

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Der Einfluss der beta-Untereinheit auf die Wirksamkeit vier neuer GABAA-Rezeptor-Modulatoren

verfasst von | submitted by

Marina Gehrman BSc

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

Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

Ass.-Prof. Mag. Dr. Sophia Khom-Steinkellner

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*Innen 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.

Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an Ass.-Prof. Mag. Dr. Sophia Khom-Steinkellner für die Betreuung meiner Masterarbeit, und für die Unterstützung von der ersten cRNA-Injektion bis hin zur Finalisierung. Ich konnte vieles mitnehmen, was auch über unser Labor hinausgeht, und wovon ich in meinem Berufsleben profitieren werde können. Vielen Dank für die Geduld, die vielen motivierenden Worte und die Möglichkeit, einen Einblick in die pharmakologische Forschung zu bekommen – ich habe es sehr geschätzt.

Ein weiterer Dank gilt unserer ganzen Arbeitsgruppe, hierbei besonders Laureta Gashi und Katharina Neßmerak für die gute Zusammenarbeit. Nachdem wir nicht nur zusammen die längeren Tage durchgestanden, sondern auch die kleinen Siege gefeiert haben, sind Freundschaften entstanden, die an dieser Stelle einen Dank verdienen.

Des Weiteren bedanken möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe rund um Frau Dr. Anke Wilhelm von der University of Blomfontein, South Africa, für die Bereitstellung der Substanzen.

Außerdem gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern – für die bedingungslose Unterstützung in meinem Studium und darüber hinaus. Ihr habt mir vorgelebt, was es bedeutet, sich etwas aufzubauen. Danke für eure unerschütterliche Geduld und dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Auch bei meinem Partner und meinen Freunden möchte ich mich bedanken. Für die vielen motivierenden Worte und die Geduld, wenn mich das Arbeiten für mein Studium vereinnahmt hat, für die notwendige Entschleunigung und für alles, was mein Abschluss noch mit sich bringen wird.

Zusammenfassung

Hintergrund: Die γ -Aminobuttersäure (GABA) vermittelt über die Aktivierung von GABAA-Rezeptoren inhibitorische Effekte im Säugetierhirn, und Erkrankungen wie Epilepsie und Angststörungen werden mit einer Dysregulation des GABAergen Systems in Verbindung gebracht. Demnach bilden GABAA-Rezeptoren wichtige Arzneistofftargets. Trotz guter Wirkung der GABAA-Rezeptor-Modulatoren zeigen diese zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen, was auf ihre unselektive Interaktion mit den meisten GABAA-Rezeptor-Subtypen zurückzuführen ist.

Zielsetzung: Das Ziel meiner Masterarbeit war es, subtyp-selektive Effekte von 4 neuen GABAA-Rezeptor-Modulatoren zu untersuchen, und in weiterer Folge deren potenzielle Interaktion mit der Neurosteroid-Bindungsstelle zu prüfen.

Methode: GABAA Rezeptoren, welche sich aus $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ -Untereinheiten zusammensetzen, wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Mittels 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik wurde die konzentrationsabhängige Modulation GABA-induzierter Chloridströme (I_{GABA}) gemessen. Die Interaktion mit der Neurosteroid-Bindungsstelle wurde pharmakologisch mittels Pregnenolonsulfat geprüft.

Ergebnisse: Meine Ergebnisse zeigten eine konzentrationsabhängige, positive Modulation von I_{GABA} an allen Subtypen durch alle Substanzen. Die Anwesenheit der $\gamma 2$ -Untereinheit war für die Potenzierung von I_{GABA} nicht notwendig, was eine Bindungstasche abseits der Benzodiazepin-Bindungsstelle nahelegt. Die maximale Wirksamkeit wurde im Gegensatz zur Potenz signifikant von der β -Untereinheiten Isoform beeinflusst. Alle Substanzen zeigten eine signifikant stärkere Modulation von I_{GABA} an $\alpha 1\beta 2$ - und $\alpha 1\beta 3$ - verglichen mit $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren. Pregnenolonsulfat blockierte die Potenzierung von I_{GABA} bei keiner Substanz.

Diskussion und Ausblick: Neue GABAA-Rezeptor-Modulatoren, welche weder mit der Benzodiazepin- noch mit der Neurosteroid-Bindungsstelle interagieren, wurden identifiziert und im Detail charakterisiert. In zukünftigen Studien sollen nun die Bindungstaschen und das therapeutische Potenzial der Substanzen untersucht werden.

Abstract

Background: γ -aminobutyric acid (GABA) mediates inhibitory synaptic transmission in the mammalian brain by activating GABAA receptors. Thus, dysregulation of the GABAergic system is associated with diseases such as epilepsy or anxiety disorders making GABAA receptors important drug targets. However, despite multiple beneficial therapeutic effects of GABAA receptor modulators, their use is also associated with serious side effects stemming from their rather unselective interaction with multiple GABAA receptor subtypes.

Aims: Aim of my master's thesis was to study potential subtype-selective effects of 4 novel GABAA receptor modulators and to determine their potential interaction with the neurosteroid binding pocket.

Scientific Approach: GABAA receptors composed of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, and $\alpha 1\beta 3$ subunits were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and concentration-dependent modulation of GABA-induced chloride currents (I_{GABA}) was measured using the 2-microelectrode voltage-clamp technique. The interaction with the neurosteroid pocket was probed using pregnenolone sulfate.

Results: My data revealed a concentration-dependent, positive modulation of I_{GABA} at all subtypes for all compounds. Notably, while their effects were not dependent on the presence of a $\gamma 2$ -subunit suggesting a binding site distinct from the benzodiazepine binding pocket, their efficacies but not potencies were strongly determined by the incorporated beta-subunit isoform. Specifically, all compounds revealed significantly stronger I_{GABA} modulation of $\alpha 1\beta 2$ and $\alpha 1\beta 3$ compared to $\alpha 1\beta 1$ receptors. Lastly, pregnenolone sulfate did not prevent I_{GABA} enhancement for any compound.

Discussion and Outlook: Novel GABAA receptor modulators interacting with neither the benzodiazepine or neurosteroid bindings site were identified and characterized in detail. Future studies will determine their interaction sites on GABAA receptors and therapeutic potential.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis	1
1. γ -Aminobuttersäure	3
1.1 Definition	3
1.2 Synthese und Metabolismus	4
2. Die Vielfalt der GABA-aktivierten Rezeptoren	6
2.1 Ionotrope GABA-Rezeptoren	6
2.2 Metabotrope GABA-Rezeptoren	8
3. Funktion, Aufbau und Zusammensetzung von GABAA-Rezeptoren	9
3.1 Funktion des GABAA-Rezeptors	9
3.2 Aufbau des GABAA-Rezeptors	11
3.2 Untereinheiten und Subtypen des GABAA-Rezeptors	14
3.2.1 die $\alpha 1$ -Untereinheit	16
3.2.2 die $\beta 1$ -Untereinheit	17
3.2.3 die $\beta 2$ -Untereinheit	17
3.2.4 die $\beta 3$ -Untereinheit	18
3.2.5 die $\gamma 2$ -Untereinheit	18
3.3. Synaptische und extrasynaptische GABAA-Rezeptoren	18
4. Erkrankungen mit Beteiligung des GABAergen Systems	20
4.1 Depressionen und Angststörungen	20
4.2 Epilepsie	23
5. Liganden und ihre Bindungsstellen am GABAA-Rezeptor	27
5.1 Benzodiazepine	27
5.2 Barbiturate	31
5.3 Anästhetika	32
5.4 Neurosteroidoide	34

6. Fragestellung	38
7. Material und Methoden	39
7.1 Injektion der cRNA.....	39
7.2 Herstellung der Messlösungen.....	40
7.3 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Applikation der Substanzen	40
7.4 Auswertung und statistische Analyse	41
8. Ergebnisse	43
8.1 Pharmakologische Charakterisierung der GABAA-Rezeptor-Subtypen	43
8.2 AWM1	45
8.3 DHHB.....	48
8.4 THH.....	51
8.5 HO.....	54
8.6 Untersuchung einer potenziellen Interaktion der neuen Liganden mit der Neurosteroid-Bindungsstelle	57
9. Diskussion	63
Literaturverzeichnis	65

1. γ -Aminobuttersäure

1.1 Definition

Die γ -Aminobuttersäure (GABA) ist eine nicht proteinogene Aminosäure und das biogene Amin der Buttersäure. Sie wird durch Decarboxylierung der Glutaminsäure gebildet und zählt zu den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmittern im zentralen Nervensystem. Auf die Entdeckung dieser Substanz in Kartoffelknollen durch Steward et al. (1949) folgte in den Jahrzehnten danach der Nachweis in Gehirnen von Säugetieren (Roberts und Frankel, 1950; Florey, 1991), die Beschreibung ihres Wirkmechanismus und der GABA-aktivierten Rezeptoren (Sigel et al., 1983; Sigel und Steinmann, 2012), und schließlich der Einsatz zahlreicher GABAA-Rezeptor-Modulatoren in der Therapie von Erkrankungen des Nervensystems (Smart und Stephenson, 2019).

Die Struktur von GABA (**Abbildung 1**) ist gekennzeichnet durch eine Carboxyl- und eine Aminogruppe, kann durch die Summenformel $C_4H_9O_2N$ beschrieben werden und weist ein Molekulargewicht von 103,12 g/mol auf (Heli et al., 2022).

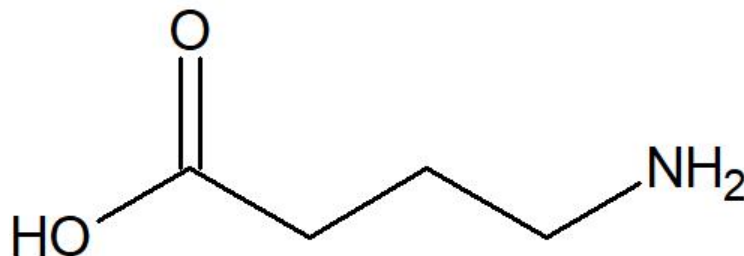


Abbildung 1: Strukturformel von GABA

GABA reguliert die Erregbarkeit von Neuronen, indem er als Gegenspieler zum exzitatorisch wirkenden Glutamat fungiert. Viele neuropsychiatrische Erkrankungen wie Epilepsie, Schlafstörungen, Angsterkrankungen oder Schizophrenie gehen mit einer Dysbalance dieser Botenstoffe einher (Zhang et al., 2021).

Außerhalb des Gehirns konnten in den letzten Jahren auch potenziell pharmakologisch relevante Wirkungen von GABA gezeigt werden. So kann GABA die Exozytose bzw. Sekretion von Insulin modulieren, des Weiteren konnte eine erhöhte GABA-Affinität im Pankreas von an Typ-2-Diabetes erkrankten Personen beobachtet werden (Bhandage et al., 2018; Korol et al.,

2018). Außerdem verstärkt GABA die Proliferation von Krebszellen, indem es an GABAB-Rezeptoren bindet und eine verstärkte β -Catenin-Aktivierung vermittelt (Huang et al., 2022).

1.2 Synthese und Metabolismus

Die neuronale Kommunikation im Gehirn wird vorwiegend über GABA und Glutamat gesteuert. Dies geschieht durch Ausschüttung der Transmitter durch Neuronen in den synaptischen Spalt, sowie deren anschließende Bindung an postsynaptische Rezeptoren. Ebenso wichtig für eine effiziente Signalweiterleitung ist jedoch auch der Abbau und die Wiederaufnahme von GABA und Glutamat. Diese Prozesse werden nicht nur durch die Neuronen, sondern auch die Astrozyten – eine Form von Gliazellen, die im ZNS besonders häufig vorkommen – bewerkstelligt (Zhou und Danbolt, 2013; Andersen und Schousboe, 2023).

Synthetisiert wird GABA in den GABAergen Neuronen mithilfe des Enzyms Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), welches die Decarboxylierung von Glutamat katalysiert (Roberts und Frankel, 1950; Sears und Hewett, 2021). Glutamat wiederum wird durch die Glutaminase aus Glutamin hergestellt. Nach der Synthese werden die Transmitter mithilfe des vesikulären GABA-Transporters (vGAT) in Vesikel aufgenommen, gespeichert, und bei Auslösung eines Aktionspotentials in die Synapse freigesetzt (Chaudhry et al., 1998; Sears und Hewett, 2021).

Die GAD, die die Decarboxylierung von Glutamat zu GABA katalysiert, kann in 2 Isoformen vorkommen – GAD65 oder der GAD67, welche sich in ihren Eigenschaften und der Lokalisation unterscheiden. Die für die klassische Neurotransmission bedeutsamere Isoform – die GAD65 – wird hauptsächlich in den Nervenendigungen exprimiert. Im Gegensatz dazu befindet sich die GAD67 vorwiegend in den neuronalen Somata und produziert GABA, dessen Aufgaben unter anderem in der Synaptogenese und der Oxidations-Reduktions-Regulierung liegen. Beide Isoformen nutzen jedoch Pyroxidin als Co-Faktor (Martin und Rimvall, 1993; Sears und Hewett, 2021).

Um das Signal zu beenden, kann GABA wieder von Neuronen und Astrozyten aufgenommen werden. Die Schlüsselrolle hierbei spielen die GABA-Transporter GAT1-3 sowie der Betain/GABA-Transporter 1 (BGT1) als sekundär aktive Neurotransmitter-Natrium-Symporter (NSS), welche zur Familie der SLC6-Transporter gehören und alle an einen Na^+ - Cl^- -Gradienten geknüpft sind. Die NSS sind aus 12 transmembranen α -Helices aufgebaut, und durchlaufen bei der Aufnahme von Neurotransmittern verschiedene Konformationszustände, welche eine abwechselnde Ausrichtung der substratbindenden Tasche zum extra- und

intrazellulären Raum zur Folge haben (Kavanaugh et al., 1992; Shahsavari und Wellendorph, 2023).

Während GAT1 und GAT3 im gesamten Gehirn lokalisiert sind und eine hohe GABA-Affinität aufweisen, beschränkt sich die Expression von GAT2 und BGT1 auf die Leptomeninx und Blutgefäße - diese spielen daher eine eher untergeordnete Rolle im Transport von GABA. Neuere Studien konnten außerdem zeigen, dass GAT1 nicht nur – wie bisher angenommen – hauptsächlich auf Neuronen, sondern auch auf Astrozyten vorkommen, was der durch Gliazellen vermittelten GABA-Clearance in Zukunft eine größere Bedeutung zuteilwerden lassen könnte (Fattorini et al., 2020; Andersen und Schousboe, 2023; Andersen et al., 2023). Das recycelte GABA kann nun wieder in synaptischen Vesikeln gespeichert werden, oder über den sogenannten GABA-Shunt durch die GABA-Transaminase (GABA-T) und Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) in den Citratzyklus fließen (Bak et al., 2006; Sears und Hewett, 2021). Dabei wird GABA durch eine Transaminierung zu Succinat-Semialdehyd umgewandelt, durch die SSADH zu Succinat oxidiert und als solches in den Citratzyklus eingeschleust. Alternativ kann es über eine Reduktion durch γ -OH-Buttersäure-Dehydrogenase (GHB-DH) als γ -OH-Buttersäure an GABAB-Rezeptoren oder extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren wirken (Kaupmann et al., 2003; Absalom et al., 2012; Rowley et al., 2012).

Nachdem GABA und Glutamat nicht nur von Neuronen, sondern auch von Astrozyten aufgenommen werden, versorgen diese die Neuronen mit Glutamin, um den Verlust auszugleichen und das Gleichgewicht der Neurotransmitter aufrecht zu halten (**Abbildung 2**). Dazu synthetisieren die Astrozyten über die Glutaminsynthetase (GS) Glutamin, welches über die phosphataktivierbare Glutaminase (PAG) wiederum zu Glutamat umgewandelt wird. Dieses kann nun entweder in den Speicher der glutamatergen Neuronen fließen, oder über die GAD den GABA-Pool der GABAergen Neuronen auffüllen (Andersen et al., 2022). Der Austausch von neuronalem Glutamat und GABA sowie astrozytärem Glutamin führt somit zu einem effizienten Neurotransmitter-Recycling, welches als Glutamat/GABA-Glutamin-Zyklus bekannt ist (Hertz, 1979; Bak et al., 2006; Andersen und Schousboe, 2023).

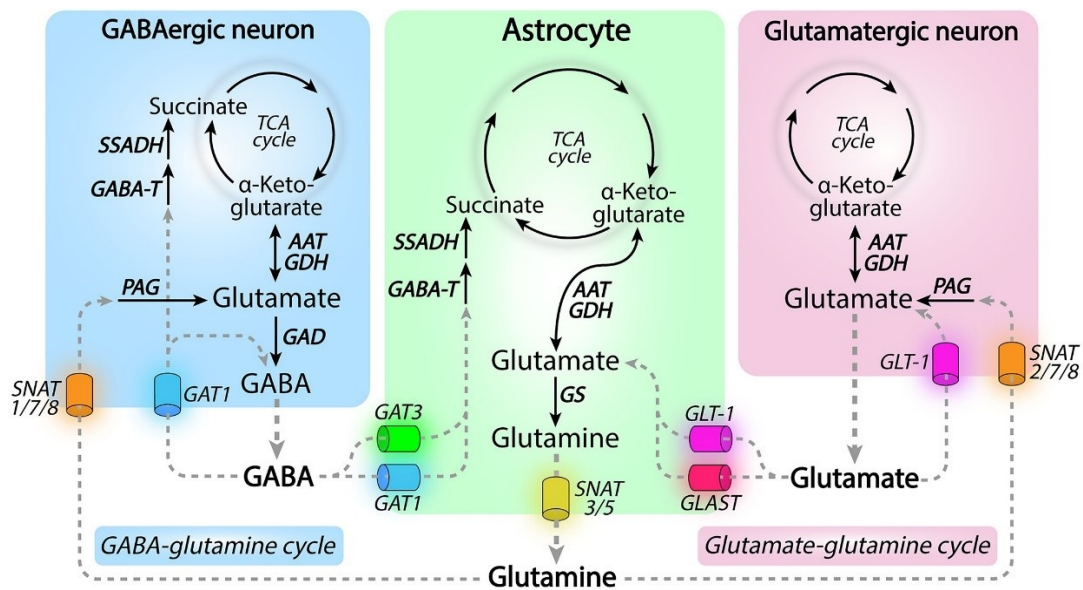


Abbildung 2: Der Glutamat/GABA-Glutamin-Zyklus (Andersen und Schousboe, 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

2. Die Vielfalt der GABA-aktivierten Rezeptoren

Bis Anfang der 1980er Jahre wurde angenommen, dass es nur einen GABA-aktivierten Rezeptor gibt. Die Verwendung von Probematerial aus Säugetierhirnen schuf in den darauffolgenden Jahren die Möglichkeit, die Proteine in ausreichender Menge zu gewinnen und zu charakterisieren. Dadurch konnten entgegen der ursprünglichen Theorie unterschiedliche Rezeptortypen entdeckt werden, was die Komplexität und Vielfalt des GABAergen Systems verdeutlichte (Sigel et al., 1982; Sigel et al., 1983; Smart und Stephenson, 2019).

2.1 Ionotrope GABA-Rezeptoren

Nach Sequenzierung des mittels Benzodiazepin-Affinitätssäule aufgereinigten Rezeptors sowie anschließender Entwicklung spezifischer Oligonukleotid-Sonden konnte erstmals die cDNA für die α- und die β-Untereinheit des GABAA-Rezeptors isoliert werden. Unter Verwendung der *Xenopus laevis*-Zelle als Expressionssystem konnten nach Injektion der geeigneten cDNA, cRNA oder mRNA erstmals GABAA-Rezeptoren rekombinant exprimiert werden (Miledi et al., 1983; Smart et al., 1983; Schofield et al., 1987; Smart et al., 1987; Smart und Stephenson, 2019).

Davon ausgehend konnte die Cystein-Schleife (Cys-loop) als gemeinsames Merkmal für eine Rezeptorklasse identifiziert werden, welche in weiterer Folge als Cys-Loop-Rezeptoren bezeichnet und später in die Familie der pentameren ligandengesteuerten Ionenkanäle umbenannt wurde (Barnard et al., 1987; Smart und Stephenson, 2019). Weitere Vertreter dieser Familie sind die nACh-Rezeptoren, die Glycin-Rezeptoren, die ionotropen 5-HT Rezeptoren sowie die Zn^{2+} Rezeptoren (Olsen und Sieghart, 2008).

Der GABAA-Rezeptor gilt als der wichtigste unter den GABA-aktivierten Rezeptoren und ist weit verbreitet im zentralen Nervensystem. Seine inhibitorische Wirkung auf Neuronen kommt durch einen Einstrom von Chloridionen zustande. GABAA-Rezeptoren werden durch GABA und Muscimol aktiviert, und durch Bicucullin und Picrotoxin blockiert, was sie von den übrigen GABA-aktivierten Rezeptortypen unterscheidet (Macdonald und Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Olsen und Sieghart, 2008). Sie vermitteln einerseits die schnelle synaptische, inhibitorische Übertragung, sowie andererseits die langsame tonische Hemmung, welche extrasynaptisch stattfindet (Richardson et al., 2024). Die Rolle des GABAA-Rezeptors zeigt sich unter anderem in der Entstehung von Krämpfen, Angst und Panik (Luscher et al., 2023; Qian et al., 2023).

Eine Untergruppe der GABAA-Rezeptoren bilden die GABAA-p-Rezeptoren, welche unempfindlich gegenüber dem GABAA-Rezeptorantagonisten Bicucullin sind (Drew et al., 1984). Sie gehören wie die GABAA-Rezeptoren zu der Familie der pentameren ligandengesteuerten Ionenkanäle, setzen sich jedoch aus fünf p-Untereinheiten zusammen (Connolly et al., 1996; Kent et al., 2021). Sie kommen hauptsächlich in der Retina, aber auch im Gehirn (z.B.: Hippocampus oder Cerebellum) vor. Unterschiede zu den klassischen GABAA-Rezeptoren zeigen sich auch hinsichtlich kinetischer Eigenschaften der GABA-induzierten Ströme wie der Desensibilisierung und Dauer der Kanalöffnung – sie werden langsamer aktiviert und deaktiviert, und weisen eine geringere Desensibilisierung auf. Außerdem werden sie nicht durch klassische Agonisten wie Benzodiazepine, Barbiturate und Neurosteroiden moduliert (Naffaa et al., 2017).

Die physiologische Rolle der GABAA-p-Rezeptoren ist ebenfalls noch nicht genau geklärt. Das vermehrte Vorkommen in der Netzhaut deutet aber auf eine eventuelle Beteiligung an der visuellen Bildverarbeitung des Auges hin (Naffaa et al., 2017).

Nachdem diese Rezeptoren weder von Bicucullin blockiert noch von Baclofen aktiviert werden, war einige Zeit lang die Bezeichnung als GABA-C-Rezeptoren und somit die Betrachtung als eigenständige Rezeptorfamilie geläufig. Aufgrund der Ähnlichkeiten, die die p-Untereinheiten mit den unterschiedlichen GABAA-Rezeptoruntereinheiten aufweisen, wird diese Einteilung

heute jedoch nicht mehr empfohlen, und die GABAA- ρ -Rezeptoren werden als eine Untergruppe der GABAA-Rezeptoren betrachtet (Olsen und Sieghart, 2008).

2.2 Metabotrope GABA-Rezeptoren

Neben den ionotropen GABAA-Rezeptoren gibt es noch einen weiteren Rezeptortyp, welcher als GABAB-Rezeptor bezeichnet wird. Dieser kann neben GABA auch durch den selektiven Agonisten Baclofen aktiviert werden, jedoch nicht durch den GABAA-Rezeptorantagonisten Bicucullin blockiert werden (Bowery et al., 1980). Die GABAB-Rezeptoren werden der Klasse C innerhalb der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zugeordnet, und gehören somit zu den metabotropen Rezeptoren (Bowery, 1993; Smart und Stephenson, 2019).

Der GABAB-Rezeptor ist ein Tetramer aus je zwei GABAB1- und GABAB2-Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten ist wiederum aus je einer Venusfliegenfallen-Domäne (VFT) und einer Transmembrandomäne aus sieben α -Helices (7TM-Domäne) aufgebaut. GABAB-Rezeptoren werden sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch exprimiert. Nach Aktivierung durch Bindung eines Agonisten wird die Adenylatcyclase über den Gai/o-Weg gehemmt, dies führt zu einer Verringerung von cAMP, was an präsynaptischen Rezeptoren die Fusion von Vesikeln und damit die Neurotransmitterfreisetzung hemmt. Dieser Effekt wird zusätzlich über die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins vermittelt, welche spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle inhibiert (Gassmann und Bettler, 2012; Evenseth et al., 2020). Des Weiteren können über GABAB-Rezeptoren einwärts gleichrichtende K⁺-Kanäle (GIRK) aktiviert werden (Bettler et al., 2004). GIRK-Kanäle bestehend aus den Untereinheiten 1-3 sind in hoher Dichte im Gehirn exprimiert, wo sie unter anderem in der Regulation der Kognition und der Stimmung involviert sind (Lüscher und Slesinger, 2010; Jeremic et al., 2021).

An postsynaptischen GABAB-Rezeptoren wirkt sich die Hemmung der Adenylatcyclase auf den cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA)-Weg aus, was ebenfalls einen verringerten Ca²⁺-Einstrom mit sich bringt (Skeberdis et al., 2006). GIRK werden durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert, was zu einer Inhibition des postsynaptischen Potentials führt (Bettler et al., 2004; Evenseth et al., 2020).

Im Gegensatz zu den GABAA-Rezeptoren vermitteln die GABAB-Rezeptoren die langsame synaptische Übertragung. Sie werden in erster Linie mit dem Gedächtnis, der Stimmung und mit Schmerzen in Verbindung gebracht (Sarasa et al., 2020).

3. Funktion, Aufbau und Zusammensetzung von GABAA-Rezeptoren

3.1 Funktion des GABAA-Rezeptors

Der GABAA-Rezeptor ist ein Ionenkanal und selektiv für Cl^- Ionen, wobei die Pore auch für weitere Anionen wie Bicarbonat (HCO_3^-), und theoretisch auch für Format, Acetat, Cyanid und sogar Halogenide durchlässig ist; die Unterschiede in der Leitfähigkeit für diese Ionen werden dabei durch Selektivitätsfilter und den Porendurchmesser bestimmt (Sigel und Steinmann, 2012; Sallard et al., 2021).

Nachdem ein Agonist an seine Bindungsstelle am GABAA-Rezeptor bindet, wird eine Reihe von Konformationsänderungen ausgelöst. Dabei wird der Agonist in seiner Bindungstasche verschlossen, worauf mehrere geschlossene Zustände folgen, die als „flipped states“ bezeichnet werden. Im nächsten Schritt öffnet sich die Pore des Rezeptors, was einen gerichteten Ionenfluss entlang des Konzentrationsgradienten ermöglicht und somit zu einer Hyperpolarisation führt (Sigel und Steinmann, 2012).

Dieser Mechanismus wird als inhibitorische Neurotransmission bezeichnet und kommt an zahlreichen Synapsen im zentralen Nervensystem vor. Die Hauptfunktion liegt dabei in der neuronalen Hemmung und der Kontrolle der Erregbarkeit, was sich auf die Entstehung von Angst, den Muskeltonus, die Vigilanz, den circadianen Rhythmus, sowie das Lernen und das Gedächtnis auswirkt. Auch im Rahmen der neuronalen Entwicklung sind GABAA-Rezeptoren beteiligt, indem sie die Neuro- und Synaptogenese regulieren (Sieghart et al., 2012; Smart und Stephenson, 2019).

Für eine Hyperpolarisation ist ein auswärts gerichteter Konzentrationsgradient vonnöten, damit die Cl^- Ionen nach der durch GABA vermittelten Öffnung aus der Umgebung in die Zelle fließen können, wodurch die Auslösung eines Aktionspotentials erschwert wird (Kaila et al., 2014; Sallard et al., 2021).

Während der frühen Entwicklung des Nervensystems kann jedoch der umgekehrte Fall eintreten – dabei ist die Cl^- Konzentration innerhalb der Zelle im Vergleich zum Extrazellulärraum höher, wodurch es zu einer Umkehrung des Konzentrationsgradienten und somit nach Bindung von GABA statt des üblichen Cl^- -Influx zu einem Cl^- Efflux kommt (Ben-Ari et al., 2012; Kaila et al., 2014). Dadurch wird anstatt einer Hyperpolarisation eine Depolarisation ausgelöst, was zu einem exzitatorischen Signal führt (Chen et al., 1996). Die erhöhte Cl^- Konzentration ist hierbei auf eine noch schwache Expression des K- Cl^-

Cotransporters (KCC2) verglichen mit jener des Na-K-2-Cl-Cotransporters (NKCC1) zurückzuführen (Sieghart und Savić, 2018; Colombi et al., 2024). In reifen Neuronen überwiegt dann jedoch die Funktion des KCC2, wodurch die intrazelluläre Cl⁻ Konzentration sinkt und in der Regel zu dem oben geschilderten, üblichen Ablauf führt (Richardson et al., 2024). Jedoch kann eine pathologische Down-regulation von KCC2 sowie Up-regulation von NKCC1 auch in Erwachsenen noch zu exzitatorischen Signalen am GABAA-Rezeptor führen. Die veränderten Expressionsmuster dieser Transporter werden mit Erkrankungen wie der Epilepsie sowie mit neuropathischen Schmerzen in Verbindung gebracht (Sigel und Steinmann, 2012; Sieghart und Savić, 2018; Liu et al., 2019)

Die Signalübertragung wird durch die Deaktivierung des Rezeptors beendet, indem der Ligand freigegeben und der Ionenkanal kurz nach Absinken der GABA-Konzentration wieder verschlossen wird - die Übermittlung des Signals dauert somit nur wenige Millisekunden an (siehe **Abbildung 3**). Nach Deaktivierung kann erneut ein Agonist an den Rezeptor binden und ihn somit wieder aktivieren (Sallard et al., 2021).

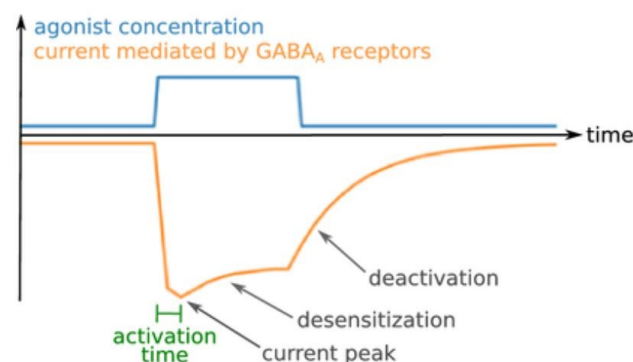


Abbildung 3: Ein durch den GABAA-Rezeptor vermittelter Strom (Sallard et al., 2021, bearbeitet, lizenziert unter CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Im Gegensatz zur Cl⁻ Konzentration ist die intrazelluläre Konzentration von Bicarbonat-Ionen höher als in der Umgebung, was zu einem einwärts gerichteten Konzentrationsgradienten und somit zu einem Fluss der Ionen nach außen führt – daher sind Bicarbonat-Ströme, die an GABAA-Rezeptoren ausgelöst werden, in der Regel depolarisierend. Im Normalfall ist die Permeabilität der Cl⁻ Ionen allerdings um ein Vielfaches höher, was in Summe trotz allem zu einer Hyperpolarisation führt. Eine Ausnahme hierbei kann im Rahmen epileptischer Anfälle auftreten, wenn die Kanäle aufgrund verlängerter GABA-Exposition lange in einem offenen

Zustand verbleiben, und der Bicarbonat-Ausstrom jenen der Cl^- -Ionen übersteigt (Barker und Ransom, 1978; Sallard et al., 2021).

