universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der Subtyp-selektiven Interaktion von ausgewählten Naturstoffderivaten mit $GABA_A$ Rezeptoren

Verfasserin

Lisa Holler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Pharmazie
Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Steffen Hering

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich recht herzlich bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für das Ermöglichen des Verfassens meiner Diplomarbeit, das Erlernen von wissenschaftlichen Praktiken im Bereich der Pharmakologie und Toxikologie und die gute Betreuung bedanken.

Großer Dank geht auch an Herrn Univ. Prof. Dr. Dipl. Ing. Marko Mihovilovic und Dipl.Ing. Maximilian Haider von der Techischen Universität Wien für die Synthese der zu untersuchenden Derivate.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt meiner Betreuerin Dr. Mag. Sophia Khom, deren Hilfestellung und Geduld mir bei meiner Arbeit wirklich sehr geholfen haben. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Mag. Angela Schöffmann und Mag. Denise Luger, die mich ebenfalls ständig unterstützt haben, bedanken.

Dr. Mag. Igor Baburin möchte ich für seine Hilfe bei jeglichen technischen Problemen danken.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Dipl. Ing. (FH) Anette Hohaus und Ing. Christina Rinne für die Bereitstellung der cRNA.

Den größten Dank möchte ich jedoch meiner Familie aussprechen, ohne deren Unterstützung ich mein Pharmaziestudium wohl nie so schnell zu Ende bringen hätte können. DANKE!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung 2

Inhaltsverzeichnis 4

Einleitung 6

1. Das GABAerge System 6

1.1. γ - Aminobuttersäure - Funktion 6

1.2. Metabolismus 6

1.3. Wirkmechanismus 7

2. Physiologische Rolle der $GABA_A$ Rezeptoren 10

2.1. Struktur des $GABA_A$ Rezeptors 10

2.2. Lokalisation 12

2.3. Die GABA Bindungsstelle 12

2.4. Untereinheiten 14

2.5. Funktion der einzelnen $GABA_A$ Rezeptor Untereinheiten 16

2.5.1. α_1 Untereinheit 16

2.5.2. α_2 Untereinheit 17

2.5.3. α_3 Untereinheit 18

2.5.4. α_5 Untereinheit 18

2.5.5. β Untereinheiten 19

2.5.6. γ Untereinheiten 20

2.5.7. δ Untereinheit 20

2.5.8. ρ Untereinheit und der $GABA_{a0r}$ Rezeptor 20

2.5.9. Lokalisation der verschiedenen Untereinheiten im Gehirn 21

2.6. Gating 23

3. $GABA_B$ Rezeptor 26

4. Modulatoren 28

4.1. Benzodiazepine 28

4.2. Barbiturate 29

4.3. Anästhetika 31

4.4. Neurosteroide 33

4.5. Alkohol 36

4.6. Furosemid 37

4.7. Loreclezol 38

5. Erkrankungen ... 40
5.1. Angststörungen und Depression ... 40
5.2. Schlafstörungen ... 40
5.3. Epilepsie ... 41
5.4. Schizophrenie ... 44
6. Methoden ... 46
6.1. Oozytenpräparation ... 46
6.2. Vorbereitung der cRNA ... 46
6.3. Injektion der cRNA ... 47
6.4. Messlösungen ... 47
6.5. 2 Elektrodenspannungsklemmtechnik ... 47
6.6. Perfusionssystem ... 48
7. Problemstellung & Zielsetzung ... 50
8. Ergebnisse ... 52
8.1. Erstellung von GABA-Konzentrationswirkungskurven ... 52
8.2. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch VA ... 55
8.3. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch VA-26 ... 57
8.4. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch VA-27 ... 59
8.5. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch VA-29 ... 61
8.6. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch VA-30 ... 63
8.7. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch VA-31 ... 65
8.8. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch VA-32 ... 67
9. Diskussion ... 70
Zusammenfassung ... 73
Abstract ... 75
Quellenverzeichnis ... 77
Lebenslauf ... 89

Einleitung

1. Das GABAerge System

1.1. γ - Aminobuttersäure - Funktion

γ - Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Säugetiere (Sieghart und Sperk, 2002; Lambert, 2007). GABA kommt hauptsächlich in Neuronen des Gehirns und im Rückenmark vor (Johnston, 1996). 25-45% aller Neuronen im ZNS sind vermutlich GABAerg (Li und Xu, 2008; Rudolph und Knoflach, 2011). GABA aktiviert 2 verschiedene Klassen von Rezeptoren: GABA Typ A ($GABA_A$) und GABA Typ B ($GABA_B$) Rezeptoren. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden sie in ionotrope und metabotrope Rezeptoren eingeteilt. $GABA_A$ Rezeptoren sind ionotrop, während $GABA_B$ Rezeptoren zu den metabotropen Rezeptoren zählen (Chebib und Johnston, 1999; Smith et al., 2001).

$GABA_A$ Rezeptoren sind das molekulare Ziel vieler neuroaktiver und therapeutisch wichtiger Substanzen. Dazu zählen unter anderem Benzodiazepine, Barbiturate, Steroide, Alkohol und Anästhetika (Möhler et al., 2001). Durch Interaktion dieser Liganden mit ihren spezifischen Bindungsstellen am $GABA_A$ Rezeptor steigt die neuronale Hemmung an GABAergen Synapsen, wodurch die anxiolytische, sedierende, hypnotische und anästhesierende Wirkung dieser Substanzen erklärt werden kann (Lambert, 2007).

1.2. Metabolismus

GABA wird in den Neuronen durch Decarboxylierung von Glutamat durch die Glutamatdecarboxylase (GAD), von der 2 Isoenzyme GAD65 und GAD 67 bekannt sind, synthetisiert (Abbildung 1) (Owens und Kriegstein, 2002).

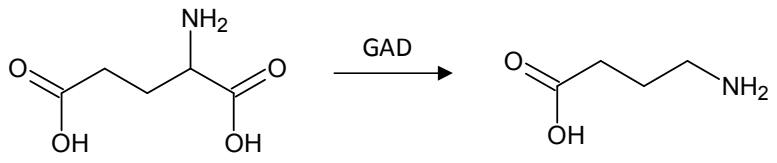

Abbildung 1: Synthese von GABA aus Glutamat

GABA wird anschließend über einen vesikulären GABA Transporter (VGAT) in Vesikel aufgenommen und über Calcium-vermittelte Exocytose wieder freigesetzt (Tillakaratne et al., 1995; Owens and Kriegstein, 2002). Ungebundene GABA wird über spezielle Na^+/Cl^- - abhängige Transporter wieder in die Neuronen aufgenommen, wo sie über mehrere Schritte durch die GABA-Transaminase (GABA-T) und Succinatsemialdehyddehydrogenase (SSADH) zu Succinat metabolisiert wird (Abbildung 2) (Petroff, 2002; Li und Xu, 2008).

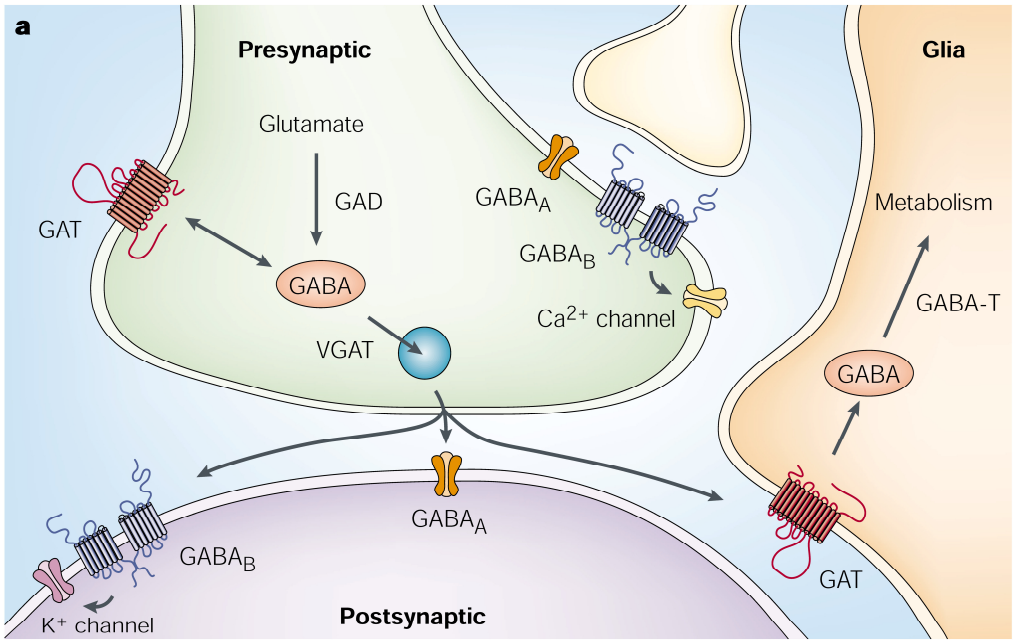

Abbildung 2: Schematisches Darstellung einer GABAergen Synapse (Owens und Kriegstein, 2002)

1.3. Wirkmechanismus

GABA bindet postsynaptisch an den $GABA_A$ oder präsynaptisch an den $GABA_B$ Rezeptor. Durch Bindung von GABA an den $GABA_A$ Rezeptor kommt es zur Öffnung eines

intrinsischen Ionenkanals, durch welchen Anionen über den bestehenden Konzentrationsgraduenten in die Zelle gelangen. Dieser ist primär durchlässig für Cl^- Ionen, jedoch können auch andere Anionen wie HCO_3^- durch die Pore fließen (Owens und Kriegstein, 2002; Herbison und Moenter, 2011), wobei die Durchlässigkeit für Cl^- aber zwei- bis fünfmal größer als jene für HCO_3^- ist (Fatima-Shad und Barry, 1993).
Der intrazelluläre Cl^- Spiegel steigt an, das Membranpotential wird negativer und es entsteht eine Hyperpolarisation, wodurch die Zelle nun weniger erregbar wird (Hevers und Lüddens, 1998; Smith et al., 2001; Olsen und Sieghart, 2008).

In frühen Entwicklungsstufen von Neuronen können auch $GABA_A$ Rezeptor-vermittelte Depolarisationen beobachtet werden. Dabei kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen und damit zu einem vermehrten Einstrom von Calciumionen in die Zelle, wodurch es zur Auslösung eines Aktionspotentials kommt. Diese exzitatorische GABAerge Aktivität wird darauf zurückgeführt, dass über einen limitierten, postnatalen Zeitraum die intrazelluläre Cl^- Konzentration höher ist als die extrazelluläre Cl^--Konzentration. Im Laufe der Entwicklung nimmt die intrazelluläre Cl^- Konzentration dann stufenweise ab (Ganguly et al., 2001; Owens und Kriegstein, 2002; Li und Xu, 2008).

2. Physiologische Rolle der $GABA_A$ Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, ist der $GABA_A$ Rezeptor der wichtigste inhibitorische Neurotransmitterrezeptor im Gehirn. 25-45% aller Synapsen im Gehirn sind GABAerg (Chapouthier, 2003). $GABA_A$ Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit des Gehirns, der Steuerung von Angst, haben Einfluss auf das Ess- und Trinkverhalten, den circadianen Rhythmus, die Wahrnehmung, das Erinnerungsvermögen und auf das Lernen (Sieghart und Sperk, 2002). Daher wirken Substanzen, welche die inhibitorische GABAerge Neurotransmission verstärken, unter anderem sedierend-hypnotisch, anxiolytisch oder muskelrelaxierend (Chapouthier, 2003). Dadurch werden $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren auch häufig in der Therapie von Krankheiten wie zum Beispiel Angststörungen, Panikattacken, Schlafstörungen oder Epilepsie eingesetzt. Daneben greifen auch Injektions- und Inhalationsanästhetika, Neurosteroide oder Alkohol an $GABA_A$ Rezeptoren an (Rudolph et al., 2001; Möhler, 2006; Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

2.1. Struktur des $GABA_A$ Rezeptors

$GABA_A$ Rezeptoren gehören zu der sogenannten Cys-loop Superfamilie, zu der auch nicotinerge Acetylcholin-, Serotonin Subtyp 3- oder Glycin- Rezeptoren gezählt werden (Lüddens et al., 1995; Olsen und Sieghart, 2008). Es handelt sich hierbei um Rezeptoren, die durch einen extrazellulär bindenden Agonisten aktiviert werden. Der Agonist bindet an eine für ihn vorgesehene Bindungsstelle, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt (siehe Kapitel 2.6. Gating). Dadurch kommt es in weiterer Folge zur Öffnung des Ionenkanals. Es öffnet sich somit eine Pore in der Membran, durch die sich Ionen entlang des Ionengradienten bewegen (Connolly und Wafford, 2004). Alle Rezeptoren der Cys-loop Superfamilie bestehen aus 5 Untereinheiten, die einen ionenselektiven Kanal bilden. Sie weisen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von ca. 30% auf. Die Ähnlichkeit bezüglich Sekundär- und Tertiärstruktur ist sogar noch größer (Olsen und Sieghart, 2008).

Ebenso wie die anderen Rezeptoren der Cys-loop Familie bestehen auch $GABA_A$ Rezeptoren aus 5 Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine Länge von

etwa 450 Aminosäureresten und ist topologisch gleich aufgebaut (Sigel und Steinmann, 2012): Jede Untereinheit besteht aus einer langen, extrazellulären, hydrophilen N-terminalen Region, welche den äußeren Teil des Rezeptors bildet, aus 4 transmembranären, α-helicalen Regionen (TM1-TM4) und einem kurzen, extrazellulären C-terminalen Ende. Die Pore selbst wird von den einzelnen 5 TM2 der Untereineheiten gebildet (Abbildung 3) (Olsen und Tobin, 1990; DeLorey und Olsen, 1992; Macdonald und Olsen, 1994).

Zwischen TM3 und TM4 befindet sich eine große, intrazelluläre Schleife, über welche verschiedene cytoplasmatische Proteine mit den $GABA_A$ Rezeptoren interagieren (Möhler, 2006; Sigel und Steinmann, 2012).

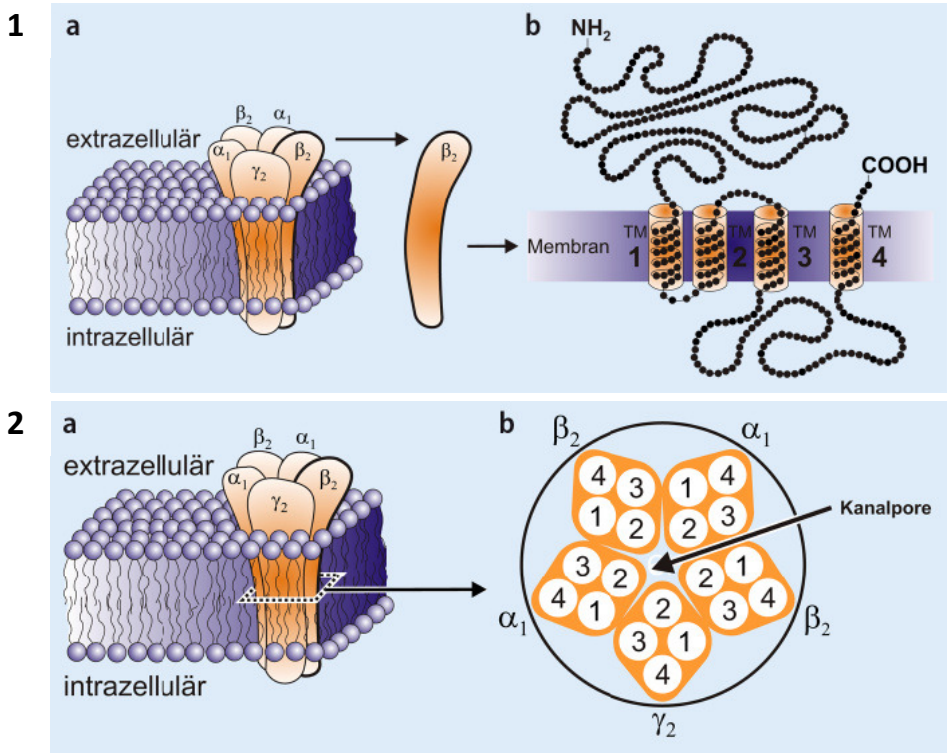

Abbildung 3: **1** und **2a)** schematische Darstellung des $GABA_A$ Rezeptor Pentamers in der Membran **1b)** Darstellung einer Rezeptoruntereinheit bestehend aus 4 transmembranären Segmenten **2b)** Querschnitt durch den Rezeptor zur Illustration der Porenbildung durch die 5 TM2 (Drexler et al., 2006)

2.2. Lokalisation

$GABA_A$ Rezeptoren werden hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert. Während manche der $GABA_A$ Rezeptoruntereinheiten im gesamten ZNS nachzuweisen sind, sind andere wiederum, wie zum Beispiel die α_6 Untereinheit, ausschließlich im Cerebellum (Kleinhirn) zu finden. ρ Untereinheiten werden primär in der Retina exprimiert. Außerhalb des ZNS wurden $GABA_A$ Rezeptoren auch noch in der Leber, der Lunge und auch im Immunsystem entdeckt (Sigel und Steinmann, 2012).

$GABA_A$ Rezeptoren können sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch und peri-synpatisch vorkommen. Während postsynaptische $GABA_A$ Rezeptoren die sogenannte phasische Inhibition vermitteln, sind extrasynaptisch vorkommende $GABA_A$ Rezeptoren für die sogenannte tonische Inhibition verantwortlich (Macdonald et al., 2004; Sieghart et al., 2012; Sigel und Steinmann, 2012). Postsynaptisch lokaliserte $GABA_A$ Rezeptoren beinhalten für gewöhnlich eine γ Untereinheit (Wang, 2011). Typische, extrasynaptisch vorkommende $GABA_A$ Rezeptoren sind beispielsweise aus $\alpha_5\beta\gamma_2$, $\alpha_4\beta\delta$ oder $\alpha_6\beta\delta$ Kombinationen aufgebaut (Sieghart et al., 2012). Vor allem die Anwesenheit einer δ Untereinheit ist ideal für die Vermittlung der tonischen Inhibition, da diese Rezeptoren besonders hohe Affinität für GABA besitzen und daher bereits von einer niedrigen GABA-Konzentration (submikromolar; 0,3 µM), wie sie im extrazellulärem Raum vorherrscht, aktiviert werden können (Farrant and Nusser, 2005; Belelli et al., 2009; Kotani and Akaike, 2012; Czyzewska and Mozrzymas, 2013).

2.3. Die GABA Bindungsstelle

$GABA_A$ Rezeptoren besitzten generell 2 Bindungsstellen für GABA, welche sich zwischen der β (β+-Seite) und α (α-Seite)- Untereinheiten befinden (siehe Abbildung 4; Ernst et al., 2003, 2005; Uusi-Oukari und Korpi, 2010; Sieghart et al., 2012).

Die Bindungstasche selbst wird von den Loops A, B und C der β- und durch die Loops D, E und F der α-Untereinheit gebildet (Boileau et al., 2002; Miller und Smart, 2010; Thompson et al., 2010).

Einige Aminosäuren, deren Anwesenheit essentiell für die GABA Bindung ist, konnten bereits identifiziert werden (Sigel und Buhr, 1997; Boileau et al., 2002; Newell und Czajkowski, 2003). Der Loop A ist Teil der β-Untereinheit im Bereich der Aminosäuren

Trp92 bis Asp101. In diesem Loop konnten Leu99 und Tyr97 als wesentlicher Bestandteil der GABA Bindungsstelle identifiziert werden (Boileau et al., 2002). Der Loop B beinhaltet die Aminosäuren Ile154 bis Asp163 auf der β-Untereinheit, wobei besonders Thr160 und Asp163 essentiell für die GABA Bindung sind. Der Loop C wird durch die Aminosäuresequenz Val199 bis Ser209 gebildet. Die Aminosäuren Ser204, Tyr205, Arg207 und Ser209 tragen direkt zur GABA Bindung bei, wogegen Phe200, Ser201, Thr202 und Gly203 zwar keine wichtigen Bindungsstellen darstellen, bei Mutation kommt es jedoch einem drastischen Senisitivitätsverlust gegenüber GABA (Wagner und Czajkowski, 2001; Boileau et al., 2002). Die Aminosäuresequenz Tyr59 bis Lys70 auf der α-Untereinheit bildet den Loop D. Hier tragen vor allem Phe64, Arg66 und Ser68 zur Bildung der GABA Bindungsstelle bei (Boileau et al., 1999). Der Loop E wird durch Met113 bis Leu132 gebildet, wobei sich die Aminosäuren Asn115, Leu117, The129 und Arg 131 als essentiell erwiesen haben (Kloda und Czajkowski, 2007). Ein Forscherteam um Newell und Czajkowski zeigte, dass auf dem Loop F der α1 Untereinheit vor allem die Aminosäurensequenz Pro174-Asp191 eine wichtige Rolle bei der Bindung von GABA einnimmt (näheres siehe Kapitel 2.6. Gating). Besonders die Aminosäuren Val178, Val180 und Asp183 erweisen sich hier als essentiell (Newell und Czajkowski, 2003).

