



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der Modulation GABA-induzierter Ströme
durch ausgewählte $\beta_{2/3}$ selektive Liganden

Verfasserin

Sibel Kaya

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering

Inhaltsverzeichnis

1	Danksagung.....	1
2	Zusammenfassung	2
3	Abstract.....	3
4	Einleitung	4
4.1	Bedeutung und Entstehung von GABA.....	4
4.2	GABA-aktivierte Rezeptoren.....	5
4.3	GABA _A -Rezeptoren	6
4.3.1	Funktion des GABA _A -Rezeptors.....	6
4.3.2	Struktur des GABA _A -Rezeptors.....	7
4.3.2.1	Verteilung der Untereinheiten im ZNS	9
4.3.3	Die Agonistenbindungsstelle.....	11
4.3.4	Gating	12
4.3.5	Physiologische Rolle der GABA _A -Rezeptoren	14
4.3.6	Bedeutung von GABA _A -Rezeptoren bei neurologischen Erkrankungen	16
4.3.6.1	Epilepsie.....	17
4.3.6.2	Angststörungen und Depression	18
4.3.6.3	Schizophrenie	20
4.3.6.4	Schlafstörungen	21
4.3.6.5	Autismus	22
4.3.7	Modulatoren am GABA _A -Rezeptor und ihre Bindungsstellen.....	22
4.3.7.1	Benzodiazepine.....	23
4.3.7.2	Barbiturate.....	25
4.3.7.3	Anästhetika	27
4.3.7.4	Ethanol.....	30
4.3.7.5	Neurosteroide.....	31
4.3.7.6	β-selektive Modulatoren	33
4.4	GABA _B -Rezeptoren	35
5	Problemstellung und Zielsetzung.....	37
6	Material und Methoden.....	38
6.1	Oozytenpräparation	38

6.2	cRNA – Vorbereitung	40
6.3	cRNA – Injektion	40
6.4	Verwendete Messlösungen	41
6.5	Perfusionssystem	41
6.6	2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik.....	42
7	Ergebnisse	44
7.1	Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch Valerensäure	46
7.2	Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB27.....	47
7.3	Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB33.....	48
7.4	Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB34.....	50
7.5	Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB29.....	51
7.6	Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB30.....	52
7.7	Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB19.....	53
8	Diskussion	55
9	Literaturverzeichnis	58
10	Lebenslauf	67

1 Danksagung

Ich möchte mich bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens sowie die Begutachtung meiner Diplomarbeit bedanken.

Weiters bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Mag. Dr. Sophia Khom für ihre tatkräftige und kompetente Unterstützung beim Schreiben meiner Arbeit.

Dank gebührt auch Frau Mag. Barbara Strommer für die Einführung in das Thema, die Begleitung durch das praktische Arbeiten, sowie die geduldige Beantwortung all meiner Fragen.

Ich bedanke mich bei Frau Mag. Angela Schöffmann für das nette Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen.

Bei Herrn Mag. Dr. Igor Baburin möchte ich mich für die Hilfestellungen bei technischen Problemen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren finanzielle sowie vor allem moralische Unterstützung ich mein Studium nicht hätte beenden können. An dieser Stelle möchte ich meine Eltern besonders erwähnen, da sie die größte Stütze meines Lebens sind und mich in allen Belangen unterstützen. Daher möchte ich diese Arbeit meiner Mutter Fatma und meinem Vater Mustafa widmen.

Zuletzt gilt mein Dank meinem Bruder Sinan, seiner Ehefrau Özden, meiner Nichte Sena und all meinen Verwandten und Freunden, die mich während des Studiums begleitet und unterstützt haben.

2 Zusammenfassung

Hintergrund: γ -aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste, inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn der Säugetiere. Sie reguliert durch Interaktion mit ionotropen GABA Typ A (GABA_A -) Rezeptoren eine Vielzahl physiologischer Vorgänge einschließlich der neuronalen Erregbarkeit. Daher werden GABA_A -Rezeptoren auch von zahlreichen Arzneistoffen wie den Benzodiazepinen, Anästhetika oder Antikonvulsiva moduliert.

Zielsetzung: Die meisten der klinisch verwendeten Arzneistoffe weisen neben den erwünschten Wirkungen auch zahlreiche Nebenwirkungen auf, die zum Teil auf eine zu geringe Selektivität zurückzuführen sein können. So modulieren z.B. die Benzodiazepine den am häufigsten vorkommenden GABA_A -Rezeptor, der aus α -, β - und γ_2 Untereinheiten besteht. Daher versucht man Substanzen zu entwickeln, die noch selektiver mit bestimmten GABA_A -Rezeptor Subtypen interagieren, um somit ggf. das Nebenwirkungsprofil zu reduzieren. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde eine Reihe von Naturstoffderivaten bezüglich ihrer selektiven Interaktion mit GABA_A -Rezeptoren untersucht.

Methode: Dafür wurden rekombinante GABA_A -Rezeptoren ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die konzentrationsabhängige Potenzierung von I_{GABA} durch 6 Naturstoffderivate mittels der 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik und eines schnellen Perfusionssystems untersucht.

Ergebnisse und Interpretation: 2 der untersuchten Naturstoffderivate (SB33 und SB29) führten zu einer stärker ausgeprägten Potenzierung von I_{GABA} im Vergleich zu VA (max. I_{GABA} Potenzierung_{VA} = $567 \pm 170\%$ vs. max. I_{GABA} Potenzierung_{SB33} = $1086 \pm 191\%$ vs. max. I_{GABA} Potenzierung_{SB29} = $670 \pm 23\%$). Die anderen Derivate induzierten entweder vergleichbare oder schwächere I_{GABA} Modulation als VA. Keines der Derivate wies eine signifikant niedrigere EC_{50} als VA auf. Derivat SB34 zeigte keinen Effekt. Diese Daten stellen einen wesentlichen Beitrag zur Erstellung einer Struktur-Wirkungsbeziehung von VA und ihren Derivaten dar.

3 Abstract

Background: γ -aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain. It regulates via interaction with ionotropic GABA type A (GABA_A -) receptor several physiological functions including the neuronal excitability. Thus, GABA_A -receptors represent also the molecular target of multiple clinically relevant drugs including benzodiazepines, anesthetics or anticonvulsants.

Aims: Most of the clinically applied drugs, however, display besides the desired effects also several adverse reactions, partly because of the low selectivity. Thus, for example benzodiazepines modulate the most frequently occurring GABA_A -receptor, which consists of α -, β - and γ -subunits. Therefore, compounds more selectively interacting with specific GABA_A -receptor subtypes are currently under investigation. In this thesis, the selective interaction of derivatives of natural products with GABA_A -receptors was analyzed.

Methods: Therefore, GABA_A receptors composed of $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ subunits were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and the concentration-dependent-modulation of I_{GABA} by these 6 derivatives was analyzed by means of the 2-microelectrode clamp technique and a fast perfusion system.

Results and Discussion: 2 of the analyzed derivatives of natural products (SB33 und SB29) induced a more pronounced potentiation of I_{GABA} compared to VA (max. I_{GABA} potentiation_{VA} = $567 \pm 170\%$ vs. max. I_{GABA} potentiation_{SB33} = $1086 \pm 191\%$ vs. max. I_{GABA} potentiation_{SB29} = $670 \pm 23\%$). The other derivatives displayed either comparable or weaker I_{GABA} modulation than VA. None of the derivatives showed a significantly lower EC_{50} than VA. Derivative SB34 was inactive. These data will contribute to the generation of a structure-activity relationship of VA and its derivatives.

4 Einleitung

4.1 Bedeutung und Entstehung von GABA

GABA (γ -Aminobuttersäure) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) und somit der Gegenspieler von Glutamat, dem wichtigsten Transmitter für exzitatorische Synapsen (Barnard et al, 1998; Hevers & Lüddens, 1998; Klink et al, 2005; Olsen & Sieghart, 2008; Sieghart, 1995; Sieghart, 2006).

Je nach Gehirnregion kann man GABA in 20 bis 50 % der Zentralsynapsen nachweisen (Dawson et al, 2005). Ihre Wirkung erfolgt entweder über ionotrope GABA Typ A (GABA_A)-Rezeptoren, über Öffnung des intrinsischen Cl^- -Kanals, oder metabotrope GABA Typ B (GABA_B)-Rezeptoren, welche über G-Proteine K^+ -Kanäle öffnen und Ca^{2+} -Kanäle schließen (Bettler et al, 2004; Gassmann & Bettler, 2012; Klink et al, 2005; Olsen & Sieghart, 2008).

Entscheidend für die Wirkung eines Transmitters ist, welche Ionenkanäle durch die Rezeptoraktivierung letztlich aktiviert werden. Sind es Kanäle, die selektiv für K^+ oder Cl^- durchlässig sind, so macht der entstehende Ionenstrom das vorhandene Ruhemembranpotential negativer und wirkt damit einer Erregung entgegen. Die damit entstehende Hyperpolarisation hemmt die Zellerregung und kann daher als inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) bezeichnet werden. Es ist so benannt, weil die im Rahmen des IPSP auftretende Hyperpolarisation einer Depolarisation entgegenwirkt, also die Zelle inhibiert wird (Barnard et al, 1998; Klink et al, 2005; Olsen & Sieghart, 2008).

In der frühen Entwicklung des Gehirns kann GABA allerdings auch exzitatorisch wirken, da die meisten Neuronen während dieser Zeit noch eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration aufweisen (Ben-Ari et al, 2007; Cherubini & Ben-Ari, 2011; Tretter & Moss, 2008).

GABAerge Signalwege spielen eine wichtige Rolle in der Gehirnphysiologie. Eine Dysfunktion kann daher verschiedene Erkrankungen wie beispielsweise Epilepsie verursachen, die durch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Erregung und Inhibition entsteht (Ben-Ari et al, 2007; Macdonald & Olsen, 1994; Sieghart et al, 1999).

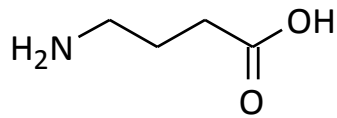


Abbildung 1: Strukturformel der γ -Aminobuttersäure

Die neutrale Aminosäure GABA entsteht durch Decarboxylierung von Glutamat, katalysiert durch die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD). GAD existiert in zwei Isoformen, GAD₆₅ und GAD₆₇, die sich in ihrem Molekulargewicht, ihren katalytischen und kinetischen Eigenschaften und den subzellulären Lokalisationen unterscheiden (Rowley et al, 2012).

Freigesetzte GABA wird durch carriervermittelte Aufnahme inaktiviert, indem sie entweder zurück in GABAerge Axone oder in Gliazellen wieder aufgenommen wird.

Diese GABA kann erneut vesikulär gespeichert werden (Aktories & Forth, 2010; Owens & Kriegstein, 2002). Der Abbau wird katalysiert durch die GABA-Transaminase (GABA-T), wobei durch Transaminierung Succinylsemialdehyd (SSA) entsteht. Letzteres kann entweder zu Succinat oxidiert werden, einem Bestandteil des Citratzyklus oder zu γ -OH-Butylsäure reduziert werden, welche GABA_B-Rezeptoren aktivieren kann (Rowley et al, 2012).

4.2 GABA-aktivierte Rezeptoren

Die Aktivität von GABA wird über mindestens zwei verschiedene Rezeptorklassen vermittelt, den ionotropen GABA_A- und den metabotropen GABA_B-Rezeptoren.

GABA_A-Rezeptoren werden durch GABA, Muscimol und Isoguvacin aktiviert und durch Bicucullin (kompetitiv) und Picrotoxin (nicht kompetitiv) blockiert. GABA_B-Rezeptoren sind über Guanosintriphosphat (GTP) -bindende Proteine indirekt an K⁺- oder Ca²⁺- Kanälen gekoppelt und werden durch GABA und (-)-Baclofen aktiviert und durch Phaclofen inhibiert (Bettler et al, 2004; Hevers & Lüddens, 1998; Sieghart, 1995; Ulrich & Bettler, 2007). In Abhängigkeit der Art des gekoppelten G-Proteins kommt es entweder zur Aktivierung von K⁺- Kanälen oder zur Inhibition von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen. Über G_i-Proteine wird die Adenylylcyclase gehemmt, wodurch es zu einer verminderten Bildung zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) kommt (Olsen & Sieghart, 2008).

Ein dritter Rezeptortyp konnte in den Bipolar- und Horizontalzellen der Retina in Wirbeltieren nachgewiesen werden. Dieser ist nicht sensitiv für Bicucullin und Baclofen, aber sensitiv für das GABA-Analogon CACA (cis-aminocrotonic-acid) und wurde ursprünglich als GABA_C-Rezeptor bezeichnet. GABA_C Rezeptoren induzieren ebenfalls schnelle, inhibitorische Transmission durch das Öffnen von Anionenkanälen. Diese Rezeptoren werden jedoch nicht von typischen Modulatoren der GABA_A-Rezeptoren wie Benzodiazepinen und Barbituraten moduliert (Barnard et al, 1998). GABA_C Rezeptoren werden durch Assemblierung von ρ -Untereinheiten geformt, welche strukturell zu den GABA_A-Rezeptoren gehören. Daher befürwortet das Komitee für Nomenklatur des IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) die Verwendung des Begriffs „GABA_C-Rezeptor“ nicht (Barnard et al, 1998; Olsen & Sieghart, 2008).

4.3 GABA_A-Rezeptoren

4.3.1 Funktion des GABA_A-Rezeptors

GABA_A-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Chloridkanäle, welche sowohl schnelle, inhibitorische, synaptische als auch extra-und perisynaptische Neurotransmission vermitteln (Barnard et al, 1998; Olsen & Sieghart, 2008). Sie werden wie bereits erwähnt von GABA und dem selektiven Agonisten Muscimol (einem Naturstoff aus dem Fliegenpilz) aktiviert und durch Bicucullin und Picrotoxin blockiert (Macdonald & Olsen, 1994; Olsen & Sieghart, 2008; Sieghart, 1995).

Wegen ihrer ubiquitären Verteilung im Nervensystem der Säugetiere spielen GABA_A-Rezeptoren eine Hauptrolle in fast allen physiologischen Gehirnfunktionen. Fehlfunktionen des GABAergen Systems sind mit einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen assoziiert. Daher dienen GABA_A-Rezeptoren als Target für zahlreiche Arzneistoffklassen (Olsen & Sieghart, 2008).

4.3.2 Struktur des GABA_A-Rezeptors

Der GABA_A-Rezeptor wurde erstmals in den 1980er Jahren chromatographisch aus bovinem Gehirn aufgereinigt. In weiterer Folge konnten zahlreiche GABA_A-Rezeptor Subtypen identifiziert werden (Sigel et al, 1982; Tretter & Moss, 2008).

GABA_A-Rezeptoren bestehen aus fünf Proteinuntereinheiten, welche zu verschiedenen Untereinheitsklassen gehören. Insgesamt gibt es 19 Gene, die für GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten codieren. Unterschiedliche Kombination dieser Untereinheiten ermöglicht eine Vielzahl von Rezeptorsubtypen, die sich in ihrer Lokalisation, zellulärer und subzellulärer Verteilung und Pharmakologie unterscheiden. Es gibt 16 Untereinheiten (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ) kombiniert als GABA_A und drei ρ Untereinheiten, welche den ursprünglich als GABA_C-Rezeptor bezeichneten Subtyp bilden (Olsen & Sieghart, 2008; Sieghart et al, 2012).

Mehr als 50% aller GABA_A-Rezeptoren sind aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit zusammengesetzt (Olsen & Sieghart, 2008; Sieghart et al, 2012; Sigel & Steinmann, 2012).

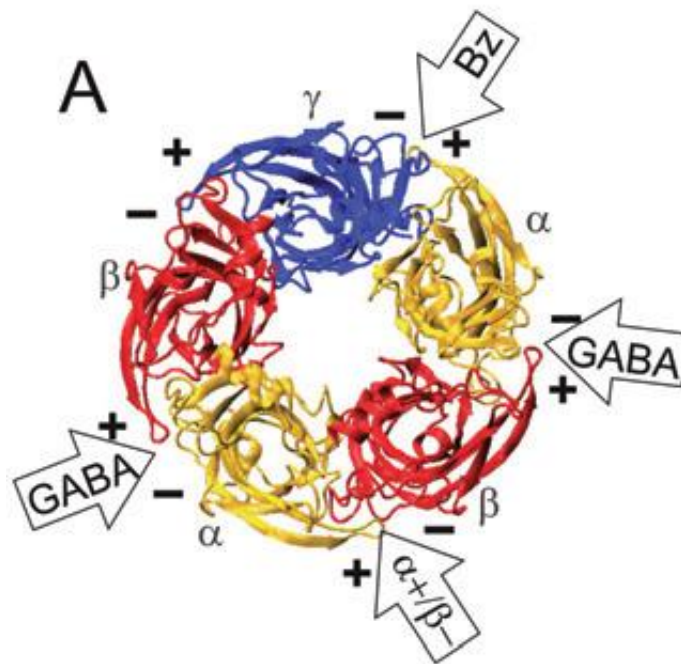


Abbildung 2: Schematische Darstellung der extrazellulären Domäne eines GABA_A-Rezeptors mit zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit (Sieghart et al, 2012)

Durchschnittlich konnte eine Masse von 40-60 kDa für jede Untereinheit und 240-290 kDa für einen pentameren Rezeptor berechnet werden (Hevers & Lüddens, 1998).

Genauso wie die Glycin-, nicotinischen Acetylcholin- (nACh), Serotonin Subtyp 3 (5-HT₃)-Rezeptoren und dem Zn²⁺-aktivierten Ionenkanal gehört auch der GABA_A-Rezeptor zu der Überfamilie der Cys-loop Rezeptoren (Kash et al, 2004; Olsen & Sieghart, 2008). Während nACh-, 5-HT₃- und Zn²⁺-aktivierte Ionenkanäle kationenselektiv sind und somit exzitatorisch wirken, sind Glycin- und GABA_A-Rezeptoren anionenselektiv und daher inhibitorisch (Olsen & Sieghart, 2008).

Alle 44 Mitglieder dieser Familie zeigen 30% Identität in der Primärstruktur und noch mehr Ähnlichkeit in Sekundär- und Tertiärstrukturen (Olsen & Sieghart, 2008).

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind heteropentamere, Membran-durchspannende Proteine, die eine zentrale Pore (Ionenkanal) bilden. Jede Untereinheit besteht aus einer langen, N-terminalen, extrazellulären Domäne, gefolgt von vier transmembranären (M1-M4) α -Helices mit einer großen intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4 (Phosphorylierungsstellen), und endet mit einer relativ kurzen, extrazellulären, C-terminalen Domäne. Der Ionenkanal selbst wird durch die transmembranären Domänen M2 gebildet (Olsen & Sieghart, 2008; Sieghart et al, 1999). Der N-Terminus enthält zusätzlich noch einen Cysteinloop, welcher charakteristisch für die Familie ist (Hevers & Lüddens, 1998). Die loops in der extrazellulären Domäne fungieren als Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten (Olsen & Sieghart, 2008). Die intrazelluläre Domäne interagiert vor allem mit cytoplasmatischen Proteinen und ist somit der Angriffspunkt für posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungsreaktionen (Tretter & Moss, 2008).

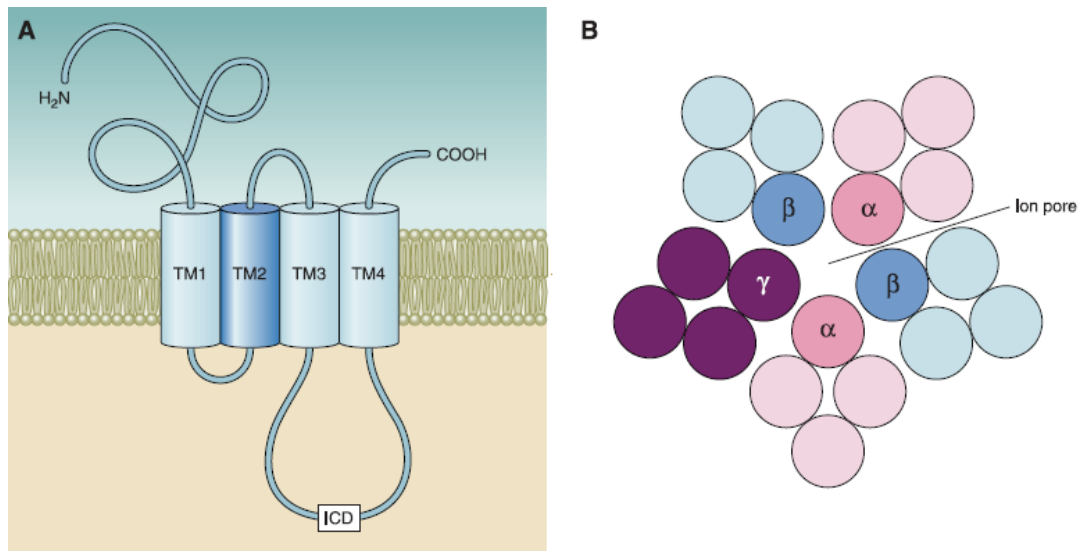


Abbildung 3: (A) Darstellung der charakteristischen Struktur einer GABA_A-Rezeptor-Untereinheit (B) Querschnitt einer Rezeptoruntereinheit, die einen Ionenkanal bildet (Vithlani et al, 2011).

