



# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Beta-Untereinheiten abhängige Modulation des GABA<sub>A</sub> Rezeptors  
durch einen Naturstoff

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Sarah Maria Trattnig
Matrikel-Nummer:	0402094
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A449 Pharmazie
Betreuer:	Univ. Prof. Dr. sc. med. Steffen Hering

## ***Danksagung***

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Steffen Hering für die Möglichkeit, die Diplomarbeit bei ihm zu schreiben und sein fortwährendes Interesse, den Fortschritt dieser Arbeit zu fördern.

Weiters möchte meinen beiden Betreuern danken. Beide haben ihr Können mit mir geteilt und durch ihre unermüdliche Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mag. Igor Baburin war bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit mein erster und zuverlässiger Ansprechpartner und hat mich bei technischen Problemen stets bereitwillig unterstützt. Mag. Sophia Khom führte mich durch das gesamte Projekt, überdies hat sie mir durch das ausführliche Korrekturlesen besonders geholfen.

Bei Dr. Annett Hohaus bedanke ich mich für die Bereitstellung der RNA.

Weiters möchte ich mich bei allen Kollegen bedanken, die mir bei meiner Arbeit mit Rat und Tat sowie konstruktiven Anregungen beiseite gestanden sind.

Ich möchte meinen Kolleginnen Aida Hodzic und Laura Lehtinen für die erfreuliche und angenehme Zusammenarbeit, sowie für die daraus entstehende Freundschaft danken.

Bei Robert bedanke ich mich besonders für seine seelische Unterstützung während der Fertigstellung der Diplomarbeit.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken. Sie waren es, die mir das Studium, und letztendlich auch diese Arbeit ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG .....	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	3
ABSTRACT .....	1
ZUSAMMENFASSUNG .....	2
EINLEITUNG .....	3
<b>A. ALLGEMEINER TEIL .....</b>	<b>3</b>
1 ERREGUNGSÜBERTRAGUNG AN SYNAPSEN.....	3
1.1 EPSP / IPSP .....	3
2. TRANSMITTER .....	4
2.1 Bereitstellung des Transmitters.....	5
2.2 Aminosäuretransmitter.....	7
2.2.1 Glutamat.....	7
2.2.2 GABA .....	9
2.2.3 Glycin.....	12
3. REZEPTOREN .....	12
3.1 Zielstrukturen von GABA .....	13
3.1.1 Ionotrope Rezeptoren.....	15
3.1.2 Metabotrope Rezeptoren.....	18
<b>B. SPEZIELLER TEIL .....</b>	<b>23</b>
4. GABA <sub>A</sub> REZEPTOR .....	23
4.1 Struktur.....	23
4.1.1 Strukturelemente.....	23
4.1.2 Repertoire der Untereinheiten.....	27
4.1.3 Untereinheiten-Verteilung .....	27
4.2 Rezeptorsubtypen .....	28
4.2.1 Rezeptorsubtypen in vivo .....	28
4.2.2 Verteilung – zellulär .....	29
4.2.3 Genclustering .....	29
4.2.4 Charakteristika in vivo.....	31
4.3 GABA <sub>A</sub> Rezeptor: Lebenszyklus in vivo.....	36
4.3.1 Assemblierung/ ER Processing.....	36
4.3.2 GABA <sub>A</sub> Rezeptor Trafficking.....	36
4.3.3 Clustering in den Synapsen.....	37
4.3.4 Endozytose und Post-endozytische Vorgänge.....	39
4.4 GABA <sub>A</sub> Rezeptor: Channel Gating Mechanismus.....	39
4.4.1 Strukturelle Änderungen während der Rezeptoraktivierung .....	40
4.5 Physiologie des GABA <sub>A</sub> Rezeptors .....	42

