



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Identifikation neuer Modulatoren des GABAA-Rezeptors, die
nicht an der Benzodiazepin-Bindungsstelle wirken

verfasst von | submitted by

Katharina Neßmerak 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

Mein Dank gilt an erster Stelle Ass.-Prof. Mag. Dr. Sophia Khom-Steinkellner. Ich habe bereits bei der Bachelorarbeit von ihrer kompetenten Betreuung profitieren dürfen und mich deswegen sehr gefreut, dass sie mir auch die Möglichkeit geboten hat, meine Masterarbeit bei ihr zu schreiben. Durch ihre aufbauenden Worte, stetige Hilfsbereitschaft sowie ihre Begeisterung über gute Ergebnisse habe ich stets die Freude an der praktischen Arbeit beibehalten, von ihrer lösungsorientierten und oftmals kreativen Denkweise durfte ich sehr viel lernen.

Von Herzen möchte ich mich auch bei Marina Gehrman für den Zusammenhalt bedanken. Gemeinsam haben wir sowohl in Zusammenhang mit der Masterarbeit als auch prüfungstechnisch die letzten Meter unseres Studiums gemeistert, uns gegenseitig motiviert und dürfen nun auch unseren Abschluss zusammen erleben. An diese Zeit werde ich immer gerne zurückdenken.

Für die Bereitstellung der Oozyten möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. Alexandra Garifulina MSc bedanken.

Bei Frau Dr. Anke Wilhelm (Universität Blomfontein, Südafrika) bedanke ich mich ebenfalls herzlichst für die Bereitstellung der Extrakte und Reinstoffe, die ich untersucht habe.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde. Oft musste ich bei Geburtstagsfeiern oder geplanten Treffen absagen, weil es sich mit dem Lernen nicht ausging. Ihr habt mir immer Verständnis entgegengebracht, mir stets ein offenes Ohr für mein Jammern geschenkt: Auch dank euch stehe ich jetzt hier und darf mein Pharmaziestudium abschließen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie – Mama, Papa, Oma, Opa und Tante Gitti – für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken. Es gab doch immer wieder Phasen, in denen ich mir meiner Studienwahl nicht mehr ganz so sicher war und an mir gezweifelt habe. Dank ihrer motivierenden Worte und Geduld habe ich es jedoch jedes Mal geschafft, den Ehrgeiz zu finden, um weiterzumachen.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Freund und meinem Bruder bedanken. Sie waren einfach immer für mich da – egal, ob in verzweifelten Lernphasen vor der Prüfung, Daumen drückend währenddessen oder danach, wenn ich auf ein gutes Ergebnis gehofft habe. Auch während meiner Masterarbeit konnte ich stets auf ihre Unterstützung zählen. Danke für alles, ich hab euch lieb!

Zusammenfassung

Hintergrund: Eine Dysbalance der exzitatorischen und inhibitorischen, synaptischen Neurotransmission im Gehirn, vermittelt durch die Neurotransmitter Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA), führt zu neurologischen und neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Epilepsie, Schlafstörungen oder Angsterkrankungen. Die ionotropen GABA_A-Rezeptoren sind somit wichtige Arzneistofftargets. Jedoch ist die Anwendung klassischer GABA_A-Rezeptor-Modulatoren wie der Benzodiazepine in der Praxis auch mit zahlreichen negativen Effekten wie Toleranzentwicklung, Abhängigkeit und Substanzmissbrauch assoziiert. Daher ist es wichtig, nach neuen Scaffolds zu suchen, die GABA_A-Rezeptoren modulieren, diese Nachteile aber nicht mit sich bringen und über andere Mechanismen zu einer Verstärkung der GABAergen Aktivität führen.

Zielsetzung: Im Zuge meiner Masterarbeit sollte die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch ausgewählte Extrakte und isolierte Reinstoffe untersucht werden.

Materialien und Methoden: GABA_A-Rezeptoren ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$) wurden in Oozyten des *Xenopus laevis* Frosches exprimiert und die Effekte der Extrakte bzw. Reinstoffe auf I_{GABA} mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht.

Ergebnisse: Während kein Extrakt eine positive Modulation von I_{GABA} zeigte, konnten 5 der untersuchten Reinstoffe als neue GABA_A-Rezeptor-Modulatoren identifiziert werden. Die Reinstoffe B und HO zeigten eine konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} , wobei ihre modulatorische Aktivität nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt wurde.

Diskussion: Substanzen, deren Wirkung nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt wird, sind vielversprechende Scaffolds zur Entwicklung neuer ZNS-aktiver Wirkstoffe. Weiterführende Untersuchungen sollen daher das pharmakologische Profil der identifizierten Substanzen erstellen und auch das therapeutische Potential dieser Substanzen austesten.

Abstract

Background: An imbalance of excitatory and inhibitory synaptic activity in the brain, mediated by the neurotransmitters glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA), leads to neurological and neuropsychiatric disorders such as epilepsy, insomnia or anxiety disorders. Ionotropic GABA_A receptors are therefore important drug targets. However, the use of classical GABA_A receptor modulators, such as benzodiazepines, is also associated with numerous negative effects in practice, including tolerance development, dependence, and substance abuse. Therefore, it is important to search for new scaffolds that modulate GABA_A receptors and thus inhibitory GABAergic activity via distinct mechanisms.

Objective: The aim of my master's thesis was to investigate the modulation of GABA-induced chloride currents (I_{GABA}) by selected extracts and isolated pure compounds.

Materials and Methods: GABA_A receptors ($\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$) were expressed in *Xenopus laevis* frog oocytes, and the effects of the extracts and pure compounds on I_{GABA} were investigated using the two-electrode voltage-clamp technique.

Results: While none of the extracts showed positive modulation of I_{GABA} , five of the pure compounds tested were identified as new GABA_A receptor modulators. Pure compounds B and HO showed a concentration-dependent modulation of I_{GABA} , with their modulatory activity not being mediated via the benzodiazepine-binding site.

Discussion: GABA_A receptor modulators whose effects are not mediated via the benzodiazepine-binding site are promising scaffolds for the development of new CNS-active drugs targeting inhibitory neurotransmission. Further studies should therefore establish the pharmacological profile of the identified substances and also test their therapeutic potential.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis	1
I. Allgemeine Informationen	4
1. GABA	4
2. GABA-aktivierte Rezeptoren	5
2.1. Historie	5
2.2. GABA _A -Rezeptoren	5
2.2.1. Aufbau	5
2.2.1.1. Gene	5
2.2.1.2. Untereinheiten	7
2.2.1.3. Struktur	8
2.2.2. Physiologische Rolle des GABA _A -Rezeptors	10
2.2.2.1. Synaptische und extrasynaptische GABA _A -Rezeptoren	10
2.2.2.2. Physiologische Funktion des GABA _A -Rezeptors	12
2.2.2.3. Tonische und phasische Inhibition	15
2.3. GABA _B -Rezeptoren	17
2.4. GABA _A -p-Rezeptoren	18
3. Bindungsstellen des GABA _A -Rezeptors und deren Liganden	19
3.1. GABA-Bindungsstellen	19
3.1.1. GABA	20
3.1.2. Bicucullin	21
3.2. Benzodiazepin-Bindungsstelle	22
3.2.1. Benzodiazepine	24
3.2.1.1. Vorteile	27
3.2.1.2. Nachteile	27
3.3. Barbiturat-Bindungsstellen	29
3.3.1. Barbiturate	30

3.4.	Neurosteroid-Bindungsstellen	31
3.4.1.	Neurosteroide.....	33
4.	Der GABA _A -Rezeptor als Target zur Behandlung neurologischer und neuropsychiatrischer Erkrankungen.....	34
4.1.	Epilepsie	35
4.2.	Depression.....	38
II.	Fragestellung.....	41
III.	Materialien und Methoden	42
1.	Hintergrundinformationen	42
2.	Präparation der Oozyten.....	42
3.	Injektion der cRNA.....	45
4.	Herstellung der Messlösungen.....	46
5.	2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Substanzapplikation	46
6.	Auswertung und statistische Analyse	47
7.	Statistische Auswertung.....	48
IV.	Ergebnisse	49
1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von GABA	49
2.	Extrakte	50
2.1.	Modulation von I _{GABA} durch die Extrakt-Serie I.....	50
2.2.	Modulation von I _{GABA} durch die Extrakt-Serie II.....	51
2.3.	Modulation von I _{GABA} durch die Extrakt-Serie III.....	53
3.	Reinstoffe	54
3.1.	Modulation von I _{GABA} durch die Reinstoffe B, C, D, E1 und E2	54
3.1.1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Reinstoffes B.....	56
3.1.2.	Flumazenil reduziert die Wirkung von Diazepam auf I _{GABA}	57
3.1.3.	Reinstoff B interagiert nicht mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle.....	59
3.2.	Modulation von I _{GABA} durch die Reinstoffe TVGR1, DHP, NTH, E22, ET2 und DMH2160	
3.3.	Modulation von I _{GABA} durch die Reinstoffe M3, DMA22, E21 und M1.....	61
3.4.	Modulation von I _{GABA} durch die Reinstoffe AWD1, AWM1, DHHB, HO und THH.....	63

3.4.1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Reinstoffes HO.....	65
3.4.2.	I_{GABA} Potenzierung durch HO wird nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt	66
V.	Diskussion.....	68
	Literaturverzeichnis	70

I. Allgemeine Informationen

1. GABA

Die γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der primäre inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren (Kim and Hibbs, 2021) und wirkt als solcher in 20-50 % aller neuronalen Synapsen (Sieghart et al., 1999; Sills and Rogawski, 2020). Es handelt sich um eine nicht-proteinogene, hydrophile Aminosäure (Olsen et al., 1999; Chuang and Reddy, 2018), die im Jahr 1949 erstmals in Pflanzen und ein Jahr darauf auch im Gehirn von Säugetieren entdeckt wurde. 1960 wurde schließlich die Rolle von GABA in der Neurotransmission bekannt (Sarasa et al., 2020).

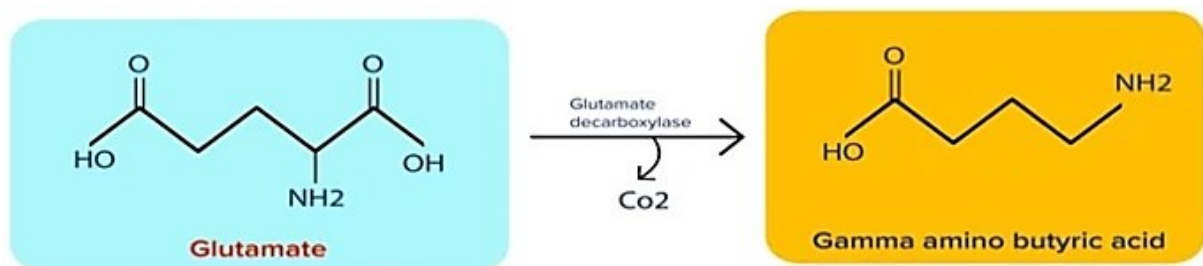


Abbildung 1: Entstehung von GABA durch die α -Decarboxylierung von Glutamat (Sarasa et al., 2020)

Die Synthese von GABA erfolgt über die irreversible α -Decarboxylierung des exzitatorischen Neurotransmitters L-Glutamat (Sarasa et al., 2020), katalysiert durch die L-Glutamat-Decarboxylase (GAD) (Bak et al., 2006; Sarasa et al., 2020). Diese ist in inhibitorischen Interneuronen sowie in Astrozyten vorhanden (Bryson et al., 2023) und benötigt Pyridoxalphosphat als Cofaktor (Sears and Hewett, 2021). GABA kommt auch im peripheren Nervensystem sowie in endokrinen und nicht-neuralen Geweben im Zusammenhang mit dem oxidativen Metabolismus vor (Sarasa et al., 2020): Dort erfolgt die Synthese jedoch über die GAD67 (Sears and Hewett, 2021), während GABA für die klassische Neurotransmission über die GAD65, die in präsynaptischen Nervenendigungen lokalisiert ist, entsteht. Die beiden Isoformen unterscheiden sich neben ihrer Lokalisation auch in ihren posttranslationalen Modifikationen sowie in ihrer Regulation: So wird die GAD65 beispielsweise palmitoyliert, um die selektive präsynaptische Verteilung zu fördern. Zudem wird sie im Gegensatz zur GAD67, die durch die Proteinkinase A (PKA) inaktiviert wird, durch die Proteinkinase C ϵ (PKC ϵ) aktiviert. Diese transloziert dafür in die synaptischen Nervenendigungen, um dort die GAD65-assoziierte GABA-Synthese und damit die synaptische Transmission zu steigern (Bryson et al., 2023). Die Phosphorylierung der GAD65 sowie der GAD67 durch die Proteinkinasen spielt somit eine entscheidende Rolle für deren Aktivität (Lee et al., 2019). Mittels synaptischer Vesikel und dem spezifischen vesikulären Transporter – dem *vesicular GABA transporter* (vGAT) – wird GABA schließlich freigesetzt (Sears and Hewett, 2021) und kann als Agonist an

GABA_A- oder GABA_B-Rezeptoren binden (Bormann, 2000; Sigel and Steinmann, 2012; Zhu et al., 2018).

2. GABA-aktivierte Rezeptoren

2.1. Historie

Im Jahr 1982 konnte neben einem Glycin-aktivierbaren Rezeptor (Pfeiffer et al., 1982) auch erstmals ein GABA-aktivierbarer Rezeptor durch die Bindung von Muscimol unter Verwendung einer Benzodiazepin-Affinitätssäule aufgereinigt werden (Sigel et al., 1982). Im Zuge der weiteren Forschung stellte sich heraus, dass sich die Bindungsstelle für den Agonisten GABA auf demselben Proteinkomplex befindet wie die der Benzodiazepine. Daraufhin wurde der Rezeptor vorerst in die beiden Untereinheiten α und β unterteilt (Sigel et al., 1983). Erst durch die fälschliche Annahme, Benzodiazepine hätten auf genau diesen beiden ebenfalls ihre Bindungsstelle, zeigte sich, dass es weitere Untereinheiten mit spezifischen Funktionen gibt (Sigel and Steinmann, 2012).

2.2. GABA_A-Rezeptoren

2.2.1. Aufbau

Der GABA_A-Rezeptor gehört zur Superfamilie der pentameren, ligandengesteuerten Ionenkanäle (pLGIC, Abkürzung für *pentameric ligand-gated ion channels*) (Scott and Aricescu, 2019) vom Cys-Schleifen-Typ (Sieghart et al., 1999; Sigel and Steinmann, 2012), zu der beispielsweise auch die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nACh), die Glycinrezeptoren oder die 5-Hydroxytryptamin-Typ-3 (5-HT₃)-Rezeptoren gehören (Sieghart et al., 1999; Kim and Hibbs, 2021). Es handelt sich um einen ionotropen Rezeptor (Heaney and Kinney, 2016), der strukturell aus fünf Untereinheiten besteht, die um eine zentrale Pore herum angeordnet sind (Kim and Hibbs, 2021). Diese bildet einen integralen Chloridkanal (Möhler, 2006; Cellot and Cherubini, 2014). Während die nACh-Rezeptoren zu den kationenselektiven Rezeptoren gehören und für Natrium-, Kalium- sowie Calciumionen durchlässig sind (Terry et al., 2023), sind sowohl die Glycin- als auch die GABA_A-Rezeptoren anionenselektiv. Neben Chloridionen sind sie auch für Bicarbonationen permeabel (Sigel and Steinmann, 2012).

2.2.1.1. Gene

Insgesamt gibt es 19 Gene, die für die 19 verschiedenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors kodieren (Simon et al., 2004; Olsen and Sieghart, 2009; Chuang and Reddy, 2018; Knoflach and Bertrand, 2021) und sich in acht Familien oder Klassen unterteilen lassen (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π und ρ) (Scott and Aricescu, 2019). Mit dieser genetischen Ausstattung ist der GABA_A-Rezeptor der vielfältigste unter den Ionenkanalrezeptoren (Simon et al., 2004). Vor

Millionen Jahren führte die Duplikation der Gene der Vorfahren des Menschen zum erstmaligen Auftreten dieser Familien und später zur Ausbildung der verschiedenen Isoformen (Sallard et al., 2021). Jede dieser Untereinheiten wurde hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, Lokalisation sowie ihres Expressionsniveaus untersucht, wobei nach wie vor unklar ist, wie so viele verschiedene Isoformen mitunter in einer einzigen Zelle präsent sein können (Ghit et al., 2021). Innerhalb einer Familie sind sich die einzelnen Isoformen ähnlich: Deren Aminosäuresequenzen stimmen zu 70-80 % miteinander überein. Beim Vergleich der Isoformen verschiedener Familien liegt dieser Prozentsatz nur bei 30-40 % (Sallard et al., 2021).

Theoretisch könnten basierend auf der Zahl der Untereinheiten 495.235 unterschiedliche GABA_A-Rezeptor-Subtypen gebildet werden (Sente et al., 2022), in der Praxis wird von rund 500 funktionalen Subtypen ausgegangen (Sallard et al., 2021). Die Gene jener Untereinheiten, die zusammen einen spezifischen Subtyp bilden, befinden sich meist auf demselben Chromosom (Knoflach and Bertrand, 2021) und liegen als Gen-Cluster vor (Chuang and Reddy, 2018). Die spezifischen Expressionsmuster jeder einzelnen Untereinheit bestimmen in ihrer Gesamtheit, wie sich die einzelnen Untereinheiten zu einem GABA_A-Rezeptor anordnen, ob dieser intra- oder subzellulär lokalisiert ist sowie dessen Häufigkeit (Martenson and Tomita, 2015; Sallard et al., 2021).

Die Genexpression kann an verschiedenen Punkten reguliert und gegebenenfalls erhöht werden, wie beispielsweise bei der Initiation der Transkription oder der Translation. Auch die Stabilität der zu translatierenden mRNA gilt als entscheidender Faktor bei der Bildung neuer GABA_A-Rezeptoren, ebenso wie verschiedene posttranslationale Modifikationen (Steiger and Russek, 2004; Barker and Hines, 2020). Das alternative Spleißen wird diesbezüglich als hauptsächlich beeinflussender Faktor vermutet, da dadurch die Diversität der Untereinheiten ebenfalls erhöht werden kann: Ein Beispiel dafür ist die γ -Untereinheit, die in den Isoformen γ_{2L} und γ_{2S} vorkommen kann und aufgrund der zusätzlichen Phosphorylierungsstelle in der γ_{2L} -Variante mit unterschiedlicher Modulierbarkeit der Rezeptoraktivität assoziiert wird (Simon et al., 2004; Sallard et al., 2021). Auch andere Faktoren wie beispielsweise Sport oder die Einnahme von Arzneistoffen können die Rezeptorexpression und damit die -funktion beeinflussen: So wurde beispielsweise im Rahmen einer Studie eine signifikante Erhöhung der GAD65-Aktivität nach aerobem Ausdauertraining festgestellt, welche zu einer Verstärkung der GABAergen Inhibition führte (Ferreira-Junior et al., 2019). Im Rahmen einer anderen Studie wurde nach Einnahme des 5 α -Reduktase-Hemmers Finasterid eine Reduktion der Amplitude von tonischen GABA_A-Strömen beobachtet: Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass Neurosteroiden, an deren Bildung oder Umwandlung die 5 α -Reduktase beteiligt ist, nicht gebildet werden: Ein Beispiel dafür ist Progesteron, das unter Beteiligung der 5 α -Reduktase in Allopregnanolon umgewandelt wird. Dieses fungiert als potenter Modulator

des GABA_A-Rezeptors, wie in Kapitel 3.4.1 näher erläutert wird (Littlejohn et al., 2019; Knoflach and Bertrand, 2021).

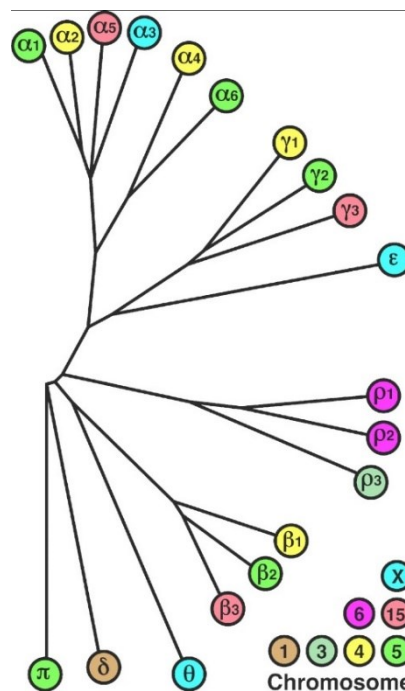


Abbildung 2: Eine Stammbaum-Analyse der 19 Gene, die für die Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors kodieren (Sigel and Steinmann, 2012)

Bei bestimmten Erkrankungen kann es zu Veränderungen des Expressionsmusters kommen. Beispielsweise konnten im Zusammenhang mit Epilepsie bereits einige Mutationen für Gene identifiziert werden, die für die verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten kodieren (Chuang and Reddy, 2018).

2.2.1.2. Untereinheiten

Es gibt sechs α -Untereinheiten (α_1 - α_6), je drei β -, γ - und ρ -Untereinheiten (β_1 - β_3 , γ_1 - γ_3 und ρ_1 - ρ_3) sowie je eine δ -, ϵ -, π - und θ -Untereinheit (Hannan et al., 2020). *In vivo* setzt sich die Mehrheit der GABA_A-Rezeptoren aus mindestens drei verschiedenen Klassen der Untereinheiten zusammen (Sallard et al., 2021). Binäre Rezeptoren, die nur aus zwei Untereinheiten bestehen, kommen unter nativen Bedingungen ebenfalls vor. In Expressionssystemen, die häufig in der biomedizinischen Forschung verwendet werden, hängt die Expressionseffizienz maßgeblich davon ab, welchen Klassen die Untereinheiten angehören: Während $\alpha\beta$ -Rezeptoren gut exprimieren, gestaltet sich die Expression der $\alpha\gamma$ - oder $\beta\gamma$ -Rezeptoren schwieriger. GABA_A-Rezeptoren können auch aus vier verschiedenen Untereinheiten bestehen, beispielsweise aus einer α , zwei β - und einer γ -Untereinheit (Sieghart and Sperk, 2002; Che Has et al., 2016; Lian et al., 2020; Mohamad et al., 2023).

Der am häufigsten exprimierte GABA_A-Rezeptor-Subtyp besteht aus zwei α -, zwei β - sowie einer non- α -non- β -Untereinheit (Scott and Aricescu, 2019). Diese ist meist eine γ - oder eine δ -Untereinheit, wobei 90 % der Rezeptoren eine γ -Untereinheit enthalten (Chuang and Reddy, 2018). Der vorherrschende Subtyp im Gehirn ist mit 60 % der $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptor (Scott and Aricescu, 2019; Knoflach and Bertrand, 2021).

Die Rolle der α -Untereinheit in der Vermittlung spezifischer Effekte der therapeutisch eingesetzten GABA_A-Rezeptor-Modulatoren wie der Eigenschaften des Rezeptors sind gut untersucht: Während etwa α_1 ubiquitär im Gehirn vorkommt und gleichzeitig am häufigsten exprimiert wird (Barker and Hines, 2020), kommt α_2 im Hippocampus (Hörtnagl et al., 2013) und Vorderhirn vor. Die α_3 -Untereinheit ist im Kortex (Barker and Hines, 2020), Thalamus und ebenfalls Hippocampus vertreten. α_4 kommt vor allem im Thalamus und Striatum vor, α_5 wiederum im Hippocampus und α_6 ist im Cerebellum vertreten (Hörtnagl et al., 2013). Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften sowie in der Affinität zum Agonisten GABA wurden abhängig von den α -Untereinheiten ebenfalls beobachtet (Eyre et al., 2012).

Abhängig vom Subtyp kann GABA auch eine unterschiedlich starke Leitfähigkeit induzieren: So weisen beispielsweise $\alpha\beta$ -Rezeptoren eine niedrigere Leitfähigkeit im Vergleich zu $\alpha\beta\gamma$ - oder $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren auf. Zudem hängt auch die Potenz von GABA von der jeweiligen Untereinheiten-Kombination ab (Mortensen et al., 2011): Enthält der GABA_A-Rezeptor beispielsweise eine γ -Untereinheit, bindet GABA typischerweise mit einer niedrigeren Affinität. Jene Rezeptoren desensibilisieren auch schneller. Ist hingegen eine δ -Untereinheit vorhanden, ist die Affinität, mit der GABA bindet höher und die Desensibilisierung langsamer (Sente et al., 2022).

2.2.1.3. Struktur

Die einzelnen Untereinheiten besitzen ähnliche topologische Eigenschaften, wobei sie zwischen 420 bis 632 Aminosäuren lang sind und ein Gewicht zwischen 52 und 59 kDa haben (Sallard et al., 2021). Jede einzelne Untereinheit enthält eine N-terminale, extrazelluläre, hydrophile Region (Olsen and Sieghart, 2009; Sigel and Steinmann, 2012), die glykosyliert werden kann (Sallard et al., 2021). In diesem Zusammenhang wird von der 200 bis 250 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne (ECD) gesprochen (Miller and Aricescu, 2014): Sie startet mit einer N-terminalen α -Helix (Zhu et al., 2018), auf der sich der bereits erwähnte, für diese Rezeptorfamilie charakteristische Cys-loop befindet (Cederholm et al., 2009; Miller and Smart, 2010; Miller and Aricescu, 2014). Es handelt sich hier um eine auf jeder Untereinheit vorkommende, in der Regel 13 Aminosäuren lange Schleife zwischen zwei Cysteinresten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Thompson et al., 2010; Sigel and Steinmann, 2012). Auf diese folgen zehn beta-Stränge, die zu einem β -Sandwich zusammengefaltet sind, bevor die vier anschließenden α -Helices bereits die an die

ECD anschließenden Transmembrandomänen TMD1-TMD4 bilden (Olsen and Sieghart, 2009; Chuang and Reddy, 2018; Zhu et al., 2018). Der C-Terminus liegt wie der N-Terminus extrazellulär vor (Sigel and Steinmann, 2012).

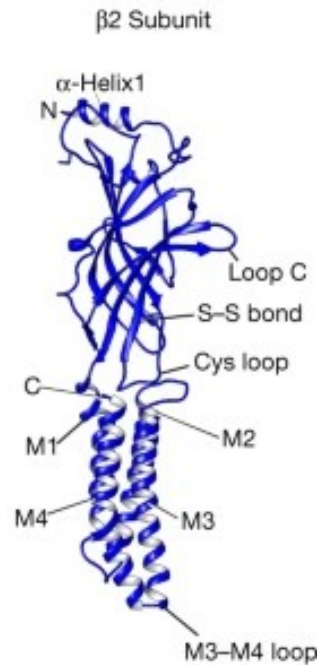


Abbildung 3: 3D-Struktur einer einzelnen β_2 -Untereinheit (Zhu et al., 2018)

Die TMD2 aller Untereinheiten bilden gemeinsam den Ionenkanal und zwischen der TMD3 und der TMD4 befindet sich eine große, intrazelluläre Schleife (Olsen and Sieghart, 2009; Sigel and Steinmann, 2012). Diese ist zwischen 85 und 255 Aminosäuren lang (Miller and Aricescu, 2014) und für die Regulation der Rezeptorfunktion entscheidend, da der wichtigste Mechanismus der Internalisierung von GABA_A-Rezeptoren auf der Interaktion der Schleife mit dem Clathrin-Adapter-Protein-2 (AP2)-Komplex beruht. Sind die Regionen des GABA_A-Rezeptors, an die der AP2-Komplex bindet, phosphoryliert, wird diese Interaktion verhindert. Daraus folgt eine Erhöhung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche und damit eine effektivere inhibitorische synaptische Transmission (Jacob et al., 2008).

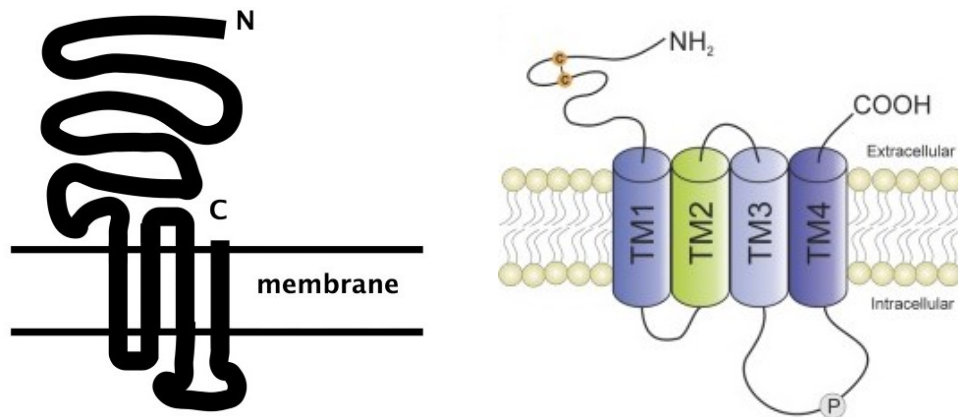


Abbildung 4: Links: Eine schematische Darstellung eines GABA_A-Rezeptors, einem integralen Membranprotein (Sigel and Steinmann, 2012) **Rechts:** Die vier Transmembransequenzen TMD1-TMD4 einer Untereinheit mit dem kurzen C- und dem langen N-Terminus. Zwischen der TMD3 und der TMD4 ist die große, intrazelluläre Schleife zu sehen (Chuang and Reddy, 2018)

Im Rahmen einer Studie wurde der GABA_A-Rezeptor als Komplex mit Fab-Fragmenten aufgereinigt und dreidimensional rekonstruiert: Neben der zylindrischen Form des Rezeptors, die sich durch die Zusammenlagerung der TMD2-Segmente ergibt, konnte so auch die pseudosymmetrische Anordnung der fünf Untereinheiten gezeigt werden (Zhu et al., 2018). Die einzelnen Untereinheiten werden vom synaptischen Spalt aus betrachtet entgegen dem Uhrzeigersinn benannt (Baur et al., 2006).