GABAA-Rezeptoren können zwei Formen der Neurotransmission vermitteln – die phasische sowie die tonische Übertragung. Von einer phasischen Übertragung wird gesprochen, wenn an der postsynaptischen Membran lokalisierte GABAA-Rezeptoren vorübergehend durch präsynaptisch freigesetztes GABA aktiviert werden (siehe **Abbildung 4**), und in weiterer Folge eine schnelle und präzise Änderung der Chlorid-Leitfähigkeit ausgelöst wird. Postsynaptisch lokalisierte GABAA-Rezeptoren beinhalten in erster Linie $\alpha 1$ -Untereinheiten, jedoch können auch $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten am Aufbau beteiligt sein (Farrant und Nusser, 2005; Richardson et al., 2024). Davon lässt sich die Form der tonischen Neurotransmission unterscheiden, die eine länger anhaltende und weniger spezifische Hemmung der Zelle mit sich bringt. Diese Art der Übertragung findet an extrasynaptischen GABAA-Rezeptoren statt, welche vorwiegend $\alpha 4$ -, $\alpha 6$ - sowie δ -Untereinheiten inkorporieren, und soll in Kapitel 3.3 genauer erläutert werden (Richardson et al., 2024)

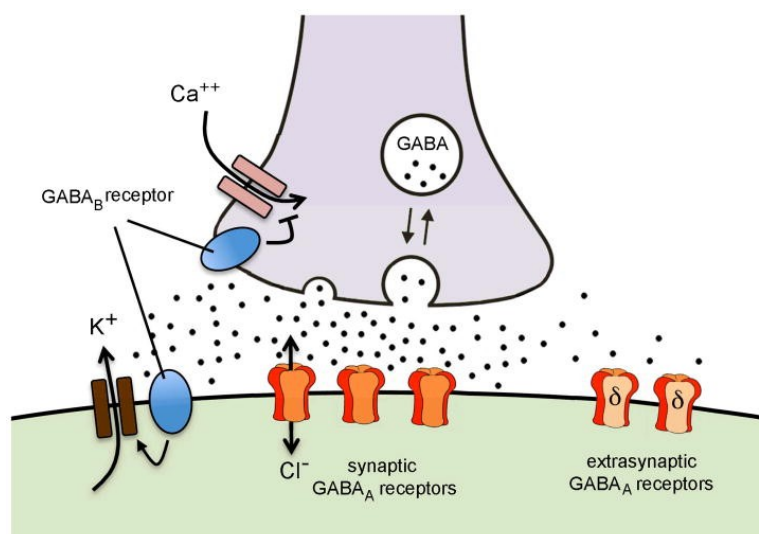


Abbildung 4: Die durch GABA vermittelte Neurotransmission an synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren (Herbison und Moenter, 2011)

3.2 Aufbau des GABAA-Rezeptors

Der ionotrope GABAA-Rezeptor setzt sich aus fünf Untereinheiten (UE) zusammen, die als Heteropentamer eine Pore bilden (Möhler, 2006). Die Tatsache, dass das Rezeptorprotein mithilfe der Affinitätschromatographie über Benzodiazepine aufgereinigt werden kann, das klonierte Protein bestehend aus der α - sowie der β -Untereinheit jedoch nicht auf Benzodiazepine anspricht, führte zu der Annahme, dass weitere Untereinheiten am Aufbau

des Rezeptors beteiligt sein müssen, und schließlich zu der Entdeckung der γ -Untereinheit (Sigel et al., 1982; Pritchett et al., 1989; Smart und Stephenson, 2019). Darauf folgte bald die Erweiterung auf mittlerweile 19 bekannte Untereinheiten: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , π , θ , welche allesamt zu den klassischen GABAA-Rezeptoruntereinheiten (Simon et al., 2004) gehören, sowie die ρ (1-3), die die GABAA- ρ -Rezeptoren bilden. Außerdem wurde das Repertoire noch um alternative Spleißvarianten der RNA erweitert (Macdonald und Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Stephenson, 1995; Sigel und Steinmann, 2012; Smart und Stephenson, 2019).

Jede dieser Untereinheiten besteht aus vier helikal angeordneten transmembranären Domänen (M1-M4), wobei die zweite Domäne (M2) die zentrale Kanalpore bildet (siehe **Abbildung 5**). Außerdem liegt eine 200-250 Aminosäuren lange, extrazelluläre N-terminale Domäne vor, die die Cys-Schleife enthält – das zentrale Merkmal aller eukaryotischer Cys-Loop-Rezeptoren. Diese setzt sich aus zwei Cystein-Resten zusammen, die durch 13 Aminosäurereste voneinander getrennt sind. An der extrazellulären Domäne ist außerdem die Bindungsstelle für den Agonisten GABA lokalisiert. Darüber hinaus weist jede Untereinheit eine 85-255 Aminosäuren lange, intrazelluläre Schleife zwischen der dritten und der vierten transmembranen Domäne auf, welche Phosphorylierungsstellen beinhaltet, worüber die Funktion des Rezeptors moduliert werden kann. Diese intrazelluläre Struktur kann außerdem mit zahlreichen Proteinen interagieren, welche am Transport und der Verankerung der Rezeptoren in der Membran beteiligt sind (Chen und Olsen, 2007; Jacob et al., 2008; Sigel und Steinmann, 2012; Miller und Aricescu, 2014). Das C-terminale Ende liegt wie das N-terminale Ende extrazellulär vor (Möhler, 2006).

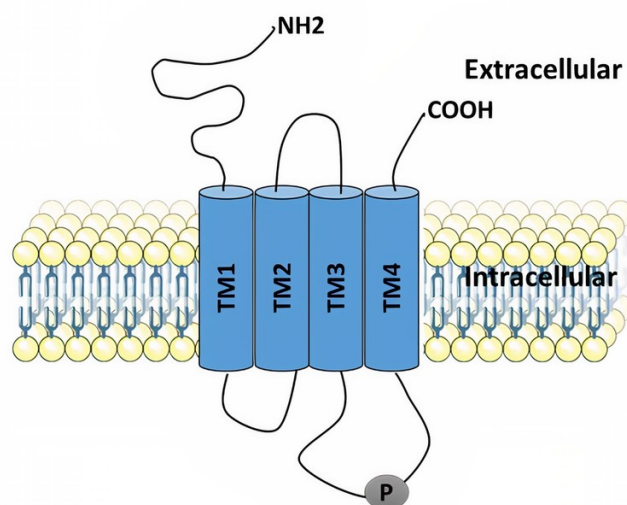


Abbildung 5: Die Struktur des GABA-A-Rezeptors (Ghit et al., 2021, bearbeitet, lizenziert unter CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Neben der Zusammensetzung der Untereinheiten spielt auch deren Anordnung eine wesentliche Rolle für die Rezeptorfunktion. Dieselben Untereinheiten können auf unterschiedliche Arten angeordnet sein – während sich die α -, β - und γ -Untereinheiten in der Regel in definierten Anordnungen zu verbinden scheinen, ist die Position der ϵ - sowie der δ -Untereinheiten weniger klar festgelegt. Setzt sich ein Pentamer aus je zwei $\alpha 1$ - und $\beta 2$ - sowie aus einer $\gamma 2$ -Untereinheit zusammen, so wie es bei der am häufigsten vorkommenden Form der Fall ist, sind diese in der Regel als $\gamma 2 \beta 2 \alpha 1 \beta 2 \alpha 1$ gegen den Uhrzeigersinn um die zentrale Pore angeordnet (Sigel und Steinmann, 2012).

Über lange Zeit hinweg stützten sich die strukturellen Kenntnisse über den GABAA-Rezeptor auf Informationen über verwandte Proteine und Rezeptoren, wie beispielsweise das lösliche Acetylcholin-Bindungsprotein, oder später den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR). So konnten erste Einblicke in die Struktur der pentameren ligandengesteuerten Ionenkanäle gewonnen werden, welche schließlich durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur eines Glutamat-Rezeptors - und somit eines anionenselektiven Cys-Loop-Rezeptors - ergänzt werden konnten (Hibbs und Gouaux, 2011; Miller und Aricescu, 2014).

Trotz diverser Ähnlichkeiten war jedoch die Aufklärung der Kristallstruktur des GABAA-Rezeptors vonnöten, um den genauen Aufbau, den Mechanismus der Ligandenbindung und die Auswirkungen von Mutationen besser verstehen zu können. Ein erster Schritt war Miller und Aricescu schließlich mit der Darstellung des $\beta 3$ -Homopentamers gelungen (2014). Weitere wichtige Erkenntnisse lieferten die Struktur der Chimäre aus einem bakteriellen ligandengesteuerten Ionenkanal (GLIC) und der GABAA- $\alpha 1$ -Untereinheit (Lavery et al., 2017), sowie schließlich die auf Cryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM) basierenden Strukturen humaner GABAA-Rezeptoren (Lavery et al., 2019; Masiulis et al., 2019; Smart und Stephenson, 2019).

Die Sekundärstruktur der extrazellulären Domäne zeichnet sich durch eine α -Helix und 10 sandwichartig angeordnete β -Stränge aus. Die Cys-Schleife befindet sich an einer Region zwischen dem $\beta 6$ - und dem $\beta 7$ -Strang, welche die extrazelluläre mit der transmembranen Domäne verbindet. Die M2-Helices der transmembranen Domäne wirken sich in Form zweier Gates auf den Ionenfluss aus – zum einen über ein aktivierendes Gate in der Mitte der Pore, und zum anderen über ein desensitisierendes Gate in der Nähe der cytosolischen Öffnung. Außerdem enthält die transmembrane Domäne kleine, durch Prolin-Reste gebildete Hohlräume an den Interfaces der Untereinheiten, welche beispielsweise die Bindung von Anästhetika ermöglichen (Kim und Hibbs, 2021).

GABA bindet an zwei strukturell identische Stellen, die sich am Interface der $\beta(+)$ - und der $\alpha(-)$ -Untereinheit befinden (Baumann et al., 2003; Sigel und Steinmann, 2012). Diese Bindungstasche wird in Form der Schleifen A bis F durch aromatische Reste beider Untereinheiten gebildet. Zu diesen Resten gehören $\alpha 1F64$ $\beta 2Y97$, $\beta 2Y157$ sowie $\beta 2Y205$, welche zusammen eine kompakte, boxartige Struktur bilden (Bergmann et al., 2013; Masiulis et al., 2019; Kim et al., 2020; Kim und Hibbs, 2021). GABA kann eine Kationen- π -Wechselwirkung mit $\beta 2Y205$ auf Schleife C sowie elektrostatische Wechselwirkungen mit $\beta 2Y97$ eingehen. Außerdem finden Interaktionen über Salz- und Wasserstoffbrücken statt, was ebenfalls zur GABA-Bindungsaffinität beiträgt (Kim und Hibbs, 2021).

Weitere wichtige Entdeckungen, die aus den letzten Jahren hervorgegangen sind, betreffen eine Reihe von Proteinkomplexen, die in Form von Hilfsuntereinheiten mit dem GABAA-Rezeptoren interagieren. So sind die Proteine Lipoma HMGIC Fusion Partner-Like 4 (LHFPL4) sowie Cleft lip and palate transmembrane protein (CLPTM1) an der Stabilisierung und dem Transport der Rezeptoren beteiligt (Davenport et al., 2017; Ge et al., 2018). Mit Shisa7 wurde außerdem ein Protein entdeckt, das neben dem Transport und der Expression auch die Kinetik der Rezeptoren moduliert. Eine Funktion dieses Proteins, die sich in Zukunft als interessanter pharmakologischer Angriffspunkt erweisen könnte, zeigt sich außerdem in der Verstärkung der durch Diazepam modulierten Ströme (Han et al., 2019; Han et al., 2021; Richardson et al., 2024).

3.2 Untereinheiten und Subtypen des GABAA-Rezeptors

Wie bereits beschrieben, bildet der GABAA-Rezeptor ein Pentamer aus 5 Untereinheiten. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Untereinheiten können sich diese somit zu unterschiedlichen Untereinheiten-Kombinationen zusammenlagern, welche in weiterer Folge als Subtypen bezeichnet werden (Olsen und Sieghart, 2009). So kann eine unterschiedliche Zusammensetzung und Anordnung innerhalb der Pentamere zu neuen Bindungsstellen für Agonisten, Antagonisten und allosterischen Modulatoren führen, nachdem diese überwiegend an den Grenzflächen der Untereinheiten lokalisiert sind (Sente et al., 2022).

Außerdem unterscheiden sich die Subtypen häufig in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften – beispielsweise in der mittleren effektiven GABA-Konzentration (EC_{50}), im Ausmaß der Desensibilisierung und der Deaktivierung (Sallard et al., 2021).

Der GABAA-Rezeptor-Subtyp, der sich aus zwei $\alpha 1$ -, zwei $\beta 2$ - und einer $\gamma 2$ -Untereinheit zusammensetzt, macht etwa 60% der GABAA-Rezeptoren im Nervensystem von Säugetieren aus, und ist damit der am häufigsten vorkommende Subtyp (Rudolph und Knoflach, 2011;

Sallard et al., 2021). Basierend auf der Vielzahl und der Variabilität der Untereinheiten könnten jedoch bis zu 500 verschiedene GABAA-Rezeptor-Subtypen existieren – die meisten davon nur in geringem Ausmaß (Barnard et al., 1998; Sallard et al., 2021). Aufgrund der quantitativen Bedeutung des GABAergen Systems im zentralen Nervensystem könnten aber jedoch selbst Subtypen, die im Vergleich zu $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ seltener vorkommen, in einer absoluten Häufigkeit vergleichbar mit Noradrenalin- oder Serotonin-Rezeptoren existieren. Somit könnten auch diese Subtypen einen wesentlichen Beitrag zur inhibitorischen Neurotransmission leisten und die Funktion ausgewählter neuronaler Populationen regulieren (Olsen und Sieghart, 2009).

Neben den bekannten 19 Untereinheiten gibt es auch noch Spleißvarianten einzelner Untereinheiten, die zur Vielfalt der GABAA-Rezeptoren beitragen - so kann beispielsweise die $\gamma 2$ -Untereinheit als $\gamma 2L$ oder als $\gamma 2S$ Variante vorliegen (Olsen und Tobin, 1990; Whiting et al., 1990; Sallard et al., 2021).

Die GABAA-Rezeptor-Pentamere stellen in der Regel Heteromere aus unterschiedlichen Untereinheiten dar. Es konnten in einigen Experimenten mittels rekombinanter Expressionssysteme jedoch auch Homomere gebildet werden, die sich nur aus ρ - oder β -Untereinheiten zusammensetzen (Connolly et al., 1996). Rezeptoren, die aus unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut sind, scheinen in diesen Studien aber Kanäle zu bilden, die sensitiver auf GABA ansprechen und auch eine höhere Cl^- Leitfähigkeit aufweisen (Sieghart und Sperk, 2002).

Bezüglich der Kombination zweier Untereinheiten wurde festgestellt, dass nicht alle Varianten gleichermaßen rekombinant exprimiert werden können. So ist die Bildung von Rezeptoren aus α - und β - Untereinheiten mit hoher Effizienz möglich, während sich die Kombinationen aus α - und γ - Untereinheiten sowie aus β - und γ -Untereinheiten schwieriger gestalten und nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden können. Die Kombination aus vier unterschiedlichen Untereinheiten – beispielsweise einer α -, zwei verschiedenen β - sowie einer γ -Untereinheit – ist ebenfalls möglich. Heteropentamere aus fünf unterschiedlichen Untereinheiten wurden untersucht, führten jedoch zu schwer interpretierbaren Ergebnissen (Sieghart und Sperk, 2002).

Der bisherige Kenntnisstand deutet darauf hin, dass *in vivo* vorkommende GABAA-Rezeptoren größtenteils aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind (siehe Tabelle 1) – so auch der bereits genannte $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Subtyp. Auch das native Vorkommen von Rezeptoren, welche aus unterschiedlichen ρ -Untereinheiten zusammengesetzt sind, gilt als vorläufig bestätigt (Sieghart und Sperk, 2002; Olsen und Sieghart, 2008; Smart und Stephenson, 2019).

Vorläufig identifizierte Kombinationen aus Untereinheiten	Wahrscheinlich existierende Kombinationen aus Untereinheiten	Möglicherweise existierende Kombinationen aus Untereinheiten
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha\beta\gamma 1$
$\alpha 2\beta\gamma 2$	$\alpha 1\beta\delta$	$\alpha\beta\gamma 3$
$\alpha 3\beta\gamma 2$	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$	$\alpha\beta\theta$
$\alpha 4\beta\gamma 2$	$\alpha\beta 1\gamma/\alpha\beta 1\delta$	$\alpha\beta\varepsilon$
$\alpha 4\beta 2\delta$	$\alpha\beta$ (Kombinationen aus beliebiger α - sowie β -Untereinheit)	$\alpha\beta\pi$
$\alpha 4\beta 3\delta$	$\alpha 1\alpha 6\beta\gamma/\alpha 1\alpha 6\beta\delta$	$\alpha x\beta\gamma\gamma 2$
$\alpha 5\beta 2\gamma 2$		
$\alpha 6\beta 2\gamma 2$		
$\alpha 6\beta 2\delta$		
$\alpha 6\beta 3\delta$		
$\rho 1-3$		

Tabelle 1: Vorläufig identifizierte, wahrscheinlich existierende sowie möglicherweise existierende Kombinationen der Untereinheiten. x und y stehen für die mögliche Zusammensetzung aus unterschiedlichen α - oder β -Varianten innerhalb eines Rezeptors (Olsen und Sieghart, 2008; Smart und Stephenson, 2019)

3.2.1 die $\alpha 1$ -Untereinheit

Die $\alpha 1$ -Untereinheit ist die am häufigsten vorkommende α -Isoform im Nervensystem, und unter anderem beteiligt am Aufbau des Subtypen $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Sie ist im ganzen Gehirn verteilt lokalisiert, und in besonders hoher Dichte im Cortex, im Thalamus, im Pallidum und im Hippocampus zu finden (Pirker et al., 2000; Rudolph und Knoflach, 2011; Sigel und Steinmann, 2012).

Über GABAA Rezeptoren mit einer $\alpha 1$ -UE werden vor allem sedierende Effekte von GABAA Rezeptor Modulatoren vermittelt. Des Weiteren wird die Suchtentwicklung, die Amnesie und die Neuroplastizität sowie die Vermittlung einer antikonvulsiven Wirkung mit dieser Untereinheit in Verbindung gebracht (Rudolph und Knoflach, 2011). Aufgrund der komplexen

und variablen Zusammensetzung der GABAA-Rezeptoren sollte es jedoch vermieden werden, die $\alpha 1$ -Untereinheit allein mit der Sedierung in Zusammenhang zu setzen. So bindet die Substanz DOV-51892 aus der Strukturklasse der Pyrazolopyrimidine selektiv an $\alpha 1$ -Rezeptoren und gilt als nicht-sedatives Anxiolytikum (Sigel und Steinmann, 2012). Mutationen des für die $\alpha 1$ -Untereinheit codierenden Gens GABRA1 werden auch mit dem Auftreten spezifischer Epilepsieformen in Verbindung gebracht (siehe auch **Tabelle 2**) (Johannesen et al., 2016; Absalom et al., 2023).

3.2.2 die $\beta 1$ -Untereinheit

Die $\beta 1$ -Untereinheit weist verglichen mit den $\beta 2$ - und der $\beta 3$ -Untereinheiten eine schwächere Expression auf. Zu den Regionen, in denen sie nachgewiesen werden konnte, zählen die Amygdala, die Großhirnrinde, der Hippocampus sowie der Hypothalamus. Innerhalb der Basalganglien konzentriert sich diese Isoform auf das Striatum (Pirker et al., 2000). Trotz der geringeren Häufigkeit der $\beta 1$ -Untereinheit im Gehirn wird angenommen, dass sie in nativen GABAA-Rezeptoren vorkommt. Mit der Substanz Salizylhydrazid konnte ein negativ allosterischer Modulator gefunden werden, der selektiv an $\beta 1$ -haltigen Rezeptoren bindet (Olsen und Sieghart, 2008). Auch Substanzen aus der Strukturklasse der Pyrazoloquinoline wirken selektiv an der $\beta 1$ -Untereinheit (Simeone et al., 2017).

3.2.3 die $\beta 2$ -Untereinheit

Die $\beta 2$ -Untereinheit ist die am häufigsten exprimierte unter den β -Isoformen und im gesamten Gehirn verteilt zu finden. In hoher Dichte ist sie beispielsweise im Bulbus olfactorius, in der Großhirnrinde, im Thalamus, im Hirnstamm und im Globus pallidus der Basalganglien zu finden, wo sie an der Vermittlung der sedativen Wirkung von Substanzen beteiligt ist (Pirker et al., 2000; Blednov et al., 2003).

Zahlreiche Modulatoren wirken selektiv an $\beta 2$ -haltigen GABAA-Rezeptoren. So kann beispielsweise das Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol eine positiv modulierende Wirkung auf diese Rezeptoren ausüben, was über eine Bindungsstelle an der transmembranen M4-Domäne vermittelt wird (Sigel et al., 2011). Die Substanz Loreclezol sowie chemisch verwandte Liganden – beispielsweise das Allgemeinanästhetikum Etomidat – weisen ebenfalls eine Selektivität für die $\beta 2$ - und auch für $\beta 3$ -Untereinheit auf. An GABAA-Rezeptoren bestehend aus $\beta 1$ -Untereinheiten zeigen diese Substanzen keine Wirkung. Für diese Selektivität scheint ein einzelner Asparagin-Rest innerhalb der transmembranen M2-Domäne verantwortlich zu sein, welcher im Falle der $\beta 2$ -Untereinheit in Position 289 und in

der $\beta 3$ -Untereinheit in Position 290 lokalisiert ist (Olsen und Sieghart, 2008). Als weiterer $\beta 2/\beta 3$ -selektiver Ligand ist außerdem die Valerensäure zu nennen (Khom et al., 2007).

3.2.4 die $\beta 3$ -Untereinheit

Die $\beta 3$ -Untereinheit wird vor allem im Bulbus olfactorius, im Striatum, im Hypothalamus, in der Amygdala und in der Großhirnrinde exprimiert (Pirker et al., 2000; Jurd et al., 2003). Die wichtige Rolle, die diese Isoform im Gehirn spielt, konnte durch eine Studie mit $\beta 3$ -knock-out-Mäusen verdeutlicht werden. $\beta 3$ -Untereinheiten Knockout (KO) ist unter anderem mit einer erhöhten Neigung zu epileptischen Anfällen, Lerndefiziten sowie einer Einschränkung der motorischen Fähigkeiten assoziiert (Pirker et al., 2000; Khom et al., 2010)

3.2.5 die $\gamma 2$ -Untereinheit

In der Gruppe der γ -Untereinheiten ist die $\gamma 2$ -Isoform diejenige mit der weitesten Verbreitung im ZNS. Sie wird im gesamten Gehirn exprimiert – hohe Mengen sind beispielsweise in der Großhirnrinde, im Hippocampus, im Pallidum und im basalen Vorderhirn lokalisiert. Im Thalamus hingegen wird sie eher schwach exprimiert. Die Rolle dieser wichtigen Isoform äußert sich insbesondere über die Wirkung der Benzodiazepine – der Austausch gegen eine $\gamma 1$ -, $\gamma 3$ - oder eine δ -Untereinheit geht mit dem Verlust der Benzodiazepinsensitivität einher (Pirker et al., 2000; Olsen und Sieghart, 2009).

Untermauert werden konnte dies durch Experimente mit Knock-in-Mäusen und dem Benzodiazepin Zolpidem. Dabei führten Punktmutationen in einem ersten Schritt zu einer Unempfindlichkeit sämtlicher γ -Untereinheiten gegenüber Zolpidem. Anschließend wurden diese Untereinheiten in definierten Zellen durch Wildtyp- $\gamma 2$ -Untereinheiten ersetzt, was zu einer Aktivierung ausschließlich dieser Rezeptoren durch Zolpidem führte (Sieghart, 2012; Sigel und Steinmann, 2012).

3.3. Synaptische und extrasynaptische GABAA-Rezeptoren

Klassische GABAA-Subtypen wie der $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptor sowie $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -inkorporierende Rezeptoren sind im synaptischen Spalt lokalisiert, wo sie ihre Wirkung über eine schnelle Neurotransmission entfalten. Diese Art der Signalweiterleitung ist auch als phasische Neurotransmission bekannt, zeichnet sich durch eine rasche Aktivierung sowie

Desensibilisierung des Rezeptors aus und wurde bereits im Kapitel 3.1 erläutert (Richardson et al., 2024).

Demgegenüber steht die Form der tonischen Neurotransmission, welche über extrasynaptische GABAA-Rezeptoren erreicht wird. Diese Rezeptoren sind hauptsächlich aus den schwächer exprimierten $\alpha 4$ -, $\alpha 6$ - und δ -Untereinheiten aufgebaut. Vereinfacht lässt sich sagen, dass δ -haltige Rezeptoren in der Regel extrasynaptisch vorliegen, aber nicht alle extrasynaptischen GABAA-Rezeptoren die δ -Untereinheit beinhalten. Im Gegensatz dazu enthalten postsynaptische Rezeptoren typischerweise γ -Untereinheiten (Belelli et al., 2009; Tossell et al., 2021).

Die tonische Reizweiterleitung zeichnet sich durch eine langsamere Aktivierung und nur unvollständige Desensibilisierung aus (Glykys und Mody, 2007; Richardson et al., 2024). Sie unterscheidet sich somit sowohl von der schnellen synaptischen GABA-Transmission als auch von der langsamen Weiterleitung über metabotrope GABAB-Rezeptoren (Belelli et al., 2009).

Die Hemmung, die über die extrasynaptischen GABAA-Rezeptoren vermittelt wird, stellt eine länger anhaltende und unspezifischere Form der Neurotransmission dar, welche Neuronen, Gliazellen und subzelluläre Regionen wie das Axon, die Dendriten und das Soma hemmt (Farrant und Nusser, 2005). Außerdem werden sie - verglichen mit synaptischen Rezeptoren - durch niedrigere GABA-Konzentrationen aktiviert, welche vor allem außerhalb des synaptischen Spalts üblich sind. Die tonische Hemmung spielt sowohl bei der Hirnentwicklung als auch im reifen Nervensystem eine wichtige Rolle (Tossell et al., 2021; Richardson et al., 2024).

Erstmals entdeckt wurden die extrasynaptischen GABAA-Rezeptoren in Körnerzellen des Kleinhirns durch Brickley et al. (1996). Mittlerweile konnten sie auch in anderen Regionen wie dem Hippocampus, dem Neocortex, dem Hypothalamus und dem Rückenmark nachgewiesen werden, und gelten heute als bedeutsamer Angriffspunkt zahlreicher endogener und exogener Substanzen. So können sie beispielsweise durch bestimmte Neurosteroiden, Antikonvulsiva und Anästhetika moduliert werden. Außerdem stehen extrasynaptische GABAA-Rezeptoren im Zusammenhang mit Erkrankungen wie dem Fragilen-X-Syndrom und bestimmten Formen der Epilepsie (Belelli et al., 2009; Chuang und Reddy, 2018).

4. Erkrankungen mit Beteiligung des GABAergen Systems

Störungen der Balance von exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern wirken sich auf vielfältige Weise auf das zentrale Nervensystem aus, was im Zusammenhang mit zahlreichen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie der Epilepsie, Schlafstörungen, Schizophrenie, Autismus, Depressionen und Angststörungen steht (Rudolph und Möhler, 2014; Sears und Hewett, 2021). In den folgenden Kapiteln soll dabei auf ausgewählte Erkrankungen näher eingegangen werden, wobei besonders die Beteiligung von GABA an der Pathophysiologie beschrieben wird.

4.1 Depressionen und Angststörungen

Nachdem in der Betrachtung der Pathogenese von Depressionen der Fokus für lange Zeit auf monoaminerge Neurotransmitter wie Serotonin und Noradrenalin gelegt wurde, wird zunehmend auch die Rolle von GABA und Glutamat als wichtigste inhibitorische und exzitatorische Neurotransmitter miteinbezogen (Luscher et al., 2023).

Die schwere Depression – im angloamerikanischen Raum auch als Major Depression (MD) bezeichnet - gilt mit einer 12-Monats-Prävalenz von 6% als eine der weltweit häufigsten Erkrankungen. Das Risiko, im Laufe des Lebens daran zu leiden, liegt bei 15-18% (Luscher et al., 2023). Depressionen sind gekennzeichnet durch eine gedrückte Stimmung, Antriebslosigkeit, Schuldgefühle und ein niedriges Selbstbewusstsein. Außerdem können Suizidgedanken, Störungen des Schlafs und des Appetits, Gewichtsverlust, Müdigkeit, Konzentrationsstörungen, psychomotorische Einschränkungen und Agitiertheit auftreten. Treten mindestens fünf oder mehr dieser Symptome über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen auf, wird von einer MD gesprochen (Cutler et al., 2023).

Eine verminderte Funktion der GABA-induzierten Neurotransmission innerhalb kortikaler Hirnregionen wie dem präfrontalen Cortex (PFC) (Ghosal et al., 2017) trägt wesentlich zu dieser Erkrankung bei, und wird durch genetische, entwicklungs- und umweltbedingte Faktoren bedingt. An Depressionen erkrankte Patient*Innen weisen verminderte GABA-Konzentrationen im Plasma, im Liquor und in der Großhirnrinde auf (Lüscher und Möhler, 2019; Cutler et al., 2023; Luscher et al., 2023). Eine Verminderung von bis zu 50% konnte insbesondere bei Personen beobachtet werden, die an melancholischen und therapieresistenten Subtypen der Depression leiden. Bei Personen, die an einer bipolaren Störung erkrankt sind oder bei denen die Melancholie kein Bestandteil der Erkrankung ist, ist die Konzentration hingegen nur um etwa 20% vermindert (Luscher et al., 2011).

Außerdem konnte in Studien, die mithilfe der transkraniellen Magnetstimulation durchgeführt wurden, eine verringerte Funktion sowohl von ionotropen GABAA-Rezeptoren als auch von metabotropen GABAB-Rezeptoren im Bereich des Cortex beobachtet werden, was sich über eine Störung der kortikalen Hemmung äußerte (Duman et al., 2019). *Post mortem* konnte zudem eine verminderte Expression des GABA-Syntheseeenzyms GAD67 im präfrontalen Cortex an MD erkrankter Patient*Innen festgestellt werden (Karolewicz et al., 2010).

