universität wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Einfluss des β-Subtyps auf die Modulation von $GABA_A$-Rezeptoren durch ausgewählte Liganden

verfasst von / submitted by

Martina Hufnagel

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet:	Diplomstudium Pharmazie
Betreut von / Supervisor:	Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering

Danksagung

Zu Beginn bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit, am Department für Pharmakologie und Toxikologie, sowie für die Bereitstellung dieses interessanten Themas.

Mein herzlichster Dank gebührt Mag. Dr. Denise Luger, für die vielen fachlichen Hilfestellungen, die engagierte Betreuung sowie für die geduldige Beantwortung vieler Fragen sowohl während des praktischen Arbeiten am Department, als auch bei der Verfassung dieser Diplomarbeit. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Mag. Dr. Sophia Khom und Mag. Marco Stadler, die mich ebenfalls ständig unterstützt haben, bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe rund um Herrn Univ.-Prof. Mihovilovic sowie DI Dr. Gerit Pototschnig (Institut für angewandte Synthesechemie, TU Wien), die die untersuchten Substanzen zur Verfügung gestellt hat, sowie bei Frau Dipl.-Ing (FH) Dr. Annette Hohaus für die Bereitstellung der cRNA.

Stellvertretend für meine vielen, lieben Studienkollegen und Freunde danke ich Lisa und Miriam für die schöne gemeinsame Zeit und dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und für den starken Rückhalt über die gesamte Dauer meines Studiums.

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung 1

II Abstract 3

III ALLGEMEINER TEIL 5

1 γ-Aminobuttersäure 5

1.1 Synthese und Metabolismus 5

2 GABA-Rezeptoren 9

2.1 $GABA_A$-Rezeptor 11

2.2 Der $GABA_C$-Rezeptor 23

3 Liganden am $GABA_A$-Rezeptor und ihre Bindungsstellen 24

3.1 Agonisten 24

3.2 Antagonisten 26

3.3 Modulatoren 26

IV PRAKTISCHER TEIL 33

4 Aufgabenstellung und Zielsetzung 33

5 Materialien und Methoden 34

5.1. Verwendete Materialien und Software 34

5.2. Oozyten des *Xenopus laevis* 35

5.3. Gewinnung und Präparation der Oozyten 36

5.4 Mikroinjektion der cRNA 37

5.5 Messlösungen 37

5.6 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik 38

5.7. Perfusionskammer und Pipettierstation 39

5.8. Verwendete Software **40**

6 Ergebnisse 42

6.1 Auswertung **42**

6.2 Berechnung **43**

6.3 GABA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve **44**

6.4 Modulation von I_{GABA} durch Derivate der VA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptorsubtypen **46**

V Diskussion **61**

VI Abkürzungen **68**

VII Abbildungsverzeichnis **70**

VIII Tabellenverzeichnis **72**

IX Literaturverzeichnis **73**

I Zusammenfassung

Hintergrund: $GABA_A$-Rezeptoren zählen zu den wichtigsten neuroinhibitorischen Rezeptoren im Gehirn. $GABA_A$-Rezeptor-Modulatoren werden aufgrund ihrer anxiolytischen, sedierenden, antikonvulsiven und muskelrelaxierenden Wirkungen zur Therapie zahlreicher Erkrankungen eingesetzt. Diese Substanzen sind wirksame Therapeutika, aber aufgrund ihrer meist unselektiven Interaktion mit zahlreichen $GABA_A$-Rezeptor-Subtypen oft mit einer Reihe von Nebenwirkungen verbunden. Die Identifikation subtyp-selektiver Liganden steht daher im Vordergrund, um Substanzen mit spezifischerem Wirkprofil und einer reduzierten Anzahl unerwünschter Begleitwirkungen zu entwickeln.

Zielsetzung: Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die β-subtypspezifische Modulation von GABA-induzierten Chlorid-Strömen (I_{GABA}) durch fünf Derivate (MH340, MH346, MH350, MH409, MH 661) des Naturstoffes Valerensäure (VA) an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren untersucht.

Methode: Expression von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten und Messung der konzentrationsabhängigen Modulation von I_{GABA} durch die Derivate mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik.

Ergebnisse und Diskussion: Die höchste Potenzierung von I_{GABA} erreichte Derivat MH409 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren (E_{max}= 2206,7 ± 217,0%, n=5). Auch an $\beta_{2/3}$-haltigen Rezeptoren wurde die $GABA_{EC5\text{-}7}$ durch MH409 signifikant stärker potenziert als durch VA (E_{max} an β_2: 1439,9 ± 101,0%, n=4; β_3: 1118,3 ± 44,4%, n=3). MH409 ist damit das erste Valerensäure-Derivat, das eine wirksame und potente Modulation von β_1-Rezeptoren aufweist. Derivat MH661 potenzierte I_{GABA} ebenso an allen Rezeptorsubtypen signifikant stärker als VA (E_{max} an β_1:417,5 ± 36,4%, n=3; β_2: 1227,8 ± 140,4%, n=7; β_3: 1260,6 ± 165,6%, n=6), die $\beta_{2/3}$-Selektivität des Ausgangsstoffes blieb jedoch erhalten. Derivat MH340 potenzierte I_{GABA}, verglichen mit VA, ähnlich stark (E_{max} an β_1: 141,6 ± 52,2%, n=8; β_2: 629,6 ± 124,0%, n=6; β_3: 503,2 ± 68,0%, n=7), wies allerdings eine geringere Potenz auf. Die Derivate MH346 und MH350 modulierten $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren nur marginal und $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ nicht signifikant.

Diese Arbeit zeigt, dass Modifikation am Molekül der Valerensäure die Wirksamkeit, Potenz und die β-Subtyp-Selektivität drastisch beeinflussen. Ob und wie sich diese Modifikationen auf die Interaktion dieser Liganden mit deren Bindungsstellen am $GABA_A$-Rezeptor sowie deren Wirkungen *in vivo* auswirken, sollte Fokus weiterer Untersuchungen sein.

II Abstract

Background: $GABA_A$ receptors represent the most important inhibitory neurotransmitter receptors in the brain. $GABA_A$ receptor modulators display anxiolytic, sedative, anticonvulsive and muscle relaxant effects and are therefore used to treat several disease states. These compounds are effective therapeutics, but are associated with several side effects due to their unselective modulation of several $GABA_A$ receptor subtypes. Therefore, the identification of subtype-selective ligands is crucial to develop compounds offering a more specific pharmacological profile and less side effects.

Aim: β-subunit specific modulation of GABA-induced currents (I_{GABA}) by five valerenic acid (VA) derivatives (MH340, MH346, MH350, MH409, MH661) was studied on $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$ receptors.

Method: $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$ receptors were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and the concentration-dependent modulation of I_{GABA} by was measured by means of the 2-microelectrode voltage clamp technique.

Results and discussion: The most pronounced potentiation of I_{GABA} was detected with derivative MH409 on $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ receptors (E_{max}= 2206,7 ± 217,0%, n=5). This derivative also modulated $\beta_{2/3}$-containing receptors more efficaciously compared to VA (E_{max} at β_2: 1439,9 ± 101,0%, n=4; β_3: 1118,3 ± 44,4%, n=3); Thus, derivative MH409 is the first reported valerenic acid derivative with pronounced efficacy and potency on β_1-containing $GABA_A$ receptors. Derivative MH661 also displayed higher efficacy than VA on all tested receptor subtypes (E_{max} at β_1: 417,5 ± 36,4%, n=3; β_2: 1227,8 ± 140,4%, n=7; β_3: 1260,6 ± 165,6%, n=6), however with preserved $\beta_{2/3}$ subunit selectivity. Derivative MH340 modulated I_{GABA} on all tested subtypes with comparable efficacy than VA (E_{max} at β_1: 141,6 ± 52,2% n=8; β_2: 629,6 ± 124,0%, n=6; β_3: 503,2 ± 68,0%, n=7), but displayed reduced potency). Two derivatives, MH346 and MH350, showed only residual activity on $\beta_{2/3}$-containing receptors and did not significantly modulate β_1-receptors.
This works shows, that modification to the VA molecule significantly alter efficacy, potency and β-subunit selectivity. Future studies are needed to analyse the impact of these modifications to the interaction with corresponding binding sites and the *in vivo* activity of these ligands.

III ALLGEMEINER TEIL

1 γ-Aminobuttersäure

Gamma Aminobuttersäure, kurz GABA, ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im ZNS der Säuger. Im Gegensatz zu Glutamat, das nach Rezeptorbindung eine exzitatorische Wirkung entfaltet, wurde für GABA, an seine spezifischen Rezeptoren gebunden, grundsätzlich eine inhibitorische Wirkung bestätigt (Olsen und Sieghart, 2008).

1.1 Synthese und Metabolismus

GABA ist eine nicht proteinogene Aminosäure, das primäre Amin der nicht essentiellen Aminosäure Glutaminsäure (Shelp et al., 1999; siehe **Abbildung 1**). Die inhibitorisch wirksame GABA entsteht aus dem exzitatorisch wirksamen Glutamat durch nur einen Decarboxylierungs-Schritt (Roth und Draguhn, 2012).

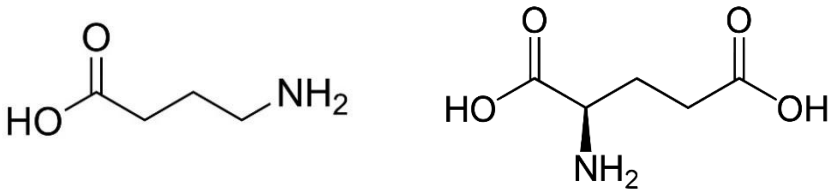

Abbildung 1: Strukturformel von GABA (links) und Glutaminsäure (rechts)

Glutamin wird durch Gultamat-Synthase zu Glutamat oxidiert, das in GABAergen Neuronen durch Glutamat-Decarboxylase (GAD) zu GABA umgewandelt wird (Roth und Draguhn, 2012; siehe **Abbildung 2** und **Abbildung 3**). GAD existiert in zwei Isoformen, GAD67 und GAD65. Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrer intraneuralen Verteilung: GAD67 ist ubiquitär verteilt, wogegen GAD65 primär in den präsynaptischen Terminalien vorkommt. Zudem wurde gezeigt, dass GAD67 in größerer Menge als aktive

holoenzymatische Form vorliegt als GAD65 (Kaufman et al., 1991; Soghomonian et al., 1998). Da GAD65 auch mit vesikulären GABA Transporter (VGAT) interagiert, ist es nicht nur an der Synthese, sondern auch an der Speicherung von GABA beteiligt (Jin et al., 2003; Roth und Draguhn, 2012).

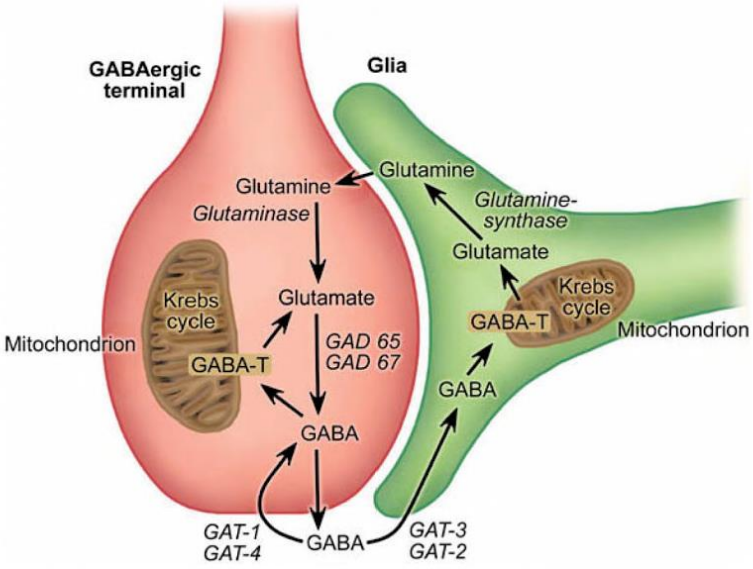

Abbildung 2: Biosyntheseweg und Metabolismus von GABA in eine Nervenendigung und einer Gliazelle (von Bohlen und Halbach, Dermietzel; 2006)

GABAerge Neuronen sind überwiegend Interneurone, sie kommen in fast allen Bereichen des Hirns vor: in den Riechbahnen, dem limbischen System und im Groß- und Kleinhirn. 20-30% aller Neuronen im Gehirn sind GABAerg (Bloom, 1971).

Nach der Synthese wird GABA präsynaptisch in Vesikeln gespeichert. Dies geschieht mit Hilfe der Protonen/GABA-Antiporter VGAT (= VIAAT vesicular inhibitory amino acid transporter) (Fon, 2001; Jin et al., 2003; Roth und Draguhn, 2012). Anschließend wird der Neurotransmitter durch Ca^{2+}-abhängige Exocytose in den synaptischen Spalt freigesetzt, die Vesikel docken dabei an die Membran an und es kommt zu einer Fusion, bei der GABA in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird. Dieser Vorgang wird durch SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex) Proteine

unterstützt. Sie bilden einen ternären Komplex, durch den der Vesikel mit der Membran verschmilzt (Fan et al., 2006).

Nach der Freisetzung kann GABA mit spezifischen Rezeptoren im synaptischen und extrasynaptischen Raum interagieren (siehe **Kapitel 2 GABA-Rezeptoren**). Ungebundene GABA wird durch GABA-Transporter (GAT) wieder in präsynaptische Neuronen oder Gliazellen aufgenommen (Cherubini et al., 2001). Dies geschieht unter anderem, um ein „spill-over" von GABA zu den benachbarten Synapsen und somit eine übermäßige Aktivierung der synaptischen und extrasynaptischen GABA Rezeptoren zu vermindern (Jin et al., 2011). Derzeit sind 3 Isoformen des GABA-Transporters bekannt: GAT 1-3. GAT 1 ist hauptsächlich in neuronalen Termini lokalisiert, im Gegensatz zu GAT 3, der sich vor allem an der Membran von Gliazellen wiederfindet. GAT 2-mRNA kommt im Gehirn selten vor (Durkin et al., 1995; Jin et al., 2011). Der membranständige Teil des GAT besteht aus 12 Segmenten (von Bohlen und Halbach, Dermietzel, 2006). GATs sind GABA/Na+/Cl-gekoppelte Transporter, die GABA gegen Na^+- und Cl^--Ionen tauschen, wobei der elektrochemische Na^+-Gradient die primäre Triebkraft für den GABA-Uptake in die Zelle ist. Chlorid alleine kann die Wiederaufnahme nicht induzieren, allerdings trägt es zu einer signifikanten Verbesserung bei. Chlorid-Ionen binden an den Transporter und verstärken somit die Affinität zum Substrat. Bei dem Transport werden zwei Natrium-Ionen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle transportiert. (Sacher et al., 2002; von Bohlen und Halbach, Dermietzel, 2006; Jin et al, 2011)

Durch GAT wieder in die Zelle aufgenommene GABA kann erneut in Vesikeln gespeichert werden oder durch GABA-Transaminase (GABA-T) abgebaut werden (Roberts, 1998; Owens & Kriegstein, 2002; siehe **Abbildung 2** und **Abbildung 3**). Dabei wird GABA durch Transaminierung zu Succinat-Semialdehyd (SSA) umwandelt. SSA kann einerseits durch SSA-Dehydrogenase zu Succinat oxidiert werden, einem Bestandteil des Citratzyklus, andererseits durch γ-OH-Buttersäure-Dehydrogenase (GHBDH) zu γ-OH-Buttersäure reduziert werden, welche $GABA_B$-Rezeptoren aktivieren kann. (Kaupmann et al., 2003; Rowley et al., 2012)

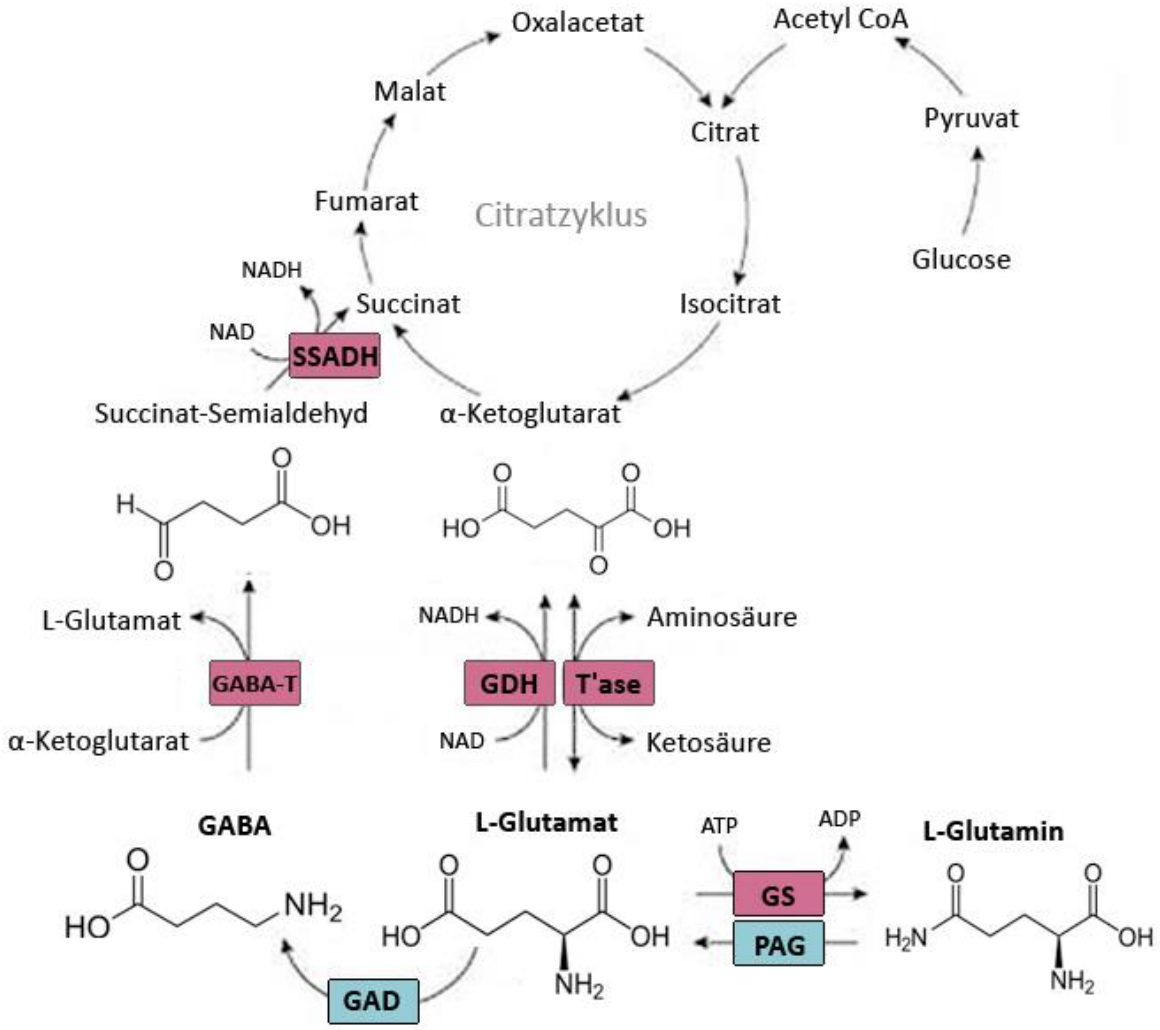

Abbildung 3:Schematische Darstellung der Synthese und des Abbaus von GABA; Abkürzungen in Kästchen bezeichnen Enzyme, die in Neuronen (blau) bzw. in Neuronen und Gliazellen (rot) für die Synthese und den Abbau von GABA verantwortlich sind. (GABA-T: GABA-Transaminase; GAD: Glutamat-Decarboxylase; GDH: Glutamat-Dehydrogenase; GS: Glutamin-Synthetase; PAG: phosphataktivierte Glutaminase; SSADH: Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase; T'ase: Aminotransferasen, einschließlich Aspartat und Alanin Aminotransferasen)
(modifiziert von: https://www.drugtimes.org/brain-function/neurochemistry-of-gaba.html)

2 GABA-Rezeptoren

Es gibt zwei Typen von GABA Rezeptoren: schnell reagierende ionotrope GABA Typ A Rezeptoren und langsamer reagierende metabotrope GABA Typ B Rezeptoren (Sieghart, 2006; Bowery, 2010). Ein dritter Rezeptortyp, der in der Retina nachgewiesen wurde, welcher anfänglich als GABA Typ C Rezeptor bezeichnet wurde, wurde mittlerweile vom Nomenklaturkomitee der IUPHAR (International Union of Pharmacology) ebenfalls der Gruppe der $GABA_A$-Rezeptoren zugeordnet und als $GABA_{A0r}$-Rezeptor bezeichnet (Bormann und Feigenspan, 1995). Trotzdem ist der Terminus „$GABA_C$-Rezeptor“ noch weit verbreitet, da sich dieser Rezeptor in seinen pharmakologischen Eigenschaften deutlich vom klassischen $GABA_A$-Rezeptor unterscheidet (Bormann, 2000). $GABA_A$-, $GABA_B$-, und $GABA_{A0R}$- ($GABA_C$-) Rezeptoren unterscheiden sich maßgeblich im Gating (direkt vs. indirekt), den beteiligten Messenger Molekülen, dem strukturellen Aufbau, der Kanalphysiologie und der Interaktion mit Agonisten, Antagonisten und Modulatoren (siehe **Tabelle 1**) (Johnston, 1996).

GABA-Rezeptor-typ	Unter-einheiten	Agonisten (Auswahl)	Antagonisten (Auswahl)	Modulatoren (Auswahl)	Kanal-physiologie	G-Prot. Sec. Mess.
$GABA_A$	α 1-6	GABA	Bicucullin	Benzodiazepine	Cl^- ↑	
	β 1-3	Muscimol	Picrotoxin (Porenblocker)	Babiturate	30 pS	
	γ 1-3			Neurosteroide	30 ms offen	
	δ, ε, π, θ			uvm.	Aktiv./Inaktiv. schnell	
$GABA_C$	ρ 1-3	GABA	3-APA	PKC	Cl^- ↑	
		CACA	3-APMPA		7 pS	
		CAMP	Picrotoxin (Porenblocker)		150 ms offen	
					Aktiv./Inaktiv. schnell	
$GABA_B$	7 TM-Rezeptor	GABA	Phaclofen	CGP7930	K^+ ↑	Gi/Go
	$R1_{a-d}$	Baclofen	Saclofen	GS39783	Ca^{2+} ↓	AC ↓
	$R2_{a-c}$					cAmp↓
	(heterodimer)					

Tabelle 1: Eigenschaften der verschiedenen GABA-Rezeptor-Typen. Liste der Agonisten, Antagonisten und Modulatoren ist nicht komplett und enthält eine Auswahl. CACA = cis-aminocrotonic acid; CAMP = cis-2-(aminomethyl)cyclopropylcarboxylic acid; 3-APA= 3-aminopropanesulfonic acid; 3-AMPA = 3-Aminopropyl(methyl)phosphinic acid; (Pin, Prézeau 2007; von Bohlen und Halbach, Dermietzel, 2006; Johnston, 1996)

2.1 $GABA_A$-Rezeptor

$GABA_A$-Rezeptoren (siehe **Abbildung 4**) sind Anionen-selektive Ionenkanäle und zählen, wie auch nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR), inhibitorische Glycinrezeptoren (GlyR), ionotrope Serotonin Typ 3 (5-HT3)-Rezeptoren und Zn^{2+}-aktivierte Ionenkanäle, zur Überfamilie der Cys-Loop Liganden gesteuerter Ionenkanäle (LGIC; ligand-gated ion channels) (Lukas und Bencherif, 2006; Breitinger und Becker, 2002; Corringer et al., 2000; Thompson und Lummis, 2006). Diese Cys-Loop Rezeptoren unterscheiden sich durch ihren pentameren Aufbau grundsätzlich von zwei weiteren Mitgliedern der LGIC Überfamilie, den tetrameren Glutamatrezeptoren und den trimeren Purinrezeptoren (Chen und Wyllie, 2006; Khakh et al., 2001; Khakh und North, 2006). Cys-Loop Rezeptoren zeigen in ihrer Aminosäure-Sequenz rund 30% Übereinstimmung untereinander und weisen Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur auf (Sigel und Buhr, 1997; Corringer et al. 2000; Olsen und Sawyer, 2004).