Durch unterschiedliches Exon-Splicing der prä-mRNA steigt die Zahl der möglichen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten noch weiter; einige Untereinheiten, wie γ_2 , kommt in 2 verschiedenen Splice-Varianten, die im Gehirn auch unterschiedlich verteilt sein können, vor: γ_{2S} (short form) und γ_{2L} (long form) (Barnard et al, 1998; Olsen & Sieghart, 2008). Der Unterschied liegt darin, dass γ_{2L} 8 zusätzliche Aminosäuren zwischen M3 und M4 besitzt und infolgedessen weitere Phosphorylierungsstellen hat. Es konnten keine überzeugenden, funktionellen Konsequenzen der Phosphorylierung an dieser Stelle dargelegt werden, aber es wurde lange vermutet, dass die γ_{2L} Untereinheit für die Modulation von GABA_A-Rezeptoren durch Ethanol eine wichtige Rolle spielt (Hevers & Lüddens, 1998; Olsen & Sieghart, 2008).

Die heterologe Expression zeigte, dass durch die Kombination von α - und β -Untereinheiten GABA-Chloridströme durch die Membran induziert, aber erst durch Co-Expression von einer γ -Untereinheit auch Benzodiazepinsensitivität auftritt (Baumann et al, 2001).

4.3.2.1 Verteilung der Untereinheiten im ZNS

GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten sind unterschiedlich und teils überlappend im Gehirn verteilt. Es gibt Zellen, die nur wenige Untereinheiten und andere, die die meisten, wenn

nicht sogar alle Untereinheiten exprimieren (Sieghart et al, 2012). Die Kombination der einzelnen Untereinheiten bestimmt die Pharmakologie des Rezeptors einschließlich Agonistensensitivität, kinetischer Eigenschaften und Sensitivität für Modulatoren (Vithlani et al, 2011).

Die am häufigsten exprimierten Rezeptorsubtypen enthalten α_1 -, α_2 -, α_3 - oder α_5 -Untereinheiten in Kombination mit einer β - und einer γ_2 -Untereinheit. Die so entstehenden Rezeptoren werden von Benzodiazepinen moduliert (Sigel & Buhr, 1997; Sigel & Steinmann, 2012).

Mehr als die Hälfte aller GABA_A-Rezeptoren besteht aus $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Diese Kombination ist im gesamten Gehirn besonders im Hippocampus und in kortikalen Interneuronen zu finden. Es gibt allerdings auch Rezeptoren, die unterschiedliche α -Isoformen inkorporieren wie z.B. $\alpha_1\alpha_3\beta_2\gamma_2$ oder $\alpha_1\alpha_6\beta_2\gamma_2$ Rezeptoren im Kleinhirn (McKernan & Whiting, 1996).

GABA_A-Rezeptoren, welche α_6 -Untereinheiten enthalten, werden ausschließlich von den Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert. Diese Rezeptoren beinhalten dazu entweder eine γ_2 - oder eine δ -Untereinheiten (McKernan & Whiting, 1996; Rudolph et al, 2001).

β_3 -GABA_A-Rezeptoren findet man in hoher Dichte in den meisten Gehirnregionen. Eine Deletion des β_3 -Gens bei Mäusen führte zu einer um 50% verminderten Dichte von GABA_A-Rezeptoren. Die meisten dieser Mäuse sterben bereits in der neonatalen Zeit bzw. zeigen Symptome des Angelmann-Syndroms (DeLorey et al, 1998; Rudolph et al, 2001).

Während γ_2 ubiquitär im ZNS vorkommt, wird die γ_1 -Untereinheit nur in wenigen Regionen des Gehirns exprimiert, und zwar in den zentralen Nuclei der Amygdala, in der Substantia nigra, im Pallidum, Septum und Thalamus (Khom et al, 2006; Korpi et al, 2002; Pirker et al, 2000).

Im Kleinhirn und Hypothalamus befinden sich in geringer Dichte GABA_A-Rezeptoren mit δ -Untereinheiten (Rudolph et al, 2001).

4.3.3 Die Agonistenbindungsstelle

Die Bindungsstelle von Neurotransmittern an Rezeptoren der Cys-loop-Familie befindet sich in der Regel in der extrazellulären Domäne zwischen zwei benachbarten Untereinheiten, die aus mindestens 6 nicht benachbarten Proteinregionen aufgebaut sind. Die Kanalpore hingegen ist vermutlich in einer Tiefe von 50 Å in der transmembranären Domäne lokalisiert (Venkatachalan & Czajkowski, 2012).

Die Sekundärstruktur der extrazellulären Domäne ist aus 10 β -Strängen zusammengesetzt, die zu einem inneren und äußeren Faltblatt angeordnet sind, sodass sie ein β -Sandwich bilden. Drei flexible loops verbinden den inneren mit dem äußeren Teil (Venkatachalan & Czajkowski, 2012).

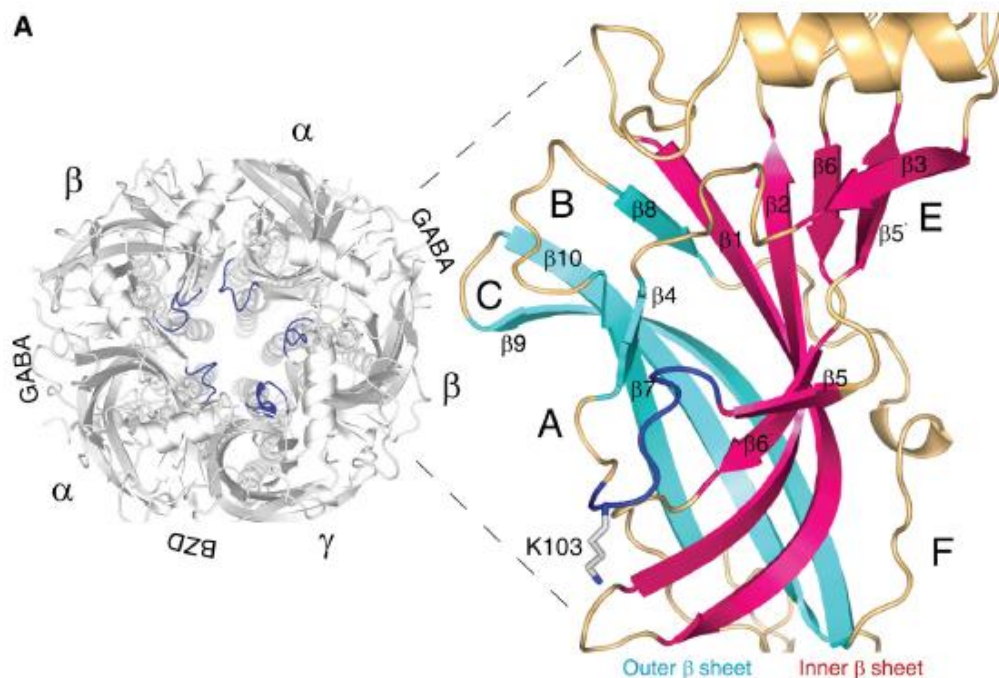


Abbildung 4: Modell eines pentameren GABA_A-Rezeptors (links); Detaillierte Ansicht einer Ligandenbindungsdomäne der β -Untereinheit (rechts) (Venkatachalan & Czajkowski, 2012)

Die GABA-Bindungsstelle befindet sich zwischen der α - und der β -Untereinheit und somit kann man pro Rezeptor jeweils zwei Bindungsstellen für GABA finden (Gielen et al, 2012; Sigel & Buhr, 1997). Die GABA-Bindungsstelle wird von 6 verschiedenen loops A-F gebildet,

wobei loops D, E und F zur α_1 -Untereinheit und loops A, B und C zur β_2 -Untereinheit gehören. Auf diesen loops konnten in den letzten Jahren zahlreiche Aminosäuren identifiziert werden, die direkt oder indirekt zur Bindung von GABA an den Rezeptor beitragen. Dazu gehören im loop A (β_2 Trp₉₂-Asp₁₀₁) die Reste β_2 Leu₉₉ und β_2 Tyr₉₇, im loop B (β_2 Ile₁₅₄-Asp₁₆₃) die Aminosäurereste β_2 Thr₁₆₀ und β_2 Asp₁₆₃, im loop C (β_2 Val₁₉₉-Ser₂₀₉) die Aminosäuren β_2 Ser₂₀₄, β_2 Tyr₂₀₅, β_2 Arg₂₀₇ und β_2 Ser₂₀₉, im Loop D (α_1 Tyr₅₉-Lys₇₀) die für die Agonistenbindung essentiellen Aminosäuren α_1 Phe₆₄, α_1 Arg₆₆ und α_1 Ser₆₈, im Loop E (α_1 Met₁₁₃-Leu₁₃₂) die Aminosäuren α_1 Asn₁₁₅, α_1 Leu₁₁₇, α_1 Thr₁₂₉ und α_1 Arg₁₃₁ und schließlich im loop F (α_1 Pro₁₇₄-Asp₁₉₁) die Reste α_1 Val₁₇₈, α_1 Val₁₈₀ und α_1 Asp₁₈₃ (Boileau et al, 1999; Kash et al, 2004; Kloda & Czajkowski, 2007; Newell & Czajkowski, 2003; Wagner & Czajkowski, 2001).

4.3.4 Gating

Durch das Binden des Agonisten an die Ligandenbindungsstelle in der extrazellulären Domäne wird eine Konformationsänderung ausgelöst, die das Öffnen des Kanals, das sogenannte Gating, bewirkt. Dieser Vorgang findet in der transmembranären Domäne statt, ist rasch, reversibel und erlaubt den Fluss von Chlorid- bzw. Bicarbonationen durch den Kanal. Die Mechanismen des Gatings sind noch nicht vollkommen geklärt (Kash et al, 2003; Kash et al, 2004).

Wesentlich für das Gating sind vermutlich elektrostatische Interaktionen zwischen den negativ geladenen Aminosäuren Asp₅₇ und Asp₁₄₉ in den extrazellulären Loops 2 und 7 und dem positiv geladenen Rest Lys₂₇₉ in der transmembranären 2-3 Linker-Region der α_1 -Untereinheit. Nach Bindung von GABA nähern sich α_1 Asp₁₄₉ und α_1 Lys₂₇₉ einander. Dies wäre ein möglicher Mechanismus für die Kopplung von Ligandenbindung mit der Öffnung des Kanals (Kash et al, 2003).

Der M2-3 Linker, eine kurze, extrazelluläre Schleife, verbindet M2 mit M3 und wurde ebenfalls mit der Rezeptoraktivierung in Verbindung gebracht. Mutation von Aminosäureresten des M2-3 Linkers der α_2 -Untereinheit und der β_2 -Untereinheit verringerte die Empfindlichkeit des Rezeptors für GABA und reduzierte auch die relative Wirksamkeit vom Partialagonisten Piperidin-4-Sulfonsäure (Kash et al, 2004).

Weiters diskutiert wird der sogenannte „Pin-into-socket“-Mechanismus, wo ein einzelner Valin-Rest der extrazellulären Domäne mit der transmembranären Region interagiert und die Rotation von der ECD (extrazelluläre Domäne), welche durch die Agonistenbindung induziert wurde, daraufhin zur M2 weiterleitet. Durch diese Rotation kommt es zur Öffnung der Kanalpore an ihrer engsten Stelle. Da durch diesen Mechanismus ein großer Teil der ECD sich bewegen würde, ist es weiterhin fraglich, ob dieser Prozess energetisch ausführbar ist.

Ebenfalls wurde vorgeschlagen, dass die Konformationsänderung, die durch die Agonisten-Bindung eingeleitet wird, durch mehrere lokale Bewegungen hervorgerufen wird und nicht durch die Rotation der gesamten Untereinheit. Diese Theorie wird als „conformational wave“-Mechanismus bezeichnet (Kash et al, 2004).

Kanalpore und Selektivitätsfilter

Besonders die M2-Segmente der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten, die die Kanalpore bilden, weisen hohe Sequenzidentität auf; gehäuft findet man hydrophile Reste wie Serin oder Threonin. Die OH-Gruppen in den Seitenketten dieser Aminosäuren interagieren vermutlich mit den Wassermolekülen und bilden Hydrathüllen, die die Chloridionen umgeben und diese somit beim Durchtritt durch den Kanal stabilisieren.

Die strukturelle Basis der Ionenselektivität wurde erstmals durch Bormann et al. an GABA_A- und Glycin-Rezeptoren untersucht. Sie verglichen die Permeabilität der Pore mittels einer Reihe von organischen und anorganischen Anionen und schlugen vor, dass die Pore an der engste Stelle 5.6 Å breit ist, und diese Stelle als „Selektivitätsfilter“ fungiert.

Jensen et al zeigten, dass die M1-M2 Schleife der β-Untereinheiten ebenfalls eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Ionenselektivität spielt. Untersuchungen an der M2 der α-Untereinheit ließen darauf schließen, dass auch die Region um einen Valinrest (Val₂₅₇) wichtig ist (Kash et al, 2004).

4.3.5 Physiologische Rolle der GABA_A-Rezeptoren

Der GABAergen inhibitorischen Neurotransmission kommt eine Schlüsselrolle in der zentralen Regulation der meisten somatischen und mentalen Funktionen zu (Möhler, 2006).

<u>Rezeptur-Subtyp</u>	<u>Häufigkeit</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Pharmakologie</u>
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	60%	Großhirnrinde, Hippocampus, Pallidum, Striatum, Thalamus, Bulbus olfactorius, Kleinhirn, Amygdala, basales Vorderhirn, Substantia nigra pars reticulata, Colliculi inferiores im Mittelhirn, Hirnstamm	Hohe Affinität zu klassischen Benzodiazepinen, Zolpidem und zum Antagonisten Flumazenil
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	15-20%	Großhirnrinde, Hippocampus, Körnerzellen des Bulbus olfactorius, Striatum, Olivenkerne, Hypothalamus, Amygdala, Motorneuronen, Colliculi superiores	Hohe Affinität zu Benzodiazepin-Agonisten und Flumazenil. Moderate Affinität zu Zolpidem
$\alpha_3\beta_n\gamma_2$	10-15%	Großhirnrinde, Hippocampus, Bulbus olfactorius, Nuclei reticularis im Thalamus, Kleinhirn, Nuclei olivares, Colliculi superiores, Hirnstamm, Rückenmark, cholinerge Neuronen des Vorderhirns, Raphe und Locus Coeruleus (serotoninerge und catecholaminerger Neuronen)	Hohe Affinität zu klassischen Benzodiazepin-Agonisten und Flumazenil; intermediäre Affinität zu Zolpidem
$\alpha_4\beta_n\delta$	< 5%	Gyrus dentatus im	Unsensitiv für klassischen

		Hippocampus, Thalamus	Benzodiazepinen und Zolpidem
$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	< 5%	Hippocampus, Riechkolben, Großhirnrinde, Colliculi superiores, Amygdala, Hypothalamus, Neuronen des Nucleus olivares, Trigeminalneuronen, Rückenmark	Hohe Affinität zu klassischen Benzodiazepinen und Flumazenil; geringe Affinität für Zolpidem
$\alpha_6\beta_{2,3}\gamma_2$	< 5%	Kleinhirn; dorsale Nuclei cochlearis	Nicht sensitiv für klassische $\alpha_6\beta_{2,3}\delta$ -Benzodiazepin-Agonisten und Zolpidem. Fehlen der Benzodiazepin-Bindungsstelle

Tabelle 1: GABA_A-Rezeptor-Subtypen mit ihren Lokalisationen und Funktionen (adaptiert nach (Möhler, 2006))

Je nachdem, welcher Rezeptorsubtyp aktiviert/moduliert wird, werden unterschiedliche Effekte ausgelöst. α_1 GABA_A-Rezeptoren vermitteln Sedierung, wohingegen über α_2 GABA_A-Rezeptoren ebenso wie über α_3 GABA_A Rezeptoren Anxiolyse vermittelt wird. Darüber hinaus kann das assoziative Raum- und Zeitgedächtnis durch die Modulation der Aktivität von hippocampalen Pyramidalzellen über extrasynaptische α_5 -Rezeptoren reguliert werden. Ferner spielen α_3 GABA_A-Rezeptoren über Regulation des Dopaminhaushaltes eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Schizophrenie (Möhler, 2006).

Synaptische GABA_A-Rezeptoren (α_1 -, α_2 -, α_3 - oder α_5 - mit β_x - und γ_x -Untereinheiten) vermitteln sogenannte phasische Inhibition im ZNS. Darunter versteht man das synchrone Öffnen von ionotropen, postsynaptischen Rezeptoren, die alle Aktivitäten in neuronalen Netzwerken regulieren. Diese Aktivierung resultiert in einer schnellen, Inhibition und ist empfindlich für die Modulation durch Benzodiazepine (Cossette P, 2012).

Demgegenüber vermitteln GABA_A-Rezeptoren in extra- und perisynaptischen Regionen (α_4 - oder α_6 -Untereinheiten mit β_x -, δ -Untereinheiten) tonische Inhibition. Darunter versteht man die Aktivierung von extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren durch geringe GABA-

Konzentrationen. Die tonische Inhibition ist ein Teil der parakrinen Aktivität und spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Regulation der neuronalen Erregbarkeit. Typischerweise inkorporieren diese Rezeptoren δ -Untereinheiten, sind daher nicht sensitiv für Benzodiazepine, aber hochempfindlich für niedrige GABA-Konzentrationen (Cossette P, 2012; Walker MC, 2012).

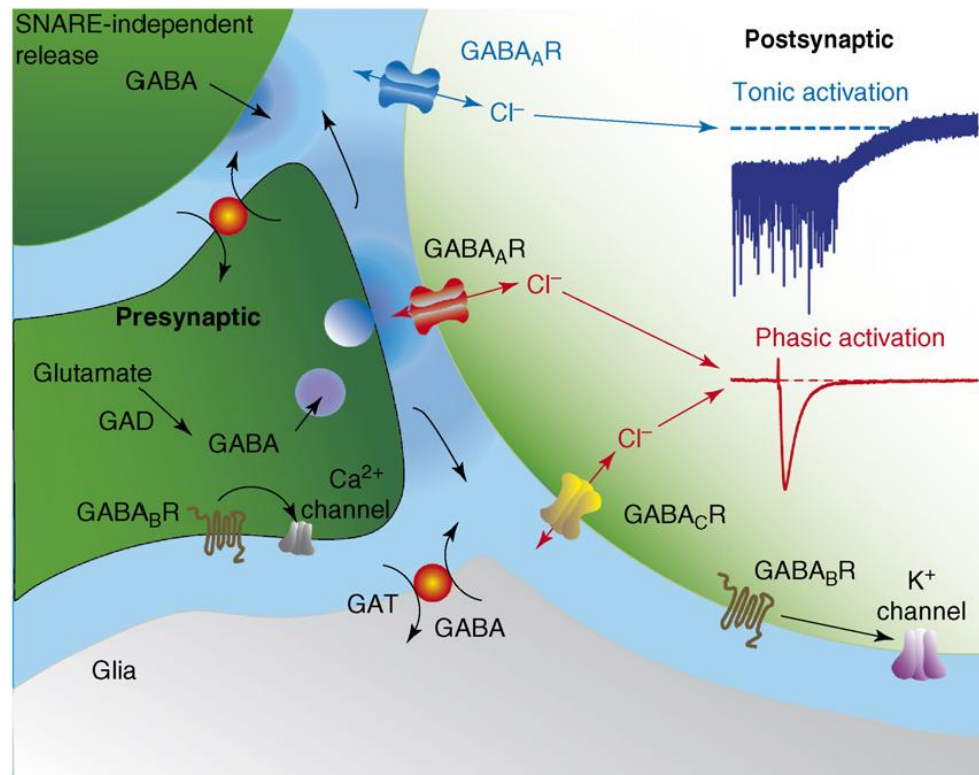


Abbildung 5: Synthese und synaptische Freisetzung von GABA mit phasischer oder tonischer Inhibition als Folge (Ge et al, 2007)

4.3.6 Bedeutung von GABA_A-Rezeptoren bei neurologischen Erkrankungen

Die Verstärkung inhibitorischer Neurotransmission durch GABA ist eine der effektivsten, therapeutischen Strategien zur Behandlung von Erkrankungen des ZNS wie Angst- und Schlafstörungen, Muskelspasmen oder Epilepsie.

GABA_A-Rezeptoren sind daher Targets für viele Arzneimittel in klinischem Gebrauch; dies sind u.a. die strukturell unterschiedlichen Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle, Barbiturate, Anästhetika oder Neurosteroiden (Rudolph et al, 2001).

4.3.6.1 Epilepsie

Epilepsie ist mit einer Prävalenz von 0.5-1% eine der häufigsten, neurologischen Erkrankungen (Hauser, 1994). Vielen Fällen liegt vermutlich eine genetische Komponente zu Grunde.

Es wurden bereits mehr als 20 Gene identifiziert, die bei der Entstehung vererbter Formen der Epilepsie eine Rolle spielen. Die molekularen Mechanismen, die diesen Epilepsien zugrunde liegen, werden in vier Kategorien unterteilt:

1. Primäre Defekte der Erregbarkeit von Membranen, die durch Mutationen der für spannungsabhängige Kanäle kodierenden Gene entstehen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^- Kanäle)
2. Defekte der synaptischen Signalübertragung, verursacht durch Mutationen der Liganden-gesteuerten Cl^- und Na^+ -Rezeptoren
3. Verminderte synaptische Signalübertragung, die durch Defekte von verschiedenen Proteinen entsteht, welche in Zusammenhang mit der Neurotransmitterfreisetzung stehen.
4. Anormale Entwicklung und Struktur des Gehirns, auch kortikale Dysplasien genannt, welche durch Signaldefekte bei der Proliferation, Differenzierung und Zellteilung entstehen (Macdonald, 2001; Macdonald et al, 2004; Macdonald & Kang, 2009; Macdonald & Kang, 2012; Macdonald et al, 2010).