4.5.1 Phasische Inhibition .....	42
4.5.2 Tonische Inhibition .....	43
4.5.3 Diversität des GABA-vermittelten Signalling .....	43
<i>4.6 Pharmakologie des GABA<sub>A</sub> Rezeptors</i> .....	<i>45</i>
4.6.1 GABA <sub>A</sub> Rezeptor: Antagonisten .....	45
4.6.2 GABA <sub>A</sub> Rezeptor: Agonisten und Partielle Agonisten .....	48
4.6.3 GABA <sub>A</sub> Rezeptor: Allosterische Modulatoren .....	52
<b>C. PRAKTISCHER TEIL</b> .....	<b>60</b>
5. MATERIAL UND METHODEN .....	60
5.1 <i>Verwendete Lösungen</i> .....	60
5.2 <i>Oozytenpräparation</i> .....	60
5.3 <i>Injektion der cRNA</i> .....	61
5.4 <i>Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik</i> .....	63
5.5 <i>Messprinzip</i> .....	63
5.6 <i>Arbeitsprotokoll</i> .....	63
5.7 <i>Software</i> .....	64
5.8 <i>Auswertung</i> .....	64
6. PROBLEMSTELLUNG .....	64
7. ERGEBNISSE .....	65
7.1 <i>GABA Dosiswirkungskurve</i> .....	65
7.2 <i>SG-C 1</i> .....	65
7.2.1 Modulation von I <sub>GABA</sub> durch den Naturstoff SG-C 1 .....	65
7.2.2 Abhängigkeit des Effekts von einer γ Untereinheit .....	66
7.2.3 Abhängigkeit des Effekts von einer β Untereinheit .....	66
7.2.4 Effekt von Mutationen in der β-Untereinheit .....	66
7.2.5 Direkte Aktivierung durch SG-C 1 .....	67
8 DISKUSSION .....	68
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	75
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	77
LITERATURVERZEICHNIS .....	80
LEBENS LAUF .....	88

## **Abstract**

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. GABA is involved many physiological processes, and therapeutic intervention in GABAergic neurotransmission is beneficial in numerous diseases. Drugs increasing GABA<sub>A</sub> receptor signalling such as anxiolytics, anti-epileptics, anaesthetics and hypnotics are widely used. GABA<sub>A</sub> receptors transmembrane assemblies of five subunits. They mediate fast synaptic responses to GABA and belong to the superfamily of ligand-gated ion channels. So far 19 human GABA<sub>A</sub> subunits have been identified:  $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ - $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ - $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\rho_1$ - $\rho_3$  and  $\theta$ . These subunits form the heteromeric GABA<sub>A</sub> receptor complexes. As a consequence a large number of GABA<sub>A</sub> receptor combinations can be formed. Within this project the modulation of  $I_{GABA}$  by the natural compound SG-C 1 was examined. Different GABA<sub>A</sub> receptor subunit compositions were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and  $I_{GABA}$  was measured using the two-microelectrodes voltage clamp technique. A  $\beta$ -subunit dependent stimulation of  $I_{GABA}$  was established. SG-C 1 modulated channels containing  $\beta_2$  or  $\beta_3$  subunits whereas receptors incorporating  $\beta_1$  subunits showed a significantly reduced sensitivity. After mutating the  $\alpha_1\beta_1$  to  $\alpha_1\beta_{1N290S}$  receptors they rebuild SG-C 1 sensitivity, comparable to  $\alpha_1\beta_2$  receptors. Interestingly the pointmutation of the corresponding residue in  $\alpha_1\beta_2$  to  $\alpha_1\beta_{2S265N}$  receptors did not exert influence on the receptor's sensitivity to SG-C 1. Modulation of  $I_{GABA}$  by SG-C 1 was not  $\gamma$ -subunit dependent. Moreover SG-C 1 directly activates the GABA<sub>A</sub> channel in absence of the agonist GABA. In summary the natural compound SG-C 1 was identified as a subunit dependent allosteric modulator of GABA<sub>A</sub> receptors that possibly interacts with a so far undescribed binding site.