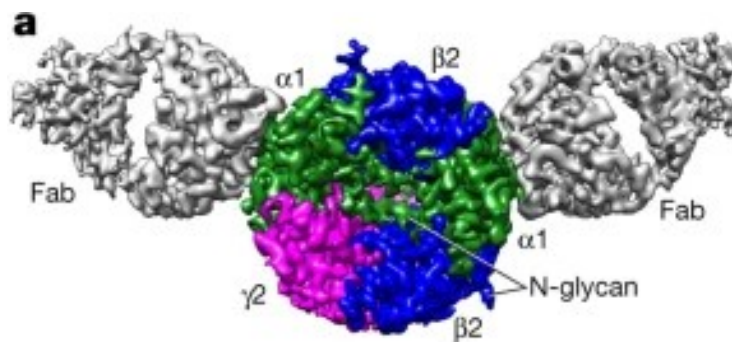


Abbildung 5: Blick von oben auf die 3D-Rekonstruktion eines GABA_A-Rezeptors mit den abstehenden Fab-Fragmenten. Die Untereinheiten-Komposition entgegen dem Uhrzeigersinn lautet β_2 - α_1 - β_2 - α_1 - γ_2 (Zhu et al., 2018), wobei es sich hier um die häufigste Isoform in Erwachsenen handelt (Baur et al., 2006)

2.2.2. Physiologische Rolle des GABA_A-Rezeptors

2.2.2.1. Synaptische und extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren kommen überwiegend im, jedoch auch in Organen außerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems vor (Sigel and Ernst, 2018). Sie befinden sich sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zellen, wobei sie in ersteren in den Dendriten, im

Zellkörper und ebenfalls in den Axonen identifiziert wurden (Sallard et al., 2021). GABAerge Neurone befinden sich beispielsweise im Neocortex, Cerebellum, Hippocampus, Hirnstamm, Bulbus olfactorius, in der Retina sowie in den Basalganglien (Sears and Hewett, 2021). Zu den nicht-neuronalen GABAergen Zellen gehören unter anderem die endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln, der Plazenta und des Nebennierenmarks sowie die glatten Muskelzellen der Harnblase und der Gebärmutter (Hedblom and Kirkness, 1997). GABA_A-Rezeptoren in nicht-neuronalen Zellen bergen ebenfalls therapeutisches Potential: So wird beispielsweise an GABA_A-Rezeptoren in der glatten Muskulatur der Atemwege geforscht, da diese als Target in der Therapie von Spasmen bei Asthma bronchiale fungieren könnten (Sigel and Ernst, 2018). Im Immunsystem sind sie ebenfalls vertreten: GABA wird von den Immunzellen synthetisiert und Antigen-präsentierende Zellen exprimieren die entsprechenden funktionalen GABA_A-Rezeptoren. Potenziell könnte sich die Manipulation der immunologischen GABA-Signaltransduktion positiv in der Therapie von Multipler Sklerose oder autoimmuner Enzephalomyelitis auswirken (Bhat et al., 2010).

Im Gehirn werden GABA_A-Rezeptoren grundsätzlich hinsichtlich ihrer Lokalisation in synaptische und extrasynaptische Rezeptoren unterteilt (Mortensen et al., 2011; Chuang and Reddy, 2018). Sie differieren unter anderem hinsichtlich ihrer Affinität und Wirksamkeit gegenüber GABA, ihrer Desensibilisierungsrate oder auch in der Wirkung von Benzodiazepinen oder Neurosteroiden (Mortensen et al., 2011; Chuang and Reddy, 2018).

Wie bereits in Kapitel 2.2.1.2 kurz angesprochen, kommen die einzelnen Untereinheiten bevorzugt in bestimmten Regionen vor. So ist beispielsweise die δ -Untereinheit ausschließlich extrasynaptisch zu finden (Chuang and Reddy, 2018; Ghit et al., 2021). α_1 -, α_2 -, α_3 - und β_3 - (Olsen, 2018; Ghit et al., 2021) sowie insbesondere γ_2 -Untereinheiten überwiegen in synaptischen, α_4 -, α_5 -, α_6 -, γ_1 - und γ_3 -Untereinheiten wiederum in extrasynaptischen Regionen (Sallard et al., 2021). Die beiden Untereinheiten ρ_1 und ρ_2 sind mit ihren spezifischen Expressionsmustern vor allem in der Retina zu finden.

Spezifische Rezeptor-Subtypen, wie beispielsweise $\alpha_5\beta_3\gamma_2$, $\alpha_4\beta_3\delta$ oder $\alpha_6\beta_3\delta$, werden zu einem großen Anteil extrasynaptisch exprimiert und fungieren dort als zusätzlicher Regulationsmechanismus der neuronalen Aktivitäten (Knoflach and Bertrand, 2021).

	Synaptic GABA-A Receptors	Extrasynaptic GABA-A Receptors
Subunits	Pentamer ($\gamma 2$ -containing)	Pentamer (δ -containing)
Inhibition	Phasic	Tonic
GABA affinity	Low	High
GABA efficacy	High	Low
Desensitization	Pronounced	Moderate/low
Benzodiazepines	Sensitive	Insensitive
NSs	Potentiated	Highly potentiated
Low $[Zn^{2+}]$ blockade	N	Y
Distribution	Highly prevalent	Highly specific regional (e.g., hippocampus, neocortex, thalamus, hypothalamus, cerebellum)

Abbildung 6: Tabellarischer Vergleich zwischen synaptischen ($\alpha\beta\gamma_2$) und extrasynaptischen ($\alpha\beta\delta$) GABA_A-Rezeptoren anhand spezifischer Charakteristika (Chuang and Reddy, 2018)

Der Unterschied zwischen tonischer und phasischer Inhibition wird in Kapitel 2.2.2.3 erläutert.

2.2.2.2. Physiologische Funktion des GABA_A-Rezeptors

Ein Gleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Aktivität im Gehirn (Bryson et al., 2023) ist essentiell für eine effiziente Informationsverarbeitung auf der zellulären und der Netzwerkebene (Sears and Hewett, 2021). Im Zuge dessen wird auch von der sogenannten E/I-Balance gesprochen, die für die neuronalen Funktionen entscheidend ist. „E“ steht dabei für die exzitatorische, „I“ für die inhibitorische Aktivität. Besonders in den kortikalen Regionen des Gehirns führt eine E/I-Dysbalance zu kognitiver Dysfunktion und damit zur Entstehung diverser neurologischer und neuropsychiatrischer Erkrankungen (Zhou and Yu, 2018). Verantwortlich dafür ist häufig eine Dysfunktion der GABA_A-Rezeptoren (Masiulis et al., 2019). Liegen dieser Mutationen in den Genen, die für die GABA_A-Rezeptoren kodieren, zugrunde (Planells-Cases and Jentsch, 2009), werden die daraus resultierenden Krankheiten auch als Kanalopathien bezeichnet. Beispiele dafür sind Epilepsie, Schlaflosigkeit, Angststörungen oder Schizophrenie (Planells-Cases and Jentsch, 2009; Zhou and Yu, 2018; Masiulis et al., 2019).

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, vermittelt GABA die inhibitorische synaptische Transmission. Durch Fusion der GABA speichernden Vesikel mit der neuronalen Membran wird GABA per Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt (Sarasa et al., 2020), wobei dieser Prozess entweder spontan oder als Reaktion auf Membrandepolarisationen ausgelöst werden kann.

Die synaptischen Vesikel, die GABA enthalten, werden dabei in zwei verschiedene Pools unterteilt (Bryson et al., 2023): Aus ersterem erfolgt die Freisetzung aufgrund kurzer Depolarisationen leicht (Hablitz et al., 2009), weswegen dieser als *readily releasable pool* (RRP) bezeichnet wird (Hablitz et al., 2009; Koppensteiner et al., 2024). Der Reservepool (*reserve pool*, abgekürzt RP) hingegen wird erst nach Entleerung des RRP entweder durch anhaltende oder sich wiederholende Depolarisationen mobilisiert (Hablitz et al., 2009). Reguliert wird die Freisetzung der Vesikel in den präsynaptischen Nervenendigungen durch Synapsine (Song and Augustine, 2016). Die Exozytose selbst kann sich schließlich sehr schnell, innerhalb von Hunderten Mikrosekunden als Reaktion auf einen Calcium-Einstrom entwickeln und wird durch den präsynaptischen *soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion* (NSF) *attachment protein receptor*-Komplex (SNARE-Komplex) vermittelt. Dessen Dysfunktion trägt daher ebenfalls maßgeblich zur Entwicklung neurologischer Erkrankungen wie Epilepsie bei (Littleton et al., 2001; Bryson et al., 2023).

Die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt, die sonst im mikromolaren Bereich liegt, steigt durch die Exozytose mehrerer tausend GABA-Moleküle in den niedrig millimolaren Bereich an (Bryson et al., 2023). Die Wirkung erfolgt schlussendlich über die Bindung an postsynaptische GABA_A-Rezeptoren (Sarasa et al., 2020): Wenn GABA an die vorgesehenen Bindungsstellen bindet, kommt es bedingt durch eine asymmetrische Rotation der fünf ECDs entgegen dem Uhrzeigersinn zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Diese Rotation wird auf die TMDs übertragen, wodurch sich verschiedene Variationen in der Öffnung des zentralen Chloridkanals ergeben (Masiulis et al., 2019; Sallard et al., 2021).

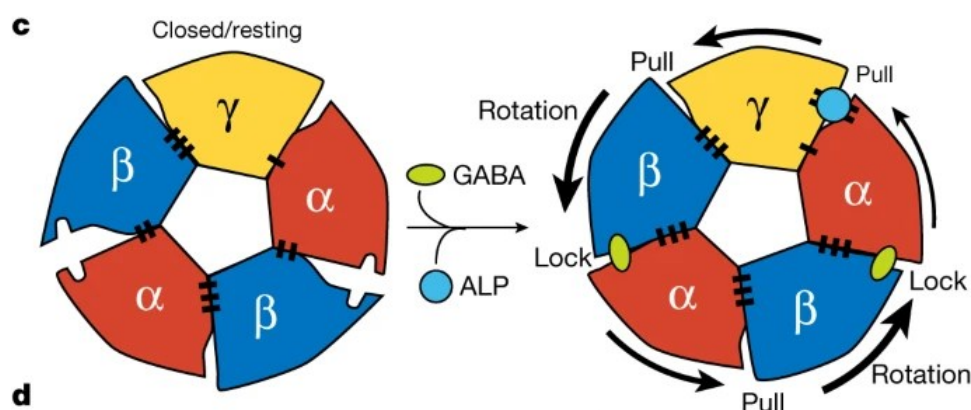


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Konformationsänderung des GABA_A-Rezeptors nach der GABA-Bindung durch Rotation der ECDs (Masiulis et al., 2019)

Wie effektiv die GABAerge Neurotransmission funktioniert, ist in erster Linie von der intrazellulären Chloridkonzentration abhängig, die sich durch die Aktivität zweier Kation-

Chlorid-Transporter ergibt: Der Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter (NKCC1) transportiert Chloridionen in die Zelle, während der neuronale Kalium-Chlorid-Cotransporter (KCC2) den Chloridausstrom fördert (Sieghart and Savić, 2018).

Im frühen Entwicklungsstadium des Gehirns dominiert die NKCC1-Funktion, woraus ein umgekehrtes Chloridpotential resultiert, das positiver als das Membranpotential ist. Öffnet sich nun der GABA_A-Rezeptor, kommt es durch diesen umgekehrten elektrochemischen Gradienten zum Chloridausstrom und dadurch zur Depolarisation (Lorenz-Guertin and Jacob, 2018). Die erhöhte Chloridkonzentration in unreifen Neuronen und die damit verbundene Depolarisation ist für die Entwicklung des Gehirns essentiell: GABA wirkt dadurch vorerst exzitatorisch und aktiviert N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren sowie spannungsabhängige Calciumkanäle. Der auf diese Weise ausgelöste starke Calciumeinstrom trägt maßgeblich zum neuronalen Wachstum, zur Bildung von Synapsen sowie zum Aufbau von neuronalen Netzwerken bei. Eine Blockade der NKCC1-Funktion im pränatalen oder frühen postnatalen Stadium kann daher in langfristigen negativen Auswirkungen resultieren, da der für die Entwicklung notwendige hohe Chloridspiegel nicht gegeben ist (Ben-Ari, 2017). Die Expression des KCC2 nimmt im Laufe der ersten postnatalen Woche zu und erreicht an dessen Ende ihr Maximum (Sauer and Bartos, 2011). Dadurch nimmt die intrazelluläre Chloridkonzentration ab, weswegen nun bei der Öffnung des GABA_A-Rezeptors Chloridionen in die Zelle einströmen (Lorenz-Guertin and Jacob, 2018). Dieser Chlorideinstrom dauert nur ein paar Millisekunden (Sigel and Ernst, 2018), führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle (Sears and Hewett, 2021) und damit verbunden zu einer Reduktion der neuronalen Erregbarkeit (Cellot and Cherubini, 2014).

Insofern ist die Chloridhomöostase entscheidend dafür, wie sich die GABAerge Aktivität schlussendlich ausprägt (Lorenz-Guertin and Jacob, 2018) und erst der Shift des Chloridgradienten sowie die Ausbildung des exzitatorischen Glutamat-Systems veranlassen die inhibitorische GABA-Wirkung (Sieghart and Savić, 2018). Wie lange die Desensibilisierung des GABA_A-Rezeptors schließlich anhält, hängt vom konkreten Rezeptor-Subtyp sowie von der Konzentration des Liganden ab (Knoflach and Bertrand, 2021).

Die postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren weisen zwar eine sehr hohe Bindungsaffinität auf, kommen in der postsynaptischen Membran jedoch nur in geringer Anzahl vor: Die mehreren tausend freigesetzten GABA-Moleküle treffen auf lediglich einige hundert postsynaptische Rezeptoren (Bryson et al., 2023). Der GABA-Überschuss, der nicht an die GABA_A-Rezeptoren bindet, gelangt vor allem über den nachfolgend beschriebenen GABA-Transporter 1 (GAT1) in Neurone oder Astrozyten (Motiwala et al., 2022) und kann anschließend metabolisiert werden. Es handelt sich hier um den sogenannten GABA-Shunt, der einen Nebenweg des Citratzyklus darstellt (Sears and Hewett, 2021): Aus GABA entsteht zuerst durch die GABA-Transaminase

Succinat-Semialdehyd (SSA). Dieses wird in weiterer Folge durch die SSA-Dehydrogenase (SSADH) zu Succinat oxidiert, das schlussendlich in den Citratzyklus eintritt (Rowley et al., 2012; Bryson et al., 2023). Eine Alternative dazu stellt die Reduktion von GABA über die γ -OH-Buttersäure-Dehydrogenase dar. Die daraus entstehende γ -OH-Buttersäure wirkt dann über die Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren (Rowley et al., 2012), deren genauer Wirkmechanismus in Kapitel 2.3 erläutert wird.

Im Zusammenhang mit der Erhaltung der E/I-Balance ist vor allem die Gruppe der soeben erwähnten GABA-Transporter (GAT) relevant. GATs sind Natrium-Symporter, die auch als *solute carrier 6* (SLC6) bekannt sind (Scimemi, 2014). Durch die Regulation ihrer Aktivität können sie die extrazelluläre GABA-Konzentration und damit den tatsächlich inhibitorisch wirkenden Anteil steuern (Sears and Hewett, 2021). Zudem werden so unerwünschte inhibitorische Effekte auf die neuronalen Schaltkreise verhindert (Bryson et al., 2023). Die inhibitorische Neurotransmission wird beendet, indem GABA in die präsynaptischen Neuronen und benachbarten Gliazellen aufgenommen wird, und somit spielt dieser Mechanismus eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der E/I-Balance (Sears and Hewett, 2021). In seinen Details ist er allerdings noch nicht vollständig verstanden (Jensen et al., 2003).

In Säugetieren wurden bislang sechs dieser GABA-Transporter identifiziert: GAT1, GAT2, GAT3, BGT1 (Betain-GABA-Transporter), CT1 (Kreatin-Transporter) sowie TauT (Taurin-Transporter). Sie alle transportieren GABA gemeinsam mit spezifischen anderen Molekülen: Die GAT1-3 transportieren zusätzlich zu GABA immer zwei Natriumionen und ein Chloridion, der BGT1 Betain, der CT1 Kreatin und der TauT Taurin. Sie unterscheiden sich in ihrer Funktion, ihrer zellulären und subzellulären Lokalisation sowie in ihrer Expression innerhalb des Gehirns (Scimemi, 2014). Der GAT1 ist der Hauptsubtyp und für 75-80 % der GABA-Aufnahme verantwortlich. Er ist im gesamten Gehirn verbreitet und in hoher Dichte in jenen Regionen lokalisiert, in denen sehr viele GABAerge Neurone zu finden sind (Jensen et al., 2003): Das sind beispielsweise der Hippocampus, der Neocortex, das Cerebellum oder die Retina. Der GAT2 wurde bisher nur in den Leptomeningen identifiziert (Zhou and Danbolt, 2013; Scimemi, 2014). Der GAT3 ist so wie der GAT1 im gesamten Gehirn zu finden, wenn auch in geringerer Dichte. In den höchsten Mengen wurde er unter anderem im Bulbus olfactorius, im Thalamus oder im Hypothalamus lokalisiert (Scimemi, 2014).

2.2.2.3. Tonische und phasische Inhibition

Je nach Lokalisation der GABA_A-Rezeptoren werden zwei verschiedene Arten inhibitorischer Neurotransmission unterschieden: Bei den extrasynaptisch lokalisierten spricht man von tonischer Inhibition, während bei den synaptisch lokalisierten von der phasischen Inhibition die Rede ist (Olsen, 2018). Sie stehen miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht, das

durch verschiedene Faktoren wie die GABA-Synthese durch die GAD65 oder den Abbau durch die GABA-Transaminase kontrolliert wird (Bryson et al., 2023).

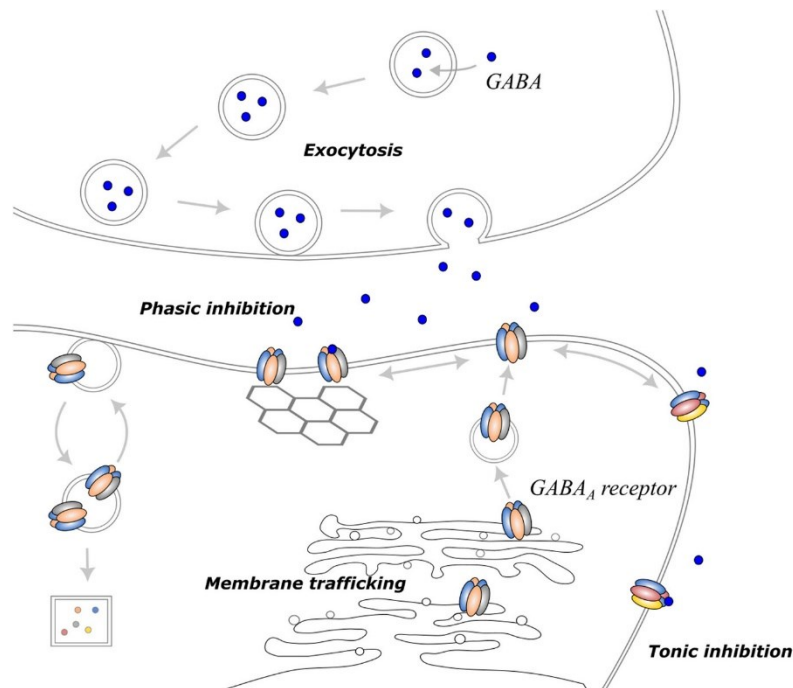


Abbildung 8: Schematische Darstellung der GABA-Wirkung an synaptischen und extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren (Bryson et al., 2023)

Unter phasischer Inhibition wird eine schnelle, punktgenaue Inhibition von genau regulierter Dauer verstanden (Sallard et al., 2021), die durch die präsynaptische GABA-Freisetzung und anschließende Bindung an synaptische GABA_A-Rezeptoren entsteht. Diese enthalten dabei stets eine γ -Untereinheit (Chuang and Reddy, 2018) und gelten als die wichtigsten Mediatoren von inhibitorischen Signalen. GABA bindet mit niedriger Affinität, weswegen eine ausreichend hohe Konzentration von 2-5 mM für die Rezeptoraktivierung notwendig ist (Sallard et al., 2021). Zahlreiche Arzneistoffe wie beispielsweise die Benzodiazepine führen zu einer positiv allosterischen Modulation der phasischen Neurotransmission, indem sie die Öffnungswahrscheinlichkeit der Chloridkanäle erhöhen (Boileau and Czajkowski, 1999; Barker and Hines, 2020).

Die Grundlage der tonischen Inhibition ist, wie bereits in Kapitel 2.2.1.2 erwähnt, die verlangsamte Desensibilisierung der Rezeptoren (Bryson et al., 2023) und die damit verbundene länger anhaltende Aktivierung (Chuang and Reddy, 2018), die von Sekunden bis hin zu Minuten andauern kann (Sallard et al., 2021), wodurch die neuronale Exzitabilität signifikant moduliert wird (Chuang and Reddy, 2018).

Die extrazellulären GABA_A-Rezeptoren, die hinsichtlich der tonischen Inhibition relevant sind, binden GABA mit sehr hoher Affinität, weswegen eine niedrige GABA-Konzentration für deren

Aktivierung ausreicht (Sallard et al., 2021). Auch Veränderungen in der tonischen Inhibition können die Wahrscheinlichkeit für verschiedene Krankheitszustände wie Angst oder Krampfanfälle erhöhen (Maguire et al., 2005; Sigel and Steinmann, 2012).

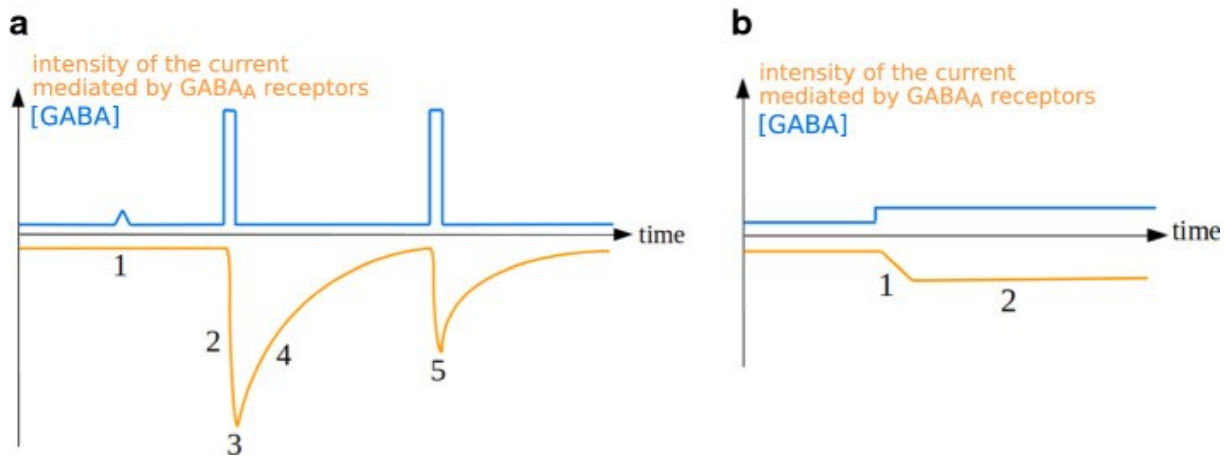


Abbildung 9: Links: Phasische Inhibition mit schneller Desensibilisierung, großer Amplitude und langsamer Deaktivierung **Rechts:** Tonische Inhibition mit langsamer Desensibilisierung, kleiner Amplitude und Steady-State-Zustand (Sallard et al., 2021)

2.3. GABA_B-Rezeptoren

Der GABA_B-Rezeptor wurde im Jahr 1981 erstmals erwähnt (Bormann, 2000). Es handelt sich um einen metabotropen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Sigel and Steinmann, 2012; Wang et al., 2021), der sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch lokalisiert ist (Heaney and Kinney, 2016) und eine wichtige Rolle in verschiedensten physiologischen und pathologischen Zuständen wie beispielweise dem Auftreten von Schmerzen und der Regulation der Stimmung oder von Erinnerungen spielt (Sarasa et al., 2020). Strukturell ist er ein Heterodimer, das sich aus den beiden Untereinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2} zusammensetzt (Heaney and Kinney, 2016) und sich in der Gensequenz, Struktur sowie in der Funktion von GABA_A-Rezeptoren unterscheidet (Sigel and Steinmann, 2012).

Der GABA_B-Rezeptor vermittelt eine langsamere synaptische Transmission (Bormann, 2000; Gassmann and Bettler, 2012; Sarasa et al., 2020): Durch die Bindung von GABA kommt es zu dessen Konformationsänderung, wodurch die G_α-Untereinheit des G-Proteins dissoziiert, welches die Adenylatcyclase inhibiert, wodurch wiederum die Konzentration an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) reduziert wird. Die so vermittelte präsynaptische Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung durch die Hemmung der Vesikelfusion dient als wichtiges inhibitorisches Feedback für die GABA_A-Neurotransmission. Darüber hinaus inhibiert der ebenfalls freigesetzte G_{βγ}-Komplex spannungsgesteuerte Calciumkanäle und aktiviert zugleich die hyperpolarisierenden, einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (GIRK), wodurch

die neuronale Inhibition verstärkt wird (Gassmann and Bettler, 2012; Sears and Hewett, 2021; Bryson et al., 2023).

Auf postsynaptische GABA_B-Rezeptoren ist die Wirkung ähnlich: Die Hemmung der Adenylatcyclase durch die G_α-Untereinheit beeinflusst den nachgeschalteten PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase A)-Signalweg. Dadurch werden, so wie auch präsynaptisch, die Calciumkanäle durch die G_{β/γ}-Untereinheit inhibiert und die Kaliumkanäle aktiviert. Die beiden Mechanismen resultieren zusammen in der Inhibierung des postsynaptischen Neurons (Skeberdis et al., 2006; Evenseth et al., 2020).

Durch die strukturell anders gestalteten Bindungsstellen greifen an GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren unterschiedliche Substanzen an: Während, wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, Muscimol ein spezifischer Ligand des GABA_A-Rezeptors ist, ist Baclofen ein spezifischer GABA_B-Rezeptor-Agonist (Olsen, 2018). Phaclofen hingegen hat eine inhibitorische Wirkung (Heaney and Kinney, 2016).

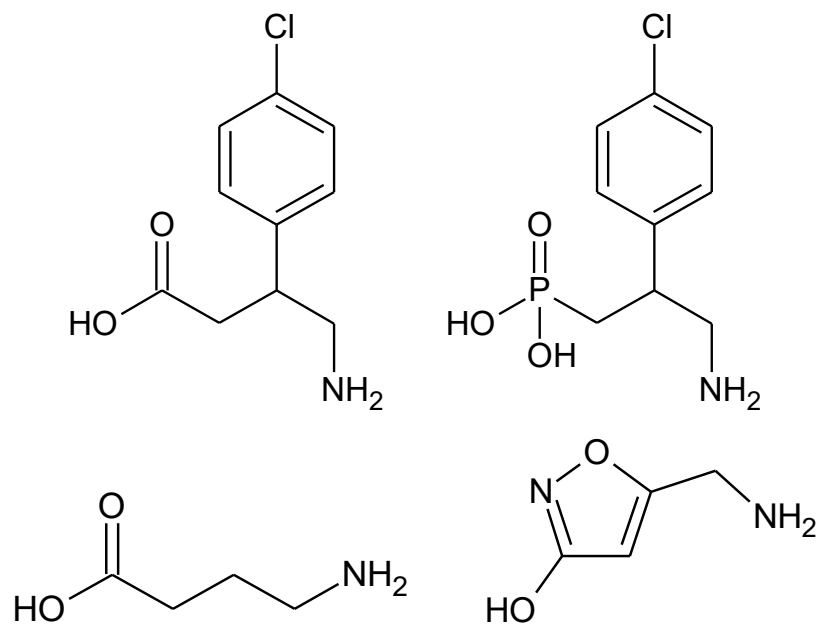


Abbildung 10: Strukturformeln des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen (**oben links**) und des GABA_B-Rezeptor-Antagonisten Phaclofen (**oben rechts**) sowie von GABA (**unten links**) und des GABA_A-Agonisten Muscimol (**unten rechts**)

2.4. GABA_A-p-Rezeptoren

Im Jahr 1984 wurde eine dritte Klasse von GABA-aktivierten Rezeptoren im ZNS entdeckt, die ursprünglich als GABA_C-Rezeptoren bezeichnet wurden (Bormann, 2000). Das Klonieren und die heterologe Expression dieser Rezeptoren zeigte allerdings, dass es sich dabei um einen Subtyp der GABA_A-Rezeptoren bestehend aus ρ -Untereinheiten handelt. Es sind somit ionotrope pLGICs, die nach der Bindung von GABA langsam aktiviert werden und weniger als

die klassischen GABA_A-Rezeptoren desensibilisieren. Ihr Aufbau unterscheidet sich ebenfalls von dem der regulären GABA_A-Rezeptoren: Während diese meist als Heteropentamere und somit bestehend aus unterschiedlichen Untereinheiten auftreten, sind GABA_A-p-Rezeptoren meistens Homopentamere, die aus p-Untereinheiten zusammengesetzt sind (Cowgill et al., 2023). Sie reagieren nicht auf Agonisten, Antagonisten oder Modulatoren der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren, wie beispielsweise Bicucullin, Baclofen (Bormann, 2000; Johnston and Beart, 2024) oder auch Benzodiazepine und Barbiturate (Bormann, 2000; Cowgill et al., 2023). Stattdessen werden sie neben GABA unter anderem durch die cis-4-Aminocrotonsäure, einen partiellen Agonisten, aktiviert. Mithilfe dieser konnte auch die Lokalisation der GABA_A-p-Rezeptoren genauer bestimmt werden: Sie wurden unter anderem in der Retina, im Hippocampus, in der Hypophyse sowie im Darm identifiziert (Johnston and Beart, 2024).

3. Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptors und deren Liganden

Die zahlreichen Pockets am GABA_A-Rezeptor dienen als Target für verschiedene Arzneistoffe bei unterschiedlichen Erkrankungen (Sigel and Steinmann, 2012). Davon befinden sich je fünf an den extrazellulären Interfaces zwischen den Untereinheiten, zwischen den transmembranären Domänen und innerhalb der Helix-Bündel, die die TMDs der einzelnen Untereinheiten bilden, sowie mindestens eine innerhalb der Kanalpore (Sieghart and Savić, 2018).

Die Rezeptoraktivierung bzw. -modulation erfolgt über endogene Liganden wie den Agonisten GABA und Neurosteroid, oder aber durch eine Vielzahl von exogenen Substanzen (Sigel and Steinmann, 2012), darunter Anästhetika, Antipsychotika oder Hypnotika (Boileau et al., 2010). Grob wird hier zwischen zwei verschiedenen Mechanismen unterschieden: Es werden entweder die GABA-induzierten Ströme moduliert, und/oder aber die GABA_A-Rezeptoren direkt aktiviert. Während die modulatorische Aktivität (in Anwesenheit des Agonisten bzw. GABA) meist bereits in niedrigeren Konzentrationen beobachtet wird, werden für die direkte Aktivierung (agonistische Aktivität, in Abwesenheit von GABA) meist höhere Konzentrationen benötigt. Allein in den letzten Jahren konnten über 100 Substanzen identifiziert werden, die über einen dieser beiden Mechanismen wirken, wobei deren jeweilige Bindungsstellen häufig noch nicht bekannt sind (Sieghart and Savić, 2018).

Im folgenden Kapitel werden die bereits relativ gut untersuchten GABA-, Benzodiazepin-, Barbiturat- sowie Neurosteroid-Bindungsstellen im Detail beschrieben.

3.1. GABA-Bindungsstellen

In den 90er Jahren wurden erstmals die beiden GABA-Bindungsstellen identifiziert und beschrieben (Olsen, 2018). Sie sind extrazellulär (Chen et al., 2019) am Interface zwischen einer α - und einer β -Untereinheit lokalisiert, wobei im Zusammenhang mit Bindungsstellen

immer von einer Hauptuntereinheit, markiert mit „+“, und einer komplementären Untereinheit, markiert mit „-“ gesprochen wird (Zhu et al., 2018).

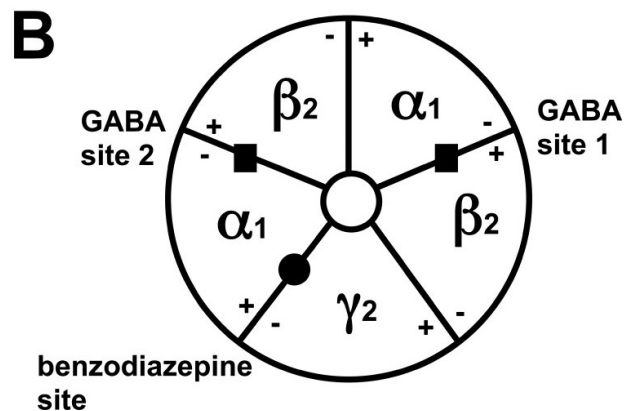


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Bindungsstellen des vorherrschenden Subtyps $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ inklusive der (+)/(-)-Markierungen (Sigel and Steinmann, 2012)

3.1.1. GABA

Die beiden GABA-Bindungsstellen befinden sich jeweils auf der ECD des $(\beta+)/(\alpha-)$ -Interfaces (Scott and Aricescu, 2019; Sallard et al., 2021) und in Abhängigkeit der Untereinheitenkombination konnten, wie auch bereits in Kapitel 2.2.1.2 kurz angesprochen, Unterschiede in der Affinität von Agonisten und Antagonisten beobachtet werden: Ist beispielsweise eine δ -Untereinheit vorhanden, steigt dadurch nicht nur die Affinität für GABA, sondern auch jene für Muscimol oder Gaboxadol (Olsen, 2018).

An den Interfaces der beiden die Bindungsstellen bildenden Untereinheiten sind jeweils sechs loops vorhanden, die die Bindungstasche bilden (Lummis et al., 2011): Auf der β -Untereinheit befinden sich die „A“, „B“ und „C“ loops und auf der α -Untereinheit die „D“, „E“ und „F“ loops (Olsen, 2018). GABA selbst bindet dabei unter dem loop C, in der sogenannten „*aromatic box*“. Dabei handelt es sich um eine hydrophobe Region, die unter anderem vier für die GABA-Bindung essentielle, aromatische Aminosäuren enthält: α_1 Phe65, β_2 Tyr97, β_2 Tyr157 und β_2 Tyr205 (Padgett et al., 2007).

Bindet GABA, orientiert sich die Aminogruppe in Richtung der β -Untereinheit und die Carboxylgruppe zeigt zur komplementären α -Untereinheit. Die Stabilisierung der Bindung erfolgt durch zahlreiche hydrophile Interaktionen, unter anderem Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen und Kation- π -Wechselwirkungen (Scott and Aricescu, 2019; Knoflach and Bertrand, 2021). Für letztere ist der Ausschluss von Wasser und damit die bereits erwähnte Hydrophobizität durch die *aromatic box* besonders wichtig, um eine effektive Bindung zu gewährleisten (Padgett et al., 2007).

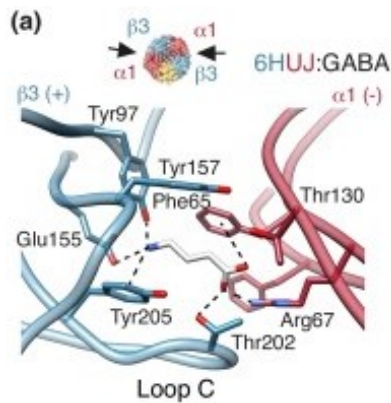


Abbildung 12: GABA-Bindungsstelle am (β+)/(α-)-Interface. GABA liegt in gebundener Form als weiß gefärbte Substanz vor, die schwarz gepunkteten Linien symbolisieren hydrophile Interaktionen zwischen den Seitenketten (Scott and Aricescu, 2019)

3.1.2. Bicucullin

An dieser orthosterischen Bindungsstelle binden neben GABA auch andere Substanzen, darunter der konvulsiv wirkende, kompetitive Antagonist des GABA_A-Rezeptors Bicucullin. Dessen Bindungsposition ähnelt jener von GABA sehr, wie ein direkter Vergleich an einem $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptor zeigte: So sind die hydrophilen Interaktionen sehr ähnlich, da das Stickstoffatom des Isoquinolins nur leicht anders positioniert ist als die Aminogruppe von GABA. Vermutlich sind es hier die Phthalid- und Isoquinolin-Strukturelemente, die mit der *aromatic box* interagieren (Scott and Aricescu, 2019). Entgegen den ursprünglichen Erwartungen, dass Bicucullin den GABA_A-Rezeptor in einen vollständig geschlossenen Zustand versetzt, bleibt dieser insgesamt in einer geöffneten Konformation. Die Rotation der ECDs der Untereinheiten wird dadurch verhindert und die TMDs in ihrem geschlossenen Stadium stabilisiert, wodurch der Chloridkanal inaktiviert wird (Masiulis et al., 2019). Die Bindung von Bicucullin verursacht einerseits eine Bewegung des loops C nach außen und andererseits auch insgesamt eine Ausdehnung der gesamten Struktur, die bei der GABA-Bindung ausbleibt (Scott and Aricescu, 2019).

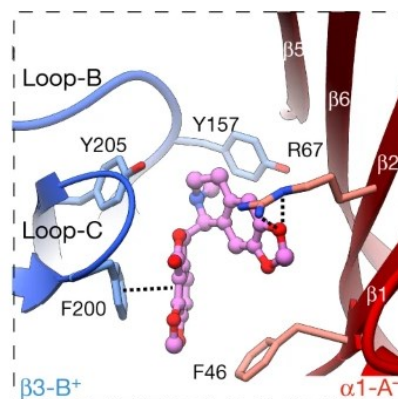


Abbildung 13: Bicucullin (rosa) in gebundenem Zustand am $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Subtyp mit π - π -Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen (schwarz gepunktete Linie) (Masiulis et al., 2019)

3.2. Benzodiazepin-Bindungsstelle

Im Jahr 1983 wurde erstmals die Benzodiazepin-Bindungsstelle als Teil eines Proteinkomplexes aus dem zerebralen Kortex eines Rindergehirns identifiziert und purifiziert, um Untersuchungen zu deren Bindungskapazität, Affinität und pharmakologischen Eigenschaften durchzuführen (Sigel et al., 1983). Es stellte sich heraus, dass dieser Komplex der bereits bekannte GABA_A-Rezeptor war und die Benzodiazepine dessen Öffnung modulierten. Deren hochaffine Bindungsstelle wurde schließlich am extrazellulären Interface zwischen den beiden Untereinheiten α_1 und γ_2 identifiziert. In weiterer Folge konnte festgestellt werden, dass sich diese immer am (α_x)/(γ_y)-Interface befindet, wobei x die Isoformen 1, 2, 3 und 5 und y die Isoformen 1, 2 und 3 einnehmen kann (Sigel and Ernst, 2018). Zudem konnte eine weitaus höhere Affinität und Wirksamkeit von γ_2 im Vergleich zu γ_1 und γ_3 eruiert werden (Olsen, 2018; Sigel and Ernst, 2018).

Benzodiazepine modulieren Rezeptoren mit den Untereinheiten α_4 sowie α_6 nicht, weswegen sie auch als „Diazepam-unempfindliche (DI für *diazepam-insensitive*) Untereinheiten“ bezeichnet werden (D'Hulst et al., 2009; Sigel and Ernst, 2018). Untereinheiten, die Diazepam binden, werden „Diazepam-empfindliche (DS für *diazepam-sensitive*) Untereinheiten“ genannt (Sigel and Ernst, 2018). Es zeigte sich jedoch, dass viele Benzodiazepin-Antagonisten an GABA_A-Rezeptoren mit diesen Untereinheiten binden (Olsen, 2018).

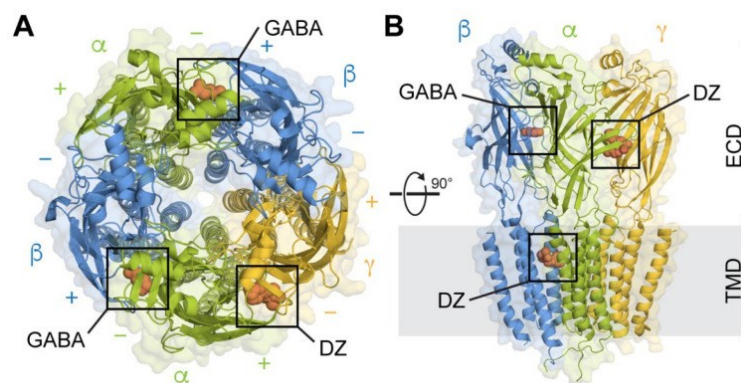


Abbildung 14: Links: Blick von oben auf den GABA_A-Rezeptor mit den beiden GABA- sowie der Benzodiazepin-Bindungsstelle **Rechts:** Seitliche Ansicht des GABA_A-Rezeptors, in der neben einer GABA- und der hochaffinen Benzodiazepin-Bindungsstelle auch eine niedrigaffine Bindungsstelle für Diazepam gekennzeichnet ist (Goldschen-Ohm, 2022)

Hauptverantwortlich dafür, wie empfindlich die Benzodiazepin-Bindungsstelle auf die verschiedenen Benzodiazepine reagiert, ist die α -Untereinheit (D'Hulst et al., 2009). Die einzelnen Isoformen der α -Untereinheiten werden mit den verschiedenen klinischen Wirkungen der Benzodiazepine assoziiert. So wird über die α_1 -Untereinheit, die in über 50 % aller GABA_A-Rezeptoren exprimiert wird, die sedative und amnestische Wirkung vermittelt, während über die α_2 - und die α_3 -Untereinheit Anxiolyse vermittelt wird. Aktivität an Rezeptoren

mit einer α_5 -Untereinheit scheint an der Beeinträchtigung der Lern- und Merkfähigkeit beteiligt zu sein, von der im Zusammenhang mit der Benzodiazepin-Gabe oft berichtet wird (Hood et al., 2014; Bryson et al., 2023). Auch regionale Unterschiede hinsichtlich der Rezeptorexpression im Gehirn, Variationen in der individuellen Verteilung der GABA_A-Rezeptoren sowie deren synaptische oder extrasynaptische Lokalisation wirken sich auf die klinischen Effekte aus (Vinkers and Olivier, 2012). Im Gegensatz zu den im Anschluss beschriebenen Barbituraten wirken Benzodiazepine allerdings ausschließlich über synaptische GABA_A-Rezeptoren (Sills and Rogawski, 2020).

Die Bindungsstelle befindet sich unter dem loop C und der Histidinrest an Position 102 auf der α_1 -Untereinheit (α_1 His102) interagiert dabei mit dem Chloridatom von Diazepam (siehe Abbildung 15) (Scott and Aricescu, 2019). Bei der α_4 - und α_6 -Untereinheit ist Histidin durch Arginin ersetzt, wodurch sich vermutlich deren bereits erwähnte Unempfindlichkeit gegenüber Benzodiazepin-Agonisten erklären lässt (Lüscher et al., 2012; Scott and Aricescu, 2019). Die Bindungstasche enthält in Analogie zur GABA-Bindungsstelle ebenfalls viele aromatische Aminosäurereste und ermöglicht so hydrophobe Interaktionen mit den Benzol-, Diazepin- und Phenylringen (Scott and Aricescu, 2019). Der durch die Bindung ausgelöste Wirkmechanismus wird in Kapitel 3.2.1 erläutert.

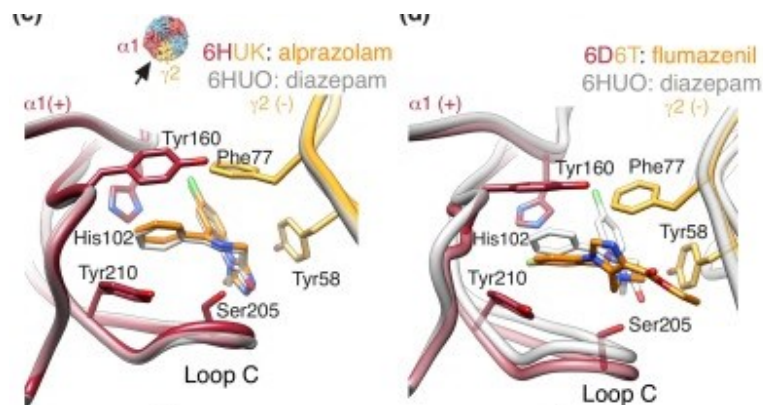


Abbildung 15: Benzodiazepin-Bindungsstelle mit Alprazolam und Diazepam (**links**) sowie dem Antagonisten Flumazenil und Diazepam (**rechts**) als Liganden (Scott and Aricescu, 2019)

Hinsichtlich der Lokalisation ist die Benzodiazepin-Bindungsstelle den GABA-Bindungsstellen ähnlich, da sie sich ebenfalls in einer Sequenzschleife, die auf der Struktur von β -Faltblättern basiert, befindet. Das Vorhandensein der γ -Untereinheit ist Grundvoraussetzung für die Bindung der Benzodiazepine und deren Sensitivität, wobei die γ_2 -Untereinheit aufgrund der bereits erwähnten maßgeblich höheren Affinität am häufigsten vertreten ist (Olsen, 2018). Wichtige, an der ausgelösten Wirkung beteiligte Aminosäuren sind beispielsweise γ_2 Met130 und γ_2 Phe77, die sich beide auf der γ_2 -Untereinheit befinden. γ_2 Phe77 ist dabei für die hohe Affinität der Benzodiazepin-Bindungsstelle verantwortlich (Wingrove et al., 1997). Neben den

Benzodiazepinen binden auch strukturell anders aussehende Substanzen an dieser Bindungsstelle, wie beispielsweise die Z-Drugs Zolpidem, Zopiclon und Zaleplon (Scott and Aricescu, 2019).

Neben der soeben beschriebenen hochaffinen Bindungsstelle gibt es noch eine weitere, niedrigaffine Benzodiazepin-Bindungsstelle in der Transmembranregion des GABA_A-Rezeptors (Sigel and Ernst, 2018). Sie befindet sich in einer homologen Position am (α +)/(β -)-Interface und wurde vermutet, als Diazepam bei $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren, bei denen dementsprechend davon ausgegangen wurde, dass sie keine Bindungsstelle für Benzodiazepine hätten, eine Wirkung auslöste. Auch bei dieser Bindungsstelle konnten bereits maßgeblich zur Bindung beitragende Aminosäuren identifiziert werden, wie Serin an der Position 267 der α_1 -Untereinheit (α_1 Ser267) oder Asparagin an der Position 265 der β_2 -Untereinheit (β_2 Asp265) (Walters et al., 2000). Die Erkenntnis, dass Diazepam in $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren eine biphasische Potenzierung des GABA-induzierten Chloridstroms hervorrief, trug ebenfalls zur Identifizierung dieser Bindungsstelle bei (Middendorp et al., 2015).

3.2.1. Benzodiazepine

Bei Benzodiazepinen handelt es sich um psychotrope Substanzen (Zhu et al., 2018), die zu den stärksten antikonvulsiven, sedativen, hypnotischen und anxiolytischen Wirkstoffen in klinischer Verwendung gehören (D'Hulst et al., 2009). Bereits im Jahr 2008 zählten sie mit 80 Millionen Verschreibungen allein in den USA zu den am häufigsten verordneten Arzneimitteln (Hanson and Czajkowski, 2008) und zwischen 1996 und 2013 wurde eine Steigerung der Verschreibungen um nahezu 70 % verzeichnet (Lembke et al., 2018). Auch in Europa werden Benzodiazepine sehr häufig angewandt, wobei die Situation in den einzelnen Ländern mitunter unterschiedlich ist (Lukačšínová et al., 2024). Das Alter spielt dabei eine große Rolle, wie internationale Studien auf der ganzen Welt zeigen: So beträgt der Prozentsatz der Benzodiazepin-Einnahme in der gesamten Population im Durchschnitt zwischen 2.1 % und 7.5 %. Betrachtet man nur die Altersgruppe ab 65 Jahren, liegt dieser aber zwischen 8.7 % und 21.5 % (Landolt et al., 2021). Eine Studie, die von Februar 2019 bis März 2020 durchgeführt wurde, verglich die Anzahl der Verschreibungen in der älteren Bevölkerung in verschiedenen europäischen Ländern: In Spanien wurde beispielsweise eine Prävalenz von 34 % eruiert. Allein in Barcelona erfolgten 96 % der Verschreibungen off-label. In Kroatien war die Situation mit 35.5 % ähnlich. In Serbien zeigte sich die besonders häufige Verschreibung von Bromazepam. In der Tschechischen Republik wurden dagegen im Vergleich zu den anderen Ländern Benzodiazepine seltener verschrieben (20 %) (Lukačšínová et al., 2024). Eine weitere, in der Schweiz im Jahr 2018 durchgeführte Studie zeigte eine jährliche Prävalenz an Verschreibungen von 8.1 % in der gesamten Schweizer Bevölkerung. Auch hier konnte ein

signifikant höherer Prozentsatz in der älteren Bevölkerung beobachtet werden: So wurde im Rahmen der Studie bei 51.9 % in der Gruppe der über 65-Jährigen mindestens eine Benzodiazepin-Verschreibung festgestellt (Landolt et al., 2021).

In ihrer chemischen Zusammensetzung sind sich die einzelnen Benzodiazepine sehr ähnlich: Sie bestehen stets aus fusionierten Benzol- und Diazepinringen mit verschiedenen Substituenten (Arora et al., 2020; Goldschen-Ohm, 2022). Die Stickstoffatome im Diazepinring befinden sich dabei in der Regel an den Positionen 1 und 4 (siehe Abbildung 16), weswegen ihre Grundstruktur als 1,4-Benzodiazepin bezeichnet wird (Arora et al., 2020).

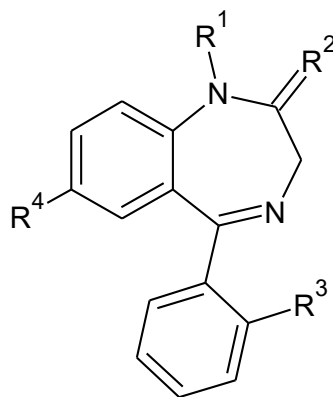


Abbildung 16: Grundstruktur der 1,4-Benzodiazepine. R¹ sind dabei häufig Methylgruppen oder ein Wasserstoffatom, R² ein Sauerstoffatom. R³ und R⁴ sind meist Halogene (Sieghart and Savić, 2018; Arora et al., 2020)

Im Jahr 1957 wurde Chordiazepoxid als erstes Benzodiazepin entdeckt, das bereits damals ein weitaus sicheres Wirkprofil als die bis dahin eingesetzten Barbiturate aufwies (Knoflach and Bertrand, 2021). Zwei Jahre später wurde es klinisch als Tranquilizer eingeführt, wodurch ein Meilenstein in der Psychopharmakologie gesetzt wurde. Die Entdeckung und Entwicklung weiterer Benzodiazepine folgte innerhalb kurzer Zeit, darunter Diazepam im Jahr 1963 (Hood et al., 2014), und stellte einen wichtigen Schritt in der Behandlung von Angststörungen und Psychosen dar (Knoflach and Bertrand, 2021). Heute häufig eingesetzte Benzodiazepine sind beispielsweise Midazolam, Lorazepam, Diazepam oder Clonazepam (Dubovsky and Marshall, 2022; Kienitz et al., 2022).

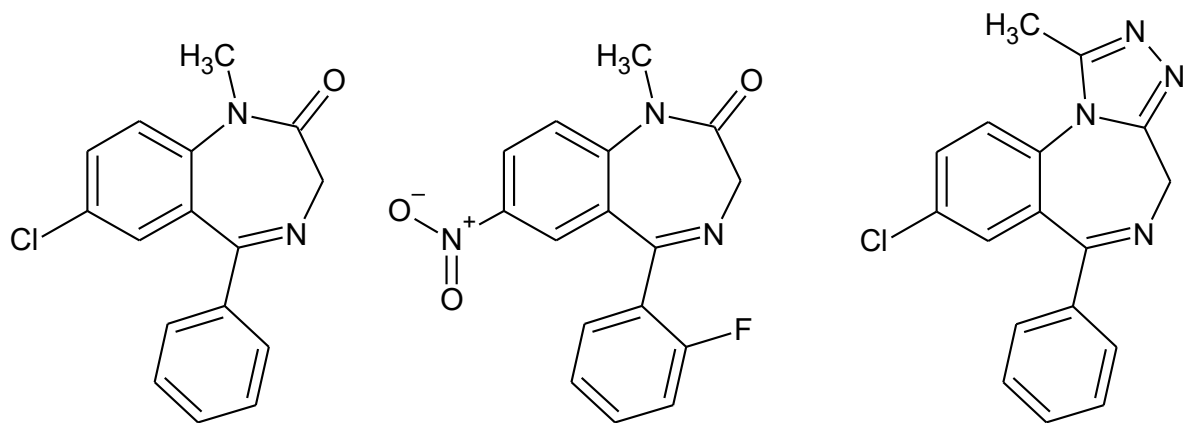


Abbildung 17: Beispiele von Benzodiazepinen mit gleicher Grundstruktur: Diazepam (**links**), Flunitrazepam (**Mitte**) und Alprazolam (**rechts**)

Benzodiazepine wirken, wie bereits erwähnt, an synaptischen GABA_A-Rezeptoren und modulieren extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren in der Regel nicht (Chuang and Reddy, 2018). Sie öffnen den Chloridkanal nicht direkt (Sieghart and Savić, 2018), sondern wirken durch die allosterische Modulation des GABA_A-Rezeptors, wobei zwischen positiv und negativ modulierenden sowie neutral wirkenden Benzodiazepinen unterschieden wird: Erstere sind die positiv allosterischen Modulatoren, die die Öffnungswahrscheinlichkeit des Chloridkanals erhöhen und damit die inhibitorische GABA-Wirkung potenzieren, zweitens sind die negativ allosterischen Modulatoren, die sie verringern. Diese beiden Gruppen vermitteln ihre Wirkung somit über Konformationsänderungen (Smith and Olsen, 1995; Boileau and Czajkowski, 1999; Sieghart and Savić, 2018; Sigel and Ernst, 2018), im Gegensatz zu den im Anschluss beschriebenen neutral wirkenden Benzodiazepinen (Sieghart and Savić, 2018).

Im Zusammenhang mit diesen für die Wirkung notwendigen Konformationsänderungen des GABA_A-Rezeptors wird von einem „lock-and-pull“-Mechanismus gesprochen: Durch die GABA-Bindung schließen sich die C loops in den β -Untereinheiten. Dadurch wird die Rotation der ECDs ausgelöst, die in den benachbarten (α)-Untereinheiten einrasten. Diese GABA-bedingten Konformationsänderungen übertragen sich auf die anderen ECDs, die sie wiederum an die TMDs weiterleiten (Masiulis et al., 2019). Benzodiazepine stabilisieren das (α +)/(γ)-Interface währenddessen, um diese Prozesse zu erleichtern (Masiulis et al., 2019; Scott and Aricescu, 2019).

Die neutral wirkenden Benzodiazepine sind Antagonisten: Sie führen zu keiner Konformationsänderung des GABA_A-Rezeptors und haben dementsprechend auch keinen direkten Effekt auf die GABA-Ströme, sondern blockieren die Wirkung der allosterischen Modulatoren (Sieghart and Savić, 2018). Ein Beispiel eines kompetitiven Antagonisten an der Benzodiazepin-Bindungsstelle ist Flumazenil, das klinisch zur Aufhebung einer Benzodiazepin-induzierten Anästhesie und als Antidot bei einer Überdosierung eingesetzt wird (Zhu et al., 2018). Die Besonderheit von Flumazenil ist, dass es neben der antagonistischen

Aktivität konzentrationsabhängig bzw. auch in Abhängigkeit des GABA_A-Rezeptor-Subtyps ebenfalls allosterisch modulierend wirken kann (Sigel and Baur, 1988; Sigel and Ernst, 2018).

3.2.1.1. Vorteile

Die zahlreichen Arzneistoffe dieser Substanzklasse sind etablierte First-Line-Drugs (Sigel and Ernst, 2018; Kienitz et al., 2022) und etwa 80 % aller GABA_A-Rezeptoren sind deren Targets (Luscher et al., 2023). Aufgrund ihres vielfältigen Wirkspektrums hat die Food and Drug Administration (FDA) die Benzodiazepine in den Vereinigten Staaten Amerikas für einige Indikationen zugelassen, darunter Angststörungen und Panikattacken, Schlaflosigkeit, epileptische Anfälle oder für den akuten Alkoholentzug. Auch off-label werden sie bei Depressionen oder dem Restless-Legs-Syndrom verordnet (Lembke et al., 2018; Goldschen-Ohm, 2022). In der EU sind Benzodiazepine von der European Medicines Agency (EMA) ebenfalls für Angststörungen, den akuten Alkoholentzug, Skelettmuskelkrämpfe, krampfartige Störungen wie Epilepsie (Borisova et al., 2021; Kienitz et al., 2022), für die prä- und postoperative Sedierung (Spence et al., 2019; Keam, 2020; Sneyd et al., 2021) sowie für Schlafstörungen zugelassen (Riemann et al., 2017; Borisova et al., 2021; Zhu et al., 2022; Ellis et al., 2023).

Die einzelnen Benzodiazepine weisen eine unterschiedlich starke Potenz auf (Olsen, 2018). Das begünstigt ihren Einsatz bei unterschiedlichen Indikationen: Die ersten Benzodiazepine, darunter Chlordiazepoxid, Oxazepam oder Temazepam, zeigen eine niedrige bis mittlere Potenz und waren durch ihre Wirksamkeit und verhältnismäßig geringe Toxizität schnell sehr beliebt im Einsatz bei Schlaf- und Angststörungen. Die neueren, weitaus potenteren Benzodiazepine wie Alprazolam, Lorazepam oder Clonazepam bringen zwar ein höheres Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen mit sich, ermöglichen jedoch durch ihren schnelleren Wirkeintritt den Einsatz in weiteren Indikationsgebieten wie beispielsweise bei Panikattacken, akuter Manie oder Agitation (Griffin et al., 2013).

Ein weiterer Vorteil der Benzodiazepine ist die Möglichkeit, diese über verschiedene Routen applizieren zu können: Neben der intravenösen, oralen, rektalen und intramuskulären Verabreichung ist auch eine bukkale, intranasale und intraossäre Verabreichung möglich (Kienitz et al., 2022).