Bei Personen, die an einer Depression erkrankt waren, konnten *post mortem* weniger Somatostatin-positive Interneurone im präfrontalen Cortex festgestellt werden, außerdem ist die Expression von SST (Somatostatin-Gen) in kortikalen Regionen und in der Amygdala häufig vermindert (Seney et al., 2015; Douillard-Guilloux et al., 2017). Des Weiteren konnte eine verringerte Expression der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ und δ im präfrontalen Cortex von Suizidopfern festgestellt werden (Merali et al., 2004; Luscher et al., 2011).

Eine weitere wichtige Verbindung zwischen Pathogenese der Depression und dem GABAergen-System stellt Stress dar, welcher wesentlich zur Entstehung der Krankheit beiträgt. So konnte bei adulten Ratten, die in den ersten Lebenswochen von ihren Müttern getrennt wurden und dadurch starkem Stress ausgesetzt wurden, eine verminderte Expression von GABAA-Rezeptoren im Locus coeruleus (LC) sowie dem Nucleus tractus solitarius (NTS) festgestellt werden. Des Weiteren wiesen die Ratten eine geringere Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit sowie eine verminderte Anzahl an Benzodiazepin-Bindungsstellen im Bereich der Amygdala, dem LC und dem NTS auf (Caldji et al., 2000). Außerdem konnte in Untersuchungen an Mäusen, die ein Defizit an $\gamma 2$ -haltigen GABAA-Rezeptoren aufweisen, eine chronische Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) – auch bezeichnet als Stressachse – im Bereich des Großhirns beobachtet werden (Shen et al., 2010).

Ein weiterer nennenswerter Faktor stellt außerdem der Spiegel an endogenen Neurosteroiden dar, welcher bei an Depressionen erkrankten Personen häufig vermindert ist. So liegen beispielsweise reduzierte Konzentrationen an Pregnenolon sowie Allopregnanolon im Plasma und Liquor von an MD erkrankten Personen vor. Diese Substanzen sind Modulatoren des GABAA-Rezeptors und werden durch chronischen Stress herunterreguliert, indem die Expression des Enzyms 5 α -Reduktase und in weiterer Folge die Neurosteroidsynthese gehemmt wird. Des Weiteren kann es zu einer verminderten Expression von δ -haltigen GABAA-Rezeptoren kommen, welche einen zentralen Angriffspunkt der Neurosteroiden darstellen. Die Neurosteroiden bieten somit die Möglichkeit zum Einsatz in der Pharmakotherapie (Lüscher und Möhler, 2019; Luscher et al., 2023).

Die MD weist zahlreiche Ähnlichkeiten zur Angststörung auf. So ist eine Verminderung der über GABA vermittelten inhibitorischen Neurotransmission an der Pathophysiologie beider Erkrankungen beteiligt, außerdem werden im Rahmen der medikamentösen Behandlung ähnliche Substanzen eingesetzt. Ein hoher Anteil der an Depressionen erkrankten Patient*Innen leidet zusätzlich an Angststörungen, dasselbe gilt auch in umgekehrter Weise (Möhler, 2012).

Die Gruppe der Angststörungen setzt sich aus der generalisierten Angststörung, der Panikstörung sowie den spezifischen Phobien zusammen. Als Hauptsymptom gilt dabei eine schwerwiegende und langanhaltende Angst, die in keinem Verhältnis zu einer direkten Bedrohung steht. Außerdem können Angststörungen zu Erschöpfung und Agitiertheit führen, und sich dabei mit der Symptomatik der Depression überschneiden (Penninx et al., 2021).

Zahlreiche Studien deuten unter anderem auf eine Fehlregulation der Kommunikation zwischen der Amygdala und dem präfrontalen Cortex bei Angststörungen hin. Beide Regionen sind an der Verarbeitung und Entstehung von Angst beteiligt – während die Amygdala für die Erkennung von Bedrohungen zuständig ist und bei Angststörungen hyperreaktiv ist, ist der präfrontale Cortex hyporeaktiv. Daher kommt es zu einem Verlust der Kontrolle des PFCs über die Amygdala. Eine ähnliche Dysregulation dieser Kommunikation liegt der Symptomatik der Depression zugrunde. Auch hier kommt es zu einer anhaltenden Überaktivität der Amygdala, und eine verminderte Aktivität des präfrontalen Cortex zeigt sich hier beispielsweise dadurch, dass Betroffene positives Feedback von außen weniger effizient verwerten können (Murray et al., 2011; Möhler, 2012).

Im Rahmen der Angststörung sind dabei zwei Regionen der Amygdala von besonderer Bedeutung: zum einen der basolaterale Komplex (BLA), welcher Informationen unter anderem vom Thalamus, dem präfrontalen Cortex und dem Assoziationscortex empfängt, und zum anderen der zentrale Kern der Amygdala (CeA), welcher Signale vom BLA erhält und prozessiert. Ausgehend davon regulieren Neuronen der CeA Regionen, die an der Angstentstehung beteiligt sind - unter anderem das Periaquäduktale Grau (PAG), den Hypothalamus, die Bettkerne des Nucleus striae terminalis (BNST) und den dorsalen Vaguskomplex (DVC). Dies führt in weiterer Folge zu den typischen Reaktionen, wie beispielsweise vermeidendes Verhalten oder Erstarren, welche im Rahmen einer Angsterkrankung auftreten (Babaev et al., 2018).

In Bereich des CeA herrscht ein überwiegend inhibitorischer Ton, während die Aktivität der BLA durch glutamaterge Pyramidalneuronen sowie inhibitorische Interneuronen gesteuert

wird. Die Aktivität der Neuronen als Reaktion auf einen angstausslösenden Reiz unterliegt hierbei komplexen neuronalen Schaltkreisen. Die BLA antwortet auf diese Reize mit einer verstärkten Aktivität exzitatorischer Neuronen und leitet dieses Signal an die CeA weiter. Abhängig von der Gefahr, die mit dem Reiz assoziiert wird, wirken sich inhibitorische Interneuronen hemmend auf die Aktivität der Hauptneuronen aus (Janak und Tye, 2015).

Das GABAerge System trägt dabei einen wesentlichen Teil zur Entstehung und Verarbeitung der Angst bei. So wirkt die direkte Applikation von GABA oder GABA-Rezeptor-Agonisten in die Amygdala anxiolytisch, während GABA-Antagonisten eine angstausslösende Wirkung mit sich bringen (Nuss, 2015). Personen, die an Angststörungen leiden, weisen überdies ein Defizit an GABA_A-Rezeptoren im Bereich des Orbitofrontalcortex (OFC), des dorsolateralen präfrontalen Cortex (dlPFC) sowie des Inselkappens auf, welches mit der Schwere der Symptomatik korreliert (Durant et al., 2010; Möhler, 2012).

Dabei scheint die γ 2-Untereinheiten eine der Schlüsselrollen zu spielen. Neben der Bedeutung, die ihr als Bestandteil der Bindungsstelle für die anxiolytisch wirksamen Benzodiazepine zukommt, zeigen zahlreiche Studien einen Zusammenhang mit der Pathogenese von Angsterkrankungen. So können bei betroffenen Personen Autoantikörper, die gegen die γ 2-Untereinheit gerichtet sind, identifiziert werden, was eine Beteiligung an der Entstehung der Erkrankung nahelegt. Ebenso zeigen γ 2-knockout-Mäuse Angstverhalten. Die γ 2-Untereinheit ist am Aufbau der meisten GABA_A-Rezeptoren im Gehirn beteiligt, und ihre reduzierte Expression scheint mit einer Verminderung der über diese Rezeptoren vermittelten anxiolytischen Wirkung einherzugehen (Smith und Rudolph, 2012; Babaev et al., 2018).

Wie im Rahmen der Depressionen bereits erwähnt, spielen endogene neuroaktive Steroide auch in der Pathophysiologie der Angststörung eine Rolle. Sie modulieren die neuronale Exzitabilität, indem sie in niedrigen Konzentrationen allosterisch die Aktivität des GABA_A-Rezeptors modulieren, oder aber in hohen Konzentrationen direkt aktivieren (Hosie et al., 2006; Nuss, 2015; Alvarez und Pecci, 2018). Infolgedessen bilden die Neurosteroidoide einen Ansatzpunkt für die Behandlung der Angststörungen und sollen in Kapitel 5.4 noch ausführlich erläutert werden.

4.2 Epilepsie

Die Epilepsie ist eine neurologische Erkrankung, welche durch eine Dysbalance zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission gekennzeichnet ist. Durch überschießende exzitatorische Aktivität sowie eine gestörte hemmende Gegenregulation

kommt es unter anderem zum Auftreten von Krampfanfällen, was sich beispielsweise in Form des Lennox-Gastaut-Syndroms (LGS) äußert (Liu et al., 2014; Richardson et al., 2024). Im Rahmen eines Anfalls steigt der Glutaminspiegel an, während GABA eine unzureichende Gegenregulation ausübt (Perucca et al., 2023a). Eine Beteiligung des GABAergen Systems in der Pathogenese ist somit unbestritten, und auch das Antikonvulsivum Phenobarbital, welches als eines der ersten in der Behandlung der Epilepsie eingesetzt wurde, entfaltet seine Wirkung über die Modulation des GABAA-Rezeptors. Auch heute wird Phenobarbital noch in der Behandlung von generalisierten und fokalen Anfällen sowie im Rahmen des therapierefraktären Status Epilepticus auf Intensivstationen eingesetzt (Richardson et al., 2024).

Das GABAerge System ist dabei an unterschiedlichen Epilepsie-Syndromen beteiligt, welche jeweils durch ein bestimmtes klinisches Bild gekennzeichnet sind. Dazu zählen die idiopathischen (genetischen) generalisierten Epilepsien (IGE), welche sich wiederum aus der juvenilen (JAE) und der kindlichen Absencen-Epilepsie (CAE), den generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (GTCS) sowie der juvenilen myoklonischen Epilepsie (JME) zusammensetzen (Hirsch et al., 2022). Des Weiteren sind die Fieberkrämpfe zu nennen, welche vor allem im Zusammenhang mit Fieber und im Alter zwischen sechs Monaten und fünf Jahren auftreten, sowie die generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS +), welche über das sechste Lebensjahr hinaus vorkommt. Auch das seltene Dravet-Syndrom, das Lennox-Gastaut-Syndrom (LGS) sowie das West-Syndrom können mit einer Fehlfunktion des GABAergen Systems in Verbindung gebracht werden (Specchio et al., 2022; Bryson et al., 2023).

Fehlfunktionen können dabei die Synthese, die Freisetzung und die Wiederaufnahme von GABA aus dem synaptischen Spalt betreffen, und beispielsweise durch unterschiedliche Genmutationen bedingt sein. Bisher konnten mehr als 100 Varianten des für den GAT1 codierenden SLC6A1-Gens gefunden werden, wobei die meisten davon Missense-Mutationen oder trunkierende Mutationen darstellen (Carvill et al., 2015). Einige dieser Varianten sind mit einem Funktionsverlust des GABA-Transporters assoziiert – der genaue Mechanismus, über den diese Dysfunktion zu Epilepsien führt, konnte bisher jedoch nicht geklärt werden (Bryson et al., 2023).

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen einer gestörten GAT-Funktion und der mit Temporallappenepilepsie (TLE) assoziierten Hippocampusklerose beobachtet werden. Auch eine Störung im Rahmen des Glutamat/GABA-Glutamin-Zyklus wird mit der TLE in Verbindung gebracht – dabei kommt es zu einer verminderten Expression der Glutaminsynthase, was eine

geringere Bildung von Glutamin und weitere Umwandlung zu GABA zur Folge hat (Bryson et al., 2023).

Auch Mutationen des GABAA-Rezeptors stehen mit unterschiedlichen Epilepsie-Formen in direkter Verbindung. Mutationen des GABRG2-Gens, welches für die γ 2-Untereinheit codiert, können zu einem Funktionsverlust des Rezeptors und in weiterer Folge zum Dravet-Syndrom, dem Lennox-Gastaut-Syndrom oder zu Fieberkrämpfen führen (Baulac et al., 2001). Aufgrund der Relevanz dieser Untereinheit für die Bindung von Benzodiazepinen geht ein Funktionsverlust auch mit einer erschwerten medikamentösen Behandlung einher (Fedi et al., 2006; Richardson et al., 2024).

Gene, die für die α 1-3, β 1-3 sowie die δ - Untereinheit codieren, konnten ebenfalls mit Formen der Epilepsie in Zusammenhang gebracht werden (siehe **Tabelle 2**). Mutationen der GABRA1- und GABRB2/3-Gene wurden dabei am häufigsten beobachtet, was mit der verbreiteten Expression dieser Untereinheiten im ZNS korreliert (Absalom et al., 2023). Neben Mutationen, die zu einem Funktionsverlust der Rezeptoren führen, konnten auch einige Gain-of-Function-Mutationen identifiziert werden – beispielsweise Varianten der β 3- oder der δ -Untereinheit (Maillard et al., 2022; Richardson et al., 2024).

Jüngste Ergebnisse einer Studie konnten zudem zeigen, dass Mutationen im GABRA4-Gen mit neurologischen Symptomen in Verbindung stehen – unter anderem mit epileptiformen EEG-Abnormalitäten und Anfällen (Sajan et al., 2024).

das von einer Mutation betroffene Gen	Genmutation	Beispiel für die phänotypische Ausprägung der Mutation in Form eines epileptischen Syndroms
<i>GABRG2</i>	K289M	GEFS+
<i>GABRG2</i>	R177G	Fieberkrämpfe
<i>GABRG2</i>	K328M	GEFS+
<i>GABRA1</i>	F92L	GEFS+
<i>GABRA1</i>	V284A	frühe kindliche epileptische Enzephalopathie (EIEE)
<i>GABRB2</i>	GA272	GTCS
<i>GABRB3</i>	L284P	myoklonische Absencen-Epilepsie (MAE)

<i>GABRB3</i>	Y302C	Fieberkrämpfe
<i>GABRB4</i>	T300I	Early-onset Epilepsie

Tabelle 2: Mutationen diverser Gene, welche für GABAA-Rezeptoruntereinheiten codieren, und mögliche phänotypische Auswirkungen im Bereich der Epilepsie (Baulac et al., 2001; Todd et al., 2014; Qu et al., 2021; Maillard et al., 2022; Vogel et al., 2022; Absalom et al., 2023; Sajan et al., 2024).

Im Rahmen eines Status epilepticus, der durch einen verlängerten Anfall oder mehrere kurz aufeinander folgende Anfälle gekennzeichnet ist, kommt es Studien zufolge zu einer Internalisierung von synaptischen GABAA-Rezeptoren. Diese Inaktivierung bringt in weiterer Folge eine verminderte GABA-vermittelte synaptische Inhibition sowie eine reduzierte Sensitivität gegenüber Benzodiazepinen mit sich. Des Weiteren könnten auch präsynaptische Mechanismen während eines Status epilepticus beeinflusst werden, welche beispielsweise die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt betreffen (Goodkin et al., 2008). Extrasynaptische Rezeptoren hingegen sind von diesem Prozess nicht betroffen, was die Neurosteroiden zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Behandlung des Status epilepticus werden lässt – diese binden sowohl an synaptische als auch an extrasynaptische Rezeptoren (Rogawski et al., 2013; Perucca et al., 2023a).

Eine vermehrte Anfallsaktivität hat auch einen Einfluss auf den Cl^- Gradienten – so kann der Transporter KCC2 zum einen durch einen zu starken Fluss der Chloridionen in seiner Kapazität überlastet werden, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Chlorid-Konzentration führt. Zum anderen kann eine vermehrte Anfallsaktivität die Expression des KCC2 herunterregulieren (Burman et al., 2019; Auer et al., 2020; Bryson et al., 2023).

Die Behandlung der Epilepsie erfolgt durch zahlreiche Antikonvulsiva, die in das GABAerge System eingreifen. So hemmt beispielsweise Tiagabin die GABA-Wiederaufnahme, während Vigabatrin den GABA-Stoffwechsel inhibiert. Benzodiazepine, Barbiturate, das Neurosteroid Ganaxolon oder Felbamat hingegen wirken über die Modulation des GABAA-Rezeptors (Perucca et al., 2023b).

5. Liganden und ihre Bindungsstellen am GABAA-Rezeptor

5.1 Benzodiazepine

Die 1,4-Benzodiazepine, welche seit vielen Jahrzehnten erfolgreich in der Pharmakotherapie zahlreicher psychischer Erkrankungen eingesetzt werden, wurden als die ersten Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABAA-Rezeptor identifiziert. Neben dieser Wirkstoffgruppe, deren bekanntester Vertreter wohl Diazepam darstellt, binden jedoch auch zahlreiche Substanzen mit abweichender Struktur an dieselbe Bindungsstelle (siehe **Abbildungen 6 und 7**). Dabei führt die Bindung der Liganden nicht zu einer direkten Aktivierung des Kanals, sondern zu einer Modulation der Wirkung von Agonisten wie GABA, indem die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht wird. So wirken neben den klassischen Benzodiazepinen beispielsweise die sogenannten Z-Drugs wie Zolpidem, Zopiclon und Zaleplon als positiv allosterische Modulatoren, ebenso wie die Substanz CGS-8216 aus der Gruppe der Pyrazoloquinoline an dieser Bindungsstelle (Sigel und Buhr, 1997; Sigel und Lüscher, 2011; Löscher und Rogawski, 2012; Sigel und Ernst, 2018). Daneben sind auch unselektive negativ allosterische Modulatoren wie das β -Carbolin Methyl-6,7-dimethoxyl-4-ethyl- β -Carbolin-3-carboxylat (DMCM) zu nennen. Als Antagonist ist der Wirkstoff Flumazenil zu nennen, welcher in der klinischen Praxis als Antidot nach einer Überdosierung von Benzodiazepinen sowie zur Aufhebung der Allgemeinanästhesie eingesetzt wird (Rudolph und Knoflach, 2011; Sigel und Ernst, 2018; Kim et al., 2020). Diese Substanz zeigt jedoch nicht ausschließlich antagonistische Aktivität – in niedrigen Konzentrationen wirkt sie als negativ allosterischer Modulator, während in hohen Konzentrationen eine positiv allosterische Wirkung beobachtet werden kann. Diese modulatorischen Effekte sind jedoch in beiden Fällen eher schwach ausgeprägt (Sigel und Baur, 1988; Sigel und Ernst, 2018)

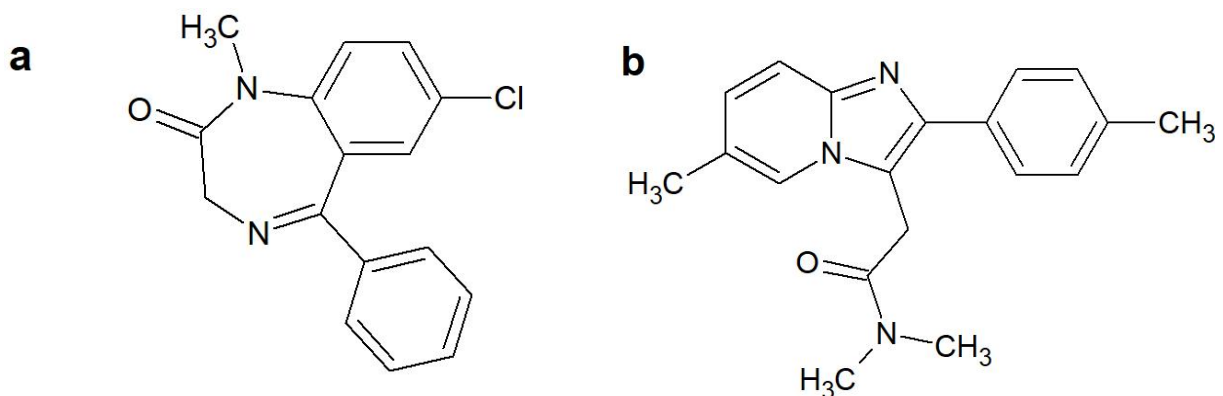


Abbildung: 6: Strukturformeln von (a) Diazepam und (b) Zolpidem

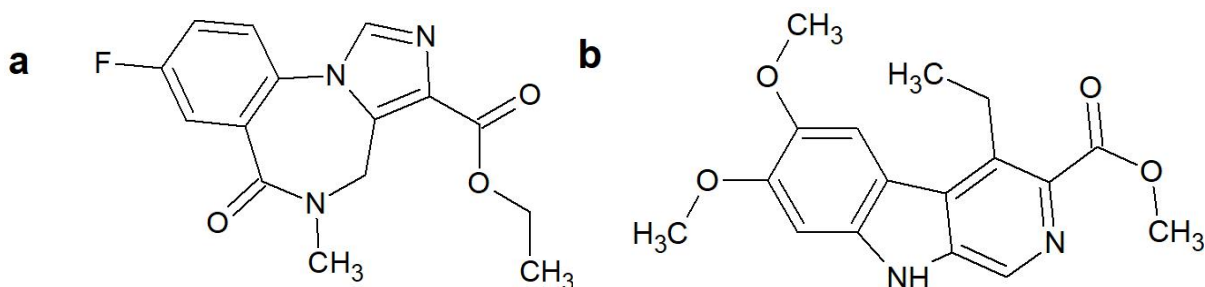


Abbildung 7: Strukturformeln von (a) Flumazenil und (b) DMCM

Die Bindung der positiv allosterischen Modulatoren an die Bindungsstelle bringt eine sedierende und anxiolytische Wirkung mit sich, des Weiteren können hypnotische und antikonvulsive Effekte beobachtet werden. Das breite Wirkspektrum ermöglicht den Einsatz in der Therapie zahlreicher Erkrankungen – so finden sie bei Angst- und Panikstörungen, Krampfanfällen, Muskelspasmen, Schlafstörungen sowie auch im Rahmen des akuten Alkoholentzugs Anwendung (Möhler et al., 2002; Goldschen-Ohm, 2022). Jedoch kann der langfristige Konsum der Benzodiazepine auch negative Effekte mit sich bringen, zu denen die Ausbildung einer Toleranz und Abhängigkeit sowie eine Beeinträchtigung der kognitiven Funktion zählen (Schmitz, 2016; Fluyau et al., 2018; Goldschen-Ohm, 2022).

Die hochaffine Bindungsstelle für Benzodiazepine und Z-Drugs befindet sich extrazellulär zwischen der $\alpha(+)$ - und der $\gamma(-)$ -Untereinheit (Sigel und Lüscher, 2011; Sigel und Ernst, 2018; Laverty et al., 2019; Kim et al., 2020). Dort interagiert der Ligand in seiner Bindungstasche mit Resten beider Untereinheiten – beispielsweise bilden die Ringe der Benzodiazepin-Kernstruktur π -Wechselwirkungen mit Aromaten des Rezeptorproteins aus (Goldschen-Ohm, 2022; Zhu et al., 2022).

Zu den essenziellen Aminosäure-Resten gehört ein Histidin-Rest in Position 101, welcher in $\alpha 1$ - $\alpha 3$ sowie $\alpha 5$ zu finden ist und in $\alpha 4$ sowie $\alpha 6$ gegen einen Arginin-Rest ausgetauscht ist. Das Fehlen dieses Restes führt demnach in $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten zu einem Verlust der Benzodiazepin-Sensitivität. Dieser Histidin-Rest interagiert über Wasserstoffbrücken mit dem Chlor-Atom von Diazepam, dem Fluor-Atom von Flumazenil oder mit den Methoxygruppen des negativ allosterischen Modulators DMCM (Goldschen-Ohm, 2022; Zhu et al., 2022). In Bezug auf die $\gamma 2$ -Untereinheit sind der Phenylalanin-Rest in Position 77 sowie der Methionin-Rest in Position 130 als für die hochaffine Bindung notwendige Aminosäuren zu nennen (Wingrove et al., 1997).

Neben dieser hochaffinen extrazellulären Bindungsstelle konnten im Bereich der Transmembrandomäne weitere Stellen gefunden werden, an denen Diazepam bindet (siehe **Abbildung 8 (A) und (B)**). Walters et al. identifizierten den Serin-Rest in Position 267 der α -Untereinheit, den Asparagin-Rest in Position 265 der β -Untereinheit sowie den Serin-Rest in Position 280 der γ -Untereinheit als für diese Bindung bedeutsame Aminosäuren (Walters et al., 2000). Diese werden mit der biphasischen Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Wirkstoffs in Verbindung gebracht - so weist er sowohl eine geringe mikromolare Affinität als auch eine hohe nanomolare Affinität auf. Die Bindung an die TMD scheint dabei für die geringer affine Wirkung verantwortlich zu sein. Diese Regionen zeigen Übereinstimmungen mit den Bindungsstellen von Anästhetika, welche in Kapitel 5.3 ausführlich erläutert werden (Masiulis et al., 2019; Szabo et al., 2019; Goldschen-Ohm, 2022).

Darüber hinaus können bestimmte Liganden der hochaffinen Bindungsstelle – beispielsweise die Substanz GCS9216 – an ein Pocket zwischen α +/ β - binden, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu der hochaffinen α +/ γ -Stelle aufweist. In GABAA-Rezeptoren, in denen die α -Untereinheit nicht vorhanden ist, kann Diazepam außerdem an ein Interface zwischen der β 2(+) und der γ 2(-)- Untereinheit binden (Wongsamitkul et al., 2017; Sigel und Ernst, 2018).

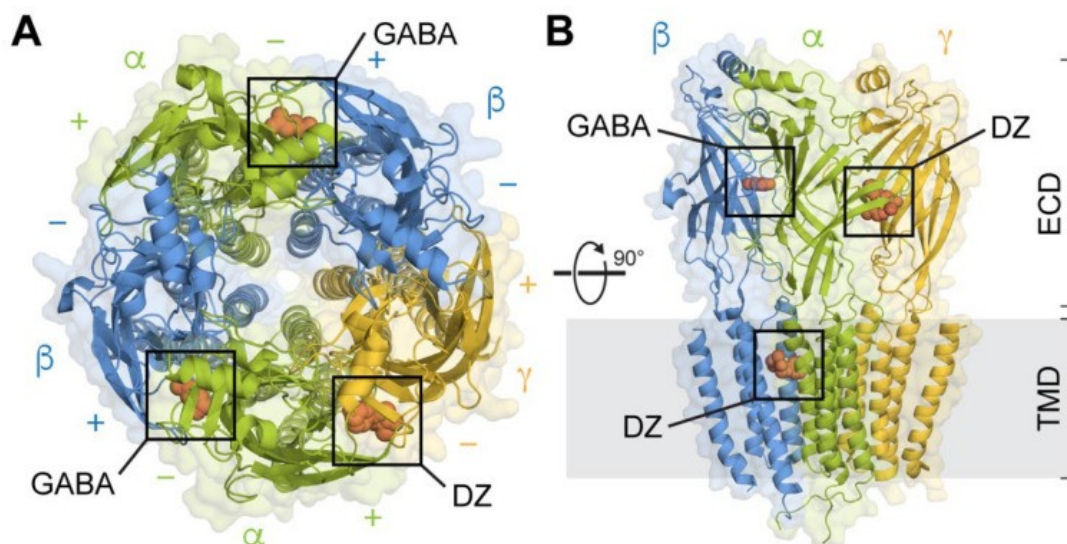


Abbildung 8: Bindung von Diazepam an die extrazelluläre sowie an die Transmembran-Bindungsstelle, **(A)** zeigt den Blick von Oben und **(B)** die Seitenansicht (Goldschen-Ohm, 2022, bearbeitet, lizenziert unter CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Wie bereits beschrieben, führt der Verlust des H101-Restes in $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten zu einem Verlust der Benzodiazepin-Sensitivität. Mithilfe von Studien an Knock-in-Mäusen konnten weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der α -Isoform und der Benzodiazepin-Wirkung gewonnen werden – so vermittelt die $\alpha 1$ -Untereinheit die sedierenden, antikonvulsiven und anterograd amnestischen Effekte. Die anxiolytischen Effekte hingegen werden durch die $\alpha 2$ -Untereinheit bewirkt, während die $\alpha 3$ - sowie die $\alpha 5$ -Untereinheiten zur Muskelrelaxation beitragen (Rudolph et al., 1999; McKernan et al., 2000; Lüscher et al., 2012).

Weitere Reste, die sich auf die Affinität der Liganden gegenüber dieser Bindungsstelle auswirken, konnten durch Studien an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) identifiziert werden. Durch die Mutation des Glu225-Restes der $\alpha 3$ -Untereinheit zu einem Glycin-Rest wird die Affinität für Zolpidem um das Zehnfache gesteigert. Der Austausch des Tyr159-Restes der $\alpha 1$ -Untereinheit gegen einen Serin-Rest hingegen geht mit dem Verlust der Flumazenil-Bindung einher. Ebenso bedeutsam für die Bindung von Flumazenil ist außerdem der Tyrosin-Rest am Position 209 der $\alpha 1$ -Untereinheit. Die Aminosäure, die sich an Position 77 der $\gamma 2$ befindet, scheint ebenfalls entscheidend zu sein – so wird die Affinität von Zolpidem durch die Mutation von Phenylalanin zu Isoleucin vermindert, und durch die Substitution zu Tyrosin erhöht (Sigel und Buhr, 1997). Die Mutation F77I führt außerdem zu einer Inhibition des GABA-induzierten Chloridstroms (I_{GABA}) durch Flunitrazepam, während an $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ GABAA-Rezeptoren ($\gamma 1$ I77) positive Modulation von I_{GABA} durch Triazolam, Midazolam und Clotiazepam, nicht aber Diazepam oder Flurazepam beobachtet werden konnte (Ogris et al., 2004; Khom et al., 2006).

Aufgrund der Auswirkungen, die die Zusammensetzung der Untereinheiten auf die Wirkung der Benzodiazepine hat, wird die Bedeutung von Subtyp-selektiven Modulatoren in der Pharmakotherapie deutlich. Bestimmte Effekte, die die Wirkstoffe auf das Nervensystem ausüben, sind im Rahmen einiger Indikationen erwünscht, und werden in anderen wiederum als Nachteil empfunden. So wird die sedierende Wirkung in der Anästhesie bei operativen Eingriffen pharmakologisch genutzt, muss in der Therapie von Angststörungen jedoch häufig als unerwünschte Nebenwirkung in Kauf genommen werden (Zeilhofer et al., 2009; Smith et al., 2012; Benham et al., 2021; Engin, 2022).

Durch die Entwicklung Subtyp-selektiver Wirkstoffe könnten bestimmte Erkrankungen unter Umgehung gewisser Nebenwirkungen gezielter therapiert werden. Bisher konnte jedoch kein vollständig selektiver Wirkstoff auf den Markt gebracht werden – einige Substanzen mit

Subtyp-selektiver Affinität und Wirksamkeit wurden jedoch bereits in präklinischen und klinischen Studien untersucht (Sieghart und Savić, 2018; Engin, 2022).

Ein Ansatz für die Entwicklung selektiver Liganden an der Benzodiazepin-Bindungsstelle stellt die $\alpha 1$ -Untereinheit dar – so würden Wirkstoffe, die keine Affinität für GABAA-Rezeptoren mit dieser Isoform aufweisen, anxiolytisch wirken, ohne die sedierende Komponente mit sich zu bringen. Außerdem scheint diese Untereinheit eine wichtige Rolle im Rahmen der Abhängigkeit zu spielen, indem sie zum Belohnungseffekt und dem Benzodiazepin-Entzugssyndrom beitragen (Engin, 2022). Nachdem im Jahr 2018 30,6 Millionen Erwachsene in den Vereinigten Staaten angaben, Benzodiazepine eingenommen zu haben, und 20% des Gesamtkonsums auf eine missbräuchliche Verwendung zurückzuführen sind, sollte diese Komponente besonders berücksichtigt werden (Maust et al., 2019).