## **Zusammenfassung**

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS bei einer Vielzahl an physiologischen Prozessen beteiligt. Durch Modulation der GABAergen Transmission können therapeutische Effekte erzielt werden. GABA<sub>A</sub> Rezeptor Modulatoren werden klinisch als Anxiolytika, Antiepileptika, Anästhetika und Hypnotika angewendet. GABA<sub>A</sub> Rezeptoren bestehen aus fünf transmembranären Untereinheiten. Sie vermitteln schnelle synaptische Neurotransmission und gehören zur Familie der Liganden gesteuerten Ionenkanäle. Bis heute wurden 19 menschliche GABA<sub>A</sub> Untereinheiten gefunden:  $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ - $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ - $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\rho_1$ - $\rho_3$  und  $\theta$ . All diese Untereinheiten können den heteromeren GABA<sub>A</sub> Rezeptor formen. Aus diesem Grund ist die Zahl der möglichen GABA<sub>A</sub> Rezeptor Kombinationen groß. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Modulation von  $I_{GABA}$  durch den Naturstoff SG-C 1 untersucht. Verschiedene GABA<sub>A</sub> Untereinheiten wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und  $I_{GABA}$  mit der Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik gemessen. SG-C 1 zeigte als GABA<sub>A</sub> Rezeptor Modulator  $\beta$ -Spezifität.  $\beta_2$  und  $\beta_3$  Rezeptoren wurden durch SG-C 1 stimuliert,  $\beta_1$  inkorporierende Rezeptoren hingegen wiesen ein signifikant verminderte Sensibilität auf. Von  $\alpha_1\beta_1$  zu  $\alpha_1\beta_{1N290S}$  mutierte Rezeptoren zeigten eine mit  $\alpha_1\beta_2$  vergleichbare Sensibilität, interessanterweise verminderte die Punktmutation des korrespondierenden Rests von  $\alpha_1\beta_2$  zu  $\alpha_1\beta_{2S265N}$  Rezeptoren nicht die Modulierbarkeit durch SG-C 1. Die Modulation von  $I_{GABA}$  durch SG-C 1 war nicht vom Vorhandensein einer spezifischen  $\gamma$ -Untereinheiten abhängig. Eine weitere interessante Eigenschaft von SG-C 1 ist, dass sie auch in Abwesenheit des Agonisten GABA den Kanal direkt aktiviert. Zusammenfassend wurde ein weiterer Naturstoff als selektiver GABA<sub>A</sub> Rezeptor Ligand identifiziert, der partiell agonistischen Eigenschaften besitzt und mit einer vermutlich bisher unbeschriebene Bindungsstelle interagiert.

## **Einleitung**

Kommunikation im Zentralen Nerven System (ZNS) basiert auf Vorgängen elektrischer oder chemischer Natur. Diese Arbeit beschäftigt sich mit Vorgängen chemischer Natur, die elektrische Veränderungen in einer Zelle herbeiführen. Am GABA<sub>A</sub> Rezeptor werden *in vitro* neue Wirkstoffe getestet, und deren pharmakologisches Profil untersucht.

## **A. Allgemeiner Teil**

### **1 Erregungsübertragung an Synapsen**

Strukturen, an denen Erregungsübertragung von einer Zelle auf eine weitere stattfindet, bezeichnet man als Synapsen. Erfolgt eine Erregungsübertragung von einem Axon auf ein Neuron, so nennt man diese Schnittstelle zweier Neurone zentrale Synapse. Innerhalb des Gehirns, des Rückenmarks und der Ganglien findet man eine große Zahl zentraler Synapsen mit folgenden Eigenschaften: Sie besitzen eine Ventilfunktion, das heißt die Erregung verläuft immer nur in eine Richtung (vom Axon auf das Neuron). Weiters verfügen sie über eine Bahnungs- bzw. Hemmfunktion, da mehrere Synapsen zusammen einen Erregungsablauf fördern oder unterdrücken können. Die Synapse gliedert sich funktionell in den synaptischen Spalt, die prä- und die postsynaptische Membran, außerhalb dieser Abschnitte spricht man vom extrasynaptischen Bereich (Thews *et al.*, 1999).

Ein Neuron ist mit etwa 1000 Synapsen verknüpft, welche je nach Lokalisation als axo-somatische, axo-dendritische oder axo-axonische Synapsen bezeichnet werden. Hinsichtlich ihrer Funktion unterscheidet man exzitatorische und inhibitorische Synapsen. Erstere fördern die Entstehung eines Aktionspotentials, Letztere wirken diesem Vorgang entgegen, beide basieren aber auf demselben physiologischen Grundschema (Thews *et al.*, 1999).

#### **1.1 EPSP / IPSP**

Ein einlaufendes Aktionspotential führt zur Depolarisation der präsynaptischen Membran eines Neurons. Spannungsabhängige Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Kanäle öffnen sich infolge dieser Potentialänderung und die jeweiligen Ionen strömen in die Zelle ein. Dadurch steigt die Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen was einerseits eine Proteinkinase aktiviert, andererseits wird die Verschmelzung der Vesikelmembranen mit der präsynaptischen Membran eingeleitet. Bei diesem als Exozytose bezeichnetem Vorgang wird der in den Vesikeln gespeicherte Neurotransmitter in den synaptischen Spalt abgegeben. Der freigesetzte Transmitter

diffundiert zum korrelierenden Rezeptor an der postsynaptischen Membran und löst dort Effekte aus.