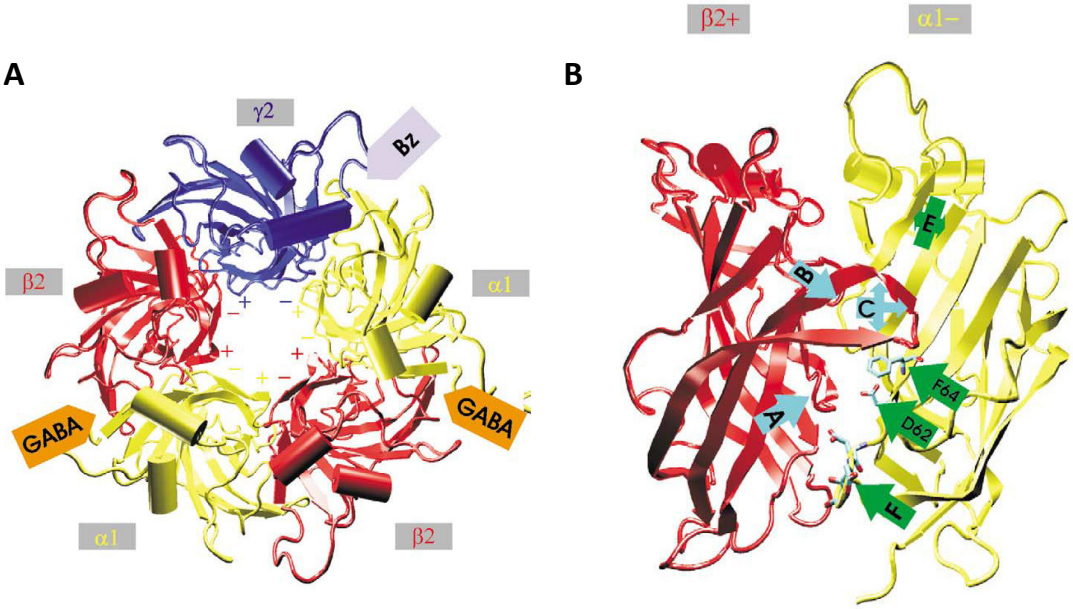

Abbildung 4: **(A)** Modell eines $GABA_A$ Rezeptors mit der GABA und Benzodiazepin Bindungsstelle gezeigt aus extrazellulärer Sicht **(B)** An der GABA Bindung beteiligte Loops und Aminosäuren am β^+ und α^- Interface (Ernst et al., 2003)

2.4. Untereinheiten

Die Komplexität der Pharmakologie der $GABA_A$ Rezeptoren begründet sich unter anderem in der Zahl der einzelnen Untereinheiten und der daraus resultierenden Zahl der theoretisch möglichen $GABA_A$ Rezeptor Subtypen. Ungeachtet der verschiedenen möglichen Spleißvariationen einzelner Untereinheiten, weiß man heute von der Existenz von 19 Genen im humanen Genom, die die einzelnen $GABA_A$ Rezeptor Untereinheiten kodieren (Simon et al., 2004; Sigel und Steinmann, 2012; Hörtnagl et al., 2013).

Folgende Untereinheiten sind bekannt: 6α, 3β, 3γ, 1δ, 1ε, 1π, 1θ und 3 ρ Untereinheiten, welche untereinander verwandt sind. So weisen α Untereinheiten untereinander 70%ige Sequenzidentität auf, während sie zu den β-Untereinheiten hingegen nur ca. 25%ige Ähnlichkeit besitzen (Smith und Olsen, 1995).

Basierend auf Zahl der vorkommenden Untereinheiten und der Tatsache, dass $GABA_A$ Rezeptoren immer aus 2α, 2β und einer variierenden Untereinheit aufgebaut sind, ergeben sich somit ca. 2000 verschiedenen $GABA_A$ Rezeptor Subtypen. Es zeigte sich jedoch, dass tatsächlich nur ungefähr 20 verschiedene $GABA_A$ Rezeptor Kombinationen auch *in vivo* vorkommen, wobei vor allem die Kombinationen $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ gefunden werden (Barnard et al., 1998 ; Möhler, 2006). Der am häufigsten exprimierte (<60%) $GABA_A$ Rezeptor Subtyp besteht aus den Untereinheiten $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, die gegen den Uhrzeigersinn angeordnet und in der Reihenfolge $\gamma_2\beta_2\alpha_1\beta_2\alpha_1$ auftreten (Abbildung 5) (Baumann et al., 2002; Rudolph und Knoflach, 2011; Sigel und Steinmann, 2012)

In mehreren Studien (Connolly et al., 1996; Tretter et al., 1997) wurde gezeigt, dass nur Rezeptoren bestehend $\alpha_x\beta_x\gamma$ oder $\alpha_x\beta_x$ Untereinheiten zur Zusammensetzung vollständiger $GABA_A$ Rezeptor Pentameren, welche letztendlich an der Zelloberfläche exprimiert werden, führen. Einzelne Untereinheiten, sowie $\alpha_x\gamma$ oder $\beta_x\gamma$ Kombinationen, werden im Endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten und wieder abgebaut (Taylor et al., 2000).

In einer Zelle können bis zu 8 verschiedene Untereinheiten vorkommen (Sigel und Steinmann, 2012).

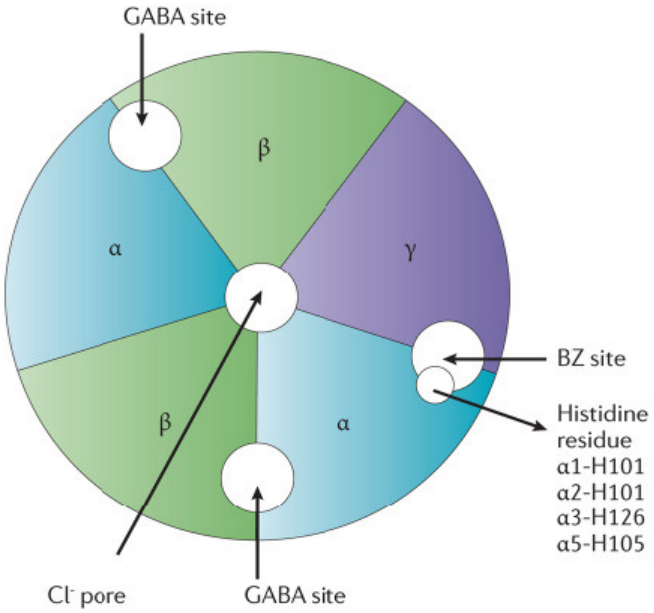

Abbildung 5: Aufbau eines typischen $GABA_A$ Rezeptor Komplexes mit seinen Bindungsstellen für GABA und Benzodiazepine (Rudolph und Knoflach, 2011)

$GABA_A$ Rezeptoren können beispielsweise aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Benzodiazepinen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. $GABA_A$ Rezeptoren, die α_1, α_2, α_3 oder α_5 Untereinheiten beinhalten, werden als so genannte Benzodiazepin-sensitive $GABA_A$ Rezeptoren bezeichnet. $GABA_A$ Rezeptoren mit α_4 oder α_6 Untereinheiten dagegen werden nicht von Benzodiazepinen moduliert. Diese α_4 oder α_6 Rezeptoren kommen jedoch nur in geringer Dichte im Gehirn vor (Sieghart und Sperk, 2002; Möhler, 2007; Reynolds, 2008). Ein wesentlicher Unterschied zwischen α_1, α_2, α_3, α_5 und den α_4 und α_6 ist eine Aminosäure in Position $\alpha_1$101 beziehungsweise homologer Position. Benzodiazepin-sensitive Untereinheiten (α_1, α_2, α_3, α_5) besitzen in dieser Position jeweils die Aminosäure Histidin, während in den Diazepam-insensitiven Untereinheiten anstelle von Histidin die Aminosäure Arginin gefunden wird (Löw et al., 2000; Möhler et al., 2001; Pym et al., 2005).

Weiters unterscheiden sich $GABA_A$ Rezeptoren, welche nur aus α und β Untereinheiten aufgebaut sind von αβγ Rezeptoren durch ihre fehlende Sensitivität für Zink und ebenfalls für Benzodiazepine (Baumann et al., 2001; Sieghart und Sperk, 2002; Möhler, 2007).

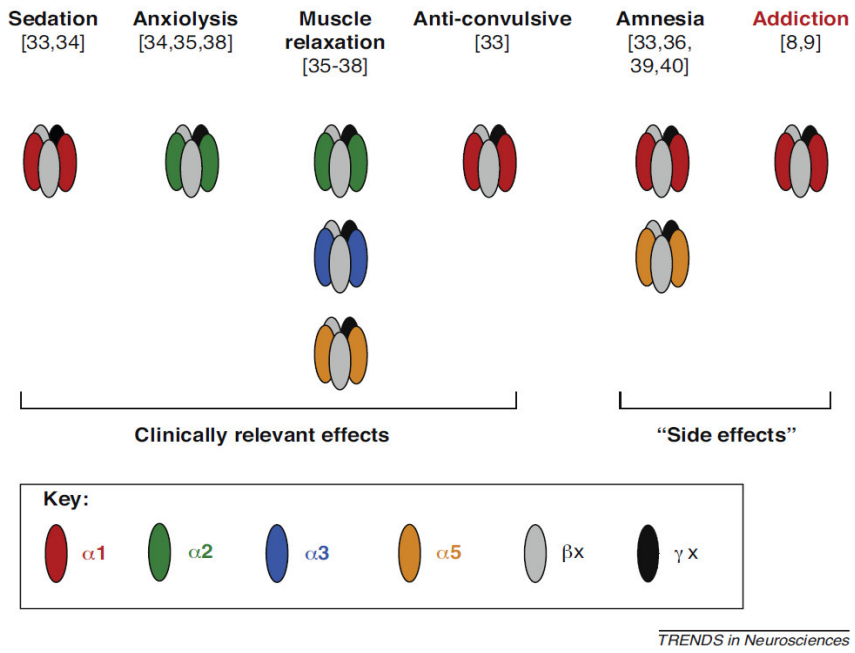

Abbildung 6: Rolle der spezifischen Untereinheiten des $GABA_A$ Rezeptors in der Vermittlung der unterschiedlichen Wirkqualitäten der Benzodiazepine (Tan et al., 2011)

2.5. Funktion der einzelnen $GABA_A$ Rezeptor Untereinheiten

2.5.1. α_1 Untereinheit

α_1 beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren stellen etwa 60% aller $GABA_A$ Rezeptoren dar (Rudolph und Möhler, 2006; Rudolph und Knoflach, 2011).

Durch eine Histidin zu Arginin Punktmutation (α_1His101Arg) konnte gezeigt werden, dass Mäusen durch diese Mutation Benzodiazepin-insensitiven α_1 Untereinheit die sedierende Wirkung und die Induktion der anterograd amnestischen Wirkung von Diazepam fehlte. Während die antikonvulsiven Eigenschaften von Diazepam ebenfalls reduziert waren, konnte jedoch keine Verminderung der anxiolytischen Wirkung beobachtet werden. Dadurch wurde festgestellt, dass Sedierung, anterograde Amnesie und zum Teil auch die antikonvulsive Wirkung von Diazepam über $GABA_A$ Rezeptoren, welche α_1 Untereinheiten inkorporieren, vermittelt wird (Reynolds et al., 2001; McKernan et al., 2000; Möhler, 2007; Rudolph und Knoflach, 2011). Eine weitere, jedoch

unterwünsche, Eigenschaft wird ebenfalls der α_1 Untereinheit zugeschrieben – die Abhängigkeitsentwicklung (Rudolph und Knoflach, 2011; Tan et al., 2011)

Weiters interagieren, die als Sedativa-Hypnotika eingesetzten, Z-drugs (Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle; Zolpidem, Zopiclon und Zaleplon) mit großer Selektivität mit α_1-inkorporierenden $GABA_A$ Rezeptoren, während sie drastisch verminderte Affinität für die anderen α Untereinheiten aufweisen. Zolpidem hat eine sehr hohe Affinität zu α_1 Untereinheit, eine 20fach niedrigere Affinität zu den α_2 und α_3 Untereinheiten und keine Affinität zu den α_5 beinhaltenden $GABA_A$ Rezeptoren (Reynolds, 2008; Rudolph und Knoflach, 2011).

Diese so genannten Z-drugs wurden früher aufgrund ihrer Selektivität als weitaus sicherere Hypnotika als Benzodiazepine angepriesen. Durch die spätere Erkenntnis, dass über Interaktion mit α_1-inkorporierende $GABA_A$ Rezeptoren auch Abhängigkeit vermitteltet wird, erwiesen sich die Z-Drugs jedoch als eine herbe Enttäuschung (Siriwardena et al., 2008).

2.5.2. α_2 Untereinheit

15-20% aller $GABA_A$ Rezeptoren beinhalten α_2 Untereinheiten (Engin et al., 2012). Sie werden vor allem in Gehirnbereichen gebildet, in denen keine oder nur eine geringe Zahl von α_1 hältigen Rezeptoren exprimiert werden. Sie kommen hauptsächlich in Kombination mit β_3 und γ_2 Untereinheiten vor (Möhler, 2007).

Durch die Entdeckung der Rolle der α_1 Untereinheit bezüglich der Vermittlung der sedierenden Wirkung von Benzodiazepinen, wurde die anxiolytische Wirkung ursprünglich den verbleibenden Benzodiazepin – sensitiven α Untereinheiten (α_2, α_3 und α_5) zugeschrieben.

Durch weitere Histidin zu Arginin Punktmutationen (α2His101Arg beziehungsweise α3His126Arg) konnte dies jedoch widerlegt werden: Bei Mutationen an His101 an der α_2 Untereinheit, an His126 an der α_3 Untereinheit und an His105 an der α_5 Untereinheit zeigte sich nur an α_2 mutierten Mäusen, dass die normalerweise durch Diazepam vermittelte Anxiolyse nicht eintrat (Möhler, 2007, 2011). Die Sedierung hingegen blieb aufrecht. Ebenso wurde bei höheren Dosen eine muskelrelaxierende Wirkung festgestellt. Somit kann die anxiolytische und zum Teil muskelrelaxierende Eigenschaft

der Benzodiazepine auf die α_2 Untereinheit rückgeschlossen werden (Möhler, 2007; Rudolph und Knoflach, 2011; Sieghart et al., 2012).

2.5.3. α_3 Untereinheit

Die α_3 Untereinheit wies diese Eigenschaften jedoch nicht auf, was bedeuten würde, dass die alleinige anxiolytische Wirkung nur auf die α_2 Untereinheit rückzuführen wäre. Bei Untersuchungen eines α_3 selektiven inversen Agonisten zeigten sich jedoch krampfauslösende und anxiogene Eigenschaften. Da diese Eigenschaften nur bei hoher Rezeptorbesetzung auftreten, klassische Benzodiazepine hingegen ihre Wirkung bereits in niedrigen Konzentrationen entfalten, wird die Hauptwirkung zu Anxiolyse der α_2 Untereinheit zugeschrieben. Der Beitrag der α_3 Untereinheit hat eher kleinere Bedeutung (Möhler, 2007, 2011).

Selektive α_3 Agonisten könnten jedoch in der Therapie von Schizophrenie eine Rolle übernehmen. In Studien wurde gezeigt, dass das dopaminerge System unter der inhibitorischen Kontrolle von α_3 beinhaltenden $GABA_A$ Rezeptoren steht, wodurch sich auch in α_3 mutierten Mäusen bestimmte psychische Auffälligkeiten, wie zum Beispiel Schizophrenie, zeigten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass selektive α_3 Agonisten auf diesem Gebiet vielleicht eine effektive Therapie darstellen könnten (Rudolph und Möhler, 2006; Rudolph und Knoflach, 2011).

Die α_3 sowie die α_2 Untereinheit sind bei intrathekal verabreichten Benzodazepinen verantwortlich für ihre schmerzlindernde Wirkung. Systemisch verabreichte Benzodiazepine weisen üblicherweise keine analgetischen Eigenschaften auf (Möhler, 2011).

2.5.4. α_5 Untereinheit

Etwa 5% aller $GABA_A$ Rezeptoren besitzen α_5-Untereinheiten primär in Kombination mit β_3 und γ_2 Untereinheiten (Möhler, 2007; Engin et al., 2012).

α_5 beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren sind aufgrund ihrer auf den Hippocampus beschränkten Expression, ein interessantes Arzneistofftarget basierend auf der bedeutsamen Rolle des Hippocampus beim Lernen und Gedächtnis (Whiting, 2003). α_5 Untereinheiten kommen hauptsächlich extrasynptisch vor (Möhler, 2007). Mäuse mit

mutierten α_5-Untereinheiten zeigten überraschenderweise bessere Leistungen bezüglich Lernen und Erinnerung. Inhibitoren der α_5 Untereinheit oder inverse α_5 Agonisten könnten daher als Neuroenhancer und ergänzend in der Therapie des Morbus Alzheimer eingesetzt werden (Chambers et al., 2003; Whiting, 2003; Dawson et al., 2006).

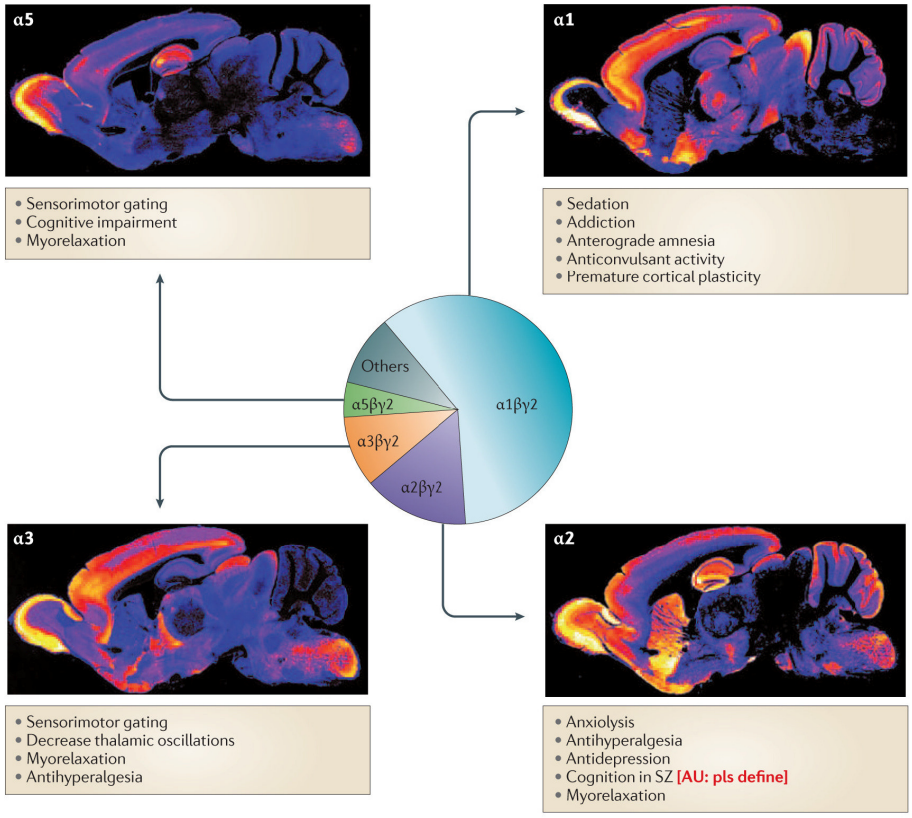

Abbildung 7: Pharmakologische Effekte und Verteilung der verschiedenen α Untereinheiten im Gehirn einer Maus (Rudolph und Knoflach, 2011)

2.5.5.β Untereinheiten

Injektionsanästhetika, wie Etomidat und Propofol, entfalten ihre Wirkung spezifisch durch β_2 und β_3 Untereinheinheiten beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren.

Hier wurde eine weitere Punktmutation (Asn265Ser) zur Untersuchung der Rolle der β_2 und β_3 Untereinheiten zu Etomidat/Propofol induzierter Anästhesie eingesetzt. Durch diese Mutation an β_2 verlor Etomidat seine sedierende Wirkung. An der β_3 Untereinheit führte diese Änderung des Asparaginrestes zu verminderter anästhetischer Wirkung. Somit konnte gezeigt werden, dass die anästhetische Wirkung von Anwesenheit einer β_3

Untereinheit und die sedierende Wirkung von Anwesenheit einer β_2 Untereinheit abhängig ist (Reynolds et al., 2003; Möhler, 2007; Olsen und Li, 2011; Yanovsky et al., 2011).

2.5.6. γ Untereinheiten

Wie bereits erwähnt, spielt die γ Untereinheit eine wesentliche Rolle für die Benzodiazepin-Sensitivität und kommt in etwa 80% aller $GABA_A$ Rezeptoren und stellt somit die am häufigsten exprimierte Untereinheit dar (Olsen und Sieghart, 2008).

γ_1 und γ_3 Untereinheiten werden weniger häufig exprimiert (Olsen und Sieghart, 2008). Während die Expression der γ_1 Untereinheit auf wenige Regionen des Gehirns wie die zentralen Nuclei der Amygdala, die Substantia nigra, das Pallidum oder das Striatum limitiert ist, wird die γ_3-Untereinheit diffus über das gesamte Gehirn verteilt gefunden (Pirker et al., 2000; Korpi et al., 2002). Aufgrund ihrer verminderten Affinität für klassische Benzodiazepin Liganden ist ihre *in vivo* noch nicht vollständig geklärt (Möhler, 2007).

Von der γ_2 Untereinheit gibt es verschiedene 2 Spleißvariationen, welche sich nur durch eine Sequenz von 8 Aminosäuren in der großen, intrazellulären Schleife zwischen TM3 und TM4 unterscheiden. Bei der γ_{2L} Untereinheit ist diese Sequenz vorhanden, während sie bei der γ_{2S} Untereinheit fehlt. Das Vorkommen der beiden Spleißvarianten γ_{2L} und γ_{2S} wird zwar für die unterscheidliche Regionen beschrieben (Olsen und Sieghart, 2008). Transgene Mäuse, welche nur die γ_{2S} Untereinheit exprimieren, Affinität zu Benzodiazepinen und erhöhte GABA-Sensitivität auf (Jin et al., 2004).

2.5.7.δ Untereinheit

Die δ Untereinheit kommt hauptsächlich extrasynaptisch in Kombination mit α_4 und α_6 Untereinheiten vor (Sieghart und Sperk, 2002; Möhler, 2006; Belelli et al., 2009). δ beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren sind Benzodiazepine-insensitiv.