GABAerge Neurotransmission und Epilepsie

Abnorme bzw. reduzierte GABAerge Neurotransmission führt zu verminderter Inhibition im ZNS. Das dadurch gestörte Gleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission trägt wesentlich zum Auftreten von Krampfanfällen bei.

So konnte beispielsweise eine Reduktion der Dichte synaptischer GABA_A -Rezeptoren durch Endocytose nach einem Status epilepticus (SE) beobachtet werden. Eine weitere Studie hat gezeigt, dass es während SE zu einer verminderten Phosphorylierung der β_3 -Untereinheit

kommt, was zu einer gesteigerten Assoziation des Rezeptors mit dem Clathrin Adaptor AP2 führt (Jacob et al, 2008).

Epilepsie-verursachende Mutationen wurden unter anderem in den Genen GABRG2, GABRA1, GABRD und GABRB3 (codieren jeweils für γ_2 -, α_1 -, δ - und β_3 -Untereinheiten) identifiziert. Die Mehrzahl dieser Mutationen ist mit Epilepsieformen mit generalisierten und febrilen Krämpfen assoziiert. Die Vererbung erfolgt hauptsächlich autosomal dominant.

Eine Punktmutation in der γ_2 -Untereinheit (Austausch von Arginin gegen Glutamin an Position 43) führt zu einer Verlangsamung der Deaktivierung von GABA_A-Rezeptoren und verstärkter Desensibilisierung. Dies führte rasch zu einer Ansammlung von desensibilisierten Rezeptoren. γ_2 R43Q wird vor allem mit Absence-Epilepsie im Kindesalter assoziiert (Bowser et al, 2002).

Eine weitere Mutation wurde durch Baulac und seinen Kollegen in einer Familie mit generalisierter Epilepsie gefunden. Sie identifizierten eine K289M-Mutation in der extrazellulären Schleife zwischen M2 und M3. Diese Mutation führte zu einer Reduktion der Stromamplituden (Macdonald, 2001).

4.3.6.2 Angststörungen und Depression

Angsterkrankungen und Depressionen besitzen neben einer genetischen Komponente häufig Stress als gemeinsame Ursache. Depressionen stellen eine komplexe heterogene Funktionsstörung mit einem weiten Spektrum von psychischen Anomalien wie z.B. Anhedonie, Schlafstörungen, Müdigkeit, Verlust des Selbstwertgefühls, negatives Denken und Suizidalität. Angst und Depression treten häufig überlappend auf (Möhler, 2012).

Angststörungen werden in 5 große Untergruppen eingeteilt:

- Generalisierte Angststörung
- Panikstörung
- Obsessive, kompulsive Störung
- Soziale Phobie

- Posttraumatische Belastungsstörung (Möhler, 2012).

Fehlfunktionen der GABAergen Inhibition scheinen in der Pathogenese beider Erkrankungen eine wesentliche Rolle zu spielen (Möhler, 2012). So werden beispielsweise in den Nuclei der Amygdala (Mandelkern) Signale vom Cortex und dem Hypothalamus verarbeitet und typische Angst-assoziierte Reaktionen ausgelöst (Möhler, 2012). Eine essentielle Komponente dieses Netzwerks ist die bereits erwähnte phasische Inhibition, die durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird (Marowsky et al, 2012).

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung von GABA_A Rezeptoren in Angsterkrankungen und deren Therapie kann von der anxiolytischen Wirkung typischer GABA_A Rezeptor Modulatoren wie den Benzodiazepinen abgeleitet werden (siehe auch Kapitel 4.3.7.1).

Darüber hinaus konnte 1999 erstmals von Rudolph et al. gezeigt werden, dass die Anxiolyse von Diazepam über GABA_A Rezeptoren, welche α_2 - und in geringerem Ausmaß auch α_3 - Untereinheiten inkorporieren, vermittelt wird (Löw et al, 2000; Möhler, 2011; Möhler, 2012; Möhler et al, 2001; Rudolph et al, 1999; Rudolph et al, 2001).

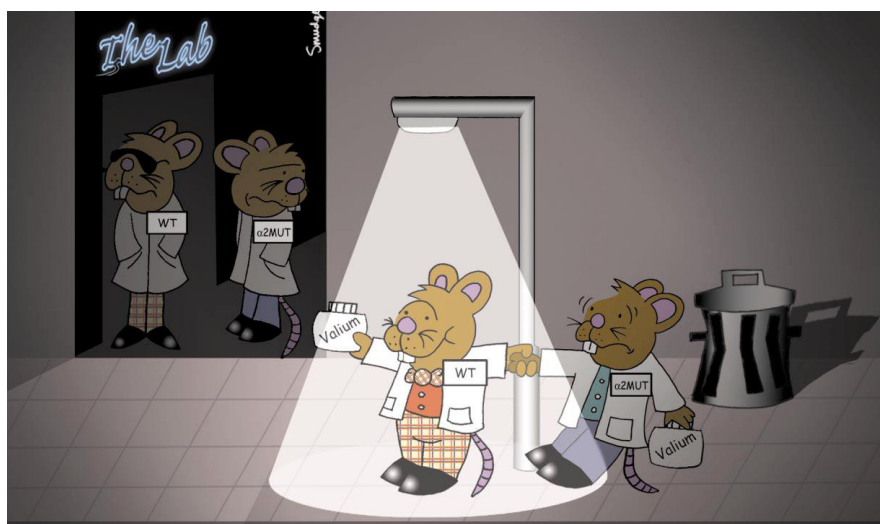


Abbildung 6: Cartoon des „Light-Dark choice-Test“; der anxiolytische Effekt von Diazepam liegt bei Wild-Typ Mäusen vor, merkbar daran, dass sie sich im hellen Licht aufhalten. Im Gegensatz dazu sind die α_2 -mutierten Mäuse insensitive gegenüber Diazepam und meiden daher das Licht (Rudolph et al, 2001)

4.3.6.3 Schizophrenie

Schizophrenie ist eine schwerwiegende, neurologische Erkrankung, von der etwa 0.5-1 % der Weltbevölkerung betroffen sind. Schizophrenie wird für gewöhnlich erst im frühen Erwachsenenalter diagnostiziert. Die Krankheit äußert sich in 3 Klassen von Symptomen:

- Positivsymptomatik: positive oder psychotische Symptome (z.B. Wahnvorstellungen, Halluzinationen)
- Negativsymptomatik: Antriebslosigkeit oder Alogie
- kognitive Beeinträchtigungen: Anomalitäten im schlussfolgernden Denken oder in der selektiven Aufmerksamkeit (Chattopadhyaya & Cristo, 2012).

In den letzten Jahren konnten wesentliche neue Erkenntnisse zur Pathogenese bzw. Pathophysiologie der Schizophrenie erzielt werden (Möhler, 2011). So konnte gezeigt werden, dass sogenannte Diskonnektivität einzelner Gehirnprozesse eine wichtige Rolle spielt. Darunter versteht man, dass eine beeinträchtigte neuronale Kommunikation zwischen verschiedenen Hirnregionen vorherrscht. Diese Funktionsstörung könnte durch eine abweichende Verschaltung von synaptischen Verbindungen während der Entwicklung des Gehirns oder aber auch später durch anormale synaptische Plastizität entstehen (Möhler, 2009).

Ein Defizit der GABAergen, inhibitorischen Neurotransmission trägt neuesten Erkenntnissen nach zufolge wesentlich zur Pathogenese, aber auch zur typischen Symptomatik der Schizophrenie bei (Möhler, 2006). Dieses Defizit basiert u.a. auf einer Abnahme des GABA-synthetisierenden Enzyms GAD und einer Degeneration der Axonenden der Chandelier-Neuronen (kleine hippocampale Interneurone). Im Frontallappen der Großhirnrinde von verstorbenen Patienten wurde darüber hinaus auch ein Defizit an Reelin-mRNA entdeckt, sowie eine Reduktion der Expression von GAD 67. Das Glykoprotein Reelin ist essentiell für die Differenzierung und Migration von Neuronen (Möhler, 2011).

Die Hauptrolle in der Pathogenese von Schizophrenie spielt jedoch die Überaktivität des dopaminergen Systems, welche auf fehlende inhibitorische Neurotransmission über α_3 -GABA_A-Rezeptoren zurückzuführen ist. Dies konnte mithilfe von α_3 -Knockout-Mäusen gezeigt werden, deren sogenannte Präpulsinhibition (physiologisches Phänomen bei

Schreckreaktionen) massiv beeinträchtigt war, was generell auf ein Defizit in sensomotorischen Prozessen deutet. Dieser Mangel kann durch den antipsychotisch wirkenden Dopamin-D2-Rezeptorantagonisten Haloperidol jedoch wieder ausgeglichen werden (Möhler, 2006).

4.3.6.4 Schlafstörungen

Etwa 15% der Bevölkerung in Industrieländern leiden unter chronischen Schlafstörungen und weitere 20% haben Probleme beim Ein- und Durchschlafen (Klinke et al, 2005).

Der suprachiasmatische Nucleus des Hypothalamus vermittelt ausgehend vom täglichen Hell-Dunkel-Zyklus den 24-Stunden-Rhythmus des Organismus mit Wach- und Schlafphasen. Diese Phasen äußern sich in unterschiedlich synchronen Aktivitätszuständen, welche mithilfe von EEG-Ableitungen (Elektroenzephalografie) eingeteilt werden können (Aktories & Forth, 2010).

GABA spielt eine wichtige Rolle bei der physiologischen Schlafregulation. Die Wirkung von GABA kann beim Übergang vom Wach- zum Schlafzustand beobachtet werden. GABAerge Neuronen im Thalamus hemmen die Weiterleitung von Signalen, die im Wachzustand normalerweise den cerebralen Kortex erreichen. Bei zunehmender Müdigkeit werden thalamische GABA-Neurone aktiviert und können im EEG zu Beginn der Schlafphase beobachtet werden (Aktories & Forth, 2010; Möhler, 2006; Möhler, 2009; Rudolph et al, 2001).

Die Wirkung einzelner Arzneistoffe, die an GABA_A Rezeptoren angreifen, kann ebenfalls im EEG beobachtet werden. So unterdrücken Benzodiazepine während der REM-Phase (rapid eye movement) des Schlafs den Anstieg der β -Wellen bzw. während der Non-REM-Phase dazu auch die δ -Wellen und ebenfalls den Anstieg von schnellen β -Wellen. Dieser Effekt wird vorwiegend über α_2 -GABA_A-Rezeptoren vermittelt. Weiters wurde bei einem Patienten, der an chronischer Insomnie litt, eine Missense-Mutation (β_3 R192H) im Gen, welches für die β_3 -Untereinheit kodiert, gefunden. Diese Mutation führt zu einer verlangsamten Desensibilisierung und einer schnelleren Deaktivierung des Kanals (Buhr et al, 2002).

4.3.6.5 Autismus

Autismus ist eine komplexe, neuronale Funktionsstörung, die mit Defiziten in verbaler und non-verbaler Kommunikation, anormaler Sozialisierung und einem begrenzten Interesse an der Umgebung (mit Stereotypen und sich wiederholendem Verhalten) einhergeht. Die Inzidenz der Krankheit, welche zwischen 10 und 20 pro 10 000 Kinder variiert, ist in den letzten Jahrzehnten dramatisch angestiegen.

Studien bei autistischen Patienten deuten stark auf eine Korrelation mit einer Dysfunktion im GABAergen System hin. So konnte eine signifikante Reduktion (ca. 50%) der GABA-synthetisierenden Enzyme GAD 65 und GAD 67 im Kleinhirn und parietalen Cortex nachgewiesen werden. Weiters konnte reduzierte Affinität der Benzodiazepine zu GABA_A-Rezeptoren beobachtet werden, was in weiterer Folge in reduzierter Modulierbarkeit zur Folge hat. Interessanterweise kann man eine hohe Komorbidität von Autismus mit Epilepsie feststellen - etwa 30 % der Autismus-Patienten leiden an Epilepsie bzw. interiktale epileptische Aktivitäten treten bei 85% der autistischen Kinder auf. Dies weist stark auf eine gemeinsame GABAerge Komponente beider Erkrankungen hin (Chattopadhyaya & Cristo, 2012).

4.3.7 Modulatoren am GABA_A-Rezeptor und ihre Bindungsstellen

GABA_A-Rezeptoren werden wie viele andere Membranproteine durch posttranslationelle Modifikation moduliert. So kommt es durch Phosphorylierung einzelner Aminosäurereste durch verschiedene Proteinkinasen zu einer Modulation der Kanalaktivität. Diese Vorgänge scheinen auch die Stabilität der Oberflächenexpression bzw. das Trafficking zu beeinflussen. Daneben greifen an GABA_A-Rezeptoren noch endogene und zahlreiche exogene Moleküle an, wie z.B. Benzodiazepine, Barbiturate, Etomidat, Propofol, der kompetitive Antagonist Bicucullin oder der Kanalblocker Picrotoxin (Sigel & Steinmann, 2012).

4.3.7.1 Benzodiazepine

Der Begriff Benzodiazepin (BDZ) bezieht sich auf die chemische Struktur des heterozyklischen Ringsystems, welches dieser Arzneistoffklasse ihren Namen gegeben hat, wobei die beiden Stickstoffatome in Position 1 und 4 (1,4-Benzodiazepin) lokalisiert sind (Aktories & Forth, 2010).

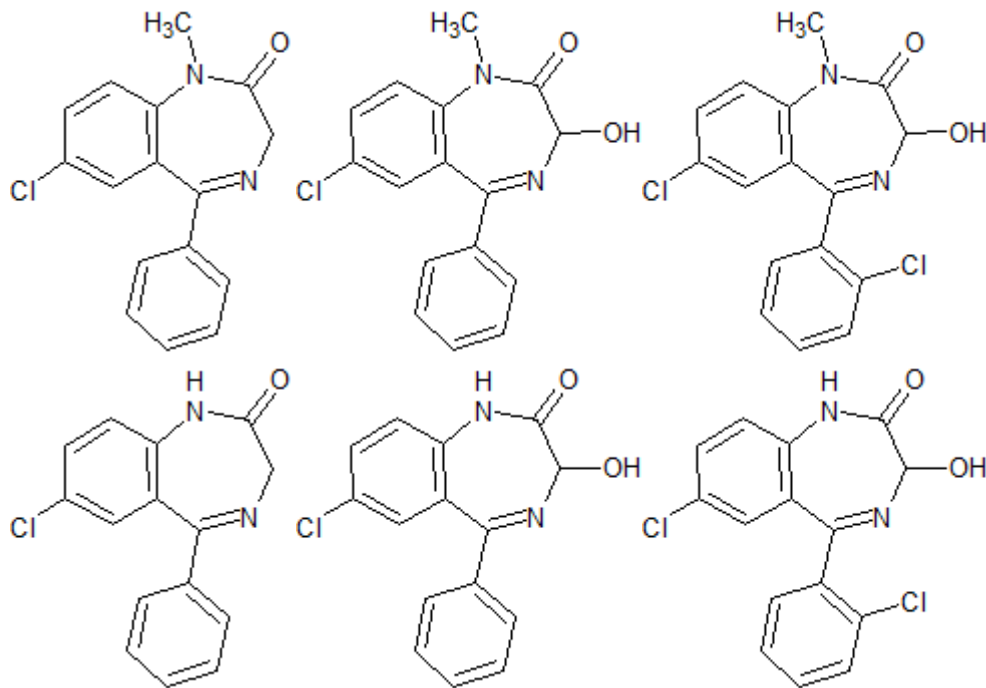


Abbildung 7: Chemische Strukturen von ausgewählten Benzodiazepinen (oben von links nach rechts: Diazepam, Temazepam, Lormetazepam; unten von links nach rechts: Nordazepam, Oxazepam, Lorazepam)

Das älteste Benzodiazepin ist Chlordiazepoxid, welches erstmals 1960 in den USA als Anxiolytikum auf den Markt eingeführt wurde. Im Jahre 1962 wurde Diazepam auf den Markt gebracht (Aktories & Forth, 2010).

Benzodiazepine werden als Sedativa, Hypnotika, Anxiolytika, Muskelrelaxantien und Antikonvulsiva verwendet (Gielen et al, 2012). Sie gehören beispielsweise in den Vereinigten Staaten zu den am meisten verschriebenen Medikamenten, mit etwa 80 Millionen Verschreibungen pro Jahr (Hanson & Czajkowski, 2008).

Die im Gehirn vorwiegend exprimierten GABA_A-Rezeptoren, bestehend aus $\alpha\beta\gamma$ -Untereinheiten, werden durch Benzodiazepine moduliert. Die Bindungsstelle der BDZ

befindet sich dabei zwischen der α - und γ -Untereinheit auf der extrazellulären Seite und besteht aus Aminosäureresten, die auf mindestens 6 nicht direkt benachbarten Domänen lokalisiert sind (Gielen et al, 2012; Hanson et al, 2008).

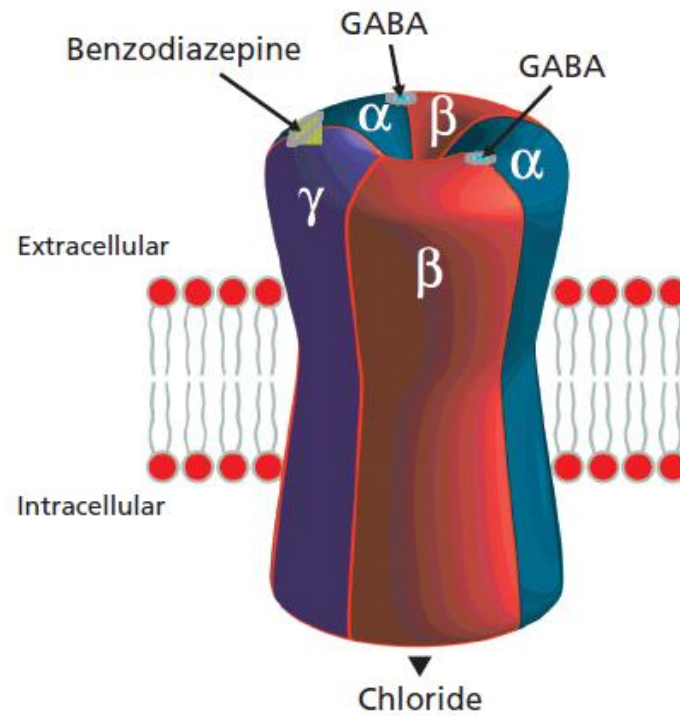


Abbildung 8: Schematische Darstellung des heteropentameren GABA_A-Rezeptors. Die Bindungsstelle der BDZ befindet sich zwischen der α - und γ -Untereinheit (Dawson et al, 2005).

Substanzen, die an die BDZ-Stelle binden, können als negative Modulatoren, welche den GABA-induzierten Strom reduzieren (BDZ-inverse Agonisten), als positive Modulatoren, die I_{GABA} potenzieren (BDZ-Agonisten), oder als Nullmodulatoren fungieren, welche nach Bindung keinen direkten Effekt auf die Stromamplitude haben (BDZ-Antagonisten).

Hochaffine Liganden wie das β -Carbolin Methyl-6,7-Dimethoxy-4-ethyl- β -carbolin-3-carboxylat (DMCM) agieren als negative allosterische Modulatoren. Flumazenil fungiert als Antagonist, indem es die Bindungsstelle besetzt, ohne I_{GABA} zu beeinflussen (Sigel & Buhr, 1997).

Weiters interagieren nicht nur Substanzen mit einer Benzodiazepin-Struktur mit der BZD-Bindungs tasche, sondern auch welche mit β -Carbolin-, Imidazopyridin-, Triazolopyridazin- oder Cyclopyrrolon-Struktur (Sigel & Buhr, 1997).

Das klassische BDZ Diazepam bindet mit hoher Affinität an rekombinante $\alpha_1\beta_x\gamma_2^-$ ($x = 1, 2, 3$), $\alpha_2\beta_x\gamma_2^-$, $\alpha_3\beta_x\gamma_2^-$ und $\alpha_5\beta_x\gamma_2^-$ GABA_A-Rezeptoren und moduliert diese. Der Rest His₁₀₁ in der α_1 -Untereinheit bzw. die homologen Reste α_2 His₁₀₁, α_2 His₁₂₆ und α_5 His₁₀₅ sind essentiell für die Bindung der BDZ. In α_4 – und α_6 -enthaltenen Rezeptoren befindet sich in homologer Position ein Argininrest, welcher den Rezeptor insensitive für die klassischen Benzodiazepine macht (Lüscher et al, 2012).