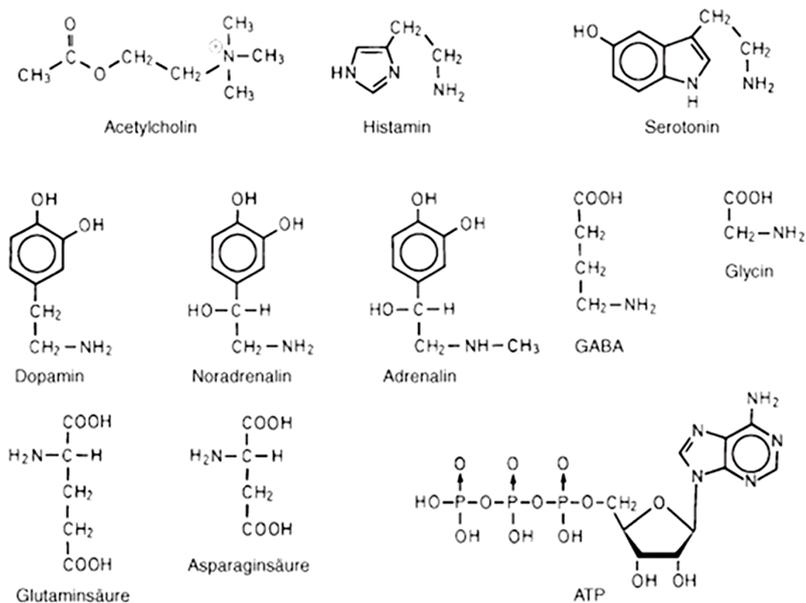
Bindet der Transmitter an einen ionotropen Rezeptor, kann dieser Rezeptor für bestimmte Ionen geöffnet werden. Je nach Rezeptorselektivität ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -Ionen) kommt es, gemäß dem elektrochemischen Gradienten, zu einem Ionenfluss.

Als Folge des Kationen-Einstroms durch Aktivierung ionotroper Rezeptoren, tritt an der postsynaptischen Membran eine kurzzeitige Depolarisation auf, die als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird. Werden nun mehrere erregende Synapsen gleichzeitig aktiviert, und summieren sich deren Potentiale bis zur Überschreitung eines Schwellenwerts so kommt es zur Weiterleitung des Aktionspotentials durch räumliche Bahnung. Als zeitliche Bahnung bezeichnet man das Auslösen eines Aktionspotentials durch mehrmalig aufeinander folgende EPSP und des Erreichens der Schwelle durch deren Summation (Thews *et al.*, 1999).

Inhibitorische Synapsen gleichen morphologisch und funktionell exzitatorischen Synapsen. Freisetzung der Transmitter und Diffusion zu den postsynaptischen Rezeptoren resultiert, durch Aktivierung entsprechender ionotroper Rezeptoren, in einem  $\text{Cl}^-$ -Einstrom oder  $\text{K}^+$ -Ausstrom, wiederum gemäß dem elektrochemischen Gradienten. Die Folge ist eine Hyperpolarisation des Neurons. Diese dem EPSP entgegen gesetzte Änderung des Membranpotentials bezeichnet man als inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP). Durch das IPSP wird der Abstand zur Schwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials vergrößert und im Zuge dessen die Erregbarkeit des Neurons vermindert (Thews *et al.*, 1999).

## **2. Transmitter**

Transmitter (z.B. Glutamat,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Acetylcholin (ACh), 5-Hydroxy-Tryptamin (5-HT<sub>3</sub>), Dopamin) sind endogenen chemischen Substanzen, die ein Neuron freisetzt und welche nach Bindung an ein nachfolgendes Neuron Exzitation oder Inhibition desselben verursachen. In Abbildung 1 sind einige Transmitter dargestellt.



**Abbildung 1 Neurotransmitter und Neurotransmission**

A Einige Nicht-Peptidische Neurotransmitter (Aktories *et al.*, 2005)

Neben den schnellen, sofort ersichtlichen Wirkungen (Exzitation, Inhibition durch die Gesamtheit der Hyper- und Depolarisationsvorgänge) trägt die Summe der synaptischen Transmission aller Neurotransmitter zur so genannten synaptischen Plastizität und den Adaptionen des Gehirns bei. Auch beteiligt an diesen Prozessen sind so genannte Neuromodulatoren (z.B. Substanz P, Prostaglandine, Neuropeptid Y) und neurotrophische Faktoren (z.B. Nerve Growth Factor, Interleukin-1, Brain-derived Neurotrophic Factor) (Rang *et al.*, 2007).

