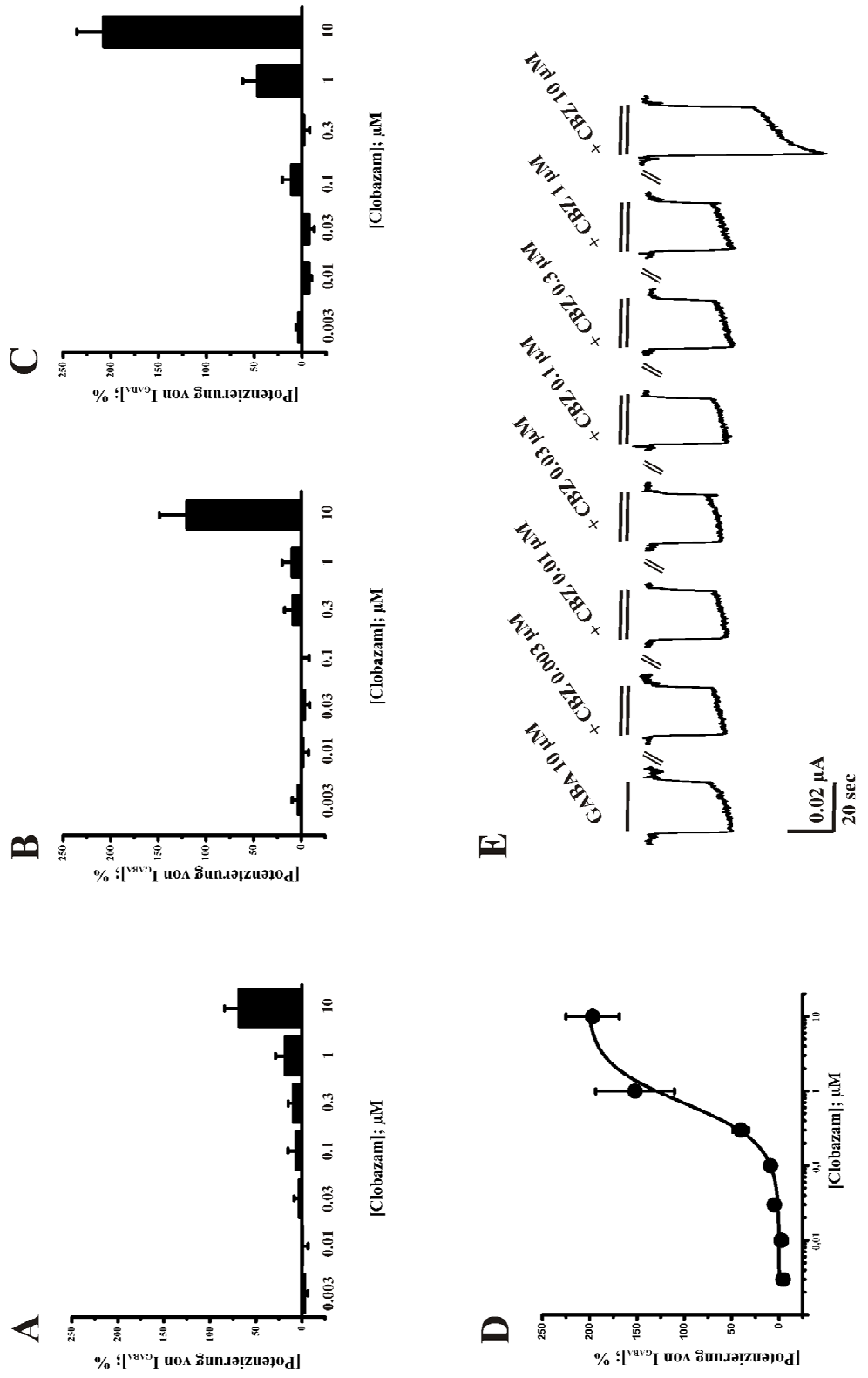
Um den Einfluss der Punktmutation  $\gamma_1$ I79F bzw. der Doppelmutation  $\gamma_1$ I79F $\times$ L132M auf die Modulation von  $I_{GABA}$  durch Clobazam untersuchen zu können, musste zuerst der Effekt von Clobazam auf  $\gamma_1$ - und  $\gamma_{2S}$ -Rezeptoren ermittelt werden.

Wie in der Abb.19A zu sehen ist, konnte bei  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ -Rezeptoren kein signifikanter Effekt von Clobazam auf  $I_{GABA}$  ( $EC_{5-10}$ ) beobachtet werden ( $p>0.05$ ,  $n=5$ ). Dagegen induzierte Clobazam eine starke, konzentrations-abhängige Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren. Erste signifikante Effekte ( $p<0.05$ ) waren bei Konzentrationen  $\geq 0.3 \mu\text{M}$  zu beobachten. Die maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  lag dabei bei  $203,17 \pm 30,1 \%$  und die  $EC_{50}$  betrug  $0,70 \pm 0,24 \mu\text{M}$  ( $n=9$ ; siehe Abbildung 19D).

Interessanterweise hatte die Mutation  $\gamma_1$ I79F einen sehr schwachen Effekt auf die Modulation von  $I_{GABA}$  durch Clobazam. Während keine signifikante Stimulation von  $I_{GABA}$  ( $EC_{5-10}$ ) im Konzentrationsbereich von 3 nM bis  $1\mu\text{M}$  zu messen war, kam es nur nach Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Clobazam zu einer signifikanten Potenzierung von  $I_{GABA}$  ( $119.89 \pm 28.84 \%$ ,  $n=6$ ,  $p<0.05$ ).