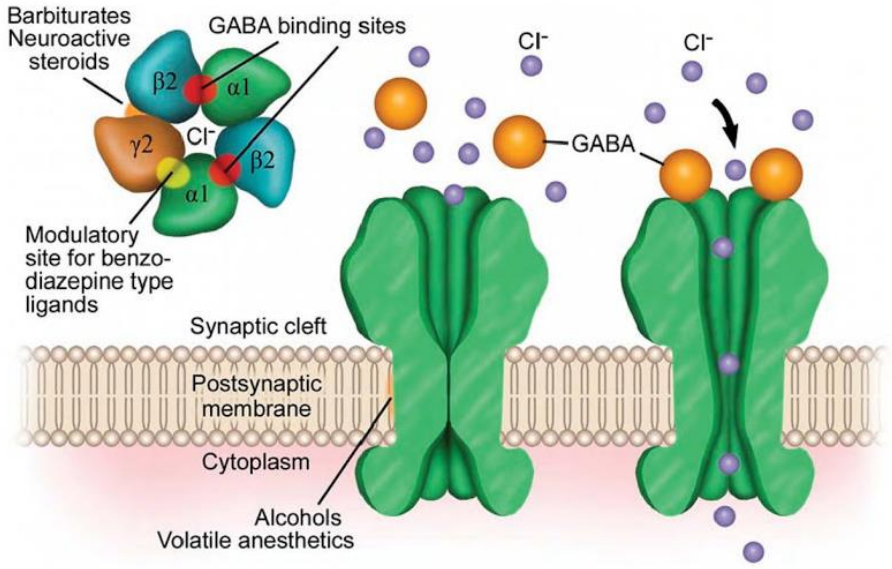

Abbildung 4: Schematische Darstellung des $GABA_A$-Rezeptors mit seinen Bindungsstellen für Liganden (links oben); Links in geschlossenem Zustand, rechts in geöffnetem Zustand. (von Bohlen und Halbach, Dermietzel; 2006)

2.1.1 Funktion und Wirkungsweise

$GABA_A$-Rezeptoren vermitteln eine schnelle, hemmende Neurotransmission im Säugetiergehirn (Olsen und Sieghart, 2008). Auch außerhalb des zentralen Nervensystems, in der Leber (Minuk et al., 2007), den glatten Muskelzellen der Lunge (Mizuta et al., 2008) und in Immunzellen (Bjurst¨om et al., 2008) sind sie präsent.

GABA-Rezeptoren regulieren Emotionen, kognitive Funktionen, Schmerzempfindung, Muskeltonus, Vigilanz, circadiane Rhythmik, Ess- und Trinkgewohnheiten, Lernen und Gedächtnis (Sieghart et al., 2012) und sind damit interessante Angriffspunkte für klinisch wirksame Substanzen (Rudolph und Knoflach, 2011).
Typische Agonisten und somit zu einer Aktivierung des $GABA_A$-Rezeptors führend, sind GABA selbst (γ-Aminobuttersäure) und Muscimol. Im Gegensatz dazu hemmt Bicucullin den Rezeptor kompetitiv, durch Picrotoxin wird der Rezeptor nicht-kompetitiv inhibiert. Klassische Modulatoren des $GABA_A$-Rezeptors sind unter anderem Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroide, Anästhetika und Ethanol (siehe **Kapitel 3 Liganden am $GABA_A$-Rezeptor und ihre Bindungsstellen**). (Olsen und Li, 2011)

Die Bindung eines Agonisten an $GABA_A$-Rezeptoren verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors. Es kommt zur Öffnung der Kanalpore und der Rezeptor wird durchlässig für Chlorid-Ionen und HCO_3-Ionen, wobei die Affinität des Rezeptors für Chlorid-Ionen wesentlich höher ist (Kaila, 1994; Doyon et al., 2011; Raimondo et al.; 2012). Unter physiologischen Bedingungen im adulten Gehirn (extrazelluläre Chlorid-Konzentration ist höher als intrazelluläre) (siehe **Abbildung 5 A** links) fließt Cl^- nach Öffnung der Kanalpore des $GABA_A$-Rezeptors entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle, dies führt zu einer Erhöhung des Ruhemembranpotentials von -65 auf -70 mV. Daraus resultiert ein inhibitorischer postsynaptischer Strom (IPSC; inhibitory postsynaptic current), die Entstehung eines Aktionspotentials in den Postsynapsen wird unterdrückt, es kommt zur neuronalen Hemmung. (Rivere et al.; 1999)
Positive allosterische Modulatoren wie Benzodiazepine (siehe **Abbildung 5 A** Mitte) können an den $GABA_A$-Rezeptor binden, um das Gating zu verändern, mit dem Effekt einer

Zunahme der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit und des Cl^- Einstroms, dadurch wird die neuronale Hemmung erhöht (Bonin und De Koninck, 2013).

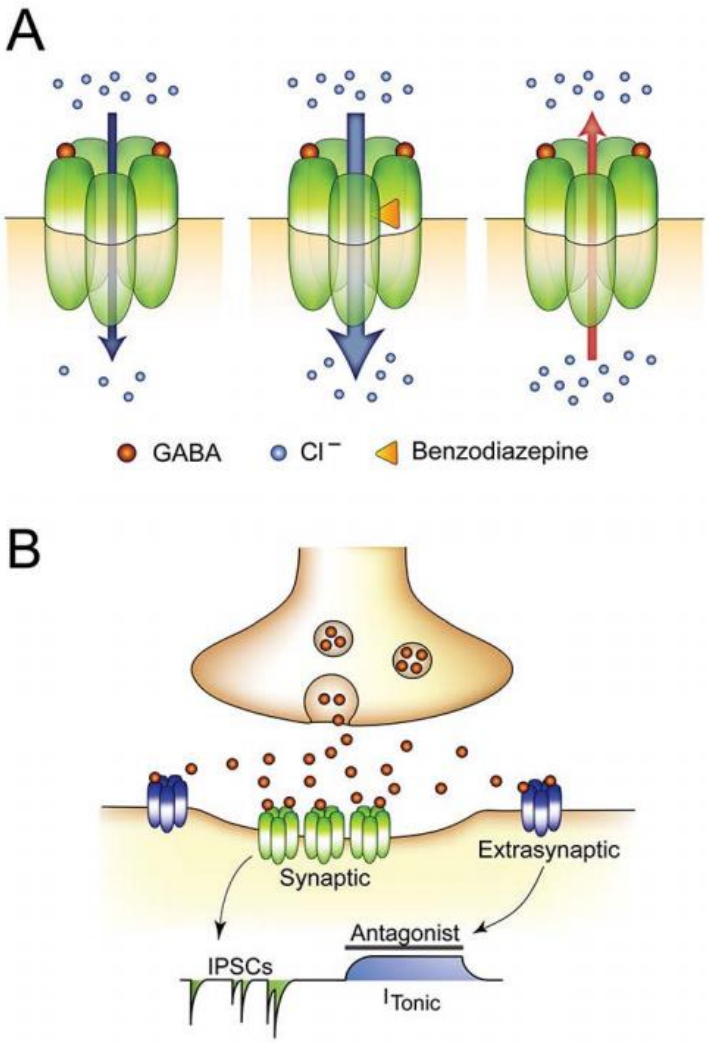

Abbildung 5: **(A)** Schematische Darstellung des Chloridstroms bei (links) rezeptorgebundener GABA, (Mitte) zusätzlich moduliert durch Benzodiazepine und (rechts) erhöhter intrazellulärer Chlorid-Konzentration. **(B)** Schematische Darstellung einer Synapse mit synaptischer (phasischer) und extrasynaptischer (tonischer) Aktivierung der $GABA_A$-Rezeptoren durch GABA. (modifiziert von Bonin et al., 2008)

2.1.1.1 Sonderfall: Exzitatorische Wirkung von GABA

Unter der Bedingung einer erhöhten intrazellulären Cl^--Konzentration (siehe **Abbildung 5 A** rechts), fließt Cl^- bei geöffneter $GABA_A$-Rezeptorpore entlang des

Konzentrationsgradienten in Richtung des extrazellulären Raumes, was zu einer Erregung des Neurons führt (Bonin und De Koninck, 2013).

Erhöhte intrazelluläre Chlorid-Konzentrationen findet man vor allem in neonatalen Nervenzellen, nur sehr selten treten diese in reifen Neuronen auf (Mody and Pearce, 2004).

Für die Aufrechterhaltung des intra- und extrazellulären Chlorid-Gradienten sind unter anderem K^+/Cl^--Cotransporter verantwortlich, die Chloridionen gegen das Konzentrationsgefälle nach außen befördern. In unreifen, pränatalen Neuronen wurde eine geringere mRNA-Konzentration für den K^+/Cl^--Cotransporter-Subtyp KCC2 als in reifen Neuronen nachgewiesen. Dies führt zu einem geringeren Konzentrationsunterschied zwischen der intrazellulären und extrazellulären Chlorid-Konzentration und wird mit der vorwiegend depolarisierenden Wirkung aktivierter $GABA_A$-Rezeptoren in unreifen Neuronen assoziiert. (Rivera et al., 1999; Prescott et al., 2006)

2.1.1.2 Phasische und tonische Aktivierung von $GABA_A$-Rezeptoren

$GABA_A$-Rezeptoren können innerhalb der Synapse (synaptisch) oder außerhalb der Synapse (extrasynaptisch) lokalisiert sein. Im Allgemeinen werden synaptische $GABA_A$-Rezeptoren durch hohe GABA-Konzentrationen, die von präsynaptischen Neuronen freigesetzt werden, aktiviert (Mody und Pearce, 2004; Vinkers und Olivier, 2012). Diese desensibilisieren schnell und vermitteln phasische Inhibition. Extrasynaptische $GABA_A$-Rezeptoren werden bereits durch niedrige Konzentrationen von GABA im extrazellulären Raum aktiviert, da sie eine höhere Affinität für GABA aufweisen als synaptische Rezeptoren. Die niedrigen Desensibilisierungsraten von extrasynaptischen Rezeptoren ermöglichen die Erzeugung eines kontinuierlichen oder "tonischen" Stroms (I_{tonic}) (siehe **Abbildung 5 B**). Der tonische $GABA_A$-Strom kann durch Blockierung der $GABA_A$-Rezeptor-Aktivität, mit einem Antagonisten, gezeigt werden. (Bonin und De Koninck, 2013)

2.1.2 Struktur

Der GABA Typ A ($GABA_A$) Rezeptor ist ein transmembranäres Pentamer. Fünf Untereinheiten sind ringförmig angeordnet, so dass sich eine zentrale Kanalpore bildet (siehe **Abbildung 6 B**). Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer langen extrazellulären N-terminalen Region, vier transmembranären Domänen (TM1- 4), einer cytoplasmatischen Schleife, die TM3 und TM4 verbindet, und einem kurzen extrazellulären C-Terminus. (Macdonald und Olsen, 1994; Kash et al., 2004; Jacob et al., 2008; Bormann, 2000)

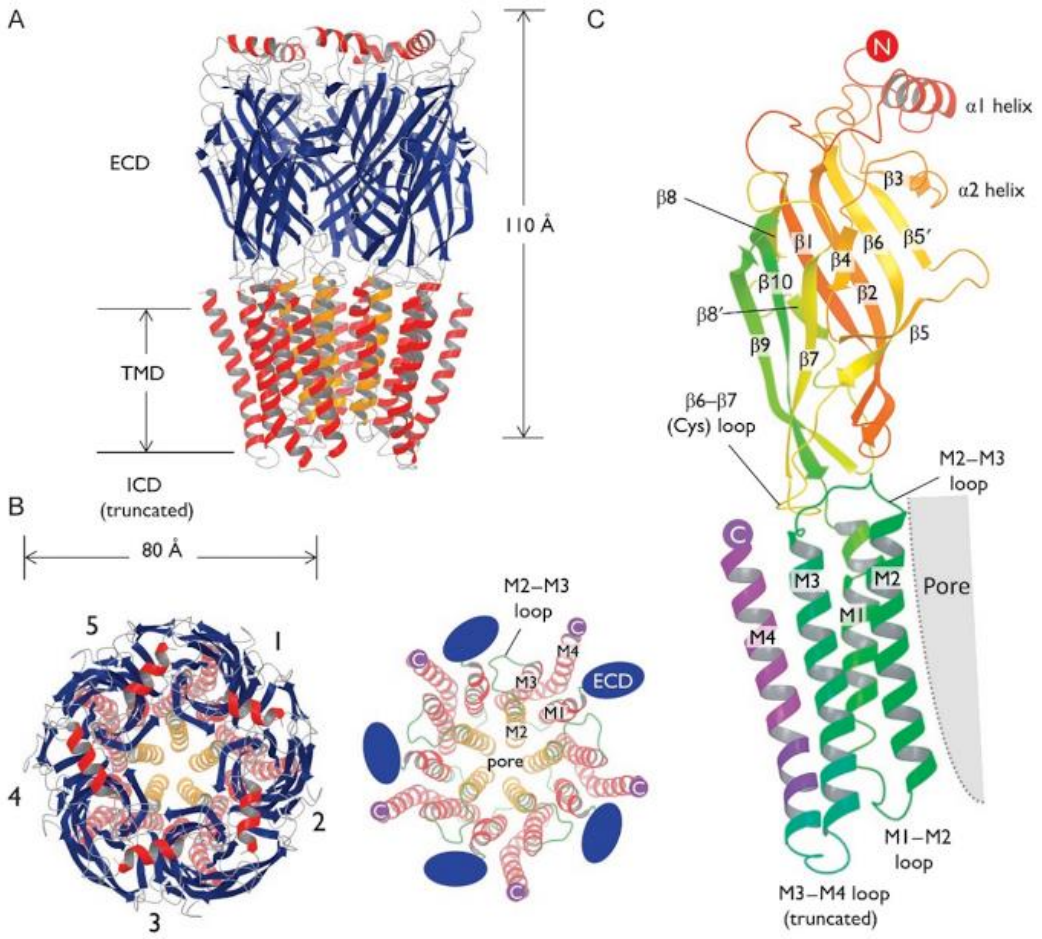

Abbildung 6: (A) $GABA_A$-Rezeptor parallel zur Membran betrachtet: gefärbte Bereiche zeigen Elemente der Sekundärstruktur: Porenbildende α-Helices (orange), α-Helices (rot), β-Faltblatt (blau); ECD = extrazelluläre Domain, TMD = transmembrane Domäne, ICD = intrazelluläre Domäne, Größe des Rezeptors in Å (Ångström) angegeben. **(B)** Links: $GABA_A$-Rezeptor mit den fünf Untereinheiten (1-5) von extrazellulärer Seite aus betrachtet. Rechts: Anordnung der transmembranen Domänen (M1-4), C-Terminus (violett) und M2-M3-Loop (grün). **(C)** Aufbau einer einzelnen Untereinheit des Rezeptors in Regenbogen-Farben, beginnend am N-Terminus (rot) bis zum C-Terminus (violett). (Chua et al., 2017)

Die große extrazelluläre N-terminale Domäne ist aus ungefähr 200 Aminosäuren aufgebaut, die sich hauptsächlich zu β-Sheets zusammenfalten (siehe **Abbildung 6 A**). Diese Region dient unter anderem zur Bindung einiger Liganden, wie zum Beispiel Benzodiazepinen (siehe **Abbildung 7**) (Simon et al, 2004; Campagna-Slater und Weaver, 2007). Die transmembranären Segmente erschließen sich aus locker gepackten α-Helices, die viele hydrophile Aminosäuren beinhalten (Vithlani et al., 2011; Sigel und Steinmann, 2012).

Die TM2-Segmente aller Untereinheiten bilden gemeinsam die Ionenkanal-Pore, wobei die hydrophilen Reste der Aminosäuren nach innen gerichtet sind und somit eine bessere Ionen-Leitfähigkeit gewährleisten, da sie mit den hydrophilen Hüllen der Chlorid-Ionen interagieren (Kash et al., 2004; Jacob et al., 2008; Sigel und Steinmann, 2012).

TM1 und TM2 besitzen an ihrer extrazellulären Seite häufig positiv geladene Aminosäure-Reste (Arginin, Lysin), diese sind wichtig für die Ladungsselektivität. Negativ geladene Ionen konzentrieren sich somit um den Eingang der Pore (Kash et al., 2004). Der Selektivitätsfilter, die engste Stelle der Pore, befindet sich am intrazellulären Ende der TM2-Domäne und beinhaltet einen Teil des TM1-TM2-Loop der β-Untereinheit (Jensen et al., 2002; Kash et al., 2004).

Regulierende Proteine, die für das Auftreten des Rezeptors an Synapsen und die Steuerung seiner Aktivität zuständig sind, können an den TM3-TM4-Loop andocken (Kittler et al., 2003). Diese Schleife beinhaltet die am meisten divergierenden Aminosäure-Reste der einzelnen Untereinheiten und unterliegt auch posttranslationalen Modifikationen, was sowohl die Funktion des Kanals als auch die Interaktion der Untereinheiten mit umliegenden Proteinen beeinflusst (Macdonald und Olsen, 1994; Campagna-Slater und Weaver, 2007).

2.1.3 Diversität

19 verschiedene Untereinheiten, die sich in acht Untergruppen eingliedern, wurden bislang identifiziert: sechs α (α_{1-6})-, drei β (β_{1-3})-, drei γ (γ_{1-3})-, eine δ-, eine ε-, eine π-, eine θ- und drei ρ (ρ_{1-3})-Untereinheiten (Jacob et al., 2008; Bormann, 2000; MacDonald 1994). Die Sequenzidentität zwischen den einzelnen Subfamilien liegt bei 30-40 %, innerhalb einer Subfamilie bei 70-80 % (Olsen und Tobin, 1990, MacDonald und Olsen, 1994).

Durch Kombination dieser Untereinheiten wäre theoretisch eine sehr hohe Anzahl an Rezeptor-Subtypen möglich, jedoch bestehen die meisten im Gehirn exprimierten $GABA_A$-Rezeptoren aus zwei α-, zwei β- und einer γ-Untereinheit (Möhler, 2006; Jacob et al., 2008; Vinkers und Olivier, 2012; Sieghart et al., 2012), wobei statt der γ-Untereinheit auch eine δ-, ε-, oder π-Untereinheit vorhanden sein kann (Jacob et al., 2008). 60% aller $GABA_A$-Rezeptoren bestehen aus zwei α_1-, zwei β_2- und einer γ_2-Untereinheit ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$ Subtyp; häufigste Isoform). Weiters wurden Kombinationen von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ (15–20%) und von $\alpha_3\beta_{1/2/3}\gamma_2$ (10–15%) als wichtige Subtypen identifiziert. Rezeptoren, die $\alpha_{4/5/6}$-, $\gamma_{1/3}$-, δ-, π-, oder θ-Untereinheiten enthalten, kommen hingegen seltener vor. (Rudolph und Knoflach, 2011; Wang, 2011)

Diese diversen Subtypen unterscheiden sich bezüglich ihrer Topographie und Entwicklung, ihrer zellulären und intrazellulären Lokalisation, ihrer Rolle in den verschiedenen Hirnregionen, ihren Regulationsmechanismen und schließlich auch ihrer Pharmakologie (Sigel et al., 1990, Olsen & Sieghart, 2008).

Identifizierte Untereinheiten-kombinationen	*UE-Kombinationen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nativ vorkommen*	*UE-Kombinationen, die möglicherweise nativ vorkommen*
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	ρ_1
$\alpha_2\beta\gamma_2$	$\alpha_1\beta\delta$	ρ_2
$\alpha_3\beta\gamma_2$	$\alpha\beta_1\gamma$/ $\alpha\beta_1\delta$	ρ_3
$\alpha_4\beta\gamma_2$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta\gamma_1$
$\alpha_4\beta_2\delta$	$\alpha_1\alpha\beta\gamma/\alpha_1\alpha_6\beta\delta$	$\alpha\beta\gamma_3$
$\alpha_4\beta_3\delta$		$\alpha\beta\theta$
$\alpha_5\beta\gamma_2$		$\alpha\beta\varepsilon$
$\alpha_6\beta\gamma_2$		$\alpha\beta\gamma\pi$
$\alpha_6\beta_2\delta$		
$\alpha_6\beta_3\delta$		
ρ		

Tabelle 2: Identifizierte und vermutete Untereinheiten(UE) Kombinationen (Sieghart und Olsen, 2008)

2.1.4 Untereinheiten und ihre Eigenschaften

Wie bereits oben erwähnt, wurden 19 verschiedene Isoformen, die sich in mehrere Untergruppen gliedern, identifiziert:

- α ($\alpha_{1\text{-}6}$)
- β ($\beta_{1\text{-}3}$)
- γ ($\gamma_{1\text{-}3}$)
- δ
- ε
- π
- θ
- ρ ($\rho_{1\text{-}3}$)

Zusätzlich zu diesen Untereinheiten wurde auch die Identität von Splice-Varianten bestätigt. Diese entstehen durch Exogen-Splicing auf der Ebene von prä-mRNA. Von der γ_2-Untereinheit sind 2 Varianten bekannt: γ_{2S} und γ_{2L}, wobei S die kurze (short) und L die lange (long) Variante des Genprodukts definiert. Bei der γ_{2L} Untereinheit ist zusätzlich eine

Sequenz von acht Aminosäuren in der großen, intrazellulären Schleife zwischen TM3 und TM4 vorhanden. (Sieghart und Sperk, 2002)

α_5, β_2, β_3 und β_4 verfügen ebenfalls über Splice-Varianten (Barnard et al., 1998).

<u>α - Untereinheiten</u>

- <u>α_1-Untereinheit</u>

Zirka 60% aller $GABA_A$-Rezeptoren beinhalten die α_1-Untereinheit (Möhler, 2006; Rudolph und Knoflach, 2011).

Die α_1-Untereinheit ist vermutlich beteiligt an der Vermittlung eines sedierenden, anterograden amnestischen und zum Teil auch antikonvulsiven Effekts. Die antikonvulsive Wirkung über α_3-hältige Rezeptoren ist jedoch deutlich stärker ausgeprägt. (Möhler, 2006; Rudolph und Knoflach, 2011)

Es wurde auch festgestellt, dass sedativ und hypnotisch wirkende Z-Drugs eine höhere Affinität zu α_1-beinhaltenden $GABA_A$-Rezeptoren aufweisen, als zu jenen, die andere α-Untereinheiten enthalten. Vor allem Zolpidem interagiert mit α_1-Untereinheiten 20-fach stärker als mit α_2- und α_3-Untereinheiten und hat keine signifikante Bindungsaffinität zu $GABA_A$-Rezeptoren, die α_5 beinhalten. (Rudolph und Knoflach, 2011)

- <u>α_2-Untereinheit</u>

Die α_2-Untereinheit ist in etwa 15-20% aller $GABA_A$-Rezeptoren enthalten (Engin et al., 2012). Sie treten sehr häufig in Kombination mit β_3- und γ_2-Untereinheiten auf (Möhler, 2006).

Zu finden sind diese α_2-Untereinheiten haltigen Rezeptoren vor allem in Hirnarealen in denen keine oder nur wenig Rezeptoren mit α_1-Untereinheiten exprimiert werden. α_2-Untereinheiten beinhaltende Rezeptoren vermitteln eine anxiolytische Wirkung, sowie in hohen Dosen Muskelrelaxation, sie haben allerdings vermutlich wenig Einfluss auf Sedierung. (Möhler, 2006; Sieghart et al., 2012)

- α_3-Untereinheit

Bei Rezeptorbindung, an Rezeptoren, die α_3-Untereinheiten beinhalten, zeigt sich eine antikonvulsive und muskelrelaxierende Wirkung von Benzodiazepinen (Möhler, 2006, 2011).

Intrathekal verabreichte Benzodiazepine vermitteln über spinale α_3- sowie α_2-haltige $GABA_A$-Rezeptoren gute analgetische Wirkung, vor allem bei entzündungsbedingten- und neuropathischen Schmerzen (Möhler, 2011, Rudolf und Knoflach, 2011).

- α_5-Untereinheit

In etwa 5% aller $GABA_A$-Rezeptoren sind α_5-Untereinheiten enthalten, diese kommen hauptsächlich in Kombination mit β_3- und γ_2-Untereinheiten vor und sind vorwiegend im Hippocampus und der Wirbelsäule lokalisiert. Im Hippocampus machen sie etwa 20% aller $GABA_A$-Rezeptoren aus. (Engin et al., 2012, Rudolf und Knoflach, 2011)

α_5-haltige $GABA_A$-Rezeptoren sind unter anderem mitverantwortlich für muskelrelaxierende Wirkung. Auch die Toleranz Entwicklung ist ihnen möglicherweise zuzuschreiben. Ebenso spielen sie eine Nebenrolle bei der Minderung entzündlicher und neuropathischer Schmerzen durch Benzodiazepine. (Knabl J, et al. 2008, Rudolf und Knoflach, 2011)

Weiters wurde entdeckt, dass Inhibitoren und inverse Agonisten, der α_5-hältigen $GABA_A$-Rezeptoren, das Lern- und Erinnerungsvermögen positiv beeinflussen können (Rudolf und Knoflach, 2011).