## 2.1 Bereitstellung des Transmitters

Man unterscheidet zwei wesentliche Freisetzungsmechanismen im ZNS:

- 1) Transmitter, die in der Nervenzelle synthetisiert und anschließend in synaptischen Vesikeln (Speichergranula) gelagert werden. Diese Gruppe umfasst alle klassischen Neurotransmitter und Neuromodulatoren sowie viele Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren.
- 2) Transmitter die bei Bedarf *de novo* synthetisiert werden und durch aktive oder passive Diffusion ihren Wirkort erreichen. Diese Gruppe umfasst unter anderem Stickstoffmonoxid (NO) sowie diverse Lipidtransmitter (Eicosanoide) und Endocannabinoide.

In beiden Gruppen nehmen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine Schlüsselrolle bei der Freisetzung des Transmitters ein. Ein Ansteigen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels führt zur Exozytose und

zur Aktivierung von Enzymen, die für die Synthese der unter 2) erwähnten Transmitter verantwortlich zeichnen. Exozytose stellt den Hauptmechanismus bei der Neurotransmitterfreisetzung im ZNS dar und erfolgt durch die Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Plasmamembran. Die aus einem Vesikel freigesetzten Transmitter werden als „Quant“ bezeichnet und stellen die kleinste mögliche freisetzbare Menge an Neurotransmittern in Synapsen dar (circa 6000 Moleküle).

In Nervenendigungen, in denen synaptische Transmission stattfindet, strömen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch spannungsabhängige Kanäle (N oder P-Typ) in das Neuron ein (nach Aktivierung durch ein eintreffendes Aktionspotential) und synaptische Vesikel docken an sogenannte aktive Zonen an, fusionieren mithilfe spezifischer Exozytose-Proteine und ergießen ihren Inhalt in den synaptischen Spalt. Die aktiven Zonen sind in der Nähe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und gegenüber von rezeptorreichen, postsynaptischen Membranabschnitten angesiedelt. Aus einem Neuron wird nun nicht nur eine Transmitterspezies freigesetzt, sondern meist ein „schneller“ und ein „langsamer“ Transmitter (z.B. der schnelle exzitatorische Aminosäuretransmitter Glutamat und ein langsames exzitatorisches Neuropeptid) aus zwei verschiedenen Vesikeln. Die schnellen Transmitter sind näher an den aktiven Zonen lokalisiert, die langsamen weiter weg. Demzufolge erreicht einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  die Vesikel der schnellen Transmitter sofort, für die langsamen muss es erst durch das Cytoplasma diffundieren. Schnelle Transmitter werden also auch bei niedrigen Stimulationsfrequenzen freigesetzt, langsame benötigen hohe Stimulationsfrequenzen, daher hängt die Transmitterfreisetzung weitgehend von der Frequenzsetzung durch das präsynaptische Neuron ab.

Nicht immer setzen Vesikel ihren Inhalt vollständig frei, oft wird nur ein Teil davon freigesetzt. Das depletierte Vesikel wird durch einen Endozytosemechanismus an der präsynaptischen Membran rückgewonnen und fusioniert im Zytoplasma mit einem Endosom. Aus dem Endosom gehen neue Vesikel hervor, die wiederum Transmitter aus dem Zytoplasma rekrutieren.

Gespeicherte Transmitter (vgl. 1)) können auch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, ohne den beschriebenen Exozytosevorgang in den synaptischen Spalt gelangen, nämlich durch, sofern vorhanden, spezifische Transmittertransportproteine. Zu einer Beendigung der Übertragung kommt es zum einen durch das Abdiffundieren des Transmitters aus dem synaptischen Spalt ins umgebende Interstitium, zum anderen werden spezifische abbauende Enzyme im synaptischen Spalt aktiv. Einige Transmitter werden zudem über ihre spezifischen Transporter in die umgebenden Zellen (Ursprungszelle, Nachbarzellen) aufgenommen und dort entweder wiederverwertet oder enzymatisch abgebaut (Rang *et al.*, 2007).