An Rezeptoren, die die Doppelmutation  $\gamma_1$ I79F $\times$ L132M enthielten, war nur bei Applikation von 1 und  $10 \mu\text{M}$  Clobazam eine signifikante Verstärkung des GABA-induzierten Chloridstromes zu sehen (Potenzierung von  $I_{GABA}$  bei  $1 \mu\text{M}$ :  $46.21 \pm 16.06\%$ ,  $n=5$  und  $10 \mu\text{M}$ :  $207.69 \pm 27.96$ ,  $n=5$ ). Die Modulation von  $I_{GABA}$  durch  $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$  und  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ I79F $\times$ L132M Rezeptoren bei diesen Konzentrationen war interessanterweise vergleichbar.

**Abbildung 21. Konzentrationsabhängige Modulation von  $I_{GABA}$  für (A)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ , (B)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ I79F, (C)  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ I79F $\times$ L132M und (D)  $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren durch Koapplikation einer GABA  $EC_{5-10}$  und Clobazam in den gezeigten Konzentrationen. (E) Typische Experimente für GABA-induzierte Chloridströme durch  $GABA_A$ -Rezeptoren bestehend aus  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ I79F (siehe Seite 59).**



## 5. Diskussion

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der Erregbarkeit des ZNS. Sie vermitteln schnelle synaptische, aber auch extrasynaptische (tonische), inhibitorische Neurotransmission. Die Aktivierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren führt daher unter anderem zu Beruhigung, Anxiolyse oder Sedierung. Die Funktion von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren kann durch zahlreiche klinisch relevante Pharmaka wie z.B. den Benzodiazepinen moduliert werden.

Die Bindungsstelle von Benzodiazepinen wird von Aminosäureresten der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit gebildet. Nur  $\alpha$ -Untereinheiten mit einem Histidin-Rest in Position 101 bzw. in homologer Position ( $\alpha_1$ H101,  $\alpha_2$ H101,  $\alpha_3$ H126 und  $\alpha_5$ H105) sind Benzodiazepin-sensitiv.  $\alpha$ -Untereinheiten, denen dieser Rest fehlt bzw. die in homologer Position einen Arginin-Rest aufweisen, sind dagegen Benzodiazepin-insensitiv (Löw et al., 2000; Balic et al., 2009).

Als wichtiger Teil der Benzodiazepin Bindungsstelle gilt die  $\gamma$ -Untereinheit. Lange wurde vermutet, dass Benzodiazepine I<sub>GABA</sub> nur durch Rezeptoren mit  $\gamma_2$ -Untereinheiten modulieren, während Rezeptoren mit  $\gamma_1$  bzw.  $\gamma_3$  Benzodiazepin-insensitiv sind. Wingrove et al. (1997) zeigten, dass die Schlüsselaminosäuren für die Benzodiazepin-Wirkung in der  $\gamma_2$  F77 bzw.  $\gamma_2$ M130 sind. Da  $\gamma_1$ -Untereinheiten in den korrespondierenden Positionen ein Isoleucin ( $\gamma_1$ I79) bzw. ein Leucin ( $\gamma_1$ L132) besitzen, wurde vermutet, dass Rezeptoren mit  $\gamma_1$ -Untereinheiten Benzodiazepin-insensitiv sind.

In früheren Arbeiten am Department konnte dagegen gezeigt werden, dass Benzodiazepine wie z.B. Triazolam, Midazolam oder Clotiazepam an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\gamma_1$ -Untereinheit angreifen, wenn auch in geringerem Ausmaß als an  $\gamma_2$ -Rezeptoren.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Punktmutation  $\gamma_1$ I79F bzw. die Doppelmutation  $\gamma_1$ I79FxL132M auf die Modulation von I<sub>GABA</sub> durch ausgewählte Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle (Zopiclon, Diazepam, Clobazam) ausübt bzw. ob mit diesen Mutationen eine mit  $\gamma_2$ -Rezeptoren vergleichbare Wirkung an  $\gamma_1$ -Rezeptoren erreicht werden kann.

Dafür wurden Rezeptoren bestehend aus  $\alpha_2$ -,  $\beta_2$ - und den Wildtyp  $\gamma$ -Untereinheiten bzw. mutierten  $\gamma$ -Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von  $I_{GABA}$  mittels 2-Mikroelektrodenanschlusstechnik untersucht.

Der erste untersuchte Ligand Zopiclon (Struktur siehe Abb. 16) zeigte keinen signifikanten Effekt an  $\gamma_1$ -Rezeptoren, während eine deutliche Modulation von  $I_{GABA}$  durch  $\gamma_2$ -Rezeptoren gemessen wurde. Das Einführen der Punktmutation resultierte in einer deutlich gesteigerten Sensitivität des Rezeptors für Zopiclon. Der Effekt am punktmutierten Rezeptor war sogar signifikant stärker als an  $\gamma_2$ -Rezeptoren. Die Doppelmutation dagegen zeigte keinen zusätzlichen Nutzen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Wirkung von Zopiclon in starkem Maße von der Aminosäure in Position 77 bzw. 79 abhängt. Befindet sich in dieser Position ein Isoleucin, wird kein Effekt beobachtet, befindet sich in dieser Position jedoch ein Phenylalanin wird  $I_{GABA}$  deutlich von Zopiclon potenziert. Obwohl mit diesen Experimenten gezeigt werden konnte, dass für die Wirkung von Zopiclon Phenylalanin notwendig ist, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht gesagt werden, ob dieser Rest für die Bindung von Zopiclon an den Rezeptor benötigt wird oder ob Phenylalanin für die Transduktion des Effekts benötigt wird. Dies könnte/sollte in weiterführenden Experimenten (z.B. durch weitere Mutationen oder auch durch Bindungsstudien mit markierten Zopiclon-Derivaten) näher untersucht werden.