5.2 Barbiturate

Eine weitere Gruppe an Modulatoren, die an GABAA-Rezeptoren binden, stellen die Barbiturate dar (siehe **Abbildung 9**). Nach ihrer Entdeckung zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde der erste Vertreter – die Diethylbarbitursäure – in der Behandlung von Psychosen und Neurosen eingesetzt (López-Muñoz et al., 2005; Fourati et al., 2017). Mithilfe der Barbiturate konnte erstmalig die Möglichkeit geschaffen werden, die Epilepsie effektiv zu behandeln, und der Weg für die intravenöse Anästhesie geebnet werden. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite, der möglichen Atemdepression als Nebenwirkung sowie der Gefahr der Abhängigkeit wurden die Barbiturate mittlerweile jedoch größtenteils durch andere Wirkstoffe ersetzt. Heute werden sie nur noch im Rahmen weniger Indikationen eingesetzt – so finden beispielsweise die Vertreter Thiopental und Phenobarbital noch in der Behandlung bestimmter Formen der Epilepsie und in der Anästhesie Anwendung (López-Muñoz et al., 2005; Cutler et al., 2023).

Barbiturate wirken krampflösend, anxiolytisch, hypnotisch und sedierend und werden aufgrund der in hohen Dosen auftretenden Atemdepression auch in der Euthanasie eingesetzt (Löscher und Rogawski, 2012). Weiters fand Thiopental in den USA für lange Zeit im Rahmen der Todesstrafe Anwendung, wurde dabei mittlerweile aber größtenteils durch Substanzen wie Midazolam ersetzt (Kim und Levy, 2020).

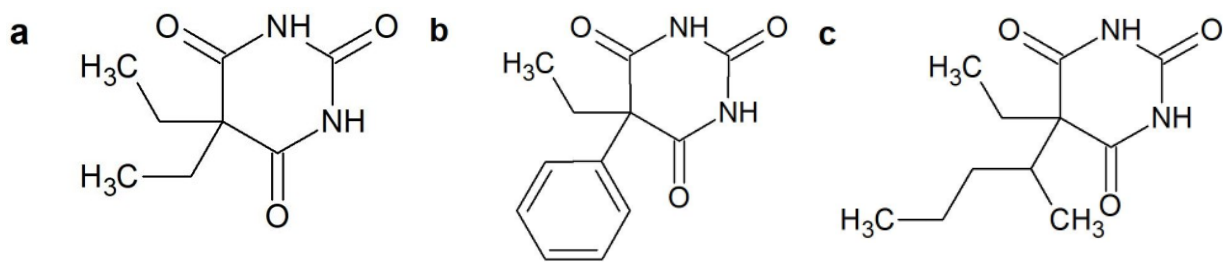


Abbildung 9: Strukturformeln von (a) Barbitital, (b) Phenobarbital und (c) Pentobarbital

Barbiturate binden sowohl an synaptische als auch an extrasynaptische GABAA-Rezeptoren, wo sie als allosterische Modulatoren die Dauer der Kanalöffnung in Anwesenheit von GABA verlängern (Ghit et al., 2021; Cutler et al., 2023). Eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors, wie es bei den Benzodiazepinen der Fall ist, wird hingegen nicht erreicht (Löscher und Rogawski, 2012). Ein weiterer Unterschied zu den Benzodiazepinen besteht in der Möglichkeit der direkten Aktivierung des Rezeptors in hohen Konzentrationen, selbst wenn GABA nicht vorhanden ist (Ghit et al., 2021; Cutler et al., 2023). Außerdem führt die Modulation durch Benzodiazepine nur zu einem begrenzten Anstieg der Chlorid-Leitfähigkeit, während dieses durch Barbiturate um ein Vielfaches gesteigert werden kann. In sehr hohen Konzentrationen können diese Liganden wiederum eine Hemmung des Stromflusses bewirken (Löscher und Rogawski, 2012).

Die Bindungsstellen für Barbiturate befinden sich an den γ +/ β -Interfaces sowie an den Interfaces der α +/ β - Untereinheiten im Bereich der Transmembrandomäne. Als Aminosäure-Reste, die für die Bindung mitverantwortlich sind, konnten der Alanin-Rest in Position 291 und der Tyrosin-Rest in Position 294 der α -Untereinheit, der Methionin-Rest in Position 277 der β -Untereinheit sowie der Serin-Rest in Position 301 der γ -Untereinheit identifiziert werden (Chua und Chebib, 2017; Ghit et al., 2021).

5.3 Anästhetika

Die Entwicklung der Anästhetika im 19. Jahrhundert leistete einen wesentlichen Beitrag zum medizinischen Fortschritt. Der Einsatz dieser Substanzen hat die Möglichkeit geschaffen, operative Eingriffe unter erheblicher Reduktion von Schmerzen und des Bewusstseins durchzuführen, und gehört heute zum klinischen Praxisalltag. Eine durch Allgemeinanästhetika ausgelöste Narkose geht in der Regel mit einer Veränderung der

Motorik, der Wahrnehmung, der Empfindung, des Bewusstseins und der autonomen Kontrolle einher (Garcia et al., 2010).

Nachdem die Barbiturate über lange Zeit hinweg zu den Mitteln der Wahl zählten, wurden diese mittlerweile größtenteils durch andere Wirkstoffe ersetzt. So werden heute hauptsächlich die intravenösen Anästhetika Propofol und Etomidat (siehe **Abbildung 10**) eingesetzt, des Weiteren sind die inhalativen Narkotika wie Isofluran und Sevofluran zu nennen. (Olsen, 2018; Kim et al., 2020)

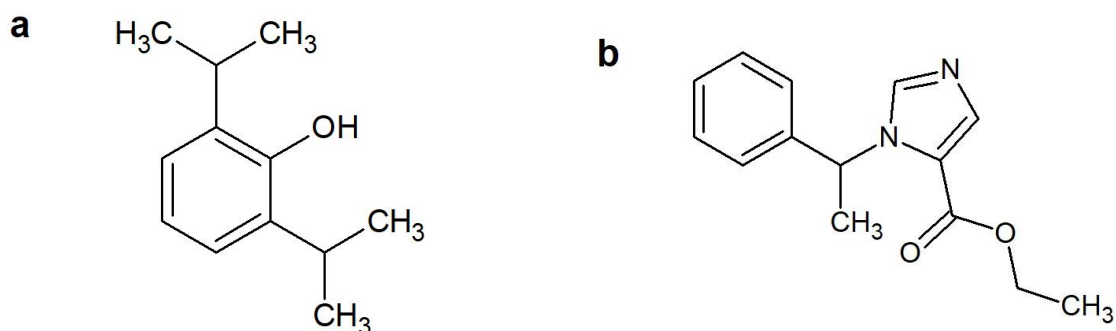


Abbildung 10: Strukturformeln von (a) Propofol und (b) Etomidat

Die Allgemeinanästhetika weisen wenig Selektivität auf - keiner der Wirkstoffe wirkt nur an einem Protein des Nervensystems. In klinisch verabreichten Konzentrationen interagiert jede der Substanzen mit mindestens zwei verschiedenen Rezeptortypen. Neben dem GABAA-Rezeptor können Glycin-, 5-HT₃- oder Glutamat-Rezeptoren an der Anästhesie beteiligt sein (Garcia et al., 2010; Kim et al., 2020). Die Wirkstoffe, die an dieser Stelle besprochen werden sollen, sind allesamt positiv allosterische Modulatoren des GABAA-Rezeptors. In hohen Konzentrationen können sie den Rezeptor auch direkt in Abwesenheit von GABA aktivieren (Garcia et al., 2010). Durch ihre Bindung führen sie zu den für die Narkose bedeutsamen Effekten: der Analgesie, der Amnesie, der hypnotischen sowie der immobilisierenden Wirkung, zu beachten sind jedoch auch unerwünschte Wirkungen wie die Atemdepression (Franks, 2006; Hao et al., 2020).

Auch wenn die genauen Wirkmechanismen der Anästhetika noch nicht vollkommen geklärt sind, konnten Bindungsstellen am GABAA-Rezeptor identifiziert werden. Diese befindet sich dabei für das intravenöse Anästhetikum Etomidat im Bereich der Transmembrandomäne am

β +/ α -Interface (Li et al., 2006; Kim et al., 2020). Die Sensitivität gegenüber Etomidat ist bei β 2- oder β 3-haltigen Rezeptoren im Vergleich zu jenen mit β 1-Untereinheiten erhöht, was auf den β 2/ β 3N265-Rest der M2-Domäne zurückzuführen ist. Mutationen dieses Restes gehen mit einer verminderten Modulation durch Etomidat einher (Siegwart et al., 2002; Jurd et al., 2003; Olsen, 2018). Eine Mutation des S265-Restes der β 1-Untereinheit zu Asparagin erhöht hingegen die Sensitivität. Des Weiteren scheint der M286-Rest der M3-Domäne aller β -Untereinheiten in der Bindung involviert zu sein (Belelli et al., 1997; Hao et al., 2020).

Der Wirkstoff Propofol interagiert höchstwahrscheinlich nicht nur mit dem β +/ α -Interface, sondern auch beispielsweise mit dem α +/ β - Interface. (Jayakar et al., 2014; Forman und Miller, 2016; Hao et al., 2020). Sowohl die α - als auch die β - und γ -Untereinheiten beeinflussen die Sensitivität. Eine Punktmutation des M286-Restes der β 1-Untereinheit geht mit einer verminderten modulierenden Wirkung einher, die direkte Aktivierung in hohen Konzentrationen bleibt jedoch unbeeinflusst (Krasowski et al., 1998; Hao et al., 2020).

Die Bindung von Inhalationsnarkotika findet hauptsächlich am α +/ β - Interface oder dem β +/ α -Interface statt (Woll et al., 2018), und wird unter anderem durch den α 1S70-Rest der M2-Domäne sowie den α 1A291-Rest der M3-Domäne beeinflusst (Mihic et al., 1997). Eine Mutation des S270-Restes, bei der Serin durch Histidin ausgetauscht wird, führt zu einer reduzierten Sensitivität für Isofluran (Hall et al., 2004; Hao et al., 2020).

5.4 Neurosteroid

Die Neurosteroiden stellen die wichtigsten endogenen Modulatoren von GABAA-Rezeptoren dar (Alvarez und Pecci, 2018). Die Synthese findet ausgehend von Cholesterol in Neuronen und Gliazellen statt, was ihnen den Namen der Neurosteroiden verleiht und sie von den klassischen, aus den Gonaden, der Nebenniere oder der Plazenta stammenden Steroiden unterscheidet (Tateiwa und Evers, 2024). Die Vertreter Allopregnanolon (siehe **Abbildung 11**), Pregnanolon und THDOC sind positiv allosterische Modulatoren am GABAA-Rezeptor, während Isopregnanolon, Pregnenolonsulfat und DHEAS als negativ allosterische Modulatoren wirken (Akk et al., 2007; Pierce et al., 2022; Tateiwa und Evers, 2024).

Nachdem die neuroaktiven Steroide als endogene Modulatoren an der ZNS-Entwicklung und an der Regulation der neuronalen Exzitabilität beteiligt sind, hat sich auch der Einsatz von exogenen Neurosteroiden in der Pharmakotherapie bewährt (Chen et al., 2019). So wirken sie beispielsweise als Antidepressiva, Hypnotika, Anästhetika und Antikonvulsiva (Reddy und Rogawski, 2000; Barbaccia et al., 2005; Kanen et al., 2017).

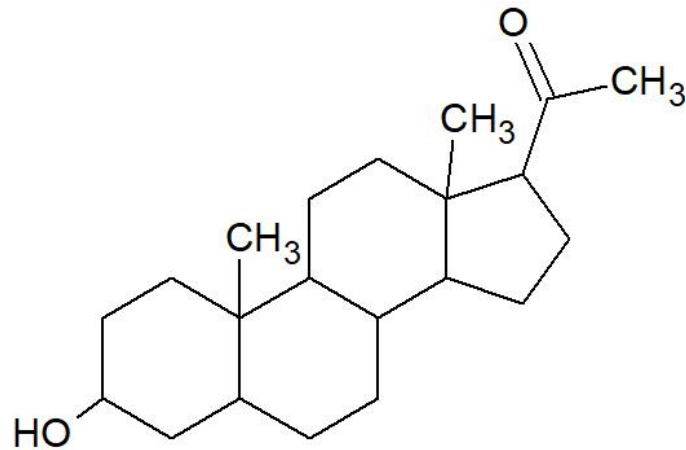


Abbildung 11: Strukturformel von Allopregnanolon

Neurosteroide wie Allopregnanolon können in niedrigen nanomolaren Konzentrationen als positiv allosterische Modulatoren wirken, in höheren mikromolaren Konzentrationen können sie wie die Barbiturate und die Anästhetika eine direkte Aktivierung des Rezeptors ohne Anwesenheit von GABA bewirken (Alvarez und Pecci, 2018; Tateiwa und Evers, 2024).

Die Bindungsstellen der Neurosteroidे am GABAA-Rezeptor befinden sich vermutlich in den TM-Domänen (Hosie et al., 2006; Lavery et al., 2017; Miller et al., 2017; Ziemba et al., 2018). Eine dieser Stellen befindet sich an der β +/ α -Interface – das Neurosteroid positioniert sich dabei mit einer Ausrichtung des A-Rings zum Q241-Rest der α -Untereinheit, während der D-Ring in Richtung des F301-Restes der β -Untereinheit ausgerichtet ist. Eine Mutation, bei der der Glutamin-Rest mit einem Leucin-Rest ausgetauscht wird, führt zu einer wesentlichen Reduktion der durch Allopregnanolon vermittelten Potenzierung (Akk et al., 2008; Germann et al., 2021), da keine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden kann (Lavery et al., 2017; Miller et al., 2017; Tateiwa und Evers, 2024).

Des Weiteren können Neurosteroidе in ein Pocket zwischen den M1- und M4-Domänen der α -Untereinheiten binden. Dabei wird der A-Ring in Richtung des Y415-Restes, und der D-Ring in die Nähe des N407-Restes der α -Untereinheit positioniert. Eine Mutation des Valin-Restes an Position 226 der α 1-Untereinheit zu einem Tryptophan-Rest geht ebenfalls mit einer verminderten Potenzierung durch Allopregnanolon einher (Chen et al., 2019; Germann et al., 2021).

Eine dritte Bindungsstelle konnte außerdem zwischen der M3- und der M4-Domäne der β -Untereinheit gefunden werden. Bindet ein Neurosteroid an diese Stelle, wird der A-Ring in

Richtung des Y443-Restes der M4-Domäne, und der D-Ring in Richtung des G287-Restes der M3-Domäne ausgerichtet (Germann et al., 2021).

Die Neurosteroiden weisen eine geringe Selektivität auf, und können an alle GABAA-Rezeptor-Subtypen binden – auch an jene, die $\alpha 4$ -, $\alpha 6$ - und δ -Untereinheiten beinhalten (Meltzer-Brody und Kanes, 2020; Reddy et al., 2023). Dementsprechend wirken sie sowohl an synaptischen als auch an extrasynaptischen Rezeptoren, was sie zu einem interessanten Ansatz für die Pharmakotherapie macht. Allopregnanolon gehört zu den Vertretern, welche die extrasynaptischen GABAA-Rezeptoren am effektivsten modulieren (Abramian et al., 2014; Meltzer-Brody und Kanes, 2020).

Die extrasynaptische δ -Untereinheit scheint sich sogar positiv auf die Affinität der Neurosteroiden auszuwirken. In einer Studie, die an δ -Knockout-Mäusen durchgeführt wurde, wurde eine wesentliche Reduktion der Potenzierung beobachtet, wodurch die essentielle Rolle der δ -Untereinheit noch einmal unterstrichen wurde (Reddy, 2018; Reddy et al., 2023).

Aufgrund der extrasynaptischen Wirkung und des hohen therapeutischen Index wären die Neurosteroiden auch für den Einsatz als Anästhetika geeignet. Sie führen nur selten zu Atemdepressionen und kardiovaskulären Beschwerden, welche zu den typischen Nebenwirkungen der aktuell eingesetzten intravenösen Anästhetika gehören. Des Weiteren weisen sie eine neuroprotektive und entzündungshemmende Wirkung auf (Tesic et al., 2020; Jolivel et al., 2021; Tateiwa und Evers, 2024). Somit könnte diese Substanzgruppe als ein Ansatz für die Entwicklung neuer Anästhetika dienen.

Des Weiteren wird die Substanz Ganaxolon – ein Derivat von Allopregnanolon, welches eine Methylierung an der 3 β -Position aufweist – in der Therapie der Epilepsie eingesetzt. Das Steroid reduziert hierbei die Häufigkeit der Anfälle, welche an dem seltenen Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)-Mangel-Syndrom erkrankte Patient*Innen erleiden (Knight et al., 2022; Tateiwa und Evers, 2024).

Eine weitere Indikation für den Einsatz exogener Neurosteroiden stellt die Postpartale Depression (PPD) dar, welche mit den klassischen Symptomen einer Major Depression einhergeht und im zeitlichen Kontext zu einer Geburt auftritt. Die Symptomatik kann dabei bis zu vier Wochen nach der Entbindung oder auch schon während der Schwangerschaft einsetzen (Leader et al., 2019; Reddy et al., 2023).

Die Ätiologie der PPD scheint vielseitig zu sein und konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Es wird aber von einer Beteiligung der HPA-Achse ausgegangen, welche bereits in

Kapitel 4.1 erwähnt wurde und durch Stress verstärkt aktiviert wird (Meltzer-Brody und Kanes, 2020). Eine chronische Aktivierung der HPA-Achse kann zu einer PPD führen (Laurent et al., 2018), außerdem sind hormonelle und neuroendokrine Faktoren beteiligt. Auch das GABAA-System scheint in der Pathophysiologie involviert zu sein, indem es zu einer Dysbalance der Neurosteroiden und veränderten Expression der Rezeptor-Untereinheiten kommt (Licheri et al., 2015; Pennell et al., 2015; Meltzer-Brody und Kanes, 2020).

Der positive Effekt von Neurosteroiden im Rahmen der PPD konnte in einer Studie beobachtet werden, welche an genetisch veränderten Mäusen durchgeführt wurde. Hierbei wurden durch Mutationen der Gene, welche für KKC2 sowie für die δ -Untereinheit des GABAA-Rezeptors codieren, PPD-ähnliche Symptome ausgelöst. Die Verabreichung des Neurosteroids SGE-516 brachte hingegen eine Besserung der Symptomatik mit sich (Melón et al., 2018; Meltzer-Brody und Kanes, 2020).

Im Rahmen einer randomisierten, placebo-kontrollierten Phase-3-Studie, welche an Patientinnen mit PPD durchgeführt wurde, konnte die Wirksamkeit von Brexanolon (Zulresso®) bestätigt werden. Dieser Wirkstoff entspricht strukturell Allopregnanolon, und konnte eine signifikante Besserung der Symptome innerhalb von 60 Stunden im Vergleich zum Placebo erzielen (Meltzer-Brody et al., 2018).

6. Fragestellung

Der inhibitorische Neurotransmitter GABA ist durch seine regulatorische Funktion, die er auf das zentrale Nervensystem ausübt, in der Entstehung zahlreicher Erkrankungen wie der Epilepsie oder den Angststörungen beteiligt. Ebenso werden Substanzen, die am GABA-aktivierten Rezeptor angreifen, aufgrund der sedativen, anästhetischen, antikonvulsiven, analgetischen und hypnotischen Eigenschaften für zahlreiche Indikationen eingesetzt. So werden Neurosteroiden zur Behandlung der PPD, Anästhetika wie Etomidat und Propofol zur Narkotisierung, Barbiturate als Antiepileptika, und Benzodiazepine als Anxiolytika und Hypnotika eingesetzt. Trotz des Beitrages, den diese Wirkstoffe im Klinikalltag leisten, sind die negativen Auswirkungen nicht außer Acht zu lassen.

Insbesondere die langfristige Anwendung von Benzodiazepinen geht mit problematischen Nebenwirkungen einher. Nach längerfristiger Einnahme kann es zu einer Verstärkung von Schlaf- und Angststörungen kommen, des Weiteren steigt die Gefahr von Stürzen, kognitiven Beeinträchtigungen und schließlich der Abhängigkeit (Lembke et al., 2018).

Die Anzahl der Erwachsenen Personen, welche in den Vereinigten Staaten ein Rezept für ein Benzodiazepin eingelöst haben, hat sich im Zeitraum von 1996 bis 2013 um 67% erhöht (Bachhuber et al., 2016). Clonazepam, Lorazepam und Alprazolam fallen unter die zehn am häufigsten verschriebenen psychotropen Substanzen, und die Zahl an Todesfällen, welche in Zusammenhang mit einer Überdosis an Benzodiazepinen stehen, ist von 1135 im Jahr 1999 auf 8791 im Jahr 2015 gestiegen (Lembke et al., 2018). Auch in Europa ist der Konsum von Benzodiazepinen weit verbreitet, und scheint hier insbesondere bei älteren Personen ein Problem darzustellen. Im Rahmen einer Studie zwischen 2019 und 2020 waren 15% der untersuchten Personen im Alter von mindestens 65 Jahren Konsumenten von Benzodiazepinen (Lukačišinová et al., 2024).

Ein Lösungsansatz könnte die Entwicklung von Substanzen darstellen, welche selektiv spezifische Subtypen des GABAA-Rezeptors modulieren. So könnten über die spezifischere Bindung gezielt gewünschte pharmakologische Effekte erzielt werden, und dabei Nebenwirkungen wie die Abhängigkeit oder die Sedierung umgangen werden (Rudolph und Knoflach, 2011).

Das Ziel meiner Masterarbeit war es, 4 Substanzen (AWM1, DHHB, THH und HO aus südafrikanischen Wildpflanzen), welche zuvor als GABAA-Rezeptor-Modulatoren identifiziert worden waren (siehe Masterarbeit Katharina Neßmerak, 2024) im Detail zu charakterisieren. Dazu wurden unterschiedliche GABAA-Rezeptor-Subtypen bestehend aus $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 1\beta 1$,

$\alpha 1\beta 2$ bzw. $\alpha 1\beta 3$ UE in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die konzentrationsabhängige Modulation von GABA-induzierten Chloridionen-Strömen (I_{GABA}) mittels 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht. Durch die Wahl der Subtypen sollten erste Einblicke in die Beteiligung potenzieller Bindungstaschen inklusive der Neurosteroid-Stelle am Rezeptor gewonnen werden, welche anschließend pharmakologisch getestet wurden.

7. Material und Methoden

Die Beschreibung der Methoden, welche für die Erhebung der Daten verwendet wurden, wurde unter anderem aus einer früheren Masterarbeit unter Betreuung von Ass. Prof. Dr. Sophia Khom-Steinkellner an der Universität Wien übernommen und an die spezifischen Gegebenheiten meiner Arbeit angepasst (siehe Masterarbeit Sabina Salkic „Neue Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren und ihre potentielle Anwendung in der Alkoholkrankheit“ 2023, <https://theses.univie.ac.at/detail/66771>).

7.1 Injektion der cRNA

Oozyten, welche über das Unternehmen Ecocyte Bioscience (Dortmund) bezogen wurden, wurden in einer Petrischale mit calcium-hältigem ND96-Medium aufbewahrt (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1mM CaCl_2 , 5 mM HEPES; pH = 7,4 mit 1M NaOH eingestellt). Für die Injektion wurden unter dem Binokular geeignete, zweifarbige, runde und intake Oozyten ausgewählt.

Anschließend wurde die cRNA unter RNase-freien Bedingungen vorbereitet. Dazu wurde die cRNA der einzelnen Untereinheiten in einem bestimmten Verhältnis in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert ($\alpha 1\beta 1$ 3:1, $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ 1:1, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ 1:1:10). Daraufhin wurde die cRNA-Mischung vorsichtig gemischt und in eine mit Silikonöl gefüllte Glaskapillare aufgesaugt. Mithilfe eines Nanoject III wurden jeweils 40 bis 60 nl der cRNA in die Oozyten injiziert, wobei man eine geringe Größenzunahme des Oozyten beobachten konnte. Nach erfolgter Injektion wurden die Oozyten in einer Petrischale in ND96 (100 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin supplementiert) für mindestens 24 Stunden inkubiert, was zur Expression der Rezeptoren führte. Die Inkubation erfolgte dabei bei einer Temperatur von 18 Grad. Nach Ablauf der 24 Stunden sowie an jedem weiteren Tag wurden die Oozyten in ein frisches AB-hältiges Medium überführt.

7.2 Herstellung der Messlösungen

Ausgehend von einer 1mM GABA-Lösung, welche täglich durch die Lösung von 5,15 mg GABA in 50 ml ND96 hergestellt wurde, wurden GABA-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M) hergestellt. Unter Verwendung der 1 μ M GABA-Lösung als Zwischenstammlösung wurden Verdünnungen mit den Konzentrationen 0,1 μ M, 0,3 μ M und 0,5 μ M hergestellt. Die Reinstoffe wurden in 100 % DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, wodurch eine 100 mM Stammlösung erhalten wurde. Davon ausgehend wurden täglich durch Verdünnung mit ND96 Zwischenstammlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 μ M, 100 nM) hergestellt, welche kurz vor Applikation zur GABA-Lösung pipettiert wurde.

7.3 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Applikation der Substanzen

Im Rahmen der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik werden die Oozyten in einer modifizierten Perfusionskammer (siehe **Abbildung 12**) positioniert, um die elektrophysiologischen Messungen durchzuführen. Diese Kammer wird durch eine Glasplatte verschlossen, welche mit zwei seitlichen Kanälen für die Mikroelektroden (microelectrode access holes MAH) ausgestattet ist. Die aus Borsilikat-Glas bestehenden Mikroelektroden, welche zuvor mithilfe eines Narashige Glaspullers (npi Electronics, Tamm) gezogen wurden, werden bis zur Hälfte mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Somit wird ein elektrischer Widerstand von etwa 1 M Ω erreicht (Baumgartner et al., 1999). Nachdem eventuell vorhandene Luftblasen aus den Kapillaren entfernt wurden, um einen ungestörten Stromfluss sicher zu stellen, können diese mithilfe des Binokulars vorsichtig über die seitlichen Kanäle in den Oozyten positioniert werden.

Durch die Spannungselektrode (potential electrode) wird das aktuelle Membranpotential des Oozyten gemessen und an einen Amplifier (TurboTec 05X, npI Electronics, Tamm) weitergeleitet. Dieser ermittelt die Differenz zwischen dem gemessenen Potential und dem Sollpotential, welches bei -70 mV liegt. Die Menge an Strom, welcher der gemessenen Differenz entspricht und somit zur Erreichung von -70 mV notwendig ist, wird über die Stromelektrode (current electrode) in den Oozyten geleitet. Die Spannung der Membran wird somit auf einem gewünschten Wert geklemmt, wodurch die Ionenströme gemessen werden können (Bianchi und Driscoll, 2006).

Die zuvor frisch vorbereiteten Messlösungen werden mithilfe eines Pipettierroboters appliziert, wobei die Flüssigkeit in einem Quarztrichter (funnel) gesammelt und anschließend mittels einer Pumpe durch den Trichter in Richtung des Kammerausgangs (chamber outlet) gesaugt

wird. Somit kann eine schnelle Perfusionsrate des Oozyten erreicht werden, welche für die akkurate Untersuchung ligandengesteuerter Ionenkanäle wesentlich ist. Um eine Verunreinigung im Rahmen der darauffolgenden Applikation zu vermeiden, entfernen zwei seitlich am Trichter angebrachte Schläuche (funnel outlets) die sich noch im Behälter befindende Flüssigkeit (Baburin et al., 2006).

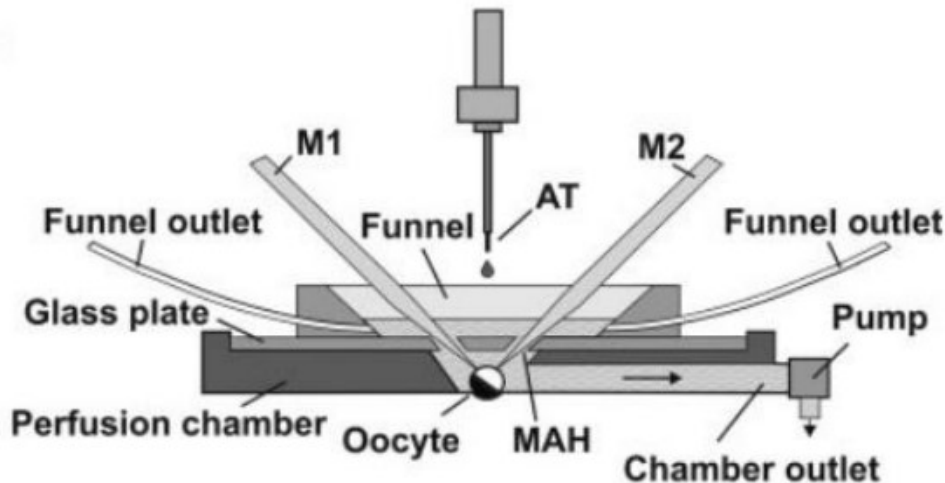


Abbildung 12: Schematischer Aufbau der Perfusionskammer (Khom et al., 2006)

Zu Beginn jedes Experiments wurde die GABA-Lösung in einer Konzentration appliziert, welche in etwa der EC_{10} -Konzentration des jeweiligen Subtyps entspricht. Darauf folgte die Applikation der zu testenden Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen in Kombination mit der GABA-Lösung, was nach anschließender Auswertung die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven ermöglichte. Im Rahmen der Experimente an der Neurosteroid-Bindungsstelle wurde nach Applikation der GABA-Kontrolllösung eine Lösung von Pregnenolonsulfat ($10\ \mu\text{M}$) sowie Pregnenolonsulfat zusammen mit der zu testenden Substanz appliziert.

Die Bedienung des Roboters erfolgte mithilfe der Software Robosoft (RBS). Die GABA-Kontrollströme sowie die durch die Testsubstanzen modulierten Ströme wurden in Clampex 10.7 (Molecular Devices, San Jose) aufgezeichnet und für die anschließende Auswertung gespeichert.

7.4 Auswertung und statistische Analyse

Die Ströme wurden im Anschluss offline in Clampfit 10.7 (Molecular Devices, San Jose) an die Messungen ausgewertet. Dazu wurden die maximalen Amplituden sowohl des GABA-Kontrollstroms als auch der durch die Substanzen modulierten Ströme in Relation zur Basislinie abgemessen und mithilfe des Analyseprogramms Origin 7.0 ausgewertet.

Um das Ausmaß der Modulation durch die Testsubstanzen berechnen zu können, wurden die Messwerte in die Formel $\frac{\text{Modulierter Strom} - \text{Kontrollstrom}}{\text{Kontrollstrom}} \times 100$ eingesetzt.