2.5.8.ρ Untereinheit und der $GABA_{a0r}$ Rezeptor

Die ρ Untereinheit kommt nur in den, früher als GABA Typ C Rezeptoren ($GABA_C$ Rezeptor) bezeichneten, $GABA_{a0r}$ Rezeptor vor, welche ausschließlich in der Retina

exprimiert werden (Bormann, 2000; Enz, 2001; Olsen und Sieghart, 2008). Aufgrund ihrer Unempflindlichkeit gegenüber Biculline und anderen $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren, wie Benzodiazepinen, Barbituraten und Anästhetika, wurden sie früher als eine eigene Klasse von GABA-aktivierten Rezeptoren angesehen. Die Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion und die Möglichkeit der Kombination der ρ Untereinheit mit anderen Untereinheiten des $GABA_A$ Rezeptors führten schlussendlich zur Entscheidung des Nomenklaturkomittees der IUPHAR (International Union of Pharmacology) den $GABA_C$ Rezeptor mit seinen 3 ρ Untereinheiten künftig zur $GABA_A$ Rezeptorfamilie zu zählen. Die retinalen $GABA_A$ Rezeptoren erhielten die Bezeichnung $GABA_{A0r}$ Rezeptoren (Bormann, 2000; Olsen und Sieghart, 2008).

2.5.9. Lokalisation der verschiedenen Untereinheiten im Gehirn

Jede der $GABA_A$ Rezeptor Untereinheiten weist eine spezifische Verteilung im Gehirn auf. Während manche Untereinheiten im gesamten Gehirn exprimiert werden, kommen andere Untereinheiten in einem deutlich eingeschränkteren Gebieten vor (Pirker et al., 2000; Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Hier ein Überblick über das Vorkommen der einzelnen Untereinheiten im Gehirn:

Die *α_1 Untereinheit* zeigt das häufigste Vorkommen von allen α Untereinheiten. Sie kommt beinahe in jedem Bereich des Gehirns vor wie dem cerebralen Cortex (Schicht 1-6), dem Hippocampus, dem Pallidum, dem Striatum, dem Bulbus olfactorius (Mitralzellen, Interneuronen), dem Kleinhirn (Purkinje Zellen, Körnerzellen), der Amygdala, dem basalen Vorderhirn, der Substantia nigra pars reticulata, der Colliculus (inferior) und dem Hirnstamm.

Stärkste Expression der *α_2 Untereinheit* findet man in Körnerzellen des Bulbus olfactorius, dem Cerebralen Cortex (Schicht 1-6), dem Hippocampus, der Amygdala, dem seitlichen Septum, dem Striatum, dem Colliculus (superior), den Motoneuronen und in bestimmten Teilen des Hypothalamus. *Die α_3 Untereinheit* kommt im Bulbus olfactorius, dem cerebralen Cortex (Schicht 5-6), dem Hippocampus, in thalamischen retikulären Neuronen, dem Kleinhirn (Golgi Typ 2 Zellen), dem unteren Olivenkern, der Amygdala, dem Colliculus (superior), im Locus coeruleus, den Raphe Kernen und Zellen des Hirnstammes und des Rückenmarks vor.

Die α_4 Untereinheit beschränkt sich auf den Hippocampus, den Thalamus, das Striatum und den Neocortex.

Die *α_5 Untereinheit* zeigt sich hauptsächlich im Hippocampus, in Körner- und Periglomerulären Zellen des Riechkolbens, im cerebralen Cortex, der Amygdala, dem Hypothalamus, dem Colliculus (superior), dem oberen Olivenkern, in spinalen trigeminalen Neuronen und dem Rückenmark.

Im Gegensatz zu den anderen α-Untereinheiten kommt die *α_6 Untereinheit* nur in den Körnerzellen des Cerebellums vor (Rudolph et al., 2001; Möhler, 2006).

Alle 3 β *Untereinheiten* sind weit verbreitet im Gehirn, besonders im cerebralen Cortex (Pirker et al., 2000; Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Die Expression der β_2 Untereinheit korreliert hauptsächlich mit der Expression der α_1 Untereinheit. Die Expression der β_3 Untereinheit korreliert mit dem Vorkommen der α_2 Untereinheit (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

Die *γ_1 Untereinheit* wird hauptsächlich im Hippocampus, im Globus pallidus, der Amygdala und im Septum gebildet. Die Expression der *γ_1* Untereinheit korreliert mit der Expression von α_1 Untereinheit.

Die *γ_2 Untereinheit* kommt überall im Gehirn vor.

Die *γ_3 Untereinheit* wird hauptsächlich, jedoch nur in geringer Konzentration, im Neocortex und dem Thalamus exprimiert (Pirker et al., 2000; Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

Die *δ Untereinheit* wird vor allem im Neocortex, im Gyrus dentatus des Hippocampus und in Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert.

In den monoaminergen Zellen des Gehirnstamms, sowie dem noradrenergen Locus caeruleus kommen vor allem *ε und ϑ Untereinheiten* vor.

Keine Expression im Gehirn zeigt die *π Untereinheit*. Sie kommt jedoch in weiblichen Organen wie zum Beispiel dem Uterus vor.

Die *ρ Untereinheit* kommt hingegen, wie bereits erwähnt, hauptsächlich in der Retina vor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

2.6. Gating

Der genaue Mechanismus, der von der Bindung der GABA zum Öffnen des Kanals führt, ist noch nicht vollständig bekannt (Cederholm et al., 2009).

Die extrazellulären Domänen aller Untereinheiten bestehen aus 10 β-strands, welche sich zu einem sogenannten β-Sandwich zusammenlegen (Absalom et al., 2009; Cederholm et al., 2009). Wichtig hierbei sind vor allem die sogenannten pre-TM1 Segmente. Sie verbinden den β-10 strand des Loop C mit der M1 Domäne und bilden somit den Übergang zwischen extrazellulärer und transmembranärer Domäne (Abbildung 8) (Keramidas et al., 2006; Cederholm et al., 2009). Nach Bindung von GABA an seine 2 Bindungsstellen kommt es zu einer Konformationsänderung, welche den Agonisten in seiner Bindungstasche einschließt (Sigel und Steinmann, 2012). Dann kommt es zu der Strukturänderung des sogenannten Loop C, welcher zwischen dem β-9 und β-10 strand liegt. Diese Veränderung wird über den β-10 strand zu TM1 und TM2 weitergeleitet (Cederholm et al., 2009; Miller und Smart, 2010)

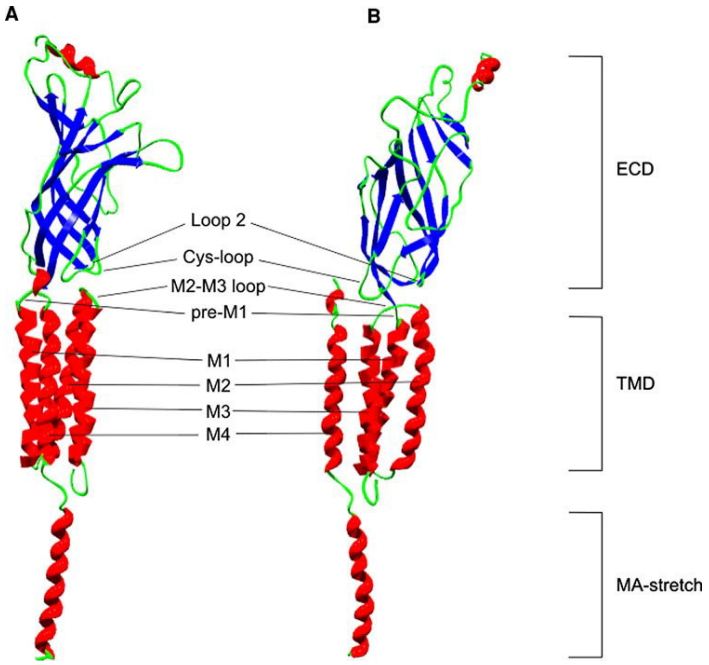

Abbildung 8: Schematische Darstellung eines nikotinergen Acetylcholin Rezeptors (Miller und Smart, 2010)

Die “conformational change wave” Hypothese besagt weiter, dass durch Bindung des Liganden eine Rotation des β-Faltblatts um seine eigene Achse folgt. Durch diese Rotation kommt es zu einer Veränderung der Position des Cys-loops und der Schleife zwischen TM2 und TM3, wodurch es zu einer Drehung der TM2 Domänen kommt, welche wie bereits erwähnt die Kanalpore des Rezeptors bilden. Durch die Drehung der TM2 kommt es zur Trennung der Helices und die Pore öffnet sich (Cederholm et al., 2009).

Weiters konnte gezeigt werden, dass in der α_1 Untereinheit vor allem die Aminosäuren Val212 und Lysin220 essentiell für das Öffnen des Kanals sind (Keramidas et al., 2006). Bei der β_2 Untereinheit erwies sich eine Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Lys196 und Glu153 auf dem Loop zwischen TM2 und TM3 wichtig für die Aktivierung des $GABA_A$ Rezeptors (Cederholm et al., 2009; Sigel und Steinmann, 2012). Beim pre-TM1 Segment auf β_2 zeigte sich außerdem, dass eine Mutation der Aminosäure Arg216 zu einer Aufhebung des Kanal-Gatings führt. An α_1 Untereinheiten führte eine Mutation der Aminosäure Arg220 auf dem pre-TM1 Segment zu selbigem Effekt (Cederholm et al., 2009).
Die Selektivität der Ionenkanäle für bestimmte Ionen wird durch die schmalste Stelle der Pore vermittelt (Connolly und Wafford, 2004).

3. $GABA_B$ Rezeptor

Die GABA Typ B Rezeptoren bilden die zweite Klasse der GABA-aktivierten Rezeptoren (Schwenk et al., 2010). Seinen Namen erhielt der $GABA_B$ Rezeptor aufgrund seiner Biculline-Insensivität (Johnston, 1996; Barnard et al., 1998). $GABA_B$ Rezeptoren zählen zu den membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche sowohl an exzitatorischen als auch an inhibitorischen Synapsen im gesamten Hirn vorkommen (Bormann, 2000; Chalifoux und Carter, 2011). $GABA_B$ Rezeptoren sind Heterodimere (Benke et al., 2012). Nach Bindung von GABA an den $GABA_B$ Rezeptor kommt es zur Dissoziation des G-Protein in αβ und γ Untereinheiten (Chalifoux und Carter, 2011; Benke et al., 2012). Die Gβγ Untereinheiten inhibieren nun entweder spannungsabhängige P/Q und N-Typ Calciumkanäle oder aktivieren Kaliumkanäle (GIRK 1-4) (Abbildung 9).

Die α Untereinheit des aktivierten G-Proteins inhibiert dagegen die Adenylatcyclase, wodurch die zelluläre Konzentration des 3'-5'-cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) abfällt. Der Abfall des cAMPs wiederum senkt die Konzentration der Proteinkinase A, welche für das Öffnen des Glutamat-aktivierten Rezeptors benötigt wird. All diese Prozesse führen letztendlich zu einer Hyperpolarisation der Zelle (Bettler et al., 2004; Chalifoux und Carter, 2011; Benke et al., 2012).

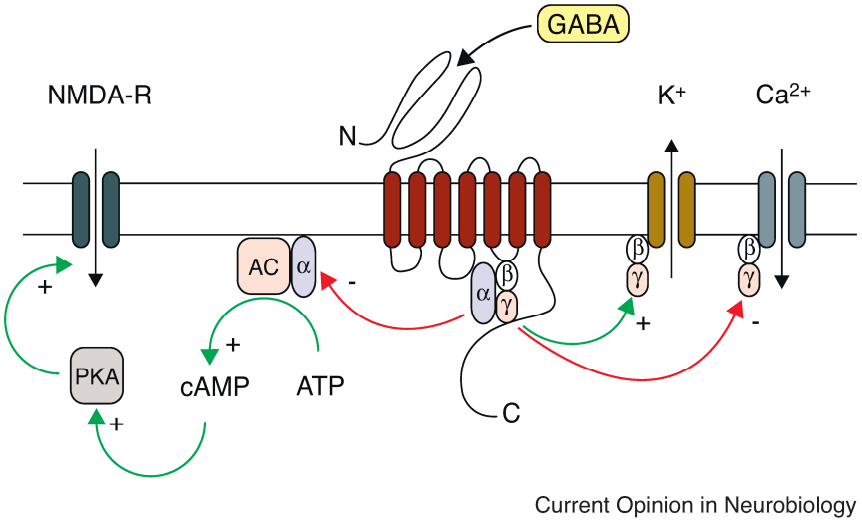

Abbildung 9: Postsynaptischer $GABA_B$ Rezeptor Signalweg (Chalifoux und Carter, 2011)

Wie bereits erwähnt sind $GABA_B$ Rezeptoren Heterodimere. Sie bestehen aus 2 verwandten Rezeptoruntereinheiten, die jeweils 7 transmembranäre Regionen besitzen: $GABA_{B(1)}$ und $GABA_{B(2)}$ (Kornau, 2006; Schwenk et al., 2010; Chalifoux und Carter, 2011).

Die $GABA_{B(1)}$ Untereinheit ist wichtig für die Aktivierung durch exogene Agonisten. $GABA_{B(2)}$ ist verantwortlich für die Signalübertragung und das Targeting (Chalifoux und Carter, 2011; Benke et al., 2012).

$GABA_B$ Rezeptoren würden gute Angriffspunkte für die Behandlung verschiedenster neurologischer Störungen darstellen. Agonisten könnten in der Therapie von Angst und Drogenabhängigkeit eingesetzt werden. Antagonisten wiederum zeigen sich als viel versprechende Neuroenhancer und könnten daneben auch als Antiepileptika eingesetzt werden (Chalifoux nd Carter, 2011). Zur Zeit ist Baclofen das einzige zugelassene Arzneimittel mit Wirkung auf den $GABA_B$ Rezeptor (Bettler et al., 2004).

4. Modulatoren

$GABA_A$ Rezeptoren werden von einer Vielzahl verschiedener pharmakologisch und klinisch wichtiger Substanzen wie zum Beispiel den Benzodiazepinen, Barbituraten, Neurosteroiden oder Anästhetika moduliert (Möhler, 2011).

4.1. Benzodiazepine

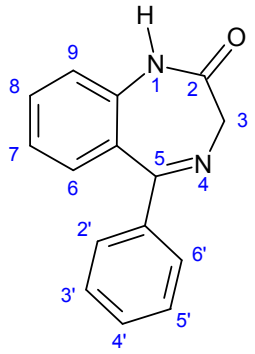

Abbildung 10: Allgemeine Strukturformel der klassischen 1,4 – Benzodiazepine

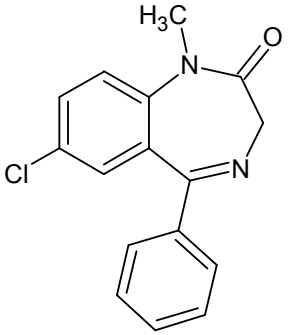

Abbildung 11: Strukturformel Diazepam

Die Benzodiazepin Bindungsstelle liegt zwischen der α und γ_2 Untereinheit (Reynolds, 2008; Sieghart et al., 2012). Benzodiazepine und andere Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle können, im Gegensatz zu GABA oder $GABA_A$-Agonisten wie Muscimol, den $GABA_A$ Rezeptor nicht direkt aktivieren. Sie können also nur in Anwesenheit von GABA den Kanal öffnen. Benzodiazepine modulieren allosterisch den bereits bestehenden GABA Strom (Sieghart et al., 2012). Es kommt zu einem Anstieg der Öffnungsfrequenz des $GABA_A$ Rezeptors (Bateson, 2004).

Benzodiazepine weisen wegen der Modulation des $GABA_A$ Rezeptors folgende klinisch relevante Eigenschaften auf: Sie wirken sedierend, anxiolytisch, antikonvulsiv und hypnotisch (Johnston, 1996; Tan et al., 2011). Benzodiazepine können aber ebenso eine anterograde Amnesie hervorrufen, welche eigentlich zu den unerwünschten Nebenwirkungen gezählt wird, sich jedoch bei kurzen, invasiven medizinischen Eingriffen auch durchaus als nützliche Eigenschaft erwiesen hat. Bei länger dauernder Anwendung kann es jedoch zu Toleranzentwicklung und psychischer Abhängigkeit kommen (Tan et al., 2011).

Chemisch gesehen sind vor allem die Reste an Position 1, 2′ und 7 des klassischen 1,4 Bnezodiazepins entscheidend für hohe Affinität zum $GABA_A$ Rezeptor. Dabei kommt die wichtigste Rolle dem Substituenten in Position 7 zu, welcher besonders wenn sehr lipophil oder elektronegativgeladen zu einer starken Erhöhung der Affinität führt (Wang et al., 1999).

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.4. Untereinheiten) können $GABA_A$ Rezeptoren in Benzodiazepin-sensitive (α_1, α_2, α_3 oder α_5 Untereinheit) und Benzodiazepin-insensitive (α_4 und α_6 Untereinheit) Rezeptoren unterteilt werden (Möhler, 2007; Reynolds, 2008; Tan et al., 2011). Ebenso können nur $GABA_A$ Rezeptoren mit einer γ Untereinheit von Benzodiazepinen moduliert werden (Baumann et al., 2001).
Beide Untereinheiten (α und γ) beinhalten wichtige Aminosäuren für die Bindung von Benzodiazepinen wie zum Beispiel Phe77 und Met130 auf der γ_2 Untereinheit. Auf der α Untereinheit erwiesen sich His101, Tyr159, Tyr209 und Thr206 als essentiell. Diese 4 Aminosäuren kommen in allen Benzodiazepin-sensitiven α Untereinheiten vor. Dadurch gestaltet sich die Entwicklung von neuen α-spezifischen Wirkstoffen als besonders schwierig. (Reynolds, 2008).
Der Mechansimus durch den Benzodiazepine oder andere Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle den Rezeptor modulieren ist noch nicht genau bekannt (Hanson und Czajkowski, 2008). Eine Theorie besagt, dass es durch Bindung des Modulators zu einer allosterischen Konformationsänderung des Rezeptor kommt, wodurch sich die Konformation der GABA-Bindungsstelle ändert und dadurch die Affinität von GABA zum $GABA_A$ Rezeptor steigt (Teissére und Czajkowski, 2001; Rudolph und Knoflach, 2011).

4.2. Barbiturate

Barbiturate interagieren mit zahlreichen, ionotropen Rezeptoren. Sie antagonisieren beispielsweise die Aktivierung von Glutamat Rezeptoren, wobei ihr primäres Ziel aber $GABA_A$ Rezeptoren darstellen. Barbiturate weisen dadurch ein sehr ähnliches Wirkspektrum wie die Benzodiazepine auf (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

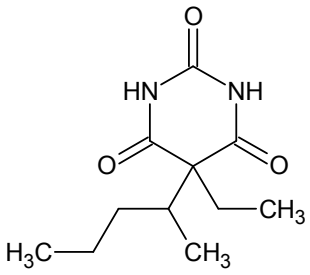

Abbildung 12: Strukturformel Pentobarbital

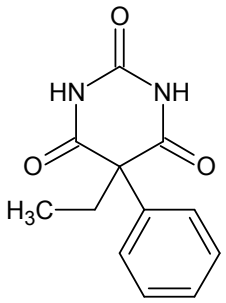

Abbildung 13: Strukturformel Phenobarbital

Die Wirkung der Barbiturate ist konzentrationsabhängig. In niedrigerer Konzentration (<50 µM) modulieren sie GABA-induzierte Chloridströme (I_{GABA}). In höheren Konzentrationen hingegen aktivieren manche Barbiturate $GABA_A$ Rezeptor direkt. In Konzentrationen die darüber hinaus steigen kommt es zur Blockade des $GABA_A$ Rezeptors. Bindung der Barbiturate führt ebenfalls zu einer allosterischen Konformationsänderung und daraus resultierend zu einer Verlängerung der Öffnungszeit des Kanals, wodurch es zu einer Verstärkung der Hyperpolarisation kommt (Macdonald und Olsen, 1994; Johnston, 1996; Sancar und Czajkowski, 2011).

Aufgrund der stark sedierenden Wirkung von Pentobarbital wird eigentlich nur mehr Phenobarbital als Antikonvulsivum eingesetzt. Hinsichtlich der Modulation von I_{GABA} sind Phenobarbital und Pentobarbital vergleichbar, jedoch ist es nur minimal sedierend bei effektiv antikonvulsiver Dosierung, ein Effekt, der vermutlich auf die verminderte direkte Aktivierung des $GABA_A$ Rezeptors durch Phenobarbital zurückzuführen ist (Löscher und Rogawski, 2012). Daneben greift Pentobarbital ubiquitär an $GABA_A$ Rezeptoren an, während Phenobarbital hauptsächlich auf den Neocortex wirkt. Dies wäre eine weitere Erklärung für die schwächere ZNS Depression von Phenobarbital (Mathers et al., 2007).

4.3. Anästhetika

Hier unterscheidet man prinzipiell zwischen Inhalations-, wie zum Beispiel Halothan, Enfluran und Isafluran, und Injektionsanästhetika, wie zum Beispiel Propofol und Etomidat. Die Wirkung von intravenösen als auch inhalativen Anästhetika ist dosisabhängig. In niedrigeren Konzentrationen potenzieren sie I_{GABA}, wogegen sie in höheren Konzentrationen $GABA_A$ Rezeptoren direkt, in Abwesenheit von GABA, öffnen können (Whiting, 2003; Bali und Akabas, 2004). Früher nahm man an, dass die Wirkung der Anästhetika über eine unspezifische Steigerung der Membranfluidität und der Permeabilität der Lipiddoppelmembran vermittelt wird (Franks, 2006).