Durch Bindungsstudien wurden mehrere Aminosäurereste in der α -Untereinheit identifiziert, die die Bindungsaffinität von BDZ-Liganden beeinflussen. Bei einer Mutation von Glu₂₂₅ in der α_3 -Untereinheit zu einem Glycin stieg die Affinität von Zolpidem um das 10-fache. Ein zusätzlicher Aminosäurerest, Ile₂₁₀, wurde in der mutierten α_6 -Untereinheit identifiziert, welcher die Affinitäten von BDZ-Liganden verändert. Ein Austausch des Tyrosinrestes in Position 159 der α_1 -Untereinheit durch Serin resultiert in einem Verlust der Flumazenil-Bindung. Zwei Reste in der γ_2 -Untereinheit (77 und 130) zeigen ausgeprägte Veränderungen in der Rezeptorbindungsspezifität, abhängig von den Seitenketten dieser Aminosäuren (Sigel & Buhr, 1997).

Weitere Aminosäuren, die an der Bildung der Bindungsstelle beteiligt sind und die Bindungsaffinität stark beeinflussen, sind α_1 His₁₀₁, α_1 Tyr₁₅₉, α_1 Thr₂₀₆, α_1 Tyr₂₀₉, γ_2 Phe₇₇ und γ_2 Met₁₃₀. Diese sechs Reste sind in fünf verschiedenen Bereichen des Proteinkomplexes lokalisiert und sind homolog zu den Aminosäuren, die die Bindungstasche für GABA bilden (Sigel & Buhr, 1997; Sigel et al, 1998). Beispielsweise sind α_1 Thr₂₀₆ und α_1 Tyr₂₀₉ direkt homolog zu β Tyr₂₀₅ und β Thr₂₀₂, die eine wichtige Rolle für die GABA-Bindung spielen (Schaerer et al, 1998). Somit scheinen Agonisten und Modulatoren an pseudosymmetrischen Strukturen zu binden (Sigel et al, 1998). Andere Aminosäuren wie Gly₂₀₀, Tyr₂₀₉ in der α_1 -Untereinheit und Ala₇₉ und Thr₈₁ in der γ_2 -Untereinheit sind ebenfalls Teil der Bindungstasche für Liganden der BDZ (Berezhnoy et al, 2004).

4.3.7.2 Barbiturate

Barbiturate wurden in den ersten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts entdeckt und entwickelten sich rasch zu den am weitesten verbreiteten Sedativa und Anästhetika. In den

1930er und 1940er Jahren erreichte ihre Einnahme einen Höhepunkt und wurde anschließend langsam, aber stetig durch Propofol und anderen Sedativa wie den BDZ ersetzt, deren Einnahme weniger problematisch hinsichtlich Missbrauch- und Abhängigkeitspotential scheinen bzw. über größere therapeutische Breite verfügen. Heutzutage wird nur Phenobarbital als Narkotikum bzw. Antiepileptikum verwendet, ist aber weit verbreitet in der Veterinärmedizin (Oakley et al, 2012).

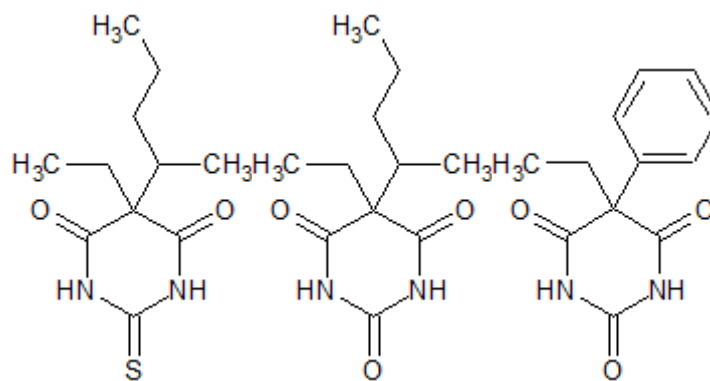


Abbildung 9: Chemische Strukturen von ausgewählten Barbituraten (von links nach rechts: Thiopental, Pentobarbital, Phenobarbital)

Barbiturate verstärken die GABAerge inhibitorische Neurotransmission durch Erhöhung der durchschnittlichen Öffnungsdauer des Kanals (Drafts & Fisher, 2006; Feng et al, 2004).

Barbiturate zeigen in Abhängigkeit der applizierten Konzentration – ähnlich wie andere intravenös applizierte Anästhetika - drei unterschiedliche Effekte: In niedrigen Konzentrationen (10µM) fungieren sie als positive, allosterische Modulatoren, indem sie GABA-induzierte Ströme potenzieren, wohingegen sie in höheren Konzentrationen (300µM) als Agonisten wirken, die den Rezeptor direkt aktivieren. In millimolaren Konzentrationen vermindern sie massiv die inhibitorische Neurotransmission, ein Effekt, welcher wahrscheinlich auf einen sogenannten „low-affinity open channel block“ Mechanismus zurückzuführen ist (Drafts & Fisher, 2006; Feng et al, 2004). Diese drei Effekte werden unterschiedlich durch die Untereinheitenkombination beeinflusst und mehrere Studien haben gezeigt, dass Modulation und direkte Aktivierung strukturell voneinander getrennt werden können. Dies deutet darauf hin, dass die Strukturelemente zur Regulation der

Signaltransduktion bzw. Bindungsstelle unterschiedlich am Rezeptor lokalisiert sind (Drafts & Fisher, 2006).

Die Modulation von I_{GABA} durch Barbiturate ist abhängig von der Isoform der exprimierten α - bzw. β -Untereinheiten (Drafts & Fisher, 2006). Ihre Bindungsstelle ist wahrscheinlich in der transmembranären Domäne lokalisiert (Akk & Steinbach, 2011). Im Allgemeinen weisen Rezeptoren mit β_2 - und β_3 -Untereinheiten eine höhere Sensitivität für Pentobarbital auf als solche, die β_1 -Untereinheiten inkorporieren. Zahlreiche Aminosäurereste in M1 und M2 der β -Untereinheit beeinflussen die positive Modulation von I_{GABA} durch Barbiturate und ebenfalls die direkte Aktivierung. Die Strukturelemente in der α -Untereinheit, die für die Aktivität der Barbiturate von Bedeutung sind, sind bislang wenig bekannt. Pentobarbital besitzt jedoch die größte Wirksamkeit als direkter Agonist an Rezeptoren mit α_6 -Untereinheiten und ist dort sogar effektiver als GABA selbst. Die α -Untereinheiten haben allerdings wenig Auswirkung auf die positive allosterische Modulation von Pentobarbital in geringeren Konzentrationen (Drafts & Fisher, 2006).

4.3.7.3 Anästhetika

Anästhetika führen zu einer reversiblen Verminderung bzw. Ausschaltung der Schmerzempfindung. Durch die Reduktion der synaptischen Transmission im ZNS bewahrt sie Patienten vor schmerzhaften bzw. unangenehmen, medizinischen Eingriffen (Oakley et al, 2012). Dabei ist von Bedeutung, dass die Wirkung der Allgemeinanästhetika schnell anflutet und ihre Wirkung aber auch rasch wieder nachlässt (Hall et al, 2011). Überdosierung von Anästhetika sind aufgrund von kardiovaskulärer und respiratorischer Depression häufig letal (Oakley et al, 2012).

Es werden verschiedene Narkosestadien nach Guedel (1937) unterschieden (I = Analgesie-, II = Exzitations-, III = Toleranz-, IV = Asphyxie) (Aktories et al, 2010).

Die ersten Anästhetika wurden zufällig entdeckt. Ihre chemische Struktur diente jahrzehntelang als Leitstruktur für die Entwicklung effektiverer und sichererer Arzneistoffe mit anästhetischer Wirkung (Oakley et al, 2012). Je nach Applikationsart unterscheidet man zwischen Inhalations- (Zufuhr und Ausscheidung über die Lunge) und Injektionsnarkotika

(intravenös) (Aktories et al, 2010). Halothan, Isofluran, Enfluran und Sevofluran sind typische Vertreter der Inhalationsnarkotika, wohingegen Barbiturate, Propofol, Ketamin und Etomidat zu den Injektionsanästhetika gehören (Aktories et al, 2010; Kotani & Akaike, 2012).

Obwohl Anästhetika seit Jahrzehnten verwendet werden, ist ihr genauer Wirkmechanismus noch nicht vollständig verstanden. Ursprünglich glaubte man, dass Anästhetika unspezifisch mit der Lipiddoppelschicht interagieren, und dadurch die Fluidität der Membran verändern. Bald erkannte man jedoch die Bedeutung der Interaktion der Anästhetika mit verschiedenen Ionenkanälen, im Besonderen mit GABA_A-Rezeptoren (Akk & Steinbach, 2011; Campagna-Slater & Weaver, 2007; Ogawa et al, 2011). Während Injektionsanästhetika vor allem mit GABA_A-Rezeptoren interagieren, inhibieren Inhalationsnarkotika daneben auch die präsynaptische Glutamatfreisetzung (Herring et al, 2011).

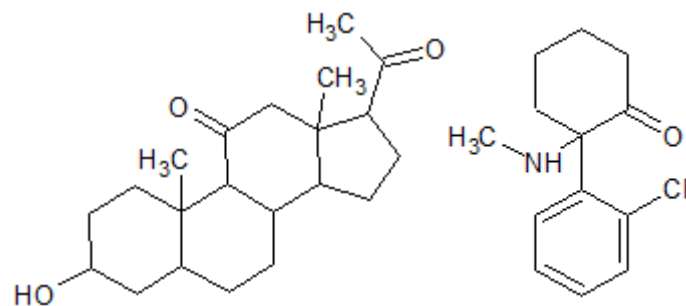


Abbildung 10: Strukturen von ausgewählten Anästhetika: Alphaxolon (links) und Ketamin (rechts)

Mutation einzelner Aminosäurereste in den transmembranären Domänen der α_1 - und $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors verhindert die Modulation von I_{GABA} durch Anästhetika (Campagna-Slater & Weaver, 2007); (Hall et al, 2011; Moraga-Cid et al, 2011). So interagieren die Hydroxylgruppen von Propofol vorwiegend mit aliphatischen Aminosäuren (Hall et al, 2011). Weiters scheint auch die Aminosäure Met₂₈₆ (M3) in der β_2 -Untereinheit Teil der Propofol- Bindungstasche zu sein und ebenfalls eine wichtige Rolle bei der I_{GABA} Modulation zu spielen, da in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass Propofol diese Aminosäure vor einer kovalenten Modifikation durch Sulfhydryl-reaktive Reagenzien schützt (Bali et al, 2009; Campagna-Slater & Weaver, 2007).

Etomidat bindet in einer Bindungstasche in der transmembranären Domäne zwischen α - (α_1 Met₂₃₆) in M1 und β - (β_2 Met₂₈₆) Untereinheiten in M3 (Akk & Steinbach, 2011; Guitchounts et al, 2012; Moraga-Cid et al, 2011). Es gibt Hinweise, dass es zwei strukturell identische Bindungsstellen für Etomidat an jedem $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptor gibt. Zusätzlich zu den Bindungsstellen in M2 und M3 in den α - und β -Untereinheiten beeinflusst auch ein Tyrosinrest in M4 (Tyr₄₄₄) die Aktivität von Propofol, nicht aber die von Etomidat. Die γ_2 -Untereinheit scheint nicht notwendig für die Potenzierung von GABA durch Propofol zu sein (Moraga-Cid et al, 2011).

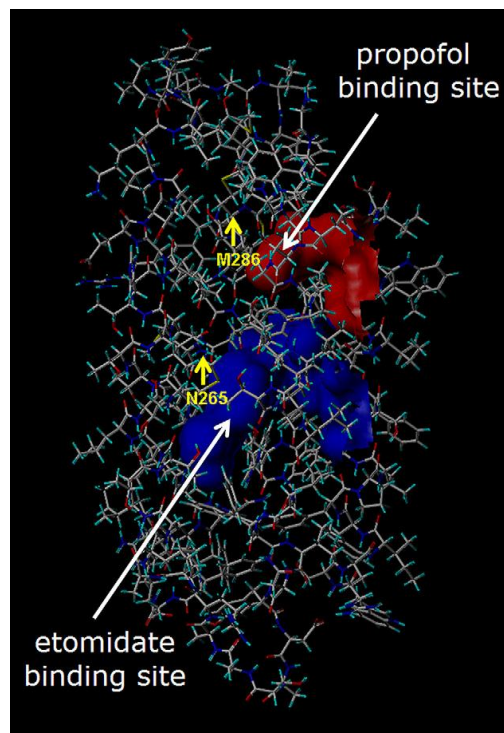


Abbildung 11: Bindungsstellen von Etomidat und Propofol (Campagna-Slater & Weaver, 2007)

Im Gegensatz dazu finden sich die für die Modulation von GABA_A-Rezeptoren durch Inhalationsanästhetika essentiellen Aminosäuren vor allem in den transmembranären Domänen der α -Untereinheiten: α_1 Leu₂₃₂ (M1), α_1 Ser₂₇₀ (M2), α_1 Ala₂₉₁ (M3), sowie α_1 Tyr₄₁₁, α_1 Thr₄₁₄ und α_1 Tyr₄₁₅ (M4) (Campagna-Slater & Weaver, 2007).

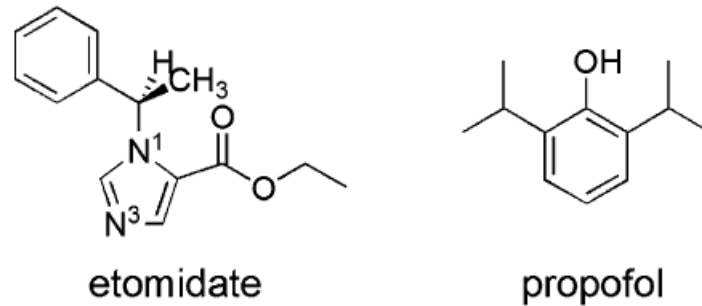


Abbildung 12: Chemische Strukturen von Etomidat und Propofol (Campagna-Slater & Weaver, 2007)

4.3.7.4 Ethanol

Eine direkte Interaktion von Ethanol mit GABA_A- Rezeptoren wurde lange vermutet. Dies ließ sich einerseits darauf zurückführen, dass Ethanol ähnliche pharmakologische Effekte wie klassische GABA_A-Rezeptor Liganden wie Barbiturate oder Benzodiazepine auslöst, dass sogenannte Kreuztoleranz zwischen Benzodiazepinen, Barbituraten und Alkohol beobachtet wird und dass schließlich die potentiell lebensbedrohliche Alkoholentzugssymptomatik in der Regel durch Gabe von Benzodiazepinen therapiert wird (Dar & Wooles, 1985; Harris, 1990; Liljequist & Engel, 1982; Nutt et al, 1989; Olsen et al, 2007).

Daneben vermutete man, dass Ethanol seine Wirkung durch unspezifische Effekte auf die Lipidmembran von Neuronen im ZNS ausübt (Davies, 2003).

In den 1980er Jahren hat man entdeckt, dass LGICs bei der Aktivität von Alkohol eine wichtige Rolle spielen, im Besonderen GABA_A-Rezeptoren (Davies, 2003; Lobo & Harris, 2008). Arzneistoffe, welche die GABAerge Funktion fördern, wie Wiederaufnahmehemmer oder GABA-Agonisten und positive Modulatoren, verstärken die Wirkung von Alkohol (Lobo & Harris, 2008).

Trotzdem wird die direkte Interaktion von Ethanol mit GABA_A-Rezeptoren auch heute noch kontrovers diskutiert: während Wallner et al. (2003) und Hanchar et al. (2004) in mehreren Studien zeigten, dass vor allem GABA_A Rezeptoren mit β_3 und δ -Untereinheiten von Ethanol in Konzentrationen > 3 mM signifikant potenziert werden, konnten andere keine direkten Wechselwirkungen feststellen (Baur et al, 2009; Hanchar et al, 2004; Wallner et al, 2003).

4.3.7.5 Neurosteroid

Neurosteroid sind potente Modulatoren aller GABA_A-Rezeptor-Subtypen und regulieren somit die Aktivität von sowohl synaptischen als auch extrasynaptischen Rezeptoren (Hosie et al, 2006; Hosie et al, 2007). Typische Vertreter dieser Klasse sind z.B. Allopregnanolon und Tetrahydrocorticosteron. Diese werden in Neuronen und Gliazellen aus Cholesterin durch die 5 α -Reduktase oder 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase synthetisiert (Hosie et al, 2007; Kim et al, 2011). Nach Spaltung der Seitenkette entsteht Pregnenolon, der Vorgänger der inhibitorischen wirksamen Neurosteroid, Pregnenolonsulfat und Dihydroepiandrosteronsulfat (DHEAS). Die anschließende Freisetzung erfolgt im Gehirn durch parakrine Sekretion (Hosie et al, 2007).

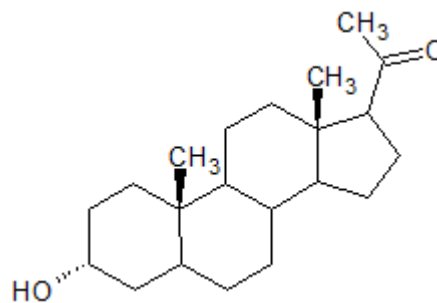


Abbildung 13: Strukturelle Darstellung von Allopregnanolon

Bis vor kurzem war noch unklar, ob die Effekte der Neurosteroid direkt über eine oder mehrere Bindungsstellen am GABA_A-Rezeptor oder indirekt über Rezeptor-assoziierte Proteine vermittelt werden (Hosie et al, 2007). In niedrigen nanomolaren Konzentrationen, die beispielsweise in Stresssituationen zu beobachten sind, potenzieren Neurosteroid GABA-induzierte Ströme, während in höheren Konzentrationen (submikromolare bis mikromolare Konzentrationen), welche beispielsweise während einer Geburt auftreten, es zu einer direkten Rezeptoraktivierung kommen kann. Dies deutet darauf hin, dass womöglich zwei verschiedene Bindungsstellen für Neurosteroid am GABA_A-Rezeptor existieren (Hosie et al, 2006).

Aminosäurereste in der α_1 -Untereinheit-M1- und/oder M3-Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivität der Neurosteroid (Hosie et al, 2007). Eine vermutliche Bindungsstelle,

über welche Neurosteroiden ihre modulatorische Wirkung ausüben, beinhaltet die Aminosäurereste $\alpha_1\text{Gln}_{241}$ in der M1-Region und $\alpha_1\text{Asp}_{407}$ in M4. Weiters wurde auch $\alpha_1\text{Thr}_{236}$ als wichtige Determinante in der Steroid-Aktivität identifiziert. Eine separate Bindungsstelle für die direkte Aktivierung in höheren Konzentrationen wird durch die Reste Thr_{236} in der α_1 -Untereinheit-M3 und Tyr_{284} in der β_2 -Untereinheit-M3 gebildet. GABA_A-Rezeptor blockierende Neurosteroiden scheinen dagegen an einer unterschiedlichen Stelle anzugreifen; hierbei spielt ein Rest in der M2-Domäne eine wichtige Rolle (Baker et al, 2010).

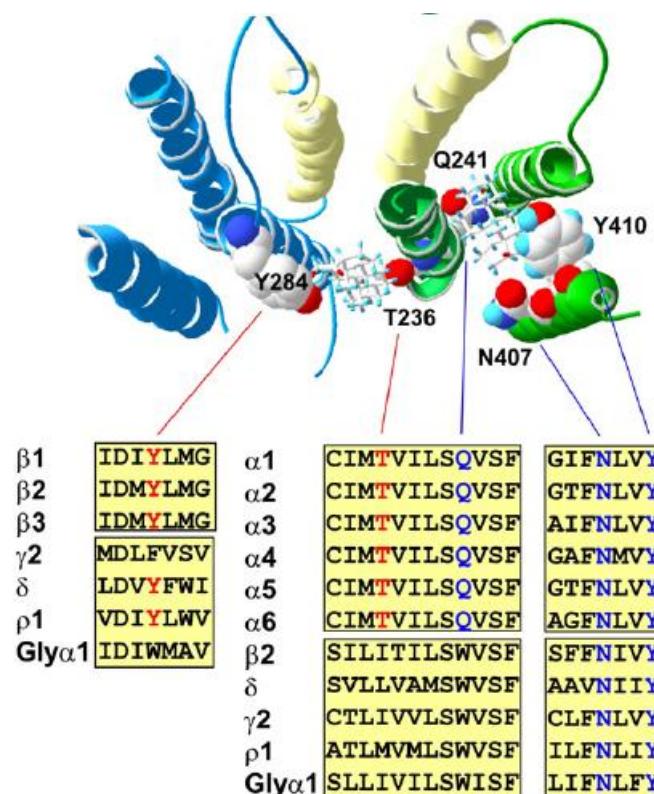


Abbildung 14: Aminosäuren, die an der Bindung der Neurosteroiden beteiligt sind (Hosie et al, 2007)

Für die Modulation von GABA_A-Rezeptoren ist die Anwesenheit einer 3 α -Hydroxy-Gruppe am Ring A und ein C-20-Keton im Ring D essentiell (Hosie et al, 2006).

Da GABA_A-Rezeptoren wesentlich für die Kontrolle der Erregbarkeit im neuronalen Netzwerk sind, können u.a. veränderte Plasmaspiegel von Neurosteroiden zu wichtigen Erkrankungen wie Panikstörungen, Depressionen, Alkoholabhängigkeit und Epilepsie führen (Hosie et al, 2006; Hosie et al, 2007).