Diazepam zeigte, wie bereits bekannt (Walters et al., 2000; Esmaili et al., 2008), keinen signifikanten Effekt an  $\gamma_1$ -Rezeptoren, dagegen konnte an den  $\gamma_2$  enthaltenden Rezeptoren eine starke Modulation beobachtet werden. Wie in Abb.18 gezeigt, kam es durch das Einführen der Punkt- bzw. auch der Doppelmutation zu einer Potenzierung von  $I_{GABA}$ . Jedoch setzte dieser Effekt erst bei Konzentration  $\geq 1 \mu\text{M}$  Diazepam ein. Die Wirkung von höheren Konzentrationen von Diazepam war dann sogar stärker als an  $\gamma_2$ -Rezeptoren, darüber hinaus konnte auch keine Saturation erreicht werden.

Dieser Effekt kann nun auf die beiden Mutationen zurückzuführen sein, jedoch ist bereits bekannt, dass Diazepam in Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  auch Rezeptoren ohne Benzodiazepin-Bindungsstelle (Rezeptoren bestehend nur aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten) potenziert (Walters et al., 2000).

Obwohl bei höheren Konzentrationen eine Wirkungssteigerung sowohl an der Einfach- als auch an der Doppelmutante beobachtet wurde, reichen die Mutationen nicht aus, um die an  $\gamma_2$ -Rezeptoren beobachtete Wirkung zu erreichen. Diazepam braucht weitere Aminosäuren, um die vollständige Wirkung ausüben zu können.

Clobazam zeigte einen schwachen Effekt an  $\gamma_1$ -Rezeptoren und eine starke konzentrationsabhängige Potenzierung von  $I_{GABA}$  an  $\gamma_2$ -Rezeptoren. Durch das Einführen der Einfachmutation kam es erst bei höheren Konzentrationen ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) zu einer signifikanten Potenzierung von  $I_{GABA}$ . Jedoch reichte die Einfachmutation nicht aus, um den Effekt vollständig wiederherzustellen. Verglichen mit Einfachmutation, kam es durch das Einführen der Doppelmutation fast zu einer Verdoppelung des Effekts. Bei der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Clobazam war der Effekt an  $\gamma_1\text{I79FxL132M}$  identisch mit dem Effekt an  $\gamma_2$ -Rezeptoren. Bei niedrigeren Konzentrationen war der Effekt an doppelmutierten Rezeptoren sogar stärker als an Wildtyprezeptoren.

Anhand dieser Daten lässt sich feststellen, dass die beiden Mutationen (Austausch von Isoleucin durch Phenylalanin in Position 79 und Austausch vom Leucin durch Methionin in Position 132) nicht ausreichen und Clobazam noch weitere Aminosäuren braucht, um die an  $\gamma_2$ -Rezeptoren beobachtete Wirkung zu erreichen.

In einer parallel durchgeführten Diplomarbeit (Amela Resic) konnte dagegen für andere Benzodiazepin-Liganden (Triazolam und Midazolam) gezeigt werden, dass durch das Einführen der Punkt- bzw. Doppelmutation eine mit  $\gamma_2$ -vergleichbare Sensitivität für Benzodiazepin-Liganden wiederhergestellt werden konnte. Ob diese Ergebnisse nun auf strukturelle Unterschiede der untersuchten Liganden (Midazolam und Triazolam besitzen einen zusätzlichen stickstoffhaltigen 5-Ring am Bicyclus) oder auf unterschiedliche Bindungsstellen am Rezeptor zurückzuführen sind, bleibt zum momentanen Stand der Untersuchungen noch ungeklärt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den drei untersuchten Substanzen nur für Zopiclon eine signifikante Abhängigkeit der  $I_{GABA}$  Potenzierung von dem Aminosäurerest in Position 77 bzw. 79 nachgewiesen werden konnte.

## 6. Zusammenfassung (250 Worte)

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) Typ A (GABAA) Rezeptoren sind die wichtigste inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren von Säugetieren. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden durch verschiedene klinisch wichtige Arzneistoffgruppen wie z.B. den Benzodiazepinen moduliert. Ihre Bindungsstelle befindet sich zwischen der  $\alpha$  und der  $\gamma_2$ -Untereinheit. Rezeptoren mit  $\gamma_1$ -Untereinheiten werden dagegen kaum von Benzodiazepinen erkannt.

Ein wesentlicher, struktureller Unterschied zwischen  $\gamma_1$ - und  $\gamma_2$ -Untereinheiten sind unterschiedliche Aminosäuren in Positionen 77 bzw. 79 ( $\gamma_2$ F77 bzw.  $\gamma_1$ I79) und Positionen 130 bzw. 132 ( $\gamma_2$ M130 bzw.  $\gamma_1$ L132).

Problemstellung:  $\gamma_1$ -Rezeptoren werden von Zopiclon, Diazepam und Clobazam nicht moduliert, während  $I_{GABA}$  durch  $\gamma_2$ -Rezeptoren signifikant potenziert wird. Lässt sich mit Hilfe von zwei Punktmutationen in der  $\gamma_1$ -Untereinheit eine mit  $\gamma_2$ -Rezeptoren vergleichbare Sensitivität für ausgewählte Liganden (Zopiclon, Diazepam und Clobazam) herstellen?

Methoden: Rekombinante GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheiten-Kombinationen wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Mit 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik wurde die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen ( $I_{GABA}$ ) gemessen.

Ergebnisse und Diskussion:

Durch das Einführen der Mutation  $\gamma_1$ I79F war die Modulation von  $I_{GABA}$  durch Zopiclon vergleichbar mit der Modulation von  $I_{GABA}$  durch  $\gamma_2$ -Rezeptoren. Die Doppelmutation zeigte keinen zusätzlichen Nutzen, daraus kann geschlossen werden, dass die Wirkung von Zopiclon einzig von Phenylalanin in Position 77 ( $\gamma_2$ ) bzw. 79 ( $\gamma_1$ I79F) abhängig ist. Obwohl Diazepam und Clobazam in höheren Konzentrationen eine deutlich stärkere Wirkung an den mutierten Rezeptoren im Vergleich zu  $\gamma_1$ -Wildtyp Rezeptoren zeigten, reichen diese zwei Mutationen nicht aus, um die an  $\gamma_2$ -Rezeptoren beobachtete Wirkung zu erreichen. Es sollten daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um festzustellen, welche weiteren Aminosäuren für die Wirkung von Diazepam und Clobazam notwendig sind.