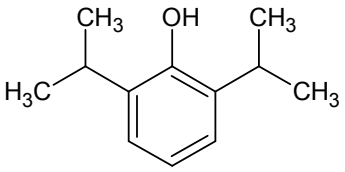

Abbildung 14:
Strukturformel Propofol

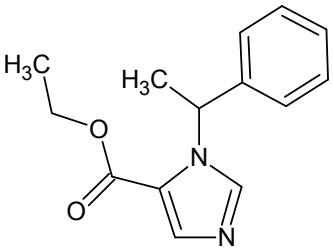

Abbildung 15:
Strukturformel Etomidat

Heute weiß man jedoch, dass Anästhetika über Hemmung von exzitatorische Rezeptoren beziehungsweise verstärkender Wirkung auf inhibitorischen Rezeptoren, wie zum Beispiel des $GABA_A$ Rezeptors, ihre Wirkung entfalten. Wie viele andere Liganden bewirken auch sie eine allosterische Modulation des Rezeptors (Forman und Miller, 2011).

Injektions- und Inhalationsanästhetika unterscheiden sich nicht nur durch ihre Applikationsart, sondern auch durch ihre Interkation mit vermutlich verschiedenen Bindungsstellen. Injektionsanästhetika binden vermutlich in einer Tasche, die von Aminosäureresten der α und β Untereinheit gebildet wird. Inhalationsanästhetika indessen binden an α Untereinheiten (Abbildung 16) (Whiting, 2003; Forman und Miller, 2011).

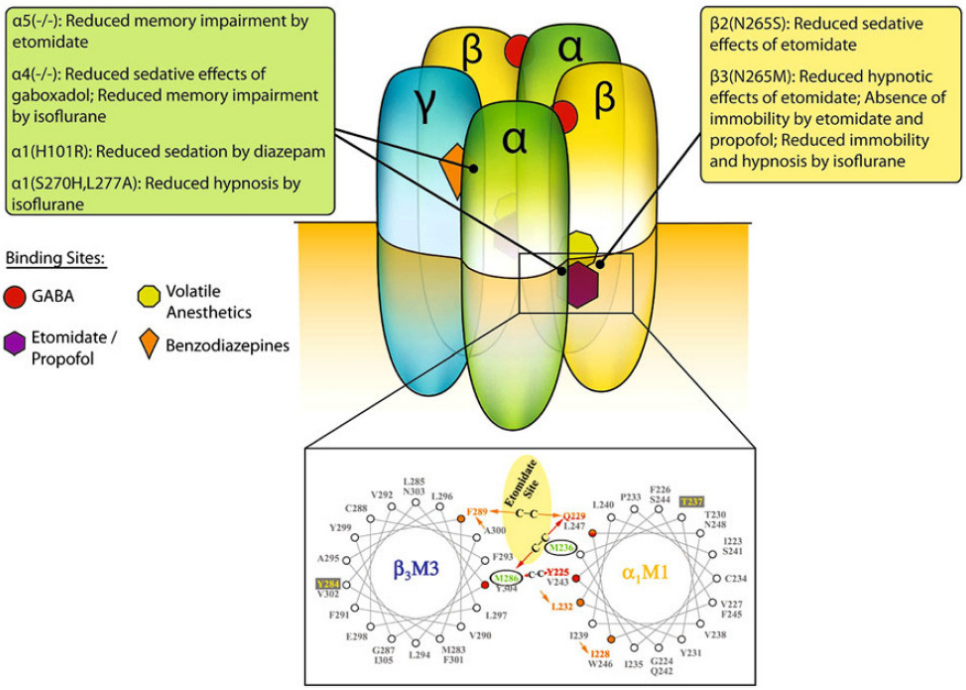

Abbildung 16: Vermutliche Bindungsstellen ausgewählter Anästhetika am $GABA_A$ Rezeptor (Wang und Orser, 2011)

Besonders wichtig für die anästhetische Wirkung der Inhalationsanästhetika sind dabei die Aminosäuren α_1Ser270 in der TM 2 und α_1Ala291 in der TM3 (Bonin und Orser, 2008).

Weder bei den die Inhalations- noch bei dem Injektionsanästhekum Propofol zeichnet sich eine Untereinheitenspezifität ab.

Die Wirkung von Etomidat hingegen hängt von der exprimierten β- Isoform ab: so werden nur $GABA_A$ Rezeptoren mit β_2 beziehungsweise β_3 Untereinheiten von Etomidat moduliert. Diese Untereinheitenselekivität lässt sich weiters auf einen einzelne Aminosäure zurückführen: Mutation der Aminosäure β_2Asn265Ser beziehungsweise des homologen Rests in der β_3 Untereinheit führt zu einem totalen Sensitivitätsverlust für Etomidat. Weiters konnte gezeigt werden, dass die anästhetischen Eigenschaften des Etomidats durch β_3 beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren vermittelt werden, während über β_2 beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren die Sedierung vermittelt wird. β_3 selektive Anästhetika könnten zu einer schnelleren Erholung und dem Ausbleiben des so

genannten „Hangovers“ nach einer Anästhesie beitragen (Whiting, 2003; Campagna-Slater und Weaver, 2007; Forman und Miller, 2011; Olsen und Li, 2011).

β_1 beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren sind an der Wirkung von Etomidat nicht beteiligt, da sie anstelle des, für die Wirkung essentiellen, Asn ein Ser (β_1Ser290) beinhalten (Drexler et al., 2006; Olsen und Li, 2011).

Etomidat selbst kann in 2 sterischen Konformationen, als R(+) und das S(-) Enantiomer, vorliegen. Das S(-) Enantiomer ist deutlich schwächer wirksam als das R(+) Etomidat, welches klinisch eingesetzt wird (Franks, 2006; Forman, 2011).

Im Gegensatz dazu ist die I_{GABA} Modulation durch Propofol vermutlich von anderen Aminosäureresten abhängig. Die anästhetische Wirkung von Propofol war in β_3 (Asn265Ser) mutierten Mäusen unverändert, wohingegen Mutation von β_2Met289Trp in der Nähe der TM3 die die Propofol-Sensitivität drastisch reduziert (Campagna-Slater und Weaver, 2007; Drexler et al., 2011).

4.4. Neurosteroide

Neurosteroide sind die am stärksten wirksamen, endogenen Modulatoren des $GABA_A$ Rezeptors (Hosie et al., 2007; Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Als Neurosteroide werden alle Steroidhormone bezeichnet, die im ZNS neu synthetisiert oder metabolisiert werden (Luchetti et al., 2011).

Hierbei muss man jedoch zwischen den sogenannten „Neurosteroiden“ und „Neuroaktive Steroiden“ unterscheiden. Neurosteroide werden, wie bereits erwähnt, im Gehirn synthetisiert, wogegen die neuroaktiven Steroide ihre Wirkung zwar im Gehirn ausüben, jedoch auch woanders im Körper synthetisiert werden (Johnston, 1996). Wie alle anderen $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren wirken sie anxiolytisch, antikonvulsiv, sedierend; in höheren Dosen vermitteln sie Anästhesie (Lambert et al., 2003).

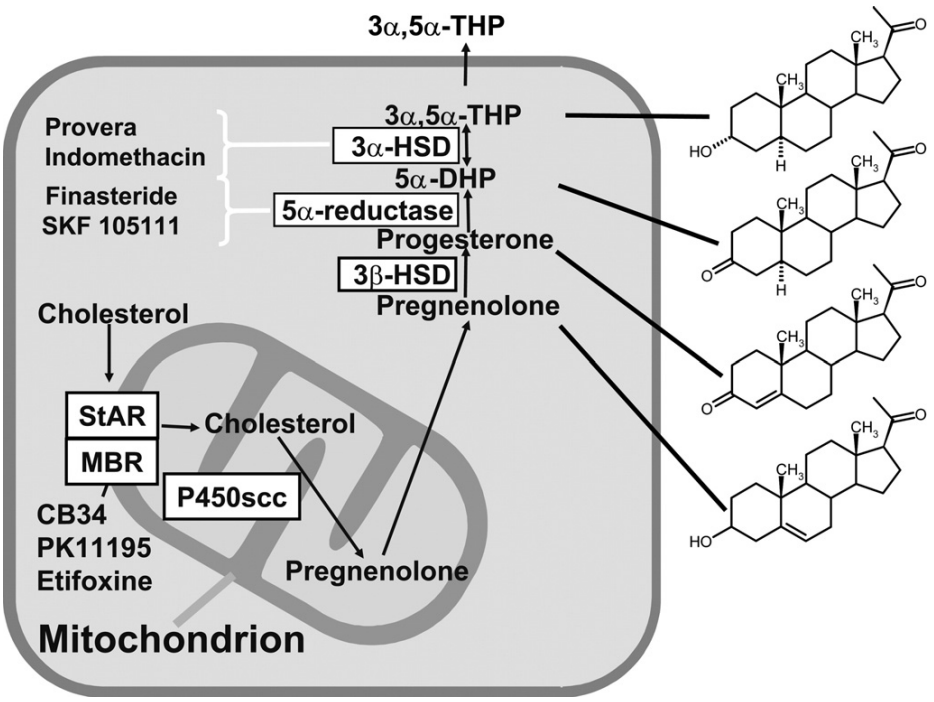

Abbildung 17: Biosynthese von $GABA_A$ Rezeptor aktiven Neurosteroiden (Herd et al., 2007)

Die 3α-hydroxy reduzierten Metaboliten von Progesteron, Deoxycorticosteron sowie des Testosterons verstärken I_{GABA} über Bindung einer Bindungsstelle, die sich von jener für GABA, Benzodiazepine oder Barbiturate unterscheidet (Wang, 2011). Sie erhöhen Öffnungszeit und der Öffnungsfrequenz von $GABA_A$ Rezeptoren (Johnston, 1996).

Wie bereits erwähnt, werden Neurosteroide in Neuronen und Gliazellen aus Cholesterol synthetisiert und vorerst in Pregnanolon umgewandelt. Nach Umwandlung über mehrere Schritte (Abbildung 17) in Progesteron und weiters in das Desoxicortison entstehen letztendlich die beiden wichtigsten endogenen $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren Allopregnanolon (3α,5α-THP) und Tetrahydrodeoxycorticosteron (3α,5α-THDOC) (Hosie et al., 2007).

Neurosteroide binden jedoch nicht nur an den $GABA_A$ Rezeptor, sondern auch an viele andere, wie zum Beispiel an Glutamat-, nicotinerge und muskarinerge Acetylcholin- , Serotonin- und Adrenorezeptoren (Wang, 2011).

Endogene Neurosteroidkonzentrationen sind dynamisch und unterliegen einer Reihe von Einflussfaktoren. Entwicklung, Pubertät, Stress, Schwangerschaft, Menstruationszyklus sowie die Einnahme von Substanzen wie Alkohol,

γ-Hydroxybutyrat oder Fluoxetin können zur Veränderung der aktuellen Neurosteroidspiegel führen. Eine Störung des Neurosteroidhaushalts kann unter anderem zu verschiedenen neurologischen oder psychischen Erkrankungen wie Panikattacken, Depressionen, Schizophrenie oder Epilepsie führen (Herd et al., 2007).

Struktur-Aktivitätsuntersuchungen verschiedener Neurosteroide zeigten, dass vor allem der Hydroxylrest in Position 3 am Ring A und eine Ketogruppe an Position 19 am Ring D wichtig für die Aktivität der Neurosteroide ist (Hosie et al., 2007). An den verschiedenen $GABA_A$ Rezeptor Untereinheiten konnten vor allem auf der α_1 Untereinheit wichtige Aminosäuren für die Neurosteroidbindung identifiziert werden (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass die hydrophoben Aminosäuren α_1Thr263, wichtig für die Aktivierung des Rezeptors, und α1Gln241, wichtig für Aktivierung und Potenzierung, sind. Thr263 liegt an der Grenzfläche zwischen α und β Untereinheiten in der Membran. Gln241 befindet sich in der Nähe von TM1 (Hosie et al., 2007; Mitchell et al., 2008). Zahlreiche Mutationen von Gln241 zeigten, dass das Neurosteroide am anderen Ende über eine Wasserstoffbrückenbindung an die Aminosäuren Asn407 und Tyr410 bindet (Hosie et al., 2007). Eben jene Wasserstoffbindungen an der Position 3α und 20 wichtig für die Aktivierung des $GABA_A$ Rezeptors sind (Wang, 2011). Das selbe gilt für Thr263, welches durch diese Erkenntnis der Wasserstoffbrückenbindung, an die Aminosäure Tyr284 auf TM3 der β2 Untereinheit bindet (Hosie et al., 2007).

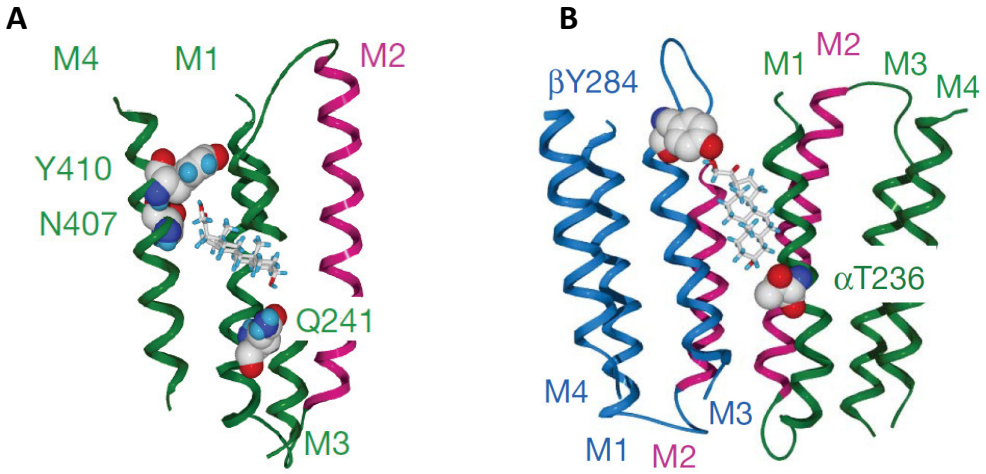

Abbildung 18: Für die Bindung wichtige Aminosäuren auf der **(A)** α Untereinheit und der **(B)** Grenzfläche zwischen α und β Untereinheit (Hosie et al., 2006)

4.5. Alkohol

Ein weiterer Modulator des $GABA_A$ Rezeptors ist Alkohol. Zu den wichtigsten pharmakologischen Wirkungen zählen Anxiolyse, Sedierung, Fehlsteuerung von motorischen Eigenschaften, Einschränkung des Urteilvermögens und in hohen Dosen Anästhesie. Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, wie zum Beispiel der $GABA_A$-, Glycin-, Glutamat- und der Serotonin Subtyp 3 Rezeptoren, stellen ein primäres Ziel für Alkohol dar. Alkohol potenziert Ströme durch $GABA_A$ beziehungsweise Glycin Rezeptoren, wohin hingegen jene von Glutamat Rezeptoren inhibiert werden. Bei dauerhafter Einnahme führt Alkohol zu Toleranzentwicklung, Abhängigkeit und Entzugserscheinungen (Johnston, 1996; Davies, 2003; Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

Durch die Modulation des $GABA_A$ Rezeptors durch Alkohol kommt es zu einer Verstärkung der GABA-induzierten Hyperpolarisation (Lobo und Harris, 2008; Addolorato et al., 2012; Davies, 2003). Es kommt zu einer Steigerung der Öffnungsfrequenz und -dauer des Ionenkanals. Zusätzlich wird die Zeit des Rezeptors im geschlossenen Stadium vermindert. Dieser Effekt tritt bereits bei einer pharmakologisch relevanten Blutalkoholkonzentration von unter 100 mmol/l auf (Davies, 2003).

Der Schwellenwert für das Auftreten der ersten Symptome liegt bei 5-10 mmol/l. Bei niedrigen Blutkonzentrationen kommt es zur Ausbildung von Euphorie und Enthemmung. Bei zunehmender Konzentration im Blut kommt es zu Beeinträchtigung der motorischen Funktionen und der Sprache. Ab einer Blutalkoholkonzentration zwischen 43 – 64 mmol/l kann es zu Erbrechen kommen. Höhere Konzentrationen können zum Koma führen. Über 109 mmol/l steigt das Risiko für Lungenversagen und Tod (Johnston, 1996; Davies, 2003).

Eine große Anzahl von $GABA_A$ Rezeptoren ist bei der Entwicklung von Alkoholtoleranz und Abhängigkeit beteiligt. In toxischen Dosierungen potenziert Alkohol hauptsächlich synaptische $GABA_A$ Rezeptoren folgender Kombinationen: $\alpha_1\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$. In niedrigeren Dosen zeigt sich jedoch vor allem Wirkung auf extrasynaptische Rezeptoren, welche Untereinheiten wie α_4 und α_6 beinhalten (Cui et al., 2012).

Bei einer Langzeit Anwendung von Alkohol kommt es zu einer Down-Regulation von $GABA_A$ Rezeptoren und zu einem veränderten Expressionmuster einzelner Untereinheiten (Davies, 2003; Enoch, 2008; Kumar et al., 2009). α_4, α_6 und γ_2

Untereinheiten werden vermehrt, α_1, α_2, α_3 und α_5 Untereinheiten vermindert exprimiert (Grobin et al., 1998; Kumar et al., 2009; Cui et al., 2012).

4.6. Furosemid

Furosemid, ein häufig eingesetztes Schleifendiuretikum, blockiert neben dem $Na^+/K^+/2Cl^-$ Cotransporter auch die ausschließlich im Cerebellum vorkommenden α_6-beinhaltendem $GABA_A$ (Lüddens et al., 1998). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Furosemid spezifisch mit $GABA_A$ Rezeptoren mit α_4, α_6, β_2 oder β_3 Untereinheiten, unabhängig von der Anwesenheit von γ_2 oder δ Untereinheit, interagiert (Lüddens et al., 1998; Wall, 2002). Die Arbeitsgruppe um S.A. Thompson zeigte, dass Furosemid 100fach stärker an $GABA_A$ Rezeptoren mit α_6 als an α_1 Untereinheiten wirkt. Durch Mutationsanalysen könnte diese Selektivität auf die transmembranäre Region der α Untereinheiten im Bereich der Aminosäuren 209-279 rückgeführt werden. Besonders der Aminosäure α_6Ile230 kommt hierbei eine große Rolle zu, während in den β Untereinheiten – ähnlich wie für Loreclezol oder Etomidat, die Aminosäure β_2Asn265 selektivitätsbestimmend ist (Thompson et al., 1999)

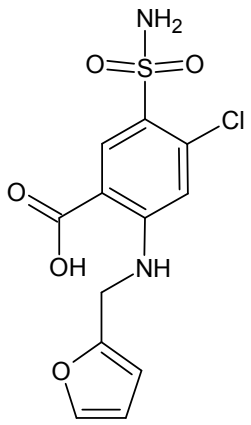

Abbildung 19: Strukturformel Furosemid

4.7. Loreclezol

Das Antikonvulsivum Loreclezol ist ebenfalls ein Modulator von $GABA_A$ Rezeptoren, welcher nicht an die bekannte Bindungsstellen von Benzodiazepinen, Barbituraten oder Anästhetika bindet (Hevers und Lüddens, 1998).

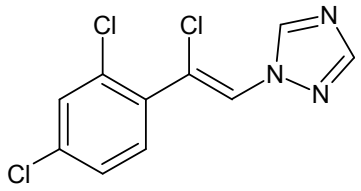

Abbildung 20: Strukturformel Loreclezol

Loreclezol weist eine deutliche Selektivität für β_2 und β_3 inkorporierende $GABA_A$ Rezeptoren über solche mit β_1 Untereinheiten (etwa 300mal höhere Potenz für $\beta_{2/3}$-Rezeptoren im Vergleich zu β_1 Rezeptoren (Hevers und Lüddens, 1998; Feigenspan et al., 2000). Diese selektive Wirkung wird von einem einzigen Asparaginrest (β_2Asn279 beziehungsweise β_3Asn280) bestimmt. Wird diese Aminosäure mutiert, verliert der resultierende Rezeptor seine Sensitivität für Loreclezol. Außerdem kann dadurch die fehlende Wirkung von Loreclezol an β_1-inkorporienden $GABA_A$ Rezeptoren erklärt werden: in β_1 Untereinheiten findet man nämlich in dieser Position statt des Asparaginrests ein Serin (Hevers und Lüddens, 1998).

5. Erkrankungen

5.1. Angststörungen und Depression

Angst und Depression sind die typischen Folgen von wiederkehrendem Stress. Zu den Angststörungen zählen unter anderem die generalisierte Angststörung, Panikattacken, Zwangsstörungen, Sozialphobie und Posttraumatische Belastungsstörung (Möhler, 2012).

Depression ist eine sehr komplexe Erkrankung, mit einem weiten Spektrum an Symptomen, wie zum Beispiel depressive Stimmung, Anhedonie, Schlafstörungen, Erschöpfungszustände, vermindertes Selbstbewusstsein, negatives Denken und Selbstmordgedanken. Angststörungen und Depressionen kommen oft nebeneinander vor und erhöhen die Komorbidität (Möhler, 2012).

Das GABAerge System stellt einen wichtigen Punkt bei Angststörungen dar. Eine Substanz-vermittelte Verstärkung der GABAergen Neurotransmission führt zu Anxiolyse, während eine Reduktion wie zum Beispiel durch als inverse Agonisten Angst auslöst. Für die Entstehung von Angst ist im Wesentlichen die Amygdala zuständig. Diese besteht vorwiegend aus GABAergen Neuronen (Kent et al., 2002; Engin et al., 2012; Möhler, 2012).

5.2. Schlafstörungen

Schlafstörungen gehören zu den am häufigsten beklagten Leiden in Arztpraxen und kommen häufig auch gemeinsam mit Angsterkrankungen vor. Als pharmakologische Ursache wird ein Mangel an zentral inhibitorischen Vorgängen gesehen (Gottesmann, 2002).