3.2.1.2. Nachteile

Erst Jahre nach der Entdeckung von Chlordiazepoxid wurde deutlich, dass die Anwendung der Benzodiazepine auch viele Nachteile mit sich bringt (Knoflach and Bertrand, 2021). Einer dieser Nachteile bezieht sich auf die diversen Wirkungen, die Benzodiazepine hervorrufen können. Bestimmte therapeutische Effekte können nämlich nicht isoliert hervorgerufen werden. Grund dafür ist, dass Benzodiazepine unselektiv den Großteil der GABA_A-Rezeptor-

Subtypen modulieren, die weitverbreitet in den meisten Gehirnregionen exprimiert werden. Abhängig von der gestellten Indikation kann das problematisch sein (Olsen, 2018). Beispielhaft dafür ist vor allem die sedierende oder auch die muskelrelaxierende Wirkung: Sind diese Effekte aufgrund der gestellten Indikation eigentlich nicht erwünscht, spricht man von unerwünschten Nebenwirkungen. Besonders bei älteren Menschen, denen Benzodiazepine zur Therapie von Schlafstörungen oder Unruhe verschrieben wurden, kommt es dadurch oft zu Synkopen, Stürzen und damit zu Verletzungen oder Knochenbrüchen. Das Risiko für diese Nebenwirkungen steigt, je länger der Einnahmezeitraum sowie die Halbwertszeit der Substanzen und je höher die verabreichte Dosis des Benzodiazepins ist (Dubovsky and Marshall, 2022). In dieser Hinsicht wären Arzneistoffe, die selektiv an einen bestimmten Subtyp des GABA_A-Rezeptors binden, die optimale Lösung, da so nur die für die Therapie gewünschte Wirkung hervorgerufen werden würde (Hood et al., 2014). Studien in genetisch modifizierten Mäusen schlagen in der Tat vor, dass Substanzen, die nur an spezifischen Subtypen wirken, weniger unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen (Engin, 2022). Da die Benzodiazepin-Bindungsstelle jedoch stark konserviert vorliegt, ist die praktische Umsetzung dieses Konzepts im Menschen sehr schwierig. In der Theorie wären Arzneistoffe mit selektiver Wirkung ein Kompromiss: Sie würden zwar gleichermaßen an alle Subtypen binden, könnten jedoch die Aktivität einer oder mehrerer α -Untereinheiten selektiv modulieren. Im Rahmen präklinischer Studien wurden bereits viele Subtyp-selektive Substanzen erfolgreich getestet, die jedoch in klinischen Studien nicht die erhofften Effekte gezeigt hatten (Engin, 2022).

Das hohe Potential zur Toleranzentwicklung und zum Substanzmissbrauch sowie die schwerwiegenden Folgen im Zusammenhang mit einer Überdosierung oder Abhängigkeitserscheinungen sind ebenfalls maßgebliche Nachteile (Hood et al., 2014; Goldschen-Ohm, 2022). Während jedoch das Opioid-Problem weltweit als solches anerkannt wird, bleiben die Auswirkungen des Benzodiazepin-Missbrauchs wenig beachtet (Lembke et al., 2018) – dabei entwickelt sich beispielsweise die Toleranz gegenüber der sedativen bzw. hypnotischen Wirkung bereits nach Tagen (Hood et al., 2014). Sie entsteht nach wiederholter Benzodiazepin-Verabreichung aufgrund von Veränderungen in der Expression der GABA_A-Rezeptoren, deren Funktion sowie der GABA-Bindung, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig bekannt sind (Barker and Hines, 2020). Ein weiteres bedeutendes Risiko ist die Entwicklung einer Atemdepression nach unkontrollierter Einnahme sehr hoher Dosen (Kienitz et al., 2022).

Viele Länder versuchen daher, mit Guidelines deren Verschreibung strenger zu regulieren, indem sie nur kurzzeitig in der kleinstmöglichen Dosis verabreicht werden sollen (Hood et al., 2014) – eine Medikation, die kürzer als einen Monat andauert ist häufig sinnvoll und

nutzbringend (Lembke et al., 2018). Diese Vorschriften werden jedoch oft ignoriert: Langfristige Verschreibungen sind dadurch besonders bei der Therapie von Angstzuständen und Schlaflosigkeit (Lembke et al., 2018) sowie in bestimmten Gruppen wie beispielsweise der älteren Bevölkerung häufig (Hood et al., 2014).

Das Problem verschärft sich durch die Tatsache, dass insbesondere die neueren, hochpotenten Benzodiazepine wie beispielsweise Flualprazolam, Diclazepam, Clonazolam oder Etizolam, die auch als „Designer-Benzodiazepine“ bekannt sind, beliebte Substanzen auf dem Schwarzmarkt sind (Sarker et al., 2022). Sie werden illegal hergestellt und sind von den tatsächlichen Arzneistoffen kaum zu unterscheiden (Lembke et al., 2018), da auch sie meist als Tabletten oder Kapseln in verschiedenen Dosierungen vertrieben werden (Moosmann et al., 2015). Chemisch sind sie einander ebenfalls sehr ähnlich: Beispielsweise ist das bereits erwähnte Clonazolam ein Analogon des therapeutisch verwendeten Clonazepam und enthält sowohl strukturelle Elemente von Clonazepam als auch von Alprazolam (Lembke et al., 2018). Als Arzneistoffe sind diese Benzodiazepine niemals zugelassen worden, aber fast alle davon waren einmal Wirkstoffkandidaten, weswegen deren Synthesewege sowie Daten aus präklinischen Untersuchungen in der Literatur meist zugänglich sind (Moosmann et al., 2015). Von der Gefährlichkeit her sind sie vergleichbar mit Fentanyl, einem der potentesten Opiode. Ein Paradebeispiel dafür ist ebenfalls Clonazolam, das so potent ist, dass es in Dosierungen im Mikrogrammbereich verabreicht werden müsste, um das Risiko einer Überdosis möglichst klein zu halten. Gleichzeitig ist es aber im Internet mitunter als „research chemical“ zu finden (Lembke et al., 2018).

3.3. Barbiturat-Bindungsstellen

Erste Hinweise auf die Lokalisation der Barbiturat-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor gaben Mutagenese-, Mouse-knock-in- sowie Photolabeling-Studien (Kim and Hibbs, 2021). Aktuelle Studien lassen vermuten, dass es zumindest zwei Bindungsstellen gibt – eine am (α+)/(β-)- sowie eine zweite am (γ+)/(β-)-Interface (Maldifassi et al., 2016). Diese wurden in der Transmembranregion der Rezeptoren identifiziert (Sieghart and Savić, 2018), genau genommen in den TMDs 1-3 der β-Untereinheiten (Bryson et al., 2023). Die genaue Lokalisation ist jedoch nach wie vor umstritten (Sills and Rogawski, 2020).

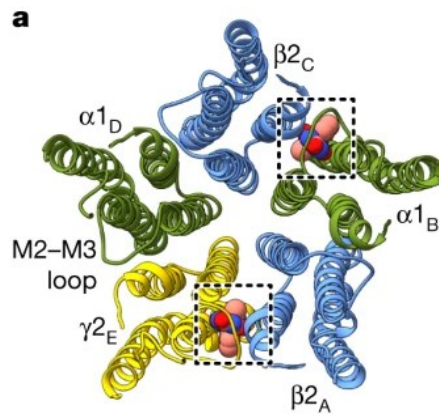


Abbildung 18: Blick durch den Ionenkanal des GABA_A-Rezeptors vom synaptischen Spalt aus mit Kennzeichnung der beiden Bindungsstellen, an denen Phenobarbital gebunden hat (Kim et al., 2020)

Eine vorgeschlagene Bindungsstelle für Barbiturate befindet sich in einem Hohlraum zwischen der TMD1 der β -Untereinheit und der TMD3 der α - bzw. γ -Untereinheit (Kim et al., 2020; Kim and Hibbs, 2021). Dieser Hohlraum wird durch die Ausbuchtung einer kurzen π -Helix gebildet. Die Barbiturate können dann in diesem Hohlraum an die Bindungsstelle binden. An der tatsächlichen Bindung sind Serinreste maßgeblich beteiligt (Kim and Hibbs, 2021): Beispielhaft dafür wäre jener an Position 265 der β_1 -Untereinheit (β_1 Ser265), der vor allem für die direkte Aktivierung des GABA_A-Rezeptors durch Barbiturate in Abwesenheit von GABA relevant ist. Es konnten bereits einige Punktmutationen dieses Serinrests identifiziert werden, die zu einer konstitutiven Aktivierung des GABA_A-Rezeptors führten, darunter Ser265Trp oder Ser265Gly (Miko et al., 2004).

Die Bindung von Phenobarbital erfolgt bei beiden Bindungsstellen auf dieselbe Weise: Die enthaltene Barbitursäure befindet sich zwischen TMD 1 und 3, während die Ethylgruppen sich in Richtung der Pore orientieren und die Phenylgruppen von der Pore wegzeigen (Kim et al., 2020). Die Stabilisierung erfolgt vor allem über hydrophobe Van-der-Waals-Interaktionen (Kim et al., 2020; Kim and Hibbs, 2021), die überwiegend von der β -Untereinheit ausgehen. Zudem bildet sich eine elektrostatische Verbindung zwischen dem Stickstoffatom der Barbitursäure und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Backbones, die ebenfalls stabilisierend wirkt (Kim et al., 2020).

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass es neben diesen beiden Bindungsstellen auch eine weitere, transmembranäre Bindungsstelle gibt. Auch hier sind die $(\alpha^+)/(\beta^-)$ - und die $(\gamma^+)/(\beta^-)$ -Interfaces involviert (Sills and Rogawski, 2020).

3.3.1. Barbiturate

Barbiturate wirken auf zweierlei Weise sowohl auf extrasynaptisch als auch auf synaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren: Während sie in niedrigeren Konzentrationen, so wie die

Benzodiazepine, eine positiv allosterische Modulation auslösen (Bryson et al., 2023), können sie in hohen Konzentrationen auch in Abwesenheit von GABA den Chloridkanal öffnen. Der zweite Mechanismus ist zwar für die klinische Anwendung weniger relevant, da die dafür notwendigen Dosierungen zu hoch sind (Hood et al., 2014), erklärt aber, weshalb die Benzodiazepine in ihrer Anwendung so viel sicherer sind. Neben sedativen Nebenwirkungen, Abhängigkeitserscheinungen bei einer längerfristigen Einnahme sowie einer Verschlimmerung der Krämpfe nach dem Absetzen ist aufgrund dieser direkten Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren auch die Wahrscheinlichkeit einer letalen Überdosierung im Vergleich zu den Benzodiazepinen maßgeblich höher (Löscher and Rogawski, 2012). Barbiturate verlängern insgesamt die Zeit, die der Chloridkanal geöffnet bleibt, indem sie dessen Einnahme bestimmter, langanhaltender Konformationen fördern. Daraus resultieren größere Amplituden der phasischen sowie eine Verstärkung der tonischen Inhibition (Bryson et al., 2023).

Das Barbiturat Phenobarbital wurde bereits vor über 100 Jahren das erste Mal synthetisiert und gehört damit zu den ältesten Barbituraten. Lange galt es als kosteneffektives Mittel der Wahl bei Epilepsie (Brodie and Kwan, 2012) und kann bei jeglichen Arten von Krampfanfällen angewandt werden. Auch heute wird es noch verschrieben (Kim et al., 2020), wobei aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen und des pharmakokinetischen Profils Vorsicht geboten ist (Bryson et al., 2023). Phenobarbital hat zudem teratogene Wirkung: Im Rahmen prospektiver Kohortenstudien konnten zahlreiche angeborene Defekte bei exponierten Säuglingen mit dem Wirkstoff in Verbindung gebracht werden (Brodie and Kwan, 2012; Kaplan and Demir, 2021).

Hinsichtlich der Pharmakokinetik der Barbiturate spielt unter anderem auch ihre Lipidlöslichkeit eine wichtige Rolle. Kurzwirksame Barbiturate wie beispielsweise Thiopental weisen eine sehr hohe Lipidlöslichkeit auf, wodurch es zu einem schnellen Wirkeintritt, einer raschen Verteilung sowie einer beinahe ausschließlich über die Leber erfolgenden Metabolisierung kommt. Bei langwirksamen Barbituraten ist die Lipidlöslichkeit niedriger: Phenobarbital beispielsweise ist eine schwache Säure, die über die Nieren ausgeschieden wird. Eine weitere, wichtige pharmakokinetische Gemeinsamkeit aller Barbiturate ist, dass sie das Cytochrom P450 (CYP)-Enzym-System induzieren. Dadurch wird die Metabolisierung zahlreicher CYP-Substrate gesteigert, weswegen bei einer Co-Medikation Vorsicht geboten ist. Zudem unterliegen sie einer Autoinduktion, da sie selbst über das CYP-System metabolisiert werden, wodurch sich bei einer Langzeitanwendung eine Toleranz entwickelt (Mactier et al., 2014).

3.4. Neurosteroid-Bindungsstellen

Zahlreiche Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass es mehrere Bindungsstellen für Neurosteroiden an GABA_A-Rezeptoren gibt. Dies wird auch durch die beiden unterschiedlichen

Wirkmechanismen (allosterische Modulation bzw. direkte Aktivierung), die in Kapitel 3.4.1 erläutert werden, impliziert (Chuang and Reddy, 2018; Chen et al., 2019).

Vermutlich befinden sich drei Neurosteroid-Bindungsstellen an GABA_A-Rezeptoren. Die erste Bindungsstelle befindet sich am Interface der (β+)- und der (α-)-Untereinheit und wird daher auch als Intersubunit-Bindungsstelle bezeichnet (Chen et al., 2019). Bindet dort ein Neurosteroid, sind unter anderem die Aminosäuren α₁Gln241 in der TMD1 der α₁-Untereinheit sowie β₂Phe301 in der TMD3 der β₂-Untereinheit von Bedeutung (Germann et al., 2021).

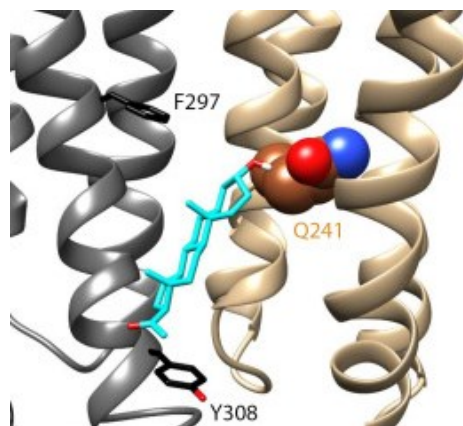


Abbildung 19: Im Zuge von Docking-Studien angefertigte Darstellung der β/α-Intersubunit-Bindungsstelle (Germann et al., 2021)

In einem Hohlraum zwischen den beiden extrazellulären Endigungen der TMD1 und der TMD4 der α-Untereinheit ist die zweite Bindungsstelle lokalisiert (Germann et al., 2021), die auch als Intrasubunit-Bindungsstelle bezeichnet wird (Chen et al., 2019). Hier wurden ebenfalls bereits relevante Aminosäurereste identifiziert: α₁Tyr415, α₁Asn407 und α₁Val226 tragen wesentlich zur Bindung der Neurosteroiden bei (Germann et al., 2021).

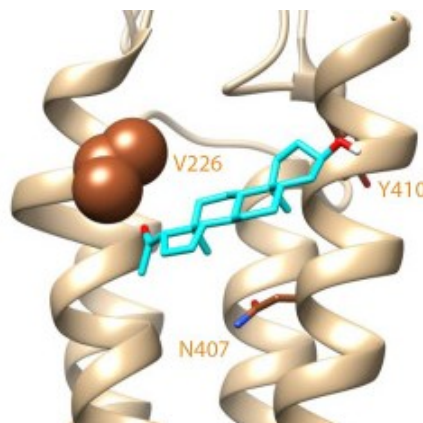


Abbildung 20: Im Zuge von Docking-Studien angefertigte Darstellung der Intrasubunit-Bindungsstelle in der α-Untereinheit (Germann et al., 2021)

Die dritte Bindungsstelle ist ebenfalls eine Intrasubunit-Bindungsstelle, in die die TMD3 und TMD4 der β -Untereinheit involviert sind. Wichtige Aminosäurereste sind hier β_2 Gly287 in der TMD3 und β_2 Tyr443 in der TMD4 (Germann et al., 2021).

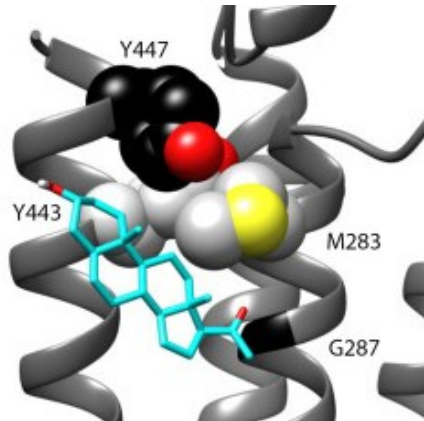


Abbildung 21: Im Zuge von Docking-Studien angefertigte Darstellung der Intrasubunit-Untereinheit in der β -Untereinheit (Germann et al., 2021)

3.4.1. Neurosteroidoide

Neurosteroidoide sind endogene Metaboliten des Cholesterols, die von Neuronen und Gliazellen produziert werden und die neuronale Aktivität regulieren (Chen et al., 2019). Grundsätzlich sind sie potente Modulatoren aller Isoformen des GABA_A-Rezeptors (Hosie et al., 2006), modulieren die Kanalöffnung allosterisch (Sigel and Steinmann, 2012; Sugasawa et al., 2019) bzw. aktivieren diesen, so wie die Barbiturate, in höheren Konzentrationen und in Abwesenheit von GABA auch direkt (Chuang and Reddy, 2018; Sieghart and Savić, 2018). Das ist vor allem bei Neurosteroiden des 3 α -Hydroxypregnan-Typs der Fall, während jene des 3 β -Hydroxysteroid-Typs sowie an Position 3 sulfatierte Neurosteroidoide den GABA_A-Rezeptor in der Regel inhibieren. Neurosteroidoide regulieren die neuronale Exzitabilität über Modulation von GABA_A-Rezeptoren (Bryson et al., 2023), ein Mechanismus, der bei diversen Erkrankungen wie Panikstörungen, Depressionen, Schizophrenie oder Alkoholabhängigkeit unterbrochen ist (Hosie et al., 2006). Zusätzlich modulieren sie aber auch andere pLGIC, wie die nACh- und die Glycin-Rezeptoren (Cheng et al., 2018).

Bei Stress oder einer Alkoholintoxikation liegt die Neurosteroid-Konzentration im nanomolaren Bereich und führt dadurch zu einer Potenzierung der GABA-Ströme (Hosie et al., 2006), die über direkte Interaktionen an den Bindungsstellen vermittelt wird (Sugasawa et al., 2019). Mikromolare Konzentrationen, wie sie beispielsweise während einer Geburt vorliegen, aktivieren hingegen den Rezeptor direkt. Dieser unterschiedliche, konzentrationsbedingte Wirkmechanismus unterstützt die bereits in Kapitel 3.4 erwähnte Annahme, dass über die

Neurosteroid-Bindungsstellen zwei verschiedene Wirkungen vermittelt werden können (Hosie et al., 2006; Chen et al., 2019).

Allopregnanolon und Tetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC) sind die beiden wichtigsten endogenen Neurosteroiden und können auf beide Weisen wirken, da sie in unterschiedlich hohen Konzentrationen vorkommen können (Chen et al., 2019).

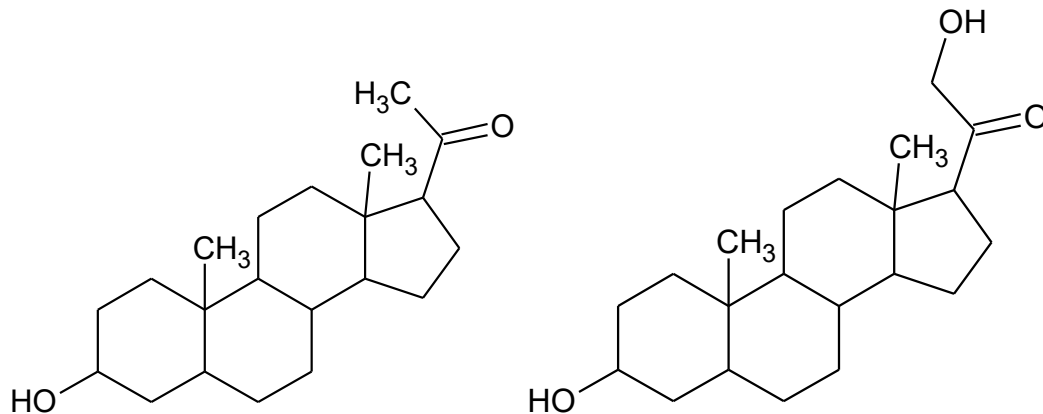


Abbildung 22: Strukturformel von Allopregnanolon ([links](#)) und THDOC ([rechts](#))

Analoge der Neurosteroiden werden in der Pharmakotherapie als Anästhetika, Anxiolytika, Antidepressiva sowie Antiepileptika eingesetzt (Chen et al., 2019; Sugawara et al., 2019). Ein Beispiel wäre Brexanolon, das in den USA durch die FDA für die Behandlung der postpartalen Depression zugelassen wurde. In der EU ist es momentan nicht zugelassen (Hutcherson et al., 2020). Ein weiteres Beispiel wäre Ganaxolon, das ebenfalls in den USA für die Behandlung von Krampfanfällen zugelassen wurde, die durch eine CDKL5-Mangelstörung (*cyclin-dependent kinase-like 5 deficiency disorder*) ausgelöst werden. Im Gegensatz zu Brexanolon ist es auch in der EU dafür zugelassen (Lamb, 2022). Beide weisen das charakteristische Steroid-Grundgerüst auf (Reddy and Estes, 2016).

4. Der GABA_A-Rezeptor als Target zur Behandlung neurologischer und neuropsychiatrischer Erkrankungen

Der GABA_A-Rezeptor fungiert bei einigen neuropsychiatrischen Erkrankungen als wichtiges Target für Arzneistoffe. Bei einigen, darunter Angst- und Schlafstörungen oder Psychosen, sind die Wirkungen durch entsprechende Arzneistoffe bereits bekannt (Goldschen-Ohm, 2022). Derzeit wird aber auch dessen Einfluss bei der Entwicklung von neurodegenerativen Krankheiten, Entwicklungs- und Kognitionsstörungen wie beispielsweise Schizophrenie (Sigel and Ernst, 2018) sowie Autismus oder dem Down-Syndrom untersucht (Rudolph and Möhler, 2014).

4.1. Epilepsie

Der Begriff Epilepsie wurde im Jahr 2005 von einer Task Force der International League Against Epilepsy (ILAE) neu und präziser anhand spezifischer Kriterien definiert (Fisher et al., 2014). Es handelt sich um eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, von der über 70 Millionen Menschen in allen Altersgruppen und Ethnien betroffen sind. 80 % leben in Entwicklungsländern, wodurch deutlich wird, dass die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung in diesen deutlich höher ist als in Industrieländern (Perucca et al., 2018; Thijs et al., 2019). Das beweist auch die Inzidenzrate, die im Jahr 2019 mit über 100 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen in Entwicklungsländern doppelt so hoch war (Thijs et al., 2019).

Die Entwicklung einer Epilepsie geht auf eine E/I-Dysbalance meist aufgrund eines pathologisch bedingten Defizits des inhibitorischen Anteils zurück. Innerhalb eines neuronalen Netzwerks kommt es dadurch zu stark verstärkter, hypersynchroner, oszillatorischer Aktivität, die, wenn sie nicht unterbrochen wird, die normalen physiologischen neuronalen Prozesse unterbricht sowie auch andere neuronale Netzwerke in ihrer Funktion stört (Thijs et al., 2019). Epileptische Anfälle, die das Hauptkriterium der Diagnose darstellen (Fisher et al., 2014), sind dadurch das klinische Ergebnis paroxysmaler, hypersynchroner, kurzzeitiger elektrischer Entladungen im Gehirn. Diese wiederum entstehen eben aufgrund der zu starken exzitatorischen bzw. der zu geringen inhibitorischen Aktivität (Treiman, 2001), ausgelöst durch genetische, strukturelle, metabolische, infektiöse, immunologische oder andere, unbekannte Ursachen. Häufige Risikofaktoren sind Kopftraumata, Infektionen sowie Tumore. Auch zerebrovaskuläre Erkrankungen wirken besonders bei älteren Menschen begünstigend. Kommt es im Zuge der Gehirnentwicklung zu Fehlbildungen, entwickelt sich die Epilepsie bereits im Kindesalter (Thijs et al., 2019).

Im Zusammenhang mit der Pathophysiologie ist die im Jahr 2010 durch die ILAE definierte Unterscheidung zwischen fokalen und generalisierten Epilepsien wichtig.

Fokale Epilepsien haben ihren Ursprung in neuronalen Netzwerken, die nur in einer Hemisphäre lokalisiert sind. Diese können entweder eng beieinander liegen oder aber großflächiger verteilt sein (Fisher et al., 2017), wobei sie sich für gewöhnlich in limbischen oder neokortikalen Regionen befinden. Strukturelle zerebrale Abnormalitäten werden als Voraussetzung angenommen, wobei deren genaue pathophysiologische Mechanismen noch nicht ganz aufgeklärt werden konnten (Thijs et al., 2019).

Im Gegensatz dazu entstehen generalisierte Epilepsien an einer beliebigen Stelle im Gehirn, breiten sich dann allerdings sehr schnell auf neuronale Netzwerke in beiden Hemisphären aus (Fisher et al., 2017). Es wird davon ausgegangen, dass ihnen insbesondere genetische Veränderungen zugrunde liegen.

Den Absence-Anfällen liegen ganz andere pathophysiologische Mechanismen zugrunde, da sie aus einer abnormalen verstärkten Inhibition hervorgehen (Thijs et al., 2019).

Bereits in den frühen 2000er Jahren kristallisierte sich die zentrale Rolle des GABAergen Systems in der Pathogenese der Epilepsie heraus (Bryson et al., 2023): Bestimmte Genvariationen, die unter anderem GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten betrafen, konnten mit Epilepsie assoziiert werden (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001). Knockout-Mäuse, bei denen das Gen für die GAD65 entfernt worden war, zeigten eine Beeinträchtigung der phasischen Inhibition, die sich in vermehrten Krampfanfällen und Angstsymptomen äußerte (Kash et al., 1997). Auch Mutationen im Gen, das für die γ -Untereinheit kodiert, konnten mit der Pathogenese von Epilepsie in Verbindung gebracht werden (Baulac et al., 2001). Zudem wurde beobachtet, dass die am häufigsten eingesetzten Antikonvulsiva über GABA_A-Rezeptoren die E/I-Balance wiederherstellen konnten (Bryson et al., 2023).

Besonders die genetischen Faktoren im Zusammenhang mit dem GABAergen System sind für den Ausbruch der Krankheit sowie die Schwere der Symptomatik relevant (Lachance-Touchette et al., 2011).

Die *gamma-aminobutyric acid A receptor*-Gene *GABRA1*, *GABRB2*, *GABRB3* und *GABRG2* kodieren für viele der häufig vorkommenden GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten: *GABRA1* kodiert für die α_1 -Untereinheit, *GABRB2* für die β_2 -Untereinheit, *GABRB3* für die β_3 -Untereinheit und *GABRG2* für die γ_2 -Untereinheit. Bei an Epilepsie Erkrankten konnten diverse pathogene Varianten dieser Gene festgestellt werden: Beispielsweise die p.Lys303Arg-Mutation im Gen *GABRB2* wird mit einer seltenen Form der Epilepsie, die mit Dystonie, Epoxid-Hydrolase-Mangel und infantilen Anfällen (EDEE für *Early Developmental Epileptic Encephalopathy*) assoziiert, Erkrankte mit der häufig auftretenden Mutation c.968G>A, p.Arg323Gln zeigten entweder das Dravet-Syndrom, GEFS+ (*Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus*) mit oder ohne kognitive Einschränkungen, Epilepsie im Kindesalter mit zentrotemporalen Spikes oder frühbeginnende epileptische Enzephalopathie mit schwerer intellektueller Beeinträchtigung (Maillard et al., 2022).

Drei *de novo* Missense-Varianten wurden im Gen *GABRA4* identifiziert: c.797C>T, p.(Pro266Leu); c.899C>A, p.(Thr300Asn) und c.634G>A, p.(Val212Ile). Sie äußern sich im Phänotyp mit Entwicklungsverzögerungen, bei der Elektroenzephalographie (EEG) mit auffallenden epileptiformen Abnormalitäten sowie mit Krampfanfällen, Aufmerksamkeitsdefiziten, strukturellen Abnormalitäten im Gehirn und autistischen Symptomen. Daraus lässt sich schließen, dass auch Mutationen dieses Gens eine E/I-Dysbalance und damit entsprechende Symptome hervorrufen (Sajan et al., 2024).

Eine im Jahr 2019 publizierte Studie untersuchte die Untereinheiten-Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren bei der Temporallappenepilepsie, die die häufigste fokale Epilepsieform in Erwachsenen ist. Es wurde dabei nicht nach Mutationen gesucht, sondern lediglich die Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren betrachtet: Die dabei beobachtete Reduktion der Expression aller α -Untereinheiten, mit Ausnahme der α_1 -Untereinheit, könnte die verminderte Empfindlichkeit gegenüber GABA sowie die bei Epilepsie gestörte phasische Inhibition erklären. Zudem konnte eine gesteigerte Expression der γ_2 -Untereinheit gezeigt werden, welche die Clusterbildung und Kinetik der einzelnen Rezeptoren beeinflusst und auch die tonische Inhibition beeinträchtigt (Stefanits et al., 2019).

Neben Mutationen in den einzelnen Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren spielen auch die im Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Kation-Chlorid-Cotransporter durch die Aufrechterhaltung der Chloridhomöostase und E/I-Balance und dementsprechend auch in der Entstehung der Epilepsie eine wesentliche Rolle (Auer et al., 2020): In präklinischen Studien wurde beispielsweise beobachtet, dass eine reduzierte KCC2-Expression mit einer erhöhten *brain derived neurotrophic factor* (BDNF)-Freisetzung und über dessen Signalweg mit der Entstehung einer Epilepsie assoziiert werden kann (Liu et al., 2019). Auch klinische Studien bestätigten den Einfluss der beiden Transporter in der Pathogenese der Epilepsie: Bei Kindern, die an der fokalen kortikalen Dysplasie (FCD) erkrankt sind, konnten durch Inhibition des NKCC1 Krampfanfälle verhindert werden. Zudem wurden eine reduzierte KCC2-Expression sowie pathologische Veränderungen des Transporters festgestellt, die gemeinsam zu einer Dysregulation der Chloridhomöostase führten (Blauwblomme et al., 2019; Liu et al., 2019).