- α_4-/ α_6-Untereinheiten

$GABA_A$-Rezeptoren, die diese Untereinheiten enthalten, sind nicht sensitiv für Benzodiazepine. α_4- und α_6-Untereinheiten findet man häufig, extrasynaptisch, in Kombination mit der δ-Untereinheit vor (Sieghart und Sperk, 2002; Möhler, 2006; Belelli et al., 2009).

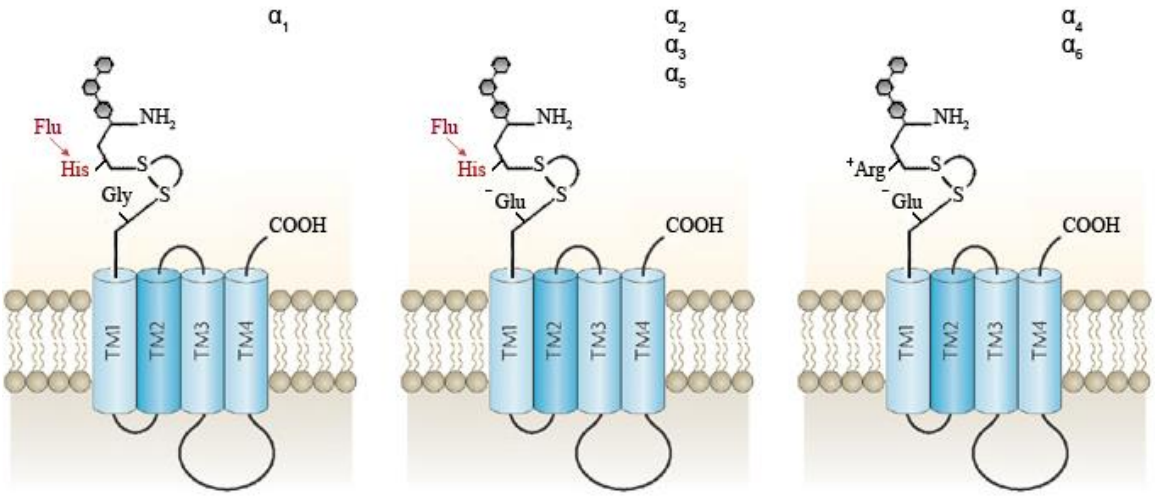

Abbildung 7: Unterschied der Sensitivität für Benzodiazepine (BDZ) an der α Untereinheit. (γ-Untereinheit muss co-exprimiert sein). Flunitrazepam (Flu) als typisches Beispiel für ein BDZ. Verantwortlich sind Unterschiedliche Aminosäuren im N-Terminus: Links: His in Kombination mit Gly führen zu einer hohen Sensitivität. Mitte: Der Austausch von Gly mit Glu^- schwächt die Sensitivität ab. Rechts: Das Ersetzen von His durch Arg^+ führt zum Sensitivitätsverlust. (modifiziert von: Jacob et al., 2008)

β -Untereinheiten

$GABA_A$-Rezeptoren vom Subtyp $\alpha\beta_{2/3}\gamma_2$ sind unter anderem Angriffspunkte für Injektionsanasthetika, wie Etomidat und Propofol. Die anästhetische Wirkung dieser Substanzen wird hier vor allem der β_3-Untereinheit und die sedierende Wirkung eher der β_2-Untereinheit zu gesprochen. (Reynolds et al., 2003; Möhler, 2006; Olsen und Li, 2011)

Die am häufigsten vorhandene β-Untereinheit ist β_2, sie ist in Bereichen der Amygdala, des Hypothalamus und des Isocortex in hoher Dichte zu finden (Olsen und Sieghart, 2008; Zhang et al., 1991).

Hohe Konzentrationen von β_3-Untereinheiten wurden in Föten festgestellt, in postnatalen Zellen wird diese Untereinheit hingegen weniger häufig, zum Beispiel in Bereichen des Vorderhirns, wie dem Isocortex oder dem Hippocampus, exprimiert (Zhang et al., 1991; Olsen und Sieghart, 2009).

Die β_1-Untereinheit weist von allen β-Untereinheiten die geringste Häufigkeit im ZNS auf, β_1 inkorporierende $GABA_A$-Rezeptoren sind teilweise im Hippocampus und im Thalamus lokalisiert (Zhang et al., 1991; Olsen und Sieghart, 2009).

$GABA_A$-Rezeptoren, die verschiedene α-Untereinheiten gemeinsam exprimieren, sind bereits bekannt, jedoch wurden bisher kein nativer $GABA_A$-Rezeptor identifiziert, in dem

unterschiedliche β-Untereinheiten gemeinsam vorkommen (Zhang et al., 1991; Olsen und Sieghart, 2009).

γ -Untereinheiten

$\gamma_{1/2/3}$-Untereinheiten werden in etwa 90% der $GABA_A$-Rezeptoren exprimiert und sind somit die meist vorhandenen Untereinheiten. Am häufigsten ist die γ_2-Untereinheit, γ_1 und γ_3 werden weniger oft exprimiert (Olsen und Sieghart, 2009).
Während die Lokalisation der γ_1-Untereinheit auf wenige Regionen des Gehirns, zum Beispiel, die zentralen Nuclei der Amygdala, die Substantia nigra, das Pallidum oder das Striatum
limitiert ist, wird die γ_3-Untereinheit über das gesamte Gehirn verteilt gefunden (Pirker et al., 2000; Korpi et al., 2002). Benzodiazepine haben eine weitaus geringere Affinität für $GABA_A$-Rezeptoren, die γ_1- oder γ_3-Untereinheiten beinhalten. Im Gegensatz dazu sind γ_2-enthaltenden $GABA_A$-Rezeptoren (co-exprimiert mit einer α-Untereinheit) hochsensitiv für Benzodiazepine. γ_2-Untereinheiten sind vorwiegend synaptisch lokalisiert, extrasynaptisch werden sie oft durch δ Untereinheiten ersetzt. (Olsen und Sieghart, 2009)

δ -Untereinheit

Die δ-Untereinheit ist ausschließlich extrasynaptisch, oft in Kombination mit α_4 und α_6, lokalisiert (Sieghart und Sperk, 2002; Möhler, 2006; Belelli et al., 2009). Am häufigsten kommen sie in den Granularzellen des Cerebellums, den Vorderhirnarealen, wie dem Neostriatum und in der Hirnrinde vor (Olsen und Sieghart, 2009). Der Rezeptorkomplex α:β:δ im Verhältnis 2:2:1 wurde am häufigsten identifiziert, es sind jedoch auch Kombinationen von α:β:δ im Verhältnis 1:1:3, 1:2:2, 2:3:1 und 2:1:2 möglich. Um die Vielfältigkeit dieser Kombinationen noch zu steigern, ist die δ-Untereinheit flexibel in ihrer Position. So entstehen pentamere Rezeptorkomplexe mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften. (Eaton et al., 2014; Wongsamitkul, et al., 2016)
δ-beinhaltende $GABA_A$-Rezeptoren sind allerdings nicht Benzodiazepin-sensitiv (Möhler, 2006a).

ε-, π-, θ-Untereinheiten

Diese Untereinheiten werden ausschließlich extrasynaptisch exprimiert (Olsen und Sieghart, 2009). Die ε-Untereinheit ist eher rar, sie kommt unter anderem im Hypothalamus, statt γ,
beziehungsweise δ, vor (Olsen und Sieghart, 2009). Die physiologische und pharmakologische Rolle der π- und θ- sind bis heute noch nicht ausreichend erforscht (Olsen und Sieghart, 2009).

2.2 Der $GABA_C$-Rezeptor

Ein grundsätzlicher, struktureller Unterschied zum klassischen $GABA_A$-Rezeptor ist der Aufbau des $GABA_C$-Rezeptors aus ausschließlich ρ-Untereinheiten. Bisher wurden 3 Untereinheiten (ρ_{1-3}) identifiziert, die jeweils ein homooligomeres oder pseudohomooligomeres (z.B. $\rho_1\rho_2$), pentameres, funktionelles Rezeptormolekül bilden (Bormann et al., 1995). Ein weiterer Unterschied liegt in der geringeren Desensibilisierungsrate. $GABA_C$-Rezeptoren sind jedoch wesentlich sensitiver für GABA als klassische $GABA_A$-Rezeptoren, dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der $GABA_C$-Rezeptor fünf Bindungstaschen für GABA ausbildet. (Bormann et al., 1995)

Der $GABA_C$-Rezeptor wurde vor allem in der Retina von Wirbeltieren nachgewiesen, geringere Konzentrationen findet man aber auch im Hippocampus, in den Colliculi superiores und dem Rückenmark (Lukasiewicz et al., 2004).

Weitere pharmakologische Eigenschaften wurden in **Tabelle 1** zusammengefasst.

3 Liganden am $GABA_A$-Rezeptor und ihre Bindungsstellen

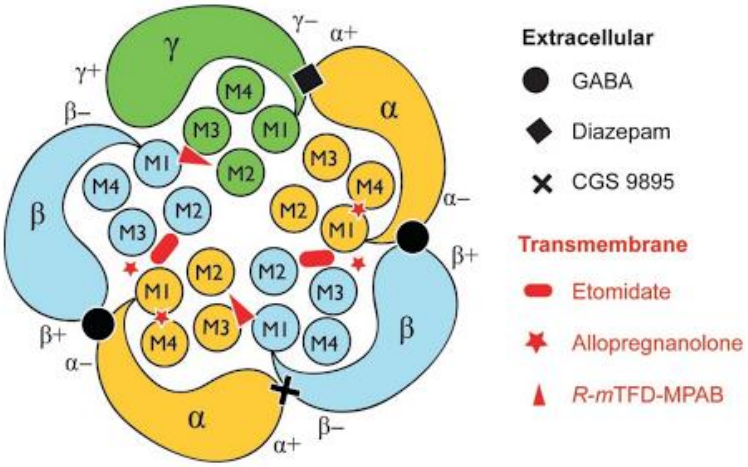

Abbildung 8: Schematische Darstellung eines $GABA_A$-Rezeptors mit γ-α-β-α-β Untereinheiten Kombination (von extrazellulärer Sicht aus, im Uhrzeigersinn). Gezeigt werden die Bindungsstellen für klassische Liganden. (Chua et al., 2017)

3.1 Agonisten

3.1.1 GABA

Die Bindungstasche für GABA ist an der extrazellulären Seite, zwischen zwei benachbarten Untereinheiten (α und β), des Rezeptors lokalisiert. Jede Untereinheit verfügt über drei (in manchen Fällen auch vier) nicht benachbarte Regionen, die die Bindungsstelle formen. Die Plus-Seite (β) der Bindungstasche setzt sich aus drei Schleifen (A, B und C) zusammen und wird durch die an der Minus-Seite (α) vorhandenen, drei β-Stränge und/oder eine Schleife (D, E, F und/oder G), komplimentiert. Die GABA Bindungsstelle befindet sich daher zwischen der α^- und β^+-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors (Lynagh und Pless, 2014; Bergmann et al., 2013). Der am weitesten verbreitete $GABA_A$-Rezeptor Subtyp besteht aus zwei α-, zwei β- und einer γ-Untereinheit im Verhältnis 2:2:1 (γ-β-α-β-α; extrazellulär betrachtet, im Uhrzeigersinn) und verfügt somit über zwei α^-/β^+-Regionen und somit auch über zwei Bindungstaschen für GABA. (Möhler, 2006)

Auch wenn nur ein GABA Molekül an den Rezeptor bindet, kommt es bereits zur Kanalöffnung, dieser Effekt wird aber durch das Binden eines weiteren Moleküls an der

zweiten Bindungstasche wesentlich verstärkt (Baumann et al., 2003; Macdonald et al., 1989; Twyman et al., 1990).

Es wurden auch Bindungstaschen für GABA an Rezeptoren nachgewiesen, die keine α-Untereinheiten enthalten. Eine logische Erklärung dafür wäre die strukturelle Voraussetzung für die Bindungstasche. Es wird angenommen, dass auch andere Untereinheiten, die zur Bindung benötigten Eigenschaften der Aminosäuren-Abfolge zur Verfügung stellen. In herkömmlichen α^-/β^+ geformten Bindungstaschen spielt die aromatische Box eine große Rolle (Lummis, 2009; Smith und Olsen, 1995). Sie besteht aus βY97, βY157, βF200, βY205 und αF64. Es hat sich herausgestellt, dass diese aromatische Box auch in β^+/β^-, β^+/γ^- und β^+/δ^- Kombinationen vorhanden ist (Bergmann et al., 2013; Lynagh und Pless, 2014).

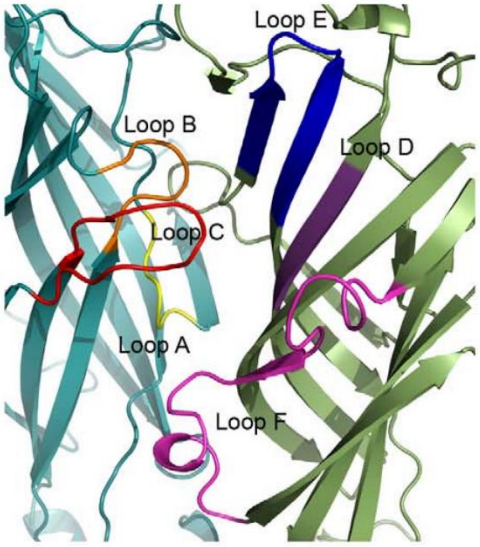

Abbildung 9: Schleifen (Loop) A-F, die die Bindungstasche für GABA formen. (Bergmann et al., 2013)

3.1.2 Muscimol

Wie auch die γ-Aminobuttersäure zählt Muscimol zu den Agonisten am $GABA_A$-Rezeptor und bindet an der gleichen Bindungstasche. Muscimol verfügt über eine psychoaktive Wirkung und wird aus *Amanita muscaria* gewonnen (Krogsgaard-Larsen et al., 1979). Untersuchungen zeigen, dass der Muscimol-Effekt an extrasynaptischen (vor allem α_6- und δ-hältig) Rezeptoren um etwa 40% stärker ausgeprägt ist im Vergleich zu synaptischen $GABA_A$-Rezeptoren (Chandra et al., 2010).

3.2 Antagonisten

3.2.1 Bicucullin

Bicucullin, ein Phtalid-Isoquinolin Alkaloid, aus *Dicentra* Arten isoliert, konkurriert mit GABA um dieselbe Bindungsstelle und ist daher ein kompetitiver Antagonist. Es wirkt konvulsiv und findet hauptsächlich Anwendung zur pharmakologischen Charakterisierung der $GABA_A$-Rezeptoren. $GABA_B$-Rezeptoren sind Bicuculin-insensitiv. (Huang und Johnston., 1990)

3.2.2 Picrotoxin

Picrotoxin ist ein nicht-kompetitiver $GABA_A$-Kanal-Blocker (Huang et al., 2003). Die Bindungsstelle von Picrotoxin befindet sich vermutlich direkt in der Pore des $GABA_A$-Rezeptors (Huang et al., 2004).

3.3 Modulatoren

3.3.1 Benzodiazepine

Wie die GABA-Bindungsstelle, wird auch die Bindungstasche für Benzodiazepine, diese befindet sich allerdings zwischen der α- und γ-Untereinheit, von Schleifen im extrazellulären Teil des Rezeptors, gebildet (siehe **Abbildung 8** Beispiel: Diazepam). Zu den Benzodiazepin- sensitiven α-Untereinheiten zählen α_1-, α_2-, α_3- und die α_5-Untereinheit, α_4 und α_6 sind nicht an der Bindung von Benzodiazepinen beteiligt. Bei der γ-Untereinheit handelt es sich typischer weise um γ_2 (Rudolph und Knoflach, 2011). Sie besteht aus den Schleifen A, B und C der α^--Seite und den Schleifen D und E der γ^+-Seite (Ernst et al., 2003).

Viele Benzodiazepine induzieren (in mikromolarer Konzentration) eine zusätzliche Rezeptorantwort durch weitere, weniger affine Bindungsstellen am α^+/β^--Interface des $GABA_A$-Rezeptors. Diese Bindungsstellen sind allerdings noch nicht ausreichend charakterisiert. Es wurde aber bereits bewiesen, dass für eine solche Rezeptorantwort die γ-Untereinheit nicht unbedingt notwendig ist. Der Effekt ist auch abhängig von den

Liganden, der Konzentration und der im Rezeptor vorhandenen, anderen, Untereinheiten (Sieghart, 2015). Klassische Benzodiazepine, wie zum Beispiel Diazepam, modulieren den $\alpha_1\beta_2y_2$ $GABA_A$-Rezeptor daher über zwei unterschiedliche Mechanismen, die sich als biphasische Potenzierung mit nanomolaren und mikromolaren Potenzen manifestieren (Walters et al., 2000).

In nanomolaren Konzentrationen werden Effekte durch die α^-/γ^+-Bindungsstelle mit hoher Affinität vermittelt, diese Bindungsstelle kann selektiv durch den Antagonisten Flumazenil blockiert werden. Diazepam, in mikromolarer Konzentration, dockt auch an die Bindungsstelle am α^+/β^--Interface, diese Interaktion kann jedoch nicht durch Flumazenil antagonisiert werden. Die physiologische Funktion dieser weiteren Bindungsstelle, ist noch nicht vollständig geklärt. Experimentelle Substanzen wie CGS9895 (siehe **Abbildung 8**) wirken als Antagonisten der klassischen Bindungsstelle für Benzodiazepine am α^-/γ^+-Interface, können den Rezeptor aber über die zweite, weniger affine Bindungsstelle am α^+/β^--Interface aktivieren und so helfen, die Auswirkungen beider Bindungsstellen auf die Wirkung von Benzodiazepinen besser zu verstehen. (Sieghart et al., 2012; Varagic, Wimmer et al., 2013)

3.3.2 Barbiturate

Barbiturate wirken dämpfend auf das zentrale Nervensystem und wurden als Sedativa, Hypnotika, Anästhetika und Antikonvulsiva eingesetzt (Charney et al., 2001).

Barbiturate, wie zum Beispiel Pentobarbital, interagieren mit mehreren Bindungsstellen am Rezeptor. Diese Bindungsstellen sind stark von der Untereinheiten-Zusammensetzung des Rezeptors abhängig und beeinflussen somit die Wirkstärke der verschiedenen Barbiturate (Drafts und Fisher, 2006).

Untersuchungen mit photoaktivierbaren Barbituraten (R-mTFD-MPAB, siehe **Abbildung 8**) haben gezeigt, dass Bindungsstellen in transmembranären Bereichen des α^+/β^-- sowie des γ^+/β^--Interfaces für die Interaktion mit Barbituraten von besonderer Bedeutung sind (Chua et al., 2017).

3.3.3 Neurosteroide

Spezifische Bindungsstellen für Neurosteroide sind sowohl innerhalb der α-Untereinheit zwischen M1-M4 lokalisiert als auch zwischen der α- und der β-Untereinheit, in der Region von M3(α) und M1(β) (siehe **Abbildung 8** Beispiel: Allopregnanolon) (Hosie et al., 2007; Li et al., 2009). Diese Bindungsstellen kommen auf allen α- und β-Untereinheiten vor, was den Mangel an Subtyp-Selektivität in der neurosteroidalen Aktivität erklären kann (Hosie et al., 2007).

Abhängig von ihren chemischen Eigenschaften können Neurosteroide am $GABA_A$-Rezeptor sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken (Chisari et al., 2010). Ihnen wird eine anxiolytische, antikonvulsive, sedierende und in höheren Dosen, anästhesierende Wirkung zugeschrieben (Lambert et al., 2003).

3.3.4 Anästhetika

Etomidat und Propofol, Anästhetika die intravenös verabreicht werden, interagieren bevorzugt mit β-Untereinheiten, während die Wirkung inhalativer Anästhetika großteils über α-Untereinheiten vermittelt wird (Bali und Akabas, 2004).

Die Bindungsstelle für Anästhetika, wie Etomidat, befindet sich in der transmembranären Region zwischen der α_1-Untereinheit, (-) Seite, und der $\beta_{2/3}$-Untereinheit (+) Seite (Olsen und Li, 2011). Eine wichtige Rolle spielen hier unter anderem die Aminosäuren βM285 in der M3 Domäne und αM236 in der M1 Domäne (Li et al., 2006).

3.3.5 Valerensäure

Valerensäure ist ein Sesquiterpen, das im Echten Baldrian (*Valeriana officinalis*) vorkommt. Sie dient dort als Indikator, da in den meisten anderen Arten der Gattung *Valeriana* Valerensäure nicht enthalten ist. Valerensäure wirkt anxiolytisch, antikonvulsiv und ZNS-dämpfend. (Khom et. al 2007; Hintersteiner et. al, 2014)

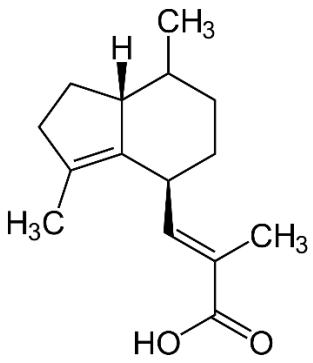

Abbildung 10: Strukturformel von Valerensäure

Khom et al., bestätigen 2007, dass Valerensäure, als allosterischer Modulator an $GABA_A$-Rezeptoren, die β_2- oder β_3-Untereinheiten exprimieren, Chlorid-Strom-verstärkend wirkt. In hohen Konzentrationen aktiviert VA $GABA_A$-Rezeptoren auch direkt (≥ 30 µM) (Khom et al., 2007).

Für Interaktionen mit dem Rezeptor ist vermutlich eine Wechselwirkung zwischen VA und N265 am C-terminalen Ende der kanalbildenden M2 Domäne der $\beta_{2/3}$-Untereinheit verantwortlich. Das Carboxylat der VA geht dabei vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung zu $\beta_{2/3}$N265 ein, weiters werden Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindungen zu $\beta_{1/3}$ R269 und mehrere hydrophobe Interaktionen mit lipophilen Resten der Bindungstasche in Betracht gezogen (siehe **Abbildung 11**). Mutationen der β_3-Untereinheit, die an Position 265 einen Serin-Rest, anstelle eines Asparagin-Restes enthalten, so wie es in nativen β_1-Untereinheiten der Fall ist, führen zu einer drastisch geringeren Wirksamkeit und Wirkstärke der VA. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass Mutationen in den Resten α_1M235, β_3R269, β_3M286 und β_3F289 der α_1- und β_3-Untereinheit die Modulation von $GABA_A$-Rezeptoren durch VA beeinflussen (Luger et al., 2015).

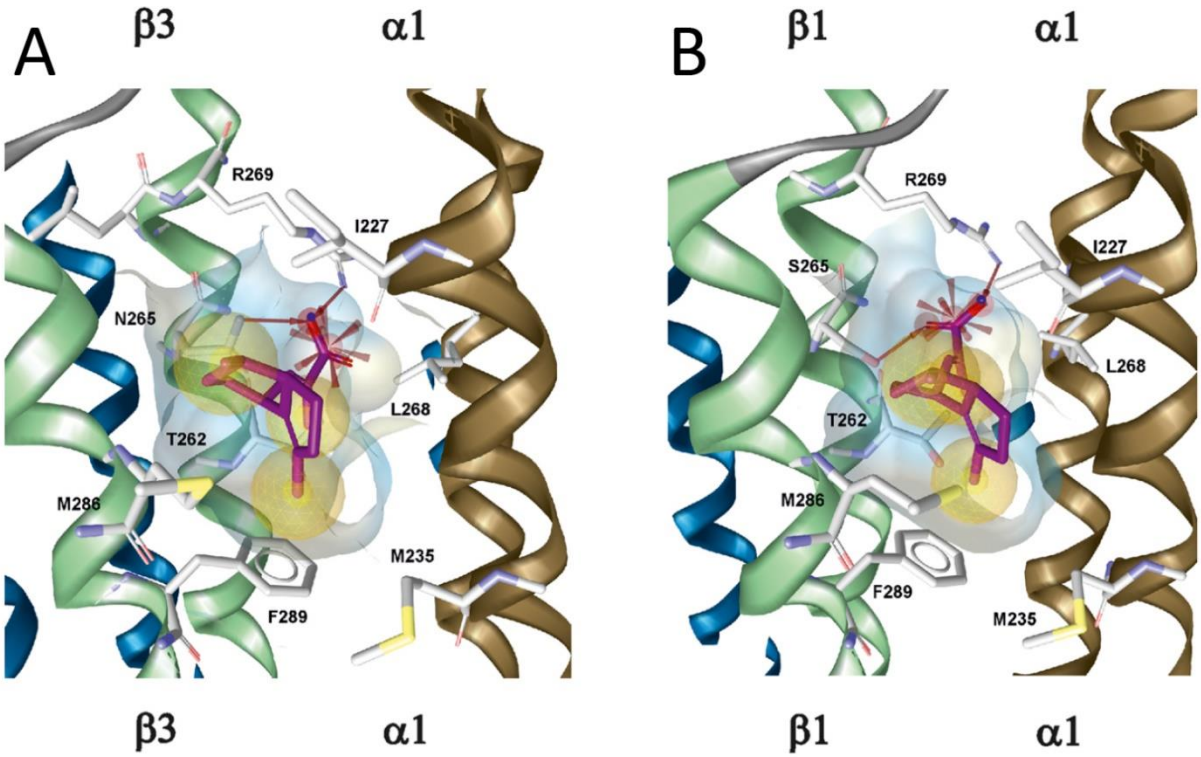

Abbildung 11: Schematische Abbildung der mutmaßlichen Bindungstasche für VA zwischen α- (braun) und β_3 (A) bzw. β_1 (B)- (grün) Untereinheit (β^+/α^-) und der optimierten Docking-Pose von VA(rot/lila). Der strukturbasierte Pharmacophor verfügt über drei lipophile Kontaktstellen (gelbe Sphären), zwei vermeintliche Wasserstoff-Bindungs-Akzeptor (rote Pfeile) und eine mutmaßliche ionische Wechselwirkung (roter Stern) (adaptiert von Luger et al., 2015).