## 7. Summary

### Background:

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) type A (GABA<sub>A</sub>) receptors are the major inhibitory neurotransmitter receptors in the mammalian brain. GABA<sub>A</sub> receptors are the target for a number of pharmacologically important drugs such as benzodiazepines. The benzodiazepine binding site is presumably located at the  $\alpha/\gamma_2$ -subunit-interface. GABA<sub>A</sub> receptors containing  $\gamma_1$ -subunits are virtually insensitive to BZ modulation. Two amino acids essential for binding and/or transduction of the effect of BZs have been so far identified:  $\gamma_2$ F77 (in  $\gamma_1$ I79) and  $\gamma_2$ M130 (in  $\gamma_1$ L132).

### Aims:

GABA<sub>A</sub> receptors containing  $\gamma_1$  subunits are not modulated by zopiclone, diazepam and clobazam, while a strong modulation of  $\gamma_2$ -containing receptors has been shown. Will the point mutation  $\gamma_1$ I79F and the double mutation  $\gamma_1$ I79FxL132M, respectively, induce sensitivity for modulation of GABA-induced chloride currents ( $I_{GABA}$ ) by zopiclone, diazepam and clobazam?

### Methods:

Recombinant GABA<sub>A</sub> receptor subtypes were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and the modulation of ( $I_{GABA}$ ) was measured using the 2-Microelectrode-Voltage-Clamp-technique.

### Results and discussion:

Introduction of the point mutation  $\gamma_1$ I79F significantly enhanced the modulation of  $I_{GABA}$  by zopiclone comparably to the modulation of  $\gamma_2$ -receptors, while the double mutation did not result in a further potentiation of  $I_{GABA}$ , therefore it can be assumed that the effect of zopiclone depends solely on F77 and F79, respectively.

Although the modulation of  $I_{GABA}$  by diazepam and clobazam through single and double mutated receptors was significantly stronger than on  $\gamma_1$  receptors, the effect observed in  $\gamma_2$  containing receptors was not achieved. Therefore, further amino acids responsible for the effect of diazepam and clobazam on  $\gamma_2$ -receptors must be identified.

## 8. Literaturverzeichnis

Addolorato, G., Leggio, L., Cardone, S., Ferrulli, A. & Gasbarrini, G. Role of the GABA(B) receptor system in alcoholism and stress: focus on clinical studies and treatment perspectives. *Alcohol* **43**, 559-63 (2009).

Akabas, M. H. GABAA receptor structure-function studies: a reexamination in light of new acetylcholine receptor structures. *Int Rev Neurobiol* **62**, 1-43 (2004).

Allen, D., Curran, H. V. & Lader, M. The effects of single doses of CL284,846, lorazepam, and placebo on psychomotor and memory function in normal male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* **45**, 313-20 (1993).

Baburin, I., Khom, S., Timin, E., Hohaus, A., Sieghart W. & Hering, S. Estimating the efficiency of benzodiazepines on GABA(A) receptors comprising gamma1 or gamma2 subunits. *Br J Pharmacol* **155**, 424-33 (2008)

Balic, E., Rudolph, U., Fritschy, J. M., Mohler, H. & Benke, D. The alpha5(H105R) mutation impairs alpha5 selective binding properties by altered positioning of the alpha5 subunit in GABAA receptors containing two distinct types of alpha subunits. *J Neurochem* **110**, 244-54 (2009).

Bateson, A. N. The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential? *Sleep Med* **5 Suppl 1**, S9-15 (2004).

Baumann, S. W., Baur, R. & Sigel, E. Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci* **23**, 11158-66 (2003).

Beer, B. et al. A placebo-controlled evaluation of single, escalating doses of CL 284,846, a non-benzodiazepine hypnotic. *J Clin Pharmacol* **34**, 335-44 (1994).

Belelli, D., Pistis, M., Peters, J. A. & Lambert, J. J. The interaction of general anaesthetics and neurosteroids with GABA(A) and glycine receptors. *Neurochem Int* **34**, 447-52 (1999).

Benke, D., Michel, C. & Mohler, H. GABA(A) receptors containing the alpha4-subunit: prevalence, distribution, pharmacology, and subunit architecture in situ. *J Neurochem* **69**, 806-14 (1997).

Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. & Gassmann, M. Molecular structure and physiological

- functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84**, 835-67 (2004).
- Bettler, B. & Tiao, J. Y. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther* **110**, 533-43 (2006).
- Boileau, A. J., Evers, A. R., Davis, A. F. & Czajkowski, C. Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci* **19**, 4847-54 (1999).
- Boileau, A. J., Newell, J. G. & Czajkowski, C. GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J Biol Chem* **277**, 2931-7 (2002).
- Burgard, E. C., Tietz, E. I., Neelands, T. R. & Macdonald, R. L. Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. *Mol Pharmacol* **50**, 119-27 (1996).
- Calakos, N. & Scheller, R.H. Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol Rev.* **76**, 1-29 (1996).
- Carling, D. AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie* **87**, 87-91 (2005).
- Carlson, B. X., Engblom, A. C., Kristiansen, U., Schousboe, A. & Olsen, R. W. A single glycine residue at the entrance to the first membrane-spanning domain of the gamma-aminobutyric acid type A receptor beta(2) subunit affects allosteric sensitivity to GABA and anesthetics. *Mol Pharmacol* **57**, 474-84 (2000).
- Celie, P. H. et al. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* **41**, 907-14 (2004).
- Cestari, I. N., Min, K. T., Kulli, J. C. & Yang, J. Identification of an amino acid defining the distinct properties of murine beta1 and beta3 subunit-containing GABA(A) receptors. *J Neurochem* **74**, 827-38 (2000).
- Cope, D. W. et al. Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Neuropharmacology* **47**, 17-34 (2004).
- Couve, A., Moss, S. J. & Pangalos, M. N. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling.