Auch Mutationen der Gene der GATs spielen eine bedeutende Rolle: Allein in den letzten 10 Jahren konnten mehr als 100 monogene Varianten des Gens *SLC6A1* (kodiert für GAT1) identifiziert werden (Bryson et al., 2023). Beispielsweise wurde die Mikro-Deletion 3p25.3 mit der myoklonischen atonischen Epilepsie, auch als Doose-Syndrom bekannt, in Verbindung gebracht (Carvill et al., 2015). Dabei handelt es sich um eine seltene Form der Epilepsie im Kindesalter, die sich durch Krampfanfälle mit plötzlichem Verlust des Muskeltonus auszeichnet (Bryson et al., 2023).

Die Benzodiazepine, insbesondere Lorazepam, Midazolam, Diazepam und Clonazepam, gelten momentan als Mittel der Wahl, um Krampfanfälle über den GABA_A-Rezeptor direkt zu behandeln (Perucca et al., 2018; Kienitz et al., 2022). Nicht nur die zahlreichen Nachteile, die bereits in Kapitel 3.2.1.2 erläutert wurden, sind problematisch: Eine Mutation am Gen *GABRG2* der γ_2 -Untereinheit, bei der an Position 43 Glutamin gegen Arginin ausgetauscht ist (Arg43Gln), führt bei an generalisierter Epilepsie Erkrankten zu einer verminderten Bindung

von Benzodiazepinen an GABA_A-Rezeptoren und damit zu deren verringerter Wirksamkeit (Fedi et al., 2006).

4.2. Depression

Depression ist heutzutage eine der häufigsten neuropsychiatrischen Erkrankungen (Wang et al., 2021), die sich vor allem durch ihre Komplexität und Heterogenität in Ausprägung der Symptome, Ursachen und pathogenetischen Mechanismen auszeichnet (Möhler, 2012). Vor allem die Major Depression Disorder (MDD), von der mehr als 300 Millionen Menschen betroffen sind (Duman et al., 2019), wird von der Weltgesundheitsorganisation als essentieller Faktor des Global Burden of Diseases (WHO, 2023) angesehen, da einer von fünf Menschen in seinem Leben daran erkrankt (Ménard et al., 2016).

Die Pathogenese der Depression ist nach wie vor unklar (Wang et al., 2021). Es gibt jedoch etliche Hypothesen, inwiefern verschiedene Rezeptoren und Änderungen der neuronalen Aktivität an der Entwicklung der Krankheit beteiligt sein könnten (Wang et al., 2021). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer familiären Vererbung durch spezifische Gene relativ hoch ist, wobei deren genauer Mechanismus ebenfalls noch nicht geklärt werden konnte (Luscher et al., 2011).

Sowohl präklinische als auch klinische Studien zeigen, dass GABA_A-Rezeptoren in der Pathogenese eine Rolle spielen (Luscher et al., 2011). Die entsprechenden pathologischen Veränderungen entstehen vermutlich durch eine Kombination aus genetischen, entwicklungs- oder umweltbedingten Einflüssen (Luscher and Fuchs, 2015; Dean and Keshavan, 2017; Luscher et al., 2023). In der Erforschung von psychiatrischen Erkrankungen sind tierexperimentelle Daten jedoch immer problematisch, da Tiere nie alle Fähigkeiten oder eben auch Beeinträchtigungen widerspiegeln können, die den Menschen ausmachen. Daher sind klinische Studien zur weiteren Erforschung von Angststörungen oder eben auch der Depression besonders wichtig (Sieghart and Savić, 2018).

Neben einer Reduktion der GABA-Signaltransduktion sowie der GABA_A-Rezeptoren (Luscher et al., 2011) wurden auch Schädigungen in den GABAergen Interneuronen, eine veränderte Chloridhomöostase, die einen negativen Effekt auf die GABA-Transmission hat, sowie Veränderungen in der Expression und Funktion der GABA_A-Rezeptoren bei MDD festgestellt. Die Reduktion der GABA-Menge sowie der GAD67-Aktivität korrelieren dabei mit der verminderten Funktion spezifischer GABA-Interneurone. Auch deren Dichte im dorsolateralen präfrontalen Kortex und im Okzipitalkortex sowie deren Größe ist bei MDD maßgeblich reduziert, wie *post mortem* festgestellt wurde (Luscher and Fuchs, 2015).

Die pathologischen Veränderungen im präfrontalen Kortex sind dabei besonders interessant: Bei an Depression Erkrankten ist der GABA-Spiegel im präfrontalen Kortex reduziert, der sich während einer Remission wieder normalisiert (Hasler et al., 2005; Ghosal et al., 2017). Zudem steigerte eine mehrfach durchgeführte Magnetstimulation des Gehirns die niedrigen GABA-Spiegel im präfrontalen Kortex (Dubin et al., 2016; Ghosal et al., 2017).

Im präfrontalen Kortex wurde zudem eine signifikante Reduktion der GAD67-Spiegel *post mortem* in unbehandelten Erkrankten festgestellt. Grund dafür könnte die bereits erwiesene Reduktion der Dichte und Größe der GABAergen Interneurone sein. Ein Vergleich mit den Werten von Erkrankten, die verschiedene Antidepressiva – Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRIs) sowie Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRIs) – erhalten hatten, zeigte, dass bei diesen die GAD67-Spiegel im Normalbereich lagen. Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass Antidepressiva die Reduktion des GAD67-Spiegels wieder ausgleichen. In der GAD65-Aktivität konnten keine Unterschiede beobachtet werden (Karolewicz et al., 2010).

Studien mit Somatostatin lieferten ebenfalls Informationen über die Beteiligung des GABAergen Systems bei MDD: Dieses Neuropeptid wird in spezifischen GABAergen Neuronen exprimiert, die hemmend auf die Dendriten der exzitatorischen, pyramidalen Neurone wirken. Eine Reduktion der Somatostatin-Expression im dorsolateralen präfrontalen Kortex (Douillard-Guilloux et al., 2017), im subgenualen anterioren cingulären Kortex (Tripp et al., 2011) sowie in den lateralen und basomedialen Kernen der Amygdala wurde insbesondere im Gehirn von Frauen mit MDD *post mortem* festgestellt. Die hemmenden GABAergen Interneurone, die Somatostatin exprimieren und in die Amygdala einlangende exzitatorische Signale regulieren, sind besonders interessant: Im Rahmen dieser konkreten Studie wurde zwar nur die tatsächliche Somatostatin-Reduktion ermittelt, aber würde diese effektiv mit einer Reduktion dieser Interneurone korrelieren, würde das eine erhebliche Störung der Feedbackinhibition in den lateralen Kernen und damit vermutlich eine Entgleisung der E/I-Balance in allen Kernen der Amygdala zur Folge haben (Douillard-Guilloux et al., 2017).

Hinsichtlich der einzelnen Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren wurde beispielsweise in einer präklinischen Studie an Mäusen der Einfluss der γ_2 -Untereinheit genauer untersucht. Dabei zeigten sich mittels *forced swimming test* (FST) in γ_2 -Knockout-Mäusen Verhaltensweisen, die mit Depression assoziiert werden (Earnheart et al., 2007; Smith and Rudolph, 2012) und nach einer dauerhaften Behandlung der Mäuse mit dem tricyclischen Antidepressivum Desipramin und dem SSRI Fluoxetin, die jedoch beide nicht über das GABAerge System wirken, konnte eine Normalisierung des Verhaltens beobachtet werden (Shen et al., 2010; Smith and Rudolph, 2012).

Auch mit postpartalen δ -Knockout-Mäusen wurden Studien durchgeführt: Der FST zeigte sehr ähnliche Ergebnisse wie bei den γ_2 -Knockout-Mäusen und ein Test zur Bestimmung der Sucrosepräferenz zeigte, dass diese verglichen mit unberührten sowie postpartalen Wildtyp-Mäusen niedriger war. Es ist daher davon auszugehen, dass die δ -haltigen GABA_A-Rezeptoren eine bedeutende Rolle in der postpartalen Depression spielen (Smith and Rudolph, 2012).

Grundsätzlich müssen diverse Hypothesen hinsichtlich der Reduktion oder gar Steigerung bestimmter Untereinheiten weiter untersucht werden (Luscher and Fuchs, 2015). Fest steht, dass beim Vorliegen einer Depression die GABA_A-Rezeptor-Expression stark verändert ist. Beispielsweise Untersuchungen in Suizidopfern, bei denen zuvor eine Depression diagnostiziert worden war, zeigten eine Reduktion in der Anzahl der Transkripte für diverse GABA_A-Untereinheiten sowie spezifische Hypermethylierungsmuster der entsprechenden Promoter, die diese Reduktion zusätzlich verstärken (Ghosal et al., 2017).

II. Fragestellung

Der GABA_A-Rezeptor nimmt eine zentrale Stellung in der Aufrechterhaltung der E/I-Balance ein (Bryson et al., 2023) und eine Dysbalance zwischen der exzitatorischen und der inhibitorischen synaptischen Aktivität führt zu neurologischen und neuropsychiatrischen Erkrankungen wie beispielsweise Epilepsie oder Angst- und Schlafstörungen. Auch in der Behandlung von Psychosen oder Schizophrenie fungiert der GABA_A-Rezeptor als wichtiges Target (Sears and Hewett, 2021; Goldschen-Ohm, 2022).

Insbesondere die Benzodiazepine, die zu den am häufigsten verschriebenen Arzneistoffen gehören, sind in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung (Hanson and Czajkowski, 2008; Lembke et al., 2018). Durch die positive allosterische Modulation des GABA_A-Rezeptors vermitteln sie antikonvulsive, sedativ-hypnotische, anxiolytische, muskelrelaxierende sowie amnestische Effekte (Sigel and Ernst, 2018; Kienitz et al., 2022) und werden dementsprechend auf vielfältige Weise therapeutisch eingesetzt (Lembke et al., 2018). Deren Nachteile stellen dabei ein bedeutendes Problem dar: Neben der pharmakologisch bedingten Nebenwirkungen, die durch die unselektive Wirkung auf alle GABA_A-Rezeptoren mit einer Benzodiazepin-Bindungsstelle entstehen (Lembke et al., 2018; Olsen, 2018; Dubovsky and Marshall, 2022), führen Benzodiazepine auch sehr schnell zu einer Toleranzentwicklung und zu Abhängigkeitserscheinungen. Der häufige Substanzmissbrauch sowie das hohe Risiko einer Überdosierung sind ebenfalls problematisch (Hood et al., 2014; Goldschen-Ohm, 2022). Es ist daher dringend notwendig, weiterhin nach neuen Wirkstoffen für die entsprechenden Erkrankungen zu forschen, die eine selektive Modulation an GABA_A-Rezeptoren hervorrufen (Rudolph and Knoflach, 2011; Sigel and Ernst, 2018; Löscher et al., 2020).

In meiner Masterarbeit lag der Fokus auf der Suche und pharmakologischen Charakterisierung neuer GABA_A-Rezeptor-Modulatoren aus einer Sammlung südafrikanischer Wildpflanzen. Dafür wurden GABA_A-Rezeptoren, zusammengesetzt aus den Untereinheiten α_1 , β_2 sowie γ_{2S} in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Effekte der Extrakte (100 µg/ml) und isolierten Reinstoffe mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und einem schnellen Perfusionssystem untersucht.

III. Materialien und Methoden

Die Erhebung der Daten erfolgte mittels der nachfolgend beschriebenen Methoden, die bereits in einer früheren Masterarbeit unter der Betreuung von Ass.-Prof. Mag. Dr. Sophia Khom-Steinkellner angewandt wurden. Sie wurden aus dieser übernommen und spezifisch an die Gegebenheiten meiner Masterarbeit angepasst (siehe Masterarbeit von Sabina Salkic „Neue Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren und ihre potenzielle Anwendung in der Alkoholkrankheit“ 2023, <https://theses.univie.ac.at/detail/66771/>).

1. Hintergrundinformationen

Im Jahr 1971 entwickelte Gurdon et al. mit Oozyten des glatten, aus Südafrika stammenden *Xenopus laevis* Frosches (Sigel and Minier, 2005) ein auch heute noch eingesetztes Expressionssystem zur Untersuchung der Funktion von Ionenkanälen, Membranrezeptoren oder auch Transportern (Baumgartner et al., 1999). Die Größe der Zellen ermöglicht deren leichte Handhabung und ihre Widerstandsfähigkeit sowie ihre Oberflächenmembran, die nur wenige endogene Ionenkanäle aufweist, sind ebenfalls Gründe, weshalb sie so beliebt sind. Durch ihre Fähigkeit, fremde DNA sowie RNA zu transkribieren und translatieren (Sigel and Minier, 2005) können sie mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik nach erfolgreicher Expression der gewünschten Ionenkanäle elektrophysiologisch untersucht werden (Baumgartner et al., 1999).

Xenopus laevis Oozyten dienen zur Expression des GABA_A-Rezeptor-Subtyps $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$. Anschließend wurde die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch ausgewählte Extrakte bzw. Reinstoffe bei einem konstant gehaltenen Membranpotential von -70 mV gemessen. Isolierte Oozyten wurden dabei entweder von Frau Dr. Alexandra Garifulina MSc (Division für Pharmakologie und Toxikologie, Department für Pharmazeutische Wissenschaften) zur Verfügung gestellt oder kommerziell von der Firma Ecocyte Bioscience (Dortmund, Deutschland) bezogen.

2. Präparation der Oozyten

Die Anästhesie der weiblichen *Xenopus laevis* Frösche erfolgte innerhalb von 15 bis 20 Minuten in einer 0.2%igen Tricain-Lösung.



Abbildung 23: Weiblicher *Xenopus laevis* Frosch (eigene Bildaufnahme 2023)

Dem vollständig anästhesierten Frosch wurden durch eine etwa 1 cm große Öffnung im Bereich des Abdomens Oozytenlappen mit einer Pinzette entnommen, die im Anschluss mit zwei Pinzetten mechanisch zerkleinert wurden. Dieser zweite Schritt erfolgte in einer Petrischale mit dem calciumfreien Medium OR₂ (82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 5 mM Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure = HEPES; pH = 7.5, eingestellt mit 1 M NaOH).

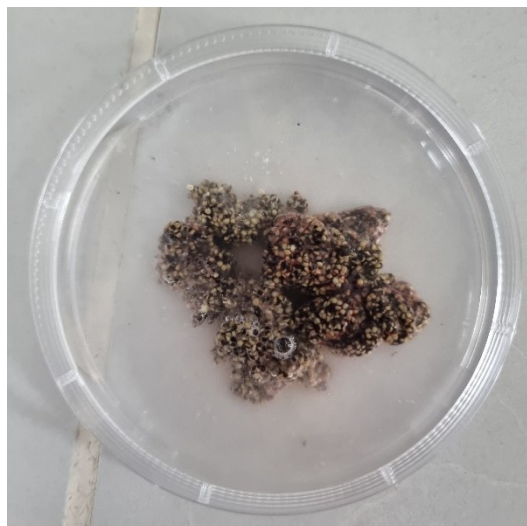


Abbildung 24: Oozytenlappen unmittelbar nach der Entnahme (eigene Bildaufnahme 2023)

Das Waschen der zerkleinerten Oozytenlappen geschah in mehreren Schritten mit OR₂-Lösung nach deren Transfer in ein 50 ml Falcon® Tube, das ebenfalls mit OR₂-Lösung gefüllt war. Im Anschluss wurden sie für die Entfernung des Binde- und Follikelgewebes ungefähr 60 Minuten lang mit 2 mg/ml Collagenase (2 mg Collagenase Sigma Typ 1A/ml OR₂-Lösung)

verdaut, wodurch der Großteil der Oozyten danach einzeln sowie frei von Blutkapillaren und Bindegewebe vorlag.



Abbildung 25: Gewaschene, unverdaute Oozytenlappen mit sichtbarem Bindegewebe und Blutkapillaren (eigene Bildaufnahme 2023)

Aufgrund der möglichen Aktivierung unspezifischer, toxisch wirkender Proteasen durch Calcium wurden die Oozyten nach dem Verdau erneut wiederholt mit calciumfreier OR₂-Lösung gewaschen. Nach deren Überführung in eine Petrischale mit calciumhaltigen ND96-Medium (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH = 7.4, eingestellt mit 1 M NaOH) erfolgte eine mehrstündige Inkubation bei 18°C. Schließlich wurden unter dem Binokular ausschließlich Oozyten des Reifegrades V-VI für die Injektion der RNA selektiert. Diese müssen intakt, symmetrisch rund sowie zweifärbig sein und haben einen Durchmesser von 1.1 bis 1.2 mm.



Abbildung 26: Verdaute Oozyten unter dem Binokular vor der Selektion (eigene Bildaufnahme 2023)

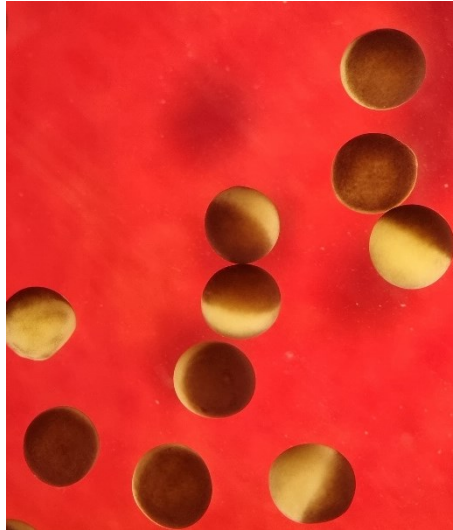


Abbildung 27: Einzelne intakte, für die Injektion geeignete, symmetrisch runde sowie charakteristisch zweifarbige Oozyten (eigene Bildaufnahme 2023)

3. Injektion der cRNA

Unter RNAase-freien Bedingungen wurde die für die gewünschten Untereinheiten ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$) des GABA_A-Rezeptors kodierende cRNA, die davor im entsprechenden Verhältnis der jeweiligen Untereinheiten gemischt worden war, in eine Glaskapillare aufgesaugt, die zuvor mit Silikonöl gefüllt worden war. Davon wurden unter Zuhilfenahme eines Nanoject III (npi, Tamm) zwischen 50 und 100 nl in die selektierten Oozyten injiziert, wobei nach der Injektion eine leichte Zunahme der Größe gesehen werden konnte.

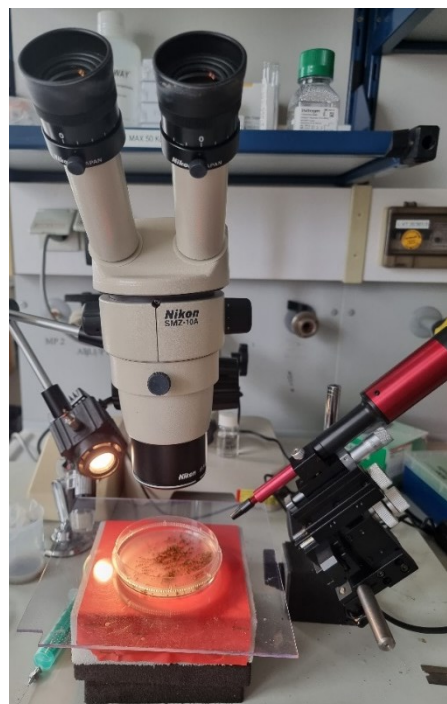


Abbildung 28: Binokular, unter dem die Petrischale mit den Oozyten zu sehen ist und rechts davon der Nanoject III für deren Injektion (eigene Bildaufnahme 2023)

Die Oozyten wurden im Anschluss für 24 Stunden inkubiert, wobei erneut das Medium ND96 gemeinsam mit einem Antibiotikum (100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) zu deren Lagerung diente. Dieses wurde täglich gewechselt.

4. Herstellung der Messlösungen

Sowohl die Herstellung der Ausgangslösung – 50 ml einer 1 mM GABA-Lösung (5.15 mg GABA in 50 ml ND96) – als auch die der für die tatsächlichen Messungen erforderlichen Lösungen – je 50 ml einer 10 µM und einer 20 µM GABA-Lösung – erfolgte täglich. Zu letzteren wurde unmittelbar vor der Testung das entsprechende Volumen der Stammlösungen der zu testenden Extrakte (20 mg/ml) hinzu pipettiert, die mit 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) angefertigt worden waren – die Testkonzentration war mit 100 µg/ml fixiert. Für die Reinstoffe wurden ebenfalls Stammlösungen (100 mM) in 100%igem DMSO hergestellt und auch hier wurden die Testlösungen in den entsprechenden Konzentrationen frisch vor der Applikation angefertigt. Die maximale Konzentration an DMSO in den Testlösungen überstieg dabei niemals 0.5 %, wodurch unspezifische Effekte von DMSO auf I_{GABA} ausgeschlossen werden konnten (Khom et al 2006).

5. 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Substanzapplikation

Mikroelektroden bestehend aus Borsilikat-Glas werden mittels eines Narashige Glaspullers (npi, Tamm) gezogen und mit 3 M KCl-Lösung bis zur Hälfte gefüllt. Luftblasen insbesondere an der Spitze dieser Glaskapillaren, aber auch Staub oder Schmutz könnten den Stromfluss behindern, weswegen sie vorab vorsichtig entfernt werden sollten. Die Messungen werden schließlich in einer modifizierten Perfusionskammer durchgeführt. Dafür wird ein Oozyt in einer kleinen Kammer, die mit einer Glasplatte mit zwei kleinen Kanälen (*microelectrode access holes* – MAH) für die beiden Mikroelektroden verschlossen wird, platziert. Als Behältnis für die Testlösungen dient ein Quarztrichter (*funnel*), der diese umgibt, wie auf Abbildung 29 zu erkennen ist. Ein Pipettierroboter übernimmt die korrekte Applikation der Testlösungen, die von oben direkt in den Quarztrichter, genau über dem Oozyten, erfolgt. Eine Pumpe sorgt in weiterer Folge für deren Entfernung und damit für die Perfusion des Oozyten, da sie mit dem Kammerausgang (*chamber outlet*) verbunden ist. Sollten Reste der applizierten Lösungen im Trichter zurückbleiben, so werden diese unmittelbar danach durch *funnel outlets* abgeleitet (Baburin et al., 2006).

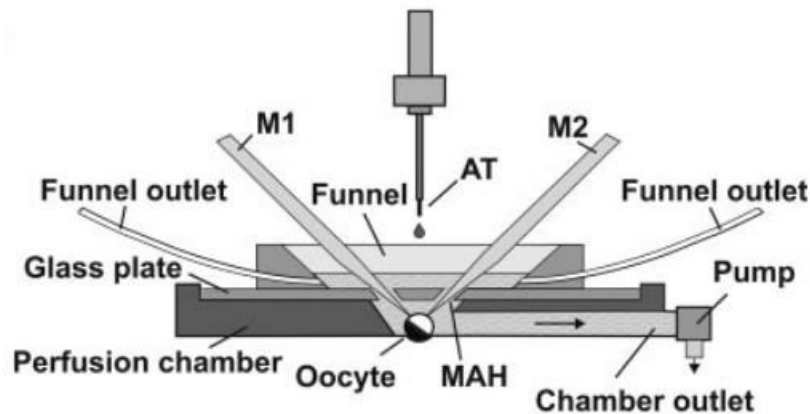


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Aufbaus der Perfusionskammer (Khom et al., 2006)

Die beiden Elektroden, die von beiden Seiten in den Oozyten gestochen werden, haben unterschiedliche Funktionen: Das tatsächliche Membranpotential der Oozyten wird von der *potential electrode* erfasst. Dessen Abweichung vom gewünschten Haltepotential (-70 mV) wird durch den Amplifier oder Rückkopplungsverstärker (Modell TurboTec 05X, npi, Tamm) gemessen. Die *current electrode* hingegen ist für die Injektion des erforderlichen Stroms verantwortlich, um das eben erwähnte notwendige Membranpotential zu erreichen und schließlich kontinuierlich auf -70 mV zu halten. Dieser Mechanismus dient dazu, die Spannung der Oozytenmembran zu „klemmen“. Beide Elektroden sind an einer Halterung mit einem mit AgCl_2 überzogenen Draht montiert. Durch die zu Beginn eingefüllte KCl-Lösung können die Signale über den Silberdraht zum Amplifier geleitet werden (Bianchi and Driscoll, 2006).

Im Zuge der Experimente dieser Arbeit wurde stets zuerst die GABA-Kontrolllösung und anschließend entweder der zu testende Extrakt mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ oder der zu testende Reinstoff in der entsprechenden Konzentration mithilfe eines Pipettierroboters appliziert. Dieser wurde mit der Software Robosoft (RBS) gesteuert, das Programm Clampex 10.7 (Molecular Devices, San Jose) zeichnete die entsprechenden Messungen auf und speicherte sie ab für deren nachfolgende Offline-Auswertung in der Software Clampfit 10.7 (Molecular Devices, San Jose).

6. Auswertung und statistische Analyse

Mittels Clampfit 10.7 wurden die Daten schließlich ausgewertet. Die notwendigen Werte wurden durch die Abmessung der maximalen Amplituden des GABA-induzierten Chloridstroms I_{GABA} – der Kontrollstrom EC_{10} – sowie des durch die Reinstoffe oder Extrakte modulierten Chloridstroms erhalten. Diese wurden nach deren Eintragung ins Programm Origin 7.0 unter Anwendung der Formel $\frac{[(\text{Modulierter Strom}) - (\text{GABA-Kontrollstrom})]}{\text{GABA-Kontrollstrom}} * 100$ normiert.

Die Daten der drei Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden ebenfalls in Origin 7.0 eingetragen, auf den jeweiligen GABA-Strom normiert und in ein semilogarithmisches Koordinatensystem übertragen. Durch diese Datenpunkte wurde mittels Origin 7.0 eine sigmoidale Kurve (Hill-Gleichung) gelegt, wodurch die Parameter $E_{\max}$ (der maximale Effekt) und EC_{50} (die effektive Konzentration, die 50 % des maximalen Effekts verursacht) ermittelt wurden.

7. Statistische Auswertung

Zuletzt erfolgte die statistische Auswertung. Zuerst wurde eine deskriptive Statistik für alle Datenpunkte erstellt und die Anzahl der Experimente pro Reinstoff oder Extrakt (n), der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) sowie der Standard Error of the Mean (S.E.M.) von allen Werten berechnet. Die Daten wurden in GraphPad Prism Version 10.0 (Boston, MA) geplottet mit Ausnahme jener der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die in Origin erstellt wurden. Im Anschluss wurden die *per se* Effekte der Extrakte bzw. Substanzen (Null-Hypothese) mithilfe des *one sample t-Test* berechnet bzw. die Wirkung der Substanzen Diazepam, B und HO in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Antagonisten Flumazenil mittels *one-way Analysis of Variance (ANOVA)* mit einem *post hoc* Vergleich der Mittelwerte (Tukey) im Programm GraphPad Prism Version 10.0 bestimmt.

Jeder einzelne Reinstoff bzw. jeder Extrakt wurde an zumindest vier verschiedenen Oozyten getestet, die aus mindestens zwei unterschiedlichen Fröschen stammten. In den Tabellen 1 bis 10 sind diese Daten zusammengefasst. Die dargestellten repräsentativen Ströme für jene Substanzen, die eine signifikante Modulation des GABA-Kontrollstroms zeigten, wurden zuerst in Clampfit 10.7 gefiltert (Lowpass, Bessel (8-Pole)), bevor sie anschließend im Programm CorelDraw X5 zu fertigen Abbildungen mit den Analysen aus GraphPad zusammengestellt werden konnten.

IV. Ergebnisse

Im Zuge meiner Masterarbeit wurde die Modulation von I_{GABA} durch 29 Extrakte sowie 20 Reinstoffe bei einer GABA EC_{10} getestet. Dafür wurden GABA_A-Rezeptoren mit der Untereinheitenkombination $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Effekte anschließend mit der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik vermessen.

1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von GABA

Vor jeglichen elektrophysiologischen Messungen am GABA_A-Rezeptor sollten entsprechende Experimente zur Erstellung einer GABA-Konzentrations-Wirkungs-Kurve durchgeführt werden, um ein Verständnis für die Reaktion des Rezeptors auf die verschiedenen GABA-Konzentrationen zu entwickeln. Zudem ist die Bestimmung des maximalen sowie des halbmaximalen GABA-Effekts für die weiteren Experimente relevant, wobei zweiterer vor allem als EC_{50} -Wert bekannt ist. Die Amplituden der Ströme wurden auf den maximalen Strom, der durch Applikation von 1 mM GABA ausgelöst wurde, normiert.