3.3.5.1 Modulation von I_{GABA} durch VA

Eine beta-selektive Modulation von $GABA_A$-Rezeptoren durch Valerensäure wurde bereits durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt (Khom et al, 2007; Benke et al., 2009). Das Department für Pharmakologie und Toxikologie (Universität Wien; Leiter: Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering) befasst sich seit mehreren Jahren mit der Modulation von $GABA_A$-Rezeptoren durch Valerensäure und ihre Derivate (siehe Khom et al., 2010; Hintersteiner et al., 2014; Kohm et al., 2016). Wie rezente Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Hering zeigten (Khom et al 2016), kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} und durch ansteigende Konzentrationen von Valerensäure zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$: E_{max} = 721 ± 68%, n=5; $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$: E_{max} = 632 ± 88%, n=9;). Im Gegensatz dazu wurden $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch VA erst bei Konzentrationen ab 100µm signifikant moduliert. (E_{max} = 111 ± 16%, n=8) (siehe **Abbildung 12**).

In Bezug auf die Wirkstärke konnten Khom et al. ebenfalls signifikante Unterschiede feststellen. Valerensäure weist an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (EC_{50} = 20,2 ± 5,2µM) und $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren (EC_{50} = 23,1 ± 4,2µM) ähnlich potente Wirkung auf. Eine deutlich geringere Potenz wurde an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren (EC_{50}= 74,4 ± 19,3µM) nachgewiesen (Khom et al., 2016).

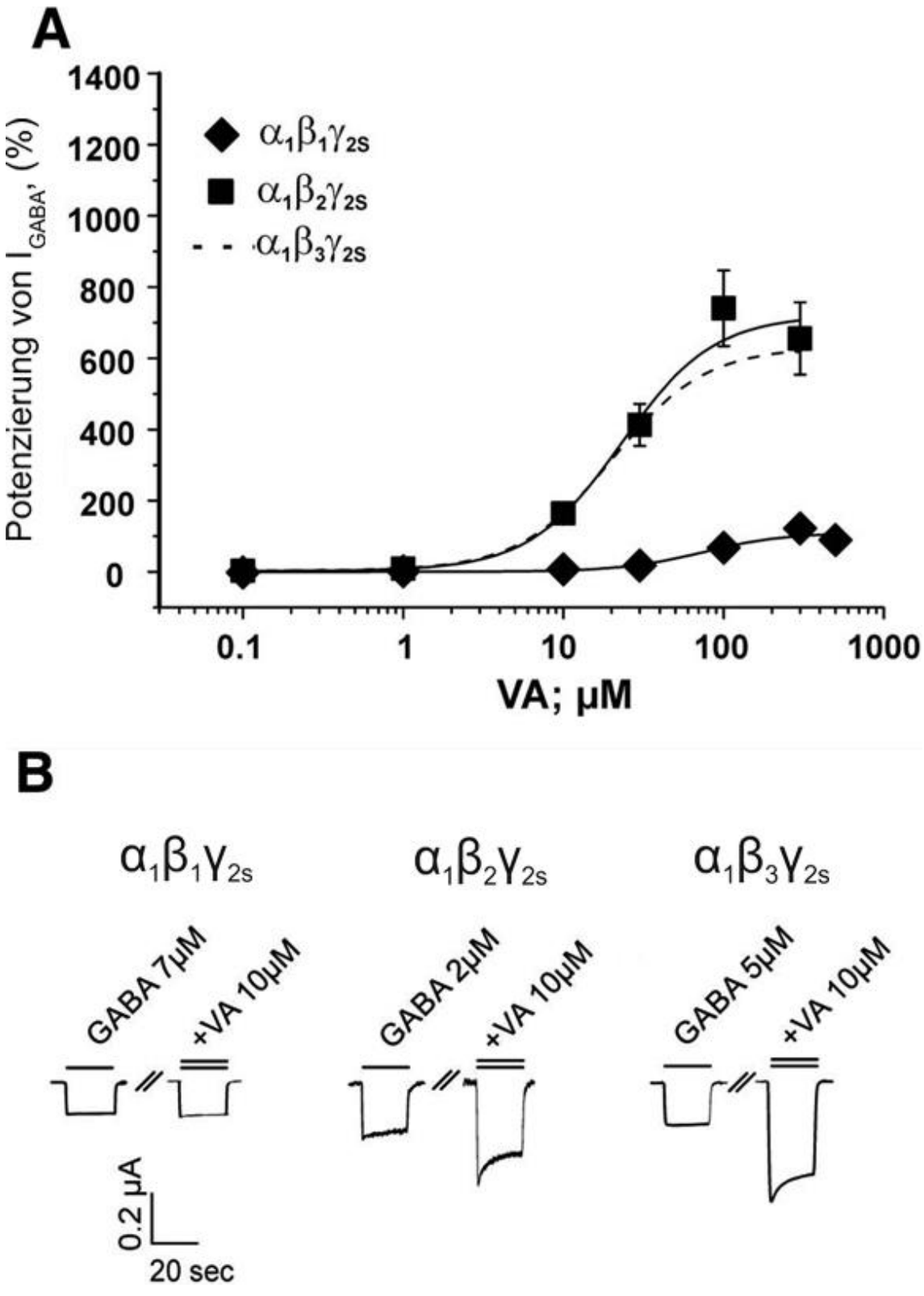

Abbildung 12: **(A)** Konzentrations-Wirkungs-Kurven von VA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (◆), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (- -) Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis* Oozyten. **(B)** Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch VA bei 10µM an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren. (adaptiert nach Khom et al., 2016)

IV PRAKTISCHER TEIL

4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Diese Diplomarbeit wurde am Department für Pharmakologie und Toxikologie (Universität Wien) unter der Betreuung von Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering durchgeführt. Im Rahmen der Arbeit sollte die Modulation GABA-induzierter Chloridströme (I_{GABA}) durch fünf ausgewählte Valerensäure(VA)-Derivate untersucht werden. Da bereits gezeigt wurde, dass Valerensäure $\beta_{2/3}$-hältige $GABA_A$-Rezeptoren bevorzugt moduliert (Khom et al., 2007; Benke et al., 2009), sollte zusätzlich evaluiert werden, ob diese $\beta_{2/3}$-Selektivität auch bei einer Derivatisierung von VA erhalten bleibt.

Dazu wurden drei verschiedene $GABA_A$-Rezeptor Subtypen ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) in Eizellen des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) exprimiert und die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen der VA-Derivate (MH 340, MH346, MH350, MH409 und MH661) bestimmt (siehe **Kapitel 5 Materialien und Methoden**). Anschließend wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und die $GABA_A$-Rezeptor Modulation durch diese Derivate anhand erhobener Parameter (Effizienz (E_{max}; %), Potenz (EC_{50}; µM) und β-Selektivität beurteilt.

5 Materialien und Methoden

Die unten beschriebenen Methoden wurden, aus in der Vergangenheit am Department für Pharmakologie und Toxikologie durchgeführten Diplomarbeiten, übernommen, nur geringfügig adaptiert und zusammengefasst (siehe Diplomarbeit Verena Hiebl „*In vitro* Untersuchung der möglichen beta-selektiven Modulation von $GABA_A$ Rezeptoren durch Piperin-Derivate“ 2013).

5.1. Verwendete Materialien und Software

Material/Software	Hersteller
Xenopus laevis Frösche	NASCO, USA
Tricain (Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoesäureethylesters)	Sigma, Österreich
Collagenase 1A	Sigma, Österreich
OR2 (82,5mM NaCl, 2mM KCl, 1mM $MgCl_2.H_2O$, 5mM HEPES)	Alle Bestandteile: Sigma, Österreich
ND96 (90mM NaCl, 1mM KCl, 1mM $MgCl_2.6\ H_2O$, 5mM HEPES, 1mM CaCl2)	Alle Bestandteile: Sigma, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)	Sigma, Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Österreich
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Österreich
GABA (γ-Aminobuttersäure)	Sigma, Österreich
KCl	Sigma, Österreich
Borsilikat-Glaskapillaren	Harvard Apparatus, UK
TURBO TEC O1C Amplifier	npi electronics, Deutschland
TECAN Miniprep 60	Tecan, Österreich
Robosoft	Robosoft Corporation, USA
Clampfit 10.2	Axon Instruments Inc., USA
Origin 7.0	Origin Lab Corporation, USA
CorelDRAW X5	Corel Corporation, Kanada
Diazepam	Sigma, Österreich

Tabelle 3: Im Rahmen der Diplomarbeit verwendete Materialien und Software

5.2. Oozyten des *Xenopus laevis*

Xenopus laevis bezeichnet den, aus Südafrika abstammenden, glatten Krallenfrosch. Diese Gattung kommt wildlebend vor allem in stehenden Gewässern, wie Teichen oder toten Flussarmen, vor. Die Oozyten des weiblichen *Xenopus laevis* werden bevorzugt für die Arbeit im Labor eingesetzt, da sie äußerst widerstandsfähig sind und an ihrer Membranoberfläche nur wenige endogene Ionenkanäle aufweisen. Dadurch eignen sie sich hervorragend für die Expression von Proteinen, insbesondere für Membranproteine. Die Oozyten sind in der Lage, Transkription und Translation fremder DNA oder RNA durchzuführen, die so exprimierten Proteine können anschließend bezüglich ihrer Funktion und Modulation untersucht werden (Sigel und Minier, 2005).

Die Oozyten kommen durch die asynchrone Oogenese zeitgleich in 6 verschiedenen Stadien vor, Stadien V und VI, kugelförmige Zellen mit einem Durchmesser von 1,1 bis 1,2mm, werden bevorzugt für Expressionsstudien verwendet. Ihr charakteristisches Aussehen, eine dunkelbraune und eine weiß-gelbliche Hälfte, ist auf den hohen Melanin-Gehalt der dunklen Hemisphäre zurückzuführen, in der sich auch der Zellkern befindet (Sigel und Minier, 2005).

Xenopus laevis Oozyten werden bereits lange als Expressionssystem für Proteine benutzt (erstmals belegt 1971 von Gurdon et al.).

Abbildung 13: *Xenopus laevis* Weibchen (eigene Aufnahme, 2015)

5.3. Gewinnung und Präparation der Oozyten

Anästhesiert wurden die weiblichen *Xenopus laevis* Frösche durch eine 0,2 prozentige Tricain-Lösung (Methansulfonsäuresalz des 3 - Aminobenzoesäureethylesters), in die sie für etwa 15-20 Minuten gelegt wurden. Anschließend wurde der narkotisierte Frosch mit dem Bauch nach oben auf ein Tuch gelegt und Teile der Ovarien, durch kleine Schnitte in die Oberhaut sowie Bauchmuskelschicht, operativ entfernt. Das entnommene Folikelgewebe mit den Oozyten wurde in einem Tube mit OR2-Lösung (82,5mM NaCl, 2mM KCl, 1mM $MgCl_2.H_2O$, 5mM HEPES) aufbewahrt.

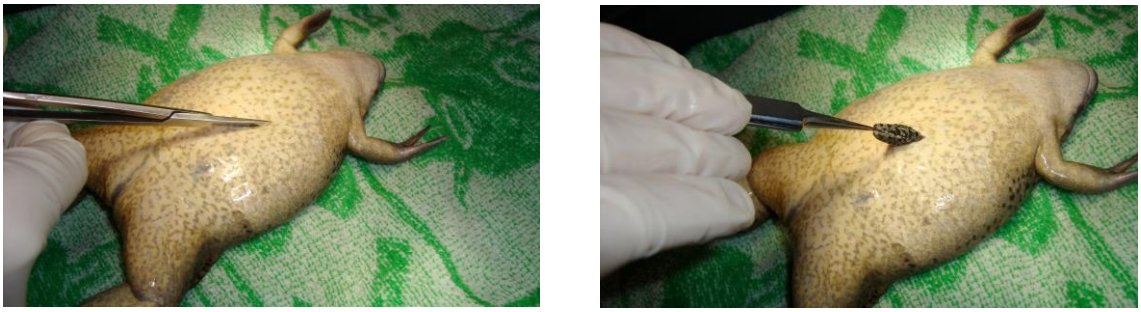

Abbildung 14:Operation des weiblichen *Xenopus laevis* (A. Schöffmann, Universität Wien, 2013)

Abbildung 15: Entnahme von Ovarialgewebe (bearbeitet, A. Schöffmann, Universität Wien, 2013)

Um das Follikelgewebe zu entfernen, wurden die Ovarien mechanisch in Segmente von zirka 10 Oozyten geteilt und mit 2mg/ml Kollagenase (Typ 1A) bei 18°C im Inkubator für 90 Minuten enzymatisch verdaut. Anschließend wurde die Kollagenase mehrfach mit OR2-Lösung ausgewaschen und die einzelnen Oozyten in Petrischalen mit Antibiotika-haltiger (100µg/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin) ND96-Lösung überführt. Schließlich wurden die Oozyten unter dem Mikroskop selektiert und bis zur Injektion im Inkubator bei 18°C gelagert.

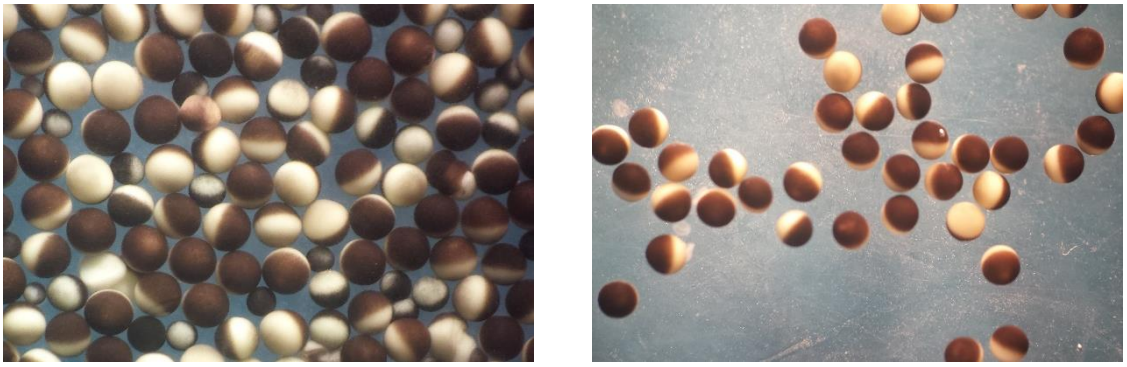

Abbildung 16: Links: einzelne Oozyten nach dem Verdau; Rechts: Oozyten nach der Selektion; (eigene Aufnahme, 2015)

5.4 Mikroinjektion der cRNA

Unter dem Mikroskop wurde jeder Oozyt in ein Gitter gelegt und mit Hilfe eines pneumatischen Injektionsgerätes etwa 50nl einer Lösung der gewünschten RNA-Mischung injiziert. Die Injektion wurde durch visuelle Volumenzunahme kontrolliert. Um eine Expression der γ-Untereinheit zu gewährleisten, wurden für die Untereinheiten Kombination $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_{2S}$ die einzelnen cRNA‘s im Verhältnis 1:1:10 gemischt (Boileau et al., 2002a, 2005; Olsen et al., 2007). Im Fall von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ wurden die cRNA‘s im Verhältnis 3:1:10 gemischt, um zusätzlich der Bildung von β_1-Homomeren entgegen zu wirken (Boileau et al., 2002b; Krishek et al., 1996). Danach wurden die injizierten Oozyten wieder bei 18°C in Antibiotika-haltiger ND96-Lösung inkubiert und konnten nach etwa 24 Stunden für die Experimente herangezogen werden.

5.5 Messlösungen

Die getesteten Derivate wurden vom Institut für Angewandte Synthesechemie, TU Wien (Univ.-Prof. Dr. Marko Mihovilovic, Dr. Gerit Pototschnig) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Valerensäure-Derivate (MH 340, MH 346, MH 350, MH409 und MH 661) wurden in Dimethylsulfoxid gelöst und lagen in einer Konzentration von 100mM vor. Die benötigten Probelösungen mit den Konzentrationen 0,1µM, 1µM, 10µM, 30µM, 100µM und 300µM wurden täglich neu hergestellt. Auch die 1mM GABA-Stammlösung

(5,15mg GABA in 50ml ND96) und die zur Messung verwendeten GABA-Konzentrationen wurden jeden Tag frisch zubereitet.

5.6 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Die bei den Versuchen verwendete 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnick (two-electrode-voltage-clamp) ist die populärste elektrophysiologische Methode zur Messung der Ionenströme durch Rezeptoren, die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wurden (Bianchi und Driscoll, 2006). Während ein Ionenfluss durch die exprimierten Chloridkanäle stattfindet, wird die Spannung der Oozyten Membran gemessen. Es werden insgesamt drei Elektroden benötigt: eine Potentialelektrode (voltage-electrode), eine Strom-Elektrode (current-electrode) und eine Referenzelektrode (ground electrode). Der Oozyt liegt während der Messung auf der Referenzelektrode auf, die Potentialelektrode und die Stromelektrode werden dabei seitlich durch die Membran des Oozyten gestochen. Die Potentialelektrode misst dabei das Membranpotential des Oozyten und sendet diese Signale an einen Feedback-Amplifier, der das Membranpotential mit einem gewünschten Haltepotential von -70mV vergleicht. Die Stromelektrode leitet den Strom, der der Differenz zwischen dem tatsächlich gemessenen Membranpotential und dem gewünschten Haltepotential entspricht, über die Oozytenmembran zur Referenzelektrode (Bianchi und Driscoll, 2006). Der injizierte Strom wird von der Referenzelektrode erfasst und aufgezeichnet (Halliwell et al., 1994). Er ist linear proportional zur Leitfähigkeit der Membran, welche wiederum direkt proportional zur Aktivität der Ionenkanäle und damit zum Ionenstrom ist (The Axon Guide: Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques, 2012).

Die Potential- und Stromelektrode bestehen aus dünnen Borsilikat-Glaskapillaren, die mit einer 3M Kaliumchlorid-Lösung befüllt sind. Ihr elektrischer Widerstand liegt zwischen 1 bis 3 MΩ. Befestigt sind die Elektroden an einer Halterung, die einen Draht enthält, der mit einer Schicht aus $AgCl_2$ überzogen ist. Dadurch wird das Signal über die KCl-Lösung, weiter zum Silberdraht und schlussendlich zum Amplifier geleitet (Bianchi und Driscoll, 2006).

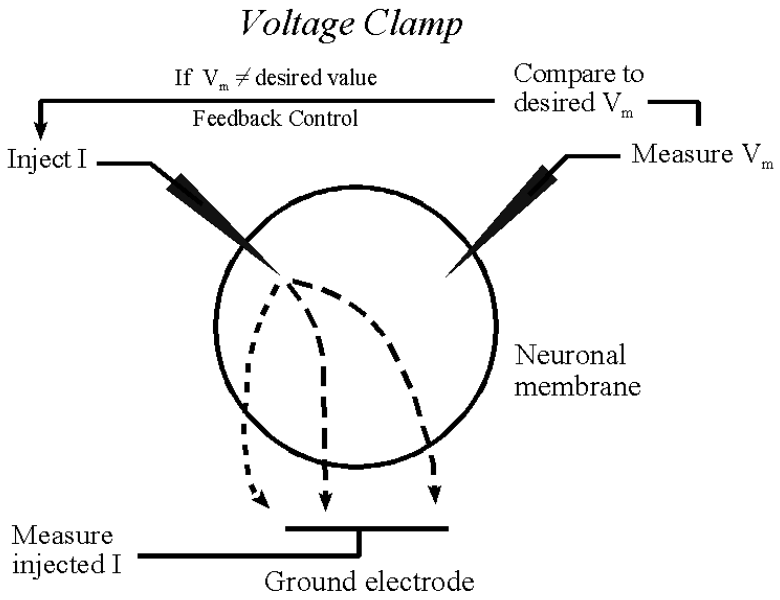

Abbildung 17: Schematische Darstellung der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (http://terpconnect.umd.edu/~rpayne/neuron/simchap3.htm; University of Maryland, USA)

5.7. Perfusionskammer und Pipettierstation

Die Applikation aller verwendeten Lösungen während den Experimenten fand mit Hilfe eines fast-perfusion-System statt, das in Abbildung 16 gezeigt wird. Die im nachfolgenden Text in Klammer stehenden Zahlen, kennzeichnen die einzelnen Teile in **Abbildung 16**.
Der Oozyt (**10**) wird hierbei in einer kleinen Kammer von zirka 15µl Fassungsvermögen auf einer zylindrischen Haltevorrichtung (**15**), die mit der Refernzelektrode (**14**) verbunden ist, platziert und mit einer Glasplatte (**7**), die über zwei schräg ausgerichtete Einlasskanäle (**8**) verfügt, bedeckt. Durch die Einlasskanäle, deren Durchmesser <1mm ist, wird der Zugang der Potential- und Stromelektrode (**1+2**) zum Oozyten gewährt. Über der Glasabdeckung befindet sich ein trichterförmiges Reservoir, (**6)** in das die verschiedenen Lösungen mit Hilfe eines Roboterarms (**3**) (Miniprep60, Tecan;) appliziert werden.
Die Kammer des Oozyten verfügt über einen Spalt, durch den der Abfluss (**12**) der applizierten Lösungen gewährleistet wird. Diese werden durch eine Pumpe abgesaugt, wobei eine schnelle vertikale Perfusion durch die beiden Einlässe stattfindet. Vor jeder neuen Applikation wird das trichterförmige Reservoir komplett über zwei weitere Abflüsse (**4+5**) entleert, um einer Vermischung der verschiedenen Lösungen entgegen zu wirken (Baburin et al., 2006).