Für die Auswertung der GABA-Dosis-Wirkungs-Kurven wurde die Formel $\frac{\text{GABA-Strom}}{\text{Maximalstrom GABA}} \times 100$ verwendet.

Anschließend wurden basierend auf den berechneten Werten, welche in Origin 7.0 eingetragen wurden, sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurven mittels Hill-Gleichung erstellt. Für jede Substanz wurde die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}), die maximale Potenzierung (E_{max}), der Hill-Koeffizient (nH), die Anzahl der durchgeführten Experimente (n) sowie der dafür verwendeten Frösche (N) ermittelt.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programmes GraphPad (Version 10). Dabei wurde der *one-way ANOVA* und *Tukey post hoc test* angewandt, um die EC_{50} - und E_{max} -Werte der Subtypen untereinander zu vergleichen. *Per se* Effekte zudem mittels *one-sample t-test* ausgewertet, um die Nullhypothese zu testen. $P < 0.05$ war das Kriterium für statistische Signifikanz. Für die Erstellung der Abbildungen in CorelDraw X5 wurden repräsentative Ströme gefiltert (Lowpass, Bessel (8-Pole)) und aus Clampfit 10.7 exportiert. Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden aus Origin 7.0 exportiert und zu vollständigen Abbildungen in CorelDraw X5 bearbeitet.

8. Ergebnisse

Im Zuge dieser Masterarbeit sollte erstmals die Subtyp-selektive Wirkung der neuen GABAA-Rezeptor-Liganden AWM1, DHHB, THH und HO untersucht werden. Dazu wurden die GABAA-Rezeptor-Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ sowie $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert, und mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik die Modulation von I_{GABA} durch unterschiedliche Konzentrationen der Substanzen untersucht.

8.1 Pharmakologische Charakterisierung der GABAA-Rezeptor-Subtypen

Die Untersuchung potenziell Subtyp-spezifischer Effekte durch die 4 Modulatoren sollte bei einer submaximalen GABA-Konzentration durchgeführt (EC_{10} = jene Konzentration, die 10% des maximalen GABA-induzierbaren Stroms auslöst) werden. Daher wurden im Vorfeld an allen 4 Subtypen ansteigende GABA-Konzentrationen appliziert und mittels Hill-Funktion wurden Konzentrationswirkungskurven erstellt, von denen EC_{50} bzw. EC_{10} abgeleitet werden konnten (siehe **Abbildung 13, Tabelle 3**). Der *one-way ANOVA* zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den EC_{50} -Werten ($F(3,16) = 22.92$, $P < 0.0001$), welche zwischen $1.2 \pm 0.8 \mu M$ ($\alpha 1\beta 3$, $n=5$) und $38.7 \pm 9.2 \mu M$ ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $n=4$) lagen. GABA- EC_{50} Werte unterschieden sich nicht zwischen den sogenannten binären $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 1\beta 2$ - oder $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren (*Post hoc Tukey Test*), jedoch kam es durch Inkorporation der $\gamma 2$ -Untereinheit zu einer signifikanten Verringerung der GABA-Potenz der $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ im Vergleich zu den binären Rezeptoren (siehe auch **Tabellen 3 und 4** für den Vergleich).

	EC50	n/N	n-RANGE
$\alpha 1\beta 1$	1.9 ± 0.2	5/3	4-5
$\alpha 1\beta 2$	1.4 ± 0.3	6/2	4-7
$\alpha 1\beta 3$	1.2 ± 0.8	5/3	5-5
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	38.7 ± 9.2	4/3	4-4

Tabelle 3: Gezeigt sind die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) in μM , die durchschnittliche Anzahl der Experimente (n), die Anzahl der verwendeten Frösche (N) sowie die Spannweite der Anzahl an Experimenten (n-RANGE). Die Werte wurden durch die Applikation von GABA in unterschiedlichen Konzentrationen an den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ermittelt.

	EC50
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2$	ns ($P = 0.9998$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P = 0.9990$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	**** ($P < 0.0001$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P > 0.9999$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	**** ($P < 0.0001$)
$\alpha 1\beta 3$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	**** ($P < 0.0001$)

Tabelle 4: Vergleich der EC₅₀-Werte von GABA zwischen den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Die Auswertung erfolgte mittels *one-way ANOVA* und *Post hoc Tukey Test* (ns = nicht signifikant, P = P -Wert, **** = $P < 0.0001$).

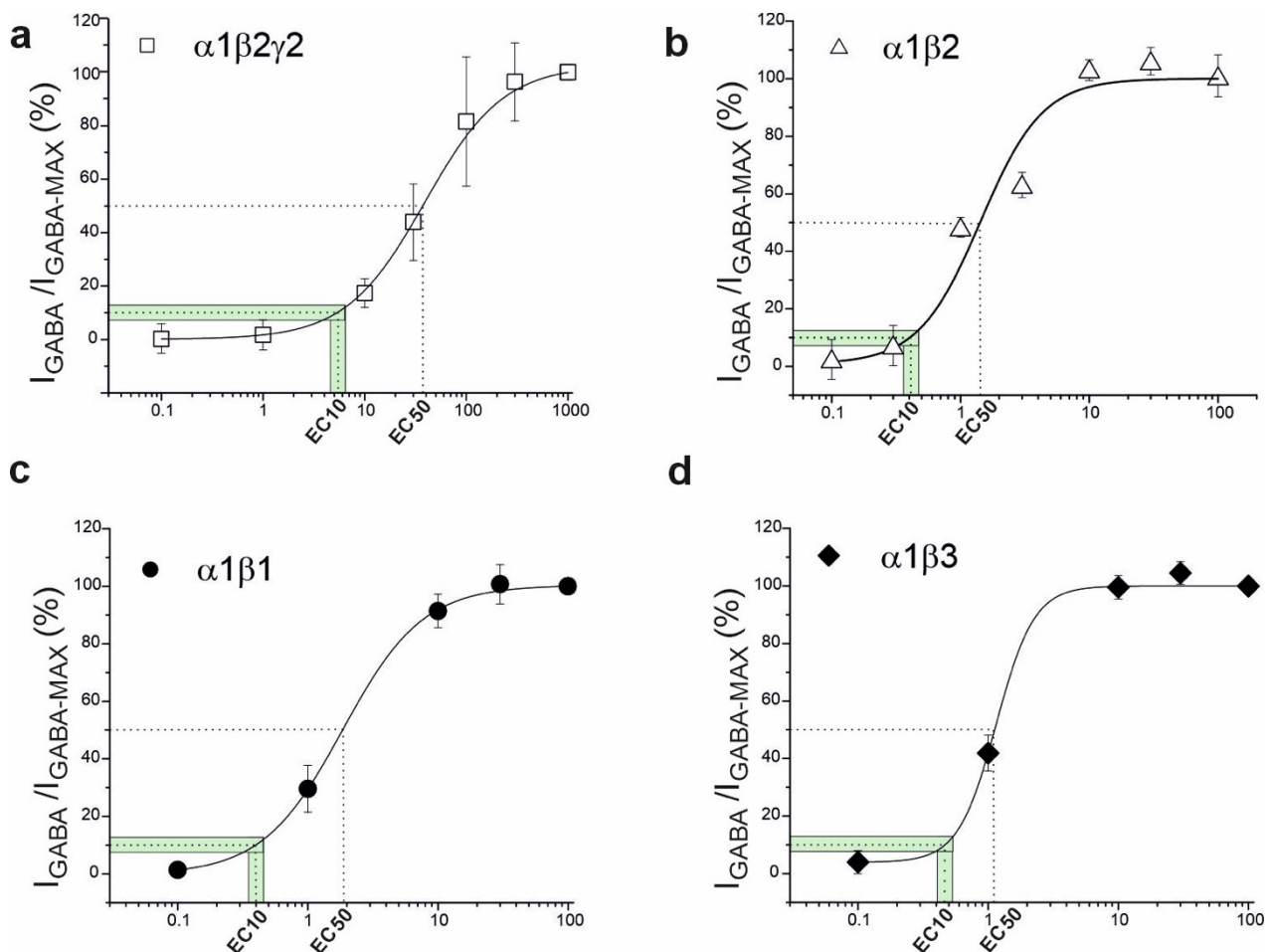


Abbildung 13: GABA-Dosiswirkungskurven an (a) $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, (b) $\alpha 1\beta 2$, (c) $\alpha 1\beta 1$ und (d) $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Gezeigt sind die GABA-Konzentrationen (μM) auf der x-Achse sowie die $I_{\text{GABA}}/I_{\text{GABA-MAX}}$ -Werte (%) auf der y-Achse. Die EC₁₀-Werte und EC₅₀-Werte sind durch die strichlierten Linien indiziert. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens vier Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

8.2 AWM1

Applikation von AWM1 führte bei allen Subtypen zu einer konzentrationsabhängigen, positiven Modulation von I_{GABA} sowie zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf mit Sättigung in Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ (siehe **Abbildungen 14 und 15, Tabelle 5**). Der *one-way ANOVA* ($F(3,23) = 14.79$, $P < 0.0001$) zeigte signifikant unterschiedliche maximale Effekte von AWM1 an den unterschiedlichen Subtypen und mittels *Post hoc Tukey Test* konnte gezeigt werden, dass der maximale Effekt von AWM1 an $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren ($842 \pm 17\%$) signifikant niedriger als jener an $\alpha 1\beta 2$ - ($5911 \pm 1437 \%$) bzw. $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren ($4920 \pm 580 \%$) war. Ebenso war die Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha 1\beta 2$ - sowie $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren signifikant stärker ausgeprägt als an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ - Rezeptoren ($871 \pm 179 \%$). Die maximale Wirkung an $\alpha 1\beta 2$ - bzw. $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren dagegen war vergleichbar (**Tabelle 6**). Die EC_{50} -Werte unterschieden sich zwischen den Subtypen nicht signifikant, und lagen zwischen $1.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ($\alpha 1\beta 3$) und $3.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ($\alpha 1\beta 1$, siehe **Tabelle 6**).

	EC_{50}	E_{max}	nH	n/N	n-RANGE
$\alpha 1\beta 1$	3.1 ± 0.2	842 ± 17	1.0 ± 0.0	8/3	5-9
$\alpha 1\beta 2$	1.5 ± 0.6	5911 ± 1437	1.2 ± 0.2	6/3	5-7
$\alpha 1\beta 3$	1.0 ± 0.4	4920 ± 580	1.3 ± 0.6	6/3	5-10
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	2.7 ± 1.8	871 ± 179	1.3 ± 0.6	7/3	5-10

Tabelle 5: Gezeigt sind die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) in μM , die maximale Potenzierung (E_{max}) in %, der Hill-Koeffizient (nH), die durchschnittliche Anzahl der Experimente (n), die Anzahl der verwendeten Frösche (N) sowie die Spannweite der Anzahl an Experimenten (n-RANGE). Die Werte wurden durch die Applikation von AWM1 in unterschiedlichen Konzentrationen an den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ermittelt.

	EC_{50}	E_{max}
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2$	ns ($P = 0.6661$)	*** ($P = 0.0001$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P = 0.4519$)	** ($P = 0.0017$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.9905$)	ns ($P > 0.9999$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P = 0.9867$)	ns ($P = 0.7726$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.8379$)	*** ($P = 0.0002$)
$\alpha 1\beta 3$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.6444$)	** ($P = 0.0025$)

Tabelle 6: Vergleich der EC_{50} - und E_{max} -Werte von AWM1 zwischen den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Die Auswertung erfolgte mittels *one-way ANOVA* und *Post hoc Tukey Test* (ns = nicht signifikant, $P = P$ -Wert, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$).

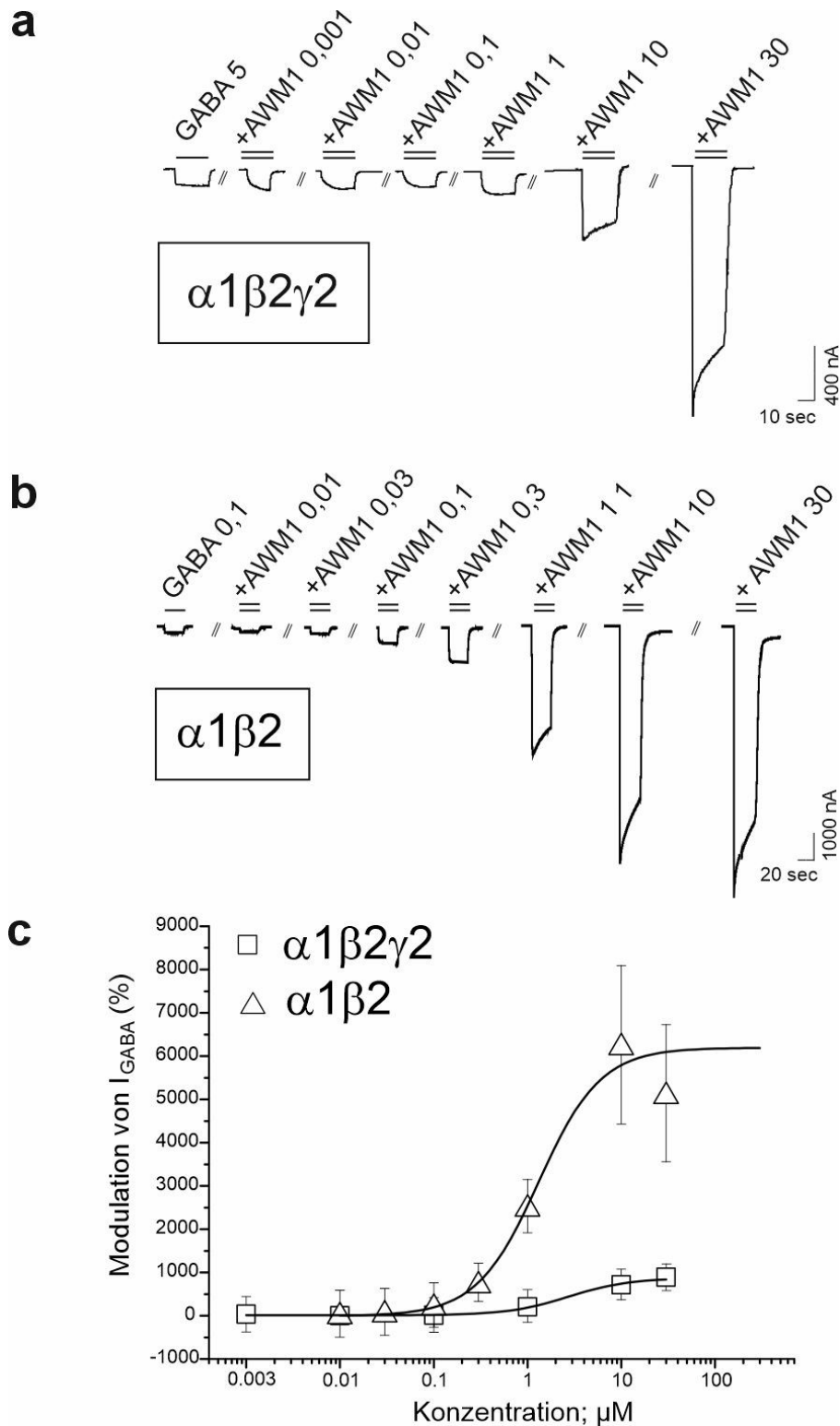


Abbildung 14: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ und **(b)** $\alpha 1 \beta 2$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch AWM1 in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von AWM1 an $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ und $\alpha 1 \beta 2$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

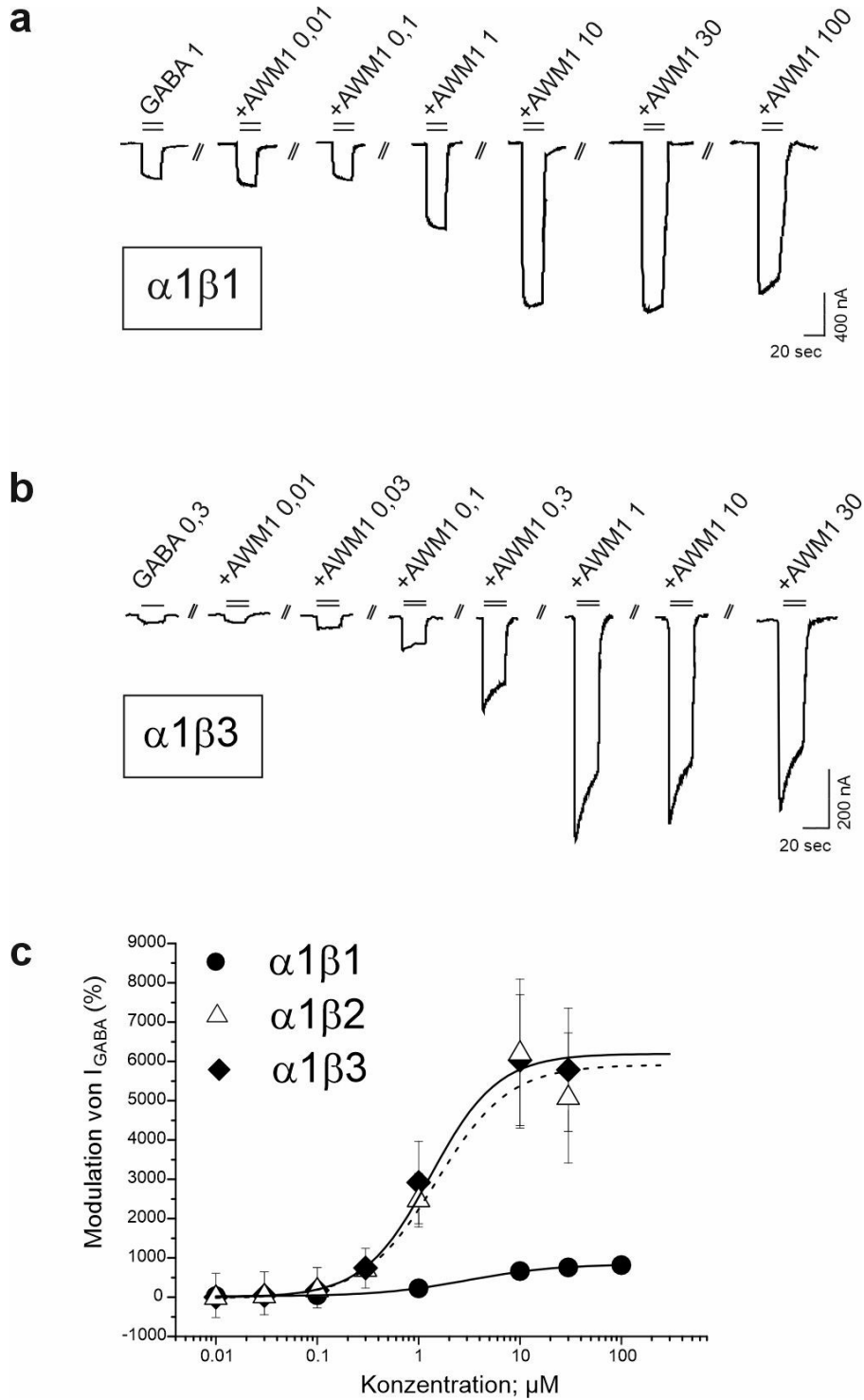


Abbildung 15: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1\beta 1$ und **(b)** $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch AWM1 in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von AWM1 an $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

8.3 DHHB

Ähnlich führte auch die Applikation von DHHB bei allen Subtypen zu einer konzentrationsabhängigen, positiven Modulation von I_{GABA} sowie zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf mit Sättigung in hohen Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{M}$ (siehe **Abbildungen 16 und 17, Tabelle 7**). Auch hier zeigte der *one-way ANOVA* ($F(3,21) = 16.21$, $P < 0.0001$) signifikant unterschiedliche maximale Effekte von DHHB an den unterschiedlichen Subtypen und mittels *Post hoc Tukey Test* konnte gezeigt werden, dass der maximale Effekt von DHHB an $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren ($3244 \pm 634 \%$) signifikant höher als jener an $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren ($301 \pm 34 \%$) war. Ebenso war die Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha 1\beta 2$ -Rezeptoren ($2833 \pm 263 \%$) signifikant stärker ausgeprägt als an $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren. Die maximale Wirkung von DHHB an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren ($1280 \pm 207\%$) war schwächer ausgeprägt als jene an $\alpha 1\beta 2$ - und $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren. Die EC_{50} -Werte hingegen unterscheiden sich zwischen den Subtypen nicht signifikant, und lagen zwischen $15.0 \pm 5.0 \mu\text{M}$ ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$) und $27.2 \pm 8.3 \mu\text{M}$ ($\alpha 1\beta 2$, siehe **Tabelle 8**).

	EC_{50}	$E_{\max}$	nH	n/N	n-RANGE
$\alpha 1\beta 1$	16.0 ± 4.0	301 ± 34	2.0 ± 0.8	7/3	5-8
$\alpha 1\beta 2$	27.2 ± 8.3	2833 ± 263	2.7 ± 1.0	7/3	7-7
$\alpha 1\beta 3$	22.9 ± 4.6	3244 ± 634	2.5 ± 0.4	6/3	6-6
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	15.0 ± 5.0	1280 ± 207	1.6 ± 0.6	5/2	4-5

Tabelle 7: Gezeigt sind die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) in μM , die maximale Potenzierung ($E_{\max}$) in%, der Hill-Koeffizient (nH), die durchschnittliche Anzahl der Experimente (n), die Anzahl der verwendeten Frösche (N) sowie die Spannweite der Anzahl an Experimenten (n-RANGE). Die Werte wurden durch die Applikation von DHHB in unterschiedlichen Konzentrationen an den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ermittelt.

	EC_{50}	$E_{\max}$
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2$	ns ($P = 0.5128$)	*** ($P = 0.0001$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P = 0.8401$)	**** ($P < 0.0001$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.9994$)	ns ($P = 0.2488$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P = 0.9542$)	ns ($P = 0.8301$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.5175$)	* ($P = 0.0286$)
$\alpha 1\beta 3$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.8191$)	** ($P = 0.0063$)

Tabelle 8: Vergleich der EC_{50} - und E_{max} -Werte von DHHB zwischen den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Die Auswertung erfolgte mittels *one-way ANOVA* und *Post hoc Tukey Test* (ns = nicht signifikant, $P = P$ -Wert, * = $P < 0.5$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$, **** = $P < 0.0001$).

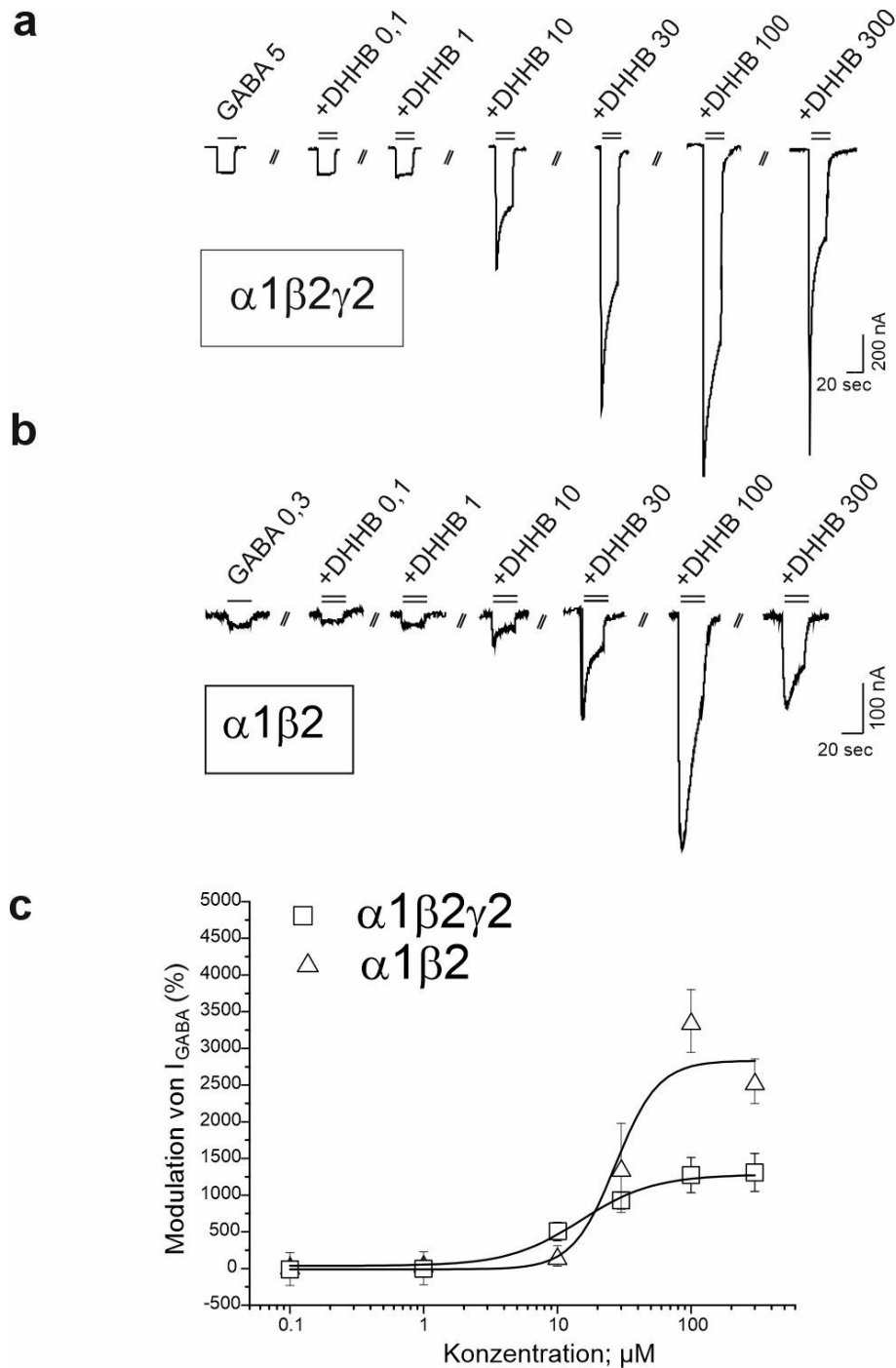


Abbildung 16: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und **(b)** $\alpha 1\beta 2$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch DHHB in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von DHHB an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 1\beta 2$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens vier Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

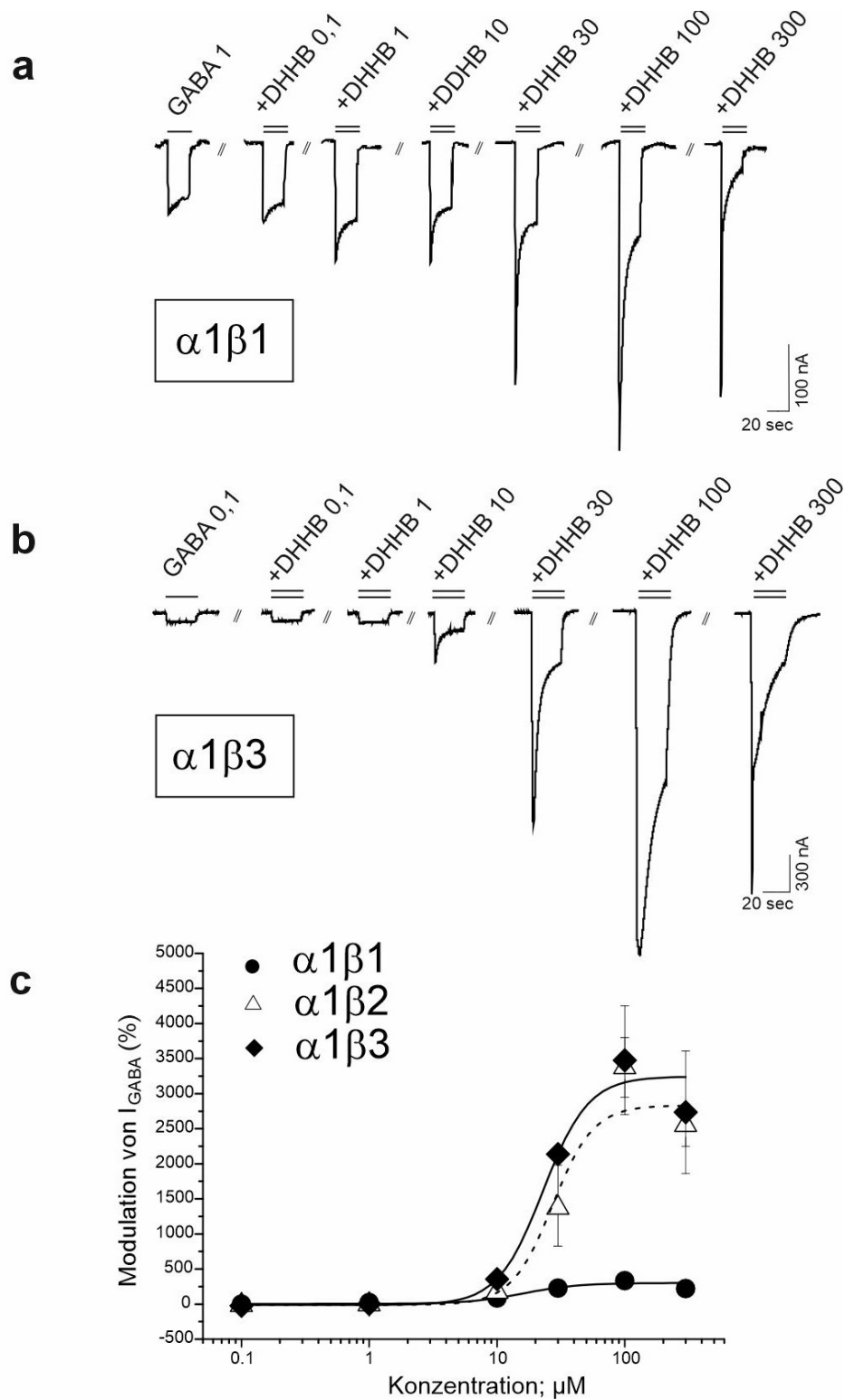


Abbildung 17: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1\beta 1$ und **(b)** $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch DHHB in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von DHHB an $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens vier Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

8.4 THH

Die Applikation von THH führte bei allen Subtypen zu einer konzentrationsabhängigen, positiven Modulation von I_{GABA} sowie zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf mit Sättigung ab Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{M}$ (siehe **Abbildungen 18** und **19**, **Tabelle 9**). Der *one-way ANOVA* ($F(3,25) = 7.076$, $P = 0.0013$) zeigte signifikant unterschiedliche maximale Effekte von THH an den unterschiedlichen Subtypen und mittels *Post hoc Tukey* Test konnte gezeigt werden, dass der maximale Effekt von THH an $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren ($3310 \pm 797 \%$) signifikant höher als jener an $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren ($363 \pm 169 \%$) war. Die Potenzierung an $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren übertraf auch jene an $\alpha 1\beta 2$ -Rezeptoren ($1576 \pm 309 \%$, **Tabellen 9** und **10**). Die EC_{50} -Werte hingegen unterscheiden sich zwischen den Subtypen nicht signifikant, und lagen zwischen 23.9 ± 6.9 ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$) und $50.8 \pm 18.7 \mu\text{M}$ ($\alpha 1\beta 3$, **Tabelle 10**).