4.3.7.6 β -selektive Modulatoren

Loreclezol

Loreclezol ist ein antikonvulsiv und anxiolytisch wirksamer Arzneistoff, welcher die Wirkung von GABA über eine allosterische Stelle, die vermutlich in der β -Untereinheit des Rezeptors lokalisiert ist, potenziert (Green et al, 1996). Dabei werden Rezeptoren mit β_2 oder β_3 -Untereinheiten um ca. das 300-fache stärker moduliert als jene mit β_1 -Untereinheiten. Loreclezol hat ebenfalls einen potenzierenden Effekt auf ρ -enthaltene GABA_C- und möglicherweise θ -enthaltene GABA_A-Rezeptoren (Boulineau et al, 2005; Groves et al, 2006).

Groves und seine Kollegen untersuchten die Wirkung von Loreclezol an Wild-Typ- und mutierten Mäusen. Letztere trugen eine Punktmutation an Position 265 (Serin statt Asparagin) der β -Untereinheit. Die mutierten Mäuse zeigten eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber Loreclezol (Groves et al, 2006).

Weiters wurden Asn₂₈₉ in der β_2 -Untereinheit bzw. Asn₂₉₀ in der β_3 -Untereinheit identifiziert, welche für die modulatorischen Wirkung von Loreclezol essentiell sind (Wingrove et al, 1994).

Mefenaminsäure

Mefenaminsäure ist ein Anthranilsäurederivat aus der Gruppe der Nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID). Woodward und seine Kollegen erkannten als erste, dass einige antiinflammatorische Arzneistoffe das Potential besitzen, GABA_A-Rezeptoren zu modulieren.

NSAIDs können vermutlich die Blut-Hirn-Schranke effektiv durchdringen. Daher und durch die relativ hohen, therapeutischen Plasmakonzentration können nennenswerte Konzentrationen im Gehirn erreicht werden (Smith et al, 2004).

Mefenaminsäure aktiviert in Konzentrationen von 10 μ M den GABA_A-Kanal direkt und ist gleichzeitig der stärkste Modulator unter den NSAIDs. Mefenaminsäure verschiebt die GABA-Dosis-Wirkungskurve nach links, ein Mechanismus, der auch bei anderen positiv allosterischen Modulatoren wie den Benzodiazepinen zu beobachten ist (Coyne et al, 2007).

Furosemid

Furosemid, ein häufig verwendetes Diuretikum, inhibiert Chloridströme durch rekombinante GABA_A-Rezeptoren (Guyon et al, 2002).

Der Na⁺/2Cl⁻/K⁺-Blocker antagonisiert selektiv, reversibel und nicht-kompetitiv GABA_A-Rezeptoren im Cerebellum. Die Interaktion ist abhängig von der Anwesenheit von α₆- und β₃-Untereinheiten, aber unabhängig von der Anwesenheit von γ₂- oder δ-Untereinheiten. Eine ähnliche Art des Antagonismus von Furosemid ist im Hippocampus und Thalamus zu finden. Die antagonistische Aktivität scheint sich allerdings von anderen zu unterscheiden, weil Furosemid die Bindung sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von exogenem GABA beeinflusst (Korpi & Lüddens, 1997).

Guyon und seine Kollegen zeigten darüber hinaus, dass die I_{GABA} Modulation von Furosemid ebenfalls von der Agonistenkonzentration abhängig ist. Bei niedrigen Konzentrationen werden die Ströme potenziert, wohingegen sie bei höheren inhibiert werden (Guyon et al, 2002).

Der Aminosäurerest Asparagin in Position 265 der β₂- und β₃-Untereinheit konnte als eine wichtige strukturelle Wirkdeterminante identifiziert werden. Darüber hinaus besitzt Furosemid eine 100-fach höhere Selektivität gegenüber α₆-Subtypen als für α₁. Durch Verwendung von α₁/α₆-Chimären wurde eine transmembranäre Region (209-279) identifiziert, welche für die hohe Sensitivität von α₆β₃γ_{2s} verantwortlich ist (Thompson et al, 1999).

4.4 GABA_B-Rezeptoren

GABA aktiviert neben den bereits besprochenen ionotropen GABA_A-Rezeptoren auch den metabotropen GABA_B-Rezeptor. Im Gegensatz zu den Ionenkanälen aktivieren GABA_B-Rezeptoren das Second Messenger-System über die Bindung und Aktivierung des Guanin-Nukleotid bindenden Proteins (G-Protein) (Bettler et al, 2004).

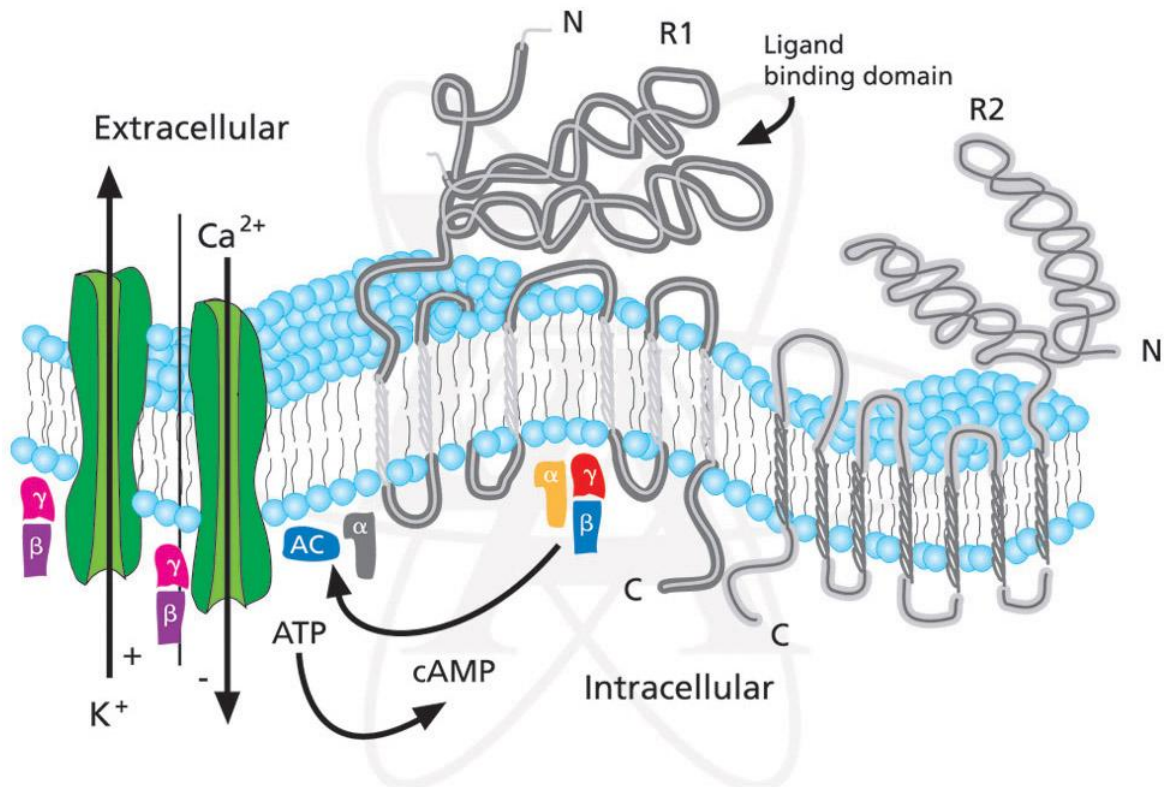


Abbildung 15: Schematische Darstellung des GABA_B-Rezeptors (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/schematic-representation-of-the-gabab-receptor.html>, 25.11.2012)

Die heptahelikalen GABA_B-Rezeptoren werden in fast allen Neuronen und Gliazellen des ZNS exprimiert, wo sie die synaptische Transmission und Signalübertragung durch die Steuerung von spannungsgesteuerten Ca²⁺- und K⁺-Kanälen regulieren (Bettler et al, 2004; Gassmann & Bettler, 2012; Schwenk et al, 2010). Präsynaptisch befinden sich GABA_B-Rezeptoren an inhibitorischen und exzitatorischen Nervenendigungen, wo sie als Hetero- oder Autorezeptoren fungieren können. GABA kann durch die Schließung der Ca²⁺-Kanäle über eine negative Rückkopplung die eigene Freisetzung inhibieren oder über Aktivierung der

Heterorezeptoren die Freisetzung von Glutamat hemmen (Gassmann & Bettler, 2012; Ulrich & Bettler, 2007). Postsynaptische Rezeptoren öffnen G-Protein gekoppelte Kalium-Kanäle (sogenannte inward rectifying K^+ Kir3-Kanäle), welche die neuronale Aktivität durch Hyperpolarisation der Membran inhibieren (Gassmann & Bettler, 2012).

GABA_B-Rezeptoren sind heteromere Proteinkomplexe, die von den 2 Untereinheiten GABA_{B1} and GABA_{B2} gebildet werden, wobei die Agonistenbindungsstelle sich an der GABA_{B1} Untereinheit befindet, während GABA_{B2} vor allem für die Signalweiterleitung und die Verankerung in der Membran eine wesentliche Rolle spielt. 2 verschiedene Isoformen (GABA_{B1a} and GABA_{B1b}) der GABA_{B1} Untereinheit sind bekannt, welche sich vor allem in der N-terminalen Domäne unterscheiden, in welcher nur die GABA_{B1a} Untereinheit ein paar sogenannte „sushi domains“ besitzt (Chalifoux & Carter, 2011); (Couve et al, 2000; Ulrich & Bettler, 2007). Die beiden Isoformen werden von den meisten Neuronen im Gehirn zusammen exprimiert und entstehen aus dem gleichen Gen unter Verwendung von unterschiedlichen Promotoren (Ulrich & Bettler, 2007).

Der typische GABA_B-Rezeptor-Agonist Baclofen (β -chlorophenyl-GABA) ist ein lipophiles Derivat von GABA, welches ursprünglich 1962 synthetisiert, und 1972 auf den Markt gebracht wurde, um die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit zu erhöhen. Es wird beispielsweise gegen Spasmen und Steifheit der Skelettmuskulatur bei Patienten mit Rückenmarksverletzungen oder Multipler Sklerose eingesetzt (Bettler et al, 2004).

GABA_B-Rezeptoren sind ähnlich wie GABA_A-Rezeptoren an einer Reihe unterschiedlicher Erkrankungen beteiligt wie z.B. Epilepsie, spastischer Lähmung, chronischen Schmerzen, Depression oder Schizophrenie (Ong & Kerr, 2005).

5 Problemstellung und Zielsetzung

Schlaf- und Angststörungen gehören mit einer Prävalenz von 15 % (Baldwin et al, 2005) bzw. 10% (Mayer G, 2010) zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen. Beide werden häufig mit Modulatoren von GABA_A Rezeptoren wie den Benzodiazepinen therapiert. Diese wirken anxiolytisch, sedierend-hypnotisch, antikonvulsiv, besitzen aber neben unerwünschten Wirkungen wie anterograder Amnesie, Muskelrelaxation auch noch ein hohes Abhängigkeits- bzw. Missbrauchspotential. Das breite (Neben)Wirkungsspektrum der Benzodiazepine ist unter anderem auf ihre unspezifische Interaktion mit den verschiedenen GABA_A-Rezeptor Subtypen zurückzuführen. Daher ist man auf der Suche nach neuen Liganden, welche selektiv bestimmte Rezeptorsubtypen modulieren, um so unerwünschte Wirkungen zu vermeiden.

Kürzlich wurde Valerensäure (aus dem Arzneibaldrian; *Valeriana officinalis* L.) als ein $\beta_{2/3}$ -selektiver und effizienter Ligand von GABA_A-Rezeptoren identifiziert. Um die Wirksamkeit und Potenz dieser Substanz zu erhöhen, wurde eine Reihe von Derivaten (SB27, SB33, SB29, SB30, SB19) synthetisiert.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte ich diese Derivate charakterisieren. Dafür sollte ich GABA_A-Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -UE in *Xenopus laevis* Oozyten exprimieren und die konzentrationsabhängige Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und einem schnellen Perfusionssystem untersuchen. Aus den ermittelten Daten sollte ich Dosis-Wirkungskurven erstellen und so EC₅₀-Werte und maximale Effekte ermitteln.

Im Anschluss sollte ich die Potenz und Wirksamkeit dieser Substanzen mit der der VA vergleichen.

6 Material und Methoden

Für die Untersuchung elektrischer Membranvorgänge werden in der Elektrophysiologie unterschiedliche Messtechniken verwendet. Als Messtechnik für diese Arbeit wurde die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gewählt, mit der es möglich ist, transmembranäre Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential zu messen. Rekombinante GABA_A-Rezeptorsubtypen (unterschiedliche Kombination der Untereinheiten) wurden dazu in Oozyten von *Xenopus laevis* (Afrikanischer Krallenfrosch) exprimiert. *Xenopus* Oozyten stellen ein Standardobjekt für die Expression und funktionelle Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren dar. Gurdon et al. entdeckten bereits 1971 das Potenzial funktioneller Expression exogener Protein-Spezies durch Injektion von mRNA in das Zytoplasma der Frosch-Oozyten ((Gurdon et al, 1971)Diplomarbeit Bernd Weber „Untersuchung der Wirkung neuer, ausgewählter Liganden von GABA_A Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten“ 2012).

6.1 Oozytenpräparation



Abbildung 16: *Xenopus laevis* Frösche
http://www.edmonton.ca/attractions_recreation/attractions/edmonton_valley_zoo/animals/african-clawed-frog.aspx (24.10.2012)

Die Oozyten vom südafrikanischen *Xenopus laevis* Frosch sind weitverbreitet als zuverlässiges System für die Expression und Charakterisierung von verschiedenen Proteinen, einschließlich Ionenkanäle und

Membranrezeptoren (Bossi et al, 2007). Aufgrund ihres großen

Durchmessers (ca. 1.1 mm) sind die Oozyten gut geeignet für Manipulationen wie cRNA-Injektion. Zudem sind die Amplituden ihrer endogenen Ströme sehr klein im Vergleich zu den heterolog exprimierten Ionenkanälen, was einen weiteren Vorteil bietet. Darüber hinaus können mehrere cRNAs, welche unterschiedliche Untereinheiten kodieren, in einem

bestimmten Verhältnis ko-injiziert werden, was für diese Diplomarbeit von großer Wichtigkeit war (Tamaro et al, 2008).

Für die Narkose wurden weibliche *Xenopus laevis* Frösche 15-30 Minuten einer 0,2 prozentigen Tricainlösung (MS-222, Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters) ausgesetzt und anschließend im Abdomenbereich operiert.

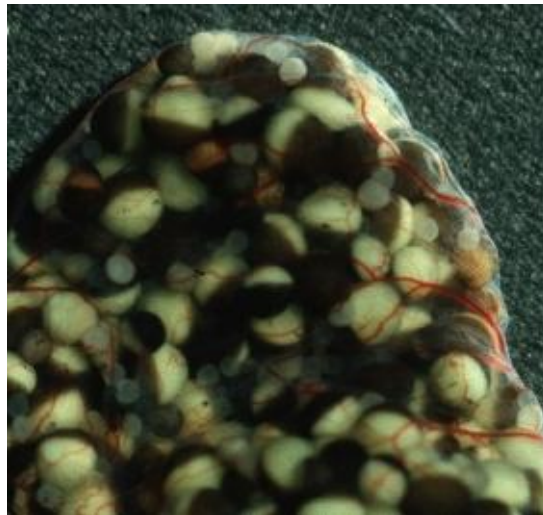


Abbildung 17: Follikelgewebe mit Oozyten;
<http://ibmmsrvlakitu.unibe.ch/sigel/xenopus.html> (22.10.2012)

Das Follikelgewebe mit den Oozyten wurde vorsichtig mit einer Pinzette entnommen und in eine Petrischale mit OR2-Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 5 mM HEPES; pH=7,5 (1M NaOH)) transferiert. Danach wurde es wieder mittels einer Pinzette mechanisch zerkleinert und anschließend für etwa 90 Minuten in Kollagenase-Lösung (2 mg Kollagenase Sigma Typ IA/ml OR2) bei 18°C inkubiert, um das Bindegewebe und die Follikelzellen zu entfernen (Bianchi & Driscoll, 2006).

Nach der Kollagenase-Behandlung liegen die meisten Oozyten einzeln und frei von Kapillaren bzw. Bindegewebe vor. Sowohl vor als auch nach der Verdauung ist es wichtig, die Oozyten gründlich mit OR2-Lösung zu waschen, weil in der später zugeführten ND96-Lösung Calcium enthalten ist und dieses durch die Aktivierung der Proteasen toxisch wirken kann.

Anschließend wurden die Oozyten in eine Petrischale mit ND96 (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES; pH=7,4 (1mM NaOH)) transferiert.

Stadium V-VI Oozyten mit einem Durchmesser von 1000-1200 μm eignen sich am besten zur Injektion und wurden unter einem Binokular nach äußerlichen Kriterien (frei von Kapillaren, symmetrisch rund, einheitlich gefärbt) selektioniert.



Abbildung 18: *Xenopus laevis* Oozyten;
<https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elitenetzwerk-home/forschungsarbeiten/lebenswissenschaften/2009/haerteis-kidney> (24.10.2012)

6.2 cRNA – Vorbereitung

Poly(A⁺)cRNA-Transkripte von linearisierter cDNA wurden in pCMV-Vektor kloniert. Die cRNAs, welche für die einzelnen Untereinheiten kodierten, wurden in Diethylpyrocarbonat (DEPC) gelöst (Baburin et al, 2008).

6.3 cRNA – Injektion

Um die Expression der γ -Untereinheit sicherzustellen, wurden die für die verschiedenen Untereinheiten kodierenden cRNAs kurz vor der Injektion in einem Verhältnis von 1:1:10 ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$) gemischt (Khom et al, 2006). 10-50 nl davon wurden mit Hilfe eines pneumatischen Injektionsgeräts in die einzelnen Oozyten injiziert. Eine sichtbare Zunahme der Größe des Oozyten wies auf eine erfolgreiche Injektion hin.

Die injizierten Oozyten wurden anschließend für mindestens 24 Stunden bei 18°C in ND96 (100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) inkubiert und konnten im Anschluss für die Messungen verwendet werden.

6.4 Verwendete Messlösungen

Die GABA-Testlösung (Konzentration 1 mM; 5.15 mg GABA in 50 ml ND96) wurde jeden Tag frisch hergestellt.

Von den zu untersuchenden Substanzen (SB27, SB33, SB29, SB30, SB19, SB34) wurden Stammlösungen (Konzentration 100 mM) in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zubereitet. Diese wurden anschließend mit ND96 verdünnt, um Testlösungen im Bereich von 0.1 bis 500 μM (0.1 μM , 1 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM , 500 μM) zu erhalten. Alle verwendeten Lösungen wurden täglich frisch hergestellt. Wichtig war, dass die DMSO-Konzentration nicht höher als 0.3 % betrug.

Die Mikroelektroden zur Messung wurden mit 2 M KCl befüllt.

6.5 Perfusionssystem

Alle Lösungen wurden mittels eines modifizierten Perfusionssystems nach Hering (1998) appliziert. Abbildung 19 und 20 zeigen eine schematische Darstellung der Perfusionskammer und der Substanzapplikation (Khom et al, 2006).

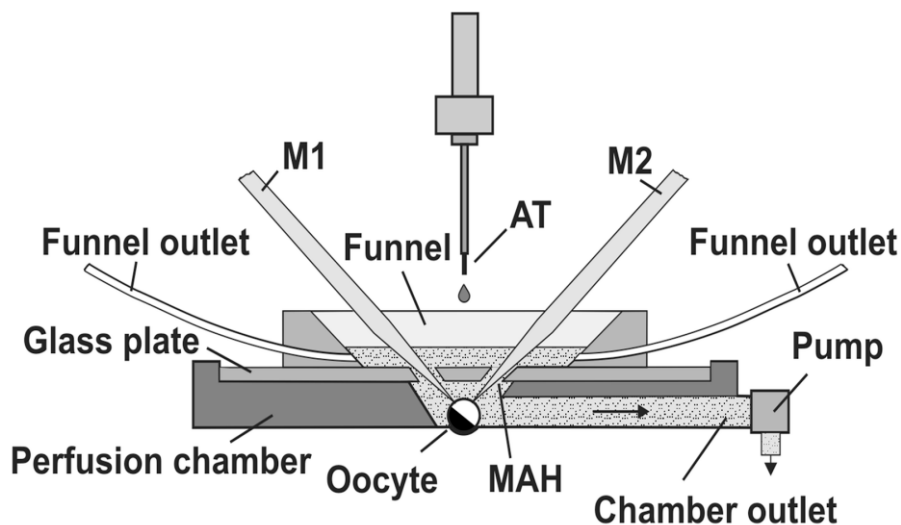


Abbildung 19: Querschnitt einer Perfusionskammer (Khom et al, 2006)

Der Oozyt (Abb. 19; 10) befindet sich dabei auf einer zylindrischen Halterung und die Applikation erfolgt, von einem Roboter (TECAN Miniprep 60) gesteuert, von oben in einen Trichter aus Quarz (6), der die beiden Mikroelektroden (1,2) umschließt. Letztere werden manuell mithilfe des Binokulars in Öffnungen (8) der Deckplatte (7) eingeführt und gelangen so zum Oozyten. Eine Pumpe, die mit der Kammer (11) und dem Ausgang der Kammer (12) verbunden ist, entfernt applizierte Mengen und ermöglicht somit eine Perfusion. Abflüsse (funnel outlet), die am Trichter befestigt sind, saugen eventuelle Restmengen ab.