Alle Transmitter, außer den Neuropeptiden, werden in wenigen Schritten in den Nervenendigungen selbst gebildet. Zwar müssen die Nervenendigungen meist Vorstufen (über spezifische Transportproteine) aufnehmen (z.B. Glutamin für Glutamat), der Synthesepapparat ist, je nach Spezialisierung der Zelle für den jeweiligen Transmitter, vorhanden. Die Internalisierung des Neurotransmitters ins Vesikel wird von diesem selbst bewerkstelligt. Mithilfe einer ATP-abhängigen Protonenpumpe wird im Vesikelinneren ein saures elektropositives Milieu geschaffen, dessen elektrochemischer Gradient vom Transmittertransportprotein genutzt wird um den Transmitter ins Innere des Vesikels zu befördern (Aktories *et al.*, 2005).

## **2.2 Aminosäuretransmitter**

### **2.2.1 Glutamat**

L-Glutamat (ionisierte Form der Glutaminsäure) stellt den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im ZNS dar. Aspartat scheint eine analoge Funktion zu haben, wurde aber in vergleichsweise geringeren Konzentrationen nachgewiesen. In Abbildung 2 A sind die Vorgänge an einer glutamergen Synapse dargestellt.

Glutamat erfüllt sowohl eine metabolische, als auch eine neurotransmittorische Funktion. Eine Verknüpfung dieser beiden grundsätzlich verschiedenen Funktionen wird durch Transaminasen, die metabolisches  $\alpha$ -Ketoglutarat in Glutamat überführen, ermöglicht (Rang *et al.*, 2007).

Glutamat wird in synaptischen Vesikeln gespeichert und durch Calcium-vermittelte Exozytose freigesetzt. Es verfügt über eigene Transportproteine, die einerseits den Transport aus dem Vesikel in das Neuron, andererseits die Internalisierung in die Speichervesikel bewerkstelligen. Durch Depolarisation bei erhöhten extrazellulären  $K^+$ -Konzentrationen kann Glutamat in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Dies geschieht vor allem bei pathologischen Prozessen und führt zu einem unphysiologischen Anstieg der Glutamatkonzentration, die im weitesten Sinne durch Übererregung zytotoxisch wirkt, und als Exzitotoxizität bezeichnet wird (Rang *et al.*, 2007).

#### **2.2.1.1 Metabolismus**

Glutamat wird *de-novo* aus Glucose synthetisiert, durch Aminierung (GABA-Transaminase) des aus dem metabolischen Zitratzyklus stammenden  $\alpha$ -Ketoglutarat, in den Mitochondrien von Neuronen. Peripheres Glutamat erreicht nur zu einem geringen Anteil den ZNS – Glutamat - Pool (Rang *et al.*, 2007). Die enzymatischen Umwandlungsvorgänge sind in Abbildung 3 A dargestellt. Nach Beendigung der synaptischen Übertragung wird Glutamat mittels eines  $Na^+$ -abhängigen Transporters aus

dem synaptischen Spalt in ein Glutamerges Neuron befördert und dort in Vesikeln gespeichert.

### **2.2.1.2 Rezeptoren**

Glutamat bindet im ZNS an vier proteinogene Zielstrukturen: N-Methyl-D-Aspartat (NMDA),  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA), Kainat und Metabotrope Glutamat Rezeptoren. Die ersten drei stellen ionotrope Rezeptoren dar, typischerweise bestehend aus vier Untereinheiten und einer „pore loop“ Struktur, die für Kationen selektiv permeabel sind. Metabotrope Glutamatrezeptoren sind per definitionem G-Protein gekoppelt und leiten Information in den Neuronen unter Beanspruchung von „second-messenger-Systemen“ weiter. In jeder der vier Klassen findet man eine große Zahl an Subtypen mit bestimmten Verteilungsmustern und charakteristischen pharmakologischen Eigenschaften.

NMDA Rezeptorkanäle erweisen sich als permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und werden durch Magnesium blockiert. Außerdem benötigen sie als Cotransmitter die primär (am Glycin Rezeptor) inhibitorisch wirkende Aminosäure Glycin zur Aktivierung. Sowohl die Glutamat- als auch die Glycinbindungsstelle müssen besetzt sein damit sich der Kanal öffnet. Daher hemmen kompetitive Antagonisten an der Glycin-Bindungsstelle indirekt den NMDA Rezeptor.

AMPA und Kainat Rezeptoren spielen bei der schnellen synaptischen Transmission eine wesentliche Rolle. NMDA Rezeptoren dagegen vermitteln langsame exzitatorische Transmission und scheinen vor allem an adaptiven langfristigen (Synaptische Plastizität) und pathologischen (Exzitotoxizität) Veränderungen des Gehirns beteiligt zu sein (Rang *et al.*, 2007).