	EC_{50}	$E_{\max}$	nH	n/N	n-RANGE
$\alpha 1\beta 1$	37.5 ± 34.9	363 ± 169	1.2 ± 0.8	7/3	5-8
$\alpha 1\beta 2$	35.5 ± 9.3	1576 ± 309	2.1 ± 0.3	8/4	8-9
$\alpha 1\beta 3$	50.8 ± 18.7	3310 ± 797	2.2 ± 0.6	7/2	7-7
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	23.9 ± 6.9	1692 ± 267	1.8 ± 0.4	7/4	6-8

Tabelle 9: Gezeigt sind die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) in μM , die maximale Potenzierung ($E_{\max}$) in%, der Hill-Koeffizient (nH), die durchschnittliche Anzahl der Experimente (n), die Anzahl der verwendeten Frösche (N) sowie die Spannweite der Anzahl an Experimenten (n-RANGE). Die Werte wurden durch die Applikation von THH in unterschiedlichen Konzentrationen an den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ermittelt.

	EC_{50}	$E_{\max}$
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2$	ns ($P = 0.9999$)	ns ($P = 0.2347$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P = 0.9667$)	*** ($P = 0.0006$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.9646$)	ns ($P = 0.1919$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P = 0.9462$)	* ($P = 0.0466$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.9753$)	ns ($P = 0.9976$)
$\alpha 1\beta 3$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P = 0.7874$)	ns ($P = 0.0819$)

Tabelle 10: Vergleich der EC_{50} - und $E_{\max}$ -Werte von THH zwischen den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Die Auswertung erfolgte mittels *one-way ANOVA* und *Post hoc Tukey* Test (ns = nicht signifikant, $P = P$ -Wert, * = $P < 0.5$, *** = $P < 0.001$).

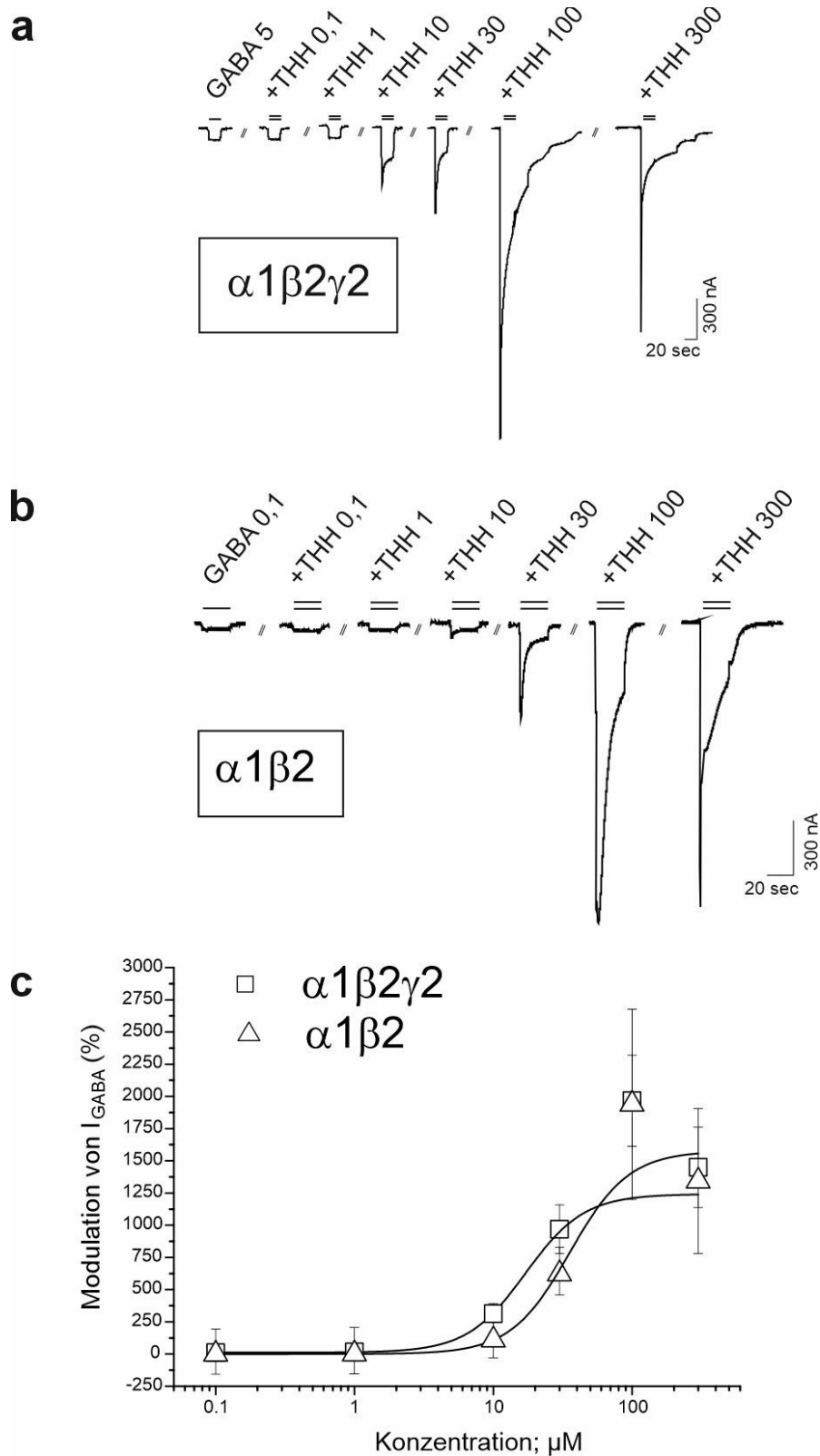


Abbildung 18: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und **(b)** $\alpha 1\beta 2$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch THH in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von THH an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 1\beta 2$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

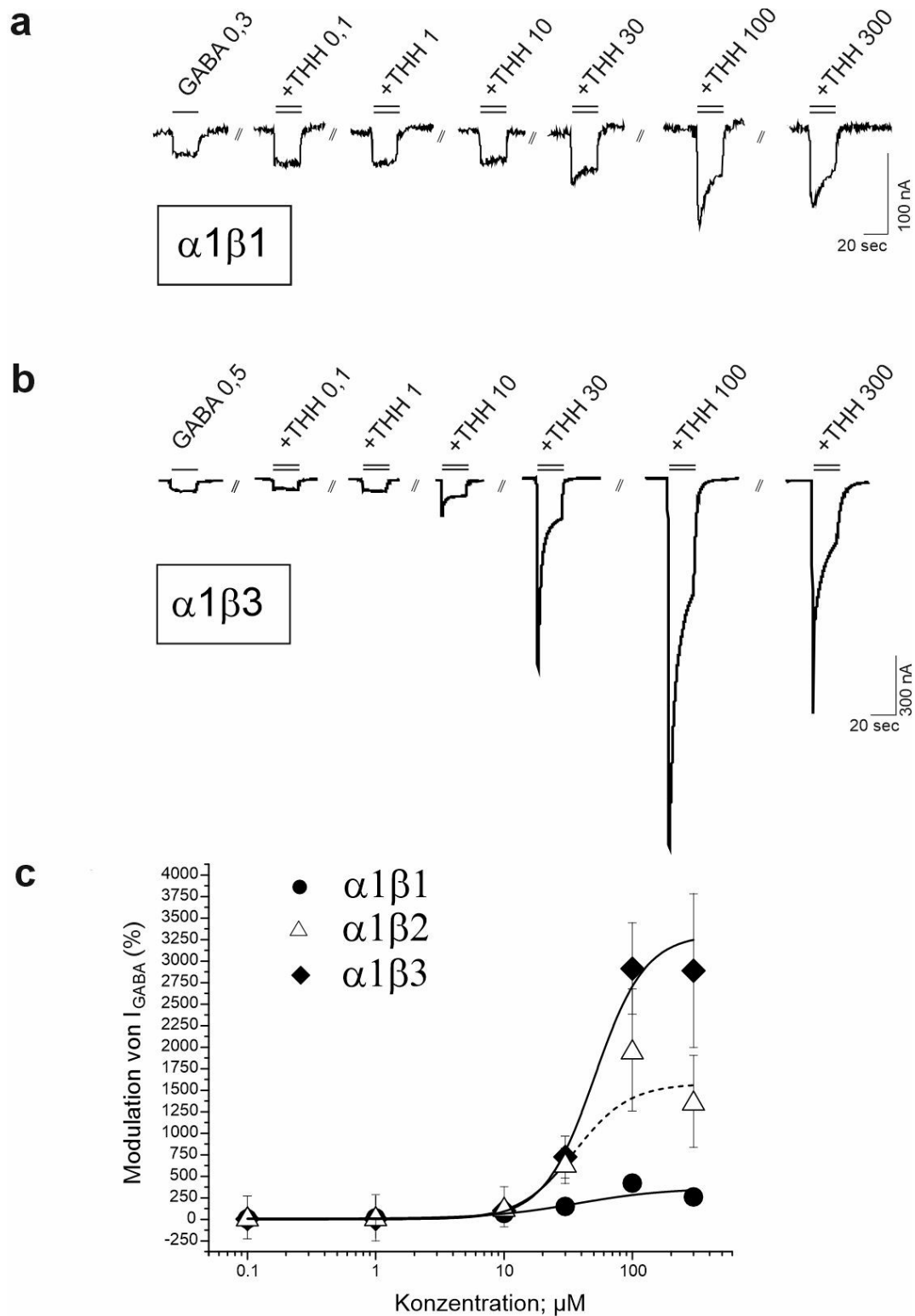


Abbildung 19: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1\beta 1$ und **(b)** $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch THH in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von THH an $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

8.5 HO

Die Applikation von HO führte auch bei allen Subtypen zu einer konzentrationsabhängigen, positiven Modulation von I_{GABA} sowie zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf mit Sättigungseffekt in hohen Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{M}$ (siehe **Abbildungen 20 und 21, Tabelle 11**). Der *one-way ANOVA* ($F(3,19) = 7.587$, $P = 0.0016$) zeigte signifikant unterschiedliche maximale Effekte von HO an den unterschiedlichen Subtypen und mittels *Post hoc Tukey Test* konnte gezeigt werden, dass der Maximaleffekt von HO an $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren ($2436 \pm 515 \%$) signifikant höher als jener an $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren ($104 \pm 30\%$) war (siehe auch **Tabellen 11 und 12**). Die Potenzierung von I_{GABA} an $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren war außerdem signifikant niedriger als jene an $\alpha 1\beta 2$ -Rezeptoren ($1564 \pm 397 \%$) sowie an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren ($1464 \pm 195 \%$). Die EC_{50} -Werte hingegen unterscheiden sich zwischen den Subtypen nicht signifikant, und lagen zwischen $27.6 \pm 14.9 \mu\text{M}$ ($\alpha 1\beta 1$) und $68.9 \pm 16.2 \mu\text{M}$ ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$, **Tabelle 12**).

	EC_{50}	$E_{\max}$	nH	n/N	n-RANGE
$\alpha 1\beta 1$	27.6 ± 14.9	104 ± 30	1.8 ± 1.8	5/3	5-5
$\alpha 1\beta 2$	63.6 ± 18.3	1564 ± 397	1.4 ± 0.3	6/6	5-7
$\alpha 1\beta 3$	40.5 ± 15.8	2436 ± 515	2.2 ± 0.6	5/3	5-5
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	68.9 ± 16.2	1464 ± 195	2.0 ± 0.4	7/2	5-7

Tabelle 11: Gezeigt sind die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) in μM , die maximale Potenzierung ($E_{\max}$) in%, der Hill-Koeffizient (nH), die durchschnittliche Anzahl der Experimente (n), die Anzahl der verwendeten Frösche (N) sowie die Spannweite der Anzahl an Experimenten (n-RANGE). Die Werte wurden durch die Applikation von HO in unterschiedlichen Konzentrationen an den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ermittelt.

	EC_{50}	$E_{\max}$
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2$	ns ($P=0.4661$)	* ($P = 0.0288$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P=0.9559$)	*** ($P = 0.0008$)
$\alpha 1\beta 1$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P=0.3220$)	* ($P = 0.0365$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 3$	ns ($P=0.7775$)	ns ($P = 0.2866$)
$\alpha 1\beta 2$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P=0.9951$)	ns ($P = 0.9956$)
$\alpha 1\beta 3$ vs. $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ns ($P=0.6279$)	ns ($P = 0.1825$)

Tabelle 12: Vergleich der EC_{50} - und $E_{\max}$ -Werte von HO zwischen den Subtypen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 3$ und $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Die Auswertung erfolgte mittels *one-way ANOVA* und *Post hoc Tukey Test* (ns = nicht signifikant, $P = P\text{-Wert}$, * = $P < 0.05$, *** = $P < 0.001$).

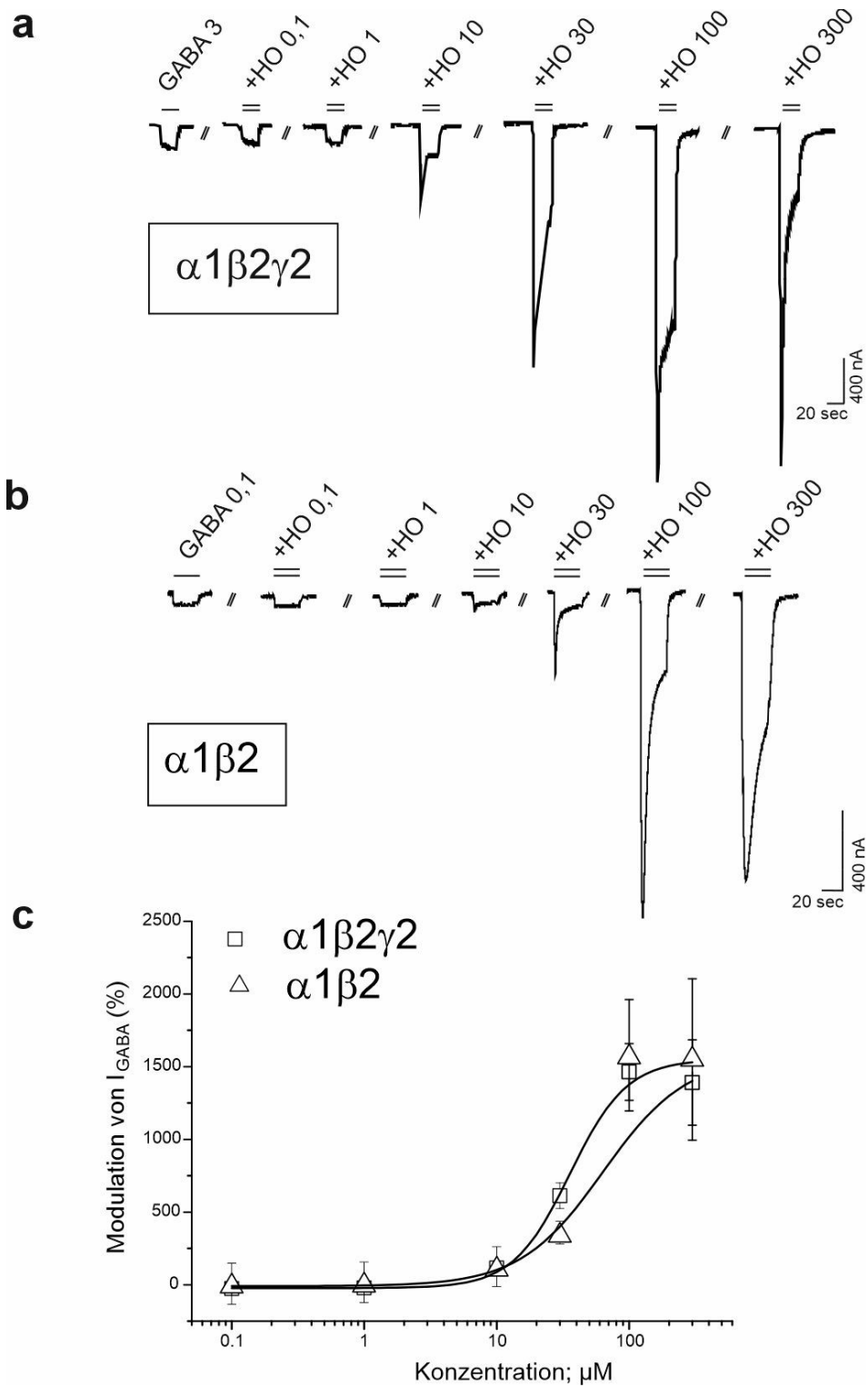


Abbildung 20: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und **(b)** $\alpha 1\beta 2$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch HO in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von HO an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 1\beta 2$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

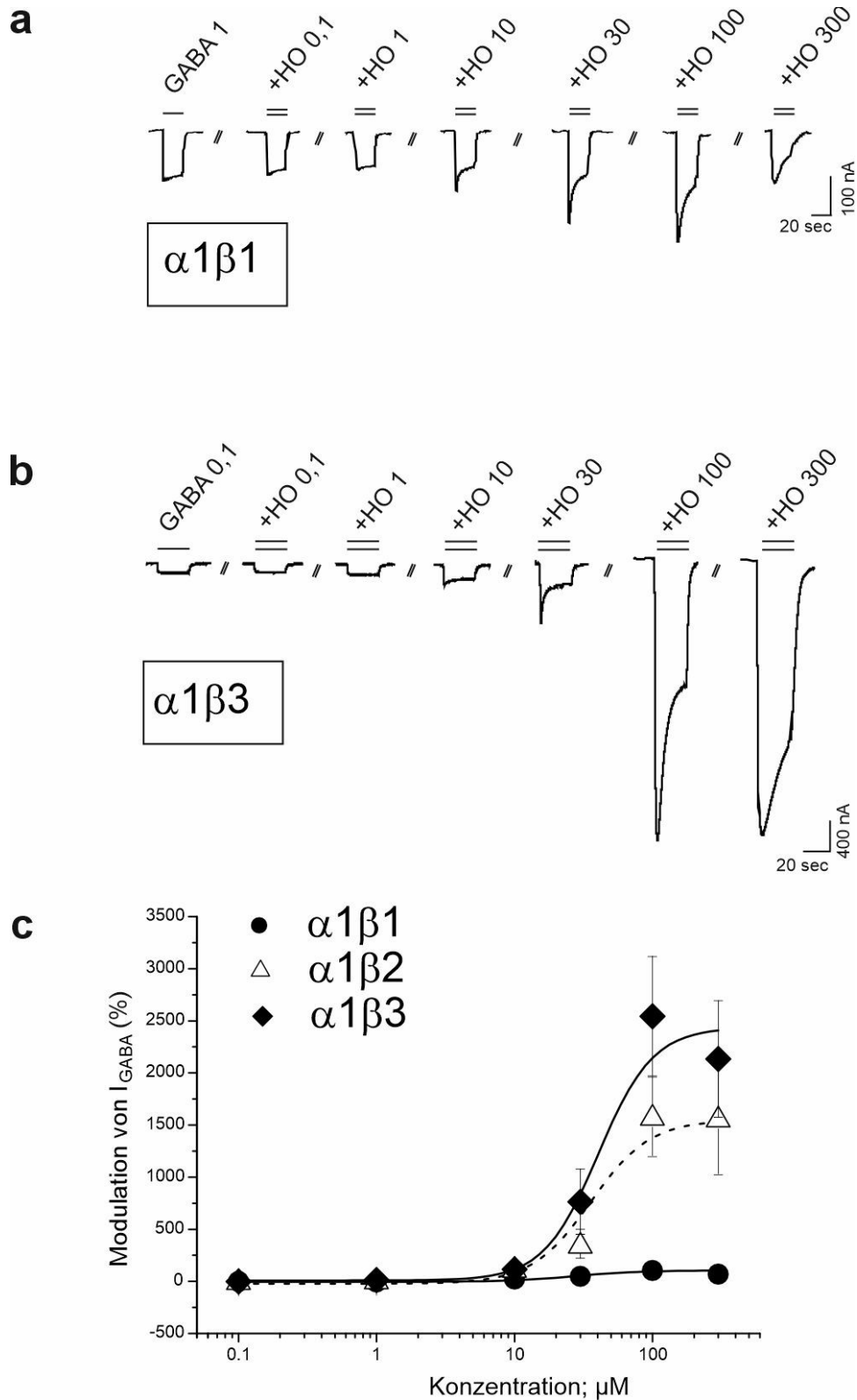


Abbildung 21: Repräsentative Experimente an **(a)** $\alpha 1\beta 1$ und **(b)** $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Dargestellt sind die GABA-Kontrollströme links sowie die Modulation von I_{GABA} durch HO in unterschiedlichen Konzentrationen (μM). **(c)** zeigt die Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungskurven von HO an $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ Rezeptoren. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten.

8.6 Untersuchung einer potenziellen Interaktion der neuen Liganden mit der Neurosteroid-Bindungsstelle

Die vorliegende Subtyp-Selektivität und die Tatsache, dass die maximalen Effekte der Substanzen an binäre Rezeptoren sogar meist signifikant stärker waren als an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ Rezeptoren, zeigt, dass die Wirkung der hier charakterisierten Substanzen nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt wird, nachdem sich diese am $\alpha(+)/\gamma(-)$ Interface befindet. Daher wurde im nächsten Schritt die potenzielle Interaktion der Liganden mit der Neurosteroid-Bindungsstelle wie in Kapitel 7.3 beschrieben untersucht. Dazu wurde die Modulation von I_{GABA} durch die 4 Liganden in einer Konzentration nahe der jeweiligen EC50 an $\alpha 1\beta 2$ -Rezeptoren in Abwesenheit und Anwesenheit von Pregnenolonsulfat (10 μ M) gemessen und Effekte der Substanzen miteinander verglichen.

Wie in **Abbildung 22(b)** dargestellt, wurde mittels *one-sample t-test* eine statistisch signifikante positive Modulation für AWM1 mit Pregnenolonsulfat ($1391.0 \pm 442.6 \%$, $t = 3.143$; $df = 5$; $P = 0.0256$) und für AWM1 ($2468.0 \pm 678.9 \%$, $t = 3.653$; $df = 5$; $P = 0.0150$) festgestellt. Pregnenolonsulfat selbst hatte hierbei einen geringen, jedoch statistisch signifikanten negativ modulatorischen Effekt ($-25.4 \pm 9.2 \%$, $t = 2.759$; $df = 5$; $P = 0.0399$), der sich noch im Bereich der biologischen Variabilität befand (Khom et al., 2007; Hintersteiner et al., 2014; Stadler et al., 2019).

Der *one-way ANOVA* ($F(2, 15) = 7.140$, $P = 0.0066$) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Effekten. Der *Post hoc Tukey* Test zeigte, dass sich die Effekte von Pregnenolonsulfat und AWM1 signifikant unterscheiden ($P = 0.0050$), jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Effekten von Pregnenolonsulfat und Pregnenolonsulfat + AWM1 festgestellt werden konnte ($P = 0.1150$), und die I_{GABA} Modulation durch AWM1 durch die Anwesenheit von Pregnenolonsulfat nicht signifikant reduziert wurde ($P = 0.2653$) (siehe **Abbildung 22(a)**). Dies weist daraufhin, dass AWM1 nicht mit der Neurosteroid-Bindungsstelle interagiert.

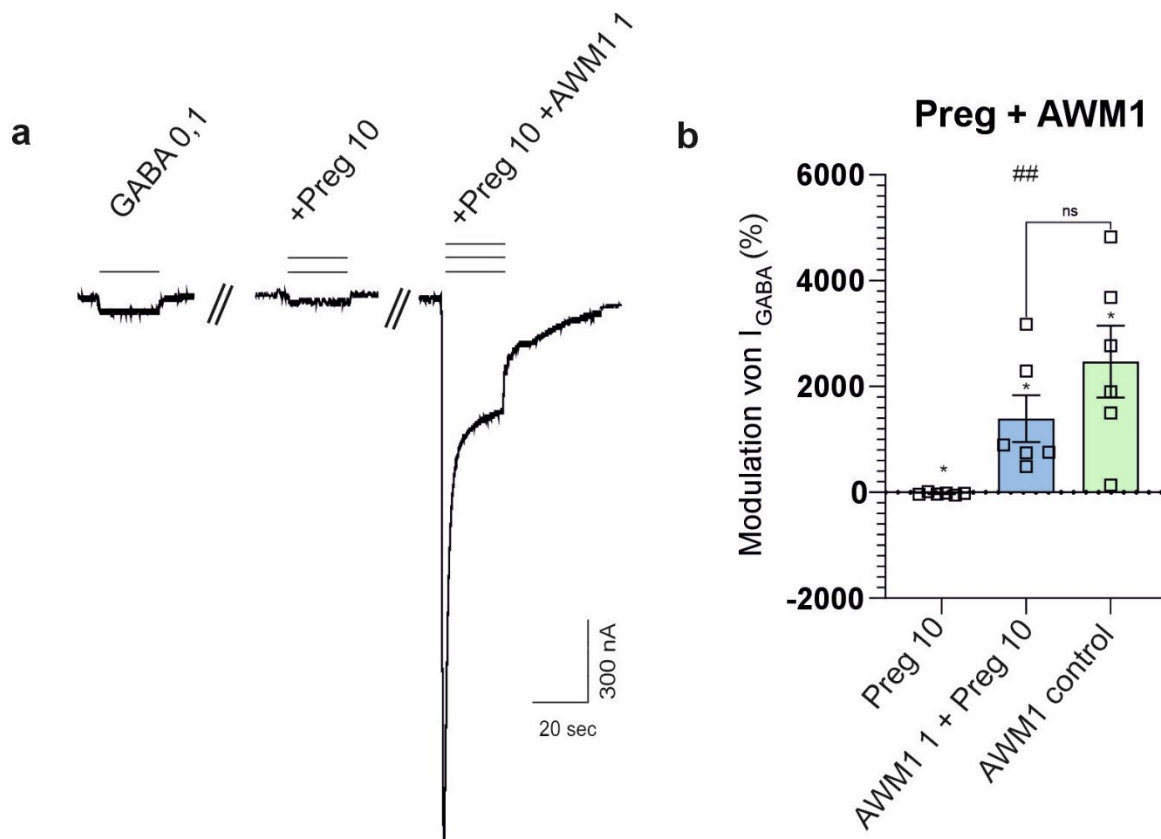


Abbildung 22 (a) zeigt ein repräsentatives Experiment bestehend aus dem GABA-Kontrollstrom (0,1 μ M), dem Strom durch GABA und Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie dem modulierten Strom durch die Co-Applikation von GABA mit Pregnenolonsulfat und AWM1 (1 μ M). **(b)** Im Balkendiagramm ist die Modulation von I_{GABA} durch Pregnenolonsulfat (10 μ M), AWM1 (1 μ M) mit Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie durch AWM1 (1 μ M) allein dargestellt. Dazu wurden die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten verwendet. Die Nullhypothese wurde mittels *one-sample t-test* (*-Symbole) getestet. Der Unterschied zwischen den Werten wurde mittels *one-way ANOVA* (#-Symbole) und *Post hoc Tukey Test* berechnet (ns = nicht signifikant, * = $P < 0.5$, ## = $P < 0.01$).

Ähnlich wie für AWM1 konnte auch für DHHB gezeigt werden, dass die Modulation von I_{GABA} durch die Co-Applikation mit Pregnenolonsulfat (siehe auch **Abbildung 23 (a)**) nicht gehemmt werden kann. Der *one-way ANOVA* ($F(2,23) = 5.176$, $P = 0.0139$) wies auf eine unterschiedliche Modulation von I_{GABA} durch die Substanzen bzw. Substanzkombination hin; mittels *Tukey post hoc Test* konnte gezeigt werden, dass die Modulation von I_{GABA} durch Pregnenolonsulfat ($-19.0 \pm 5.7\%$, $t = 3.312$; $df = 6$; $P = 0.0162$) sich vom DHHB *per se* Effekt ($854.7 \pm 230.5\%$, $t = 3.708$; $df = 11$; $P = 0.0035$) signifikant unterschied ($P = 0.0104$), jedoch konnte kein signifikanter Unterschied ($P = 0.1503$) zum Effekt der Kombination DHHB + Pregnenolonsulfat ($573.7 \pm 109.4\%$, $t = 5.245$; $df = 6$; $P = 0.0019$) festgestellt werden. Der Effekt von DHHB in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat unterschied sich nicht signifikant ($P = 0.5640$) vom *per se* Effekt von DHHB auf I_{GABA} (siehe **Abbildung 23 (b)**).

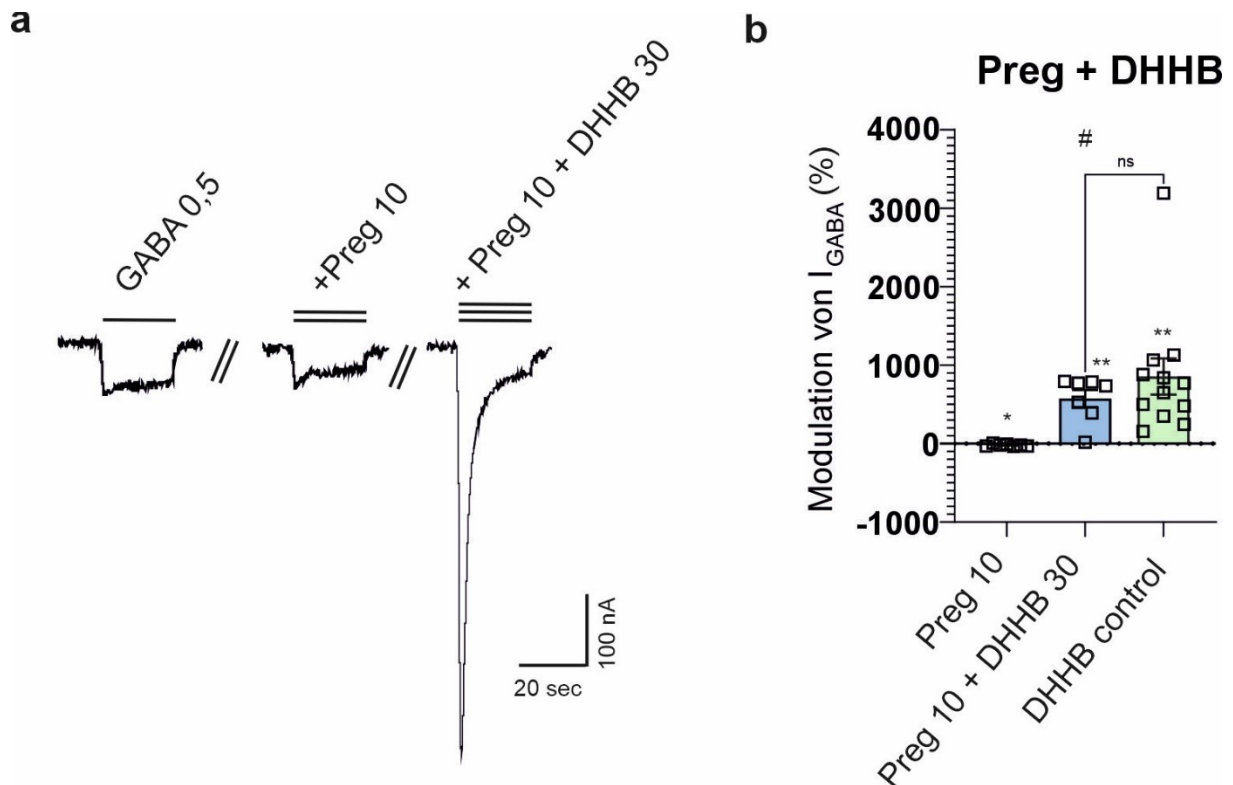


Abbildung 23 (a) zeigt ein repräsentatives Experiment bestehend aus dem GABA-Kontrollstrom (0,1 μ M), dem Strom durch GABA und Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie dem modulierten Strom durch die Co-Applikation von GABA mit Pregnenolonsulfat und DHHB (30 μ M). **(b)** Im Balkendiagramm ist die Modulation von I_{GABA} durch Pregnenolonsulfat (10 μ M), DHHB (30 μ M) mit Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie durch DHHB (30 μ M) allein dargestellt. Dazu wurden die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten verwendet. Die Nullhypothese wurde mittels *one-sample t-test* (*-Symbole) getestet. Der Unterschied zwischen den Werten wurde mittels *one-way ANOVA* (#-Symbole) und *Post hoc Tukey Test* berechnet (ns = nicht signifikant, * = $P < 0.5$, ** < 0.01, # = $P < 0.5$).