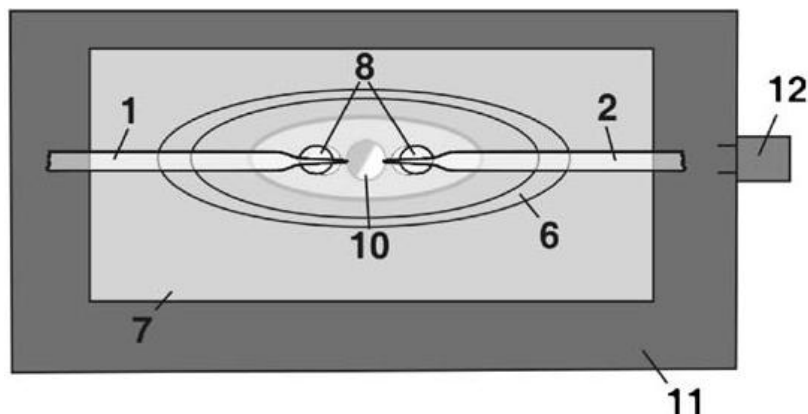


Abbildung 20: Aufsicht einer Perfusionskammer (Baburin et al, 2006)

6.6 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Der Versuchsaufbau besteht aus zwei Mikroelektroden, die mittels einer feinen Nadel in den Oozyten eingeführt werden. Eine Elektrode („potential electrode“) misst dabei den transmembranären Strom und die andere („current electrode“) injiziert dabei den Strom in den Oozyten, um das benötigte Potential (Haltepotential) zu erreichen bzw. konstant zu halten. Die Abweichung des tatsächlichen Potentials zum Haltepotential wird von einem Rückkopplungsverstärker (TURBO TEC Amplifier) gemessen. Der vom Verstärker über die „current electrode“ injizierte Strom ist indirekt proportional zum Ionenstrom, der von der Oozytenmembran generiert wird.

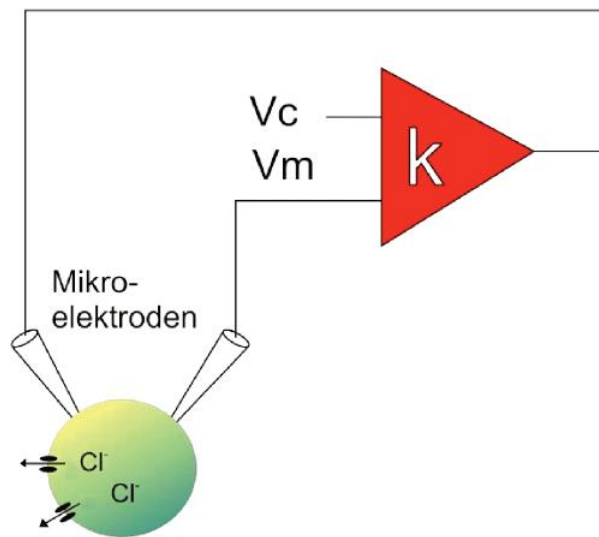


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Messprinzips

7 Ergebnisse

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) bei einer GABA-EC₃₋₁₀ Konzentration durch 6 neu synthetisierte Naturstoffderivate mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und eines schnellen Perfusionssystems untersucht.

Dafür wurden GABA_A-Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert.

Erstellung einer GABA-Konzentrationswirkungskurve und Ermittlung der GABA EC₃₋₁₀ Konzentration

Zuerst wurden GABA_A-Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und anschließend ansteigende GABA-Konzentrationen appliziert. Die resultierende Induktion von Chloridströmen wurde mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gemessen.

Die so erhaltenen Amplituden wurden nach folgender Formel normiert:

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

Amplitude_x... Amplitude bei jeweiliger Konzentration

Amplitude_{max}... Amplitude induziert von 1mM GABA

und die Werte in ein Koordinatensystem (siehe Abbildung 22) eingetragen. Durch diese Datenpunkte wurde eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung gelegt (siehe Abbildung 22 B). Anhand dieser Kurve konnten dann die EC₅₀-Werte d.h. jene Konzentration, welche den halbmaximalen Effekt auslöst, bzw. die EC₃₋₁₀-Werte abgelesen werden (siehe Tabelle 2).

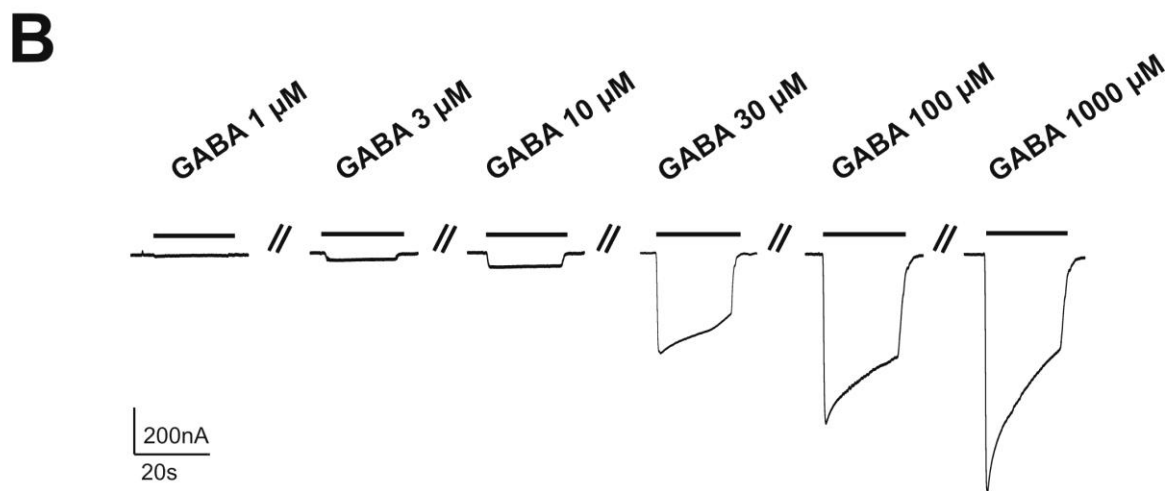
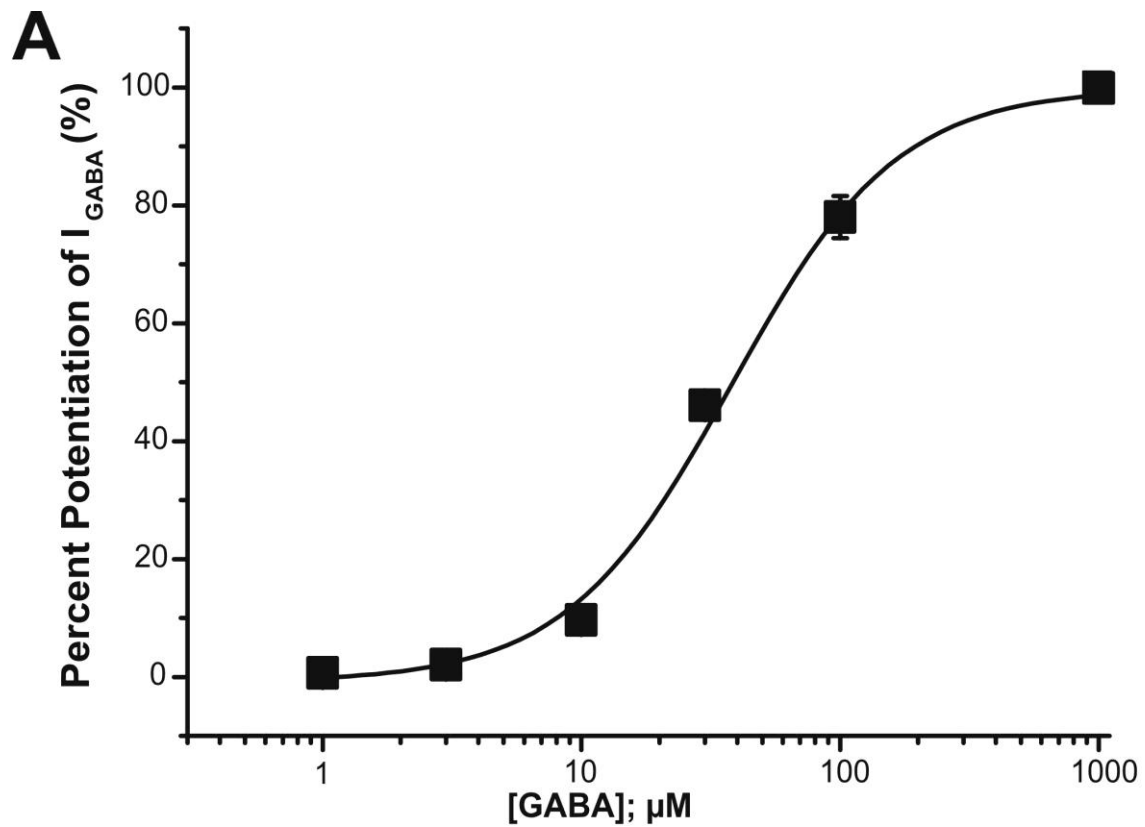


Abbildung 22: (A) GABA-Konzentrations-Wirkungskurve an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren. (B) Typisches Experiment; GABA wurde in den Konzentrationen 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM und 1 mM appliziert.

7.1 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren durch Valerensäure

Wie in Abbildung 23 gezeigt, kam es durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} Konzentration und ansteigender Konzentrationen von VA zu einer signifikanten Potenzierung des GABA-induzierten Stroms. Erste signifikante Effekte traten bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ auf (siehe Abbildung 23 B für ein typisches Experiment).

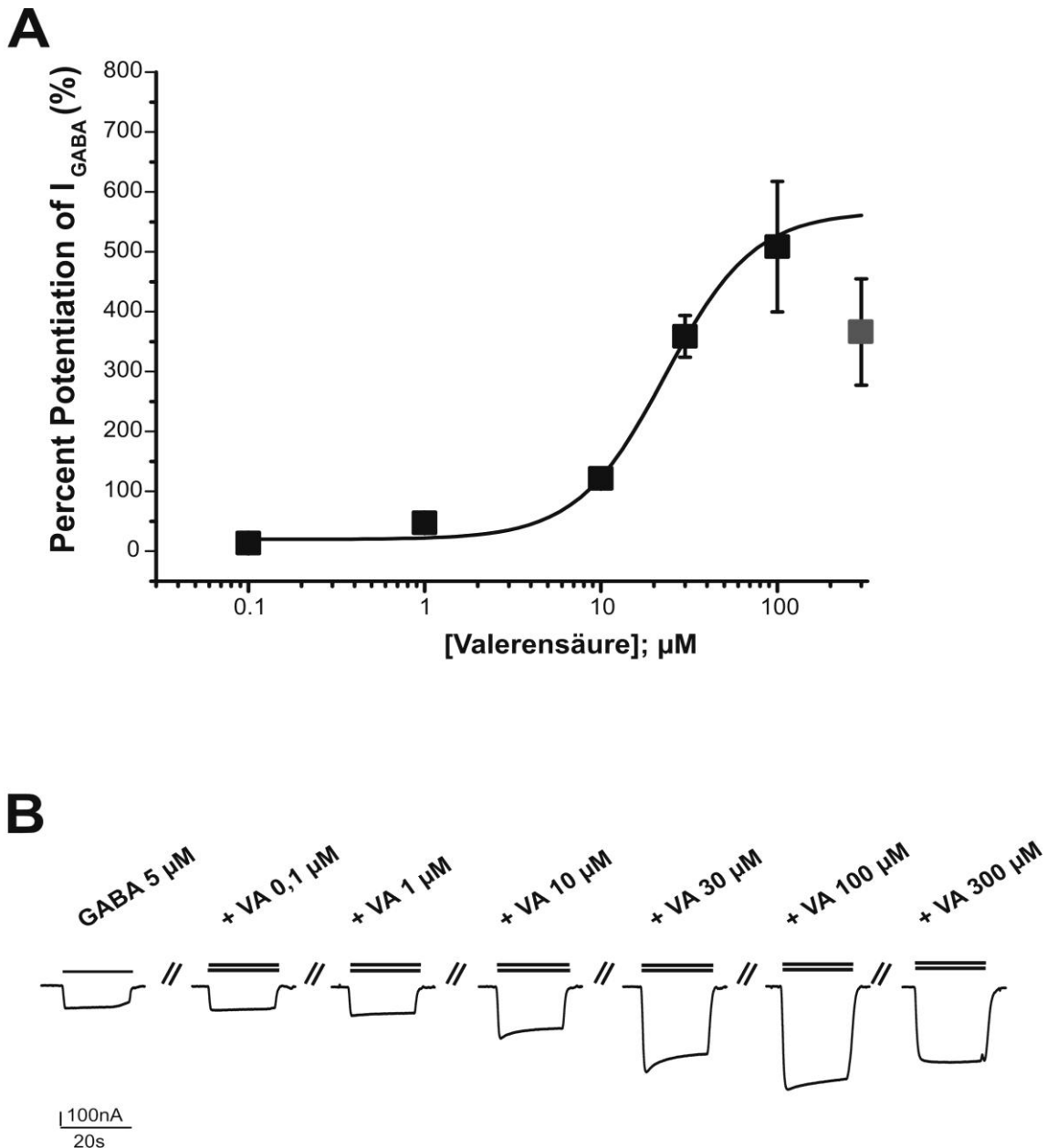


Abbildung 23: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für Valerensäure an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren; konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} und Valerensäure in den gezeigten Konzentrationen. Der Datenpunkt bei 300 μM Valerensäure wurde nicht für die Konzentrations-Wirkungskurve berücksichtigt. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert $\pm$ S.E.M von mind. 3 verschiedenen Experimenten von 2 verschiedenen Fröschen dar. (B) Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von Valerensäure.

Die Potenzierung von I_{GABA} nahm mit steigender Konzentration zu und erreichte bei 100 μM ihr Maximum ($567 \pm 170\%$; $n=9$). Die EC_{50} lag dabei bei $23.2 \pm 10.1 \mu\text{M}$.

Interessanterweise kam es – wie bereits von anderen Untereinheit (UE)-Kombinationen bekannt, in Konzentrationen $>100 \mu\text{M}$ wieder zu einer Abnahme der Potenzierung (Khom et al, 2007; Khom et al, 2010).

7.2 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB27

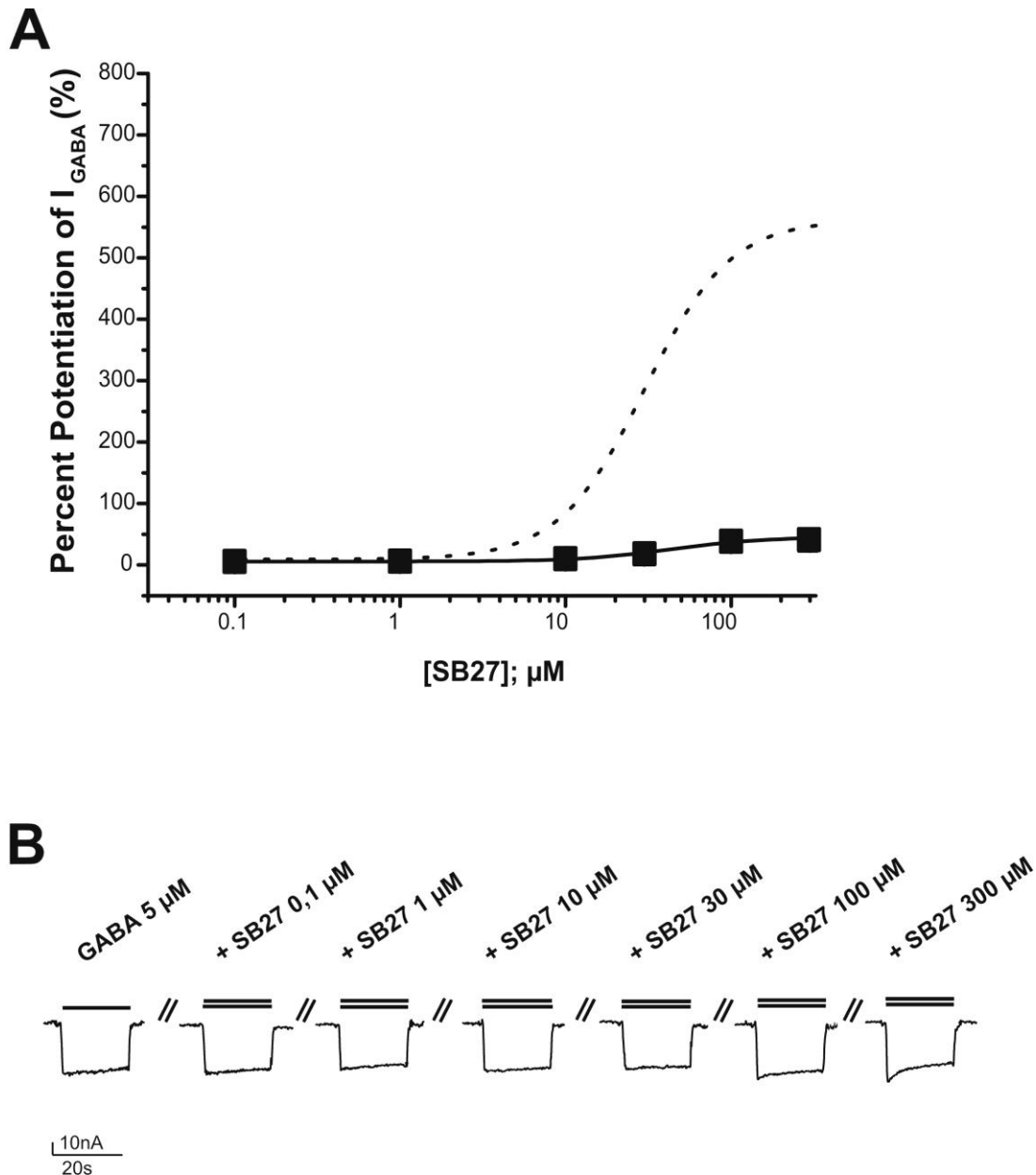


Abbildung 24: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für SB27 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren; konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} und SB27 in den gezeigten Konzentrationen. Strichlierte Linie zeigt die Modulation von I_{GABA} durch VA. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert $\pm$ S.E.M von mind. 3 verschiedenen Experimenten von 2 verschiedenen Fröschen dar. **(B)** Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von SB27.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, führte die Applikation des Derivates SB27 zu einer Potenzierung von I_{GABA} . Hier konnten erste Effekte bei Konzentration $\geq 30 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Die maximale Potenzierung von I_{GABA} durch SB27 lag bei $46 \pm 18\%$ ($n=5$), die EC_{50} betrug $43.3 \pm 39.8 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 24 B für die Modulation von I_{GABA} durch SB27).

Im Vergleich zu VA (strichlierte Linie in Abbildung 24) war die Potenzierung etwa 12-mal schwächer ausgeprägt, die EC_{50} war ebenfalls signifikant höher (siehe Tabelle 2).

7.3 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren durch SB33

Wie in Abbildung 25 gezeigt, führte die Applikation des Derivates SB33 zu einer Potenzierung von I_{GABA} (GABA- EC_{3-10}). Erste Effekte traten bei Konzentration $\geq 10 \mu\text{M}$ auf. Die maximale Potenzierung lag bei $1086 \pm 191\%$ ($n=5$) die EC_{50} lag bei $209.2 \pm 60.0 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 25 B für die Modulation von I_{GABA} durch SB33)

Im Vergleich zu VA war die Potenzierung etwas stärker ausgeprägt, die EC_{50} war hingegen deutlich höher (siehe Tabelle 2).