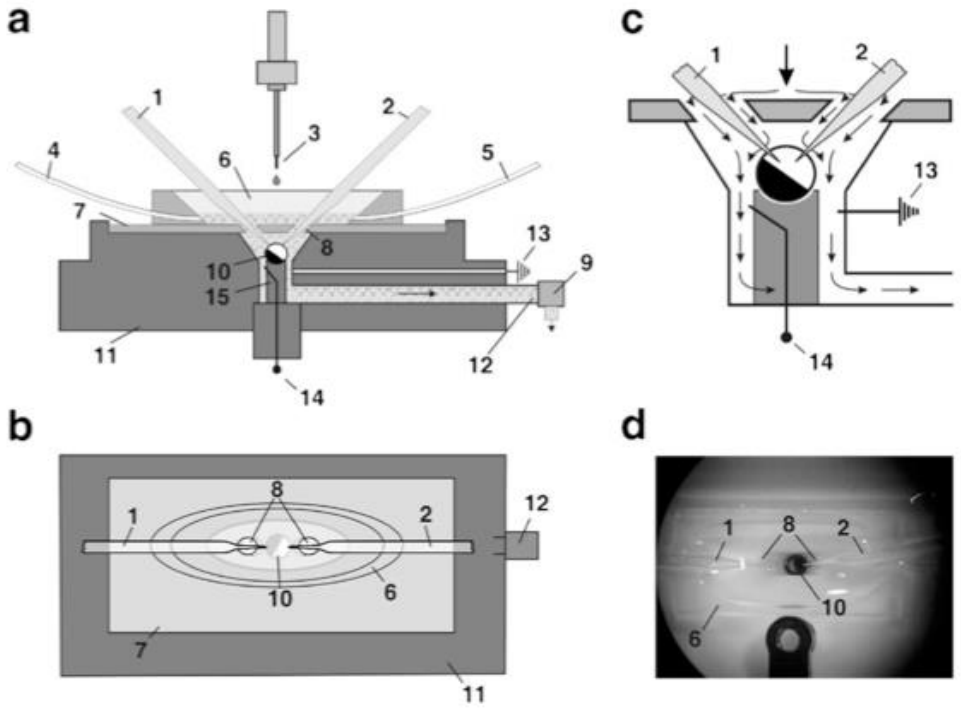

Abbildung 18: Querschnitt **(a)** und Aufsicht **(b)** der Perfusionskammer; Schematische Darstellung des Flusses innerhalb der Perfusionskammer **(c)**; Foto der Perfusionskammer **(d)** (Baburin et al., 2006)

5.8. Verwendete Software

Die Pipettierstation Minirep60 von TECAN wird durch das Programm *Robosoft*® bedient. In diesem Programm können unter anderem Einstellungen bezüglich des Perfusionsvolumen, der Perfusionsgeschwindigkeit, die Anzahl der Kammer-Wäschen und der temporäre Ablauf der Applikationen, getätigt werden. Dadurch kann eine Automatisierung der einzelnen Arbeitsschritte erreicht werden.

Weiters wird das Programm *Clampfit 10.2* zur Aufzeichnung der Ströme herangezogen. Hiermit können die einzelnen Werte abgelesen werden, welche dann mit Hilfe des Programms *Origin 7.0* zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurven sowie zur Berechnung von E_{max} und EC_{50} dienen.

Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mit *QuickCalcs*: „t-test to compare two

means“ bzw. mit dem „one sample t-test“ der Website *GraphPad* Software (https://www.graphpad.com) durchgeführt. P-Werte <0,05 gelten als statistisch signifikant.

Die gezeigten Abbildungen wurden in *CorelDRAW X5* und *Adobe Photoshop CS2* erstellt oder bearbeitet.

6 Ergebnisse

6.1 Auswertung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} durch fünf ausgewählte Naturstoffderivate an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren mit Hilfe der 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik und eines schnellen Perfusionssystems (Baburin et al., 2006) untersucht.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicher zu stellen, wurde vor jedem Experiment eine Kontrollkonzentration von GABA definiert, die 3-7% des maximalen Effekts (I_{max}; c = 1mM) impliziert. Diese GABA Konzentration, im Folgenden als effective concentration 3-7 (EC_{3-7}) bezeichnet, wurde im Rahmen jeder Messung co-appliziert und in die Berechnungen der Modulation durch die Liganden als Kontrollstrom ($I_{control}$) miteinbezogen.

Die so erhaltenen Datenpunkte wurden mit Hilfe von Origin 7.0 in ein semilogarithmisches Koordinatensystem übertragen. Anschließend wurde eine sigmoidale Kurve durch die Punkte gelegt und die Parameter E_{max}, und EC_{50} ermittelt.

6.2 Berechnung

Die GABA $EC_{3\text{-}7}$ sowie die Datenpunkte zur Berechnung der GABA-Konzentrations-Wirkungskurve wurden wie folgt berechnet:

$$E(\%) = \frac{I_{GABA}}{I_{\max}} * 100$$

I_{GABA}..... GABA-induzierter Chloridstrom (µA)

I_{max}..... Maximalstrom bei 1mM GABA (µA)

Die Potenzierung (Modulation) des GABA $EC_{3\text{-}7}$ Kontrollstroms durch die jeweiligen Liganden wurde mit folgender Formel berechnet:

$$Modulation\ I_{GABA}(\%) = \frac{I_{moduliert}}{I_{control}} * 100 - 100$$

$I_{moduliert}$.... durch das Derivat modulierter Strom (µA; Co-Applikation GABA $EC_{3\text{-}7}$ + Ligand))

$I_{control}$..... GABA-Kontrollstrom (µA; $EC_{3\text{-}7}$)

6.3 GABA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve

$GABA_A$-Rezeptor Subtypen: $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S;}$ wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Induktion der Chlorid-Ströme mit Hilfe der 2-Mikroelektrodenspannungs-Klemmtechnik nach Applikation ansteigender GABA Konzentrationen gemessen. Die nach Applikation von unterschiedlichen GABA Konzentrationen gemessenen Ströme (µA) wurden auf den Maximalstrom (bei 1mM) normiert (siehe **Kapitel 6.2 Berechnung**) und gemittelt. Nach Überführung dieser Daten in ein Koordinatensystem und Erstellung einer sigmoidalen Kurve (siehe **Abbildung 19**) mit Hilfe der Hill-Gleichung, konnten die benötigten Werte abgelesen werden (siehe **Tabelle 5**).

Der maximale I_{GABA} wurde an allen drei Rezeptorsubtypen bei einer Applikation von 1mM GABA erreicht (siehe **Abbildung 19**). In Bezug auf die Wirkstärke konnte festgestellt werden, dass GABA, β_1-haltige Rezeptoren (EC_{50} = 36,8 ± 7,6µM), tendenziell potenter aktiviert als β_2- (EC_{50} = 67,7 ± 6,0µM) und β_3- (EC_{50} = 46,5 ± 6,6µM) haltige Rezeptoren. Signifikante ($p<0.05$) Unterschiede konnten durch den Austausch der β_1- mit der β_2-Untereinheit ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$) festgestellt werden (siehe **Tabelle 4**).

EC_{50}	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	----------	*	NS
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	*	----------	NS
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	NS	NS	----------

Tabelle 4: Vergleich der Wirkstärke von GABA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren. Sterne zeigen statistische Signifikanz: * = $p<0.05$, NS: nicht signifikant;

Substanz	Rezeptor-Subtyp	EC_{50} (µM)	n_H	n
GABA	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	36,8 ± 7,6	1,0 ± 0,1	3
	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	67,7 ± 6,0	1,6 ± 0,1	3
	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	46,5 ± 6,6	1,5 ± 0,1	5

Tabelle 5: Wirkstärke (EC_{50}), Hill-Koeffizient (n_H) und Anzahl der durchgeführten Experimente (n) von GABA an $GABA_A$-Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination.

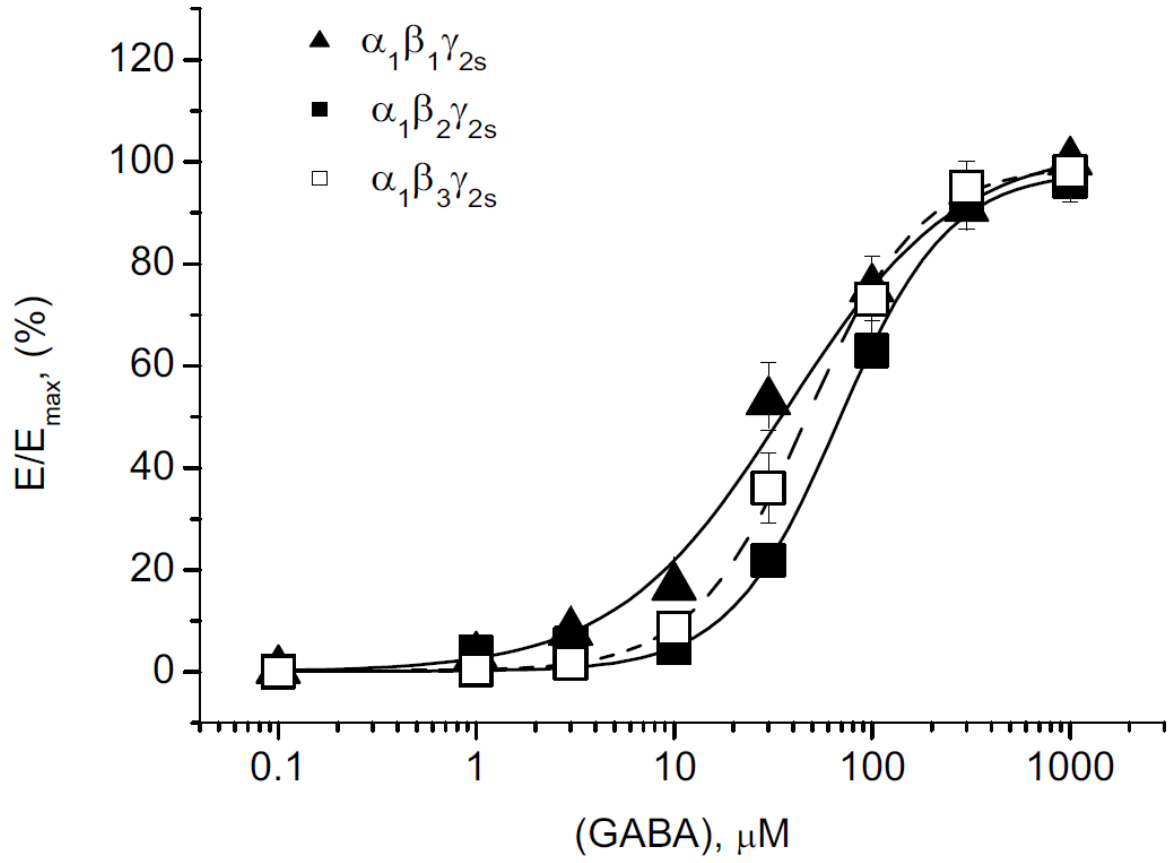

Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von GABA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$-Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis* Oozyten.

6.4 Modulation von I_{GABA} durch Derivate der VA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptorsubtypen

Die Auswertung der folgenden Daten zeigt, dass zwei der fünf untersuchten Valerensäure Derivate (MH409 und MH661) zu einer signifikant stärkeren Potenzierung des GABA-induzierten Chlorid-Stroms fähig sind als Valerensäure selbst. Ein Derivat, MH340, weist eine ähnliche maximale Potenzierung von I_{GABA} (EC_{3-7}) wie VA auf. Zwei weitere Derivate, MH346 und MH350, erreichten bis zu einer Konzentration von 300µM an keinem der getesteten Subtypen, ausgenommen Ligand MH350 an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, eine Modulation von I_{GABA} über 100%. Aus diesem Grund konnte für diese beiden Derivate keine Sättigung des Effekts erzielt werden und somit keine E_{max} oder EC_{50} Werte ermittelt werden.

Substanz	Rezeptor-Subtyp	E_{max} (%)	EC_{50} (µM)	n_H	n
VA*	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	111 ± 16	74,4 ± 19,3	1,6 ± 0,5	8
	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	721 ± 68	23,1 ± 4,2	1,4 ± 0,2	5
	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	632 ± 88	20,2 ± 5,2	1,5 ± 0,3	9
MH 340	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	141,6 ± 52,2	105,7 ± 96,7	1,0 ± 0,3	8
	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	629,6 ± 124,0	114,8 ± 44,3	1,5 ± 0,3	6
	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	503,2 ± 68,0	64,3 ± 17,7	1,7 ± 0,3	7
MH 409	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	2206,7 ± 217,0	24,7 ± 4,1	1,4 ± 0,1	5
	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	1439,9 ± 101,0	79,7 ± 10,6	1,3 ± 0,1	4
	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	1118,3 ± 44,4	41,3 ± 3,6	1,7 ± 0,1	3
MH 661	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	417,5 ± 36,4	18,2 ± 5,7	1,6 ± 0,4	3
	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	1227,8 ± 140,4	19,2 ± 4,5	2,0 ± 0,3	7
	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	1260,6 ± 165,6	17,4 ± 5,1	1,6 ± 0,3	6
MH 346	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	$E_{(10\mu M)}$ = 10,5 ± 10,2	-----□	-----□	5
	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$E_{(100\mu M)}$ = 79,3 ± 12,0	-----□	-----□	5
	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	$E_{(100\mu M)}$ = 34,8 ± 12,8	-----□	-----□	7
MH 350	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	$E_{(30\mu M)}$ = 21,4 ± 7,5	-----□	-----□	6
	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$E_{(100\mu M)}$ = 129,7 ± 30,1	-----□	-----□	7
	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	$E_{(100\mu M)}$ = 53,8 ± 14,4	-----□	-----□	8

Tabelle 6: Wirksamkeit (E_{max}), Wirkstärke (EC_{50}), Hill-Koeffizient (n_H) und Anzahl der durchgeführten Experimente (n) von VA, MH 340, MH 409 und MH 661 an $GABA_A$-Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination. *Daten für VA wurden aus: Khom et al., 2016; entnommen.

□= auf Grund geringer Modulation durch 1 bis 300µM der Liganden MH346 und MH 350 konnten keine E_{max} und EC_{50} Werte errechnet werden. Angegeben ist der im Rahmen der Konzentrations-Wirkungs-Untersuchung stärkste beobachtete Effekt; $E_{\mu M}$ = (%) I_{GABA} Modulation des Liganden bei angegebener Konzentration.

6.4.2 Modulation von I_{GABA} durch MH 340

Wie in **Abbildung 20** ersichtlich, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} mit ansteigenden Konzentrationen des Liganden MH340 zu einer signifikanten ($p<0.01$) Potenzierung von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$-Rezeptoren bereits ab einer Konzentration von 10µM während für $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren die dreifache Konzentration nötig war um eine signifikante ($p<0.005$) Modulation zu sehen. (siehe **Abbildung 21 A, 21 B** und **21 C** für typische Experimente). Die tendenziell stärkste Potenzierung von I_{GABA} durch MH 340 war an β_2-haltigen Rezeptoren zu erkennen (E_{max} = 629,6 ± 124,0%, n=6;), gefolgt von β_3-haltigen Rezeptoren (E_{max} = 503,2 ± 68,0%, n=7;).
Im Gegensatz dazu entsprach die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (E_{max}= 141,6 ± 52,2%; n=8) nur etwa einem Viertel im Vergleich zu β_2- und β_3-haltigen Rezeptoren und war somit deutlich schwächer ausgeprägt ($p<0.005$).

Bezüglich der Wirkstärke konnte festgestellt werden, dass der Ligand MH340 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (EC_{50} = 105,7 ± 96,7µM) und $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (EC_{50} = 114,8 ± 44,3µM) Rezeptoren eine ähnliche Potenz aufweist, aber an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren (EC_{50}= 64,3 ± 17,7µM) tendenziell potenter ist. Jedoch unterscheiden sich die EC_{50} Werte der Derivate an einzelnen Rezeptorsubtypen nicht signifikant ($p>0.05$) (siehe **Tabelle 7**).

E_{max} / EC_{50}	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	----------	*** / NS	*** / NS
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	*** / NS	----------	NS / NS
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	*** / NS	NS / NS	----------

Tabelle 7: Vergleich von Wirksamkeit (E_{max} oben rechts) und Wirkstärke (EC_{50} unten links) von MH340 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren.
Sterne zeigen statistische Signifikanz: *** = $p<0.005$, NS: nicht signifikant;

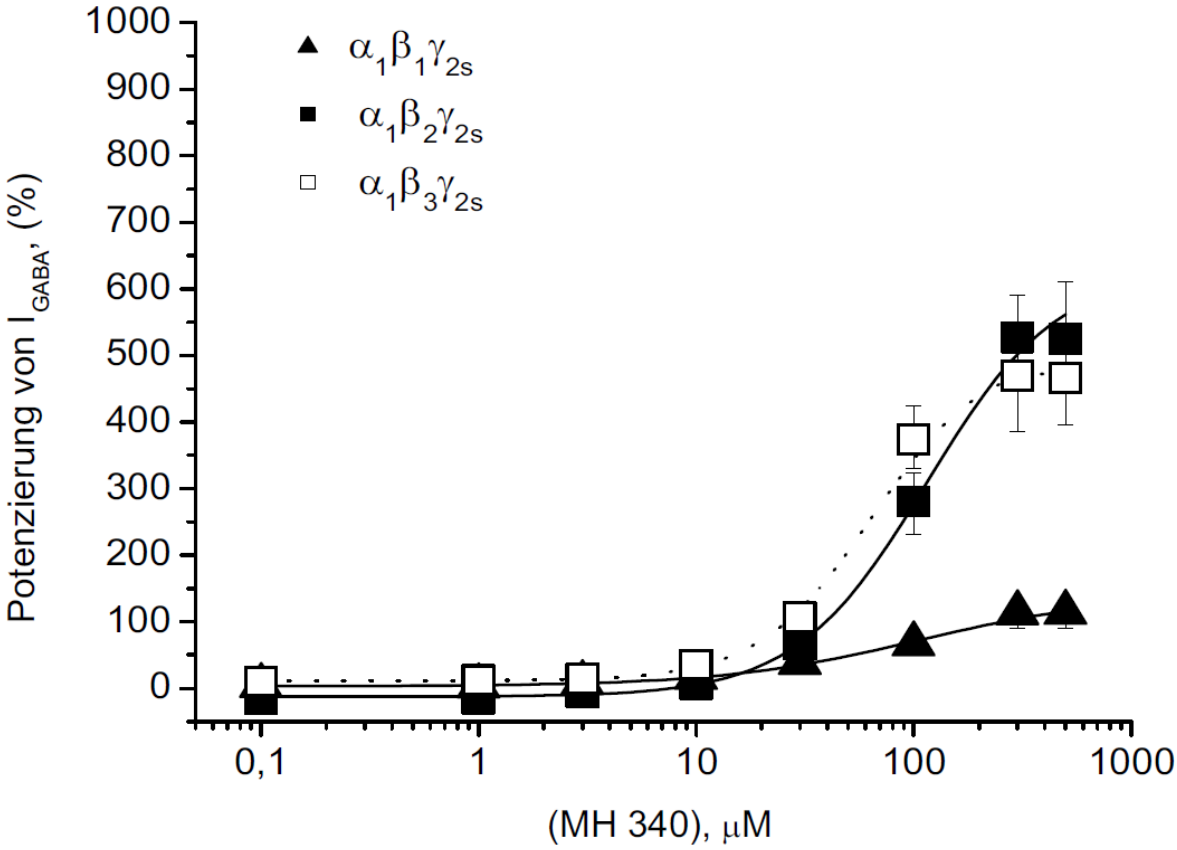

Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von MH340 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$-Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis* Oozyten.

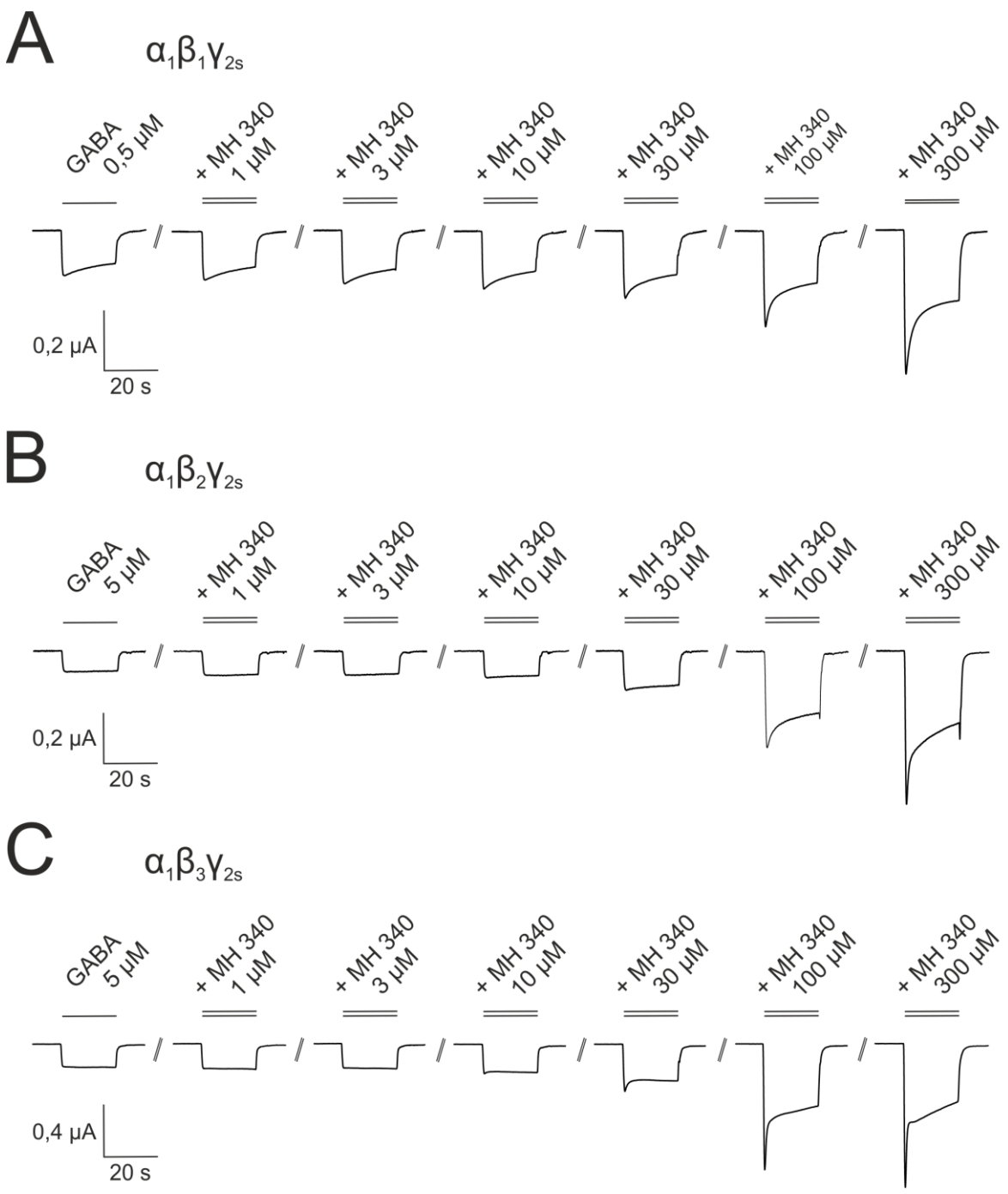

Abbildung 21: Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch verschiedene Konzentrationen (1/3/10/30/100/300µM) des Liganden MH340 an **(A)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, **(B)** $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren.

6.4.3 Modulation von I_{GABA} durch MH 409

Wie **Abbildung 22** zeigt, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} und durch ansteigende Konzentrationen des Liganden MH409 zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$- Rezeptoren ab einer Konzentration von 10µM ($p<0.05$). Die stärkste Potenzierung von I_{GABA} durch MH 409 war an β_1 inkorporierenden Rezeptoren zu erkennen (E_{max} = 2206,7 ± 217,0%, n=5;), hier potenzierten 30µM MH409 I_{GABA} bereits um etwa 1400% (siehe **Abbildung 23 A** für ein typisches Experiment). Im Vergleich dazu war an β_2- und β_3-haltigen Rezeptoren für eine vergleichbare Modulation eine etwa 10-fach höhere Konzentration nötig (β_2: E_{max} = 1439,9 ± 101,0%, n=4; β_3: E_{max} = 1118,3 ± 44,4%, n=3;) (siehe **Abbildung 23 B** und **23 C** für typische Experimente).

In Bezug auf die Wirkstärke konnten ebenfalls signifikante Unterschiede festgestellt werden (siehe **Tabelle 8**). Der Ligand MH409 ist an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren (EC50 = 24,7 ± 4,1µM) am potentesten, an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren (EC50 = 41,3 ± 3,6µM) signifikant ($p<0.05$) schwächer. Die geringste Potenz von MH409 wurde an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren (EC50= 64,3 ± 17,7µM) gemessen, auch diese unterscheidet sich signifikant zu β_1-haltigen Rezeptoren ($p<0.005$) und β_3-haltigen Rezeptoren ($p<0.05$).