Der *one-sample t-test* zeigte auch eine signifikante positive Modulation durch THH in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat (393.4 ± 138.9 %, $t = 2.832$; $df = 4$; $P = 0.0472$, siehe **Abbildung 24(a)**). Die Applikation von Pregnenolonsulfat führte hier zu keinem signifikanten Effekt auf I_{GABA} (-10.0 ± 20.5 %, $t = 0.4865$; $df = 4$; $P = 0.6520$). Für dieses Experiment konnte der *one-way ANOVA* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Substanzen bzw. Substanzkombinationen ermitteln ($F(2,15) = 3.362$, $P = 0.0622$, siehe **Abbildung 24(b)**). Das weist daraufhin, dass die Effekte von THH möglicherweise zum Teil auch über die Neurosteroid-Bindungsstelle mediiert werden.

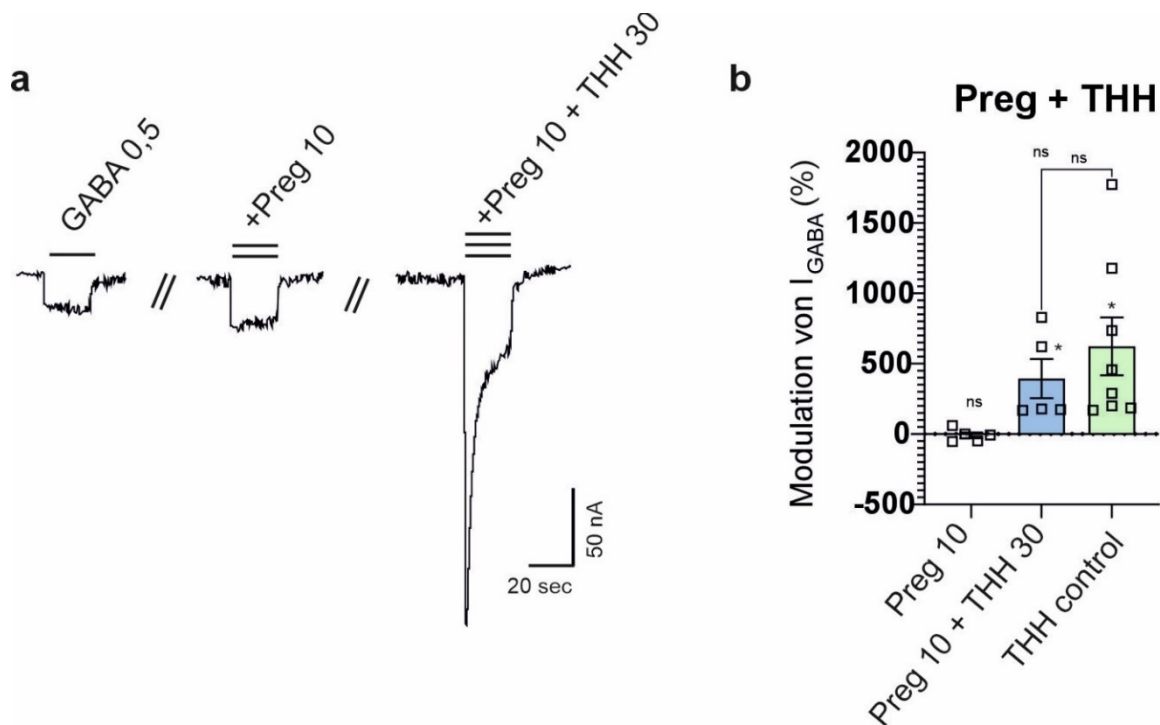


Abbildung 24 (a) zeigt ein repräsentatives Experiment bestehend aus dem GABA-Kontrollstrom (0,1 μ M), dem Strom durch GABA und Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie dem modulierten Strom durch die Co-Applikation von GABA mit Pregnenolonsulfat und THH (30 μ M). **(b)** Im Balkendiagramm ist die Modulation von I_{GABA} durch Pregnenolonsulfat (10 μ M), THH (30 μ M) mit Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie durch THH (30 μ M) allein dargestellt. Dazu wurden die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten verwendet. Die Nullhypothese wurde mittels *one-sample t-test* (*-Symbole) getestet. Der Unterschied zwischen den Werten wurde mittels *one-way ANOVA* und *Post hoc Tukey Test* berechnet, und zeigte in beiden Fällen keinen signifikanten Unterschied (ns = nicht signifikant, * = $P < 0.5$).

Letztlich konnte auch für HO in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat eine Potenzierung von I_{GABA} beobachtet werden (*one-sample t-test*; 635.3 ± 216.4 %, $t = 2.935$; $df = 4$; $P = 0.0426$, **Abbildung 25(a)**). Der *one-way ANOVA* ($F(2,14) = 5.757$, $P = 0.0150$, siehe auch **Abbildung 25(b)**) zeigte einen signifikanten Unterschied der I_{GABA} -Modulation durch die Substanzen bzw. Substanzkombinationen auf. Konkret konnte ein signifikanter Unterschied in der Modulation von I_{GABA} durch Pregnenolonsulfat (0.2 ± 18.8 %, $t = 0.01098$; $df = 4$; $P = 0.9918$) vs. Pregnenolonsulfat + HO ($P = 0.0115$) festgestellt werden, jedoch konnte im Vergleich zum *per se* Effekt von HO (338.2 ± 82.3 %, $t = 4.111$; $df = 6$; $P = 0.0063$) kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($P = 0.1619$). Auch für Pregnenolonsulfat + HO im Vergleich zum *per se* Effekt von HO wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ($P = 0.2349$). Dies weist daraufhin, dass auch die Wirkung von HO vermutlich nicht über die Neurosteroid-Bindungsstelle vermittelt wird.

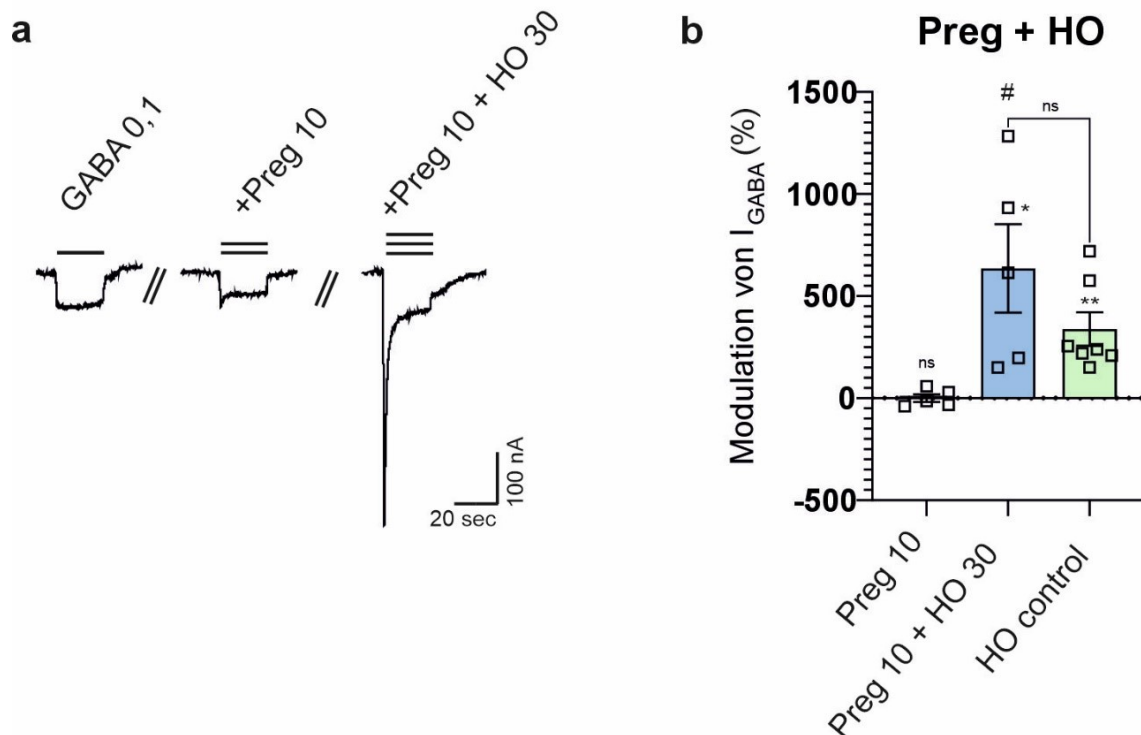


Abbildung 25 (a) zeigt ein repräsentatives Experiment bestehend aus dem GABA-Kontrollstrom (0,1 μ M), dem Strom durch GABA und Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie dem modulierten Strom durch die Co-Applikation von GABA mit Pregnenolonsulfat und HO (30 μ M). **(b)** Im Balkendiagramm ist die Modulation von I_{GABA} durch Pregnenolonsulfat (10 μ M), HO (30 μ M) mit Pregnenolonsulfat (10 μ M) sowie durch HO (30 μ M) allein dargestellt. Dazu wurden die Mittelwerte $\pm$ SEM von mindestens fünf Experimenten an unterschiedlichen Oozyten verwendet. Die Nullhypothese wurde mittels *one-sample t-test* (*-Symbole) getestet. Der Unterschied zwischen den Werten wurde mittels *one-way ANOVA* (#-Symbole) und *Post hoc Tukey Test* berechnet (ns = nicht signifikant, * = $P < 0.5$, ** = $P < 0.01$, # = $P < 0.5$).

Substanz	Mittelwert %	SD	S.E.M.	n/N
Pregnenolonsulfat	-17.4	31.7	6.6	23/2
AWM1	2468.0	1663.0	678,9	6/2
AWM1 + Pregnenolonsulfat	1391.0	1084.0	442,6	6/2
DHHB	854.7	798.5	230.5	12/2
DHHB + Pregnenolonsulfat	573.7	289.4	109.4	7/2
THH	623.2	580.4	205.2	8/4
THH + Pregnenolonsulfat	393.4	310.6	138.9	5/2
HO	338.2	217.6	82.26	7/5
HO + Pregnenolonsulfat	635.3	483.9	216.4	5/2

Tabelle 13: Deskriptive Statistik der Experimente zur Neurosteroid-Bindungsstelle mit Mittelwert, Standardabweichung (SD), standard error of the mean (S.E.M.), Anzahl der Experimente (n) und Anzahl der Frösche (N).

9. Diskussion

Die Interaktion des Neurotransmitters GABA mit verschiedenen GABA-aktivierten Rezeptoren bildet die mechanistische Grundlage der synaptischen Inhibition. So wirkt er als Gegenspieler zum exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, und ist somit an der neuronalen Hemmung und der Kontrolle der Erregbarkeit beteiligt. Dies wirkt sich in weiterer Folge auf die Entstehung von Angst, den Muskeltonus, die Vigilanz, den circadianen Rhythmus, das Lernen und das Gedächtnis aus. Des Weiteren ist die über GABA vermittelte Neurotransmission im Rahmen der neuronalen Entwicklung beteiligt, indem sie die Neuro- und Synaptogenese reguliert (Sieghart et al., 2012; Smart und Stephenson, 2019).

Zahlreiche Erkrankungen des ZNS wie Epilepsie, Depressionen und Angststörungen, Schizophrenie und Autismus werden mit einer gestörten Funktion des GABAergen Systems in Zusammenhang gebracht (Rudolph und Möhler, 2014; Sears und Hewett, 2021). So weisen an Depressionen erkrankte Patient*Innen häufig geringere GABA-Konzentrationen in der Großhirnrinde auf, des Weiteren konnte eine verminderte Expression des GABA-Syntheseeenzyms GAD67 im präfrontalen Cortex erkrankter Personen festgestellt werden (Karolewicz et al., 2010). Außerdem kann eine veränderte Expression der GABA-aktivierten Rezeptoren und diverser Untereinheiten mit bestimmten Formen der Epilepsie, wie beispielsweise Fieberkrämpfen oder GEFS+ assoziiert werden (Richardson et al., 2024).

Modulatoren des GABAA-Rezeptors bilden somit einen wichtigen Ansatzpunkt in der Therapie dieser und vieler weiterer Erkrankungen der ZNS. Hierbei werden Wirkstoffe aus den Gruppen der Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden sowie Anästhetika eingesetzt. Trotz des wertvollen Beitrages, den die GABAA-Modulatoren in der klinischen Praxis leisten, bringen sie auch zahlreiche Nebenwirkungen mit sich. So sind insbesondere die Benzodiazepine mit negativen Effekten wie Sedierung, kognitiven Beeinträchtigungen und der Gefahr der Abhängigkeit verbunden (Lembke et al., 2018). Mithilfe von Substanzen, welche selektiv an spezifischen Subtypen des GABAA-Rezeptors wirken, könnten diese Nebenwirkungen reduziert werden.

Das Ziel der vorliegenden Masterarbeit lag darin, die Substanzen AWM1, DHHB, THH und HO, deren GABAA-Rezeptor-modulatorische Wirkung im Rahmen der Masterarbeit meiner Kollegin Katharina Neßmerak identifiziert wurden, näher zu charakterisieren und erste Einblicke in ihr Selektivitätsprofil bzw. potenzielle Interaktionsstellen am GABAA-Rezeptor zu erhalten. Dazu wurden die Subtypen $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ und $\alpha 1\beta 3$ in *Xenopus laevis* Oozyten

exprimiert, anschließend wurde die konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} mittels 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht.

Alle hier untersuchten Substanzen zeigten ein sehr ähnliches Selektivitätsprofil: die stärkste Potenzierung von I_{GABA} wurde an $\alpha 1\beta 2$ - bzw. $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren beobachtet, die Wirkung war nicht abhängig von der Anwesenheit einer γ -Untereinheit und in allen Fällen war die Potenzierung von I_{GABA} an $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren signifikant schwächer ausgeprägt als an $\alpha 1\beta 2$ - bzw. $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren. Somit konnten alle der getesteten Substanzen (AWM1, DHHB, THH, HO) als neue β -selektive Modulatoren von I_{GABA} identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Substanzen nicht mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle interagieren, das Vorhandensein der $\gamma 2$ -Untereinheit für ihre Wirkung nicht notwendig war beziehungsweise in den meisten Fällen der Effekt der Substanzen an $\alpha 1\beta 2$ - bzw. $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren sogar stärker war als an $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren. Die Implikation dieser Befunde bzw. ein möglicher Beitrag dieses $\alpha\beta$ Interfaces zur Wirkung der Substanzen ist Gegenstand laufender Untersuchungen, ebenso wie die Identifikation der Bindungsstelle. Da auch die Neurosteroid-Bindungsstelle offenbar nicht - oder im Falle von THH nur rudimentär - involviert ist, wäre eine Untersuchung der Interaktion meiner Substanzen mit dem Etomidat Pocket basierend auf der Untereinheitenspezifität für $\beta 2/\beta 3$ inkorporierende Rezeptoren (siehe auch Kapitel 5.3) naheliegend.

Nachdem im Rahmen dieser Masterarbeit die β -Selektivität für alle getesteten Substanzen gezeigt werden konnte, könnten diese Modulatoren einen interessanten Ansatz für weitere pharmakologische Forschung darstellen und das therapeutische, wie auch das toxische Potential dieser Substanzen in präklinischen Modellen untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Abramian, A. M., Comenencia-Ortiz, E., Modgil, A., Vien, T. N., Nakamura, Y., Moore, Y. E., Maguire, J. L., Terunuma, M., Davies, P. A. & Moss, S. J. 2014. Neurosteroids promote phosphorylation and membrane insertion of extrasynaptic GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 7132-7.
- Absalom, N., Eghorn, L. F., Villumsen, I. S., Karim, N., Bay, T., Olsen, J. V., Knudsen, G. M., Bräuner-Osborne, H., Frølund, B., Clausen, R. P., Chebib, M. & Wellendorph, P. 2012. $\alpha 4\beta\delta$ GABA(A) receptors are high-affinity targets for γ -hydroxybutyric acid (GHB). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13404-9.
- Absalom, N. L., Lin, S. X. N., Liao, V. W. Y., Chua, H. C., Møller, R. S., Chebib, M. & Ahring, P. K. 2023. GABA(A) receptors in epilepsy: Elucidating phenotypic divergence through functional analysis of genetic variants. *J Neurochem*.
- Akk, G., Covey, D. F., Evers, A. S., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F. & Mennerick, S. 2007. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther*, 116, 35-57.
- Akk, G., Li, P., Bracamontes, J., Reichert, D. E., Covey, D. F. & Steinbach, J. H. 2008. Mutations of the GABA-A receptor $\alpha 1$ subunit M1 domain reveal unexpected complexity for modulation by neuroactive steroids. *Mol Pharmacol*, 74, 614-27.
- Alvarez, L. D. & Pecci, A. 2018. Structure and dynamics of neurosteroid binding to the $\alpha(1)\beta(2)\gamma(2)$ GABA(A) receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 182, 72-80.
- Andersen, J. V. & Schousboe, A. 2023. Milestone Review: Metabolic dynamics of glutamate and GABA mediated neurotransmission - The essential roles of astrocytes. *J Neurochem*, 166, 109-137.
- Andersen, J. V., Schousboe, A. & Verkhratsky, A. 2022. Astrocyte energy and neurotransmitter metabolism in Alzheimer's disease: Integration of the glutamate/GABA-glutamine cycle. *Prog Neurobiol*, 217, 102331.
- Andersen, J. V., Schousboe, A. & Wellendorph, P. 2023. Astrocytes regulate inhibitory neurotransmission through GABA uptake, metabolism, and recycling. *Essays Biochem*, 67, 77-91.
- Auer, T., Schreppel, P., Erker, T. & Schwarzer, C. 2020. Impaired chloride homeostasis in epilepsy: Molecular basis, impact on treatment, and current treatment approaches. *Pharmacol Ther*, 205, 107422.
- Babaev, O., Piletti Chatain, C. & Krueger-Burg, D. 2018. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. *Exp Mol Med*, 50, 1-16.
- Baburin, I., Beyl, S. & Hering, S. 2006. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch*, 453, 117-23.

- Bachhuber, M. A., Hennessy, S., Cunningham, C. O. & Starrels, J. L. 2016. Increasing Benzodiazepine Prescriptions and Overdose Mortality in the United States, 1996-2013. *Am J Public Health*, 106, 686-8.
- Bak, L. K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, 98, 641-53.
- Barbaccia, M. L., Carai, M. A., Colombo, G., Lobina, C., Purdy, R. H. & Gessa, G. L. 2005. Endogenous gamma-aminobutyric acid (GABA)(A) receptor active neurosteroids and the sedative/hypnotic action of gamma-hydroxybutyric acid (GHB): a study in GHB-S (sensitive) and GHB-R (resistant) rat lines. *Neuropharmacology*, 49, 48-58.
- Barker, J. L. & Ransom, B. R. 1978. Amino acid pharmacology of mammalian central neurones grown in tissue culture. *The Journal of Physiology*, 280, 331-354.
- Barnard, E. A., Darlison, M. G. & Seeburg, P. 1987. Molecular biology of the GABAA receptor: the receptor/channel superfamily. *Trends in Neurosciences*, 10, 502-509.
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N. & Langer, S. Z. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*, 50, 291-313.
- Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J. F., Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R. & Leguern, E. 2001. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet*, 28, 46-8.
- Baumann, S. W., Baur, R. & Sigel, E. 2003. Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci*, 23, 11158-66.
- Baumgartner, W., Islas, L. & Sigworth, F. J. 1999. Two-microelectrode voltage clamp of *Xenopus* oocytes: voltage errors and compensation for local current flow. *Biophys J*, 77, 1980-91.
- Belelli, D., Harrison, N. L., Maguire, J., Macdonald, R. L., Walker, M. C. & Cope, D. W. 2009. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci*, 29, 12757-63.
- Belelli, D., Lambert, J. J., Peters, J. A., Wafford, K. & Whiting, P. J. 1997. The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11031-6.
- Ben-Ari, Y., Woodin, M. A., Sernagor, E., Cancedda, L., Vinay, L., Rivera, C., Legendre, P., Luhmann, H. J., Bordey, A., Wenner, P., Fukuda, A., Van Den Pol, A. N., Gaiarsa, J. L. & Cherubini, E. 2012. Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever! *Front Cell Neurosci*, 6, 35.

- Benham, R. S., Choi, C., Hodgson, N. W., Hewage, N. B., Kastli, R., Donahue, R. J., Muschamp, J. W., Engin, E., Carlezon, W. A., Jr., Hensch, T. K. & Rudolph, U. 2021. α 2-containing γ -aminobutyric acid type A receptors promote stress resiliency in male mice. *Neuropsychopharmacology*, 46, 2197-2206.
- Bergmann, R., Kongsbak, K., Sørensen, P. L., Sander, T. & Balle, T. 2013. A unified model of the GABA(A) receptor comprising agonist and benzodiazepine binding sites. *PLoS One*, 8, e52323.
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. & Gassmann, M. 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev*, 84, 835-67.
- Bhandage, A. K., Jin, Z., Korol, S. V., Shen, Q., Pei, Y., Deng, Q., Espes, D., Carlsson, P. O., Kamali-Moghaddam, M. & Birnir, B. 2018. GABA Regulates Release of Inflammatory Cytokines From Peripheral Blood Mononuclear Cells and CD4(+) T Cells and Is Immunosuppressive in Type 1 Diabetes. *EBioMedicine*, 30, 283-294.
- Bianchi, L. & Driscoll, M. 2006. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook*, 1-16.
- Blednov, Y. A., Jung, S., Alva, H., Wallace, D., Rosahl, T., Whiting, P. J. & Harris, R. A. 2003. Deletion of the α 1 or β 2 subunit of GABAA receptors reduces actions of alcohol and other drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 304, 30-6.
- Bowery, N. G. 1993. GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33, 109-47.
- Bowery, N. G., Hill, D. R., Hudson, A. L., Doble, A., Middlemiss, D. N., Shaw, J. & Turnbull, M. 1980. (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, 283, 92-4.
- Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G. & Farrant, M. 1996. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *J Physiol*, 497 (Pt 3), 753-9.
- Bryson, A., Reid, C. & Petrou, S. 2023. Fundamental Neurochemistry Review: GABA(A) receptor neurotransmission and epilepsy: Principles, disease mechanisms and pharmacotherapy. *J Neurochem*, 165, 6-28.
- Burman, R. J., Selfe, J. S., Lee, J. H., Van Den Berg, M., Calin, A., Codadu, N. K., Wright, R., Newey, S. E., Parrish, R. R., Katz, A. A., Wilmschurst, J. M., Akerman, C. J., Trevelyan, A. J. & Raimondo, J. V. 2019. Excitatory GABAergic signalling is associated with benzodiazepine resistance in status epilepticus. *Brain*, 142, 3482-3501.
- Caldji, C., Francis, D., Sharma, S., Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. 2000. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 22, 219-29.

- Carvill, G. L., McMahon, J. M., Schneider, A., Zemel, M., Myers, C. T., Saykally, J., Nguyen, J., Robbiano, A., Zara, F., Specchio, N., Mecarelli, O., Smith, R. L., Leventer, R. J., Møller, R. S., Nikanorova, M., Dimova, P., Jordanova, A., Petrou, S., Helbig, I., Striano, P., Weckhuysen, S., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. & Mefford, H. C. 2015. Mutations in the GABA Transporter SLC6A1 Cause Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures. *Am J Hum Genet*, 96, 808-15.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Danbolt, N. C., Osen, K. K., Edwards, R. H. & Storm-Mathisen, J. 1998. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci*, 18, 9733-50.
- Chen, G., Trombley, P. Q. & Van Den Pol, A. N. 1996. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J Physiol*, 494 (Pt 2), 451-64.
- Chen, Z. W., Bracamontes, J. R., Budelier, M. M., Germann, A. L., Shin, D. J., Kathiresan, K., Qian, M. X., Manion, B., Cheng, W. W. L., Reichert, D. E., Akk, G., Covey, D. F. & Evers, A. S. 2019. Multiple functional neurosteroid binding sites on GABAA receptors. *PLoS Biol*, 17, e3000157.
- Chen, Z. W. & Olsen, R. W. 2007. GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem*, 100, 279-94.
- Chua, H. C. & Chebib, M. 2017. GABA(A) Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. *Adv Pharmacol*, 79, 1-34.
- Chuang, S. H. & Reddy, D. S. 2018. Genetic and Molecular Regulation of Extrasynaptic GABA-A Receptors in the Brain: Therapeutic Insights for Epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*, 364, 180-197.
- Colombi, I., Rastogi, M., Parrini, M., Alberti, M., Potenzieri, A., Chellali, M. M., Rosati, S., Chiappalone, M., Nanni, M., Contestabile, A. & Cancedda, L. 2024. Heterogeneous subpopulations of GABA(A)R-responding neurons coexist across neuronal network scales and developmental stages in health and disease. *iScience*, 27, 109438.
- Connolly, C. N., Krishek, B. J., McDonald, B. J., Smart, T. G. & Moss, S. J. 1996. Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem*, 271, 89-96.
- Cutler, A. J., Mattingly, G. W. & Maletic, V. 2023. Understanding the mechanism of action and clinical effects of neuroactive steroids and GABAergic compounds in major depressive disorder. *Transl Psychiatry*, 13, 228.
- Davenport, E. C., Pendolino, V., Kontou, G., McGee, T. P., Sheehan, D. F., López-Doménech, G., Farrant, M. & Kittler, J. T. 2017. An Essential Role for the Tetraspanin LHFPL4 in the Cell-Type-Specific Targeting and Clustering of Synaptic GABA(A) Receptors. *Cell Rep*, 21, 70-83.

- Douillard-Guilloux, G., Lewis, D., Seney, M. L. & Sibille, E. 2017. Decrease in somatostatin-positive cell density in the amygdala of females with major depression. *Depress Anxiety*, 34, 68-78.
- Drew, C. A., Johnston, G. A. & Weatherby, R. P. 1984. Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett*, 52, 317-21.
- Duman, R. S., Sanacora, G. & Krystal, J. H. 2019. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron*, 102, 75-90.
- Durant, C., Christmas, D. & Nutt, D. 2010. The pharmacology of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci*, 2, 303-30.
- Engin, E. 2022. GABA(A) receptor subtypes and benzodiazepine use, misuse, and abuse. *Front Psychiatry*, 13, 1060949.
- Evenseth, L. S. M., Gabrielsen, M. & Sylte, I. 2020. The GABA(B) Receptor-Structure, Ligand Binding and Drug Development. *Molecules*, 25.
- Farrant, M. & Nusser, Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, 6, 215-29.
- Fattorini, G., Melone, M. & Conti, F. 2020. A Reappraisal of GAT-1 Localization in Neocortex. *Front Cell Neurosci*, 14, 9.
- Fedi, M., Berkovic, S. F., Marini, C., Mulligan, R., Tochon-Danguy, H. & Reutens, D. C. 2006. A GABAA receptor mutation causing generalized epilepsy reduces benzodiazepine receptor binding. *Neuroimage*, 32, 995-1000.
- Florey, E. 1991. GABA: history and perspectives. *Can J Physiol Pharmacol*, 69, 1049-56.
- Fluyau, D., Revadigar, N. & Manobianco, B. E. 2018. Challenges of the pharmacological management of benzodiazepine withdrawal, dependence, and discontinuation. *Ther Adv Psychopharmacol*, 8, 147-168.
- Forman, S. A. & Miller, K. W. 2016. Mapping General Anesthetic Sites in Heteromeric γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors Reveals a Potential For Targeting Receptor Subtypes. *Anesth Analg*, 123, 1263-1273.
- Fourati, Z., Ruza, R. R., Laverty, D., Drège, E., Delarue-Cochin, S., Joseph, D., Koehl, P., Smart, T. & Delarue, M. 2017. Barbiturates Bind in the GLIC Ion Channel Pore and Cause Inhibition by Stabilizing a Closed State. *J Biol Chem*, 292, 1550-1558.
- Franks, N. P. 2006. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S72-81.
- Garcia, P. S., Kolesky, S. E. & Jenkins, A. 2010. General anesthetic actions on GABA(A) receptors. *Curr Neuropharmacol*, 8, 2-9.

- Gassmann, M. & Bettler, B. 2012. Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci*, 13, 380-94.
- Ge, Y., Kang, Y., Cassidy, R. M., Moon, K. M., Lewis, R., Wong, R. O. L., Foster, L. J. & Craig, A. M. 2018. Clptm1 Limits Forward Trafficking of GABA(A) Receptors to Scale Inhibitory Synaptic Strength. *Neuron*, 97, 596-610.e8.
- Germann, A. L., Pierce, S. R., Tateiwa, H., Sugasawa, Y., Reichert, D. E., Evers, A. S., Steinbach, J. H. & Akk, G. 2021. Intrasubunit and Intersubunit Steroid Binding Sites Independently and Additively Mediate $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA(A) Receptor Potentiation by the Endogenous Neurosteroid Allopregnanolone. *Mol Pharmacol*, 100, 19-31.
- Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S. & Hussein, D. E. E. 2021. GABA(A) receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J Genet Eng Biotechnol*, 19, 123.
- Ghosal, S., Hare, B. & Duman, R. S. 2017. Prefrontal Cortex GABAergic Deficits and Circuit Dysfunction in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Stress and Depression. *Curr Opin Behav Sci*, 14, 1-8.
- Glykys, J. & Mody, I. 2007. Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron*, 56, 763-70.
- Goldschen-Ohm, M. P. 2022. Benzodiazepine Modulation of GABA(A) Receptors: A Mechanistic Perspective. *Biomolecules*, 12.
- Goodkin, H. P., Joshi, S., Mtchedlishvili, Z., Brar, J. & Kapur, J. 2008. Subunit-specific trafficking of GABA(A) receptors during status epilepticus. *J Neurosci*, 28, 2527-38.
- Hall, A. C., Rowan, K. C., Stevens, R. J., Kelley, J. C. & Harrison, N. L. 2004. The effects of isoflurane on desensitized wild-type and alpha 1(S270H) gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Anesth Analg*, 98, 1297-304, table of contents.
- Han, W., Li, J., Pelkey, K. A., Pandey, S., Chen, X., Wang, Y. X., Wu, K., Ge, L., Li, T., Castellano, D., Liu, C., Wu, L. G., Petralia, R. S., Lynch, J. W., Mcbain, C. J. & Lu, W. 2019. Shisa7 is a GABA(A) receptor auxiliary subunit controlling benzodiazepine actions. *Science*, 366, 246-250.
- Han, W., Shepard, R. D. & Lu, W. 2021. Regulation of GABA(A)Rs by Transmembrane Accessory Proteins. *Trends Neurosci*, 44, 152-165.
- Hao, X., Ou, M., Zhang, D., Zhao, W., Yang, Y., Liu, J., Yang, H., Zhu, T., Li, Y. & Zhou, C. 2020. The Effects of General Anesthetics on Synaptic Transmission. *Curr Neuropharmacol*, 18, 936-965.
- Heli, Z., Hongyu, C., Dapeng, B., Yee Shin, T., Yejun, Z., Xi, Z. & Yingying, W. 2022. Recent advances of γ -aminobutyric acid: Physiological and immunity function, enrichment, and metabolic pathway. *Front Nutr*, 9, 1076223.