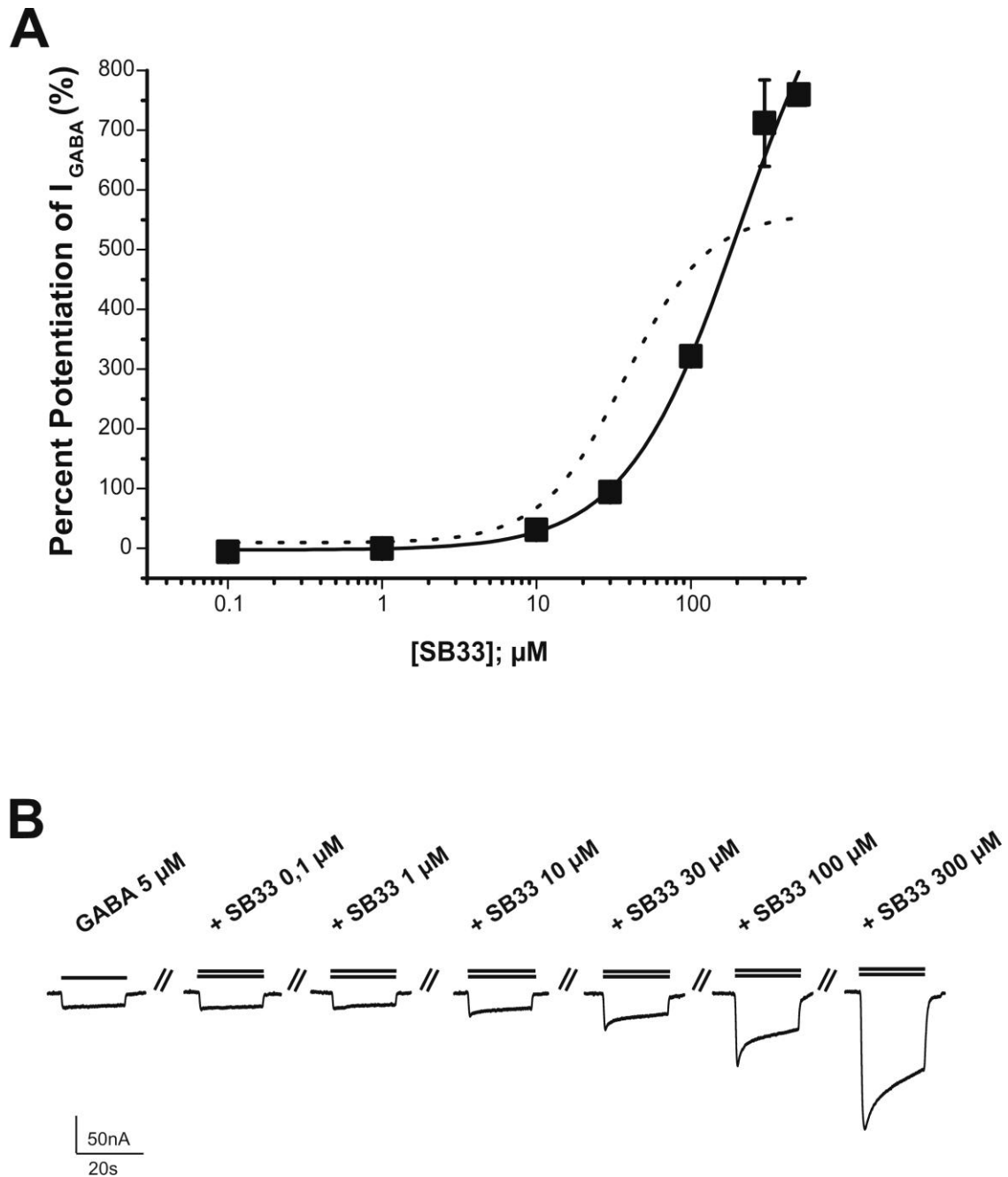


Abbildung 25: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für SB33 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren; konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} und SB33 in den gezeigten Konzentrationen. Strichlierte Linie zeigt die Modulation von I_{GABA} durch VA. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert $\pm$ S.E.M von mind. 3 verschiedenen Experimenten von 2 verschiedenen Fröschen dar. **(B)** Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von SB33.

7.4 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren durch SB34

Derivat SB34 führte in keiner der getesteten Konzentrationen zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} ($p > 0.05$; $n = 6$; siehe Abbildung 26 A bzw. 26 B für fehlende Modulation von I_{GABA} durch SB34).

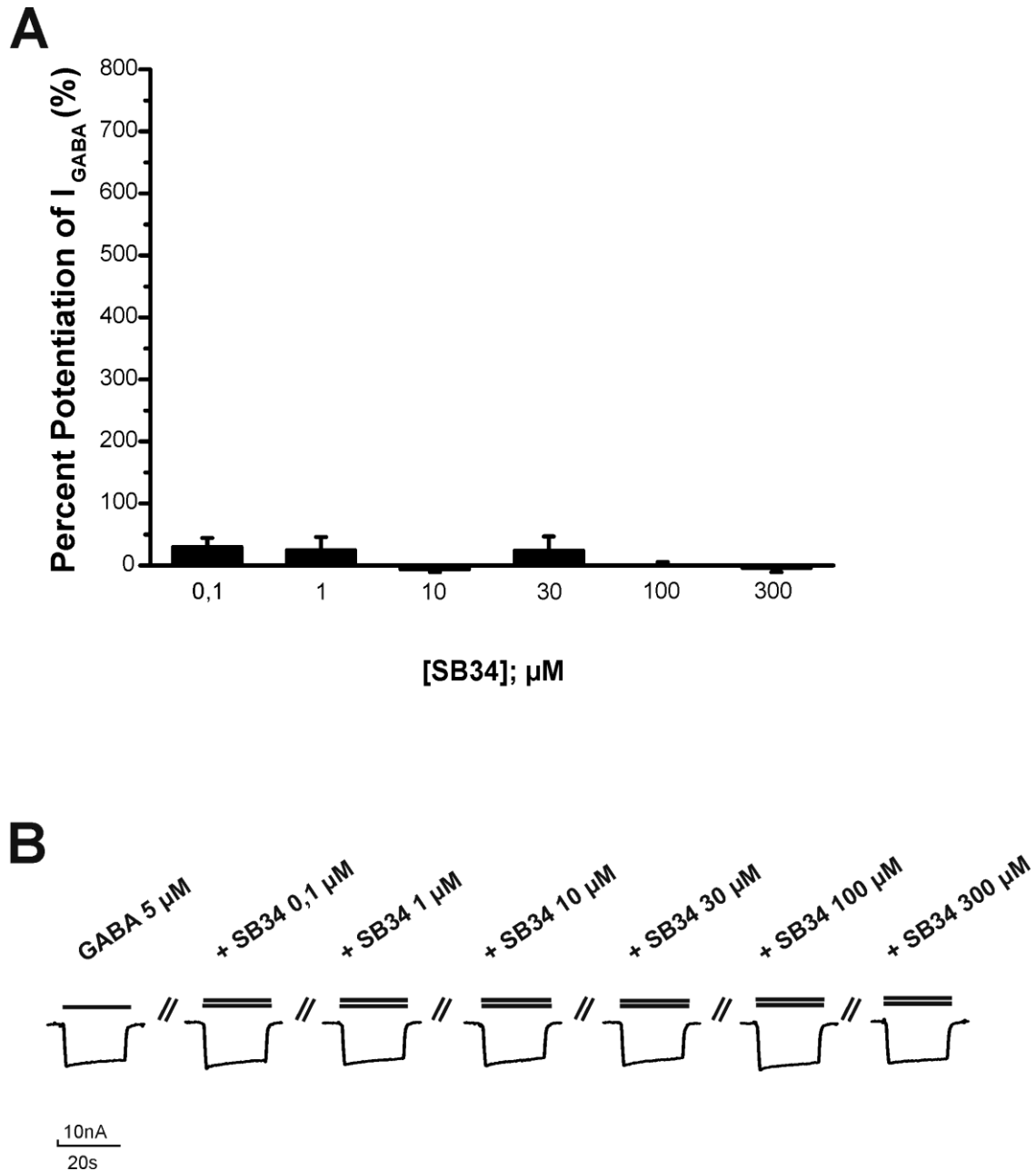


Abbildung 26: (A) Veranschaulichung der fehlenden Modulation von I_{GABA} durch SB34 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren anhand eines Balkendiagramms; Modulation von I_{GABA} durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} und SB34 in den gezeigten Konzentrationen. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert $\pm$ S.E.M von mind. 3 verschiedenen Experimenten von 2 verschiedenen Fröschen dar. **(B)** Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentration von SB34.

7.5 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren durch SB29

Wie in Abbildung 27 gezeigt, führte die Applikation des Derivates SB29 zu einer Potenzierung von I_{GABA} . Erste Effekte traten bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ auf. Die maximale Potenzierung lag bei $670 \pm 23\%$, ($n=4$), die EC_{50} lag bei $27.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 27 B für die Modulation von I_{GABA} durch SB29)

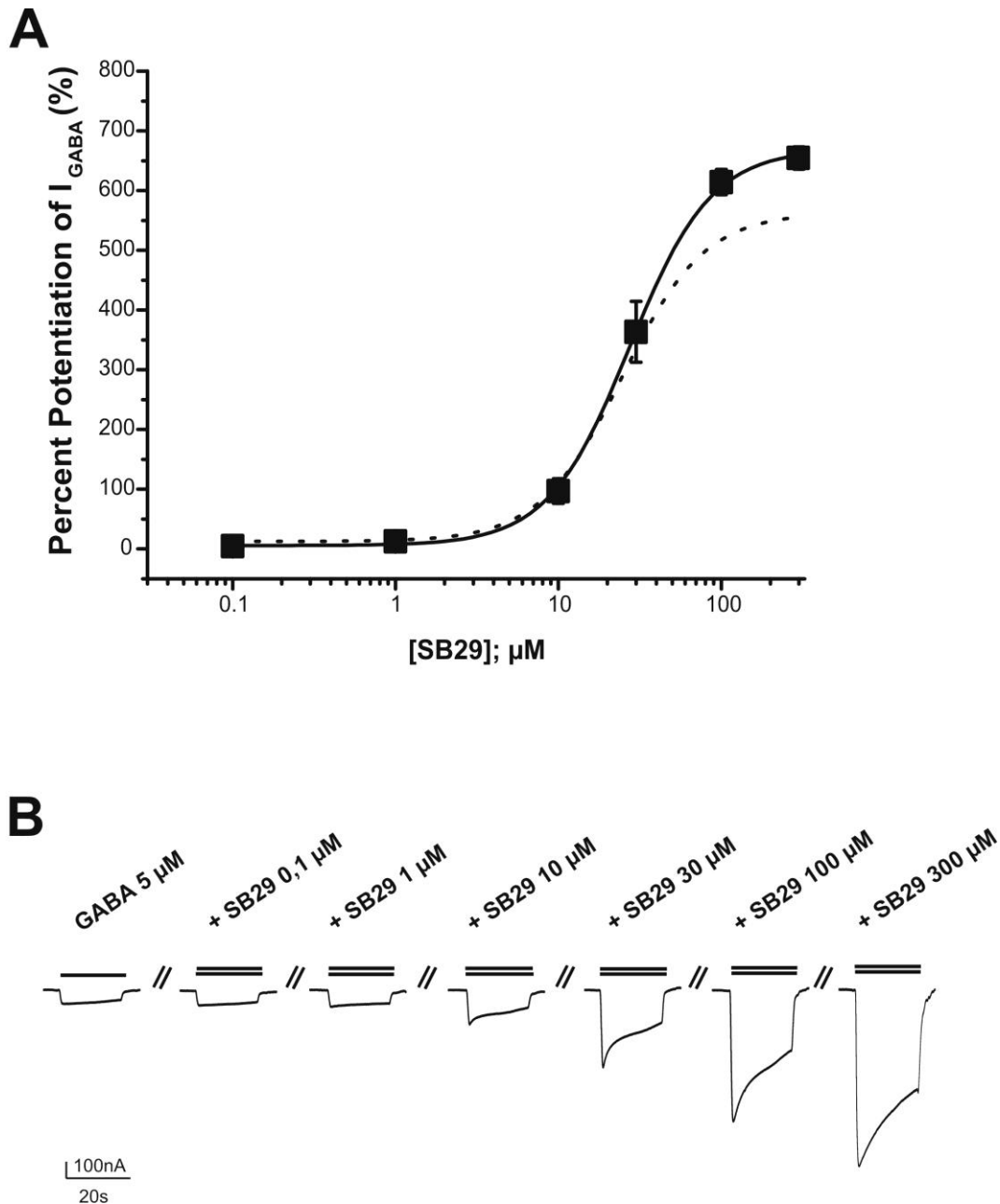


Abbildung 27: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für SB29 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren; konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} und SB29 in den gezeigten Konzentrationen. Strichlierte Linie zeigt die Modulation von I_{GABA} durch VA. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert $\pm$ S.E.M von mind. 3 verschiedenen Experimenten von 2 verschiedenen Fröschen dar. **(B)** Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von SB29

Im Vergleich zu VA war die Potenzierung etwas stärker ausgeprägt, die EC_{50} war vergleichbar (siehe Tabelle 2).

7.6 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren durch SB30

Wie in Abbildung 28 gezeigt, führte die Applikation des Derivates SB30 zu einer konzentrationsabhängigen positiven, allosterischen Modulation von I_{GABA} . Erste Effekte traten bei Konzentrationen $\geq 30 \mu M$ auf. Die maximale Stimulation von I_{GABA} lag bei $512 \pm 74\%$ ($n=5$), die EC_{50} lag bei $104.8 \pm 32.6 \mu M$ (siehe Abbildung 28 B für die Modulation von I_{GABA} durch SB30).

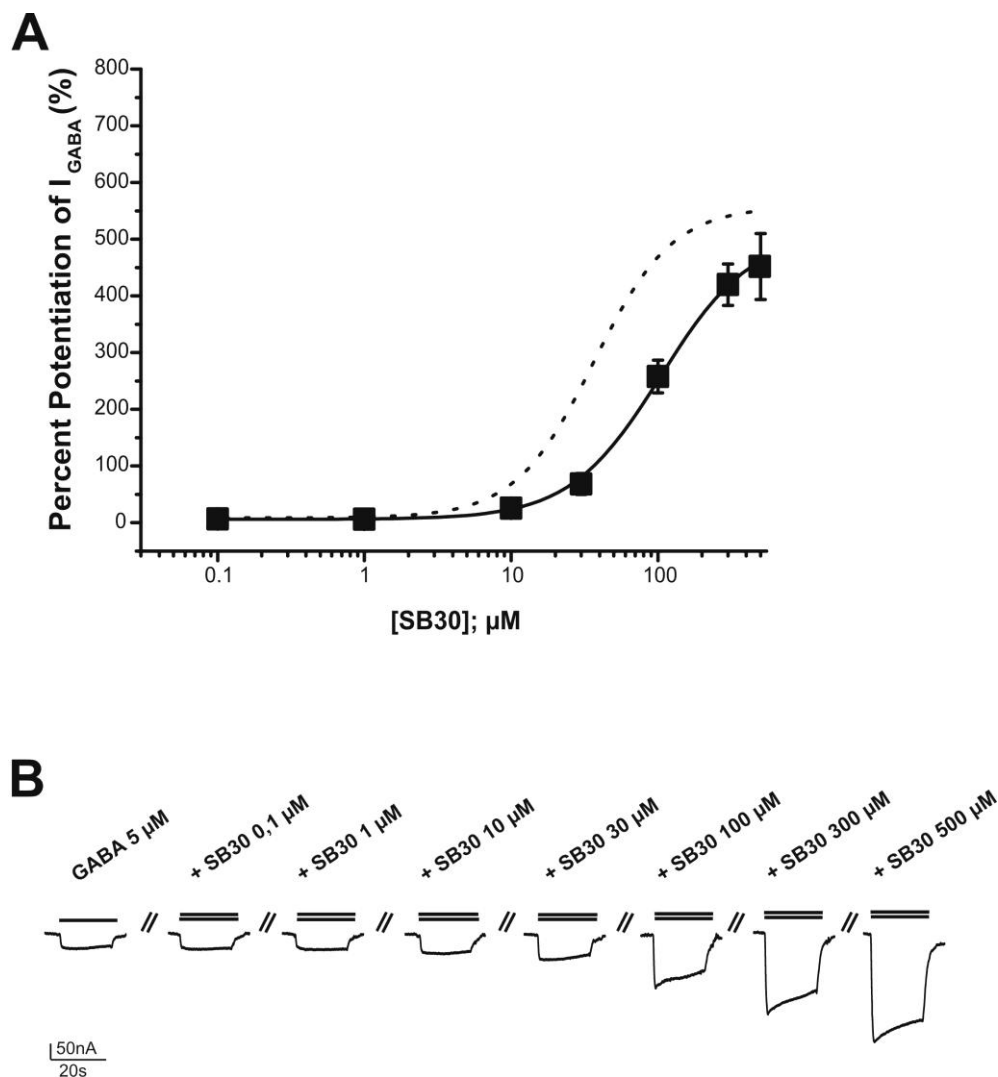


Abbildung 28: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für SB30 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ – Rezeptoren; konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} und SB30 in den gezeigten Konzentrationen. Strichlierte Linie zeigt die Modulation von I_{GABA} durch VA. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert $\pm$ S.E.M von mind. 3 verschiedenen Experimenten von 2 verschiedenen Fröschen dar. (B) Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von SB30.

Im Vergleich zu VA war die Potenzierung vergleichbar stark ausgeprägt, die EC_{50} war dagegen deutlich höher (siehe Tabelle 2).

7.7 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren durch SB19

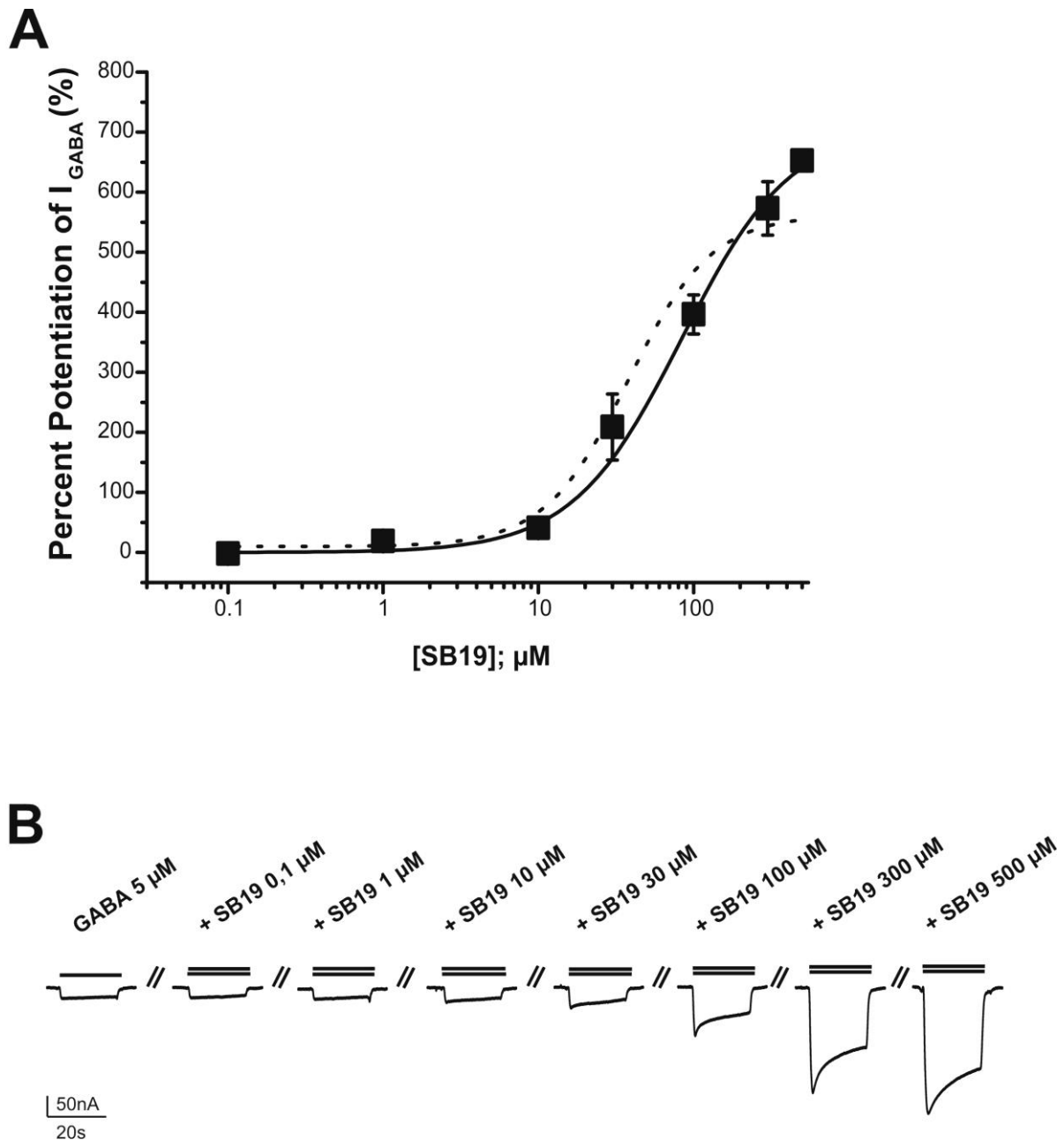


Abbildung 29: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für SB19 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ – Rezeptoren; konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch Koapplikation einer GABA EC_{3-10} und SB19 in den gezeigten Konzentrationen. Strichlierte Linie zeigt die Modulation von I_{GABA} durch VA. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert $\pm$ S.E.M von mind. 3 verschiedenen Experimenten von 2 verschiedenen Fröschen dar. **(B)** Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von SB19.

Wie in Abbildung 29 gezeigt, führte die Applikation des Derivates SB19 zu einer Potenzierung von I_{GABA} . Erste Effekte traten bei Konzentrationen $> 30 \mu\text{M}$ auf. Die maximale Potenzierung lag bei $711 \pm 73\%$ ($n=4$) die EC_{50} lag bei $83.6 \pm 22.6 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 29 B für die Modulation von I_{GABA} durch SB19)

Die Potenzierung von I_{GABA} war vergleichbar mit der durch VA, während die EC_{50} aber deutlich höher lag (siehe Tabelle 2).