Ausreichend Schlaf ist besonders wichtig für die Leistungsfähigkeit des Menschen, somit führt Schlafentzug zu weitreichenden neurologischen Verhaltensdefiziten. Während des Schlafens kommt es abwechselnd zu REM und non REM Phasen. Die Einhaltung dieser Abfolge ist überaus wichtig für erholsamen Schlaf (Thase, 2006). Klassische Benzodiazepine werden unter anderem bei der Therapie von Schlaflosigkeit eingesetzt. Es wurde jedoch gezeigt, dass es beispielsweise durch Diazepam zu unerwünschten Änderungen des Ablaufs von REM/non REM Schlafs kommt. Im Elektroenzephalogramm

(EEG) zeigte sich eine Unterdrückung des REM Schlafes, eine Reduzierung des Tiefschlafes und Anstieg von schnellen β-Wellen. α_1 selektive $GABA_A$ Rezeptor Liganden, wie Zolpidem und Zaleplon, zeigen interessanterweise diese Veränderungen im EEG jedoch nicht (Rudolph und Möhler, 2006). Dies lässt vermuten, dass die α_1 Untereinheit zwar für die sedierende Wirkung, jedoch nicht für den Eingriff in das REM/non REM System verantwortlich ist. Für diese Eigenschaft zeigte sich vor allem die α_2 Untereinheit verantwortlich. In α_2 (His101Arg) punktmutierten Mäusen zeigte sich nämlich eine stark abgeschwächte Suppression von δ-Wellen, sowie der β-Wellen in der non REM Phase und der θ-Wellen in der REM Phase (Rudolph und Möhler, 2006; Möhler, 2007).
Weiters wurde kürzlich eine Mutation in der β_3 Untereinheit (β3Arg192His) identifiziert, die mit chronischer Insomnie assoziiert ist. Durch diese Mutation kommt es zu einer Verlangsamung der Desensibilisierung des Rezeptors sowie zu einer schnelleren Deaktivierung. Dies führt in weiterer Folge zu einer Verlängerung der Dauer von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (Buhr et al., 2002).

5.3. Epilepsie

Epilepsie ist mit einer Erscheinungsrate von 0,5-1% eine der am häufigsten vorkommendsten neurologischen Erkrankungen weltweit (Macdonald et al., 2010). Epileptische Anfälle sind plötzlichauftretende elektrische Entladungen im Gehirn, die durch zu starke Erregung oder zu geringe Hemmung bestimmter Areale auftreten können (Treiman, 2001). Aufgrund dieses Ungleichgewichts zwischen exzitatiorischer und inhibitorischer Neurotransmission, stellen neben dem GABAergen System auch spannungsabhängige Natrium- und Calciumkanäle, Kaliumkanäle, ionotrope und metabotrope Glutamat Rezeptoren und diverse andere Neurotransmittersysteme, wie zum Beispiel Acetylcholin, Glycin und Monoamine wichtige molekulare Arzneistofftargets für Antiepileptika dar (Holtkamp und Meierkord, 2007). Gründe für dieses Ungleichgewicht können entweder auf eine genetische Prädisposition oder auch auf eine Arzneimittel-induzierte Zu- oder Abnahme gewisser Neurotransmitter zurückgeführt werden (Macdonald et al., 2004, 2010).
Von Epilepsie spricht man, wenn eine Person 2 oder mehr unprovozierte Anfälle erlitten hat (Macdonald et al., 2010).

Die Rolle von GABA in der Epilepsie: Veränderungen des GABAergen Systems wurden im Tierversuch schon früh mit Epilepsie in Verbindung gebracht. GABA Agonisten verhinderten Krampfanfälle, wogegen es bei der Behandlung mit GABA Antagonisten oder Inhibitoren der GABA Synthese zum Auftreten von Krampfanfällen kam (Podell, 1998; Treiman, 2001). Der $GABA_A$ Rezeptor hat somit eine zentrale Rolle in der Therapie der Epilespie. Andere Arzneistoffe wie Vigabatrin und Tiagabin, greifen wiederum in den GABA Metabolismus ein und führen dadurch zu Erhöhung der GABA Konzentration im synaptischen Spalt und dadurch zu einer verstärkten Inhibition. Beide Wirkstoffe weisen jedoch einen unterschiedlichen Wirkmechanismus auf. Vigabatrin ist ein irreversibler Hemmer der GABA Transaminase, wogegen Tiagabin die GABA Wiederaufnahme in die Neuronen hemmt (Abbildung 21) (Podell, 1998; Treiman, 2001).

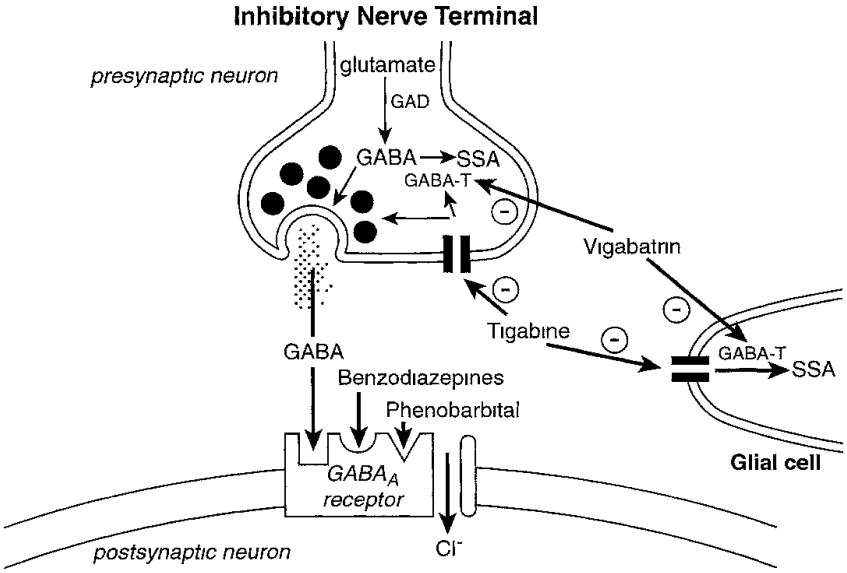

Abbildung 21: Wirkmechanismus von Phenobarbital, Tiagabin und Vigabatrin (Podell, 1998)

Einige spezielle Epilepsieformen können vor allem auf genetische Veränderungen in $GABA_A$ Rezeptor Untereinheiten aber auch zahlreichen anderen Ionenkanälen, wie der juvenilen myoklonischen Epilepsie bis hin zur Dravet-Syndrom, zurückgeführt werden. So zeigte sich, dass bei Familien mit autosomal dominant vererbter generalisierter Epilepsie, mit und ohne Fieberanfällen, eine Mutation der Aminosäure Lys289 auf der γ_2 Untereinheit vorliegt. Lys289 liegt zwischen TM2 und TM3, eine Region die besonders

wichtig für das Gating von $GABA_A$ Rezeptoren wichtig ist (Macdonald et al., 2004, 2010). Eine Mutation der Aminosäure Arg43 konnte für kindliche Abscencen sowie Fieberanfälle verantwortlich gemacht werden. Arg43 befindet sich in der N-terminalen, extrazellulären Domäne auf der γ_2 Untereinheit (Macdonald et al., 2004).

Eine weitere Reihe von Aminosäuren wird mit der Entstehung verschiedener Arten von Epilepsiearten in Verbindung gebracht (siehe Abbildung 22):

Mutation/variant, original reference	GES	Structural feature	$GABA_AR$ dysfunction
Missense mutations in coding sequences			
γ2(R82Q) (Wallace *et al.* 2001)	CAE/FS	N-terminus at γ2/β2 subunit interface	Impaired oligomerization, ER retention, reduced surface expression, reduced current
γ2(K328M) (Baulac *et al.* 2001)	GEFS+	M2–M3 loop	Reduced single channel mean open times, accelerated whole cell current deactivation
δ(E177A) (Dibbens *et al.* 2004)	GEFS+	Adjacent to cys-loop	Reduced whole cell current, reduced single channel mean open time
δ(R220H) (Dibbens *et al.* 2004)	GEFS+	Between cys-loop and M1 N-terminus	Reduced whole cell current, reduced single channel mean open time
γ2(R177G) (Audenaert *et al.* 2006)	FS	Insertion of a neutral aa at N-terminus	Altered whole cell current kinetics
α1(A322D) (Cossette *et al.* 2002)	JME	Insertion of charged amino acid in M3	Misfolded, altered topology, reduced total and surface expression, reduced whole cell current
β3(P11S) (Tanaka *et al.* 2008)	CAE, autism	Signal peptide missense mutation	Abnormal N-linked glycosylation, reduced whole cell current
β3(S15F) (Tanaka *et al.* 2008)	CAE	Signal peptide missense mutation	Abnormal N-linked glycosylation and reduced whole cell current
β3(G32R) (Tanaka *et al.* 2008)	CAE	N terminus missense mutation	Abnormal N-linked glycosylation and reduced whole cell current
Nonsense mutations in coding sequences			
γ2(Q390X) (Harkin *et al.* 2002)	GEFS+/DS	Intracellular loop between M3 and M4	ER retention, dominant negative reduction of wild-type receptors, reduced whole cell current
γ2(Q40X) (Hirose, 2006)	DS	1st residue of mature peptide	Unstudied, likely triggers NMD
γ2(Q429X) (Sun *et al.* 2008)	GEFS+	Intracellular loop between M3 and M4	Unstudied, likely unaffected by NMD and therefore produces truncated peptide
Frameshift mutations in coding sequences			
α1(S326fs328X) (Maljevic *et al.* 2006)	CAE	Frameshift and PTC in M3	NMD of mRNA followed by ERAD of subunit protein
Mutations in untranslated sequences			
GABRG2(IVS6 + 2T→G) (Kananura *et al.* 2002)	CAE/FS	Splice-donor site intron 6	Predicted to cause PTC at 5th/7th exon junction.
GABRB3 haplotype 2 (Urak *et al.* 2006)	CAE	Exon 1a promoter	Impaired binding of N-Oct-3 transcription activator

Abbildung 22: Diverse Epilepsie-assoziierte $GABA_A$ Rezeptor Mutationen (Macdonald et al., 2010)

5.4. Schizophrenie

Schizophrenie ist eine weitere neurologische Erkrankung, welche sich vor allem durch Störungen der Wahrnehmung, Aufmerksamkeit, Gedächtnis und einem abnormen Verhalten in Erkennen und Ausdrücken von Emotionen zeigt (Gonzalez-Burgos et al., 2011). Der Hauptgrund für die Entstehung von Schizophrenie wird in einer Überaktivität des dopaminergen Systems im Gehirn gesehen. Dieses System wird hautpsächlich durch GABA-vermittelte Inhibition reguliert (Rudolph und Möhler, 2006; Charych et al., 2009; Hines et al., 2012). Post mortem Untersuchungen zeigten vor allem Up-Regulation der α_2 und α_5 beinhaltenden $GABA_A$ Rezeptoren. Es wird vermutet, dass diese Gegenregulation der $GABA_A$ Rezeptoren eine kompensatorisch bedingte Änderung aufgrund der verminderten GABAergen Neurotransmission ist (Engin et al., 2012; Hines et al., 2012).

6. Methoden

Die unten beschriebenen Methoden wurden aus in der Vergangenheit am Department für Pharmakologie und Toxikologie unter der Betreuung von Univ. Prof. Dr. Steffen Hering durchgeführten Diplomarbeiten übernommen (siehe Diplomarbeit Bernd Weber „Untersuchung der Wirkung neuer, ausgewählter Liganden von $GABA_A$ Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten“ Sommersememster 2012).

6.1. Oozytenpräparation

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) wurden 15-30 min lang in einer 0,2 % Lösung von Tricain (= Methansulfonsauresalz des 3- Aminobenzoesaureethylesters; MS-222) anästhetisiert. Daraufhin wurde vorsichtig mit einer Pinzette Follikelgewebe operativ entnommen. Das Follikelgewebe wurde in einer Petrischale mit OR2- Lösung (82,5 mM NaCl, 2mM KCl, 1mM $MgCl_2$. 6 H_2O, 5 mM HEPES; pH=7,5 (1M NaOH)) übergeführt, und zuerst mechanisch zerkleinert und danach für etwa 90 min in Collagenaselösung inkubiert (2mg Collagenase Sigma Typ IA/ml OR2), um Bindegewebe und Follikelzellen zu entfernen. Durch diese Collagenasebehandlung konnte rasch eine große Anzahl von einzelnen Oozyten präpariert werden. Da Calcium durch die Aktivierung unspezifischer Proteasen toxisch wirkt, mussten die Oozyten vor, vor allem aber nach der Collagenase- Behandlung gründlich mit OR2- Lösung gewaschen werden. Danach wurden sie in ND96- Lösung (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$. 6 H_2O, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM HEPES; pH=7,4 (1M NaOH)) transferiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einigen Stunden wurden Stadium V-VI Oozyten (Durchmesser 1000-1200 µM) ausgewählt, da diese sich am besten zur Injektion eignen.

6.2. Vorbereitung der cRNA

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

6.3. Injektion der cRNA

Bei der Injektion von cRNA musste auf ausreichende, mechanische Stabilität geachtet werden, um die Oozyten nicht zu verletzen. Vor der Injektion wurden die einzelnen cRNAs, die für die verschiedenen Untereinheiten codieren, im Verhältnis 1:1:10 ($\alpha_1\beta_3\gamma_2$) oder 3:1:10 ($\alpha_1\beta_1\gamma_2$) gemischt. Mithilfe eines pneumatischen Injektionsgeräts wurden etwa 10 bis 50 nl dieser Lösung in jeden einzelnen Oozyten injiziert, was an einer deutlichen Größenzunahme des Oozyten zu erkennen war. Nach der Injektion wurden die Oozyten für 24 Stunden bei 18° C in ND96 (+ 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) inkubiert und waren anschließend für die Messungen bereit.

6.4. Messlösungen

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden Stammlösungen (Konzentration 100 mM) in 100% DMSO hergestellt. Die Konzentration der GABA-Testlösung, die jeden Tag frisch bereitet wurde, betrug 1mM (5,15 mg GABA in 50ml ND96). Bei den Testlösungen war darauf zu achten, dass die DMSO-Konzentration 0,3% nicht übersteigt. Lösungen, die für die Messungen verwendet wurden, mussten ebenfalls täglich frisch bereitet werden.

6.5. 2 Elektrodenspannungsklemmtechnik

Der Versuchsaufbau der Zwei-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik, die für die Oozyten verwendet wurde, ist in Abbildung 23 schematisch dargestellt. Die Versuchsanordnung besteht aus einer intrazellulären Elektrode (V) zur Messung des transmembranären Potentials, einem Rückkopplungsverstärker, der die Abweichung des tatsächlichen Potentials zum benötigten Potential (Haltepotential) misst, und aus einer zweiten, intrazellulären Elektrode (I), die den Strom, der nötig ist, um das Haltepotential zu erreichen bzw. konstant zu halten, in den Oozyten injiziert („voltage clamp“- Prinzip). Der Verstärker funktioniert nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung. Der Strom, der über die zweite Mikroelektrode injiziert wird, fließt mit umgekehrtem Vorzeichen zum Aktionsstrom, der von der Zellmembran generiert wird (Hille, 1992; Strommer, 2008).

6.6. Perfusionssystem

Die Messungen wurden in einer modifizierten Messkammer eines schnellen Perfusionssystems nach Baburin (2006) durchgeführt.

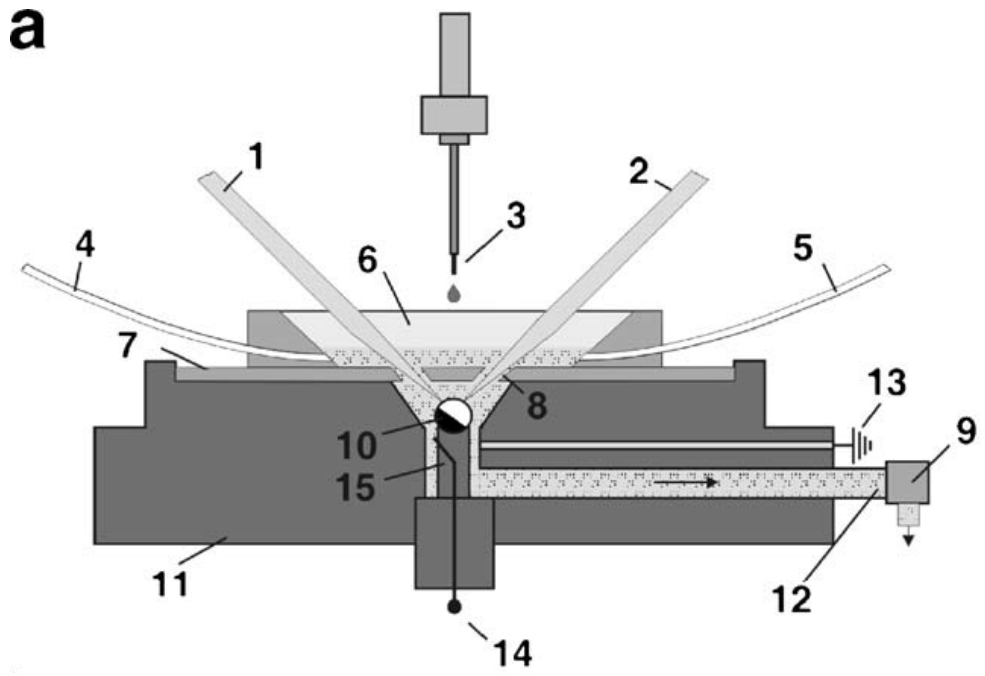

Abbildung 23: Querschnitt durch die Perfusionskammer: 2 Mikroelektroden (1 und 2) werden durch schräge Öffnungen (8) in der Glasplatte (7) in die Oozytenkammer eingeführt. Die zu untersuchende Substanz wird über die Spitze des Roboterarms (3) in eine Auffangkammer aus Quarz (6), welche die Elektrodenöffnungen umgibt, appliziert. Der Waschvorgang des Oozyten (10), der sich auf einer zylindrischen Haltevorrichtung (15) befindet, wird durch eine Spritzpumpe, welche mit der Kammer (11) über eine Abflussstelle (12) verbunden ist, ermöglicht. Die restliche Flüssigkeit wird nun, bevor die Testsubstanz appliziert wird, durch die Trichterabflussstellen (4, 5) abgesaugt. Zusätzlich zur Erdung (13) enthält die Oozytenhaltevorrichtung eine Referenzelektrode (14), welche als extrazellulärer Bezug für die Spannungselektrode dient (Baburin et al., 2006).

7. Problemstellung & Zielsetzung

$GABA_A$ Rezeptoren zählen zu den wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren im Gehirn. Ungefähr 25-40% aller Neuronen im ZNS sind GABAerg und spielen daher eine primäre Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit des Gehirns. Eine Fehlsteuerung des GABAergen Systems kann somit zu erheblichen Beeinträchtigungen, wie zum Beispiel Angsterkrankungen, Schlafstörungen, Epilepsie oder sogar Schizophrenie, führen. Angststörungen zählen zu den am häuftigsten auftretendsten psychiatrischen Erkrankungen der westlichen Welt und stellen eine enorme Belastung und ein gesundheitliches Risiko für die betroffenen Personen dar. Bei der Therapie von Angsterkrankungen kann auf Verhaltenstherapie oder auch auf Pharmakotherapie, wie zum Beispiel mit Benzodiazepinen, zurückgegriffen werden. Bei der Behandlung mit Benzodiazepinen zeigt sich, im Gegensatz zur Verhaltenstherapie, ein deutlich schnellerer Therapieerfolg. Jedoch kann es zum Auftreten einer Reihe von Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Sedierung, Ataxie, anterograder Amnesie sowie Toleranz und Abhängigkeit, kommen. Diese unerwünschten Eigenschaften werden vor allem durch unselektive Interaktion mit $GABA_A$ Rezeptoren erklärt. Deswegen sucht man intensiv nach neuen, subtyp-selektiven Liganden von $GABA_A$ Rezeptoren. Als $\beta_{2/3}$-selektiver Ligand von $GABA_A$ Rezeptoren zeigte sich der Naturstoff LH-1. Um die pharmakodynamischen Eigenschaften zu verbesserung bzw. um die Subtypselektivität zu steigern, wurde eine Serie von Derivaten synthetisiert.

Im Rahmen meine Aufgabe im Rahmen der Diplomarbeit sollte die Modulation von $GABA_A$ Rezeptoren verschiedener Untereinheitenkombinationen durch ausgewählte Naturstoffderivate untersucht werden. Dazu sollten die:

- GABA-Konzentrationswirkskungskurven für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren zur Ermittlung der GABA EC_{50} bzw. GABA $EC_{5\text{-}7}$ erstellt werden
- Messung der Potenzierung von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Naturstoff LH-1
- Untersuchung der konzentrationsabhängigen und subtyp-selektiven ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen I_{GABA} /$EC_{5\text{-}7}$) durch 6 ausgewählte Naturstoffderivate mittels der 2 Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik
- Vergleich der Potenzierung, der EC_{50} und der Selektivität zu LH-1

8. Ergebnisse

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte die konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch 6 ausgewählte Naturstoffderivate durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren mittels der 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik untersucht werden.

Da die Wirkung vieler $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren von der verwendeten GABA Konzentration abhängt, sollte im Vorfeld meiner Messungen ein pharmakologisches Profil für die zu untersuchenden Rezeptorsubtypen $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ erstellt werden.

8.1. Erstellung von GABA-Konzentrationswirkungskurven

$GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Induktion von Chloridströmen unter 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik nach Applikation von verschiedenen GABA Konzentrationen gemessen.
Die gemessenen Amplituden konnten nach folgender Formel normiert werden:

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

$Amplitude_x$...Amplitude bei jeweiliger Konzentration
$Amplitude_{max}$...Amplitude induziert von 1mM GABA

Wenn man diese Werte in ein Koordinatensystem (Abbildung 24A) eingeträgt und durch die Datenpunkte wurde danach eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung legt, können sowohl EC_{50}-Werte d.h. jene Konzentration, die 50 % des maximalen Effekts auslöst, bzw. die EC_{5-7}-Werte abgelesen werden (Tabelle 1).