- Herbison, A. E. & Moenter, S. M. 2011. Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus. *J Neuroendocrinol*, 23, 557-69.
- Hertz, L. 1979. Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog Neurobiol*, 13, 277-323.
- Hibbs, R. E. & Gouaux, E. 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, 474, 54-60.
- Hintersteiner, J., Haider, M., Luger, D., Schwarzer, C., Reznicek, G., Jäger, W., Khom, S., Mihovilovic, M. D. & Hering, S. 2014. Esters of valerenic acid as potential prodrugs. *Eur J Pharmacol*, 735, 123-31.
- Hirsch, E., French, J., Scheffer, I. E., Bogacz, A., Alsaadi, T., Sperling, M. R., Abdulla, F., Zuberi, S. M., Trinka, E., Specchio, N., Somerville, E., Samia, P., Riney, K., Nabbout, R., Jain, S., Wilmschurst, J. M., Auvin, S., Wiebe, S., Perucca, E., Moshé, S. L., Tinuper, P. & Wirrell, E. C. 2022. ILAE definition of the Idiopathic Generalized Epilepsy Syndromes: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*, 63, 1475-1499.
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., Da Silva, H. M. & Smart, T. G. 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444, 486-9.
- Huang, D., Wang, Y., Thompson, J. W., Yin, T., Alexander, P. B., Qin, D., Mudgal, P., Wu, H., Liang, Y., Tan, L., Pan, C., Yuan, L., Wan, Y., Li, Q. J. & Wang, X. F. 2022. Cancer-cell-derived GABA promotes β -catenin-mediated tumour growth and immunosuppression. *Nat Cell Biol*, 24, 230-241.
- Jacob, T. C., Moss, S. J. & Jurd, R. 2008. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 331-343.
- Janak, P. H. & Tye, K. M. 2015. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517, 284-92.
- Jayakar, S. S., Zhou, X., Chiara, D. C., Dostalova, Z., Savechenkov, P. Y., Bruzik, K. S., Dailey, W. P., Miller, K. W., Eckenhoff, R. G. & Cohen, J. B. 2014. Multiple propofol-binding sites in a γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR) identified using a photoreactive propofol analog. *J Biol Chem*, 289, 27456-68.
- Jeremic, D., Sanchez-Rodriguez, I., Jimenez-Diaz, L. & Navarro-Lopez, J. D. 2021. Therapeutic potential of targeting G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in the central nervous system. *Pharmacol Ther*, 223, 107808.
- Johannesen, K., Marini, C., Pfeffer, S., Møller, R. S., Dorn, T., Niturad, C. E., Gardella, E., Weber, Y., Søndergård, M., Hjalgrim, H., Nikanorova, M., Becker, F., Larsen, L. H., Dahl, H. A., Maier, O., Mei, D., Biskup, S., Klein, K. M., Reif, P. S., Rosenow, F., Elias,

- A. F., Hudson, C., Helbig, K. L., Schubert-Bast, S., Scordo, M. R., Craiu, D., Djémié, T., Hoffman-Zacharska, D., Caglayan, H., Helbig, I., Serratosa, J., Striano, P., De Jonghe, P., Weckhuysen, S., Suls, A., Muru, K., Talvik, I., Talvik, T., Muhle, H., Borggraefe, I., Rost, I., Guerrini, R., Lerche, H., Lemke, J. R., Rubboli, G. & Maljevic, S. 2016. Phenotypic spectrum of GABRA1: From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies. *Neurology*, 87, 1140-51.
- Jolivel, V., Brun, S., Binamé, F., Benyounes, J., Taleb, O., Bagnard, D., De Sèze, J., Patten-Mensah, C. & Mensah-Nyagan, A. G. 2021. Microglial Cell Morphology and Phagocytic Activity Are Critically Regulated by the Neurosteroid Allopregnanolone: A Possible Role in Neuroprotection. *Cells*, 10.
- Jurd, R., Arras, M., Lambert, S., Drexler, B., Siegwart, R., Crestani, F., Zaugg, M., Vogt, K. E., Ledermann, B., Antkowiak, B. & Rudolph, U. 2003. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J*, 17, 250-2.
- Kaila, K., Price, T. J., Payne, J. A., Puskarjov, M. & Voipio, J. 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 15, 637-54.
- Kanes, S., Colquhoun, H., Gunduz-Bruce, H., Raines, S., Arnold, R., Schacterle, A., Doherty, J., Epperson, C. N., Deligiannidis, K. M., Riesenberger, R., Hoffmann, E., Rubinow, D., Jonas, J., Paul, S. & Meltzer-Brody, S. 2017. Brexanolone (SAGE-547 injection) in post-partum depression: a randomised controlled trial. *Lancet*, 390, 480-489.
- Karolewicz, B., Maciag, D., O'dwyer, G., Stockmeier, C. A., Feyissa, A. M. & Rajkowska, G. 2010. Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13, 411-20.
- Kaupmann, K., Cryan, J. F., Wellendorph, P., Mombereau, C., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Froestl, W., Van Der Putten, H., Mosbacher, J., Bräuner-Osborne, H., Waldmeier, P. & Bettler, B. 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.
- Kavanaugh, M., Arriza, J. L., North, R. A. & Amara, S. G. 1992. Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 22007-22009.
- Kent, M. R., Kara, N. & Patton, J. G. 2021. Inhibition of GABA(A)-p receptors induces retina regeneration in zebrafish. *Neural Regen Res*, 16, 367-374.
- Khom, S., Baburin, I., Timin, E., Hohaus, A., Trauner, G., Kopp, B. & Hering, S. 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology*, 53, 178-87.

- Khom, S., Baburin, I., Timin, E. N., Hohaus, A., Sieghart, W. & Hering, S. 2006. Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits. *Mol Pharmacol*, 69, 640-9.
- Khom, S., Strommer, B., Ramharter, J., Schwarz, T., Schwarzer, C., Erker, T., Ecker, G. F., Mulzer, J. & Hering, S. 2010. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *Br J Pharmacol*, 161, 65-78.
- Kim, E. & Levy, R. J. 2020. The role of anaesthesiologists in lethal injection: a call to action. *Lancet*, 395, 749-754.
- Kim, J. J., Gharpure, A., Teng, J., Zhuang, Y., Howard, R. J., Zhu, S., Noviello, C. M., Walsh, R. M., Jr., Lindahl, E. & Hibbs, R. E. 2020. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature*, 585, 303-308.
- Kim, J. J. & Hibbs, R. E. 2021. Direct Structural Insights into GABA(A) Receptor Pharmacology. *Trends Biochem Sci*, 46, 502-517.
- Knight, E. M. P., Amin, S., Bahi-Buisson, N., Benke, T. A., Cross, J. H., Demarest, S. T., Olson, H. E., Specchio, N., Fleming, T. R., Aimetti, A. A., Gasior, M. & Devinsky, O. 2022. Safety and efficacy of ganaxolone in patients with CDKL5 deficiency disorder: results from the double-blind phase of a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*, 21, 417-427.
- Korol, S. V., Jin, Z., Jin, Y., Bhandage, A. K., Tengholm, A., Gandasi, N. R., Barg, S., Espes, D., Carlsson, P. O., Laver, D. & Birnir, B. 2018. Functional Characterization of Native, High-Affinity GABA(A) Receptors in Human Pancreatic β Cells. *EBioMedicine*, 30, 273-282.
- Krasowski, M. D., Koltchine, V. V., Rick, C. E., Ye, Q., Finn, S. E. & Harrison, N. L. 1998. Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the gamma-aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Mol Pharmacol*, 53, 530-8.
- Laurent, H., Goodman, S. H., Stowe, Z. N., Halperin, M., Khan, F., Wright, D., Nelson, B. W., Newport, D. J., Ritchie, J. C., Monk, C. & Knight, B. 2018. Course of ante- and postnatal depressive symptoms related to mothers' HPA axis regulation. *J Abnorm Psychol*, 127, 404-416.
- Laverty, D., Desai, R., Uchański, T., Masiulis, S., Stec, W. J., Malinauskas, T., Zivanov, J., Pardon, E., Steyaert, J., Miller, K. W. & Aricescu, A. R. 2019. Cryo-EM structure of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ GABA(A) receptor in a lipid bilayer. *Nature*, 565, 516-520.
- Laverty, D., Thomas, P., Field, M., Andersen, O. J., Gold, M. G., Biggin, P. C., Gielen, M. & Smart, T. G. 2017. Crystal structures of a GABA(A)-receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. *Nat Struct Mol Biol*, 24, 977-985.

- Leader, L. D., O'connell, M. & Vandenberg, A. 2019. Brexanolone for Postpartum Depression: Clinical Evidence and Practical Considerations. *Pharmacotherapy*, 39, 1105-1112.
- Lembke, A., Papac, J. & Humphreys, K. 2018. Our Other Prescription Drug Problem. *N Engl J Med*, 378, 693-695.
- Li, G. D., Chiara, D. C., Sawyer, G. W., Husain, S. S., Olsen, R. W. & Cohen, J. B. 2006. Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *J Neurosci*, 26, 11599-605.
- Licheri, V., Talani, G., Gorule, A. A., Mostallino, M. C., Biggio, G. & Sanna, E. 2015. Plasticity of GABAA Receptors during Pregnancy and Postpartum Period: From Gene to Function. *Neural Plast*, 2015, 170435.
- Liu, R., Wang, J., Liang, S., Zhang, G. & Yang, X. 2019. Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Front Neurol*, 10, 1407.
- Liu, Y. Q., Yu, F., Liu, W. H., He, X. H. & Peng, B. W. 2014. Dysfunction of hippocampal interneurons in epilepsy. *Neurosci Bull*, 30, 985-998.
- López-Muñoz, F., Ucha-Udabe, R. & Alamo, C. 2005. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 1, 329-43.
- Löscher, W. & Rogawski, M. A. 2012. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia*, 53 Suppl 8, 12-25.
- Lukačšínová, A., Reissigová, J., Ortner-Hadžiabdić, M., Brkic, J., Okuyan, B., Volmer, D., Tadić, I., Modamio, P., Mariño, E. L., Tachkov, K., Liperotti, R., Onder, G., Finne-Soveri, H., Van Hout, H., Howard, E. P. & Fialová, D. 2024. Prevalence, country-specific prescribing patterns and determinants of benzodiazepine use in community-residing older adults in 7 European countries. *BMC Geriatr*, 24, 240.
- Luscher, B., Maguire, J. L., Rudolph, U. & Sibille, E. 2023. GABA(A) receptors as targets for treating affective and cognitive symptoms of depression. *Trends Pharmacol Sci*, 44, 586-600.
- Lüscher, B. & Möhler, H. 2019. Brexanolone, a neurosteroid antidepressant, vindicates the GABAergic deficit hypothesis of depression and may foster resilience. *F1000Res*, 8.
- Luscher, B., Shen, Q. & Sahir, N. 2011. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry*, 16, 383-406.
- Lüscher, B. P., Baur, R., Goeldner, M. & Sigel, E. 2012. Influence of GABA(A) receptor α subunit isoforms on the benzodiazepine binding site. *PLoS One*, 7, e42101.
- Lüscher, C. & Slesinger, P. A. 2010. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 11, 301-315.
- Macdonald, R. L. & Olsen, R. W. 1994. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci*, 17, 569-602.

- Maillard, P. Y., Baer, S., Schaefer, É., Desnoux, B., Villeneuve, N., Lépine, A., Fabre, A., Lacoste, C., El Chehadeh, S., Piton, A., Porter, L. F., Perriard, C., Wardé, M. A., Spitz, M. A., Laugel, V., Lesca, G., Putoux, A., Ville, D., Mignot, C., Héron, D., Nabbout, R., Barcia, G., Rio, M., Roubertie, A., Meyer, P., Paquis-Flucklinger, V., Patat, O., Lefranc, J., Gerard, M., De Bellescize, J., Villard, L., De Saint Martin, A. & Milh, M. 2022. Molecular and clinical descriptions of patients with GABA(A) receptor gene variants (GABRA1, GABRB2, GABRB3, GABRG2): A cohort study, review of literature, and genotype-phenotype correlation. *Epilepsia*, 63, 2519-2533.
- Martin, D. L. & Rinvall, K. 1993. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem*, 60, 395-407.
- Masiulis, S., Desai, R., Uchański, T., Serna Martin, I., Laverty, D., Karia, D., Malinauskas, T., Zivanov, J., Pardon, E., Kotecha, A., Steyaert, J., Miller, K. W. & Aricescu, A. R. 2019. GABA(A) receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*, 565, 454-459.
- Maust, D. T., Lin, L. A. & Blow, F. C. 2019. Benzodiazepine Use and Misuse Among Adults in the United States. *Psychiatr Serv*, 70, 97-106.
- Mckernan, R. M., Rosahl, T. W., Reynolds, D. S., Sur, C., Wafford, K. A., Atack, J. R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., Garrett, L., Bristow, L., Marshall, G., Macaulay, A., Brown, N., Howell, O., Moore, K. W., Carling, R. W., Street, L. J., Castro, J. L., Ragan, C. I., Dawson, G. R. & Whiting, P. J. 2000. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci*, 3, 587-92.
- Melón, L., Hammond, R., Lewis, M. & Maguire, J. 2018. A Novel, Synthetic, Neuroactive Steroid Is Effective at Decreasing Depression-Like Behaviors and Improving Maternal Care in Preclinical Models of Postpartum Depression. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 703.
- Meltzer-Brody, S., Colquhoun, H., Riesenberger, R., Epperson, C. N., Deligiannidis, K. M., Rubinow, D. R., Li, H., Sankoh, A. J., Clemson, C., Schacterle, A., Jonas, J. & Kanes, S. 2018. Brexanolone injection in post-partum depression: two multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *Lancet*, 392, 1058-1070.
- Meltzer-Brody, S. & Kanes, S. J. 2020. Allopregnanolone in postpartum depression: Role in pathophysiology and treatment. *Neurobiol Stress*, 12, 100212.
- Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M. O. & Anisman, H. 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci*, 24, 1478-85.

- Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. D., Finn, S. E., Mascia, M. P., Valenzuela, C. F., Hanson, K. K., Greenblatt, E. P., Harris, R. A. & Harrison, N. L. 1997. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature*, 389, 385-9.
- Miledi, R., Parker, I. & Sumikawa, K. 1983. Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 218, 481-4.
- Miller, P. S. & Aricescu, A. R. 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature*, 512, 270-5.
- Miller, P. S., Scott, S., Masiulis, S., De Colibus, L., Pardon, E., Steyaert, J. & Aricescu, A. R. 2017. Structural basis for GABA(A) receptor potentiation by neurosteroids. *Nat Struct Mol Biol*, 24, 986-992.
- Möhler, H. 2006. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res*, 326, 505-16.
- Möhler, H. 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62, 42-53.
- Möhler, H., Fritschy, J. M. & Rudolph, U. 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 2-8.
- Murray, E. A., Wise, S. P. & Drevets, W. C. 2011. Localization of dysfunction in major depressive disorder: prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry*, 69, e43-54.
- Naffaa, M. M., Hung, S., Chebib, M., Johnston, G. a. R. & Hanrahan, J. R. 2017. GABA- ρ receptors: distinctive functions and molecular pharmacology. *Br J Pharmacol*, 174, 1881-1894.
- Nuss, P. 2015. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 11, 165-75.
- Ogris, W., Pörtl, A., Hauer, B., Ernst, M., Oberto, A., Wulff, P., Höger, H., Wisden, W. & Sieghart, W. 2004. Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Biochem Pharmacol*, 68, 1621-9.
- Olsen, R. W. 2018. GABA(A) receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*, 136, 10-22.
- Olsen, R. W. & Sieghart, W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev*, 60, 243-60.
- Olsen, R. W. & Sieghart, W. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56, 141-8.
- Olsen, R. W. & Tobin, A. J. 1990. Molecular biology of GABAA receptors. *Faseb j*, 4, 1469-80.

- Pennell, K. D., Woodin, M. A. & Pennell, P. B. 2015. Quantification of neurosteroids during pregnancy using selective ion monitoring mass spectrometry. *Steroids*, 95, 24-31.
- Penninx, B. W., Pine, D. S., Holmes, E. A. & Reif, A. 2021. Anxiety disorders. *Lancet*, 397, 914-927.
- Perucca, E., Bialer, M. & White, H. S. 2023a. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: I. Role of GABA as a Modulator of Seizure Activity and Recently Approved Medications Acting on the GABA System. *CNS Drugs*, 37, 755-779.
- Perucca, E., White, H. S. & Bialer, M. 2023b. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: II. Treatments in Clinical Development. *CNS Drugs*, 37, 781-795.
- Pierce, S. R., Germann, A. L., Steinbach, J. H. & Akk, G. 2022. The Sulfated Steroids Pregnenolone Sulfate and Dehydroepiandrosterone Sulfate Inhibit the $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$ GABA(A) Receptor by Stabilizing a Novel Nonconducting State. *Mol Pharmacol*, 101, 68-77.
- 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, 815-50.
- Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R. & Seeburg, P. H. 1989. Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 338, 582-5.
- Qian, X., Zhao, X., Yu, L., Yin, Y., Zhang, X. D., Wang, L., Li, J. X., Zhu, Q. & Luo, J. L. 2023. Current status of GABA receptor subtypes in analgesia. *Biomed Pharmacother*, 168, 115800.
- Qu, S., Zhou, C., Howe, R., Shen, W., Huang, X., Catron, M., Hu, N. & Macdonald, R. L. 2021. The K328M substitution in the human GABA(A) receptor gamma2 subunit causes GEFS+ and premature sudden death in knock-in mice. *Neurobiol Dis*, 152, 105296.
- Reddy, D. S. 2018. GABA-A Receptors Mediate Tonic Inhibition and Neurosteroid Sensitivity in the Brain. *Vitam Horm*, 107, 177-191.
- Reddy, D. S., Mbilinyi, R. H. & Estes, E. 2023. Preclinical and clinical pharmacology of brexanolone (allopregnanolone) for postpartum depression: a landmark journey from concept to clinic in neurosteroid replacement therapy. *Psychopharmacology (Berl)*, 240, 1841-1863.
- Reddy, D. S. & Rogawski, M. A. 2000. Enhanced anticonvulsant activity of ganaxolone after neurosteroid withdrawal in a rat model of catamenial epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*, 294, 909-15.

- Richardson, R. J., Petrou, S. & Bryson, A. 2024. Established and emerging GABA(A) receptor pharmacotherapy for epilepsy. *Front Pharmacol*, 15, 1341472.
- Roberts, E. & Frankel, S. 1950. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem*, 187, 55-63.
- Rogawski, M. A., Loya, C. M., Reddy, K., Zolkowska, D. & Lossin, C. 2013. Neuroactive steroids for the treatment of status epilepticus. *Epilepsia*, 54 Suppl 6, 93-8.
- Rowley, N. M., Madsen, K. K., 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., Crestani, F., Benke, D., Brünig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Bluethmann, H. & Möhler, H. 1999. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*, 401, 796-800.
- Rudolph, U. & Knoflach, F. 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 685-97.
- Rudolph, U. & Möhler, H. 2014. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 54, 483-507.
- Sajan, S. A., Gradisch, R., Vogel, F. D., Coffey, A. J., Salyakina, D., Soler, D., Jayakar, P., Jayakar, A., Bianconi, S. E., Cooper, A. H., Liu, S., William, N., Benkel-Herrenbrück, I., Maiwald, R., Heller, C., Biskup, S., Leiz, S., Westphal, D. S., Wagner, M., Clarke, A., Stockner, T., Ernst, M., Kesari, A. & Krenn, M. 2024. De novo variants in GABRA4 are associated with a neurological phenotype including developmental delay, behavioral abnormalities and epilepsy. *European Journal of Human Genetics*.
- Sallard, E., Letourneur, D. & Legendre, P. 2021. Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell Mol Life Sci*, 78, 5341-5370.
- Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F. & Angayarkanni, J. 2020. A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Curr Microbiol*, 77, 534-544.
- Schmitz, A. 2016. Benzodiazepine use, misuse, and abuse: A review. *Ment Health Clin*, 6, 120-126.
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A. & Et Al. 1987. Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, 328, 221-7.
- Sears, S. M. & Hewett, S. J. 2021. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Exp Biol Med (Maywood)*, 246, 1069-1083.

- Seney, M. L., Tripp, A., Mccune, S., Lewis, D. A. & Sibille, E. 2015. Laminar and cellular analyses of reduced somatostatin gene expression in the subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis*, 73, 213-9.
- Sente, A., Desai, R., Naydenova, K., Malinauskas, T., Jounaidi, Y., Miehl, J., Zhou, X., Masiulis, S., Hardwick, S. W., Chirgadze, D. Y., Miller, K. W. & Aricescu, A. R. 2022. Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signalling. *Nature*, 604, 190-194.
- Shahsavari, A. & Wellendorph, P. 2023. GABA transport cycle: beyond a GAT feeling. *Nature Structural & Molecular Biology*, 30, 863-865.
- Shen, Q., Lal, R., Luellen, B. A., Earnheart, J. C., Andrews, A. M. & Luscher, B. 2010. gamma-Aminobutyric acid-type A receptor deficits cause hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and antidepressant drug sensitivity reminiscent of melancholic forms of depression. *Biol Psychiatry*, 68, 512-20.
- Sieghart, W. 1995. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev*, 47, 181-234.
- Sieghart, W. 2012. Unravelling the role of GABAA receptor subtypes in distinct neurons and behaviour. *J Physiol*, 590, 2181-2.
- Sieghart, W., Ramerstorfer, J., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z. & Ernst, M. 2012. A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha(+)$ $\beta(-)$ interface. *Br J Pharmacol*, 166, 476-85.
- Sieghart, W. & Savić, M. M. 2018. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABA(A) Receptor Subtype- and Function-selective Ligands: Key Issues in Translation to Humans. *Pharmacol Rev*, 70, 836-878.
- Sieghart, W. & Sperk, G. 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem*, 2, 795-816.
- Sieghart, R., Jurd, R. & Rudolph, U. 2002. Molecular determinants for the action of general anesthetics at recombinant $\alpha(2)\beta(3)\gamma(2)$ gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *J Neurochem*, 80, 140-8.
- Sigel, E. & Baur, R. 1988. Allosteric modulation by benzodiazepine receptor ligands of the GABAA receptor channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci*, 8, 289-95.
- Sigel, E., Baur, R., Rácz, I., Marazzi, J., Smart, T. G., Zimmer, A. & Gertsch, J. 2011. The major central endocannabinoid directly acts at GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 18150-5.
- Sigel, E. & Buhr, A. 1997. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 18, 425-9.
- Sigel, E. & Ernst, M. 2018. The Benzodiazepine Binding Sites of GABA(A) Receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 39, 659-671.

- Sigel, E. & Lüscher, B. P. 2011. A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABAA receptors. *Curr Top Med Chem*, 11, 241-6.
- Sigel, E., Mamalaki, C. & Barnard, E. A. 1982. Isolation of a GABA receptor from bovine brain using a benzodiazepine affinity column. *FEBS Lett*, 147, 45-8.
- Sigel, E. & Steinmann, M. E. 2012. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem*, 287, 40224-31.
- Sigel, E., Stephenson, F. A., Mamalaki, C. & Barnard, E. A. 1983. A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J Biol Chem*, 258, 6965-71.
- Simeone, X., Siebert, D. C. B., Bampali, K., Varagic, Z., Treven, M., Rehman, S., Pyszkowski, J., Holzinger, R., Steudle, F., Scholze, P., Mihovilovic, M. D., Schnürch, M. & Ernst, M. 2017. Molecular tools for GABA(A) receptors: High affinity ligands for β 1-containing subtypes. *Sci Rep*, 7, 5674.
- Simon, J., Wakimoto, H., Fujita, N., Lalande, M. & Barnard, E. A. 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem*, 279, 41422-35.
- Skeberdis, V. A., Chevalleyre, V., Lau, C. G., Goldberg, J. H., Pettit, D. L., Suadicani, S. O., Lin, Y., Bennett, M. V., Yuste, R., Castillo, P. E. & Zukin, R. S. 2006. Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci*, 9, 501-10.
- Smart, T. G., Constanti, A., Bilbe, G., Brown, D. A. & Barnard, E. A. 1983. Synthesis of functional chick brain GABA-benzodiazepine-barbiturate/receptor complexes in mRNA-injected *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett*, 40, 55-9.
- Smart, T. G., Houamed, K. M., Van Renterghem, C. & Constanti, A. 1987. mRNA-directed synthesis and insertion of functional amino acid receptors in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Soc Trans*, 15, 117-22.
- Smart, T. G. & Stephenson, F. A. 2019. A half century of γ -aminobutyric acid. *Brain Neurosci Adv*, 3, 2398212819858249.
- Smith, K. S., Engin, E., Meloni, E. G. & Rudolph, U. 2012. Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABAA receptor subtypes in mice. *Neuropharmacology*, 63, 250-8.
- Smith, K. S. & Rudolph, U. 2012. Anxiety and depression: mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA(A) receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 62, 54-62.
- Specchio, N., Wirrell, E. C., Scheffer, I. E., Nabbout, R., Riney, K., Samia, P., Guerreiro, M., Gwer, S., Zuberi, S. M., Wilmschurst, J. M., Yozawitz, E., Pressler, R., Hirsch, E., Wiebe, S., Cross, H. J., Perucca, E., Moshé, S. L., Tinuper, P. & Auvin, S. 2022. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset

- in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*, 63, 1398-1442.
- Stadler, M., Monticelli, S., Seidel, T., Luger, D., Salzer, I., Boehm, S., Holzer, W., Schwarzer, C., Urban, E., Khom, S., Langer, T., Pace, V. & Hering, S. 2019. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel $\beta 2/3$ Subunit-Selective γ -Aminobutyric Acid Type A (GABA(A)) Receptor Modulators. *J Med Chem*, 62, 317-341.
- Stephenson, F. A. 1995. The GABAA receptors. *Biochem J*, 310 (Pt 1), 1-9.
- Steward, F. 1949. γ -Aminobutyric acid: a constituent of potato tubers? *Science*, 110, 439-440.
- Szabo, A., Nourmahnad, A., Halpin, E. & Forman, S. A. 2019. Monod-Wyman-Changeux Allosteric Shift Analysis in Mutant $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$ GABA(A) Receptors Indicates Selectivity and Crosstalk among Intersubunit Transmembrane Anesthetic Sites. *Mol Pharmacol*, 95, 408-417.
- Tateiwa, H. & Evers, A. S. 2024. Neurosteroids and their potential as a safer class of general anesthetics. *J Anesth*, 38, 261-274.
- Tesic, V., Joksimovic, S. M., Quillinan, N., Krishnan, K., Covey, D. F., Todorovic, S. M. & Jevtovic-Todorovic, V. 2020. Neuroactive steroids alphaxalone and CDNC24 are effective hypnotics and potentiators of GABA(A) currents, but are not neurotoxic to the developing rat brain. *Br J Anaesth*, 124, 603-613.
- Todd, E., Gurba, K. N., Botzolakis, E. J., Stanic, A. K. & Macdonald, R. L. 2014. GABAA receptor biogenesis is impaired by the $\gamma 2$ subunit febrile seizure-associated mutation, GABRG2(R177G). *Neurobiol Dis*, 69, 215-24.
- Tossell, K., Dodhia, R. A., Galet, B., Tkachuk, O. & Ungless, M. A. 2021. Tonic GABAergic inhibition, via GABA(A) receptors containing $\alpha \beta \epsilon$ subunits, regulates excitability of ventral tegmental area dopamine neurons. *Eur J Neurosci*, 53, 1722-1737.
- Vogel, F. D., Krenn, M., Westphal, D. S., Graf, E., Wagner, M., Leiz, S., Koniuszewski, F., Augé-Stock, M., Kramer, G., Scholze, P. & Ernst, M. 2022. A de novo missense variant in GABRA4 alters receptor function in an epileptic and neurodevelopmental phenotype. *Epilepsia*, 63, e35-e41.
- Walters, R. J., Hadley, S. H., Morris, K. D. & Amin, J. 2000. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci*, 3, 1274-81.
- Whiting, P., Mckernan, R. M. & Iversen, L. L. 1990. Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma 2 phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9966-70.
- Wingrove, P. B., Thompson, S. A., Wafford, K. A. & Whiting, P. J. 1997. Key amino acids in the gamma subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site. *Mol Pharmacol*, 52, 874-81.

- Woll, K. A., Zhou, X., Bhanu, N. V., Garcia, B. A., Covarrubias, M., Miller, K. W. & Eckenhoff, R. G. 2018. Identification of binding sites contributing to volatile anesthetic effects on GABA type A receptors. *FASEB J*, 32, 4172-4189.
- Wongsamitkul, N., Maldifassi, M. C., Simeone, X., Baur, R., Ernst, M. & Sigel, E. 2017. α subunits in GABAA receptors are dispensable for GABA and diazepam action. *Scientific Reports*, 7, 15498.
- Zeilhofer, H. U., Möhler, H. & Di Lio, A. 2009. GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 397-402.
- Zhang, W., Xiong, B. R., Zhang, L. Q., Huang, X., Yuan, X., Tian, Y. K. & Tian, X. B. 2021. The Role of the GABAergic System in Diseases of the Central Nervous System. *Neuroscience*, 470, 88-99.
- Zhou, Y. & Danbolt, N. C. 2013. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 165.
- Zhu, S., Sridhar, A., Teng, J., Howard, R. J., Lindahl, E. & Hibbs, R. E. 2022. Structural and dynamic mechanisms of GABA(A) receptor modulators with opposing activities. *Nat Commun*, 13, 4582.
- Ziemba, A. M., Szabo, A., Pierce, D. W., Haburcak, M., Stern, A. T., Nourmahnad, A., Halpin, E. S. & Forman, S. A. 2018. Alphaxalone Binds in Inner Transmembrane β - α -Interfaces of $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors. *Anesthesiology*, 128, 338-351.