E_{max} / **EC_{50}**	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	----------	* / ***	** / *
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	* / ***	----------	NS / *
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	** / *	NS / *	----------

Tabelle 8: Vergleich von Wirksamkeit (E_{max} oben rechts) und Wirkstärke (EC_{50} unten links) von MH409 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren.
Sterne zeigen statistische Signifikanz: * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$, NS: nicht signifikant;

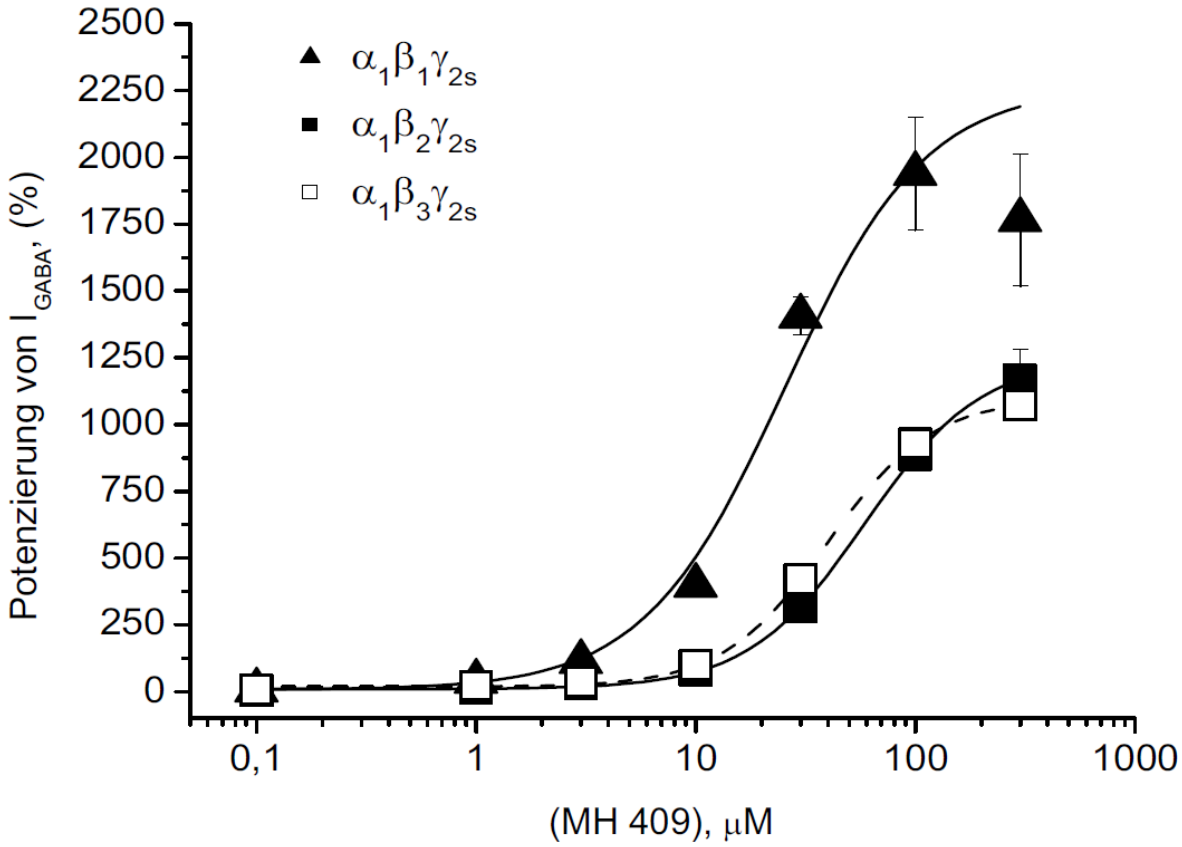

Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von MH409 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$-Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis* Oozyten.

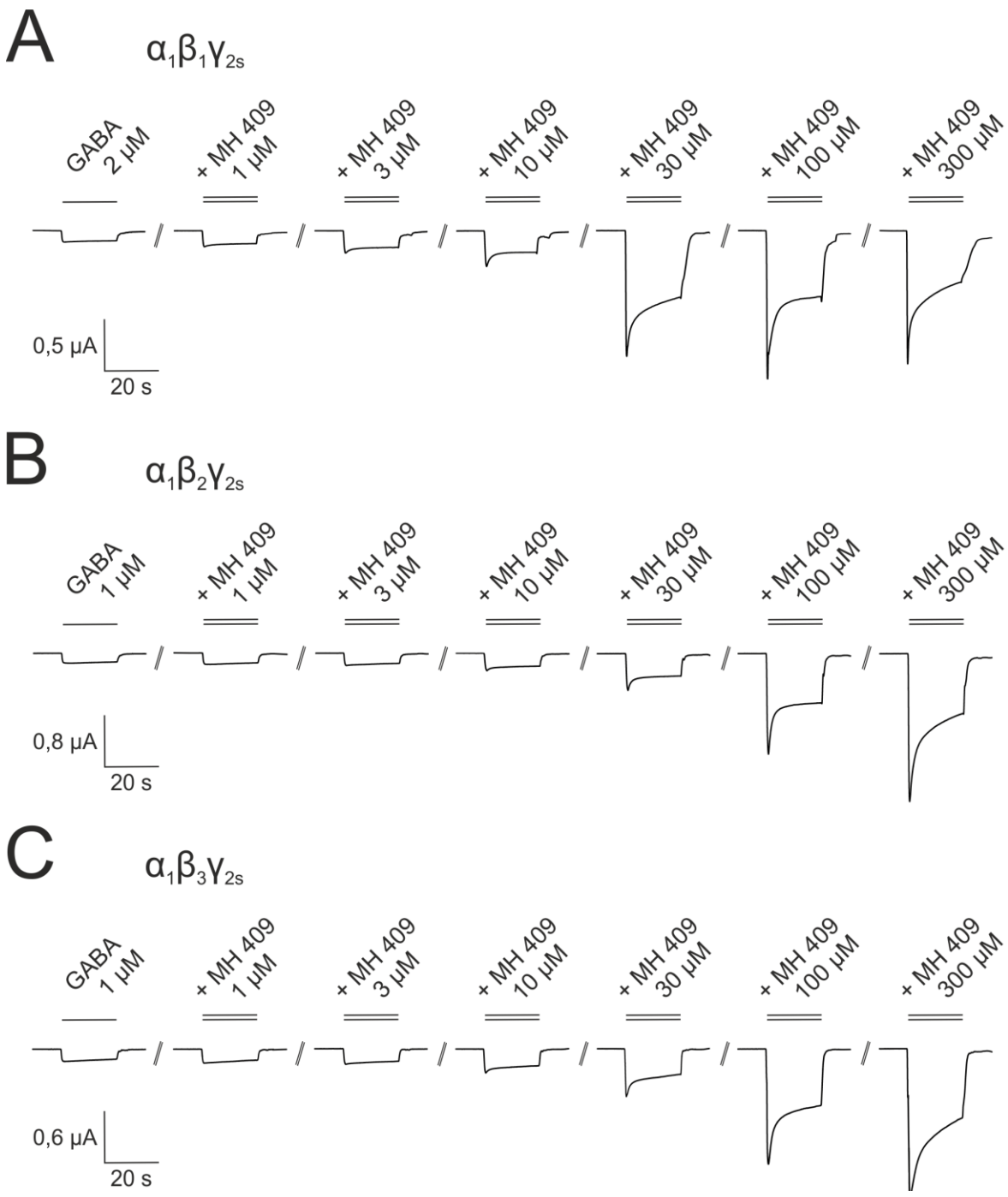

Abbildung 23: Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch verschiedene Konzentrationen (1/3/10/30/100/300µM) des Liganden MH409 an **(A)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, **(B)** $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren.

6.4.4 Modulation von I_{GABA} durch MH 661

Wie in **Abbildung 24** ersichtlich, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} und durch ansteigende Konzentrationen des Liganden MH661 zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren ab einer Konzentration von 3µM (siehe **Abbildung 25 B** und **25 C** für typische Experimente). MH 661 moduliert β_2-haltige Rezeptoren (E_{max} = 1227,8 ± 140,4%, n=7;) und β_3-haltigen Rezeptoren (E_{max} = 1260,6 ± 165,6%, n=6;) vergleichbar stark.
Im Gegensatz dazu war die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ signifikant ($p<0.05$) schwächer ausgeprägt (E_{max} = 417,5 ± 36,4%, n=3) und betrug nur etwa ein Drittel, verglichen mit $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren (siehe **Abbildung 25 A** für ein typisches Experiment).

Hinsichtlich der Wirkstärke konnte festgestellt werden, dass der Ligand MH409 an allen drei Rezeptorsubtypen ähnlich potent wirkt. Die EC_{50} befindet sich im Bereich von 17,4 ± 5,1µM an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren und 19,2 ± 4,5µM an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren.

E_{max} / EC_{50}	$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	----------	** / NS	* / NS
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	** / NS	----------	NS / NS
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	* / NS	NS / NS	----------

Tabelle 9: Vergleich von Wirksamkeit (E_{max} oben rechts) und Wirkstärke (EC_{50} unten links) von MH340 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren.
Sterne zeigen statistische Signifikanz: * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, NS: nicht signifikant;

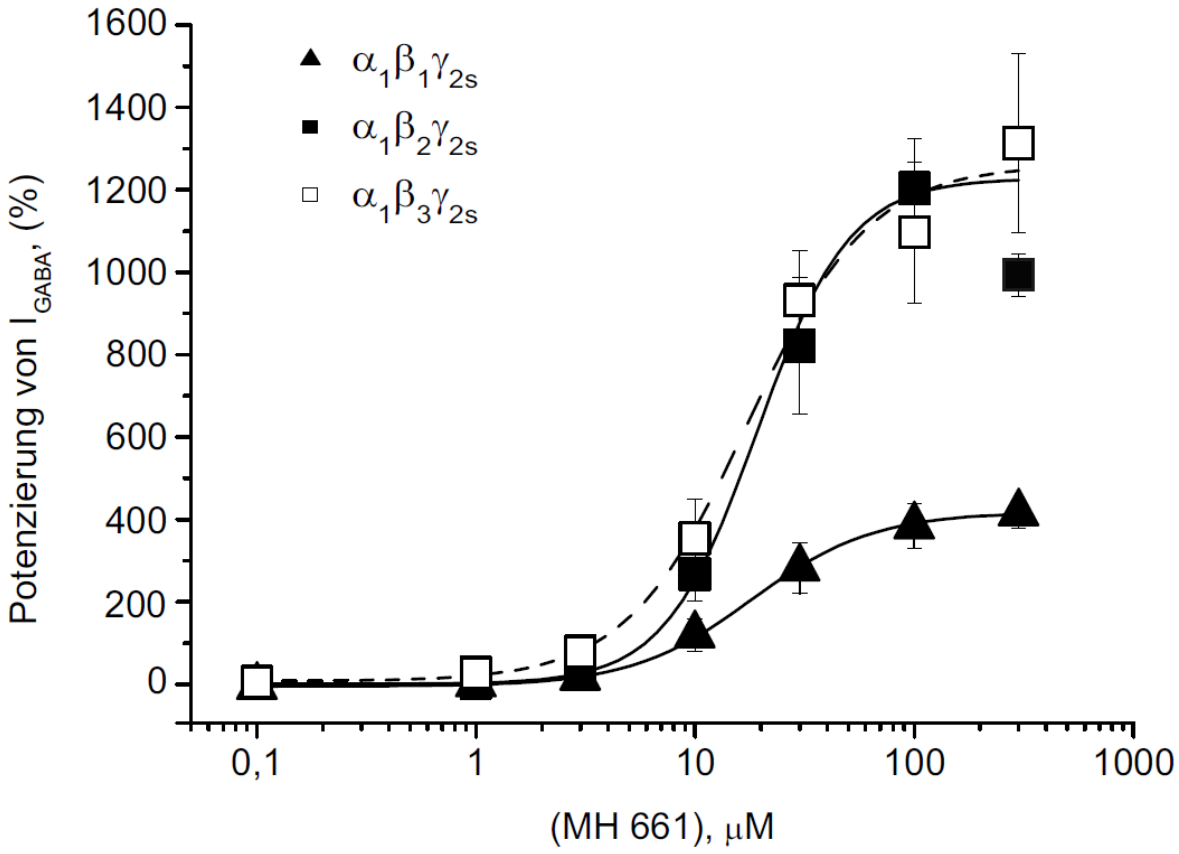

Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von MH661 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$-Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis* Oozyten.

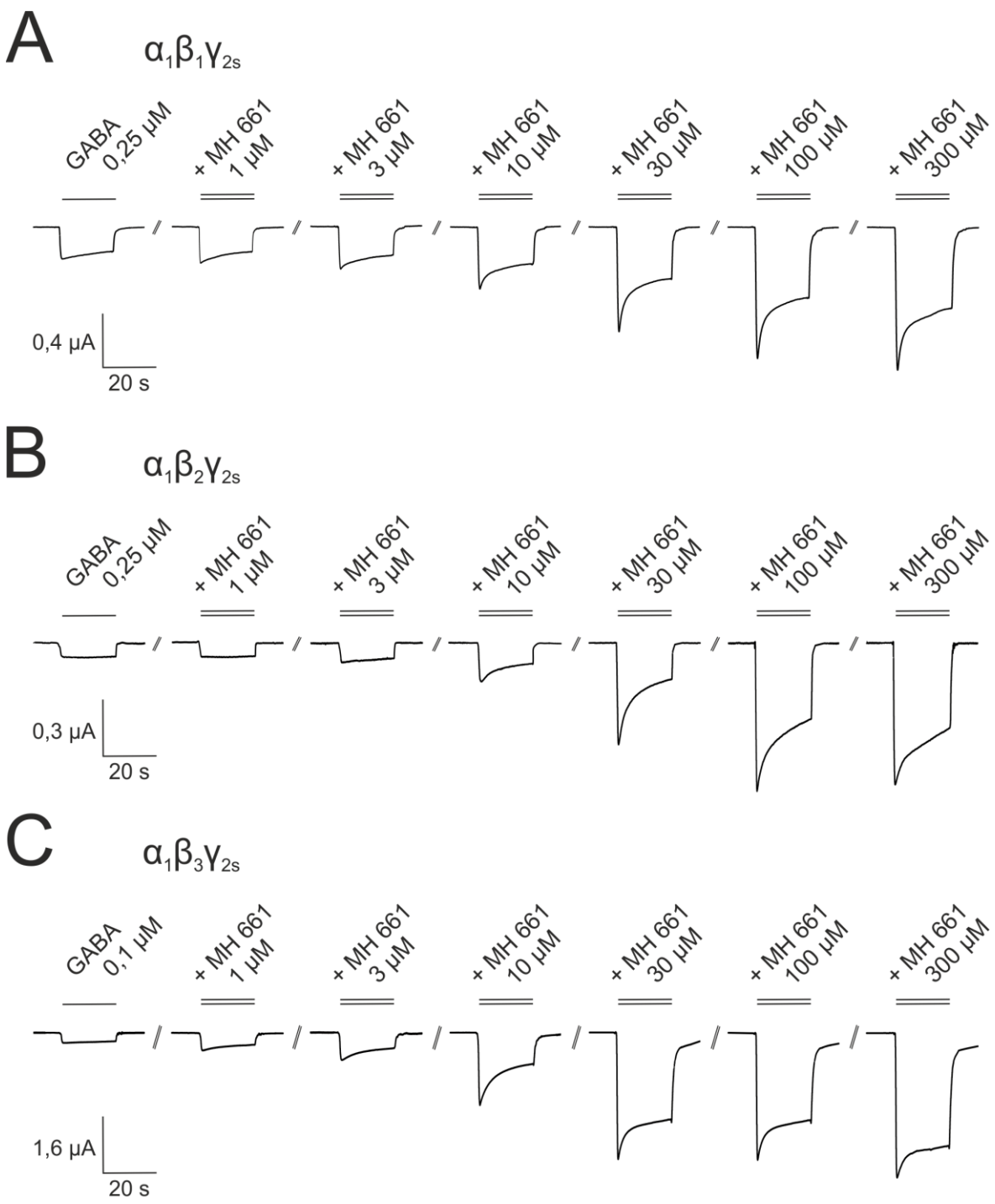

Abbildung 25: Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch verschiedene Konzentrationen (1/3/10/30/100/300µM) des Liganden MH661 an **(A)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, **(B)** $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und **(C)** $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren.

6.4.5 Modulation von I_{GABA} durch MH 346

Im Unterschied zu dem Naturstoff VA sowie den Derivaten MH340, MH409 und MH661 moduliert Ligand MH346 $GABA_A$-Rezeptoren im getesteten Konzentrationsbereich nicht ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$) oder erst bei Applikation deutlich höherer Konzentrationen ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$: ≥30µM bzw. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$: ≥100µM). Wie **Abbildung 26 A** zeigt, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} und durch ansteigende Konzentrationen des Liganden MH346 zu einer signifikanten ($p<0.05$) Potenzierung von I_{GABA}, an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren, nur bei einer Konzentration von 30, 100 und 300µM. Konzentration unter 30µm führten zu keiner signifikanten Potenzierung des Kontrollstroms. Die numerisch höchste Potenzierung von I_{GABA} durch MH 346 wurde an β_2 inkorporierenden Rezeptoren, bei einer Konzentration von 100µM, gemessen und betrug 79,3 ± 12,0% (n=5).

Signifikant ($p<0.05$) schwächere Ergebnisse wurden für β_3-haltige Rezeptoren erzielt. Auch eine Konzentration von 30µM führte an diesem Rezeptorsubtyp zu keiner signifikanten Modulation von I_{GABA}. Erst 100µM MH346 bewirkten eine erste signifikante Potenzierung von I_{GABA} ($E_{100\mu M}$ = 34,8 ± 12,8%; n=7).

An $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren kam es in keiner der getesteten Konzentrationen zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} ($p>0.05$; n=5).

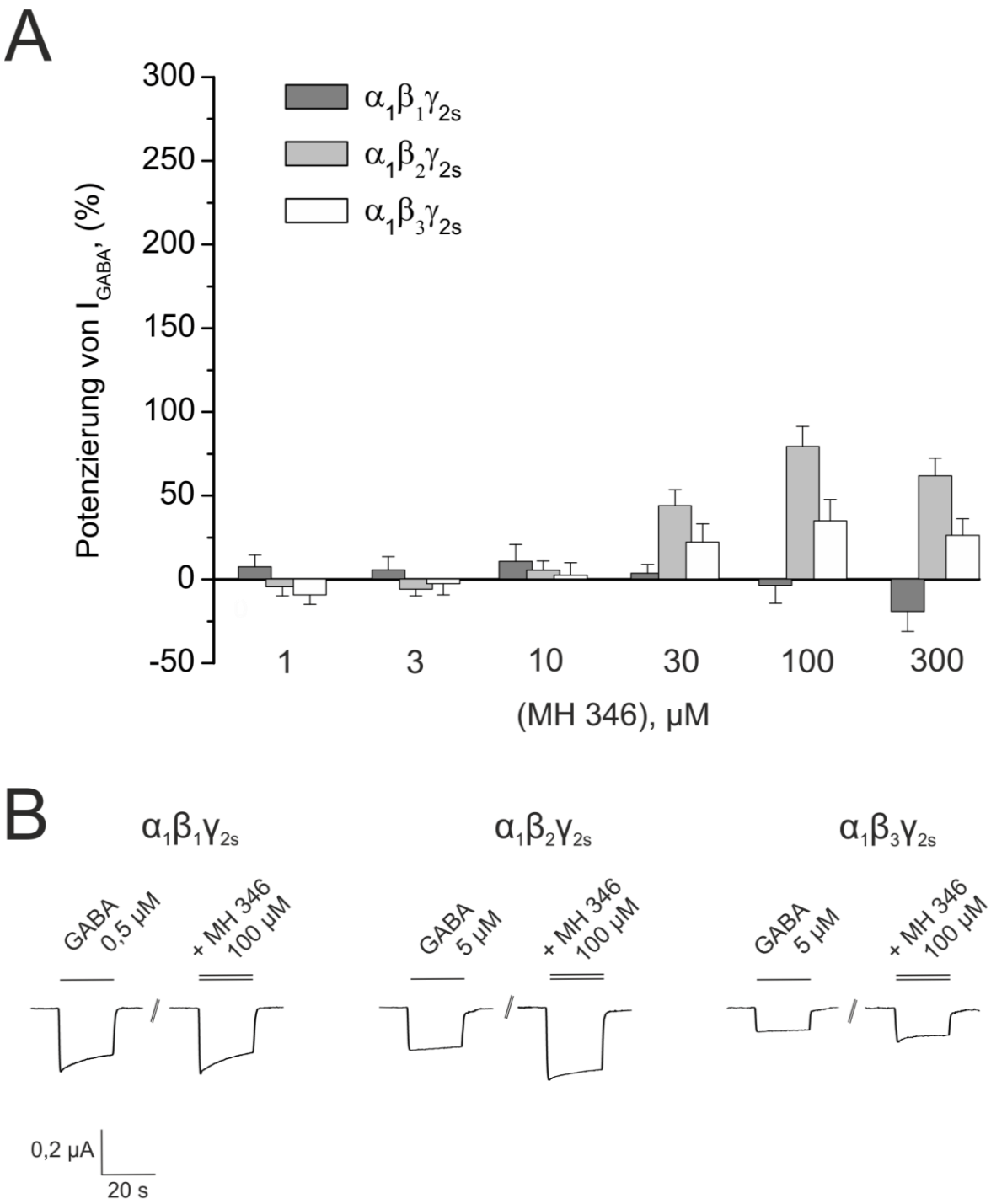

Abbildung 26: **(A)** Balkendiagramm zur Veranschaulichung der gemessenen Modulation von I_{GABA} durch MH346 an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren; **(B)** Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch Ligand MH346 bei 100µM an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis* Oozyten.

6.4.6 Modulation von I_{GABA} durch MH 350

Auch Ligand MH350 modulierte I_{GABA} verglichen mit VA sowie den Derivaten MH340, MH409 und MH661 deutlich schwächer. Über den getesteten Konzentrationsbereich potenzierte MH350 I_{GABA} nicht signifikant ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$) oder erst bei Applikation höherer Konzentrationen ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$: ≥10µM bzw. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ ≥100µM). Wie in **Abbildung 27 A** ersichtlich, kam es nach Co-Applikation einer GABA EC_{5-7} und durch ansteigende Konzentrationen des Liganden MH350 zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren ab einer Konzentration von 10µM, an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren konnte eine signifikante Potenzierung von I_{GABA} erst ab einer Konzentration von 100µM gemessen werden. Die numerisch stärkste Potenzierung von I_{GABA} durch MH 350 wurde an β_2-haltigen Rezeptoren, bei einer Konzentration von 100µM gemessen und betrug 129,7 ± 30,1 % (n=7). Dieser Wert war damit mehr als doppelt so hoch verglichen mit der maximalen I_{GABA} Modulation an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren ($E_{100\mu M}$ = 53,8 ± 14,4%, n=8).

An $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren kam es in keiner der getesteten Konzentrationen zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} ($p>0.05$; n=6;).

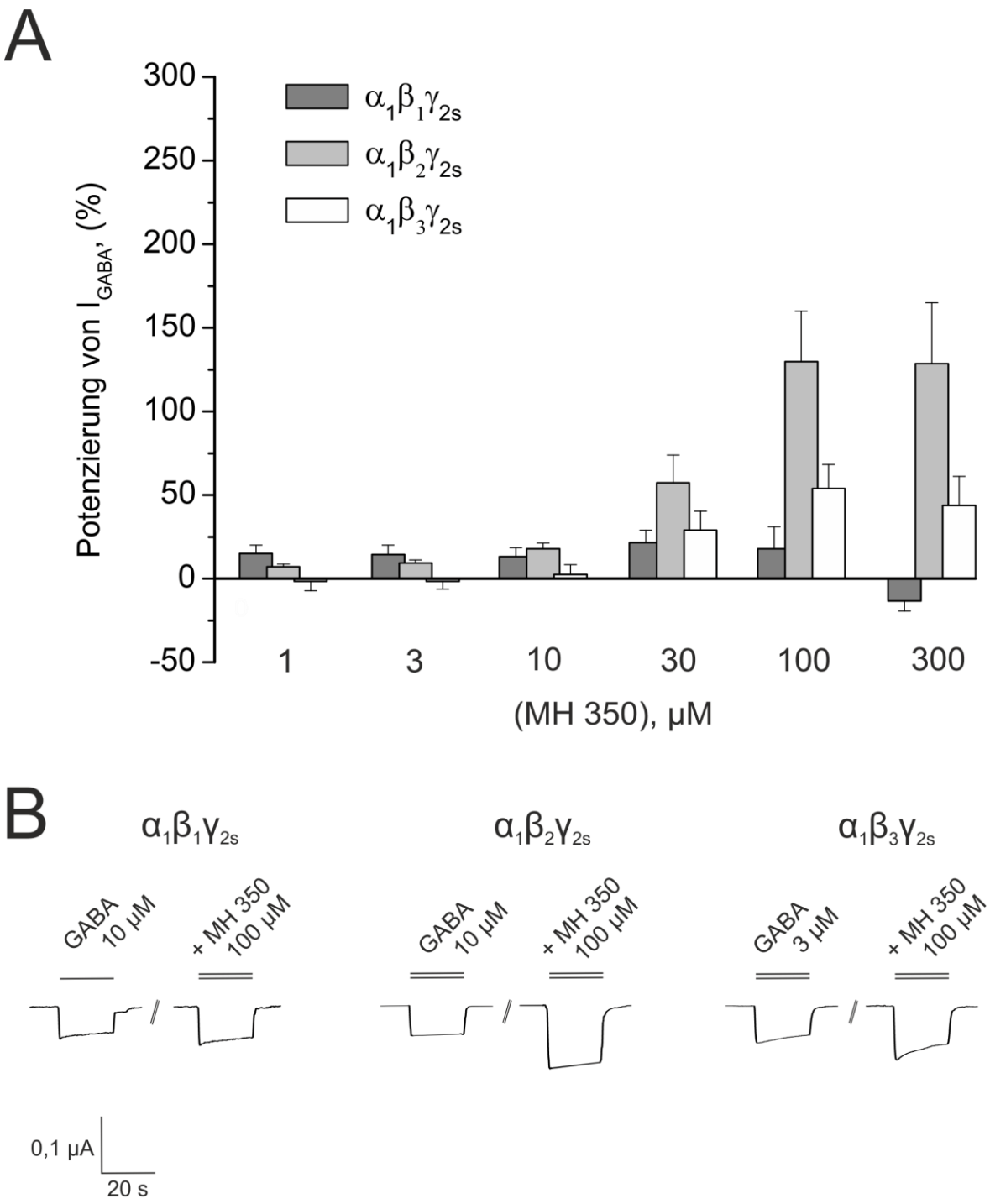

Abbildung 27: **(A)** Balkendiagramm zur Veranschaulichung der gemessenen Modulation von I_{GABA} durch MH350 an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren; **(B)** Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch Ligand MH350 bei 100µM an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen *Xenopus laevis* Oozyten.