Untereinheit	EC_{50}; µM	EC_{5-7}; µM	n_H	n
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	24,7 ± 0,8	3,5 – 5	1,5 ±0,1	3
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	42,4 ±6,6	5,5 – 8	1,5 ±0,2	3

Tabelle 1: Zusammenfassung der Parameter EC_{50}, EC_{5-7}, n_H und Anzahl der Experimente der GABA-Dosis-Konzentrationskurven durch die angeführten GABAA-Rezeptoren-Subtypen

n_H .... Hill-Koeffizient

n .... Anzahl der Experimente

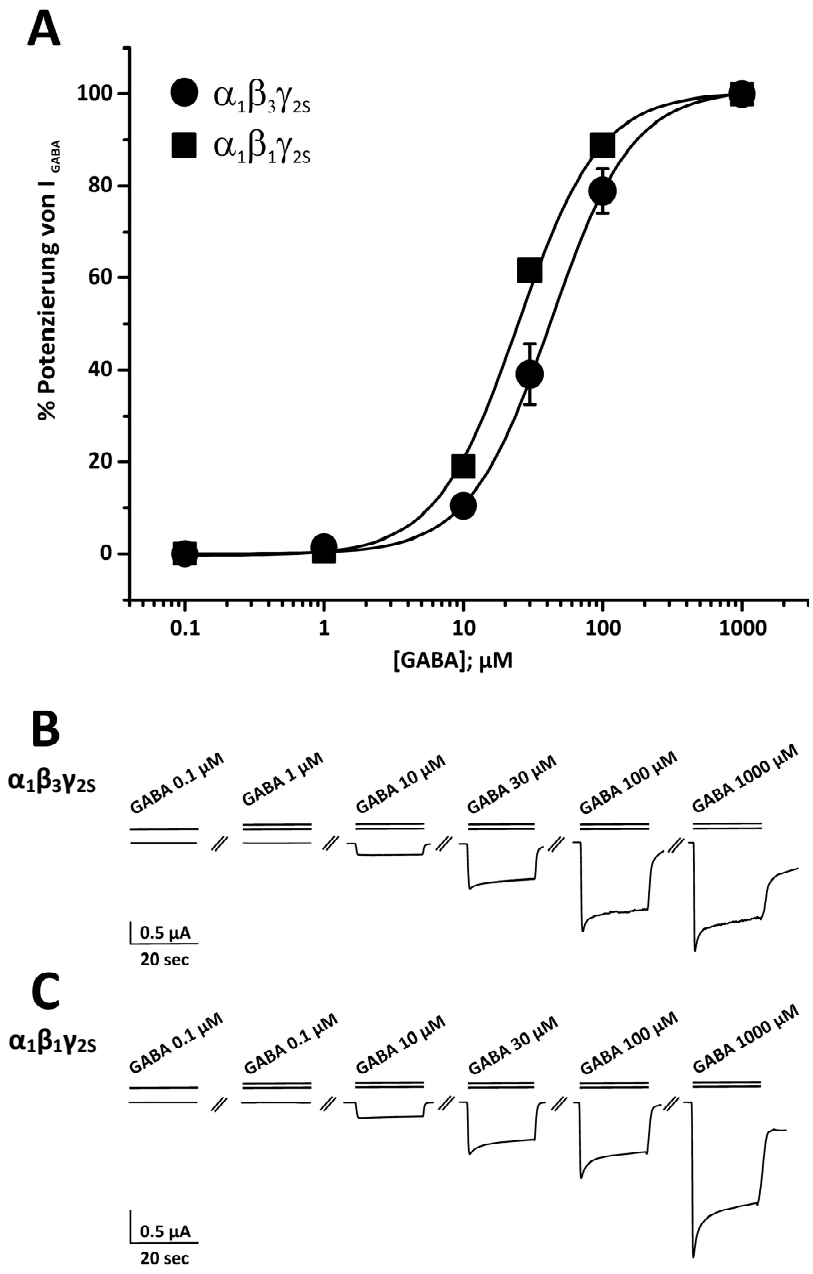

Abbildung 24: **(A)** Konzentrationswirkungskurve durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw, (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren. Typische Experimente für die Induktion von Chloridströmen nach Applikation ansteigender GABA-Konzentrationen durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Untereinheiten

8.2. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch LH-1

Wie in Abbildung 25A gezeigt, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (entsprechend 5,5 – 8 µM) und ansteigenden Konzentrationen des Liganden LH-1 zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} durch Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen ≥ 1 µM ($p<0.05$; n=4) beobachtet werden (siehe auch Abbildung 25B für ein typisches Experiment). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug 670 ± 200 % (n=5) und die EC_{50} lag bei 28,1 ± 15,3µM.

Im Gegensatz dazu war die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ signifikant schwächer ausgeprägt ($p<0.005$). Hier war die erste Modualtion von I_{GABA} (EC_{5-7}; entsprechend 3,5 – 5 µM) bei Konzentrationen ≥ 10 µM ($p<0.01$; n=6) zu messen (Abbildung 25C für typische durch ansteigende Konzentrationen von LH-1 modulierte Ströme durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptroren). Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren 257 ± 112 % (n=6) und die EC_{50} lag bei 188,7 ± 149 µM.

Die EC_{50} Werte für die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-1 unterschieden sich nicht signifkant ($p>0.05$)

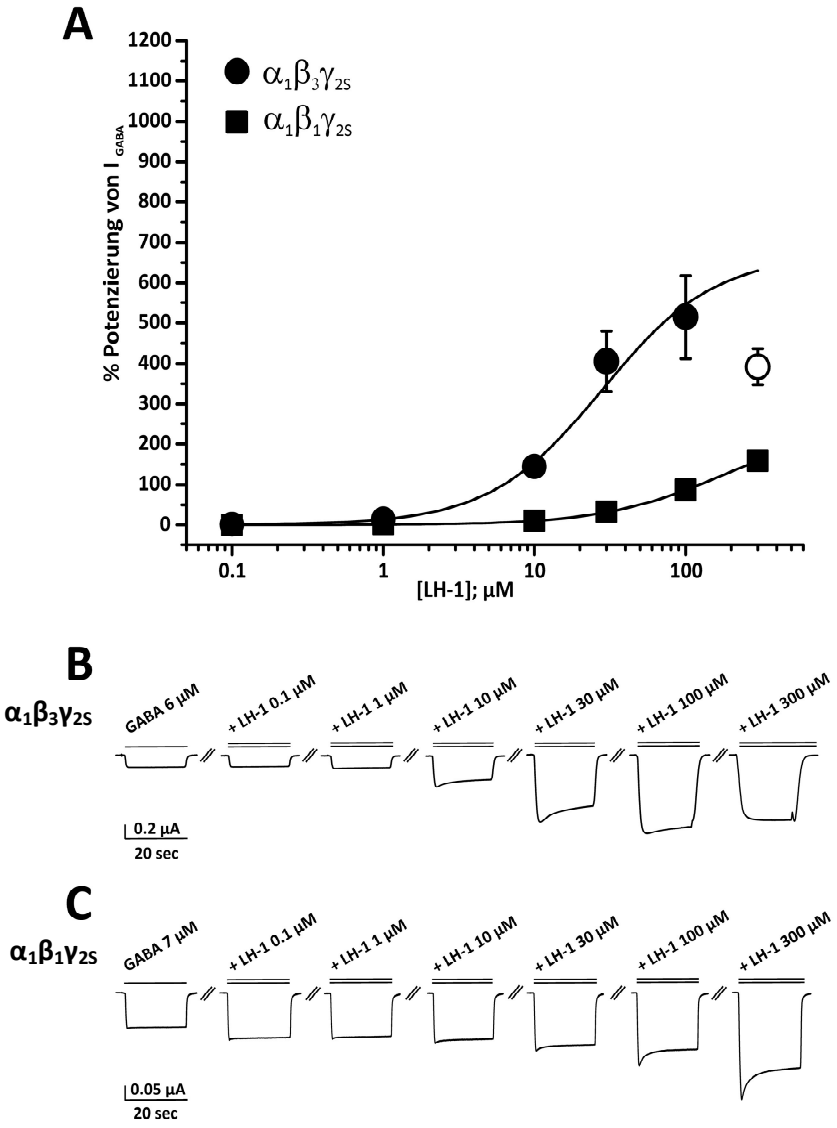

Abbildung 25: **(A)** Konzentrationswirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw. (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert ± S.E.M von mind. 4 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Typische Ströme für die Modulation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentration von LH-1 (doppelter Balken) durch **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren

8.3. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch LH-26

Die Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (entsprechend 5,5 – 8 µM) und ansteigenden Konzentrationen des Liganden LH-26 zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} durch Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten wird in Abbildung 26A gezeigt. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen ≥ 1 µM ($p<0.01$; n=5) beobachtet werden (siehe auch Abbildung 26B für ein typisches Experiment). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug 969 ± 51 % (n=6) und die EC_{50} lag bei 7,4 ± 1,3 µM.

Die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ war hingegen signifikant schwächer ausgeprägt ($p<0.005$). Hier war die erste Modulation von I_{GABA} (EC_{5-7}; entsprechend 3,5 – 5 µM) bei Konzentrationen ≥ 10 µM ($p<0.01$; n=5) zu messen (Abbildung 26C für typische durch ansteigende Konzentrationen von LH-26 modulierte Ströme durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptroren). Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren 333 ± 69 % (n=5) und die EC_{50} lag bei 108,1 ± 31,9 µM.

Ebenso konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den EC_{50} Werten der Stimulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Derivat LH-26 beobachtet werden ($p<0.05$)

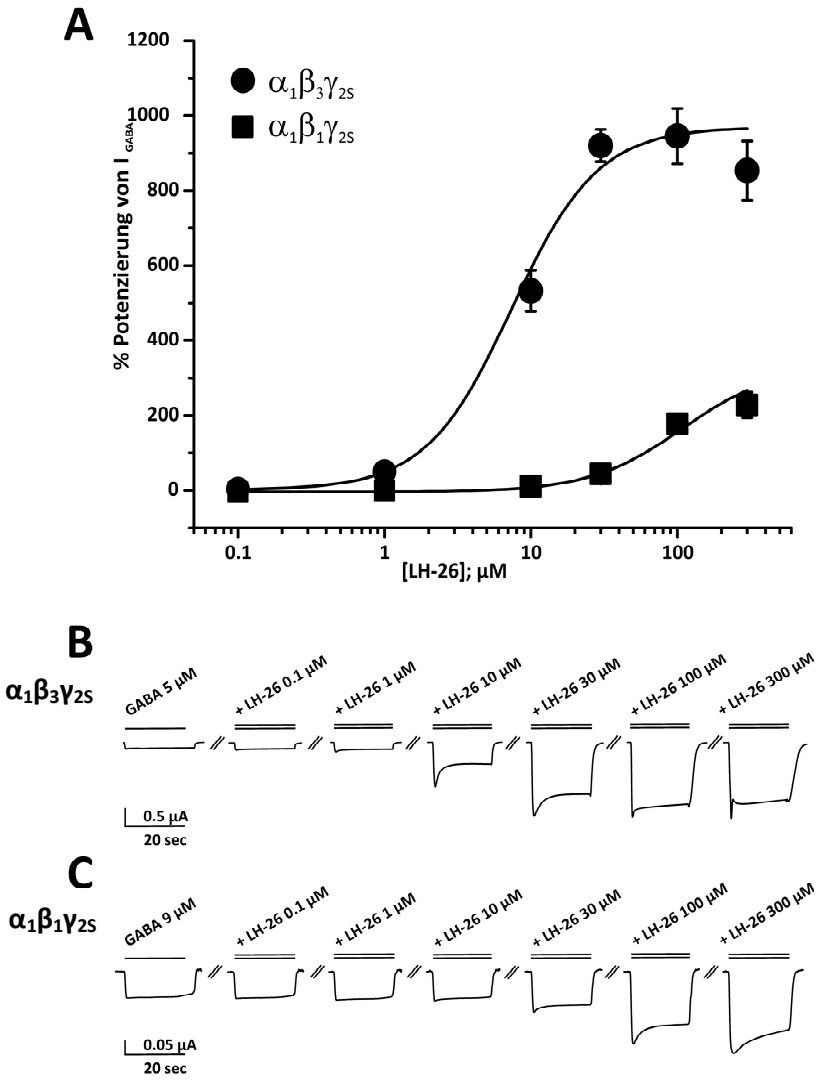

Abbildung 26: **(A)** Modulation von I_{GABA} durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw. (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Derivat LH-26. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert ± S.E.M von mind. 4 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Typisches Experiment für die Modulation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentration von Derivat LH-26 (doppelter Balken) durch **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren

8.4. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch LH-27

Wie in Abbildung 27A gezeigt wird, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (entsprechend 5,5 – 8 µM) und ansteigenden Konzentrationen des Liganden LH-27 zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} durch Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen ≥ 1 µM ($p<0.01$; n=6) beobachtet werden (siehe auch Abbildung 27B für ein typisches Experiment). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug 1110 ±69 % (n=6) und die EC_{50} lag bei 13,2 ± 1,07 µM.

Im Gegensatz dazu war die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ signifikant schwächer ausgeprägt ($p<0.005$). Hier war die erste Modulation von I_{GABA} (EC_{5-7}; entsprechend 3,5 – 5 µM) bei Konzentrationen ≥ 10 µM ($p<0.05$; n=5) zu messen (Abbildung 27C für typische durch ansteigende Konzentrationen von LH-27 modulierte Ströme durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptroren). Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren 391 ± 38 % (n=5) und die EC_{50} lag bei 59,8 ± 11,6 µM.

Darüberhinaus konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den EC_{50} Werten der Potenzierung von IGABA durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Derivat LH-27 berechnet werden ($p<0.05$).

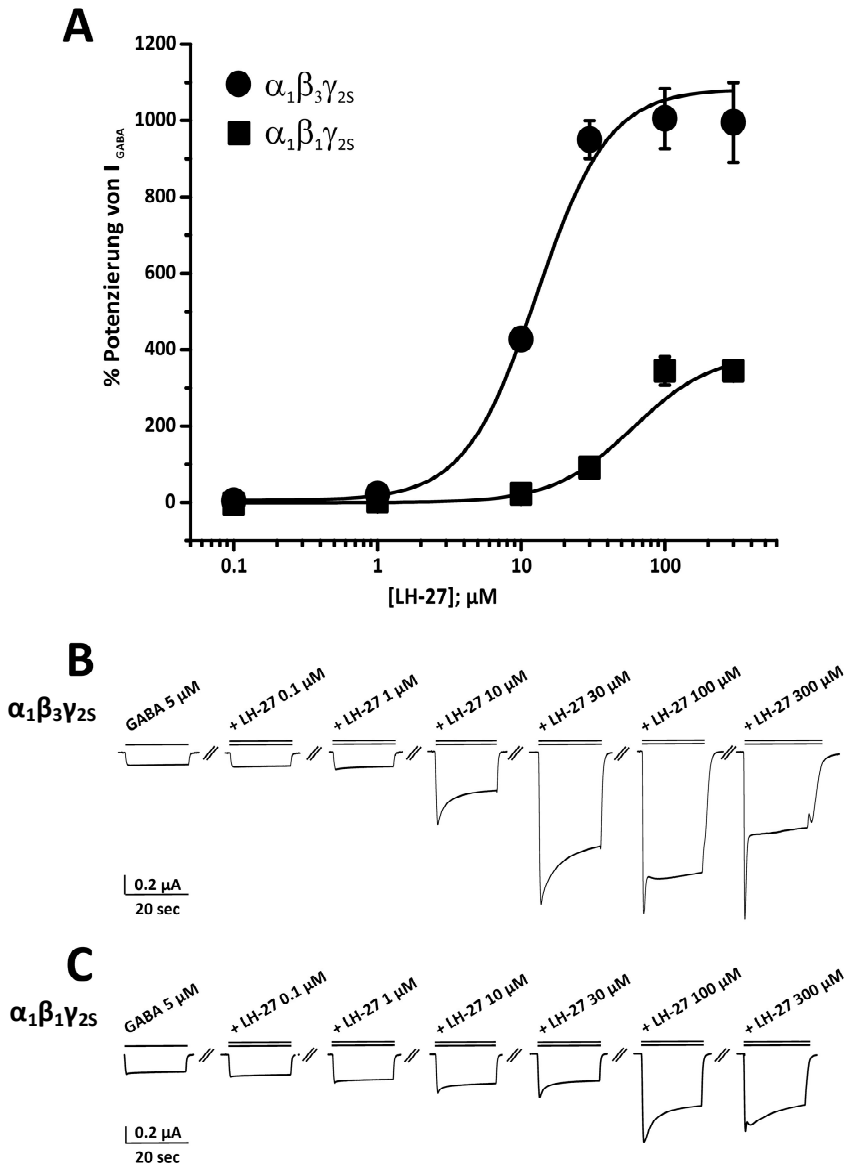

Abbildung 27: **(A)** Konzentrationswirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw. (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-27. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert ± S.E.M von mind. 4 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Typische für die Modulation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentration von LH-27 (doppelter Balken) durch **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren

8.5. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch LH-29

Bei der Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} Konzentration und ansteigenden Konzentrationen des Liganden LH-29 konnte eine signifikante Potenzierung ($EC_{5-7;}$ entsprechend 5,5 – 8 µM) von I_{GABA} durch Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten (Abbildung 28A) beobachtet werden. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen ≥ 10 µM ($p<0.01$; n=5) beobachtet werden (siehe auch Abbildung 28B für ein typisches Experiment). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug 160 ± 21 % (n=5) und die EC_{50} lag bei 98,7 ± 33,3 µM.

Im Gegensatz dazu war die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ signifikant schwächer ausgeprägt ($p<0.005$). Hier war die erste Modulation von I_{GABA} (EC_{5-7}; entsprechend 3,5 – 5 µM) bei Konzentrationen ≥ 10 µM ($p<0.05$; n=6) zu messen (Abbildung 28C für typische durch ansteigende Konzentrationen von LH-29 modulierte Ströme durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptroren). Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren 76 ± 14 % (n=7) und die EC_{50} lag bei 63,1 ± 26,3 µM.

Die EC_{50} Werte für die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-29 unterschieden sich jedoch nicht signifkant ($p>0.05$)

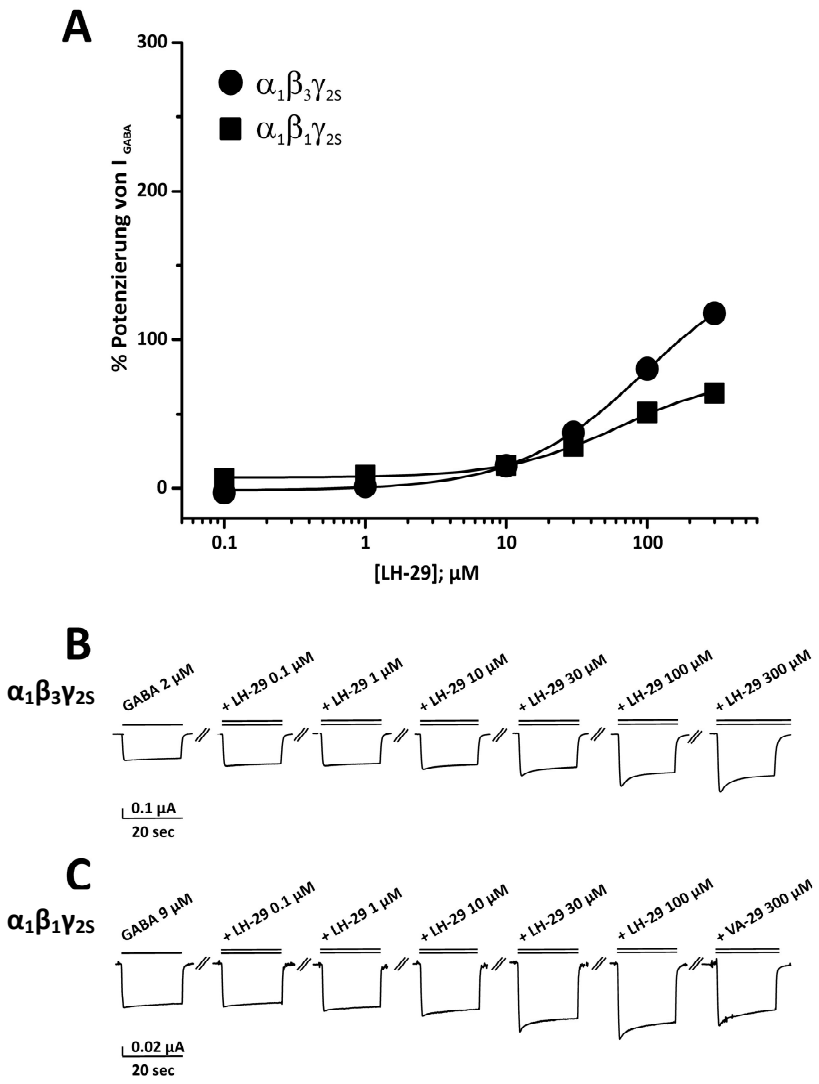

Abbildung 28: **(A)** Modulation von I_{GABA} durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw. (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Derivat LH-29. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert ± S.E.M von mind. 4 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Typische Ströme für die Modulation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentration von Derivat LH-29 (doppelter Balken) durch **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren

8.6. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch LH-30

Die Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (entsprechend 5,5 – 8 µM) und ansteigenden Konzentrationen des Liganden LH-30 zeigte eine signifikante Potenzierung von I_{GABA} durch Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten (Abbildung 29A). Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen ≥ 1 µM ($p<0.05$; n=5) beobachtet werden (siehe auch Abbildung 29B für ein typisches Experiment). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug 461 ± 36 % (n=5) und die EC_{50} lag bei 51,8 ± 7,1 µM.