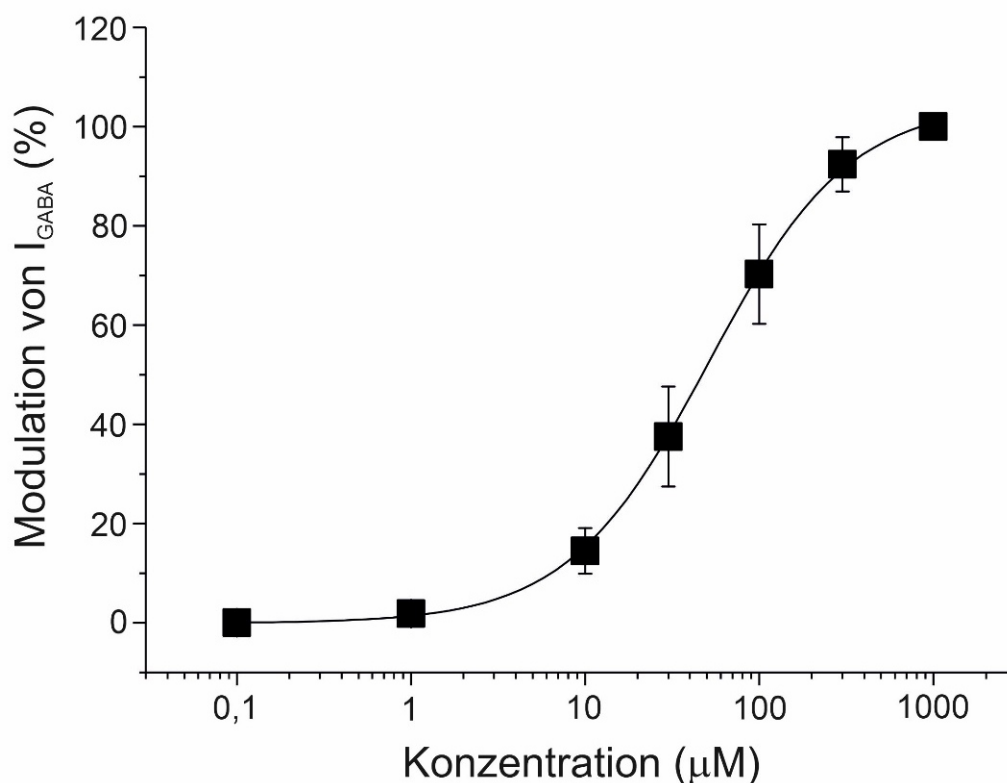


Abbildung 30: Modulation durch GABA. Eine typische Konzentrations-Wirkungs-Kurve von GABA mit verschiedenen ansteigenden Konzentrationen. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte der 6 durchgeführten Experimente an genauso vielen Oozyten aus 4 *Xenopus laevis* Fröschen.

Abbildung 30 zeigt die gemittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve von GABA. In klarer Abhängigkeit von der applizierten GABA-Konzentration kam es dabei zu einer Zunahme der jeweiligen Stromamplituden, wobei die EC_{50} bei $51.1 \pm 16.4 \mu M$ lag.

2. Extrakte

2.1. Modulation von I_{GABA} durch die Extrakt-Serie I

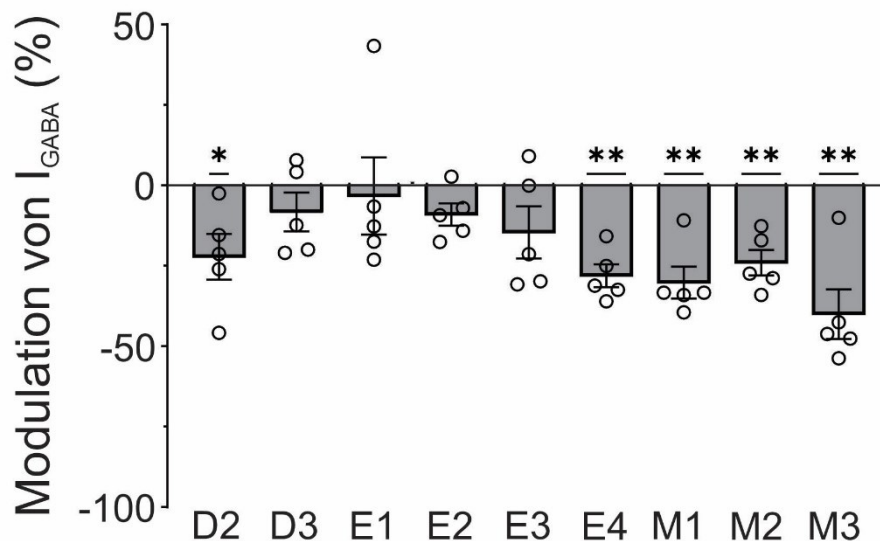


Abbildung 31: Modulation von I_{GABA} durch die Extrakt-Serie I. Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *one sample t-Test* wurde die Nullhypothese getestet (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$).

In Abbildung 31 ist zu sehen, dass keiner der untersuchten Extrakte nach der Applikation zu einer signifikanten positiven Modulation von I_{GABA} führte. In Anwesenheit von 100 $\mu g/ml$ E4, M1 und M3 konnte jedoch eine signifikant negative Inhibition von I_{GABA} gezeigt werden. Nach der Applikation von E4 wurde die GABA-Response um $-28.1 \pm 3.5 \%$ ($t = 7.933$, $df = 4$, $P = 0.0014$), bei M1 um $-30.3 \pm 5.0 \%$ ($t = 6.084$, $df = 4$, $P = 0.0037$) und bei M3 um $-40.1 \pm 7.7 \%$ ($t = 5.200$, $df = 4$, $P = 0.0065$) abgeschwächt. In Anwesenheit von D2, D3, E1, E2, E3 und M2 wurde keine signifikante Modulation von I_{GABA} beobachtet ($P > 0.05$) oder der ermittelte Wert lag im Bereich der biologischen Variabilität.

Extrakt	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
D2	-22.3	15.9	7.1	5/2	0.0350
D3	-8.3	13.5	6.0	5/2	0.2417
E1	-3.4	26.8	12.0	5/2	0.7935
E2	-9.1	7.7	3.5	5/2	0.0587
E3	-14.6	18.1	8.1	5/2	0.1448
E4	-28.1	7.9	3.5	5/2	0.0014
M1	-30.3	11.1	5.0	5/2	0.0037
M2	-24.0	8.8	4.0	5/2	0.0037
M3	-40.1	17.2	7.7	5/2	0.0065

Tabelle 1: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, Standardabweichung (SD), Standard Error of the Mean (S.E.M.), Anzahl der Experimente (n) sowie der Frösche (N) und der P-Wert ermittelt.

2.2. Modulation von I_{GABA} durch die Extrakt-Serie II

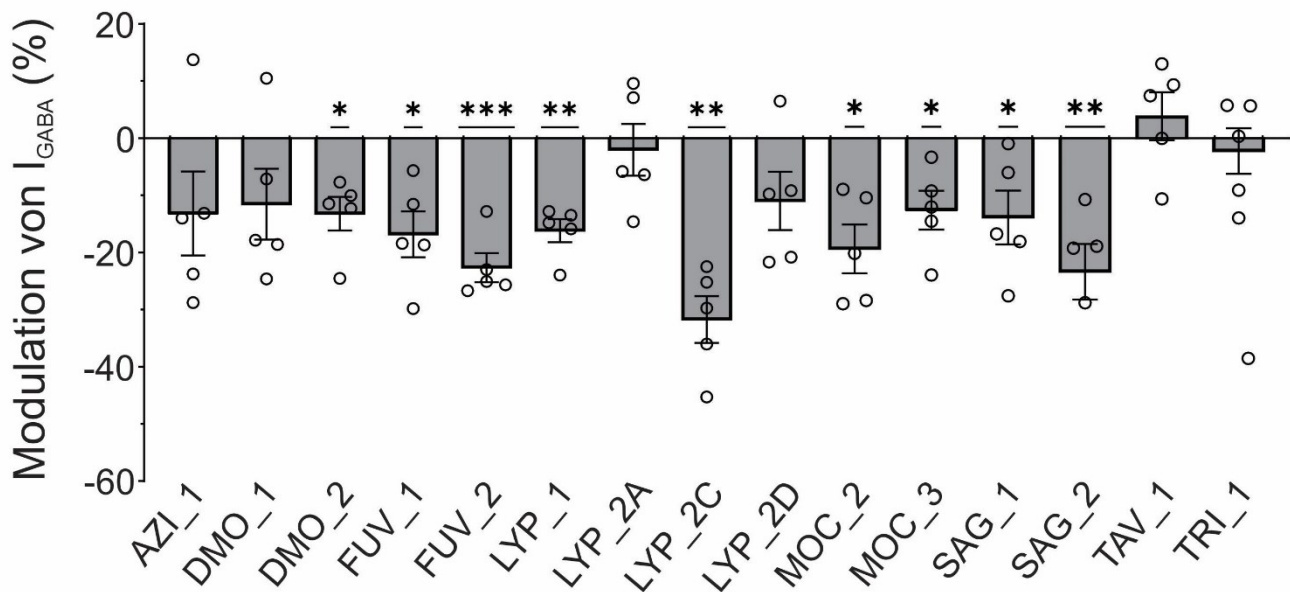


Abbildung 32: Modulation von I_{GABA} durch die Extrakt-Serie II. Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *one sample t-Test* wurde die Nullhypothese getestet (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$).

In Abbildung 32 ist zu sehen, dass keiner der untersuchten Extrakte dieser Serie zu einer signifikanten positiven Modulation von I_{GABA} führte. Jedoch konnte nach der Applikation von 100 µg/ml LYP_2C eine signifikante negative Inhibition von I_{GABA} gezeigt werden. In dessen Anwesenheit wurde die GABA-Response um -31.7 ± 4.1 % ($t = 7.758$, $df = 4$, $P = 0.0015$) abgeschwächt. In Anwesenheit von AZI_1, DMO_1, DMO_2, FUV_1, FUV_2, LYP_1, LYP_2A, LYP_2D, MOC_2, MOC_3, SAG_1, SAG_2, TAV_1 und TRI_1 wurde keine signifikante Modulation von I_{GABA} beobachtet ($P > 0.05$) oder der ermittelte Wert befand sich im Bereich der biologischen Variabilität.

Extrakt	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
AZI_1	-13.2	16.4	7.4	5/2	0.1474
DMO_1	-11.5	13.8	6.2	5/2	0.1357
DMO_2	-13.2	6.6	2.9	5/2	0.0109
FUV_1	-16.8	9.0	4.0	5/2	0.0141
FUV_2	-22.6	5.7	2.5	5/2	0.0009
LYP_1	-16.2	4.5	2.0	5/2	0.0013
LYP_2A	-2.0	10.1	4.5	5/2	0.6784
LYP_2C	-31.7	9.1	4.1	5/2	0.0015
LYP_2D	-11.0	11.4	5.1	5/2	0.0978
MOC_2	-18.2	8.9	4.0	5/2	0.0104
MOC_3	-11.8	7.1	3.2	5/2	0.0204
SAG_1	-13.0	9.9	4.4	5/2	0.0419
SAG_2	-22.0	10.2	4.6	5/2	0.0087
TAV_1	3.6	8.8	3.9	5/2	0.4136
TRI_1	-2.1	8.4	3.7	5/2	0.5984

Tabelle 2: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der P-Wert ermittelt.

2.3. Modulation von I_{GABA} durch die Extrakt-Serie III

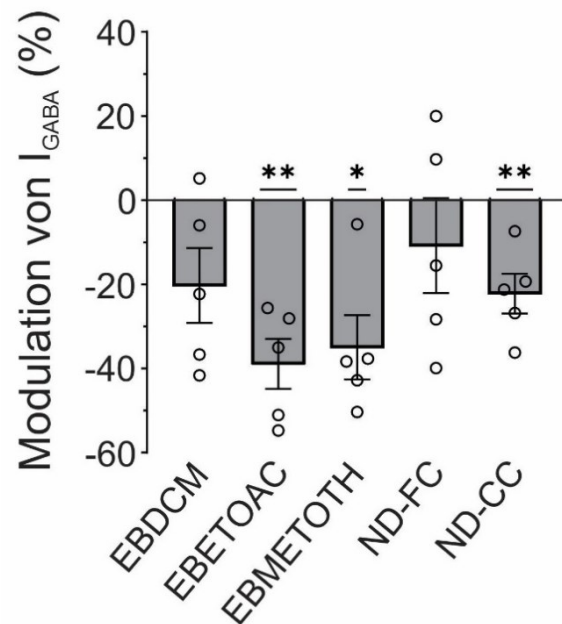


Abbildung 33: Modulation von I_{GABA} durch die Extrakt Serie III. Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *one sample t-Test* wurde die Nullhypothese getestet (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$).

In Abbildung 33 ist zu sehen, dass keiner der untersuchten Extrakte der Serie III zu einer signifikanten positiven Modulation von I_{GABA} führte. Nach der Applikation von 100 $\mu\text{g/ml}$ EBETOAC und EBMETHOTH konnte jedoch eine signifikante negative Inhibition von I_{GABA} gezeigt werden. In Anwesenheit von EBETOAC wurde die GABA-Response um $-38.9 \pm 5.9 \%$ ($t = 6.547$, $df = 4$, $P = 0.0028$) und von EBMETOTH um $-35.0 \pm 7.7 \%$ ($t = 4.572$, $df = 4$, $P = 0.0102$) abgeschwächt. Nach der Applikation von EBDCM, ND-FC und ND-CC wurde keine signifikante Modulation von I_{GABA} beobachtet ($P > 0.05$).

Extrakt	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
EBDCM	-20.3	19.9	8.9	5/3	0.0849
EBETOAC	-38.9	13.3	5.9	5/3	0.0028
EBMETOTH	-35.0	17.1	7.7	5/2	0.0102
ND-FC	-10.8	25.2	11.3	5/2	0.3917
ND-CC	-22.2	10.6	4.7	5/2	0.0093

Tabelle 3: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der P -Wert ermittelt.

3. Reinstoffe

3.1. Modulation von I_{GABA} durch die Reinstoffe B, C, D, E1 und E2

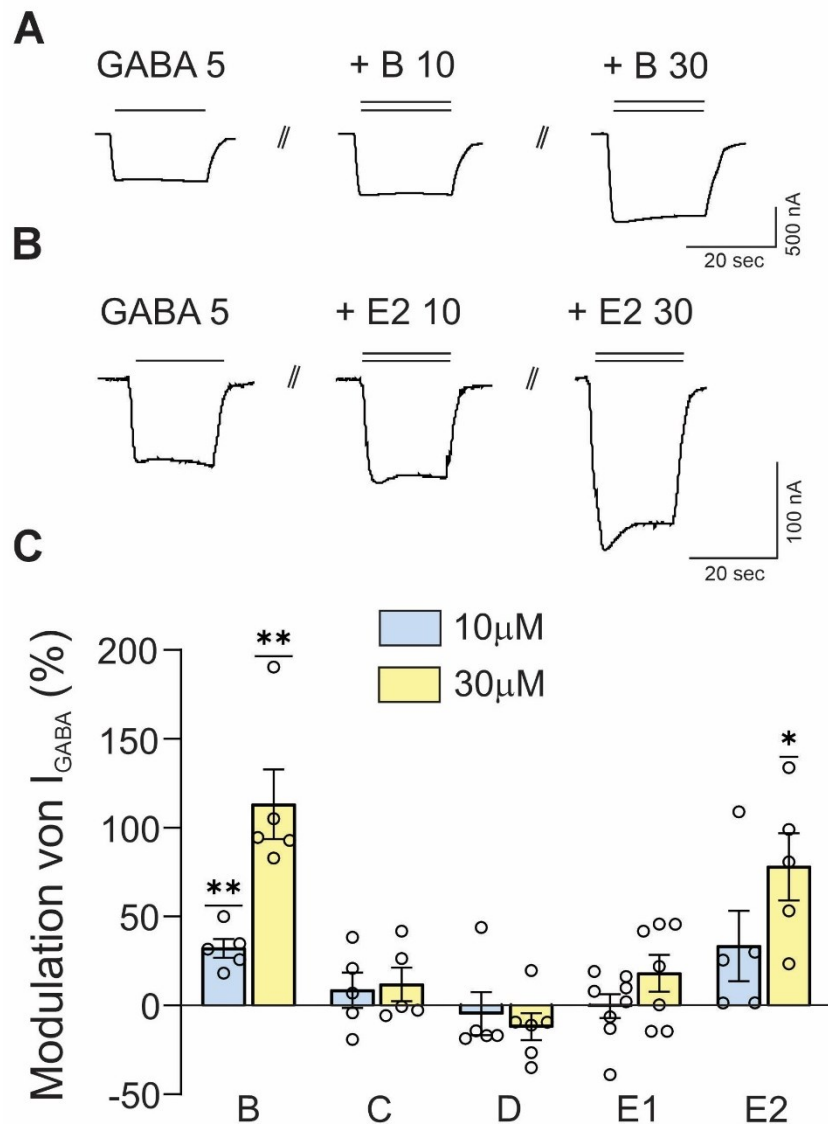


Abbildung 34: Modulation von I_{GABA} durch die Reinstoffe B, C, D, E1 und E2. (A) Dieses repräsentative Experiment zeigt die Modulation des GABA-induzierten Stroms bei 5 μM . Der linke Strom ist der Kontrollstrom. Der mittlere sowie der rechte Strom verdeutlichen dessen Modulation, die durch die Co-Applikation von 10 bzw. 30 μM des Reinstoffes B hervorgerufen wurde. (B) Dieses repräsentative Experiment zeigt die Modulation des GABA-induzierten Stroms bei 5 μM . Der linke Strom ist der Kontrollstrom. Der mittlere sowie der rechte Strom verdeutlichen dessen Modulation, die durch die Co-Applikation von 10 bzw. 30 μM des Reinstoffes E2 hervorgerufen wurde. (C) Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *one sample t-Test* wurde die Nullhypothese getestet (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$).

In Abbildung 34 ist zu sehen, dass die Applikation der Reinstoffe B und E2 zu einer signifikanten positiven Modulation von I_{GABA} führte. In Anwesenheit von 10 μM B wurde der GABA-induzierte Kontrollstrom um $32.0 \pm 5.3 \%$ ($t = 6.050$, $df = 4$, $P = 0.0038$) und von 30 μM B um $113.1 \pm 19.6 \%$ ($t = 5.760$, $df = 4$, $P = 0.0045$) verstärkt. Ähnlich kam es nach Applikation von 30 μM E2 zu einer Potenzierung von I_{GABA} um $78.0 \pm 18.9 \%$ ($t = 1.685$, $df = 4$, $P = 0.0146$), während kein signifikanter Effekt bei Applikation von 10 μM E2 beobachtet werden konnte. Die Reinstoffe C, D und E1 zeigten bei beiden getesteten Konzentrationen keine signifikante Modulation von I_{GABA} ($P > 0.05$).

Reinstoff	Mittelwert (%)	SD	S.E.M	n/N	P-Wert
B (10 μM)	32.0	11.8	5.3	5/2	0.0038
B (30 μM)	113.1	43.9	19.6	5/2	0.0045
C (10 μM)	8.5	22.2	9.9	5/3	0.4410
C (30 μM)	11.8	21.1	9.4	5/3	0.2812
D (10 μM)	-4.7	27.1	12.1	5/3	0.7201
D (30 μM)	-12.1	18.7	7.7	6/3	0.1760
E1 (10 μM)	-0.5	19.0	6.7	8/3	0.9476
E1 (30 μM)	18.0	27.5	10.4	7/3	0.1348
E2 (10 μM)	33.3	44.2	19.8	5/3	0.1672
E2 (30 μM)	78.0	42.3	18.9	5/3	0.0146

Tabelle 4: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der *P*-Wert ermittelt.

3.1.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Reinstoffes B

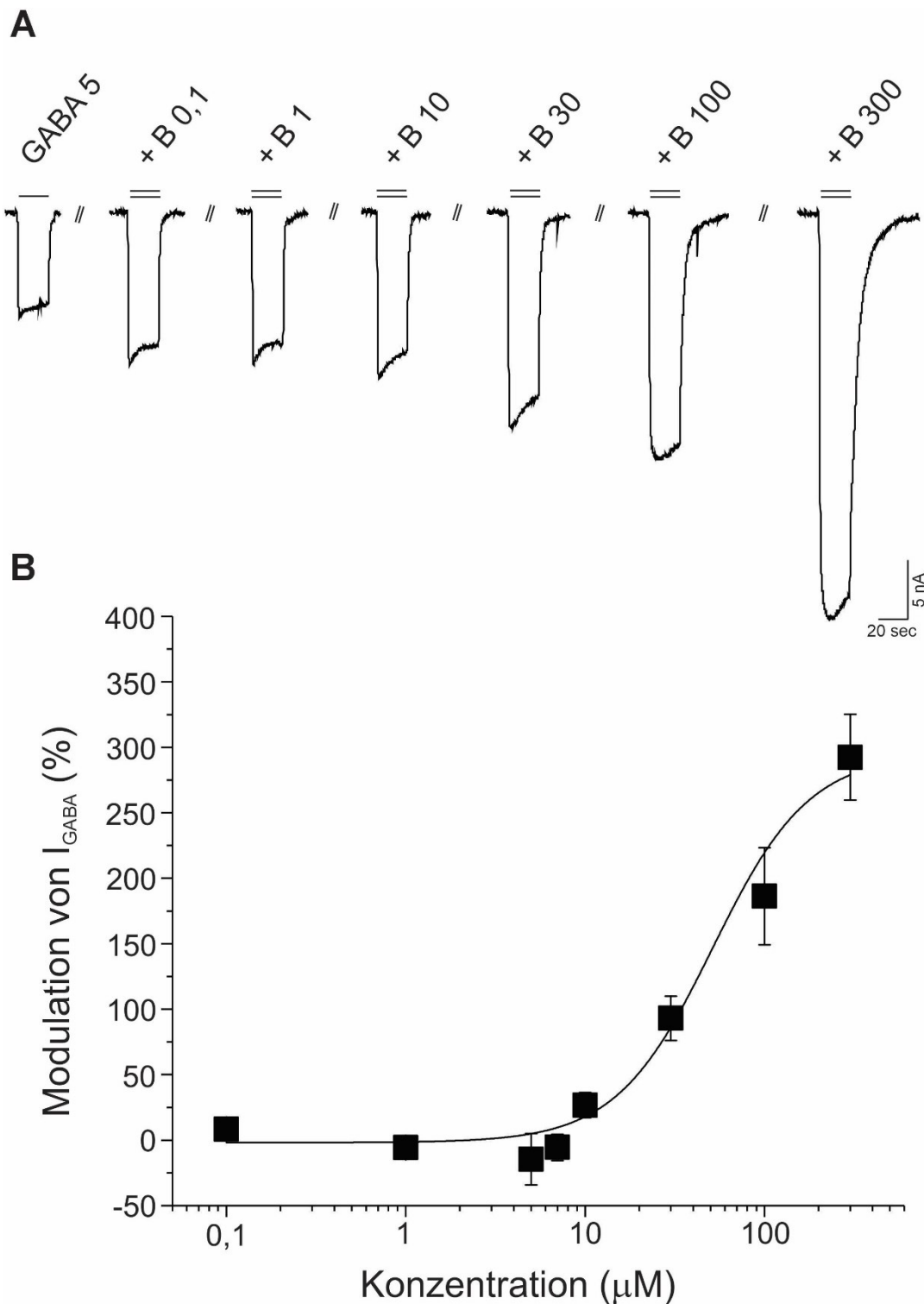


Abbildung 35: Modulation von I_{GABA} durch B. (A) Dieses repräsentative Experiment zeigt die Modulation des GABA-induzierten Stroms bei 5 μM . Der linke Strom ist der Kontrollstrom, die anderen Ströme verdeutlichen dessen durch die Co-Applikation hervorgerufene Modulation in den entsprechenden Konzentrationen (in μM). (B) Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigt die Modulation von I_{GABA} durch B in verschiedenen Konzentrationen und die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte der durchschnittlich 7 Experimente/Konzentration an genauso vielen Oozyten aus 5 *Xenopus laevis* Fröschen.

Im Anschluss wurde eine potenziell konzentrationsabhängige Wirkung des Reinstoffes B untersucht. Wie in Abbildung 35 gezeigt, traten erste signifikante Effekte auf I_{GABA} bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ auf und eine Saturation wurde bei Konzentrationen $\geq 300 \mu\text{M}$ beobachtet. Die EC_{50} lag bei $51.3 \pm 22.4 \mu\text{M}$ und die E_{max} bei $295.2 \pm 60.9 \%$.

3.1.2. Flumazenil reduziert die Wirkung von Diazepam auf I_{GABA}

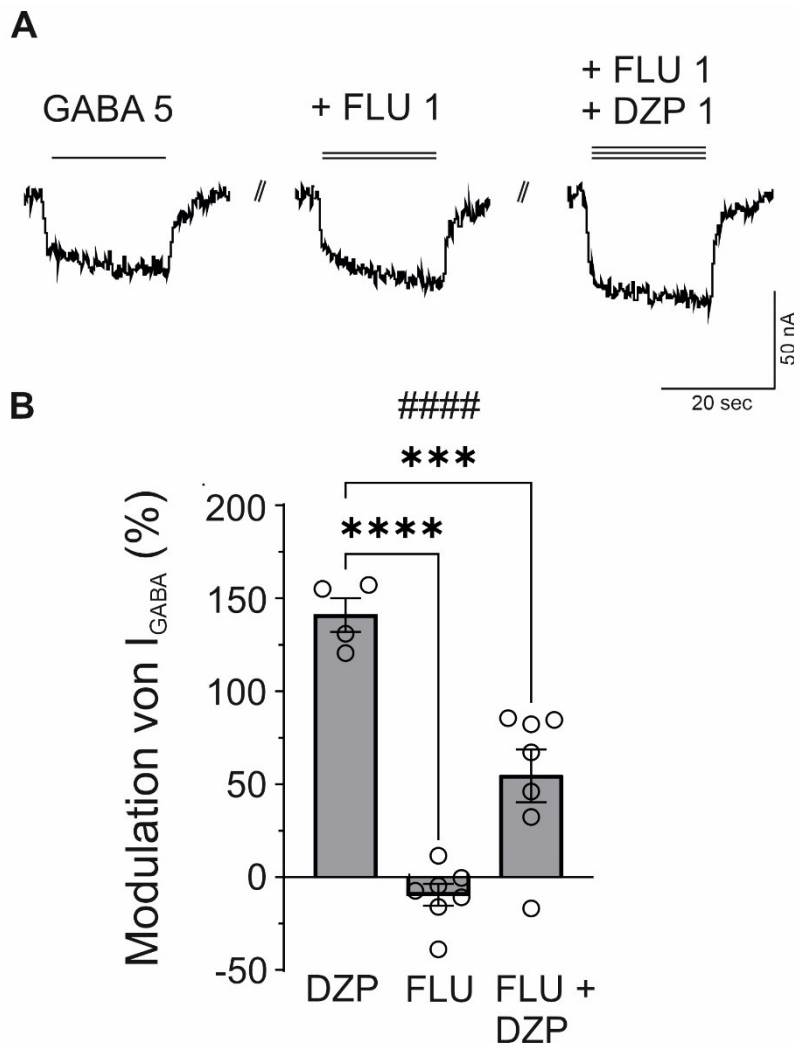


Abbildung 36: Modulation von I_{GABA} durch Diazepam und Flumazenil. (A) Dieses repräsentative Experiment zeigt die Modulation des GABA-induzierten Stromes. Der linke Strom ist der Kontrollstrom, der mittlere Strom zeigt I_{GABA} in Anwesenheit von Flumazenil in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$. Der rechte Strom zeigt den Strom durch die Co-Applikation von Flumazenil und Diazepam, jeweils in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$. (B) Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den Mittelwert $\pm$ S.E.M. der Experimente mit Diazepam ($1 \mu\text{M}$), Flumazenil ($1 \mu\text{M}$) und Flumazenil mit Diazepam (je $1 \mu\text{M}$), wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *ordinary one-way ANOVA* wurden die Effekte von Flumazenil bzw. Flumazenil und Diazepam mit dem Mittelwert der Experimente mit Diazepam verglichen ($*** = P < 0.001$, $**** = P < 0.0001$), $#### = P < 0.0001$).

Abbildung 36 zeigt ein Kontrollexperiment, das durchgeführt wurde, um die Wirkung des Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil auf die Potenzierung von I_{GABA} mittels Diazepam zu zeigen. Der *one-sample t-test* zeigte eine signifikante Potenzierung von I_{GABA} durch Applikation von 1 μ M Diazepam um $140.9 \pm 9.0 \%$ ($t = 15.57$, $df = 3$, $P = 0.0006$), während nach Applikation von 1 μ M Flumazenil kein Effekt beobachtet wurde ($-9.6 \pm 5.9 \%$, $t = 1.630$, $df = 6$, $P = 0.1542$). In Anwesenheit von Flumazenil induzierte Diazepam eine deutlich reduzierte, aber signifikante Potenzierung von I_{GABA} ($54.4 \pm 14.2 \%$, $t = 3.832$, $df = 6$, $P = 0.0086$). Mittels *ordinary one-way ANOVA* ($F(2, 15) = 39.92$, $P = < 0.0001$) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Effekten dieser drei Applikationen festgestellt. Der *post hoc tukey test* zeigte schließlich einen signifikanten Unterschied zwischen der Modulation von I_{GABA} durch Diazepam und jener durch Flumazenil ($P < 0.0001$) bzw. zwischen Diazepam und der Co-Applikation Diazepam und Flumazenil ($P = 0.0002$). Diese Daten zeigen, dass die potenzierende Wirkung von Diazepam durch dessen Bindung an die Benzodiazepin-Bindungsstelle bei einer gemeinsamen Applikation mit Flumazenil stark reduziert wird.

Substanz	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
Diazepam (1 μ M)	140.9	18.1	9.0	4/3	0.0006
Flumazenil (1 μ M)	-9.6	15.6	5.9	7/3	0.1542
Flumazenil (1 μ M) + Diazepam (1 μ M)	54.4	37.6	14.2	7/3	0.0086

Tabelle 5: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der P-Wert ermittelt.