V Diskussion

$GABA_A$-Rezeptoren zählen zu den wichtigsten neuroinhibitorischen Rezeptoren im Gehirn. Aus diesem Grund wird ihnen eine große Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit des Gehirns zugeschrieben. Zahlreiche Erkrankungen wie zum Beispiel Angsterkrankungen, Schlafstörungen, Epilepsie oder Schizophrenie werden maßgeblich mit einer Dysfunktion des GABAergen Systems assoziiert. $GABA_A$-Rezeptor-Modulatoren werden aufgrund ihrer anxiolytischen, sedierenden, antikonvulsiven und muskelrelaxierenden Wirkungen äußerst effektiv zur Therapie derartiger Erkrankungen eingesetzt. Aufgrund der Interaktion mit zahlreichen $GABA_A$-Rezeptor Subtypen, besitzen $GABA_A$-Rezeptor Liganden jedoch oft ein unspezifisches Wirkprofil und sind mit einer Reihe von Nebenwirkungen assoziiert. Subtyp-selektive Liganden könnten ein spezifischeres Wirkprofil aufweisen und unerwünschte Begleitwirkungen reduzieren.

Valerensäure wurde bereits vor einigen Jahren als β_2/β_3-subtypselektiver Ligand des $GABA_A$-Rezeptors identifiziert. Dieser Naturstoff interagiert selektiv mit β_2/β_3-Untereinheiten inkorporierenden Rezeptoren und weist nur sehr geringe Aktivität an β_1 Untereinheiten beinhaltenden $GABA_A$-Rezeptoren auf (Khom et al., 2007; Benke et al., 2009; Luger et al., 2015). Untersuchungen haben gezeigt, dass durch das gezielte Einführen von Modifikationen die Effizienz (E_{max}), Potenz (EC_{50}) und die β-Selektivität dieses Naturstoffes gezielt beeinflusst werden kann (Khom et. al., 2010; Kopp et al., 2010; Hintersteiner et al., 2014; Khom et al., 2016).

Für meine Diplomarbeit wurden daher fünf Derivate ausgewählt, um den Einfluss struktureller Modifikationen am Molekül der Valerensäure sowohl in Bezug auf die maximale Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren, deren Wirkstärke (EC_{50}), als auch auf eine potentielle Veränderung der β-Selektivität der neuen Naturstoffliganden (MH340, MH346, MH350, MH409 und MH661) zu untersuchen, um einen weiteren Beitrag zur besseren Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung von Valerensäure und modifizierten Derivaten zu leisten. Folgende Erkenntnisse wurden dabei gewonnen:

Strukturelle Modifikationen der Valerensäure beeinflussen signifikant die Wirksamkeit (E_{max}) der Modulation von I_{GABA} im Vergleich zum Naturstoff

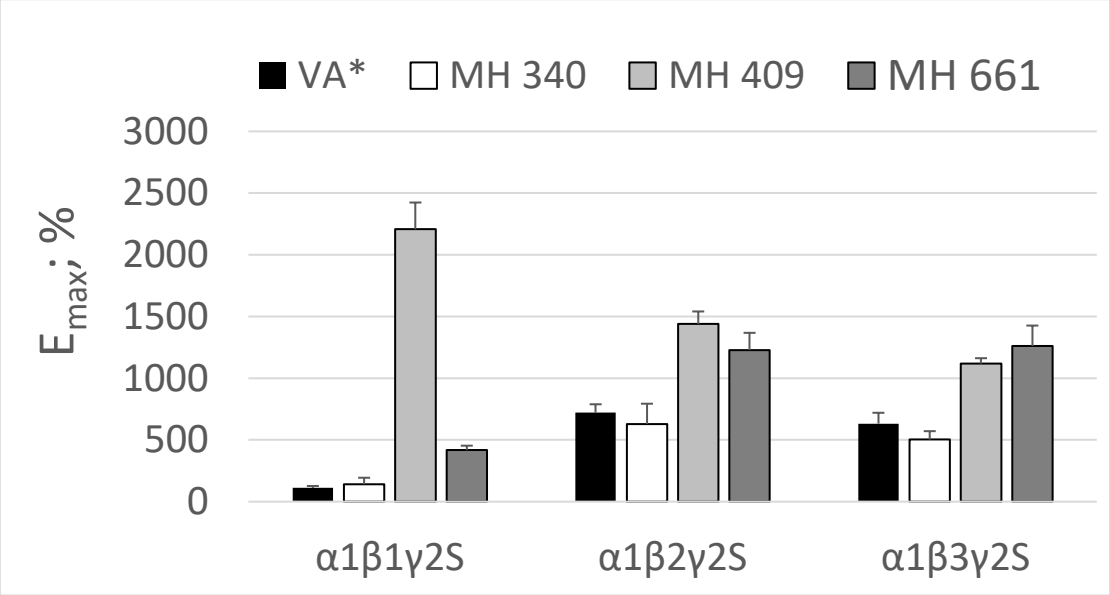

Abbildung 28: E_{max} von drei Valerensäure-Derivaten (MH340, MH409, MH661) an $GABA_A$-Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination im Vergleich zu Valerensäure (schwarz; * aus: Khom et al., 2016).

Bei zwei Derivaten, MH409 und MH661, konnte im Vergleich zu VA an allen drei getesteten Rezeptorsubtypen eine deutlich stärker ausgeprägte Potenzierung von I_{GABA} beobachtet werden (siehe **Abbildung 28**). MH409 erzielte dabei an β_1-haltigen Rezeptoren eine maximale Modulation von 2206,7 ± 217,0% (n=5), die Wirksamkeit dieses Derivates ist damit an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren etwa 20-fach höher verglichen mit VA (Daten zu VA aus Khom et al., 2016; siehe **Tabelle 6**). Auch an β_2- und β_3-haltigen Rezeptoren zeigte Ligand MH409 eine deutlich stärkere Modulation als der Naturstoff und potenzierte I_{GABA} etwa doppelt so stark (β_2: E_{max} = 1439,9 ± 101,0%, n=4; β_3: E_{max} = 1118,3 ± 44,4%, n=3).

MH661 modulierte β_2- und β_3-haltigen Rezeptoren ähnlich stark wie MH409 (MH661: β_2: E_{max} = 1227,8 ± 140,4%, n=7; β_3: E_{max} = 1260,6 ± 165,6%, n=6). Im Vergleich dazu war die Modulation von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren durch MH661 schwächer ausgeprägt als bei MH409, aber dennoch deutlich stärker (β_1: E_{max} = 417,5 ± 36,4%, n=3) verglichen mit der $\beta_{2/3}$-subtypselektiven Valerensäure.

Ein Derivat, MH340, potenzierte I_{GABA} an allen getesteten $GABA_A$-Rezeptoren ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) ähnlich stark, wie Valerensäure (β_1: E_{max} = 141,6 ± 52,2%, n=8; β_2: E_{max} = 629,6 ± 124,0%, n=6; β_3: E_{max} = 503,2 ± 68,0%, n=7; siehe **Abbildung 28**). Die im Rahmen dieser Derivatisierung durchgeführten Modifikation hatte daher keinen Einfluss auf die maximale Modulation von I_{GABA} durch die getesteten Rezeptorsubtypen.

Die beiden letzten (MH350 und MH346) der fünf untersuchten Derivate modulierten I_{GABA} abhängig vom untersuchten Subtyp nur sehr schwach bzw. nicht signifikant. Die stärkste gemessene Potenzierung trat an beiden Substanzen, bei einer Konzentration von 100µM, an β_2-haltigen Rezeptoren auf (MH346: $E_{(100\mu M)}$ = 79,3 ± 12,0%, n=5; MH350: $E_{(100\mu M)}$ = 129,7 ± 30,1%, n=7).

Strukturelle Modifikationen der Valerensäure beeinflussen signifikant die Wirkstärke (EC_{50}) der I_{GABA} Modulation im Vergleich zum Naturstoff

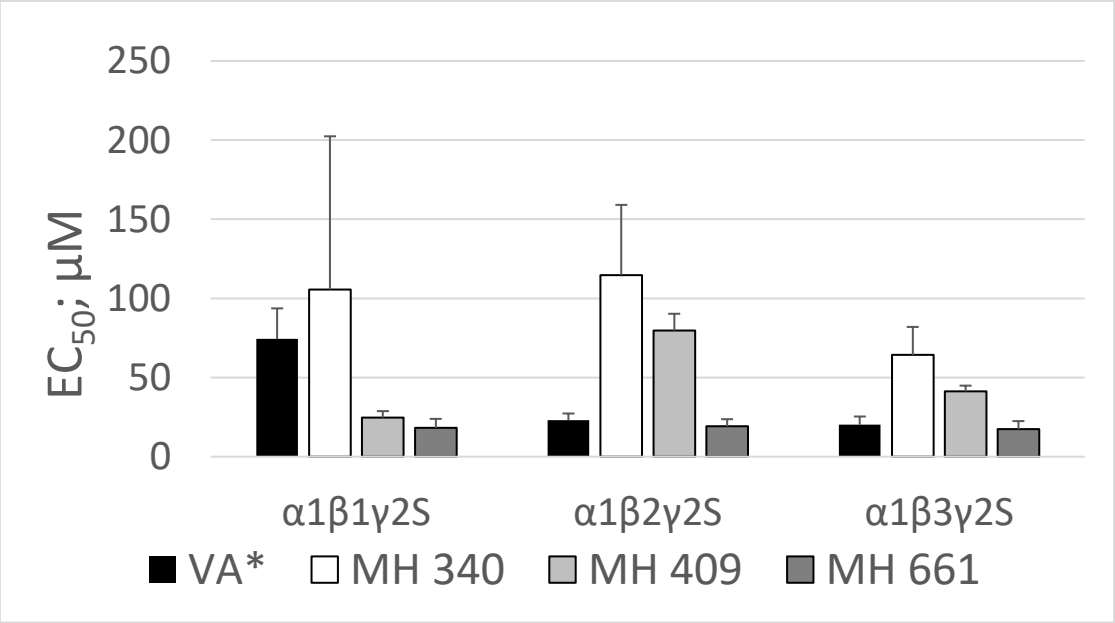

Abbildung 29: EC_{50} von drei Valerensäure-Derivaten (MH340, MH409, MH661) an $GABA_A$-Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination im Vergleich zu Valerensäure (schwarz; * aus: Khom et al., 2016).

Durch gezielte Modifikationen des Moleküls Valerensäure konnten signifikante Änderungen in der Wirkstärke (EC_{50}; µM) der Modulation von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren durch die getesteten Liganden beobachtet werden (siehe **Abbildung 29**). Verglichen mit VA zeigten die Derivate MH409 und MH661 eine signifikant höhere Potenz an β_1-haltigen Rezeptoren:

Substanz MH409 wirkte, unterschiedlich zu VA und allen anderen getesteten Derivaten, an β_1-haltigen Rezeptoren am potentesten (β_1: EC_{50} = 24,7 ± 4,1µM, n=5). Im Gegensatz dazu ist an β_2-haltigen Rezeptoren etwa die dreifache (β_2: EC_{50} = 79,7 ± 10,6µM, n=4) bzw. an β_3-haltige Rezeptoren die 1,5- bis 2-fache (β_3: EC_{50} = 41,3 ± 3,6µM, n=3) Konzentration MH409 nötig, um einen halbmaximalen Effekt auszulösen. Die EC_{50} von MH409 ist im Vergleich zu Valerensäure an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ etwa 3-mal geringer (VA: β_1: EC_{50} = 74,4 ± 19,3µM, n=8), an $\beta_{2/3}$-haltigen Rezeptoren jedoch 3,5- bzw. 2-fach höher (VA: β_2: EC_{50} = 23,1 ± 4,2µM, n=5; bzw. β_3: EC_{50} = 20,2 ± 5,2µM, n=9).

Derivat MH661 wirkte an allen drei Rezeptor Subtypen ähnlich potent (β_1: EC_{50} = 18,2 ± 5,7µM, n=3; β_2: EC_{50} = 19,2 ± 4,5µM, n=7; β_3: EC_{50} = 17,4 ± 5,1µM, n=6) wie VA an β_2- und β_3-Rezeptoren (VA: β_2: EC_{50} = 23,1 ± 4,2µM, n=5; bzw. β_3: EC_{50} = 20,2 ± 5,2µM, n=9). an β_1-haltigen Rezeptoren wurde jedoch nur ein Viertel der Konzentration von VA (VA: β_1: EC_{50} = 74,4 ± 19,3µM, n=8) benötigt um einen halb maximalen Effekt auszulösen.

Derivat MH340 zeigte an den drei getesteten Subtypen vergleichbare (β_1) bzw. signifikant geringere (β_2 und β_3) Potenz verglichen mit Valerensäure (MH340: β_1: EC_{50} = 105,7 ± 96,7µM, n=8; β_2: EC_{50} = 114,8 ± 44,3µM, n=6; β_3: EC_{50} = 64,3 ± 17,7µM, n=7).

Die Wirkstärke der beiden Derivate MH 346 bzw. MH350 konnte im Rahmen dieser Untersuchungen für den getesteten Konzentrationsbereich und die ausgewählten $GABA_A$-Rezeptorsubtypen nicht bestimmt werden, da die beiden Liganden auch bei hohen Konzentrationen (300µM) nur geringe modulatorische Aktivität zeigten.

Strukturelle Modifikationen der Valerensäure beeinflussen signifikant die $\beta_{2/3}$-Subtyp-Selektivität des Naturstoffes

Die Auswertung bezüglich einer möglichen β-Subtypentendenz zeigte überraschende Ergebnisse. Strukturelle Modifikationen an VA resultierten bei Derivat MH409 in einer Umkehr der Untereinheitenspezifität in Richtung β_1-Präferenz: $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$-Rezeptoren wurden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und ihrer Potenz wesentlich stärker moduliert als $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$- und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$-Rezeptoren. Dies ist ein Befund, der bislang noch für kein VA-Derivat gestellt werden konnte: MH409 ist damit das erste bekannte Valerensäure-Derivat, das an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren im Vergleich zu $\beta_{2/3}$-enthaltenen $GABA_A$-Rezeptoren sowohl eine höhere Wirksamkeit (etwa 20-fach) als auch eine höhere Wirkstärke (etwa 3-fach) als Valerensäure selbst aufweist. Derivat MH661 potenzierte β_1-Rezeptoren ebenfalls effizienter als VA (etwa 4-fach stärker); durch die ausgeprägte Modulation von $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch diesen Liganden konnte jedoch die $\beta_{2/3}$-Selektivität dieses Derivats – trotz gesteigerter Modulation β_1-hältiger Rezeptoren – erhalten bleiben.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass jene Modifikationen, die zu Derivat MH340 führten, die β_2/β_3-Selektivität von VA nicht beeinflusst haben: Dieses Derivat zeigte im Rahmen der Untersuchungen zwar an allen drei getesteten Subtypen eine vergleichbare (β_1) oder geringere ($\beta_{2/3}$) Potenz als VA, die maximal erreichte I_{GABA} Modulation war jedoch mit VA vergleichbar und an β_1-Rezeptoren signifikant schwächer ausgeprägt.

Die beiden Derivate MH346 und MH350 modulierten $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ im getesteten Konzentrationsbereich nur marginal (höchste gemessene I_{GABA} Potenzierung: 129,7 ± 30,1%, n=7; bei 100µM MH350 an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$). An $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ zeigte sich, durch diese beiden Substanzen, keine signifikante Modulation. Modifikationen, die zu diesen beiden Derivaten geführt haben, beeinflussten daher vor allem die maximale Wirksamkeit sowie die EC_{50} dieser Substanzen.

Interpretation und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Modifikationen am Molekül der Valerensäure signifikante Auswirkungen auf die Modulation von $GABA_A$-Rezeptoren vom Typ $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ haben: Dabei hatten jene Modifikationen, die zum Liganden MH409 führten, im Rahmen dieser Versuchsreihe den größten Einfluss auf die gemessenen Paramater: Im Vergleich zum $\beta_{2/3}$ selektiven Naturstoff besitzt Ligand MH409 eine Präferenz für β_1-inkorporierende $GABA_A$-Rezeptoren und zeigt an diesem Rezeptorsubtyp eine 20-fach erhöhte Wirksamkeit in Kombination mit einer 3-fach erhöhten Potenz. Zusätzlich zeigt dieses Derivat auch an β_2 und β_3 Rezeptoren eine doppelt so hohe I_{GABA} Modulation im Vergleich zu VA. Dieses Derivat ist damit das erste identifizierte Valerensäure-Derivat, das eine starke und potente Modulation von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren aufweist.

Im Gegensatz dazu beeinflussten jene Modifikationen, die zu Derivat MH661 und MH340 führten, die β-Subtyp Selektivität nur geringfügig: Ähnlich wie VA zeigten beide Substanzen eine reduzierte Modulation von β_1 im Vergleich zu $\beta_{2/3}$ Rezeptoren. Dieses Verhältnis war jedoch bei VA stärker ausgeprägt (etwa 6-fach geringere Modulation von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_{2S}$) im Vergleich zu MH340 (4-fach) bzw. MH661 (3-fach). MH661 zeigte zusätzlich eine signifikant erhöhte maximale I_{GABA} Potenzierung an allen drei getesteten Subtypen, wogegen die maximale Wirksamkeit von MH340 mit dem Naturstoff vergleichbar war.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Modifikationen am Molekül die Wirksamkeit, Potenz und Untereinheitenselektivität des Moleküls auch drastisch reduzieren können: Die beiden Derivate MH346 und MH350 modulieren $\beta_{2/3}$ Rezeptoren nur marginal und sind im getesteten Konzentrationsbereich an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ Rezeptoren unwirksam.

Zukünftige Untersuchungen könnten zeigen, ob β_1-präferierende Substanzen wie Ligand MH409 über ein anderes Wirkprofil im Vergleich zum Naturstoff VA verfügen: VA wirkt *in vivo* anxiolytisch und antikonvulsiv, aber nicht sedierend (Khom et al., 2007; Benke et al, 2009; Hintersteiner et al., 2014; Khom et al., 2016). Demgegenüber könnten Liganden, die vorwiegend β_1-Rezeptoren modulieren, Sedierung verursachen (Yanovsky et al., 2012; Gee et al., 2010).

Der Naturstoff Valerensäure interagiert vermutlich mit einer Bindungsstelle im α^-/β^+-Interface von $GABA_A$-Rezeptoren. Teil der potentiellen Bindungstasche von VA ist die Aminosäure β_3N265. Diese Aminosäure ist in β_1 durch ein Serin ersetzt (β_1S266) und verantwortlich für die $\beta_{2/3}$ selektive Wirkung der Valerensäure (Khom et al., 2007; Benke et al., 2009; Luger et al., 2015). Ob Derivate der Valerensäure ebenfalls mit dieser Bindungsstelle interagieren, ist bislang unklar und Fokus weiterer Untersuchungen.

VI Abkürzungen

3-AMPA ..... 3-Aminopropyl(methyl)phosphinic acid

3-APA..... 3-aminopropanesulfonic acid

ATP ..... Adenosintriphosphat

BZ ..... Benzodiazepin(e)

CACA..... cis-aminocrotonic acid

cAMP ..... cis-2-(aminomethyl)cyclopropylcarboxylic acid

cRNA..... coding RNA

Cys-loop ..... Cystein-Disulfidbrücke

DMSO ..... Dimethylsulfoxid

EC_{50}..... Potency (µM), Wirkstärke

ECD ..... extrazelluläre Domain

E_{max} ..... Efficiency (%), Wirksamkeit

EPSP..... Erregendes postsynaptisches Potential

GABA ..... γ-Aminobuttersäure

$GABA_A$..... γ-Aminobuttersäure Rezeptor Typ A

GABA-T ..... GABA-Transaminase

GAD ..... Glutamat-Decarboxylase

GAT-1 ..... GABA-Transporter 1

GDH ..... Glutamat-Dehydrogenase

GS ..... Glutamin-Synthetase

ICD ..... intrazelluläre Domäne

$I_{control}$ ..... GABA-Kontrollstrom

I_{GABA}..... GABA-induzierter Chloridstrom

I_{max} ..... Maximalstrom bei 1mM GABA

$I_{moduliert}$ ..... durch das VA-Derivat modulierter Strom

IPSP ..... Inhibitorisches postsynaptisches Potential

n ..... Anzahl der Experimente

n_H ..... Hillkoeffizient

PAG ..... phosphataktivierte Glutaminase

SEM ..... Standard error of the mean, Standardfehler

SSADH ..... Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase

T'ase..... Aminotransferasen, einschließlich Aspartat und Alanin Aminotransferasen

TMD ..... transmembrane Domäne

VA ..... Valerensäure

ZNS..... zentrales Nervensystem

VII Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von GABA (links) und Glutaminsäure (rechts) **5**
Abbildung 2: Biosynthese Weg und Metabolismus von GABA in eine Nervenendigung und einer Gliazelle (Von Bohlen und Halbach, Dermietzel; 2006)..... **6**
Abbildung 3:Schematische Darstellung der Synthese und des Abbaus von GABA; Abkürzungen in Kästchen bezeichnen Enzyme, die in Neuronen (blau) bzw. in Neuronen und Gliazellen (rot) für die Synthese und den Abbau von GABA verantwortlich sind. (GABA-T: GABA-Transaminase; GAD: Glutamat-Decarboxylase; GDH: Glutamat-Dehydrogenase; GS: Glutamin-Synthetase; PAG: phosphataktivierte Glutaminase; SSADH: Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase; T'ase: Aminotransferasen, einschließlich Aspartat und Alanin Aminotransferasen;) **8**
Abbildung 4: Schematische Darstellung des $GABA_A$-Rezeptors mit seinen Bindungsstellen für Liganden (links oben); Links in geschlossenem Zustand, rechts in geöffnetem Zustand. (von Bohlen und Halbach, Dermietzel; 2006) **11**
Abbildung 5: (A) Schematische Darstellung des Chloridstroms bei (links) rezeptorgebundener GABA, (Mitte) zusätzlich moduliert durch Benzodiazepine und (rechts) erhöhter intrazellulärer Chlorid-Konzentration. (B) Schematische Darstellung einer Synapse mit synaptischer (phasischer) und extrasynaptischer (tonischer) Aktivierung der $GABA_A$-Rezeptoren durch GABA. (modifiziert von Bonin et al., 2008) **13**
Abbildung 6: (A) $GABA_A$-Rezeptor parallel zur Membran betrachtet: gefärbte Bereiche zeigen Elemente der Sekundärstruktur: Porenbildende α-Helices (orange), α-Helices (rot), β-Faltblatt (blau); ECD = extrazelluläre Domain, TMD = transmembrane Domäne, ICD = intrazelluläre Domäne, Größe des Rezeptors in Å (Ångström) angegeben. (B) Links: $GABA_A$-Rezeptor mit den fünf Untereinheiten (1-5) von extrazellulärer Seite aus betrachtet. Rechts: Anordnung der transmembranen Domänen (M1-4), C-Terminus (violett) und M2-M3-Loop (grün). (C) Aufbau einer einzelnen Untereinheit des Rezeptors in Regenbogen-Farben, beginnend am N-Terminus (rot) bis zum C-Terminus (violett). (Chua et al., 2017) **15**
Abbildung 7: Unterschied der Sensitivität für Benzodiazepine (BDZ) an der α Untereinheit. (γ-Untereinheit muss co-exprimiert sein). Flunitrazepam (Flu) als typisches Beispiel für ein BDZ. Verantwortlich sind Unterschiedliche Aminosäuren im N-Terminus: Links: His in Kombination mit Gly führen zu einer hohen Sensitivität. Mitte: Der Austausch von Gly mit Glu^- schwächt die Sensitivität ab. Rechts: Das Ersetzen von His durch Arg^+ führt zum Sensitivitätsverlust. (modifiziert von: Jacob et al., 2008) **21**
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines $GABA_A$-Rezeptors mit γ-α-β-α-β Untereinheiten Kombination (von extrazellulärer Sicht aus, im Uhrzeigersinn). Gezeigt werden die Bindungsstellen für klassische Liganden. (Chua et al., 2017) **24**
Abbildung 9: Schleifen (Loop) A-F, die die Bindungstasche für GABA formen. (Bergmann et al., 2013)..... **25**
Abbildung 10: Strukturformel von Valerensäure **29**
Abbildung 11: Schematische Abbildung der mutmaßlichen Bindungstasche für VA zwischen α- (braun) und β_3 (A) bzw. β_1 (B)- (grün) Untereinheit (β^+/α^-) und der optimierten Docking-Pose von VA(rot/lila). Der strukturbasierte Pharmakophor verfügt über drei lipophile Kontaktstellen (gelbe Sphären), zwei vermeintliche Wasserstoff-Bindungs-Akzeptor (rote Pfeile) und eine mutmaßliche ionische Wechselwirkung (roter Stern) (adaptiert von Luger et al., 2015). **30**
Abbildung 12: (A) Konzentrations-Wirkungs-Kurven von VA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (◆), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (- -) Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen Xenopus laevis Oozyten. (B) Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch VA bei 10µM an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren. (adaptiert nach Khom et al., 2016) **32**
Abbildung 13: Xenopus laevis Weibchen (eigene Aufnahme, 2015) **35**