*Mol Cell Neurosci* **16**, 296-312 (2000).

Coyne, L., Su, J., Patten, D. & Halliwell, R. F. Characterization of the interaction between fenamates and hippocampal neuron GABA(A) receptors. *Neurochem Int* **51**, 440-6 (2007).

Crawley JN, Gerfen CR, Rogawski MA, Sibley DR, Skolnick P, Wray S Short Protocols in Neuroscience, 1. Auflage (2007); John Wiley&Sons , Inc., New Jersey.

Crestani, F., Martin, J. R., Mohler, H. & Rudolph, U. Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. *Br J Pharmacol* **131**, 1251-4 (2000).

Criswell, H. E. et al. Molecular basis for regionally specific action of ethanol on gamma-aminobutyric acidA receptors: generalization to other ligand-gated ion channels. *J Pharmacol Exp Ther* **267**, 522-37 (1993).

Culmsee, C., Monnig, J., Kemp, B. E. & Mattson, M. P. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci* **17**, 45-58 (2001).

Denker, A. & Rizzoli, S.O. Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci* **2**, 135 (2010).

Draguhn, A., Verdorn, T. A., Ewert, M., Seeburg, P. H. & Sakmann, B. Functional and molecular distinction between recombinant rat GABAA receptor subtypes by Zn<sup>2+</sup>. *Neuron* **5**, 781-8 (1990).

Duncalfe, L. L., Carpenter, M. R., Smillie, L. B., Martin, I. L. & Dunn, S. M. The major site of photoaffinity labeling of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by [3H]flunitrazepam is histidine 102 of the alpha subunit. *J Biol Chem* **271**, 9209-14 (1996).

Ernst, M., Brauchart, D., Boesch, S. & Sieghart, W. Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* **119**, 933-43 (2003).

Ernst, M., Bruckner, S., Boesch, S. & Sieghart, W. Comparative models of GABAA receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. *Mol Pharmacol* **68**, 1291-300 (2005).

Esmaili, A., Lynch, J. W. & Sah, P. GABAA receptors containing gamma1 subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. *J Neurophysiol* **101**, 341-9 (2009).

- Evans, A. K. & Lowry, C. A. Pharmacology of the beta-carboline FG-7,142, a partial inverse agonist at the benzodiazepine allosteric site of the GABA A receptor: neurochemical, neurophysiological, and behavioral effects. *CNS Drug Rev* **13**, 475-501 (2007).
- Filip, M. & Frankowska, M. GABA(B) receptors in drug addiction. *Pharmacol Rep* **60**, 755-70 (2008).
- Fisher, J. L. & Macdonald, R. L. Single channel properties of recombinant GABAA receptors containing gamma 2 or delta subtypes expressed with alpha 1 and beta 3 subtypes in mouse L929 cells. *J Physiol* **505** ( Pt 2), 283-97 (1997).
- Fisher, J. L. & Macdonald, R. L. The role of an alpha subtype M2-M3 His in regulating inhibition of GABAA receptor current by zinc and other divalent cations. *J Neurosci* **18**, 2944-53 (1998).
- Forth, W., Henschler, D. & Rummel, W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage (2005)
- Fon, E. A. & Edwards, R. H. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve* **24**, 581-601 (2001).
- Frankowska, M., Nowak, E. & Filip, M. Effects of GABAB receptor agonists on cocaine hyperlocomotor and sensitizing effects in rats. *Pharmacol Rep* **61**, 1042-9 (2009).
- Gadalla, A. E. et al. AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Neurochem* **88**, 1272-82 (2004).
- Geppert, M. & Südhof, T. C. RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu Rev Neurosci.* 21, 75-95 (1998).
- Goetz, T., Arslan, A., Wisden, W. & Wulff, P. GABA(A) receptors: structure and function in the basal ganglia. *Prog Brain Res* **160**, 21-41 (2007).
- Goldin AL Expression of ion channels by injection of mRNA into *Xenopus* oocytes. *Methods Cell Biol* **36**, 487-509 (1991).

- Gonzalez, L. Jr & Scheller, R. H. Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell*. 96, 755-8 (1999).
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR and Marbaix G Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**, 177-82 (1971).
- Goudet, C. et al. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain Res Rev* **60**, 43-56 (2009).
- Haas, K. F. & Macdonald, R. L. GABAA receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABAA receptor currents in mouse fibroblasts. *J Physiol* **514** ( Pt 1), 27-45 (1999).
- Hadingham, K. L. et al. Cloning of cDNA sequences encoding human alpha 2 and alpha 3 gamma-aminobutyric acidA receptor subunits and characterization of the benzodiazepine pharmacology of recombinant alpha 1-, alpha 2-, alpha 3-, and alpha 5-containing human gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol* **43**, 970-5 (1993).
- Halliwell, R. F. et al. Subunit-selective modulation of GABAA receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid. *Eur J Neurosci* **11**, 2897-905 (1999).
- Hanchar, H. J., Dodson, P. D., Olsen, R. W., Otis, T. S. & Wallner, M. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci* **8**, 339-45 (2005).
- Hanchar, H. J., Wallner, M. & Olsen, R. W. Alcohol effects on gamma-aminobutyric acid type A receptors: are extrasynaptic receptors the answer? *Life Sci* **76**, 1-8 (2004).
- Hanson, S. M., Morlock, E. V., Satyshur, K. A. & Czajkowski, C. Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the gamma-aminobutyric acid type-A (GABAA) receptor are different. *J Med Chem* **51**, 7243-52 (2008).
- Harris, R. A. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol Clin Exp Res* **23**, 1563-70 (1999).
- Harris, R. A. et al. Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased

- behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3658-62 (1995).
- Harris, R. A. et al. Ethanol increases GABAA responses in cells stably transfected with receptor subunits. *Alcohol Clin Exp Res* **19**, 226-32 (1995).
- Harrison, N. L. & Gibbons, S. J. Zn<sup>2+</sup>: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* **33**, 935-52 (1994).
- Henschel, O., Gipson, K. E. & Bordey, A. GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 211-24 (2008).
- Hering, S., Small-volume and rapid extracellular solution exchange around *Xenopus* oocytes during voltage-clamp recordings. *Pflugers Arch* **436**, 303-7 (1998).
- Hevers, W. & Luddens, H. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**, 35-86 (1998).
- Hill-Venning, C., Belelli, D., Peters, J. A. & Lambert, J. J. Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Br J Pharmacol* **120**, 749-56 (1997).
- Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sunderland, Massachusetts:p 33 (1992).
- Homanics, G. E. et al. Normal electrophysiological and behavioral responses to ethanol in mice lacking the long splice variant of the gamma2 subunit of the gamma-aminobutyrate type A receptor. *Neuropharmacology* **38**, 253-65 (1999).
- Horenstein, J. & Akabas, M. H. Location of a high affinity Zn<sup>2+</sup> binding site in the channel of alpha1beta1 gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol* **53**, 870-7 (1998).
- Jackel, C. et al. The main determinant of furosemide inhibition on GABA(A) receptors is located close to the first transmembrane domain. *Eur J Pharmacol* **357**, 251-6 (1998).
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* **1**, 15-25 (2005).
- Kapur, J. & Macdonald, R. L. Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn<sup>2+</sup> sensitivity

- of hippocampal dentate granule cell GABAA receptors. *J Neurosci* **17**, 7532-40 (1997).
- Kash, T. L., Jenkins, A., Kelley, J. C., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* **421**, 272-5 (2003).
- Kash, T. L., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochem Soc Trans* **32**, 540-6 (2004).
- Kaesler, P.S. Pushing synaptic vesicles over the RIM. *Cell Logist.***1**, 106-110 (2011).
- Khom, S. et al. Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits. *Mol Pharmacol* **69**, 640-9 (2006).
- Klinke, R. & Silbernegel, S. Lehrbuch der Physiologie, 3. vollständig überarb. Auflage (2001).
- Kloda, J. H. & Czajkowski, C. Agonist-, antagonist-, and benzodiazepine-induced structural changes in the alpha1 Met113-Leu132 region of the GABAA receptor. *Mol Pharmacol* **71**, 483-93 (2007).
- Knoflach, F. et al. Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors alpha 4 beta 2 gamma 2 and alpha 6 beta 2 gamma 2. *Mol Pharmacol* **50**, 1253-61 (1996).
- Kofuji, P., Wang, J. B., Moss, S. J., Haganir, R. L. & Burt, D. R. Generation of two forms of the gamma-aminobutyric acidA receptor gamma 2-subunit in mice by alternative splicing. *J Neurochem* **56**, 713-5 (1991).
- Kontis, K. J. & Goldin, A. L. Site-directed mutagenesis of the putative pore region of the rat IIA sodium channel. *Mol Pharmacol* **43**, 635-44 (1993).
- Korpi, E. R., Grunder, G. & Luddens, H. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol* **67**, 113-59 (2002).
- Korpi, E. R. et al. Cerebellar granule-cell-specific GABAA receptors attenuate benzodiazepine-induced ataxia: evidence from alpha 6-subunit-deficient mice. *Eur J Neurosci* **11**, 233-40 (1999).
- Korpi, E. R., Kuner, T., Seeburg, P. H. & Luddens, H. Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Mol Pharmacol* **47**, 283-9 (1995).

Korpi, E. R., Makela, R. & Uusi-Oukari, M. Ethanol: Novel Actions on Nerve Cell Physiology Explain Impaired Functions. *News Physiol Sci* **13**, 164-170 (1998).

Krishek, B. J., Moss, S. J. & Smart, T. G. Interaction of H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on recombinant and native rat neuronal GABAA receptors. *J Physiol* **507** ( Pt 3), 639-52 (1998).

Kuramoto, N. et al. Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron* **53**, 233-47 (2007).

Kurata, Y., Marszalec, W., Hamilton, B. J., Carter, D. B. & Narahashi, T. Alcohol modulation of cloned GABAA receptor-channel complex expressed in human kidney cell lines. *Brain Res* **631**, 143-6 (1993).

Lambert, J. J., Belelli, D., Peden, D. R., Vardy, A. W. & Peters, J. A. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol* **71**, 67-80 (2003).

Langtry, H. D. & Benfield, P. Zolpidem. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs* **40**, 291-313 (1990).

Lavoie, A. M., Tingey, J. J., Harrison, N. L., Pritchett, D. B. & Twyman, R. E. Activation and deactivation rates of recombinant GABA(A) receptor channels are dependent on alpha-subunit isoform. *Biophys J* **73**, 2518-26 (1997).

Li, G. D., Chiara, D. C., Cohen, J. B. & Olsen, R. W. Neurosteroids allosterically modulate binding of the anesthetic etomidate to gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* **284**, 11771-5 (2009).

Liu, Y. & Edwards, R.H. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci.* **20**, 125-56 (1997).

Low, K. et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **290**, 131-4 (2000).

López-Muñoz, F., Ucha-Udabe, R. & Alamo, C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat* **1**, 329-43 (2005).