Die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ war in etwa gleich stark wie jene durch Rezeptoren, die aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten aufgebaut sind ($p>0.25$). Hier war die erste Modulation von I_{GABA} (EC_{5-7}; entsprechend 3,5 – 5 µM) bei Konzentrationen ≥ 10 µM ($p<0.01$; n=5) zu messen (Abbildung 29C für typische durch ansteigende Konzentrationen von LH-30 modulierte Ströme durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren). Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren 492 ± 97 % (n=5) und die EC_{50} lag bei 79,4 ± 23,5 µM.

Die EC_{50} Werte für die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-30 unterschieden sich jedoch nicht signifkant ($p>0.05$)

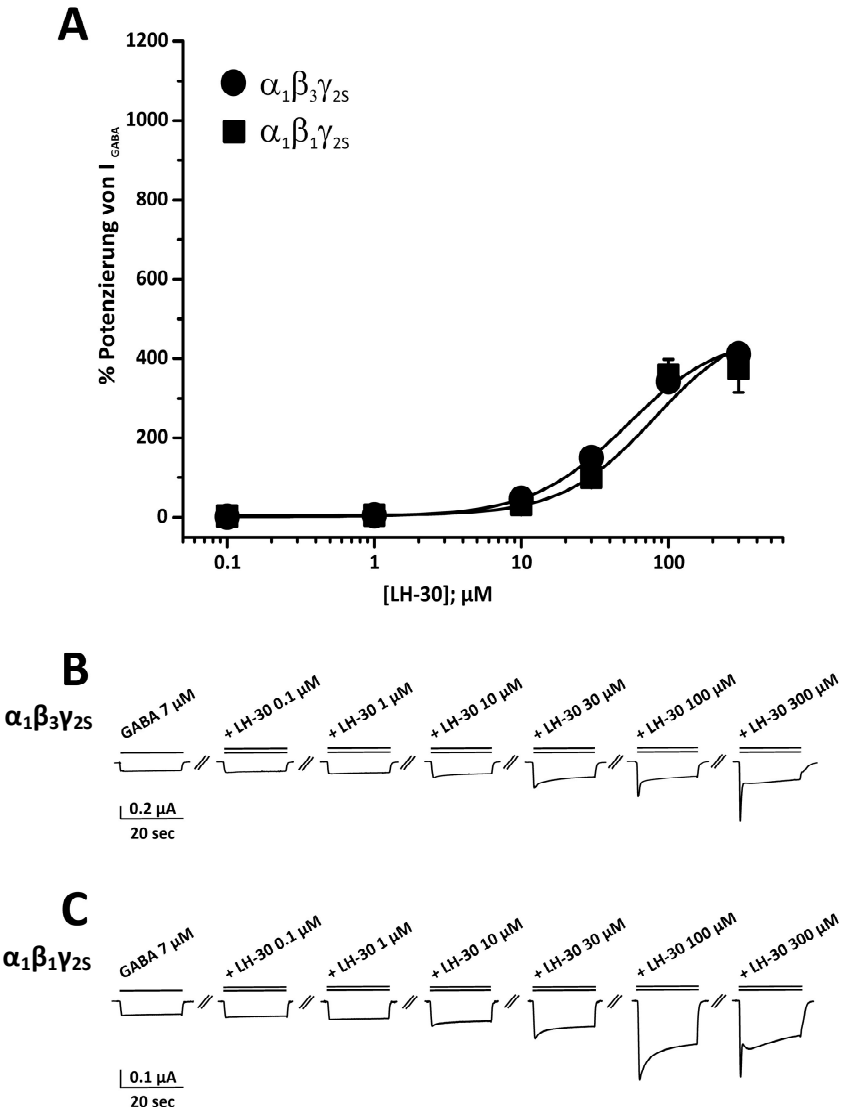

Abbildung 29: **(A)** Modulation von I_{GABA} durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw. (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Derivat LH-30. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert ± S.E.M von mind. 4 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Typisches Experiment für die Modulation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentration von Derivat LH-30 (doppelter Balken) durch **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren

8.7. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch LH-31

Wie in Abbildung 30A gezeigt wird, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} Konzentration und ansteigenden Konzentrationen des Liganden LH-31 zu einer signifikanten Potenzierung ($EC_{5-7;}$ entsprechend 5,5 – 8 µM) von I_{GABA} durch Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen ≥ 0,1 µM ($p<0.05$; n=5) beobachtet werden (siehe auch Abbildung 30B für ein typisches Experiment). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug 559 ± 30 % (n=7) und die EC_{50} lag bei 36,8 ± 4,3 µM.

Gegensatz dazu war die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ signifikant schwächer ausgeprägt ($p<0.005$). Hier war die erste Modulation von I_{GABA} (EC_{5-7}; entsprechend 3,5 – 5 µM) bei Konzentrationen ≥ 1 µM ($p<0.05$; n=6) zu messen (Abbildung 30C für typische durch ansteigende Konzentrationen von LH-31 modulierte Ströme durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren). Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren 70 ± 36 % (n=6) und die EC_{50} lag bei 96,2 ± 112 µM.

Die EC_{50} Werte für die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-31 unterschieden sich jedoch nicht signifkant ($p>0.05$)

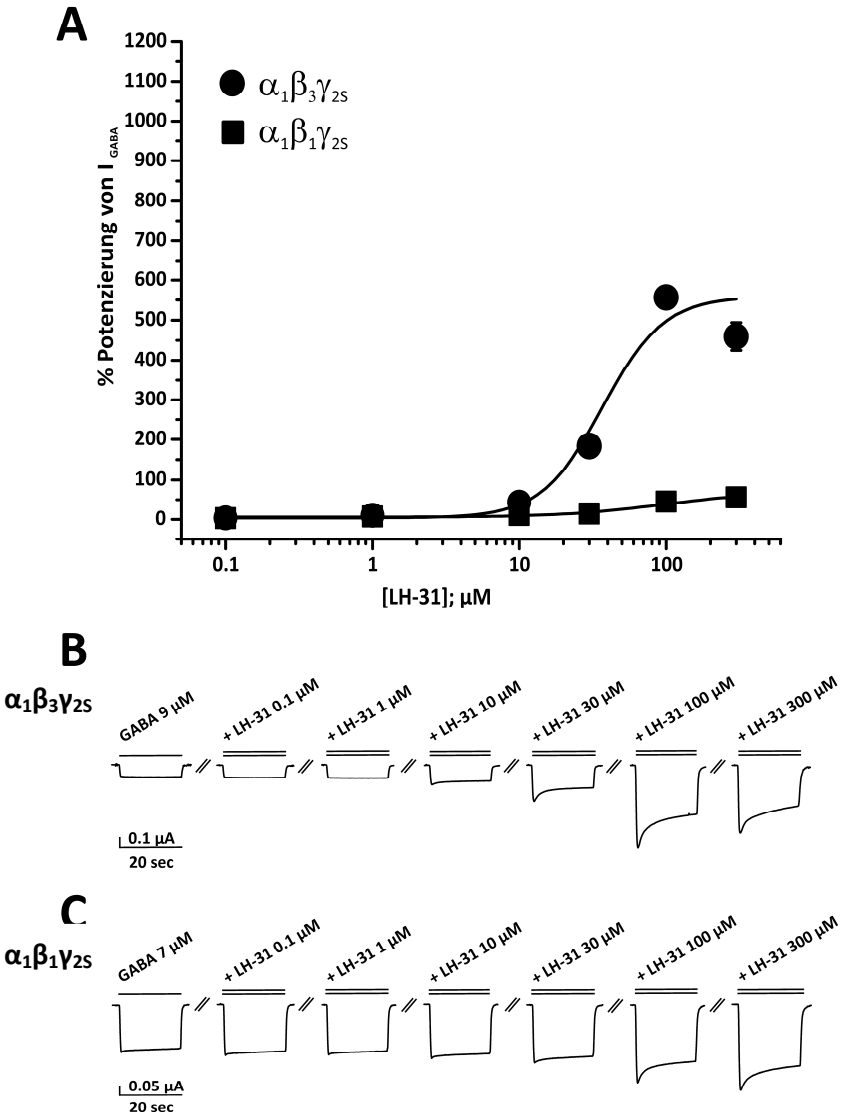

Abbildung 30: **(A)** Konzentrationswirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw. (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-31. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert ± S.E.M von mind. 4 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Typische Ströme für die Modulation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentration von LH-31 (doppelter Balken) durch **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren

8.8. Untersuchung der Modulation von I_{GABA} durch LH-32

Bei der Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} Konzentration und ansteigenden Konzentrationen des Liganden LH-32 kommte eine signifikante Potenzierung ($EC_{5-7;}$ entsprechend 5,5 – 8 µM) von I_{GABA} durch Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten beobachtet werden (Abbildung 31A). Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen ≥ 0,1 µM ($p<0.05$; n=5) beobachtet werden (siehe auch Abbildung 31B für ein typisches Experiment). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug 625 ± 40 % (n=7) und die EC_{50} lag bei 5,3 ± 0,6 µM.

Im Gegensatz dazu war die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ signifikant schwächer ausgeprägt ($p<0.005$). Hier war die erste Modulation von I_{GABA} (EC_{5-7}; entsprechend 3,5 – 5 µM) bei Konzentrationen ≥ 0,1 µM ($p<0.05$; n=6) zu messen (Abbildung 31C für typische durch ansteigende Konzentrationen von LH-32 modulierte Ströme durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren). Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren 257 ± 57 % (n=7) und die EC_{50} lag bei 28,9 ± 13,7 µM.

Die EC_{50} Werte für die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-31 unterschieden sich jedoch nicht signifkant ($p>0.05$)

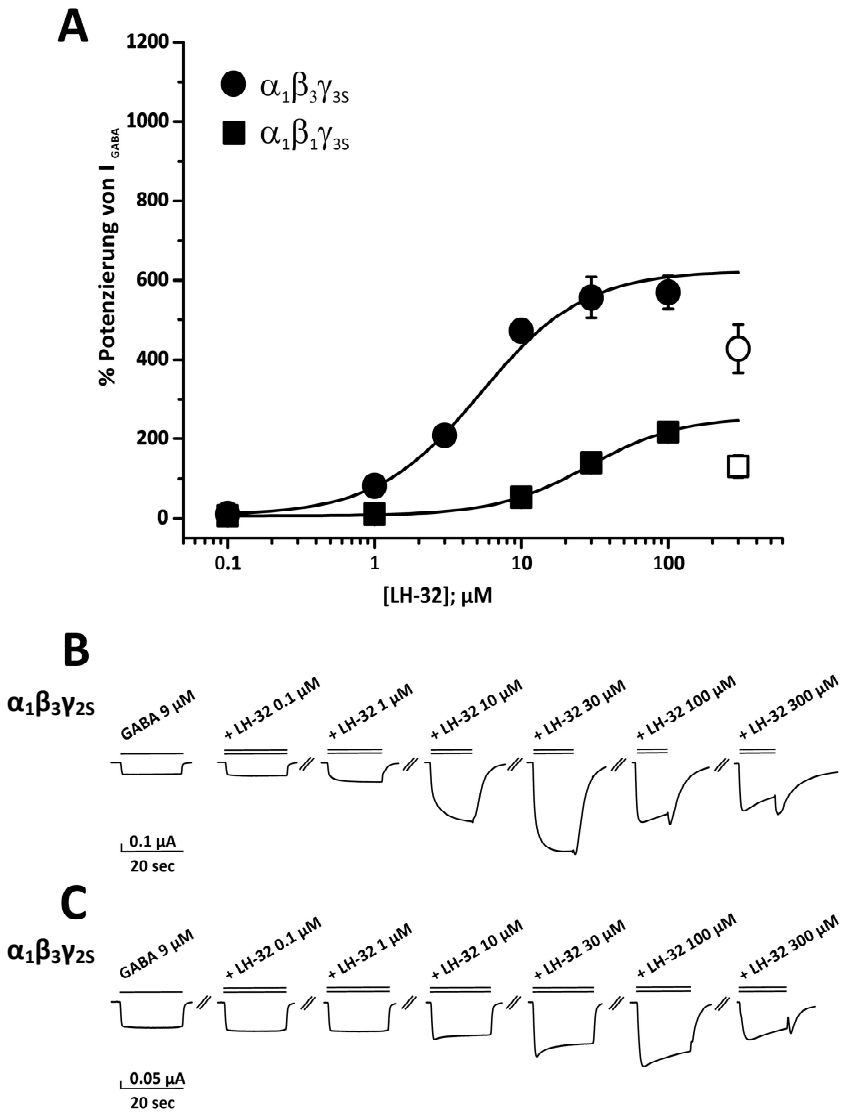

Abbildung 31: **(A)** Konzentrationswirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus (●) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ bzw. (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch LH-32. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert ± S.E.M von mind. 4 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Typisches Experiment für die Modulation einer GABA EC_{5-7} Konzentration (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentration von LH-32 (doppelter Balken) durch **(B)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren.

9. Diskussion

$GABA_A$ Rezeptoren sind die wichtigsten neuroinhibitorischen Rezeptoren im Gehirn und spielen daher eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit des Gehirns. Fehlfunktionen des GABAergen Systems können erhebliche Folgen mit sich bringen, wie zum Beispiel Angsterkrankungen, Schlafstörungen, Epilepsie oder Schizophrenie. $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren werden aufgrund ihrer anxiolytischen, sedierenden, hypnotischen und muskelrelaxierenden Wirkungen zur Therapie der oben genannten Erkrankungen sehr effektiv eingesetzt. Aufgrund ihrer subtypunselektiven Wirkung auf die $GABA_A$ Rezeptoren bringen diese Substanzen jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen mit sich. Die Entwicklung neuer Liganden soll durch eine selektive Interaktion mit den $GABA_A$ Rezeptorsubtypen zu verringerten unerwünschten Nebenwirkungen führen.

In den letzten Jahren wurde der Naturstoff LH-1 als ein subtypselektiver Ligand des $GABA_A$ Rezeptors identifiziert. Dieser Naturstoff interagiert selektiv mit β_2/β_3 Untereinheit beinhaltenden Rezeptoren und weist kaum Aktivität an $GABA_A$ Rezeptoren mit β_1 Untereinheit auf.

Modifikationen dieser Substanz können jedoch neben der gewünschten Steigerung der Effizienz der Potenz manchmal auch zu einer Änderung der Selektivität der Liganden führen. Dabei kann es sowohl zu einer Erhöhung der Selektivität, aber auch zu einem totalen Selektivitätsverlust kommen.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte daher neben der Untersuchung der Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren und der Veränderung der EC_{50} auch eine potentielle Veränderung der β-Selektivität der neuen Naturstoffliganden untersucht werden. Folgende Erkenntnisse wurden dabei gewonnen:

1. Derivatisierung von LH-1 führt zu signifikanter Erhöhung der Potenz beziehungsweise der Effizienz der I_{GABA} Modulation

   Dafür wurden $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Untereinheiten exprimiert, die konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch 6 Liganden untersucht und mit der I_{GABA} Potenzierung von LH-1 verglichen.

   Die EC_{50} von 3 der untersuchten Liganden (LH-26, LH-27 und LH-32) war signifikant niedriger als die von LH-1. Bei beiden Derivaten LH-26 und LH-27 kam es

darüberhinaus auch noch zu einer deutlichen Steigerung der I_{GABA} Potenzierung. Bei LH-26 kam es an β_3 beinhaltenden $GABA_A$ Rezeptoren zu einer Erhöhung um 50%. Bei LH-27 wurde die Potenzierung sogar um 65% gesteigert. Das Derivat LH-32 zeigte mit 5,3 ± 0,6 µM die niedrigste EC_{50} von allen.

Bei den anderen Derivaten konnte keine Verbesserung der EC_{50} beobachtet werden beziehungsweise wurde bei LH-29 und LH-30 sogar eine signifikante Verschlechterung der Affinität beobachtet.

2. Derivatisierung von LH-1 ändert die I_{GABA} Potenzierung

   Während Derivatisierung bei Substanzen LH-26 und LH-27 zu deutlich stärker ausgeprägter Potenzierung führte, kam es hingegen bei den Derivaten LH-29 und LH-30 zu einer massiven Reduktion der I_{GABA}. Mit LH-1 vergleichbar starke Potenzierung konnte für LH-31 und LH-32 beobachtet werden.

3. Derivatisierung führt zu veränderter Subtyp-Selektivität

   Die überraschendsten Ergebnisse meiner Arbeit waren hinsichtlich der Selektivität zu sehen. Hier führten bereits kleine strukturelle Änderungen am Molekül zu dramatischen Änderungen der Selektivität.

   So kam es bei den Derivaten LH-29 und LH-30 zu einem totalen Selektivitätsverlust. Beide Rezeptorsubtypen ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$) wurden mit vergleichbarer Potenz und Effizienz moduliert. Bei LH-29 muss jedoch angemerkt werden, dass die I_{GABA} Potenzierung allgemein sehr schwach ausgeprägt war. Auch die Derivate LH-26, LH-27 und LH-32 modulierten erstaunlicherweise β_1 beinhaltende $GABA_A$ Rezeptoren, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als Rezeptoren mit β_3 Untereinheiten. Einzig LH-31 behielt seine β_3-Selektivität und zeigte keinen Effekt an β_1 beinhaltenden $GABA_A$ Rezeptoren.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass meine Arbeit demonstriert, wie leichte Strukturveränderungen die pharmakodynamischen Eigenschaften eines Moleküls ändern können.

Zusammenfassung

Hintergrund: γ-Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste, inhibitorische Neurotransmitter und spielt eine bedeutsame Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit des Gehirns. Modulatoren des GABA Typ A ($GABA_A$) Rezeptors verstärken GABA-induzierte Chloridströme (I_{GABA}) und wirken dadurch unter anderem sedierend, anxiolytisch, muskelrelaxierend oder hypnotisch. Dadurch sind $GABA_A$ Rezeptoren ein wichtiges Target bei der Therapie von Angsterkrankungen, Schlafstörungen oder Epilepsie.

Problemstellung und Zielsetzung: Typische $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren wie Benzodiazepine weisen eine Reihe von Nebenwirkungen auf. Diese werden hauptsächlich auf die unselektive Interaktion mit den verschiedenen $GABA_A$ Rezeptor Subytpen zurückgeführt. Durch Subtypselektive Liganden erhofft man sich Reduktion unerwünschter Nebeneffekte. Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte ich die subtypspezifische Modulation von I_{GABA} durch 6 verschiedenen Naturstoffderivaten durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$ Rezeptoren untersuchen.

Methode: Expression von $GABA_A$ Rezeptoren ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) in *Xenopus laevis* Oozyten und Messung der konzentrationsabhängigen Modulation von I_{GABA} durch die Derivate mittels der 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik

Ergebnisse und Diskussion: Signifikant stärkere Modulation von I_{GABA} und dazu noch eine dazu niedrigere EC_{50} konnte für Derivate LH-26 und LH-27 im Vergleich zu LH-1 beobachtet werden (LH-26: 969±51% bzw. EC_{50}: 7,4±1,3µM vs. LH-27: 1110±69 % bzw. EC_{50}: 13,2±1,07 µM vs. LH-1: 670 ± 200% bzw. EC_{50}: 28,1 ± 15,3µM). Die niedrigste EC_{50} konnte für Derivat LH-32 an $GABA_A$ Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Untereinheiten ermittelt (5,3±0,6µM). Hinsichtlich der Subtypselektivität kam es bei den Derivaten LH-29 und LH-30 zu totalem Selektivitätsverlust, sie modulierten I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren in gleichem Ausmaß. Einzig LH-31 behielt seine β_3-Selektivität. Diese Arbeit liefert weitere Einblicke in die Interaktion von LH-1 und ihren Derivaten mit $GABA_A$ Rezeptoren.

Abstract

Background: γ-aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter playing an important role in regulating the brain's excitability.Modulators of GABA type A ($GABA_A$) receptors enhance GABA-induced chloride currents (I_{GABA}) and induce sedative, anxiolytic, muscle relaxant and hypnotic effects. Therefore, $GABA_A$ receptors represent an important drug target in the therapy of anxiety disorders, insomnia or epilepsy.

Aims: Typical $GABA_A$ receptor ligands such as benzodiazepines, however, suffer from several undesired side effects. These effects are mainly due to relatively unselective interaction with most *in vivo* occurring $GABA_A$ receptor subtypes. Thus, subtype-selective compounds are expected to display fewer unwanted effects. In my diploma thesis, I should investigate the subtype-selective modulation of I_{GABA} by 6 novel natural substance-derivatives through $GABA_A$ receptors composed of $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ subunits.

Methods: Expression of $GABA_A$ receptors ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ and $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) in *Xenopus laevis* oocytes and analysis of the concentration-dependent modulation of I_{GABA} by means of the 2-microelectrode-voltage-clamp-technique.

Results and Discussion: Significantly more pronounced enhancement of I_{GABA} and additionally lower EC_{50} values were determined for derivatives LH-26 und LH-27 compared to LH-1 (LH-26: 969±51% bzw. EC_{50}: 7,4±1,3µM vs. LH-27: 1110±69 % bzw. EC_{50}: 13,2±1,07 µM vs. LH-1: 670 ± 200% bzw. EC_{50}: 28,1 ± 15,3µM). The lowest EC_{50} value for $GABA_A$ receptors composed of $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ subunits was measured for derivative LH-32 (5,3±0,6µM). With respect to subtype-selectivity, a complete loss of selectivity was observed for derivatives LH-29 and LH-30, I_{GABA} enhancement through $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ and $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ reeptors was comparable. Only LH-31 retained its β_3-selectivity. My data provide further insights into the interaction of LH-1 and its derivatives with $GABA_A$ receptors.