Substanz	EC_{50} -Wert [μM]	Maximale Stimulation [%]
Valerensäure	23.2 ± 10.1	567 ± 170
SB27	43.3 ± 39.8	46 ± 18
SB33	209.2 ± 60.0	1086 ± 191
SB29	27.3 ± 3.8	670 ± 23
SB30	104.8 ± 32.6	512 ± 74
SB19	83.6 ± 22.6	711 ± 73

Tabelle 2: Zusammenfassung der maximalen Stimulation und der EC_{50} -Werte der getesteten Substanzen

8 Diskussion

Als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS spielt GABA eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen Zuständen wie unter anderem der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Kontrolle von Emotionen, sowie des Muskeltonus (Möhler, 2006; Möhler, 2011; Sieghart, 1995). Fehlfunktionen des GABAergen Systems sind daher eng mit verschiedenen Krankheitsbildern wie Angst- und Schlafstörungen, Muskelspasmen und Epilepsie verknüpft (Rudolph et al, 2001; Sieghart et al, 1999). Die am häufigsten klinisch verwendeten Liganden von GABA_A-Rezeptoren sind Benzodiazepine. Sie können effizient in der Therapie der oben erwähnten Erkrankungen eingesetzt werden, weisen aber – da sie relativ unspezifisch mit allen GABA_A-Rezeptoren interagieren, welche eine Benzodiazepinbindungsstelle besitzen – ein breites Wirkspektrum auf. Einige dieser Wirkungen sind dabei durchaus erwünscht, während andere wie z.B. die Sedierung in der Therapie von Angststörung sehr problematisch zu beurteilen ist. Daneben besitzen Benzodiazepine ein hohes Missbrauchs- und Abhängigkeitspotential (Allison & Pratt, 2003; Gielen et al, 2012). Da in den letzten Jahren neue Informationen über die Lokalisation bzw. Pharmakologie einzelner GABA_A-Rezeptor Subtypen gewonnen werden konnten, versucht man momentan Liganden zu finden, die spezifisch mit einem Rezeptorsubtyp interagieren. Dadurch erhofft man sich, dass das Wirkspektrum derart eingeschränkt wird, dass nur noch die gewünschte Wirkung ausgelöst werden kann. So erhofft man sich beispielsweise neue anxiolytisch wirkenden Arzneistoffe, denen die typische sedierende Wirkkomponente fehlt (Rudolph et al, 2001; Rudolph & Möhler, 2006).

Am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien, wo ich meine Diplomarbeit durchgeführt habe, konnte ebenfalls in den letzten Jahren ein solcher Subtyp-selektiver Ligand aus dem Baldrian (Valerensäure VA) identifiziert werden (Khom et al, 2007). VA interagiert ausschließlich mit GABA_A Rezeptoren mit $\beta_{2/3}$ Untereinheiten. Daher vermutet man, dass VA *in vivo* anxiolytische Effekte ohne Sedierung auslöst. VA zeigt jedoch niedrige Affinität zum Rezeptor. Daher wurden bereits zahlreiche Naturstoffderivate synthetisiert, um Affinität, Effektivität und Selektivität zu erhöhen.

Ich sollte im Rahmen meiner Diplomarbeit die Modulation von I_{GABA} durch einige dieser Derivate untersuchen.

In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass die Derivatisierung der Carboxylfunktion zu neuen Naturstoffderivaten führt, die effizienter sind. Dabei erwies ein substituiertes VA-Amid als effektivsten und potentesten unter den Derivaten. Dieses zeigte nicht nur eine hohe Selektivität für $\beta_{2/3}$ -Rezeptoren, sondern hatte auch eine höhere Affinität zu GABA_A Rezeptoren als VA selbst. Allerdings wirkte VA-Amid nicht nur anxiolytisch, sondern in hohen Dosen auch sedierend (Khom et al, 2010).

Daher sollte ich eine weitere Serie von Naturstoffderivaten charakterisieren, welche an anderen Stellen modifiziert sind. Dafür habe ich GABA_A-Rezeptoren vom $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ -Subtyp in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} durch 6 neue Derivate (SB19, SB27, SB29, SB30, SB33, SB34) untersucht.

Durch meine Messungen konnte ich zeigen, dass weitere Derivatisierung der VA in neuartigen GABA_A-Modulatoren resultiert. Leider zeigte keines der Derivate, das ich untersucht habe, eine niedrigere EC_{50} als die der VA; einzig die EC_{50} von SB29 war vergleichbar mit der von VA. Alle anderen Derivate waren deutlich weniger potent. Im Gegensatz dazu war die Potenzierung von SB29, SB30 und SB19 vergleichbar mit der der VA, SB33 führte sogar zu einer beinahe doppelt so starken Stimulation von I_{GABA} . SB27 war kaum noch wirksam (etwa 12-fach reduzierte Potenzierung), während SB34 keinen Effekt zeigte.

Meine Ergebnisse können zur Erstellung einer ersten Struktur-Wirkungsbeziehung verwendet werden. Durch sie können Strukturelemente identifiziert werden, die für die Wirksamkeit der Derivate von Bedeutung sind bzw. auch jene Strukturelemente, die für neue Derivate vermieden werden sollten. Durch diese Ansatzpunkte können in weiterführenden Untersuchungen neuere und besser wirksame Liganden entwickelt werden.

Weiters sollte im nächsten Schritt auch die β -Selektivität der wirksameren Derivate untersucht werden. Derivatisierung und Strukturmodifikation können nämlich neben der erwünschten gesteigerten Wirksamkeit natürlich auch in veränderter Untereinheitenselektivität resultieren.

Schlussendlich sollten die selektiven Liganden noch im Tiermodell auf mögliche anxiolytische bzw. sedierende Wirkung untersucht werden.

Zusammengefasst lässt sich somit sagen, dass im Rahmen meiner Diplomarbeit 5 weitere, neue GABA_A-Rezeptor-Liganden basierend auf der Struktur von VA identifiziert wurden, wobei eines der Derivate deutlich effizienter als VA war.

9 Literaturverzeichnis

Akk G, Steinbach JH (2011) Structural studies of the actions of anesthetic drugs on the γ -aminobutyric acid type A receptor. *Anesthesiology* **115**: 1338-1348

Aktories K, Forth W (2010) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Vol. XXIV, 1224 S., 10., überarbeitete. Auflage., 2. edn. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Allison C, Pratt JA (2003) Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol Ther* **98**: 171-195

Baburin I, Beyl S, Hering S (2006) Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch* **453**: 117-123

Baburin I, Khom S, Timin E, Hohaus A, Sieghart W, Hering S (2008) Estimating the efficiency of benzodiazepines on GABA(A) receptors comprising gamma1 or gamma2 subunits. *Br J Pharmacol* **155**: 424-433

Baker C, Sturt BL, Bamber BA (2010) Multiple roles for the first transmembrane domain of GABAA receptor subunits in neurosteroid modulation and spontaneous channel activity. *Neurosci Lett* **473**: 242-247

Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, Bandelow B, Bond A, Davidson JR, den Boer JA, Fineberg NA, Knapp M, Scott J, Wittchen HU, Psychopharmacology BAF (2005) Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol* **19**: 567-596

Bali M, Jansen M, Akabas MH (2009) GABA-induced intersubunit conformational movement in the GABAA receptor alpha 1M1-beta 2M3 transmembrane subunit interface: experimental basis for homology modeling of an intravenous anesthetic binding site. *J Neurosci* **29**: 3083-3092

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* **50**: 291-313

Baumann SW, Baur R, Sigel E (2001) Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* **276**: 36275-36280

Baur R, Kaur KH, Sigel E (2009) Structure of alpha6 beta3 delta GABA(A) receptors and their lack of ethanol sensitivity. *J Neurochem* **111**: 1172-1181

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* **87**: 1215-1284

Berezhnoy D, Nyfeler Y, Gonthier A, Schwob H, Goeldner M, Sigel E (2004) On the benzodiazepine binding pocket in GABAA receptors. *J Biol Chem* **279**: 3160-3168

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84**: 835-867

Bianchi L, Driscoll M (2006) Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook*: 1-16

Boileau AJ, Evers AR, Davis AF, Czajkowski C (1999) Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci* **19**: 4847-4854

Bossi E, Fabbrini MS, Ceriotti A (2007) Exogenous protein expression in *Xenopus* oocytes: basic procedures. *Methods Mol Biol* **375**: 107-131

Boulineau N, Baur R, Minier F, Sigel E (2005) Consequence of the presence of two different beta subunit isoforms in a GABA(A) receptor. *J Neurochem* **95**: 1724-1731

Bowser DN, Wagner DA, Czajkowski C, Cromer BA, Parker MW, Wallace RH, Harkin LA, Mulley JC, Marini C, Berkovic SF, Williams DA, Jones MV, Petrou S (2002) Altered kinetics and benzodiazepine sensitivity of a GABAA receptor subunit mutation [gamma 2(R43Q)] found in human epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15170-15175

Buhr A, Bianchi MT, Baur R, Courtet P, Pignay V, Boulenger JP, Gallati S, Hinkle DJ, Macdonald RL, Sigel E (2002) Functional characterization of the new human GABA(A) receptor mutation beta3(R192H). *Hum Genet* **111**: 154-160

Campagna-Slater V, Weaver DF (2007) Anaesthetic binding sites for etomidate and propofol on a GABAA receptor model. *Neurosci Lett* **418**: 28-33

Chalifoux JR, Carter AG (2011) GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr Opin Neurobiol* **21**: 339-344

Chattopadhyaya B, Cristo GD (2012) GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders. *Front Psychiatry* **3**: 51

Cherubini E, Ben-Ari Y (2011) The immature brain needs GABA to be excited and hyper-excited. *J Physiol* **589**: 2655-2656

Cossette P L-TP, Rouleau GA. (2012) Mutated GABA (A) receptor subunits in idiopathic generalized epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition, Center for Excellence in Neuromics of University of Montreal, p. 21.

Couve A, Moss SJ, Pangalos MN (2000) GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* **16**: 296-312

Coyne L, Su J, Patten D, Halliwell RF (2007) Characterization of the interaction between fenamates and hippocampal neuron GABA(A) receptors. *Neurochem Int* **51**: 440-446

Dar MS, Wooles WR (1985) GABA mediation of the central effects of acute and chronic ethanol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **22**: 77-84

Davies M (2003) The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* **28**: 263-274

Dawson GR, Collinson N, Attack JR (2005) Development of subtype selective GABAA modulators. *CNS Spectr* **10**: 21-27

DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW (1998) Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci* **18**: 8505-8514

Drafts BC, Fisher JL (2006) Identification of structures within GABAA receptor alpha subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 1094-1101

Feng HJ, Bianchi MT, Macdonald RL (2004) Pentobarbital differentially modulates alpha1beta3delta and alpha1beta3gamma2L GABAA receptor currents. *Mol Pharmacol* **66**: 988-1003

Gassmann M, Bettler B (2012) Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci* **13**: 380-394

Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H (2007) GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* **30**: 1-8

Gielen MC, Lumb MJ, Smart TG (2012) Benzodiazepines modulate GABAA receptors by regulating the preactivation step after GABA binding. *J Neurosci* **32**: 5707-5715

Green AR, Misra A, Murray TK, Snape MF, Cross AJ (1996) A behavioural and neurochemical study in rats of the pharmacology of loreclezole, a novel allosteric modulator of the GABAA receptor. *Neuropharmacology* **35**: 1243-1250

Groves JO, Guscott MR, Hallett DJ, Rosahl TW, Pike A, Davies A, Wafford KA, Reynolds DS (2006) The role of GABA β 2 subunit-containing receptors in mediating the anticonvulsant and sedative effects of loreclezole. *Eur J Neurosci* **24**: 167-174

Guitchounts G, Stewart DS, Forman SA (2012) Two etomidate sites in α 1 β 2 γ 2 γ -aminobutyric acid type A receptors contribute equally and noncooperatively to modulation of channel gating. *Anesthesiology* **116**: 1235-1244

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**: 177-182

Guyon A, Cathala L, Paupardin-Tritsch D, Eugène D (2002) Furosemide modulation of GABA(A) receptors in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *Neuropharmacology* **43**: 750-763

Hall AC, Griffith TN, Tsikolia M, Kotey FO, Gill N, Humbert DJ, Watt EE, Yermolina YA, Goel S, El-Ghendy B, Hall CD (2011) Cyclohexanol analogues are positive modulators of GABA(A) receptor currents and act as general anaesthetics in vivo. *Eur J Pharmacol* **667**: 175-181

Hanchar HJ, Wallner M, Olsen RW (2004) Alcohol effects on gamma-aminobutyric acid type A receptors: are extrasynaptic receptors the answer? *Life Sci* **76**: 1-8

Hanson SM, Czajkowski C (2008) Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. *J Neurosci* **28**: 3490-3499

Hanson SM, Morlock EV, Satyshur KA, Czajkowski C (2008) Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the gamma-aminobutyric acid type-A (GABAA) receptor are different. *J Med Chem* **51**: 7243-7252

Harris RA (1990) Alcohol sensitivity. *Nature* **348**: 589

Hauser WA (1994) The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia* **35 Suppl 2**: S1-6

Herring BE, McMillan K, Pike CM, Marks J, Fox AP, Xie Z (2011) Etomidate and propofol inhibit the neurotransmitter release machinery at different sites. *J Physiol* **589**: 1103-1115

Hevers W, Lüddens H (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**: 35-86

Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**: 486-489

Hosie AM, Wilkins ME, Smart TG (2007) Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* **116**: 7-19

Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* **9**: 331-343

Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, Harrison NL (2003) Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* **421**: 272-275

Kash TL, Trudell JR, Harrison NL (2004) Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochem Soc Trans* **32**: 540-546

Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S (2007) Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* **53**: 178-187

Khom S, Baburin I, Timin EN, Hohaus A, Sieghart W, Hering S (2006) Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits. *Mol Pharmacol* **69**: 640-649

Khom S, Strommer B, Ramharter J, Schwarz T, Schwarzer C, Erker T, Ecker GF, Mulzer J, Hering S (2010) Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *Br J Pharmacol* **161**: 65-78

Kim BG, Cho JH, Choi IS, Lee MG, Jang IS (2011) Modulation of presynaptic GABA(A) receptors by endogenous neurosteroids. *Br J Pharmacol* **164**: 1698-1710

Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S (2005) *Physiologie*, Vol. XIII, 930 S., 5. Auflage edn. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Kloda JH, Czajkowski C (2007) Agonist-, antagonist-, and benzodiazepine-induced structural changes in the alpha1 Met113-Leu132 region of the GABAA receptor. *Mol Pharmacol* **71**: 483-493

Korpi ER, Gründer G, Lüddens H (2002) Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol* **67**: 113-159

Korpi ER, Lüddens H (1997) Furosemide interactions with brain GABAA receptors. *Br J Pharmacol* **120**: 741-748

Kotani N, Akaike N (2012) The effects of volatile anesthetics on synaptic and extrasynaptic GABA-induced neurotransmission. *Brain Res Bull*

Liljequist S, Engel J (1982) Effects of GABAergic agonists and antagonists on various ethanol-induced behavioral changes. *Psychopharmacology (Berl)* **78**: 71-75

Lobo IA, Harris RA (2008) GABA(A) receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* **90**: 90-94

Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüdliche T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **290**: 131-134

Lüscher BP, Baur R, Goeldner M, Sigel E (2012) Influence of GABA(A) receptor α subunit isoforms on the benzodiazepine binding site. *PLoS One* **7**: e42101

Macdonald RL (2001) GABAA Receptor Defects Can Cause Epilepsy. *Epilepsy Curr* **1**: 74

Macdonald RL, Gallagher MJ, Feng HJ, Kang J (2004) GABA(A) receptor epilepsy mutations. *Biochem Pharmacol* **68**: 1497-1506

Macdonald RL, Kang JQ (2009) Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABAA receptor subunit mutations. *Epilepsy Curr* **9**: 18-23

Macdonald RL, Kang JQ (2012) mRNA surveillance and endoplasmic reticulum quality control processes alter biogenesis of mutant GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *Epilepsia* **53 Suppl 9**: 59-70

Macdonald RL, Kang JQ, Gallagher MJ (2010) Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol* **588**: 1861-1869

Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* **17**: 569-602

Marowsky A, Rudolph U, Fritschy JM, Arand M (2012) Tonic Inhibition in Principal Cells of the Amygdala: A Central Role for $\alpha 3$ Subunit-Containing GABAA Receptors. *J Neurosci* **32**: 8611-8619

Mayer G FI, Fischer J (ed) (2010) *Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1-32pp

McKernan RM, Whiting PJ (1996) Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* **19**: 139-143

Moraga-Cid G, Yevenes GE, Schmalzing G, Peoples RW, Aguayo LG (2011) A Single phenylalanine residue in the main intracellular loop of $\alpha 1$ γ -aminobutyric acid type A and glycine receptors influences their sensitivity to propofol. *Anesthesiology* **115**: 464-473

Möhler H (2006) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* **326**: 505-516

- Möhler H (2009) Role of GABAA receptors in cognition. *Biochem Soc Trans* **37**: 1328-1333
- Möhler H (2011) The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology* **60**: 1042-1049
- Möhler H (2012) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* **62**: 42-53
- Möhler H, Crestani F, Rudolph U (2001) GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **1**: 22-25
- Newell JG, Czajkowski C (2003) The GABAA receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *J Biol Chem* **278**: 13166-13172
- Nutt D, Adinoff B, Linnoila M (1989) Benzodiazepines in the treatment of alcoholism. *Recent Dev Alcohol* **7**: 283-313
- Oakley S, Vedula LS, Bu W, Meng QC, Xi J, Liu R, Eckenhooff RG, Loll PJ (2012) Recognition of anesthetic barbiturates by a protein binding site: a high resolution structural analysis. *PLoS One* **7**: e32070
- Ogawa SK, Tanaka E, Shin MC, Kotani N, Akaike N (2011) Volatile anesthetic effects on isolated GABA synapses and extrasynaptic receptors. *Neuropharmacology* **60**: 701-710
- Olsen RW, Hancher HJ, Meera P, Wallner M (2007) GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol* **41**: 201-209
- Olsen RW, Sieghart W (2008) 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**: 243-260
- Ong J, Kerr DI (2005) Clinical potential of GABAB receptor modulators. *CNS Drug Rev* **11**: 317-334
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**: 715-727
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**: 815-850
- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int*

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* **401**: 796-800

Rudolph U, Crestani F, Möhler H (2001) GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 188-194

Rudolph U, Möhler H (2006) GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* **6**: 18-23

Schaerer MT, Buhr A, Baur R, Sigel E (1998) Amino acid residue 200 on the alpha1 subunit of GABA(A) receptors affects the interaction with selected benzodiazepine binding site ligands. *Eur J Pharmacol* **354**: 283-287

Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, Trojanova J, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* **465**: 231-235

Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**: 181-234

Sieghart W (2006) Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Adv Pharmacol* **54**: 231-263

Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Höger H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int* **34**: 379-385

Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M (2012) A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha(+)$ $\beta(-)$ interface. *Br J Pharmacol* **166**: 476-485

Sigel E, Buhr A (1997) The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 425-429

Sigel E, Mamalaki C, Barnard EA (1982) Isolation of a GABA receptor from bovine brain using a benzodiazepine affinity column. *FEBS Lett* **147**: 45-48

Sigel E, Schaerer MT, Buhr A, Baur R (1998) The benzodiazepine binding pocket of recombinant alpha1beta2gamma2 gamma-aminobutyric acidA receptors: relative orientation of ligands and amino acid side chains. *Mol Pharmacol* **54**: 1097-1105

Sigel E, Steinmann ME (2012) Structure, Function and Modulation of GABAA receptors. *J Biol Chem*

Smith AJ, Oxley B, Malpas S, Pillai GV, Simpson PB (2004) Compounds exhibiting selective efficacy for different beta subunits of human recombinant gamma-aminobutyric acid A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 601-609

Tammaro P, Shimomura K, Proks P (2008) *Xenopus* oocytes as a heterologous expression system for studying ion channels with the patch-clamp technique. *Methods Mol Biol* **491**: 127-139

Thompson SA, Arden SA, Marshall G, Wingrove PB, Whiting PJ, Wafford KA (1999) Residues in transmembrane domains I and II determine gamma-aminobutyric acid type AA receptor subtype-selective antagonism by furosemide. *Mol Pharmacol* **55**: 993-999

Tretter V, Moss SJ (2008) GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci* **1**: 7

Ulrich D, Bettler B (2007) GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* **17**: 298-303

Venkatachalan SP, Czajkowski C (2012) Structural link between γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor agonist binding site and inner β -sheet governs channel activation and allosteric drug modulation. *J Biol Chem* **287**: 6714-6724

Vithlani M, Terunuma M, Moss SJ (2011) The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol Rev* **91**: 1009-1022

Wagner DA, Czajkowski C (2001) Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* **21**: 67-74

Walker MC KD. (2012) Tonic GABAA Receptor-mediated signaling in epilepsy. p. 13.

Wallner M, Hancher HJ, Olsen RW (2003) 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**: 15218-15223

Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Whiting PJ (1994) 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**: 4569-4573

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Sibel Kaya
Geburtsdatum	19. Februar 1988
Geburtsort	Wien
Staatsangehörigkeit	Österreich
Familienstand	ledig

Ausbildung:

1994 - 1998:	Volksschule Wien V
1998 – 2006:	GRG V Joseph Haydn
WS 2006	Studium der Medizin (Medizinische Universität Wien)
SS 2007 - lfd	Studium der Pharmazie (Universität Wien)

Berufliche Tätigkeiten:

04/2007 – 01/2008	Schütz Marketing Services
08/2008	Ferialpraktikum in der Marchfeldapotheke, Deutsch Wagram
Seit 09/2008	geringfügige Beschäftigung in der Marchfeldapotheke, Deutsch Wagram

Sprachkenntnisse:

Türkisch - Muttersprache

Deutsch - fließend

Englisch in Wort & Schrift – Maturaniveau

Französisch in Wort & Schrift - Maturaniveau