Lüllmann, H., Mohr, K. & Wehling, M. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen

verstehen-Medikamente gezielt einsetzen. 16., vollst. überarb. Aufl. (2006).

Lüddens, H., Seeburg, P.H., Korpi, E.R., Impact of beta and gamma variants on ligand-binding properties of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol* **45**; 810-4 (1994).

Marx, C. E. et al. Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacology* **31**, 1249-63 (2006).

Mercado, J. & Czajkowski, C. Charged residues in the alpha1 and beta2 pre-M1 regions involved in GABAA receptor activation. *J Neurosci* **26**, 2031-40 (2006).

Mercado, J. & Czajkowski, C. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and pentobarbital induce different conformational rearrangements in the GABA A receptor alpha1 and beta2 pre-M1 regions. *J Biol Chem* **283**, 15250-7 (2008).

Mihalek, R. M. et al. Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12905-10 (1999).

Mihic, S. J. & Harris, R. A. GABA and the GABAA receptor. *Alcohol Health Res World* **21**, 127-31 (1997).

Mihic, S. J., Whiting, P. J. & Harris, R. A. Anaesthetic concentrations of alcohols potentiate GABAA receptor-mediated currents: lack of subunit specificity. *Eur J Pharmacol* **268**, 209-14 (1994).

Mihic, S. J., Whiting, P. J., Klein, R. L., Wafford, K. A. & Harris, R. A. A single amino acid of the human gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma 2 subunit determines benzodiazepine efficacy. *J Biol Chem* **269**, 32768-73 (1994).

Mohler, H. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* **326**, 505-16 (2006).

Monti, J. M. & Pandi-Perumal, S. R. Eszopiclone: its use in the treatment of insomnia. *Neuropsychiatr Dis Treat* **3**, 441-53 (2007).

Morimoto, T., Wang, X.H. & Poo, M.M. Overexpression of synaptotagmin modulates short-term synaptic plasticity at developing neuromuscular junctions. *Neuroscience* **82**, 969-78 (1998).

Müller-Esterl, W. Biochemie, 1.Auflage, Elsevier GmbH München, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2004).

Nagaya, N. & Macdonald, R. L. Two gamma2L subunit domains confer low Zn<sup>2+</sup> sensitivity to ternary GABA(A) receptors. *J Physiol* **532**, 17-30 (2001).

Neelands, T. R., Fisher, J. L., Bianchi, M. & Macdonald, R. L. Spontaneous and gamma-aminobutyric acid (GABA)-activated GABA(A) receptor channels formed by epsilon subunit-containing isoforms. *Mol Pharmacol* **55**, 168-78 (1999).

Neelands, T. R. & Macdonald, R. L. Incorporation of the pi subunit into functional gamma-aminobutyric Acid(A) receptors. *Mol Pharmacol* **56**, 598-610 (1999).

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. *J Neurosci* **24**, 11226-35 (2004).

Newell, J. G., Czajkowski, C. The GABAA receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *J Bio Chem* **278**, 13166-72 (2003)

Nutt, D. GABAA receptors: subtypes, regional distribution, and function. *J Clin Sleep Med* **2**, S7-11 (2006).

Ogris, W. et al. Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Biochem Pharmacol* **68**, 1621-9 (2004).

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. *Pharmacol Rev* **60**, 243-60 (2008).

Olsen, R. W. & Sieghart, W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141-8 (2009).

Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**, 715-27 (2002).

- Pang, Z.P. & Südhof, T.C. Cell biology of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 22, 496-505 (2010).
- Paulmichl, M. et al. Cloning and expression of a rat cardiac delayed rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7892-5 (1991).
- Proctor, W. R., Soldo, B. L., Allan, A. M. & Dunwiddie, T. V. Ethanol enhances synaptically evoked GABAA receptor-mediated responses in cerebral cortical neurons in rat brain slices. *Brain Res* **595**, 220-7 (1992).
- Rang, H.P., Dale M.M., Ritter, J.M. & Moore, P.K. Pharmacology, Fifth Edition, Churchill Livingstone (2003).
- Rivera, C. et al. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-5 (1999).
- Rupprecht, R. & Holsboer, F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* **22**, 410-6 (1999).
- Sanna, E. et al. Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABA(A) receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **451**, 103-10 (2002).
- Sanna, E., Garau, F. & Harris, R. A. Novel properties of homomeric beta 1 gamma-aminobutyric acid type A receptors: actions of the anesthetics propofol and pentobarbital. *Mol Pharmacol* **47**, 213-7 (1995).
- Saxena, N. C. & Macdonald, R. L. Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol Pharmacol* **49**, 567-79 (1996).
- Sieghart, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234 (1995).
- Sigel, E. & Buhr, A. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 425-9 (1997).
- Smart, T. G., Moss, S. J., Xie, X. & Huganir, R. L. GABAA receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br J Pharmacol* **103**, 1837-9 (1991).

- Spasic, M. R., Callaerts, P. & Norga, K. K. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons. *Neuroscientist* **15**, 309-16 (2009).
- Spletstoesser, F., Bonnet, U., Wiemann, M., Bingmann, D. & Busselberg, D. Modulation of voltage-gated channel currents by harmaline and harmane. *Br J Pharmacol* **144**, 52-8 (2005).
- Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M. & Mody, I. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14439-44 (2003).
- Sudhof, T.C. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* **27**, 509-47 (2004).
- Sundstrom-Poromaa, I. et al. Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA(A) receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* **5**, 721-2 (2002).
- Tan, K.R., Rudolph, U. & Lüscher, C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci* **34**, 188-97 (2011).
- Terunuma, M., Pangalos, M. N. & Moss, S. J. Functional modulation of GABAB receptors by protein kinases and receptor trafficking. *Adv Pharmacol* **58**, 113-22.
- Thews, G., Mutschler, E. & Vaupel, P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; 5., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1999).
- Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L. A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y. & Zerial, M. Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem.* **268**, 18143-50 (1993).
- Unwin, N., Miyazawa, A., Li, J. & Fujiyoshi, Y. Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. *J Mol Biol* **319**, 1165-76 (2002).
- Wafford, K. A. et al. Ethanol sensitivity of the GABAA receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit. *Neuron* **7**, 27-33 (1991).
- Wafford, K. A. & Whiting, P. J. Ethanol potentiation of GABAA receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the gamma 2 subunit. *FEBS Lett* **313**, 113-7 (1992).