3.1.3. Reinstoff B interagiert nicht mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle

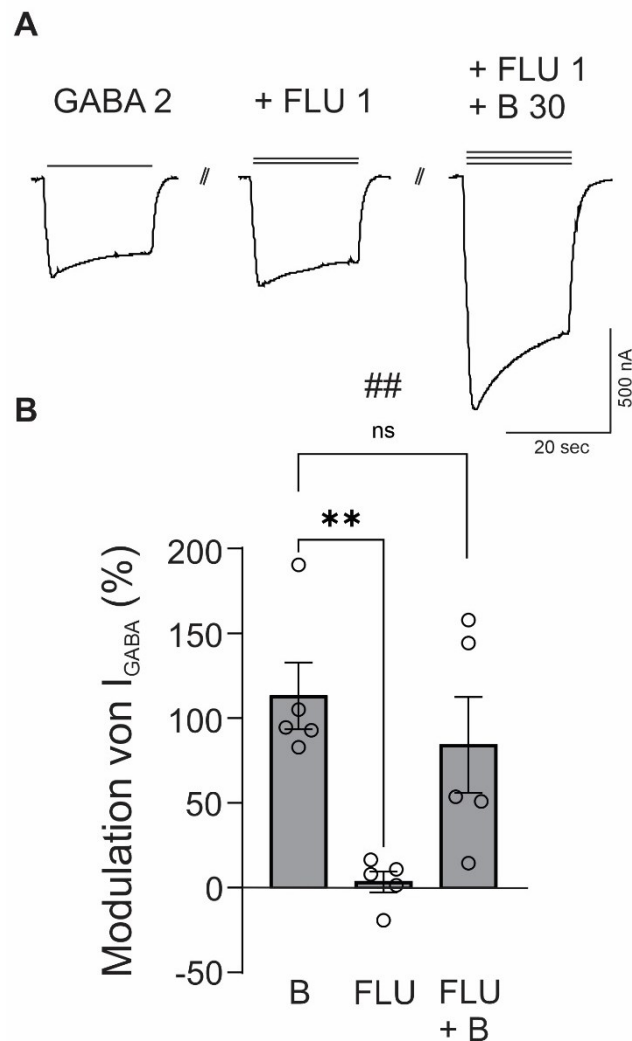


Abbildung 37: Modulation von I_{GABA} durch B und Flumazenil. (A) Dieses repräsentative Experiment zeigt die Modulation des GABA-induzierten Stromes. Der linke Strom ist der Kontrollstrom, der mittlere Strom zeigt I_{GABA} in Anwesenheit von Flumazenil in einer Konzentration von 1 μ M, während der rechte Strom I_{GABA} nach Co-Applikation von Flumazenil (1 μ M) und dem Reinstoff B (30 μ M) zeigt. (B) Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *ordinary one-way ANOVA* wurden die durchschnittlichen Effekte auf I_{GABA} von Flumazenil gemeinsam mit B mit dem Effekt von B bzw. dem *per se* Effekt von Flumazenil verglichen (** = $P < 0.01$, # = $P < 0.01$, ns = nicht signifikant).

Wie in Abbildung 37 gezeigt und davor beschrieben, führte die Applikation von 30 μ M B zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} (113.1 ± 19.6 %, $t = 5.760$, $df = 4$, $P = 0.0045$), während Flumazenil wiederum keinen Effekt auf I_{GABA} hatte (3.4 ± 6.2 %, $t = 0.5507$, $df = 4$, $P = 0.6112$). Durch Co-Applikation beider Substanzen (30 μ M B und 1 μ M Flumazenil) kam es zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} um 84.2 ± 28.2 % ($t = 2.982$, $df = 4$, $P = 0.0406$). Mittels *ordinary one-way ANOVA* ($F(2, 12) = 7.947$, $P = 0.0063$) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Effekten dieser drei Applikationen festgestellt. Der *post hoc tukey*

test zeigte schließlich einen signifikanten Unterschied zwischen der Modulation von I_{GABA} durch B und jener durch Flumazenil ($P = 0.0044$), aber keinen zwischen der Modulation durch B und jener durch die Co-Applikation B und Flumazenil ($P = 0.5128$). Die Wirkung des Reinstoffes B wird daher nicht vom Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil blockiert, was bedeutet, dass B nicht an die Benzodiazepin-Bindungsstelle bindet.

Substanz	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
B (30 μ M)	113.1	43.9	19.6	5/2	0.0045
Flumazenil (1 μ M)	3.4	13.8	6.2	5/2	0.6112
Flumazenil (1 μ M) + B (30 μ M)	84.2	63.1	28.2	5/2	0.0406

Tabelle 6: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der *P*-Wert ermittelt.

3.2. Modulation von I_{GABA} durch die Reinstoffe TVGR1, DHP, NTH, E22, ET2 und DMH21

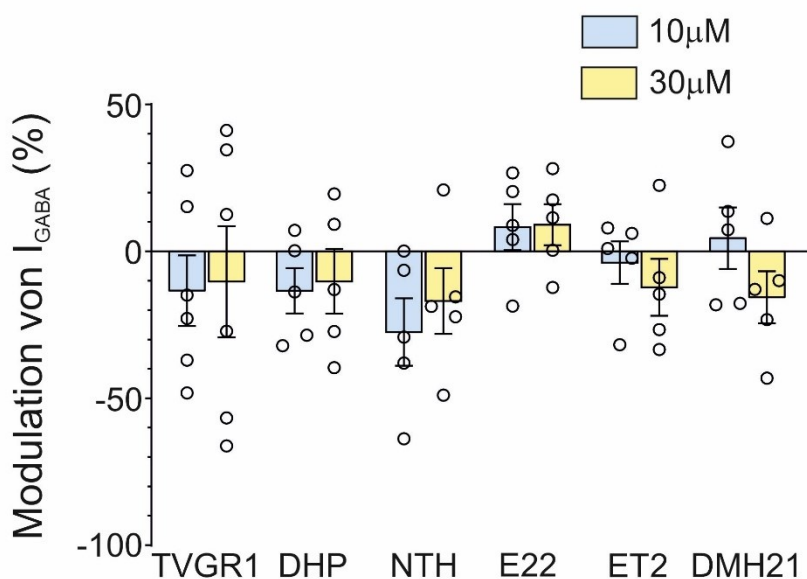


Abbildung 38: Modulation von I_{GABA} durch TVGR1, DHP, NTH, E22, ET2 und DMH21. Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *one sample t-Test* wurde der Unterschied zu Null ermittelt, jedoch war keines der Ergebnisse signifikant.

In Abbildung 38 ist zu sehen, dass die Applikation der Reinstoffe TVGR1, DHP, NTH, E22, ET2 und DMH21, jeweils in den Konzentrationen 10 μ M und 30 μ M, zu keiner signifikanten Modulation ($P > 0.05$) des GABA-induzierten Chloridstroms führte.

Reinstoff	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
TVGR1 (10 μ M)	-13.4	29.5	12.0	6/3	0.3176
TVGR1 (30 μ M)	-10.3	46.4	18.9	6/3	0.6099
DHP (10 μ M)	-13.4	17.2	7.7	5/3	0.1565
DHP (30 μ M)	-10.2	24.6	11.0	5/3	0.4065
NTH (10 μ M)	-27.5	25.7	11.5	5/2	0.0750
NTH (30 μ M)	-16.9	24.9	11.2	5/2	0.2043
E22 (10 μ M)	8.3	17.5	7.8	5/2	0.3510
E22 (30 μ M)	9.0	15.6	7.0	5/2	0.2644
ET2 (10 μ M)	-3.8	16.1	7.2	5/3	0.6257
ET2 (30 μ M)	-12.2	21.7	9.7	5/3	0.2762
DMH21 (10 μ M)	4.5	23.3	10.4	5/3	0.6884
DMH21 (30 μ M)	-15.6	19.8	8.9	5/3	0.1534

Tabelle 7: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der *P*-Wert ermittelt.

3.3. Modulation von I_{GABA} durch die Reinstoffe M3, DMA22, E21 und M1

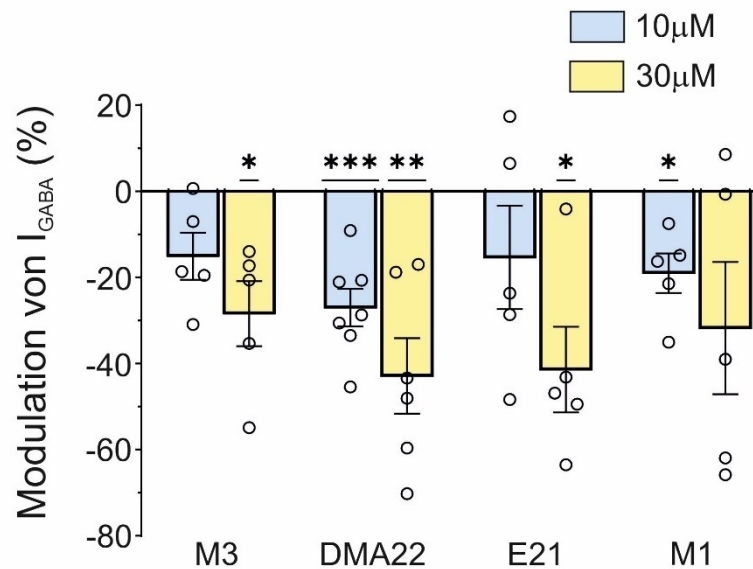


Abbildung 39: Modulation von I_{GABA} durch M3, DMA22, E21 und M1. Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *one sample t-Test* wurde der Unterschied zu Null ermittelt (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$).

In Abbildung 39 ist zu sehen, dass die Applikation der Reinstoffe M3, DMA22 und E21 jeweils bei zumindest einer Konzentration zu einer signifikanten Inhibition des GABA-induzierten

Chloridstroms führte. In Anwesenheit von 30 μM M3 wurde I_{GABA} um $-28.4 \pm 7.6 \%$ ($t = 3.762$, $df = 4$, $P = 0.0197$), von 10 μM DMA22 um $-27.0 \pm 4.3 \%$ ($t = 6.221$, $df = 6$, $P = 0.0008$), von 30 μM DMA22 um $-42.9 \pm 8.8 \%$ ($t = 4.891$, $df = 5$, $P = 0.0045$) und von 30 μM E21 um $-41.4 \pm 9.9 \%$ ($t = 4.167$, $df = 4$, $P = 0.0141$) abgeschwächt. Nach der Applikation von je 10 μM M3 und E21 sowie von 10 bzw. 30 μM M1 kam es zu keiner signifikanten Modulation des I_{GABA} ($P > 0.05$) oder die Werte lagen im Bereich der biologischen Variabilität.

Reinstoffe	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
M3 (10 μM)	-15.1	12.2	5.5	5/2	0.0505
M3 (30 μM)	-28.4	16.9	7.6	5/2	0.0197
DMA22 (10 μM)	-27.0	11.5	4.3	7/3	0.0008
DMA22 (30 μM)	-42.9	21.5	8.8	6/3	0.0045
E21 (10 μM)	-15.4	26.8	12.0	5/3	0.2693
E21 (30 μM)	-41.4	22.2	9.9	5/3	0.0141
M1 (10 μM)	-19.1	10.3	4.6	5/3	0.0142
M1 (30 μM)	-31.8	34.3	15.4	5/3	0.1072

Tabelle 8: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der P -Wert ermittelt.

3.4. Modulation von I_{GABA} durch die Reinstoffe AWD1, AWM1, DHHB, HO und THH

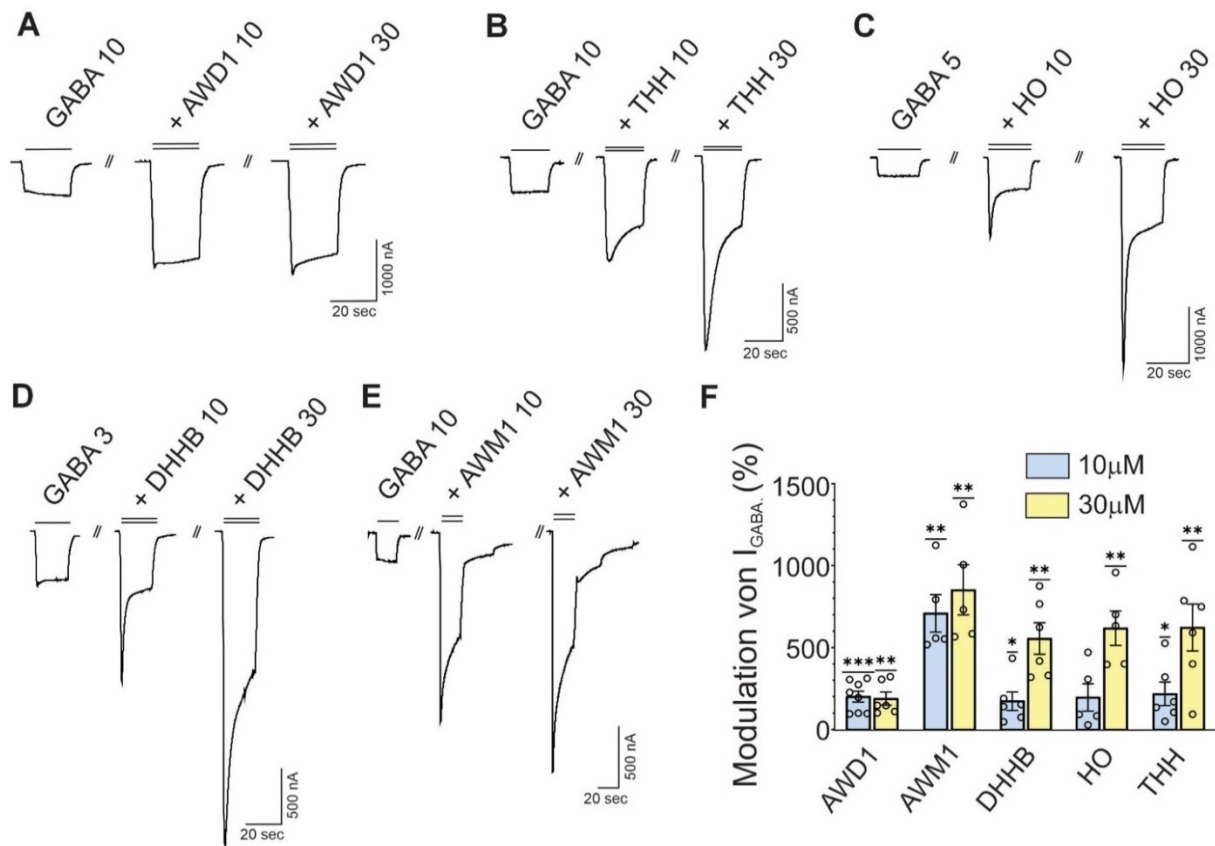


Abbildung 40: Modulation von I_{GABA} durch die Reinstoffe AWD1, AWM1, DHHB, HO und THH. (A) – (E) Diese repräsentativen Experimente zeigen jeweils die Modulation des GABA-induzierten Kontrollstroms durch die 4 Substanzen. Der linke Strom in jedem Panel ist dabei der GABA-Kontrollstrom und die beiden rechts davon gezeigten Ströme verdeutlichen stets dessen Modulation, die durch die Co-Applikation von 10 bzw. 30 µM des jeweiligen Reinstoffes hervorgerufen wurde. **(B)** Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *one sample t-Test* wurde der Unterschied zu Null ermittelt (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$).

Abbildung 40 zeigt, dass die Applikation der Reinstoffe AWD1, AWM1, DHHB, HO und THH jeweils in zumindest einer Konzentration zu einer signifikanten positiven Modulation von I_{GABA} führte. In Anwesenheit von 10 µM AWD1 wurde I_{GABA} um 200.4 ± 33.1 % ($t = 6.057$, $df = 7$, $P = 0.0005$), von 30 µM AWD1 um 188.4 ± 40.4 % ($t = 4.662$, $df = 5$, $P = 0.0055$), von 10 µM AWM1 um 708.7 ± 114.9 % ($t = 6.169$, $df = 4$, $P = 0.0035$), von 30 µM AWM1 um 851.9 ± 152.5 % ($t = 5.587$, $df = 4$, $P = 0.0050$), von 10 µM DHHB um 172.9 ± 56.5 % ($t = 3.061$, $df = 5$, $P = 0.0281$), von 30 µM DHHB um 554.9 ± 96.1 % ($t = 5.774$, $df = 5$, $P = 0.0022$), von 30 µM HO um 617.8 ± 104.8 % ($t = 5.897$, $df = 4$, $P = 0.0041$), von 10 µM THH um 217.1 ± 72.0 % ($t = 3.016$, $df = 5$, $P = 0.0296$) und von 30 µM THH um 622.1 ± 143.3 % ($t = 4.342$, $df = 5$, $P =$

0.0074) potenziert. Nur nach der Applikation von 10 μM HO wurde keine signifikante Modulation beobachtet ($P > 0.05$).

Reinstoff	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
AWD1 (10 μM)	200.4	93.6	33.1	8/3	0.0005
AWD1 (30 μM)	188.4	99.0	40.4	6/3	0.0055
AWM1 (10 μM)	708.7	256.9	114.9	5/2	0.0035
AWM1 (30 μM)	851.9	341.0	152.5	5/2	0.0050
DHHB (10 μM)	172.9	138.3	56.5	6/3	0.0281
DHHB (30 μM)	554.9	235.4	96.1	6/3	0.0022
HO (10 μM)	195.7	186.8	83.5	5/2	0.0791
HO (30 μM)	617.8	234.2	104.8	5/2	0.0041
THH (10 μM)	217.1	176.3	72.0	6/3	0.0296
THH (30 μM)	622.1	350.9	143.3	6/3	0.0074

Tabelle 9: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der P -Wert ermittelt.

3.4.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Reinstoffes HO

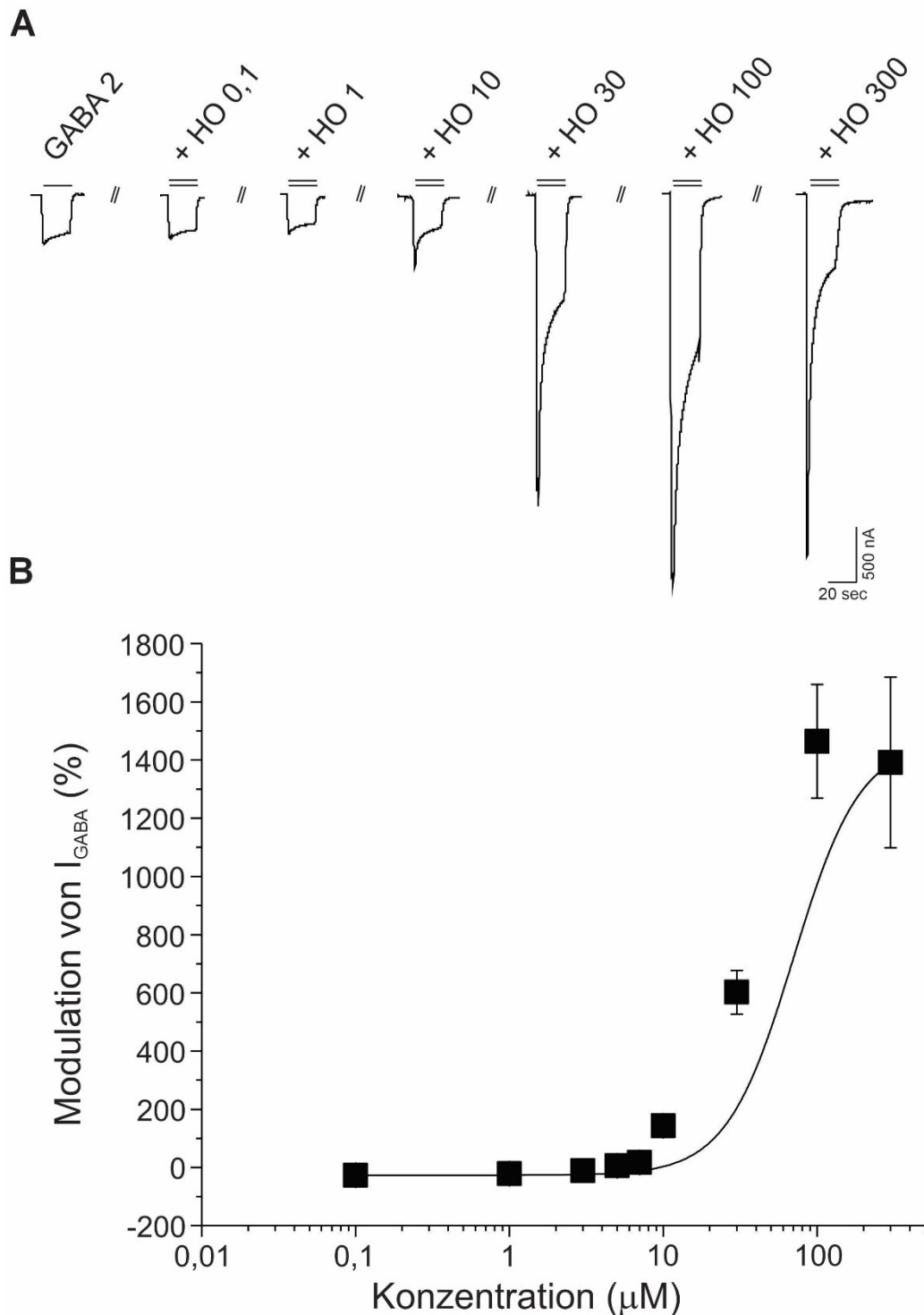


Abbildung 41: Modulation von I_{GABA} durch HO. (A) Dieses repräsentative Experiment zeigt die Modulation des GABA-induzierten Stroms bei 2 μM . Der linke Strom ist der Kontrollstrom, die anderen Ströme verdeutlichen dessen durch die Co-Applikation hervorgerufene Modulation in den entsprechenden Konzentrationen (in μM). (B) Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigt die Modulation von I_{GABA} durch HO in ansteigenden Konzentrationen. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte der durchschnittlich 7 Experimente je Konzentration an genauso vielen Oozyten aus 4 *Xenopus laevis* Fröschen.

Abbildung 41 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Reinstoffes HO. Applikation von HO führte zu einer positiven, konzentrationsabhängigen Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren. Erste signifikante Effekte traten dabei ab einer Konzentration von 30 μM auf, eine Saturation wurde bei Konzentrationen $\geq 100 \mu M$ beobachtet. Die EC_{50} wurde bei $35.7 \pm 6.5 \mu M$ und die E_{max} bei $1550.6 \pm 214.9 \%$ ermittelt.

3.4.2. I_{GABA} Potenzierung durch HO wird nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt

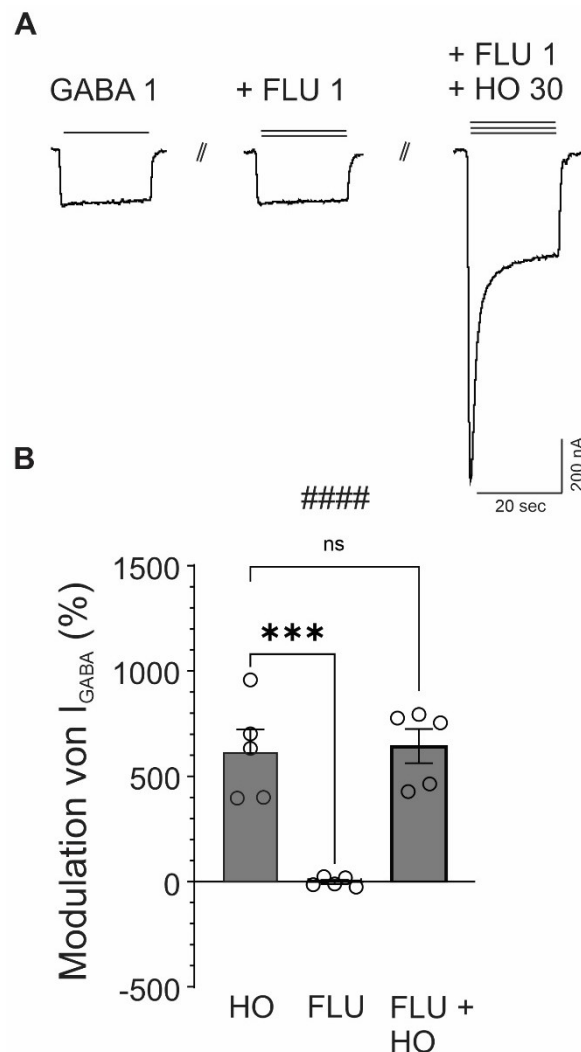


Abbildung 42: Modulation von I_{GABA} durch HO und Flumazenil. (A) Dieses repräsentative Experiment zeigt die Modulation des GABA-induzierten Stromes durch HO. Der linke Strom ist dabei der Kontrollstrom, der mittlere Strom I_{GABA} in Anwesenheit von Flumazenil und der rechte Strom zeigt die Modulation des Kontrollstroms durch die Co-Applikation von Flumazenil und HO. (B) Die einzelnen Balken des Diagramms zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ S.E.M., wobei an verschiedenen Oozyten stets zumindest 5 Experimente durchgeführt wurden. Mittels *ordinary one-way ANOVA* wurden die durchschnittlichen Effekte auf I_{GABA} von Flumazenil mit Flumazenil und HO bzw. dem *per se* Effekt von HO verglichen (** = $P < 0.01$, **** = $P < 0.0001$, ns = nicht signifikant).

Letztlich wurde auch untersucht, ob HO mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle interagiert. Wie in Abbildung 42 gezeigt, führte die Applikation von HO in einer Konzentration von 30 μM zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} ($617.8 \pm 104.8 \%$, $t = 5.897$, $df = 4$, $P = 0.0041$), während die Applikation von Flumazenil erneut keinen signifikanten Effekt auf I_{GABA} zeigte ($-2.4 \pm 9.8 \%$, $t = 0.2420$, $df = 4$, $P = 0.8207$). In Anwesenheit von Flumazenil kam es nach Applikation von HO zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} ($643.2 \pm 81.1 \%$; $t = 7.928$, $df = 4$, $P = 0.0014$).

Mittels *ordinary one-way ANOVA* ($F(2, 12) = 22.72$, $P = < 0.0001$) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Effekten dieser drei Applikationen festgestellt. Der *post hoc tukey test* zeigte schließlich einen signifikanten Unterschied zwischen der Modulation von I_{GABA} durch HO und jener durch Flumazenil ($P = 0.0002$), aber keinen zwischen der Modulation durch HO und jener durch die Co-Applikation HO und Flumazenil ($P = 0.9608$). Die Wirkung des Reinstoffes HO wird durch die gleichzeitige Applikation von Flumazenil nicht beeinflusst, was bedeutet, dass die Modulation des GABA_A -Rezeptors nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt wird.

Substanz	Mittelwert (%)	SD	S.E.M.	n/N	P-Wert
HO (30 μM)	617.8	234.2	104.8	5/2	0.0041
Flumazenil (1 μM)	-2.4	21.8	9.8	5/2	0.8207
Flumazenil (1 μM) + HO (30 μM)	643.2	181.4	81.1	5/2	0.0014

Tabelle 10: Deskriptive Statistik. Von jedem einzelnen Extrakt wurden Mittelwert in %, SD, S.E.M., n, N und der P-Wert ermittelt.

V. Diskussion

Die Modulation des GABA_A-Rezeptors spielt in der Pharmakotherapie verschiedener neurologischer und neuropsychiatrischer Erkrankungen eine große Rolle (Goldschen-Ohm, 2022). Jegliche momentan verfügbaren Pharmaka, darunter insbesondere die populären Benzodiazepine, verursachen jedoch neben der erwünschten Wirkung auch erhebliche Nebenwirkungen (Lembke et al., 2018; Olsen, 2018; Dubovsky and Marshall, 2022). Zudem entwickelt sich binnen kürzester Zeit eine Toleranz sowie Abhängigkeit, die in weiterer Folge zu Überdosierungen oder Substanzmissbrauch führen können (Hood et al., 2014; Goldschen-Ohm, 2022). Daher ist es essenziell, nach potenziellen neuen Wirkstoffen zu suchen, die durch ihre selektive Modulation des GABA_A-Rezeptors diese zahlreichen, schwerwiegenden Nebenwirkungen nicht hervorrufen.

Im Zuge meiner Masterarbeit stand daher die Untersuchung verschiedener Extrakte und Reinstoffe aus einer Gruppe südafrikanischer Pflanzen im Vordergrund. Die Modulation der GABA-induzierten Ströme wurde dabei an *Xenopus laevis* Oozyten, in denen zuvor der Subtyp $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ des GABA_A-Rezeptors exprimiert wurde, mit der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gemessen.

Keiner der hier untersuchten Extrakte zeigte eine positive Modulation von I_{GABA} , jedoch kam es bei einigen wenigen zu einer signifikanten Inhibition des GABA-induzierten Chloridstroms, wobei der stärkste Effekt beim Extrakt M3 mit etwa -40 % beobachtet wurde. Die direkte Inhibition des GABA_A-Rezeptors wird zwar momentan noch nicht therapeutisch ausgenützt, könnte aber bei Krankheiten wie Narkolepsie (Kim et al., 2008; Sun et al., 2019) oder der hepatischen Enzephalopathie (Sergeeva, 2013; Bai et al., 2023), bei denen GABAerge Aktivität vermehrt ist, von Vorteil sein. Aus toxikologischer Sicht ist die GABA_A-Rezeptor-Hemmung aber durchaus von Bedeutung: Eine Reduktion der inhibitorischen Neurotransmission führt zu einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit, die sich in Krampfanfällen, Neurotoxizität oder neuronalen Schädigungen äußern kann. Psychische Effekte wie Angstzustände, Unruhe oder auch kognitive Beeinträchtigungen können dadurch auftreten (Kim et al., 2017; Ghit et al., 2021). Zudem werden Pflanzen aus volksmedizinischer Sicht häufig als besonders sichere Behandlungsmöglichkeiten mit nur wenigen oder keinen Nebenwirkungen angesehen. Diese werden dabei jedoch meist maßgeblich unterschätzt (Shi et al., 2014; Bruni et al., 2021).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Extrakte bzw. deren Inhaltsstoffe sind nicht bekannt, weswegen weitere Untersuchungen notwendig wären, um genaue Aussagen über deren potenziellen pharmakologischen Nutzen treffen zu können.