Abbildung 14:Operation des weiblichen Xenopus laevis (A. Schöffmann, Universität Wien, 2013) **36**
Abbildung 15: Entnahme von Ovarialgewebe (bearbeitet, A. Schöffmann, Universität Wien, 2013) 36
Abbildung 16: Links: einzelne Oozyten nach dem Verdau; Rechts: Oozyten nach der Selektion; (eigene Aufnahme, 2015) **37**
Abbildung 17: Schematische Darstellung der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (http://terpconnect.umd.edu/~rpayne/neuron/simchap3.htm; University of Maryland, USA) **39**
Abbildung 18: Querschnitt (a) und Aufsicht (b) der Perfusionskammer; Schematische Darstellung des Flusses innerhalb der Perfusionskammer (c); Foto der Perfusionskammer (d) (Baburin et al., 2006) . **40**
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von GABA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen Xenopus laevis Oozyten. **45**
Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von MH340 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen Xenopus laevis Oozyten. **49**
Abbildung 21: Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch verschiedene Konzentrationen (1/3/10/30/100/300µM) des Liganden MH340 an (A) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, (B) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und (C) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren. **50**
Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von MH409 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen Xenopus laevis Oozyten. **52**
Abbildung 23: Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch verschiedene Konzentrationen (1/3/10/30/100/300µM) des Liganden MH409 an (A) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, (B) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und (C) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren. **53**
Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von MH661 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ (▲), $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (■) und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (□)$GABA_A$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen Xenopus laevis Oozyten. **55**
Abbildung 25: Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch verschiedene Konzentrationen (1/3/10/30/100/300µM) des Liganden MH661 an (A) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, (B) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und (C) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Rezeptoren. **56**
Abbildung 26: (A) Balkendiagramm zur Veranschaulichung der gemessenen Modulation von I_{GABA} durch MH346 an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren; (B) Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch Ligand MH346 bei 100µM an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen Xenopus laevis Oozyten. **58**
Abbildung 27: (A) Balkendiagramm zur Veranschaulichung der gemessenen Modulation von I_{GABA} durch MH350 an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren; (B) Repräsentative Kontrollströme und modulierte I_{GABA} durch Ligand MH350 bei 100µM an $\alpha_1\beta_{1/2/3}\gamma_{2S}$ Rezeptoren. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mind. 3 verschiedenen Experimenten an mind. 2 verschiedenen Xenopus laevis Oozyten. **60**
Abbildung 28: E_{max} von drei Valerensäure-Derivaten (MH340, MH409, MH661) an $GABA_A$ Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination im Vergleich zu Valerensäure (schwarz; * aus: Khom et al., 2016). **62**
Abbildung 29: EC_{50} von drei Valerensäure-Derivaten (MH340, MH409, MH661) an $GABA_A$ Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination im Vergleich zu Valerensäure (schwarz; * aus: Khom et al., 2016). **63**

VIII Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der verschiedenen GABA Rezeptor-Typen. Liste der Agonisten, Antagonisten und Modulatoren ist nicht komplett und enthält die gängigsten Substanzen. CACA = cis-aminocrotonic acid; CAMP = cis-2-(aminomethyl)cyclopropylcarboxylic acid; 3-APA= 3-aminopropanesulfonic acid; 3-AMPA = 3-Aminopropyl(methyl)phosphinic acid; (Ghose et al., 2010; Von Bohlen und Halbach, Dermietzel; 2006; Johnston, 1996) **10**

Tabelle 2: Identifizierte und vermutete Untereinheiten(UE) Kombinationen (Sieghart und Olsen, 2008) ... **18**

Tabelle 3: Im Rahmen der Diplomarbeit verwendete Materialien und Software **34**

Tabelle 4: Vergleich der Wirkstärke von GABA an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren. Sterne zeigen statistische Signifikanz: * = $p<0.05$; NS: nicht signifikant; **44**

Tabelle 5: Wirkstärke (EC_{50}), Hill-Koeffizient (n_H) und Anzahl der durchgeführten Experimente (n) von GABA an $GABA_A$ Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination. **45**

Tabelle 6: Wirksamkeit (E_{max}), Wirkstärke (EC_{50}), Hill-Koeffizient (n_H) und Anzahl der durchgeführten Experimente (n) von VA, MH 340, MH 409 und MH 661 an $GABA_A$ Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenkombination. *Daten für VA wurden aus: Khom et al., 2016; entnommen. □= auf Grund geringer Modulation durch 1 bis 300 µM der Liganden MH346 und MH 350 konnten keine E_{max} und EC_{50} Werte errechnet werden. Angegeben ist der im Rahmen der Konzentrations-Wirkungs-Untersuchung stärkste beobachtete Effekt; $E_{\mu M}$ = (%) I_{GABA} Modulation des Liganden bei angegebener Konzentration. **47**

Tabelle 7: Vergleich von Wirksamkeit (E_{max} oben rechts) und Wirkstärke (EC_{50} unten links) von MH340 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren. Sterne zeigen statistische Signifikanz: *** = $p<0.005$; NS: nicht signifikant; **48**

Tabelle 8: Vergleich von Wirksamkeit (oben rechts) und Wirkstärke (unten links) von MH409 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren. Sterne zeigen statistische Signifikanz: * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$; **51**

Tabelle 9: Vergleich von Wirksamkeit (oben rechts) und Wirkstärke (unten links) von MH340 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$-Rezeptoren. Sterne zeigen statistische Signifikanz: * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$; NS: nicht signifikant; **54**

IX Literaturverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. Neuron 11:401–407.

Bali M, Akabas MH (2004) Defining the Propofol Binding Site Location on the $GABA_A$ Receptor. Mol. Pharmacol. 65:68–76.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, et al. (1998) Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev 50:291-313.

Baumann SW, Baur R, Sigel E (2003) Individual properties of the two functional agonist sites in $GABA_A$ receptors. The Journal of Neuroscience 23(35):11158-11166.

Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW (2009) Extrasynaptic $GABA_A$ receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 29:12757-63.

Benke D, Barberis A, Kopp S, Altmann KH, Schubiger M, Vogt KE, Rudolph U, 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.

Bergmann R, Kongsbak K, Sørensen PL, Sander T, Balle T (2013) A Unified Model of the GABA(A) Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. PLoS ONE 8(1):e52323.

Bianchi L, Driscoll M (2006) Heterologous expression of C. elegans ion channels in Xenopus oocytes. WormBook, ed. The C. elegans Research Community.

Bjurstöm H, Wang J, Wang J, Ericsson I, Bengtsson M, Liu Y, Kumar-Mendu S, Issazadeh-Navikas S, Birnir B (2008) GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. Journal of Neuroimmunology 205(1-2):44-50.

Bloom FE, Iversen LL (1971) Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. Nature 229(5287):628–630.

Boileau AJ, Newell JG, Czajkowski C (2002a) GABA(A) receptor β2 Tyr97 and Leu99 Line the GABA-binding Site. The Journal of Biological Chemistry 277(4):2931- 2937.

Boileau AJ, Baur R, Sharkey LM, Sigel E, Czajkowski C (2002b) The relative amount of cRNA coding for gamma2 subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABA(A) receptors expressed in Xenopus oocytes. Neuropharmacology 43:695-700.

Bonin RP, Orser BA (2008) GABA(A) receptor subtypes underlying general anesthesia. Pharmacol Biochem Behav 90:105-112.

Bonin RP, De Koninck Y (2013) Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. Neuroscience Letters 557(A):43-51

Bormann J, Feigenspan A (1995) GABAC receptors. Trends Neurosci 18:515-519.

Bowery NG (2010) Historical perspective and emergence of the GABAB receptor. Adv Pharmacol 58:1–18.

Breitinger HG, Becker CM (2002) The Inhibitory Glycine Receptor-Simple Views of a Complicated Channel. Chembiochem 3:1042-1052.

Campagna-Slater V, Weaver DF (2007) Molecular modelling of the $GABA_A$ ion channel protein. J Mol Graph Model 25:721-30.

Chandra D, Halonen LM, Linden AM, Procaccini C, Hellsten K, et al. (2010) Prototypic GABA(A) receptor agonist muscimol acts preferentially through forebrain high-affinity binding sites. Neuropsychopharmacology 35:999-1007.

Charney DS, Mihic SJ, Harris RA (2001) Hypnotics and sedatives. Goodman & Gilmans's Pharmacological Basis of Therapeutics 10:399-427.

Chen PE, Wyllie DJ (2006) Pharmacological Insights Obtained from Structure-Function Studies of Ionotropic Glutamate Receptors. British journal of pharmacology 147:839-853.

Cherubini E, Conti F (2001) Generating diversity at GABAergic synapses. Trends Neurosci 24:155–162.

Chisari M, Eisenman LN, Covey DF, Mennerick S, Zorumski CF (2010) The sticky issue of neurosteroids and GABA(A) receptors. Trends Neurosci 33(7):299-306.

Chua HC, Chebib M (2017) $GABA_A$ Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. Advances in Pharmacology 79:1-34.

Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP (2000) Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40:431-458.

Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF (2003) A Novel Class of Ligand-Gated Ion Channel Is Activated by Zn2+. The Journal of biological chemistry 278:712-717.

Doyon N, Prescott S, Castonguay A, Godin A, Kröger H, De Koninck Y (2011) Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. PLOS computational biology 7(9): e1002149.

Drafts BC, Fisher JL (2006) Identification of structures within GABAA receptor alpha subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. J Pharmacol Exp Ther 318:1094-101.

Durkin MM, Smith KE, Borden LA, Weinshank RL, Branchek TA, Gustafson EL (1995) Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in rat brain: an in situ hybridization study. Brain Res Mol Brain Res 33: 7-21.

Eaton M, Bracamontes J, Shu HJ, Li P, Mennerick SJ, Steinbach JH, et al. (2014) $GABA_A$ α_4, β_2 and δ subunits assemble to produce more than one functionally distinct receptor type. Molecular Pharmacology 86(6):647-656.

Engin E, Liu J, Rudolph U (2012) alpha2-containing GABA(A) receptors: a target for the development of novel treatment strategies for CNS disorders. Pharmacology & Therapeutics 136(2):142-152.

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

Fan HP, Fan FJ, Bao L, Pei G (2006) SNAP-25/syntaxin 1A complex functionally modulates neurotransmitter gamma-aminobutyric acid reuptake. J Biol Chem 281:28174-84.

Fon EA, Edwards RH (2001) Molecular mechanisms of neurotransmitter release. Muscle Nerve 24:581–601.

Gee KW, Tran MB, Hogenkamp DJ, Johnstone TB, Bagnera RE, Yoshimura RF, Huang JC, Belluzzi JD, Whittemore ER (2010) Limiting activity at beta1-subunit-containing GABAA receptor subtypes reduces ataxia. J Pharmacol Exp Ther 332(3):1040-53.

Ghose S, Winter MK, McCarson KE, Tamminga CA, Enna SJ (2011) The GABAB receptor as a target for antidepressant drug action. British Journal of Pharmacology 162:1-17.

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

Halliwell JV, Plant TD, Robbins J, Standen NB (1994) Microelectrode techniques: The Plymouth workshop handbook. 2nd Edition. Edited by Ogden, DC. Company of Biologists, Cambridge, UK.

Hintersteiner J, Haider M, Luger D, Schwarzer C, Reznicek G, Jäger W, Khom S, Mihovilovic MD, Hering S (2014) Esters of valerenic acid as potential prodrugs. Eur J Pharmacol 735:123–131.

Hosie AM, Wilkins ME, Smart TG (2007) Neurosteroid binding sites on GABAA receptors. Pharmacology & Therapeutics 16(1):7-19.

Huang JH, Johnston GA (1990) (+)-Hydrastine, a potent competitive antagonist at mammalian GABAA receptors. Br J Pharmacol 99:727-30.

Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GA (2003) Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from Ginkgo biloba, is an antagonist at recombinant alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors. Eur J Pharmacol 464: 1-8.

Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GA (2004) Ginkgolides, diterpene trilactones of Ginkgo biloba, as antagonists at recombinant alpha1beta2gamma2L GABAA receptors. Eur J Pharmacol 494:131-8.

Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. Nat Rev Neurosci 9:331-43.

Jensen ML, Timmermann DB, Johansen TH, Schousboe A, Varming T, Ahring PK (2002) The β subunit determines the ion selectivity of the $GABA_A$ receptor. J Biol Chem 277:41438-41447.

Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, et al. (2003) Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A 100:4293-8.

Jin XT, Galvan A, Wichmann T, Smith Y (2011) Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. Front Syst Neurosci 5:63.

Johnston GA (1996) GABAc receptors: relatively simple transmitter -gated ion channels?. Trends Pharmacol Sci 17(9):319-323.

Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ (1991) Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. J Neurochem 56:720–723.

Kaila K (1994) Ionic basis of $GABA_A$ receptor channel function in the nervous system. Prog.Neurobiol 42:489-537

Kash TL, Trudell JR, Harrison NL (2004) Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A ($GABA_A$) receptor. Biochem Soc Trans 32:540-6.

Kaupmann K, Cryan JF, Wellendorph P, Mombereau C, Sansig G, et al. (2003) Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice. Eur J Neurosci 18:2722-30.

Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP (2001) International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status REFERENCES 134 of the Nomenclature and Properties of P2x Receptors and Their Subunits. Pharmacological reviews 53:107-118.

Khakh BS, North RA (2006) P2x Receptors as Cell-Surface Atp Sensors in Health and Disease. Nature 442:527-532.

Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B and Hering S (2007) Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. Neuropharmacology 53:178-87.

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

Khom S, Hintersteiner J, Luger D, Haider M, Pototschnig G, Mihovilovic MD, Schwarzer C, Hering S (2016) Analysis of b-Subunit-dependent GABAA Receptor Modulation and Behavioral Effects of Valerenic Acid Derivatives. J Pharmacol Exp Ther 357:580–590.

Kittler JT, Moss SJ (2003) Modulation of $GABA_A$ receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking:
implications for the efficacy of synaptic transmission. Curr Opin Neurobiol 13:341-347.

Knabl J, Witschi R, Hosl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, et al. (2008) Reversal of pathological pain through specific spinal $GABA_A$ receptor subtypes. Nature 451:330–4.

Kopp S, Baur R, Sigel E, Möhler H, Altmann KH (2010) Highly potent modulation of GABA(A) receptors by valerenic acid derivatives. ChemMedChem 5:678–681.

Korpi ER, Mihalek RM, Sinkkonen ST, Hauer B, Hevers W, et al. (2002) Altered receptor subtypes in the forebrain of GABA(A) receptor delta subunit-deficient mice: recruitment of gamma 2 subunits. Neuroscience 109:733-43.

Krishek BJ, Moss SJ, Smart TG (1996) Homomeric beta1 gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties. Mol Pharmacol 49:494-504.

Krogsgaard-Larsen P, Hjeds H, Curtis DR, Lodge D, Johnston GA (1979) Dihydromuscimol, thiomuscimol and related heterocyclic compounds as GABA analogues. J Neurochem 32:1717-24.

Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA (2003) Neurosteroid modulation of GABAA receptors. Prog. Neurobiol 71:67-80.

Li GD, Chiara DC, Cohen JB, Olsen RW (2009) Neurosteroids Allosterically Modulate Binding of the Anesthetic Etomidate to γ-Aminobutyric Acid Type A Receptors. Journ. Biol. Chem. 284:11771-11775.

Li GD, Chiara DC, Sawyer GW, Husain SS, Olsen RW, Cohen JB (2006) Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. J Neurosci 26:11599-605.

Luger D, Poli G, Wieder M, Stadler M, Ke S, Ernst M, Hohaus A, Linder T, Seidel T, Langer T, et al. (2015) Identification of the putative binding pocket of valerenic acid on GABAA receptors using docking studies and site-directed mutagenesis. Br J Pharmacol 172:5403–5413.

Lukas RJ, Bencherif M (2006) Nicotinic Acetylcholine Receptor Biology. Biological and Biophysical Aspects of Ligand-Gated Ion Channel Receptor Superfamilies. 2-33.

Lukasiewicz PD, Eggers ED, Sagdullaev BT, McCall MA (2004) GABAC receptor-mediated inhibition in the retina. Vision Res 44(28):3289-3296.

Lummis SC (2009) Location GABA in GABA receptor binding sites. Biochemical Society Transactions 37(6):1343-1346.

Lynagh T, Pless SA (2014) Principles of agonist recognition in Cys-loop receptors. Frontiers in Physiology 5: doi: 10.3389/fphys.2014.00160.

MacDonald RL, Olsen RW (1994) $GABA_A$ receptor channels. Annu Rev Neurosci 17:569-602.

MacDonald RL, Rogers CJ, Twyman RE (1989) Barbiturate regulation of kinetic properties of the $GABA_A$ receptor channel of mouse spinal neurones in culture. J Physiol 417:483-500.

Minuk GY, Zhang M, Gong Y, Minuk L, Dienes H, Pettigrew N, Kew M, Lipschitz J, Sun D (2007) Decreased hepatocyte membrane potential differences and $GABA_A$-beta3 expression in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 45(3):735-745.

Mizuta K, Xu D, Pan Y, Comas G, Sonett JR, Zhang Y, Panettieri RA, Yang J, Emala CW (2008) $GABA_A$ receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology 294(6):L1206-1216.

Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. Trends Neurosci 27:569-75.

Möhler H (2006) $GABA_A$ receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. Journal of receptor and signal transduction research 26(5-6):731-740.

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

Möhler H (2011) The rise of a new GABA pharmacology. Neuropharmacology 60:1042–1049.

Olsen RW, Hanchar HJ, Meera P, Wallner M (2007) GABAA Receptor Subtypes: the 'One Glass of Wine' Receptors. Alcohol 41(3):201-209.

Olsen RW, Li GD (2011) GABA(A) receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. Can J Anaesth 58:206-15.

Olsen RW, Sawyer G (2004) $GABA_A$ Receptor. Encyclopedia of Biological Chemistry 2:162-166.

Olsen RW, Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classifcation on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. Pharmacological reviews 60(3):243-260.

Olsen RW, Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. Neuropharmacology 56:141–148.

Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nature Reviews. Neuroscience 3(9):715-727.

Pin JP, Prézeau L (2007) Allosteric modulators of GABA(B) receptors: mechanism of action and therapeutic perspective. Curr Neuropharmacol. 5(3):195-201.

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

Prescott SA, Sejnowski TJ, De Koninck Y (2006) Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain. Mol.Pain 2:32.

Raimondo JV, Markram H, Akerman CJ (2012) Short-term ionic plasticity at GABAergic synapses. Frontiers in synaptic neuroscience 4:5.

Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwaite A, et al. (2003) Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. J Neurosci 23:8608-17.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K+/Cl- cotransporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature 397:251-255.

Roberts E (1988) in GABA and Benzodiazepine Receptors (ed. Squires, R. F.) 1–21 (CRC, Boca Raton, Florida, 1988).

Roth FC, Draguhn A (2012) GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. Neural Plasticity. Article ID: 805830

Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. Neurochem Int 61:546-58.

Rudolph U, Knoflach F (2011) Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of $GABA_A$ receptor subtypes. Nat Rev Drug Discov 10:685-97.

Sacher A, Nelson N, Ogi JT, Wright EM, Loo DD, Eskandari S (2002) Presteady-state and steady-state kinetics and turnover rate of the mouse gamma-aminobutyric acid transporter (mGAT3). J Membr Biol 190:57-73.

Shelp BJ, Bown AW, McLean MD (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends Plant Sci 4:446-52.

Sieghart W (2006) Structure, pharmacology, and function of $GABA_A$ receptor subtypes. Adv Pharmacol 54:231–263.

Sieghart W (2015) Chapter three – Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. Advances of Pharmacology 72:53-96.

Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M (2012) A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the α(+) β(-) interface. Br. J. Pharmacol 166(2):476-85.

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

Sigel E, Baur R, Trube G, Möhler H, Malherbe P (1990) The effect of subunit composition of rat brain $GABA_A$ receptors on channel function. Neuron 5(5):703-711.

Sigel E, Buhr A (1997) The Benzodiazepine Binding Site of $GABA_A$ Receptors. Trends in pharmacological sciences 18:425-429.

Sigel E, Minier F (2005) The Xenopus oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. Mol Nutr Food Res 49:228-234.

Sigel E, Steinmann ME (2012) Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. The Journal of biological chemistry 287(48):40224-40231.

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

Smith GB, Olsen RW (1995) Functional domains of $GABA_A$ receptors. Trends in Pharmacological Sciences 16(5):162-168.

Soghomonian JJ, Martin DL (1998) Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? Trends Pharmacol Sci. 19:500–505.

Taylor J, Gordon-Weeks PR (1991) Calcium-independent γ-aminobutyric acid release from growth cones: role of γ-aminobutyric acid transport. J. Neurochem. 56:273–280.

Thompson AJ, Lummis SC (2006) 5-Ht3 Receptors. Curr Pharm Des 12:3615-3630.

Twyman RE, Rogers CJ, MacDonald RL (1990) Intraburst kinetic properties of the $GABA_A$ receptor main conductance state of mouse spinal cord neurons in culture. The Journal of Physiology 423(1):193-220.

Varagic Z, Wimmer L, Schnürch M, Mihovilovic MD, Huang S, Rallapalli S, et al. (2013) Identification of novel positive allosteric modulators and null modulators at the $GABA_A$ receptor α + β-interface. British Journal of Pharmacology 169(2):371-383.

Vinkers CH, Olivier B (2012) Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators? Adv Pharmacol Sci 2012:416864.

Vithlani M, Terunuma M, Moss SJ (2011) The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. Physiol Rev 91:1009-22.

Von Bohlen und Halbach O, Dermietzel R (2006) Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects. Wiley-VCH Verlag, 2. Auflage, Kapitel 3.3:75-89.

Walters RJ, Hadley SH, Morris KD, Amin J (2000) Benzodiazepines act on $GABA_A$ receptors via two distinct and separable mechanisms. Nature Neuroscience 3(12):1274-1281.

Wang M. (2011) Neurosteroids and $GABA_A$-Receptor function. Front. Endocrinol. 2(44):1-23.

Wongsamitkul N, Baur R, Sigel E (2016) Towards understanding functional properties and subunit arrangement of $\alpha_4\beta_2\delta$ $GABA_A$ receptors. J Biol Chem 291:18474–18483.

Yanovsky Y, Schubring S, Fleischer W, Gisselmann G, Zhu XR, Lübbert H, Hatt H, Rudolph U, Haas HL, Sergeeva OA (2012) GABAA receptors involved in sleep and anaesthesia: β1- versus β3-containing assemblies. European Journal of Physiology. 463(1):187–199