- Wagner, D. A. & Czajkowski, C. Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* **21**, 67-74 (2001).
- Wagner, D. A., Czajkowski, C. & Jones, M. V. An arginine involved in GABA binding and unbinding but not gating of the GABA(A) receptor. *J Neurosci* **24**, 2733-41 (2004).
- Wagner, J. & Wagner, M. L. Non-benzodiazepines for the treatment of insomnia. *Sleep Med Rev* **4**, 551-581 (2000).
- Wallner, M., Hancher, H. J. & Olsen, R. W. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15218-23 (2003).
- Walters, R. J., Hadley, S. H., Morris, K. D. & Amin, J. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci* **3**, 1274-81 (2000).
- Wang, Q., Pless, S. A. & Lynch, J. W. Ligand- and subunit-specific conformational changes in the ligand-binding domain and the TM2-TM3 linker of {alpha}1 {beta}2 {gamma}2 GABAA receptors. *J Biol Chem* **285**, 40373-86.
- Wang, T. L., Hackam, A. S., Guggino, W. B. & Cutting, G. R. A single amino acid in gamma-aminobutyric acid rho 1 receptors affects competitive and noncompetitive components of picrotoxin inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11751-5 (1995).
- Weiner, J. L., Gu, C. & Dunwiddie, T. V. Differential ethanol sensitivity of subpopulations of GABAA synapses onto rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **77**, 1306-12 (1997).
- Whiting, P., McKernan, R. M. & Iversen, L. L. Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma 2 phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9966-70 (1990).
- Whiting, P. J. GABA-A receptors: a viable target for novel anxiolytics? *Curr Opin Pharmacol* **6**, 24-9 (2006).
- Whiting, P. J. et al. Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel GABAA receptor subunit conferring atypical functional properties [corrected; erratum to be published]. *J*

*Neurosci* **17**, 5027-37 (1997).

Whittemore, E. R., Yang, W., Drewe, J. A. & Woodward, R. M. Pharmacology of the human gamma-aminobutyric acidA receptor alpha 4 subunit expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* **50**, 1364-75 (1996).

Wingrove, P. B., Thompson, S. A., Wafford, K. A. & Whiting, P. J. Key amino acids in the gamma subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site. *Mol Pharmacol* **52**, 874-81 (1997).

Wingrove, P. B., Wafford, K. A., Bain, C. & Whiting, P. J. The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the beta 2 and beta 3 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4569-73 (1994).

Wohlfarth, K. M., Bianchi, M. T. & Macdonald, R. L. Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci* **22**, 1541-9 (2002).

Wooltorton, J. R., McDonald, B. J., Moss, S. J. & Smart, T. G. Identification of a Zn<sup>2+</sup> binding site on the murine GABAA receptor complex: dependence on the second transmembrane domain of beta subunits. *J Physiol* **505** ( Pt 3), 633-40 (1997).

Xi, Z. X. et al. GABA transmission in the nucleus accumbens is altered after withdrawal from repeated cocaine. *J Neurosci* **23**, 3498-505 (2003).

Xie, X., Hider, R. C. & Smart, T. G. Modulation of GABA-mediated synaptic transmission by endogenous zinc in the immature rat hippocampus in vitro. *J Physiol* **478** ( Pt 1), 75-86 (1994).

## **9. LEBENS LAUF**

### **PERSÖNLICHE DATEN**

Name: Neda Panić  
Geburtsdatum: 01.11.1986  
Geburtsort: Teslić, Bosnien und Herzegowina  
Staatsangehörigkeit: Bosnien und Herzegowina

### **AUSBILDUNG**

1993-2001 8-jährige Grundschule „Djordje Natošević“, Novi Sad, Serbien  
2001-2005 Realgymnasium „Isidora Sekulić“, Novi Sad, Serbien  
Jun. 2005 Matura mit „ausgezeichnetem Erfolg“ abgelegt  
Okt. 2005-Mär. 2006 Vorstudienlehrgang Deutsch, Universität Wien  
Ab. Okt. 2006 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

# DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Ermöglichung der Durchführung dieser Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie, für das interessante Thema und die fachliche Betreuung.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Sophia Khom für die Betreuung und Unterstützung während der gesamten Diplomarbeit, für die Einschulung an den Geräten und dafür bedanken, dass sie mir bei auftretenden Fragen immer hilfreich zur Seite gestanden ist.

Herzliches Dankeschön an Frau Dr. Annette Hohaus für das Zurverfügungstellen der RNA und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Dr. Igor Baburin für die Hilfe bei technischen Fragen.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Team der Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien für die freundliche Aufnahme, das angenehme Arbeitsklima und die Freude die ich dadurch an der Arbeit hatte.

Frau Mag. Amela Resic danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die Hilfe, die Unterstützung und auch für die Freude, die wir bei der Arbeit hatten.

Ich danke meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums.

Herzliches Dankeschön auch an Divna und Werner für die Aufnahme in Wien, die Geduld, die Unterstützung und besonders dafür, dass sie immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.

Meinen Freunden und Studienkollegen, besonders Steffi, Irena, Sandra und Astrid, danke ich für ihre große Unterstützung, Hilfsbereitschaft und das immer offene Ohr.