Quellenverzeichnis

Absalom, N.L., Schofield, P.R., and Lewis, T.M. (2009). Pore structure of the Cys-loop ligand-gated ion channels. Neurochem. Res. *34*, 1805–1815.

Addolorato, G., Leggio, L., Hopf, F.W., Diana, M., and Bonci, A. (2012). Novel Therapeutic Strategies for Alcohol and Drug Addiction: Focus on GABA, Ion Channels and Transcranial Magnetic Stimulation. Neuropsychopharmacology *37*, 163–177.

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

Bali, M., and Akabas, M.H. (2004). Defining the propofol binding site location on the GABAA receptor. Mol. Pharmacol. *65*, 68–76.

Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., and Langer, S.Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ-Aminobutyric AcidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Structure and Receptor Function. Pharmacol Rev *50*, 291–314.

Bateson, A.N. (2004). The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential? Sleep Medicine *5, Supplement 1*, S9–S15.

Baumann, S.W., Baur, R., and Sigel, E. (2001). Subunit Arrangement of γ-Aminobutyric Acid Type A Receptors. J. Biol. Chem. *276*, 36275–36280.

Baumann, S.W., Baur, R., and Sigel, E. (2002). Forced Subunit Assembly in α1β2γ2 GABAAReceptors INSIGHT INTO THE ABSOLUTE ARRANGEMENT. J. Biol. Chem. *277*, 46020–46025.

Belelli, D., Harrison, N.L., Maguire, J., Macdonald, R.L., Walker, M.C., and Cope, D.W. (2009). Extrasynaptic GABAA Receptors: Form, Pharmacology, and Function. J. Neurosci. *29*, 12757–12763.

Benke, D., Barberis, A., Kopp, S., Altmann, K.-H., Schubiger, M., Vogt, K.E., Rudolph, U., and Möhler, H. (2009). GABA A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of

valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. Neuropharmacology *56*, 174–181.

Benke, D., Zemoura, K., and Maier, P.J. (2012). Modulation of cell surface GABAB receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. World J Biol Chem *3*, 61–72.

Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M. (2004). Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors. Physiol Rev *84*, 835–867.

Bonin, R.P., and Orser, B.A. (2008). GABAA receptor subtypes underlying general anesthesia. Pharmacology Biochemistry and Behavior *90*, 105–112.

Bormann, J. (2000). The "ABC" of GABA receptors. Trends in Pharmacological Sciences *21*, 16–19.

Buhr, A., Bianchi, M.T., Baur, R., Courtet, P., Pignay, V., Boulenger, J.P., Gallati, S., Hinkle, D.J., Macdonald, R.L., and Sigel, E. (2002). Functional characterization of the new human GABA(A) receptor mutation beta3(R192H). Hum. Genet. *111*, 154–160.

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

Cederholm, J.M.E., Schofield, P.R., and Lewis, T.M. (2009). Gating mechanisms in Cys-loop receptors. Eur Biophys J *39*, 37–49.

Chalifoux, J.R., and Carter, A.G. (2011). GABAB receptor modulation of synaptic function. Current Opinion in Neurobiology *21*, 339–344.

Chambers, M.S., Atack, J.R., Broughton, H.B., Collinson, N., Cook, S., Dawson, G.R., Hobbs, S.C., Marshall, G., Maubach, K.A., Pillai, G.V., Reeve, A.J. and MacLeod, A.M. (2003). Identification of a Novel, Selective GABAA α5 Receptor Inverse Agonist Which Enhances Cognition. J. Med. Chem. *46*, 2227–2240.

Chapouthier, G. (2003). GABA receptor subunits and global behaviour. Drug Discovery Today *8*, 778.

Charych, E.I., Liu, F., Moss, S.J., and Brandon, N.J. (2009). GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders. Neuropharmacology *57*, 481–495.

Chebib, M., and Johnston, G.A.R. (1999). The “abc” of Gaba Receptors: A Brief Review. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology *26*, 937–940.

Connolly, C.N., and Wafford, K.A. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. Biochem. Soc. Trans. *32*, 529–534.

Connolly, C.N., Krishek, B.J., McDonald, B.J., Smart, T.G., and Moss, S.J. (1996). Assembly and Cell Surface Expression of Heteromeric and Homomeric -Aminobutyric Acid Type A Receptors. J. Biol. Chem. *271*, 89–96.

Cui, W.-Y., Seneviratne, C., Gu, J., and Li, M.D. (2012). Genetics of GABAergic signaling in nicotine and alcohol dependence. Hum. Genet. *131*, 843–855.

Czyzewska, M.M., and Mozrzymas, J.W. (2013). Monoterpene α-thujone exerts a differential inhibitory action on GABAA receptors implicated in phasic and tonic GABAergic inhibition. Eur. J. Pharmacol. *702*, 38–43.

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, G.R., Maubach, K.A., Collinson, N., Cobain, M., Everitt, B.J., MacLeod, A.M., Choudhury, H.I., McDonald, L.M., Pillai, G., Rycroft, W., Smith, A.J., Sternfeld, F., Tattersall F.D., Wafford, K.A., Reynolds, D.S., Seabrook, G.R. and Atack, J.R. (2006). An Inverse Agonist Selective for α5 Subunit-Containing GABAA Receptors Enhances Cognition. J Pharmacol Exp Ther *316*, 1335–1345.

DeLorey, T.M., and Olsen, R.W. (1992). Gamma-aminobutyric acidA receptor structure and function. J. Biol. Chem. *267*, 16747–16750.

Drexler, B., Antkowiak, B., Engin, E., and Rudolph, U. (2011). Identification and characterization of anesthetic targets by mouse molecular genetics approaches. Can J Anaesth *58*, 178–190.

Drexler, D.B., Grasshoff, C., Rudolph, U., Unertl, K., and Antkowiak, B. (2006). Die GABAA-Rezeptor-Familie. Anaesthesist *55*, 287–295.

Engin, E., Liu, J., and Rudolph, U. (2012). α2-containing GABAA receptors: A target for the development of novel treatment strategies for CNS disorders. Pharmacology & Therapeutics *136*, 142–152.

Enoch, M.-A. (2008). The role of GABAA receptors in the development of alcoholism. Pharmacology Biochemistry and Behavior *90*, 95–104.

Enz, R. (2001). GABA(C) receptors: a molecular view. Biol. Chem. *382*, 1111–1122.

Ernst, M., Brauchart, D., Boresch, S., and Sieghart, W. (2003). Comparative modeling of GABAA receptors: limits, insights, future developments. Neuroscience *119*, 933–943.

Farrant, M., and Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. Nature Reviews Neuroscience *6*, 215–229.

Fatima-Shad, K., and Barry, P.H. (1993). Anion Permeation in GABA- and Glycine-Gated Channels of Mammalian Cultured Hippocampal Neurons. Proc. R. Soc. Lond. B *253*, 69–75.

Feigenspan, A., Gustincich, S., and Raviola, E. (2000). Pharmacology of GABA(A) receptors of retinal dopaminergic neurons. J. Neurophysiol. *84*, 1697–1707.

Forman, S.A. (2011). Clinical and Molecular Pharmacology of Etomidate. Anesthesiology *114*, 695–707.

Forman, S.A., and Miller, K.W. (2011). Anesthetic Sites and Allosteric Mechanisms of Action on Cys-loop Ligand-gated Ion Channels. Can J Anaesth *58*, 191–205.

Franks, N.P. (2006). Molecular targets underlying general anaesthesia. British Journal of Pharmacology *147*, S72–S81.

Ganguly, K., Schinder, A.F., Wong, S.T., and Poo, M. (2001). GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition. Cell *105*, 521–532.

Gonzalez-Burgos, G., Fish, K.N., and Lewis, D.A. (2011). GABA Neuron Alterations, Cortical Circuit Dysfunction and Cognitive Deficits in Schizophrenia. Neural Plast *2011*.

Gottesmann, C. (2002). GABA mechanisms and sleep. Neuroscience *111*, 231–239.

Grobin, A.C., Matthews, D.B., Devaud, L.L., and Morrow, A.L. (1998). The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. Psychopharmacology (Berl.) *139*, 2–19.

Hanson, S.M., and Czajkowski, C. (2008). Structural Mechanisms Underlying Benzodiazepine Modulation of the GABAA Receptor. J. Neurosci. *28*, 3490–3499.

Herd, M.B., Belelli, D., and Lambert, J.J. (2007). Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. Pharmacol. Ther. *116*, 20–34.

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

Hines, R.M., Davies, P.A., Moss, S.J., and Maguire, J. (2012). Functional regulation of GABAA receptors in nervous system pathologies. Current Opinion in Neurobiology *22*, 552–558.

Holtkamp, M., and Meierkord, H. (2007). Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostrategies. Cellular and Molecular Life Sciences *64*, 2023–2041.

Hörtnagl, H., Tasan, R.O., Wieselthaler, A., Kirchmair, E., Sieghart, W., and Sperk, G. (2013). Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABA(A) receptor subunits in the mouse brain. Neuroscience.

Hosie, A.M., Wilkins, M.E., Da Silva, H.M.A., and Smart, T.G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. Nature *444*, 486–489.

Hosie, A.M., Wilkins, M.E., and Smart, T.G. (2007). Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. Pharmacol. Ther. *116*, 7–19.

Jin, P., Zhang, J., Rowe-Teeter, C., Yang, J., Stuve, L.L., and Fu, G.K. (2004). Cloning and Characterization of a GABAA Receptor γ2 Subunit Variant. J. Biol. Chem. *279*, 1408–1414.

Johnston, G.A.R. (1996). GABAA receptor pharmacology. Pharmacology & Therapeutics *69*, 173–198.

Kent, J.M., Mathew, S.J., and Gorman, J.M. (2002). Molecular targets in the treatment of anxiety. Biol. Psychiatry *52*, 1008–1030.

Keramidas, A., Kash, T.L., and Harrison, N.L. (2006). The pre-M1 segment of the α1 subunit is a transduction element in the activation of the GABAA receptor. J Physiol *575*, 11–22.

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

Khom, S., Strommer, B., Ramharter, J., Schwarz, T., Schwarzer, C., Erker, T., Ecker, G.F., Mulzer, J., and 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.

Kopp, S., Baur, R., Sigel, E., Möhler, H., and Altmann, K.-H. (2010). Highly Potent Modulation of GABAA Receptors by Valerenic Acid Derivatives. ChemMedChem *5*, 678–681.

Kornau, H.-C. (2006). GABA(B) receptors and synaptic modulation. Cell Tissue Res. *326*, 517–533.

Korpi, E.R., Gründer, G., and Lüddens, H. (2002). Drug interactions at GABAA receptors. Progress in Neurobiology *67*, 113–159.

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

Kumar, S., Porcu, P., Werner, D.F., Matthews, D.B., Diaz-Granados, J.L., Helfand, R.S., and Morrow, A.L. (2009). The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. Psychopharmacology *205*, 529–564.

Lambert, J.D.C. (2007). GABA (Gamma Aminobutyric Acid). In Encyclopedia of Stress (Second Edition), George FinkAssociate Editors:Bruce McEwen, E. Ronald de Kloet, Robert Rubin, George Chrousos, Andrew Steptoe, Noel Rose, Ian Craig, and E.R. de K. Giora FeuersteinA2 - Editor-in-Chief: George FinkAssociate Editors:Bruce McEwen, eds. (New York: Academic Press), pp. 97–108.

Lambert, J.J., Belelli, D., Peden, D.R., Vardy, A.W., and Peters, J.A. (2003). Neurosteroid modulation of GABAA receptors. Progress in Neurobiology *71*, 67–80.

Li, K., and Xu, E. (2008). The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. Neurosci Bull *24*, 195–200.

Lobo, I.A., and Harris, R.A. (2008). GABA(A) receptors and alcohol. Pharmacol. Biochem. Behav. *90*, 90–94.

Löscher, W., and Rogawski, M.A. (2012). How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. Epilepsia *53*, 12–25.

Löw, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brünig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.-M., Rülicke, T., Bluethmann, H., Möhler, H. and Rudolph, U. (2000). Molecular and Neuronal Substrate for the Selective Attenuation of Anxiety. Science *290*, 131–134.

Luchetti, S., Huitinga, I., and Swaab, D.F. (2011). Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis. Neuroscience *191*, 6–21.

Lüddens, H., Korpi, E.R., and Seeburg, P.H. (1995). GABAA/Benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiological implications. Neuropharmacology *34*, 245–254.

Lüddens, H., Lang, H.-J., and Korpi, E.R. (1998). Structure–activity relationship of furosemide-derived compounds as antagonists of cerebellum-specific GABAA receptors. European Journal of Pharmacology *344*, 269–277.

Macdonald, R.L., and Olsen, R.W. (1994). Gabaa Receptor Channels. Annual Review of Neuroscience *17*, 569–602.

Macdonald, R.L., Gallagher, M.J., Feng, H.-J., and Kang, J. (2004). GABAA receptor epilepsy mutations. Biochemical Pharmacology *68*, 1497–1506.

Macdonald, R.L., Kang, J.-Q., and Gallagher, M.J. (2010). Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. J Physiol *588*, 1861–1869.

Mathers, D.A., Wan, X., and Puil, E. (2007). Barbiturate activation and modulation of GABAA receptors in neocortex. Neuropharmacology *52*, 1160–1168.

McKernan, R.M., Rosahl, T.W., Reynolds, D.S., Sur, C., Wafford, K.A., Atack, J.R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., Garrett, L., Bristow, L., Marshall, G., Macaulay, A., Brown, N., Howell, O., Moore, K.W., Carling, R.W., Street, L.J., Castro, J.L., Ragan, C.I., Dawson, G.R. and Whiting, P.J. (2000). Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABAA receptor α1 subtype. Nature Neuroscience *3*, 587–592.

Miller, P.S., and Smart, T.G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. Trends in Pharmacological Sciences *31*, 161–174.

Mitchell, E.A., Herd, M.B., Gunn, B.G., Lambert, J.J., and Belelli, D. (2008). Neurosteroid modulation of GABAA receptors: molecular determinants and significance in health and disease. Neurochem. Int. *52*, 588–595.

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

Möhler, H. (2007). Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABAA receptors. Journal of Neurochemistry *102*, 1–12.

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., and Rudolph, U. (2001). GABAA-receptor subtypes: a new pharmacology. Current Opinion in Pharmacology *1*, 22–25.

Olsen, R.W., and Li, G.-D. (2011). GABAA receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. Can J Anaesth *58*, 206–215.

Olsen, R.W., and Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ-Aminobutyric AcidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. Pharmacol Rev *60*, 243–260.

Olsen, R.W., and Tobin, A.J. (1990). Molecular biology of GABAA receptors. FASEB J *4*, 1469–1480.

Owens, D.F., and Kriegstein, A.R. (2002). Is there more to gaba than synaptic inhibition? Nature Reviews Neuroscience *3*, 715–727.

Petroff, O.A.C. (2002). Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. Neuroscientist *8*, 562–573.

Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., and Sperk, G. (2000). GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. Neuroscience *101*, 815–850.

Podell, M. (1998). Antiepileptic drug therapy. Clinical Techniques in Small Animal Practice *13*, 185–192.

Pym, L.J., Cook, S.M., Rosahl, T., McKernan, R.M., and Atack, J.R. (2005). Selective labelling of diazepam-insensitive GABAA receptors in vivo using [3H]Ro 15-4513. British Journal of Pharmacology *146*, 817–825.

Reynolds, D.S. (2008). The value of genetic and pharmacological approaches to understanding the complexities of GABAA receptor subtype functions: The anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacology Biochemistry and Behavior *90*, 37–42.

Reynolds, D.S., McKernan, R.M., and Dawson, G.R. (2001). Anxiolytic-like action of diazepam: which GABAA receptor subtype is involved? Trends in Pharmacological Sciences *22*, 402.

Reynolds, D.S., Rosahl, T.W., Cirone, J., O'Meara, G.F., Haythornthwaite, A., Newman, R.J., Myers, J., Sur, C., Howell, O., Rutter, A.R., Atack, J., Macaulay, A.J., Hadingham, K.L., Hutson, P.H., Belelli, D., Lambert, J.J., Dawson, G.R., McKernan, R., Whiting, P.J. and Wafford, K.A. (2003). Sedation and Anesthesia Mediated by Distinct GABAA Receptor Isoforms. J. Neurosci. *23*, 8608–8617.

Rudolph, U., and Knoflach, F. (2011). Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. Nature Reviews Drug Discovery *10*, 685–697.

Rudolph, U., and Möhler, H. (2006). GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. Current Opinion in Pharmacology *6*, 18–23.

Rudolph, U., Crestani, F., and Möhler, H. (2001). GABAA receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. Trends in Pharmacological Sciences *22*, 188–194.

Sancar, F., and Czajkowski, C. (2011). Allosteric modulators induce distinct movements at the GABA-binding site interface of the GABA-A receptor. Neuropharmacology *60*, 520–528.

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

Sieghart, W., and Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Curr Top Med Chem *2*, 795–816.

Sieghart, W., Ramerstorfer, J., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., and Ernst, M. (2012). A novel GABAA receptor pharmacology: drugs interacting with the α+β- interface. British Journal of Pharmacology *166*, 476–485.

Sigel, E., and Steinmann, M.E. (2012). Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors. J. Biol. Chem. *287*, 40224–40231.

Simon, J., Wakimoto, H., Fujita, N., Lalande, M., and Barnard, E.A. (2004). Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. J. Biol. Chem. *279*, 41422–41435.

Siriwardena, A.N., Qureshi, M.Z., Dyas, J.V., Middleton, H., and Orner, R. (2008). Magic bullets for insomnia? Patients' use and experiences of newer (Z drugs) versus older (benzodiazepine) hypnotics for sleep problems in primary care. British Journal of General Practice *58*, 417–422.

Smith, G.B., and Olsen, R.W. (1995). Functional domains of GABAA receptors. Trends in Pharmacological Sciences *16*, 162–168.

Smith, Y., Charara, A., Paquet, M., Kieval, J.Z., Paré, J.-F., Hanson, J.E., Hubert, G.W., Kuwajima, M., and Levey, A.I. (2001). Ionotropic and metabotropic GABA and glutamate receptors in primate basal ganglia. Journal of Chemical Neuroanatomy *22*, 13–42.

Tan, K.R., Rudolph, U., and Lüscher, C. (2011). Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. Trends in Neurosciences *34*, 188–197.

Taylor, P.M., Connolly, C.N., Kittler, J.T., Gorrie, G.H., Hosie, A., Smart, T.G., and Moss, S.J. (2000). Identification of Residues within GABAA Receptor α Subunits That Mediate Specific Assembly with Receptor β Subunits. J. Neurosci. *20*, 1297–1306.

Teissére, J.A., and Czajkowski, C. (2001). A β-Strand in the γ2 Subunit Lines the Benzodiazepine Binding Site of the GABAA Receptor: Structural Rearrangements Detected during Channel Gating. J. Neurosci. *21*, 4977–4986.

Thase, M.E. (2006). Depression and sleep: pathophysiology and treatment. Dialogues Clin Neurosci *8*, 217–226.

Thompson, S.A., Arden, S.A., Marshall, G., Wingrove, P.B., Whiting, P.J., and Wafford, K.A. (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.

Tillakaratne, N.J., Medina-Kauwe, L., and Gibson, K.M. (1995). gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. *112*, 247–263.

Treiman, D.M. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. Epilepsia *42 Suppl 3*, 8–12.

Tretter, V., Ehya, N., Fuchs, K., and Sieghart, W. (1997). Stoichiometry and Assembly of a Recombinant GABAA Receptor Subtype. J. Neurosci. *17*, 2728–2737.

Uusi-Oukari, M., and Korpi, E.R. (2010). Regulation of GABAA Receptor Subunit Expression by Pharmacological Agents. Pharmacol Rev *62*, 97–135.

Wall, M.J. (2002). Furosemide reveals heterogeneous GABAA receptor expression at adult rat Golgi cell to granule cell synapses. Neuropharmacology *43*, 737–749.

Wang, M. (2011). Neurosteroids and GABA-A receptor function. Front. Endocrin. *2*, 44.

Wang, D.-S., and Orser, B.A. (2011). Inhibition of learning and memory by general anesthetics. Can J Anaesth *58*, 167–177.

Wang, Q., Han, Y., and Xue, H. (1999). Ligands of the GABAA Receptor Benzodiazepine Binding Site. CNS Drug Reviews *5*, 125–144.

Whiting, P.J. (2003). GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? Drug Discovery Today *8*, 445–450.

Yanovsky, Y., Schubring, S., Fleischer, W., Gisselmann, G., Zhu, X.-R., Lübbert, H., Hatt, H., Rudolph, U., Haas, H.L., and Sergeeva, O.A. (2011). GABAA receptors involved in sleep and anaesthesia: β1- versus β3-containing assemblies. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology *463*, 187–199.

Lebenslauf

NAME	Lisa HOLLER
ADRESSE	Arndtstraße 13/23, 1120 Wien
GEBURTSDATUM	11.6.1989
NATIONALITÄT	Österreich

AUSBILDUNG	Okt. 2007 – März 2013	Studium der Pharmzie
		Universität Wien
	2004 – 2007	BORG Oberschützen
		7432 Oberschützen
	2000 – 2004	Hauptschule Rechnitz
		7471 Rechnitz
	1996 – 2000	Volksschule Rechnitz
		7471 Rechnitz

AUSBILDUNGSRELEVANTE BERUFSERFAHRUNG

Praxisarbeit in der Engel Apotheke, 7471 Rechnitz,	
in den Jahren:	September 2009
	Juni 2010
	Juli 2011
	Juni/Juli 2012

SPRACHKENNTISSE	Englisch	fließend
	Latein	Grundkenntnisse