Im Gegensatz dazu konnten einige isolierte Reinstoffe als neue GABA_A-Modulatoren identifiziert werden: 7 der 20 Reinstoffe führten zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA}. Den stärksten Effekt zeigte der Reinstoff AWM1 mit etwa 700 % bei 10 µM und etwa 850 % bei 30 µM. Zwei der Reinstoffe – B und HO – wurden dann noch näher untersucht und deren konzentrationsabhängige Wirkung ermittelt. Dabei lagen die EC₅₀-Werte beider Substanzen mit 51 bzw. 36 µM im mittleren mikromolaren Bereich. Der maximale Effekt von B war im Vergleich zu Diazepam und auch HO nur schwach ausgeprägt. HO hingegen führte im Vergleich zu Diazepam zu einer 2-3fach stärkeren Potenzierung von I_{GABA}.

Besonders vorteilhaft war, dass sowohl B als auch HO nicht mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle interagieren. Daher versprechen sie ein vorteilhaftes therapeutisches Potential, weniger Abhängigkeitserscheinungen und Nebenwirkungen sowie eine niedrigere Toleranzentwicklung.

Diese Daten sind ein erster Schritt zur Etablierung neuer positiver Modulatoren am GABA_A-Rezeptor und insbesondere hinsichtlich weiterer Therapiemöglichkeiten für Erkrankungen mit einer reduzierten inhibitorischen Aktivität relevant. Nachdem ich im Zuge meiner Masterarbeit 7 Reinstoffe mit signifikanter Potenzierung von I_{GABA} identifizieren konnte, wäre nun deren genauere Charakterisierung am GABA_A-Rezeptor von Interesse: Mittels Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten, die verschiedene Subtypen des GABA_A-Rezeptors exprimieren, könnten erste Erkenntnisse über ihr Selektivitätsprofil gewonnen werden. Eine spezifische Bindung an einen oder mehrere bestimmte Subtypen des GABA_A-Rezeptors würde es ermöglichen, Nebenwirkungen wie jene der Benzodiazepine gezielt zu umgehen. Insbesondere bei B und HO, die nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle mit dem GABA_A-Rezeptor interagieren, aber auch bei den anderen 5 Reinstoffen wären zudem Untersuchungen hinsichtlich ihrer potenziellen Bindungsstellen interessant.

In weiterer Folge wäre die Charakterisierung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Reinstoffe mittels präklinischer Untersuchungen von Bedeutung: Neben der Bioverfügbarkeit und dem toxikologischen Profil sollten auch physikalische Parameter wie die Löslichkeit, die Bindung an Plasmaproteine sowie die Lipophilie ermittelt werden. In zukünftigen Studien wäre es außerdem interessant zu untersuchen, inwieweit die Substanzen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und dementsprechend an Neurone angreifen können. Dieser Aspekt ist für die entsprechenden Erkrankungen relevant, da nur so eine Wirkung auf das ZNS erreicht werden kann.

Literaturverzeichnis

- Arora N, Dhiman P, Kumar S, Singh G, Monga V (2020) Recent advances in synthesis and medicinal chemistry of benzodiazepines. *Bioorganic Chemistry* 97:103668.
- Auer T, Schreppel P, Erker T, Schwarzer C (2020) Impaired chloride homeostasis in epilepsy: Molecular basis, impact on treatment, and current treatment approaches. *Pharmacology & Therapeutics* 205:107422.
- Baburin I, Beyl S, Hering S (2006) Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch* 453:117–123.
- Bai Y, Li K, Li X, Chen X, Zheng J, Wu F, Chen J, Li Z, Zhang S, Wu K, Chen Y, Wang Y, Yang Y (2023) Effects of oxidative stress on hepatic encephalopathy pathogenesis in mice. *Nat Commun* 14:4456.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry* 98:641–653.
- Barker JS, Hines RM (2020) Regulation of GABAA Receptor Subunit Expression in Substance Use Disorders. *Int J Mol Sci* 21.
- Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, 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* 28:46–48.
- Baumgartner W, Islas L, Sigworth FJ (1999) Two-microelectrode voltage clamp of *Xenopus* oocytes: voltage errors and compensation for local current flow. *Biophys J* 77:1980–1991.
- Baur R, Minier F, Sigel E (2006) A GABAA receptor of defined subunit composition and positioning: Concatenation of five subunits. *FEBS Letters* 580:1616–1620.
- Ben-Ari Y (2017) NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. *Trends in Neurosciences* 40:536–554.
- Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, Steinman L (2010) Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:2580–2585.
- Bianchi L, Driscoll M (2006) Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook*:1–16.

- Blauwblomme T, Dossi E, Pellegrino C, Goubert E, Iglesias BG, Sainte-Rose C, Rouach N, Nabhout R, Huberfeld G (2019) Gamma-aminobutyric acidergic transmission underlies interictal epileptogenicity in pediatric focal cortical dysplasia. *Annals of Neurology* 85:204–217.
- Boileau AJ, Czajkowski C (1999) Identification of Transduction Elements for Benzodiazepine Modulation of the GABAA Receptor: Three Residues Are Required for Allosteric Coupling. *Journal of Neuroscience* 19:10213–10220.
- Boileau AJ, Pearce RA, Czajkowski C (2010) The Short Splice Variant of the $\gamma 2$ Subunit Acts as an External Modulator of GABAA Receptor Function. *Journal of Neuroscience* 30:4895–4903.
- Borisova T, Pozdnyakova N, Dudarenko M, Krisanova N, Andronati S (2021) GABAA receptor agonist cinazepam and its active metabolite 3-hydroxyphenazepam act differently at the presynaptic site. *European Neuropsychopharmacology* 45:39–51.
- Bormann J (2000) The ‘ABC’ of GABA receptors. *Trends in pharmacological sciences* 21:16–19.
- Brodie MJ, Kwan P (2012) Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. *Epilepsia* 53:40–46.
- Bruni O, Ferini-Strambi L, Giacomoni E, Pellegrino P (2021) Herbal Remedies and Their Possible Effect on the GABAergic System and Sleep. *Nutrients* 13.
- Bryson A, Reid C, Petrou S (2023) Fundamental Neurochemistry Review: GABAA receptor neurotransmission and epilepsy: Principles, disease mechanisms and pharmacotherapy. *Journal of Neurochemistry* 165:6–28.
- Carvill GL et al. (2015) Mutations in the GABA Transporter SLC6A1 Cause Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures. *The American Journal of Human Genetics* 96:808–815.
- Cederholm JME, Schofield PR, Lewis TM (2009) Gating mechanisms in Cys-loop receptors. *European Biophysics Journal* 39:37–49.
- Cellot G, Cherubini E (2014) GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. *Front Pediatr* 2:70.
- Che Has AT, Absalom N, van Nieuwenhuijzen PS, Clarkson AN, Ahring PK, Chebib M (2016) Zolpidem is a potent stoichiometry-selective modulator of $\alpha 1\beta 3$ GABAA receptors: evidence of a novel benzodiazepine site in the $\alpha 1$ - $\alpha 1$ interface. *Scientific Reports* 6:28674.

- Chen Z-W, Bracamontes JR, Budelier MM, Germann AL, Shin DJ, Kathiresan K, Qian M-X, Manion B, Cheng WWL, Reichert DE, Akk G, Covey DF, Evers AS (2019) Multiple functional neurosteroid binding sites on GABAA receptors. *PLoS Biol* 17:e3000157.
- Cheng WWL, Chen Z-W, Bracamontes JR, Budelier MM, Krishnan K, Shin DJ, Wang C, Jiang X, Covey DF, Akk G, Evers AS (2018) Mapping two neurosteroid-modulatory sites in the prototypic pentameric ligand-gated ion channel GLIC. *J Biol Chem* 293:3013–3027.
- Chuang S-H, Reddy DS (2018) Genetic and Molecular Regulation of Extrasynaptic GABA-A Receptors in the Brain: Therapeutic Insights for Epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 364:180–197.
- Cowgill J, Fan C, Haloi N, Tobiasson V, Zhuang Y, Howard RJ, Lindahl E (2023) Structure and dynamics of differential ligand binding in the human ρ -type GABAA receptor. *Neuron* 111:3450-3464.e5.
- Dean J, Keshavan M (2017) The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry* 27:101–111.
- D'Hulst C, Atack JR, Kooy RF (2009) The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discovery Today* 14:866–875.
- Douillard-Guilloux G, Lewis D, Seney ML, Sibille E (2017) Decrease in somatostatin-positive cell density in the amygdala of females with major depression. *Depress Anxiety* 34:68–78.
- Dubin MJ, Mao X, Banerjee S, Goodman Z, Lapidus KAB, Kang G, Liston C, Shungu DC (2016) Elevated prefrontal cortex GABA in patients with major depressive disorder after TMS treatment measured with proton magnetic resonance spectroscopy. *J Psychiatry Neurosci* 41:E37-45.
- Dubovsky SL, Marshall D (2022) Benzodiazepines Remain Important Therapeutic Options in Psychiatric Practice. *Psychotherapy and Psychosomatics* 91:307–334.
- Duman RS, Sanacora G, Krystal JH (2019) Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron* 102:75–90.
- Earnheart JC, Schweizer C, Crestani F, Iwasato T, Itohara S, Mohler H, Lüscher B (2007) GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J Neurosci* 27:3845–3854.

- Ellis J, Ferini-Strambi L, García-Borreguero D, Heidbreder A, O'Regan D, Parrino L, Selsick H, Penzel T (2023) Chronic Insomnia Disorder across Europe: Expert Opinion on Challenges and Opportunities to Improve Care. *Healthcare (Basel)* 11.
- Engin E (2022) GABA(A) receptor subtypes and benzodiazepine use, misuse, and abuse. *Front Psychiatry* 13:1060949.
- Evenseth LSM, Gabrielsen M, Sylte I (2020) The GABA(B) Receptor-Structure, Ligand Binding and Drug Development. *Molecules* 25.
- Eyre MD, Renzi M, Farrant M, Nusser Z (2012) Setting the time course of inhibitory synaptic currents by mixing multiple GABA(A) receptor α subunit isoforms. *J Neurosci* 32:5853–5867.
- Fedi M, Berkovic SF, Marini C, Mulligan R, Tochon-Danguy H, Reutens DC (2006) A GABAA receptor mutation causing generalized epilepsy reduces benzodiazepine receptor binding. *NeuroImage* 32:995–1000.
- Ferreira-Junior NC, Ruggeri A, Silva Jr SD, Zampieri TT, Ceroni A, Michelini LC (2019) Exercise training increases GAD65 expression, restores the depressed GABAA receptor function within the PVN and reduces sympathetic modulation in hypertension. *Physiological Reports* 7:e14107.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel Jr J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S (2014) ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55:475–482.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM (2017) Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58:522–530.
- Gassmann M, Bettler B (2012) Regulation of neuronal GABAB receptor functions by subunit composition. *Nature Reviews Neuroscience* 13:380–394.
- Germann AL, Pierce SR, Tateiwa H, Sugawara Y, Reichert DE, Evers AS, Steinbach JH, 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 AS, Hussein DEE (2021) GABA(A) receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J Genet Eng Biotechnol* 19:123.

- Ghosal S, Hare B, Duman RS (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.
- Goldschen-Ohm MP (2022) Benzodiazepine Modulation of GABA(A) Receptors: A Mechanistic Perspective. *Biomolecules* 12.
- Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD (2013) Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System–Mediated Effects. *Ochsner Journal* 13:214–223.
- Hablitz JJ, Mathew SS, Pozzo-Miller L (2009) GABA vesicles at synapses: are there 2 distinct pools? *The Neuroscientist* 15:218–224.
- Hannan S, Minere M, Harris J, Izquierdo P, Thomas P, Tench B, Smart TG (2020) GABAAR isoform and subunit structural motifs determine synaptic and extrasynaptic receptor localisation. *Neuropharmacology* 169:107540.
- Hanson SM, Czajkowski C (2008) Structural Mechanisms Underlying Benzodiazepine Modulation of the GABAA Receptor. *Journal of Neuroscience* 28:3490–3499.
- Hasler G, Neumeister A, van der Veen JW, Tumonis T, Bain EE, Shen J, Drevets WC, Charney DS (2005) Normal prefrontal gamma-aminobutyric acid levels in remitted depressed subjects determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry* 58:969–973.
- Heaney CF, Kinney JW (2016) Role of GABAB receptors in learning and memory and neurological disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 63:1–28.
- Hedblom E, Kirkness EF (1997) A Novel Class of GABAA Receptor Subunit in Tissues of the Reproductive System *. *Journal of Biological Chemistry* 272:15346–15350.
- Hood SD, Norman A, Hince DA, Melichar JK, Hulse GK (2014) Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. *Br J Clin Pharmacol* 77:285–294.
- Hörtnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, Kirchmair E, Sieghart W, Sperk G (2013) Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience* 236:345–372.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HMA, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444:486–489.
- Hutcherson TC, Cieri-Hutcherson NE, Gosciak MF (2020) Brexanolone for postpartum depression. *American Journal of Health-System Pharmacy* 77:336–345.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience* 9:331–343.

- Jensen K, Chiu C-S, Sokolova I, Lester HA, Mody I (2003) GABA Transporter-1 (GAT1)-Deficient Mice: Differential Tonic Activation of GABAA Versus GABAB Receptors in the Hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 90:2690–2701.
- Johnston GAR, Beart PM (2024) Milestone review: GABA, from chemistry, conformations, ionotropic receptors, modulators, epilepsy, flavonoids, and stress to nutraceuticals. *Journal of Neurochemistry* n/a Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.16087> [Accessed May 24, 2024].
- Kaplan YC, Demir O (2021) Use of Phenytoin, Phenobarbital Carbamazepine, Levetiracetam Lamotrigine and Valproate in Pregnancy and Breastfeeding: Risk of Major Malformations, Dose-dependency, Monotherapy vs Polytherapy, Pharmacokinetics and Clinical Implications. *Curr Neuropharmacol* 19:1805–1824.
- Karolewicz B, Maciag D, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Feyissa AM, Rajkowska G (2010) Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:411–420.
- Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, Noebels JL, Mayfield RD, Hanahan D, Baekkeskov S (1997) Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:14060–14065.
- Keam SJ (2020) Remimazolam: First Approval. *Drugs* 80:625–633.
- Khom S, Baburin I, Timin EN, Hohaus A, Sieghart W, Hering S (2006) Pharmacological Properties of GABAA Receptors Containing $\gamma 1$ Subunits. *Molecular Pharmacology* 69:640–649.
- Kienitz R, Kay L, Beuchat I, Gelhard S, von Brauchitsch S, Mann C, Lucaciu A, Schäfer J-H, Siebenbrodt K, Zöllner J-P, Schubert-Bast S, Rosenow F, Strzelczyk A, Willems LM (2022) Benzodiazepines in the Management of Seizures and Status Epilepticus: A Review of Routes of Delivery, Pharmacokinetics, Efficacy, and Tolerability. *CNS Drugs* 36:951–975.
- Kim J, Lee S, Kang S, Kim S-H, Kim J-C, Yang M, Moon C (2017) Brain-derived neurotrophic factor and GABAergic transmission in neurodegeneration and neuroregeneration. *Neural Regen Res* 12:1733–1741.
- Kim JJ, Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, Howard RJ, Zhu S, Noviello CM, Walsh RM, Lindahl E, Hibbs RE (2020) Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature* 585:303–308.
- Kim JJ, Hibbs RE (2021) Direct Structural Insights into GABAA Receptor Pharmacology. *Trends in Biochemical Sciences* 46:502–517.

- Kim SJ, Lyoo IK, Lee YS, Sung YH, Kim HJ, Kim JH, Kim KH, Jeong D-U (2008) Increased GABA levels in medial prefrontal cortex of young adults with narcolepsy. *Sleep* 31:342–347.
- Knoflach F, Bertrand D (2021) Pharmacological modulation of GABAA receptors. *Current Opinion in Pharmacology* 59:3–10.
- Koppensteiner P, Bhandari P, Önal C, Borges-Merjane C, Le Monnier E, Roy U, Nakamura Y, Sadakata T, Sanbo M, Hirabayashi M, Rhee J, Brose N, Jonas P, Shigemoto R (2024) GABA(B) receptors induce phasic release from medial habenula terminals through activity-dependent recruitment of release-ready vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121:e2301449121.
- Lachance-Touchette P, Brown P, Meloche C, Kinirons P, Lapointe L, Lacasse H, Lortie A, Carmant L, Bedford F, Bowie D, Cossette P (2011) Novel $\alpha 1$ and $\gamma 2$ GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *European Journal of Neuroscience* 34:237–249.
- Lamb YN (2022) Ganaxolone: First Approval. *Drugs* 82:933–940.
- Landolt S, Rosemann T, Blozik E, Brüngger B, Huber CA (2021) Benzodiazepine and Z-Drug Use in Switzerland: Prevalence, Prescription Patterns and Association with Adverse Healthcare Outcomes. *Neuropsychiatr Dis Treat* 17:1021–1034.
- Lee S-E, Lee Y, Lee GH (2019) The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain. *Archives of Pharmacal Research* 42:1031–1039.
- Lembke A, Papac J, Humphreys K (2018) Our Other Prescription Drug Problem. *New England Journal of Medicine* 378:693–695.
- Lian J-J, Cao Y-Q, Li Y-L, Yu G, Su R-B (2020) Flumazenil-Insensitive Benzodiazepine Effects in Recombinant $\alpha\beta$ and Neuronal GABA(A) Receptors. *Brain Sci* 10.
- Littlejohn EL, Espinoza L, Lopez MM, Smith BN, Boychuk CR (2019) GABA(A) receptor currents in the dorsal motor nucleus of the vagus in females: influence of ovarian cycle and 5 α -reductase inhibition. *J Neurophysiol* 122:2130–2141.
- Littleton JT, Barnard RJ, Titus SA, Slind J, Chapman ER, Ganetzky B (2001) SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12233–12238.
- 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.
- Lorenz-Guertin JM, Jacob TC (2018) GABA type a receptor trafficking and the architecture of synaptic inhibition. *Developmental Neurobiology* 78:238–270.

- Löscher W, Potschka H, Sisodiya SM, Vezzani A (2020) Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacol Rev* 72:606–638.
- Löscher W, Rogawski MA (2012) How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia* 53:12–25.
- Lukačšínová A, Reissigová J, Ortner-Hadžiabdić M, Brkic J, Okuyan B, Volmer D, Tadić I, Modamio P, Mariño EL, Tachkov K, Liperotti R, Onder G, Finne-Soveri H, van Hout H, Howard EP, 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.
- Lummis SCR, McGonigle I, Ashby JA, Dougherty DA (2011) Two Amino Acid Residues Contribute to a Cation- π Binding Interaction in the Binding Site of an Insect GABA Receptor. *Journal of Neuroscience* 31:12371–12376.
- Luscher B, Fuchs T (2015) GABAergic control of depression-related brain states. *Adv Pharmacol* 73:97–144.
- Luscher B, Maguire JL, Rudolph U, Sibille E (2023) GABAA receptors as targets for treating affective and cognitive symptoms of depression. *Trends in Pharmacological Sciences* 44:586–600.
- Luscher B, Shen Q, Sahir N (2011) The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular Psychiatry* 16:383–406.
- Lüscher BP, Baur R, Goeldner M, Sigel E (2012) Influence of GABAA Receptor α Subunit Isoforms on the Benzodiazepine Binding Site. *PLOS ONE* 7:e42101.
- Mactier R, Laliberté M, Mardini J, Ghannoum M, Lavergne V, Gosselin S, Hoffman RS, Nolin TD (2014) Extracorporeal Treatment for Barbiturate Poisoning: Recommendations From the EXTRIP Workgroup. *American Journal of Kidney Diseases* 64:347–358.
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005) Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8:797–804.
- Maillard P-Y et al. (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.
- Maldifassi MC, Baur R, Sigel E (2016) Functional sites involved in modulation of the GABAA receptor channel by the intravenous anesthetics propofol, etomidate and pentobarbital. *Neuropharmacology* 105:207–214.

- Martenson JS, Tomita S (2015) Synaptic localization of neurotransmitter receptors: comparing mechanisms for AMPA and GABAA receptors. *Current Opinion in Pharmacology* 20:102–108.
- Masiulis S, Desai R, Uchański T, Serna Martin I, Lavery D, Karia D, Malinauskas T, Zivanov J, Pardon E, Kotecha A, Steyaert J, Miller KW, Aricescu AR (2019) GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature* 565:454–459.
- Ménard C, Hodes GE, Russo SJ (2016) Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience* 321:138–162.
- Middendorp SJ, Maldifassi MC, Baur R, Sigel E (2015) Positive modulation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors by an antagonist of the high affinity benzodiazepine binding site. *Neuropharmacology* 95:459–467.
- Miko A, Werby E, Sun H, Healey J, Zhang L (2004) A TM2 Residue in the $\beta 1$ Subunit Determines Spontaneous Opening of Homomeric and Heteromeric γ -Aminobutyric Acid-gated Ion Channels *. *Journal of Biological Chemistry* 279:22833–22840.
- Miller PS, Aricescu AR (2014) Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512:270–275.
- Miller PS, Smart TG (2010) Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 31:161–174.
- Mohamad FH, Mohamad Jamali MA, Che Has AT (2023) Structure-function Studies of GABA (A) Receptors and Related computer-aided Studies. *Journal of Molecular Neuroscience* 73:804–817.
- Möhler H (2006) GABAA receptor diversity and pharmacology. *Cell and Tissue Research* 326:505–516.
- Möhler H (2012) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62:42–53.
- Moosmann B, King LA, Auwärter V (2015) Designer benzodiazepines: A new challenge. *World Psychiatry* 14:248.
- Mortensen M, Patel B, Smart TG (2011) GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones. *Front Cell Neurosci* 6:1.
- Motiwala Z, Aduri NG, Shaye H, Han GW, Lam JH, Katritch V, Cherezov V, Gati C (2022) Structural basis of GABA reuptake inhibition. *Nature* 606:820–826.
- Olsen RW (2018) GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* 136:10–22.

- Olsen RW, Li GD, Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL (1999) Basic neurochemistry. Siegel, GJ, Agranoff, BW, Albers, RW, Molinoff, PB, Eds:335.
- Olsen RW, Sieghart W (2009) GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56:141–148.
- Padgett CL, Hanek AP, Lester HA, Dougherty DA, Lummis SCR (2007) Unnatural Amino Acid Mutagenesis of the GABAA Receptor Binding Site Residues Reveals a Novel Cation– π Interaction between GABA and β 2Tyr97. *Journal of Neuroscience* 27:886–892.
- Perucca P, Scheffer IE, Kiley M (2018) The management of epilepsy in children and adults. *Medical Journal of Australia* 208:226–233.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257:9389–9393.
- Planells-Cases R, Jentsch TJ (2009) Chloride channelopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792:173–189.
- Reddy DS, Estes WA (2016) Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* 37:543–561.
- Riemann D et al. (2017) European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia. *Journal of Sleep Research* 26:675–700.
- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry International* 61:546–558.
- Rudolph U, Knoflach F (2011) Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10:685–697.
- Rudolph U, Möhler H (2014) GABAA Receptor Subtypes: Therapeutic Potential in Down Syndrome, Affective Disorders, Schizophrenia, and Autism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54:483–507.
- Sajan SA et al. (2024) De novo variants in GABRA4 are associated with a neurological phenotype including developmental delay, behavioral abnormalities and epilepsy. *European Journal of Human Genetics* Available at: <https://doi.org/10.1038/s41431-024-01600-3>.
- Sallard E, Letourneur D, Legendre P (2021) Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell Mol Life Sci* 78:5341–5370.

- Sarasa SB, Mahendran R, Muthusamy G, Thankappan B, Selta DRF, Angayarkanni J (2020) A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Current Microbiology* 77:534–544.
- Sarker A, Al-Garadi MA, Ge Y, Nataraj N, McGlone L, Jones CM, Sumner SA (2022) Evidence of the emergence of illicit benzodiazepines from online drug forums. *Eur J Public Health* 32:939–941.
- Sauer J-F, Bartos M (2011) Postnatal differentiation of cortical interneuron signalling. *European Journal of Neuroscience* 34:1687–1696.
- Scimemi A (2014) Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00161>.
- Scott S, Aricescu AR (2019) A structural perspective on GABAA receptor pharmacology. *Current Opinion in Structural Biology* 54:189–197.
- Sears SM, Hewett SJ (2021) Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Exp Biol Med (Maywood)* 246:1069–1083.
- Sente A, Desai R, Naydenova K, Malinauskas T, Jounaidi Y, Miehl J, Zhou X, Masiulis S, Hardwick SW, Chirgadze DY, Miller KW, Aricescu AR (2022) Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signalling. *Nature* 604:190–194.
- Sergeeva OA (2013) GABAergic transmission in hepatic encephalopathy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 536:122–130.
- Shen Q, Lal R, Luellen BA, Earnheart JC, Andrews AM, 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* 68:512–520.
- Shi Y, Dong J-W, Zhao J-H, Tang L-N, Zhang J-J (2014) Herbal Insomnia Medications that Target GABAergic Systems: A Review of the Psychopharmacological Evidence. *Curr Neuropharmacol* 12:289–302.
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Höger H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABAA receptors. *Neurochemistry International* 34:379–385.
- Sieghart W, Savić MM (2018) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABAA Receptor Subtype- and Function-selective Ligands: Key Issues in Translation to Humans Ohlstein EH, ed. *Pharmacological Reviews* 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.
- Sigel E, Baur R (1988) Allosteric modulation by benzodiazepine receptor ligands of the GABAA receptor channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Neuroscience* 8:289–295.
- Sigel E, Ernst M (2018) The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 39:659–671.
- Sigel E, Mamalaki C, Barnard EA (1982) Isolation of a GABA receptor from bovine brain using a benzodiazepine affinity column. *FEBS Lett* 147:45–48.
- Sigel E, Minier F (2005) The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. *Molecular Nutrition & Food Research* 49:228–234.
- Sigel E, Steinmann ME (2012) Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors. *J Biol Chem* 287:40224–40231.
- Sigel E, Stephenson FA, Mamalaki C, Barnard EA (1983) A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J Biol Chem* 258:6965–6971.
- Sills GJ, Rogawski MA (2020) Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology* 168:107966.
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA (2004) Analysis of the Set of GABAA Receptor Genes in the Human Genome *. *Journal of Biological Chemistry* 279:41422–41435.
- Skeberdis VA, Chevalleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadicani SO, Lin Y, Bennett MVL, Yuste R, Castillo PE, Zukin RS (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci* 9:501–510.
- Smith GB, Olsen RW (1995) Functional domains of GABAA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 16:162–168.
- Smith KS, Rudolph U (2012) Anxiety and depression: mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA(A) receptor subtypes. *Neuropharmacology* 62:54–62.
- Sneyd JR, Gambus PL, Rigby-Jones AE (2021) Current status of perioperative hypnotics, role of benzodiazepines, and the case for remimazolam: a narrative review. *British Journal of Anaesthesia* 127:41–55.
- Song S-H, Augustine GJ (2016) Synapsin Isoforms Regulating GABA Release from Hippocampal Interneurons. *J Neurosci* 36:6742–6757.

- Spence J, Young J, Alhazzani W, Whitlock R, D'Aragon F, Um K, Mazer D, Beaver C, Jacobsohn E, Belley-Cote E (2019) Safety and efficacy of perioperative benzodiazepine administration: study protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 9:e031895.
- Stefanits H, Milenkovic I, Mahr N, Patariaia E, Baumgartner C, Hainfellner JA, Kovacs GG, Kasprian G, Sieghart W, Yilmazer-Hanke D, Czech T (2019) Alterations in GABAA Receptor Subunit Expression in the Amygdala and Entorhinal Cortex in Human Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 78:1022–1048.
- Steiger JL, Russek SJ (2004) GABAA receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *Pharmacology & Therapeutics* 101:259–281.
- Sugasawa Y, Bracamontes JR, Krishnan K, Covey DF, Reichert DE, Akk G, Chen Q, Tang P, Evers AS, Cheng WWL (2019) The molecular determinants of neurosteroid binding in the GABA(A) receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 192:105383.
- Sun Y, Blanco-Centurion C, Bendell E, Vidal-Ortiz A, Luo S, Liu M (2019) Activity dynamics of amygdala GABAergic neurons during cataplexy of narcolepsy. *Elife* 8.
- Terry AV, Jones K, Bertrand D (2023) Nicotinic acetylcholine receptors in neurological and psychiatric diseases. *Pharmacological Research* 191:106764.
- Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW (2019) Epilepsy in adults. *The Lancet* 393:689–701.
- Thompson AJ, Lester HA, Lummis SCR (2010) The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics* 43:449–499.
- Treiman DM (2001) GABAergic Mechanisms in Epilepsy. *Epilepsia* 42:8–12.
- Tripp A, Kota RS, Lewis DA, Sibille E (2011) Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis* 42:116–124.
- Vinkers CH, Olivier B (2012) Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators? *Adv Pharmacol Sci* 2012:416864.
- Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF (2001) Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 28:49–52.

- Walters RJ, Hadley SH, Morris KDW, Amin J (2000) Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nature Neuroscience* 3:1274–1281.
- Wang H-Q, Wang Z-Z, Chen N-H (2021) The receptor hypothesis and the pathogenesis of depression: Genetic bases and biological correlates. *Pharmacological Research* 167:105542.
- WHO U (2023) Unfpa. Geneva: WHO:2.
- Wingrove PB, Thompson SA, Wafford KA, Whiting PJ (1997) Key Amino Acids in the γ Subunit of the γ -Aminobutyric AcidA Receptor that Determine Ligand Binding and Modulation at the Benzodiazepine Site. *Molecular Pharmacology* 52:874–881.
- Zhou S, Yu Y (2018) Synaptic E-I Balance Underlies Efficient Neural Coding. *Front Neurosci* 12:46.
- Zhou Y, Danbolt NC (2013) GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:165.
- Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM, Kim JJ, Hibbs RE (2018) Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature* 559:67–72.
- Zhu S, Sridhar A, Teng J, Howard RJ, Lindahl E, Hibbs RE (2022) Structural and dynamic mechanisms of GABAA receptor modulators with opposing activities. *Nature Communications* 13:4582.