### **2.2.1.3 Pharmakologie**

Zahlreiche kompetitive und nicht kompetitive Antagonisten sowohl für den AMPA als auch für den NMDA Rezeptor sind bekannt, jedoch weist keiner dieser Stoffe ein geeignetes Wirkprofil für die klinische Anwendungen (Epilesie, Neurodegenerative Krankheiten, Psychiatrische Erkrankungen) auf. NMDA Rezeptoren werden blockiert von Substanzen wie Ketamin und Phencyclidin, sowie Memantin und Dizocilpin. In klinischer Anwendung findet man Ketamin als Notfallanästhetikum und –analgetikum und Memantin zur palliativen Behandlung bei Morbus Alzheimer. Ein immer wieder auftretendes Problem bei der Verabreichung von NMDA Antagonisten stellen ausgeprägte psychotomimetische Nebenwirkungen dar, da glutamerge Rezeptoren ubiquitär verteilt sind. Eine selektive Antagonisierung von bestimmten Rezeptorsubtypen würde dieser Problematik möglicherweise beikommen.

Agonisten und positive Modulatoren sind vor allem für den AMPA Rezeptor von klinischer Relevanz. Sie sollen Prozesse wie Kognition und Erinnern positiv beeinflussen. Piracetam und Aniracetem wirken in dieser Weise auf den AMPA Rezeptor und werden bei Demenz verabreicht, ob der psychotrope Effekt dieser Substanzen ausschließlich über den AMPA Rezeptor vermittelt wird, ist umstritten

### **2.2.2 GABA**

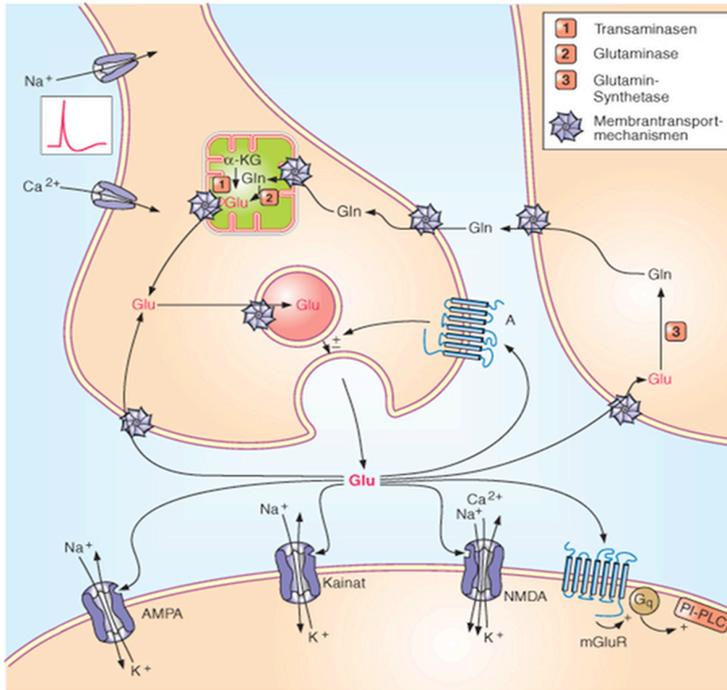
Die  $\gamma$ -Aminobuttersäure ( GABA ) stellt den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Gehirn dar. Neben der inhibitorischen Wirkung kann GABA unter bestimmten Umständen (Synergismus oder Antagonismus mit Co-Peptiden) auch Exzitation verursachen. (Birbaumer *et al.*, 2006).

Man findet GABA bei Säugetieren vorwiegend im ZNS, in extraneuralen Geweben konnte GABA in Spuren nachgewiesen werden. GABA fungiert als inhibitorischer Neurotransmitter in vielen verschiedenen zentralen Prozessen, circa 20% der ZNS Neuronen sind GABAerg (Rang *et al.*, 2007).

Die meisten GABAergen Neurone stellen kurze Interneurone dar, es existieren aber auch GABAerge Projektionsneurone, zum Beispiel hintereinander geschaltete Neuronensysteme der motorische Schleife (Großhirnrinde – Stammganglien – ventrale Thalamuskern – Großhirnrinde) (Aktories *et al.*, 2005).

Die Vorgänge an GABAergen Synapsen sind in Abbildung 2 B dargestellt.

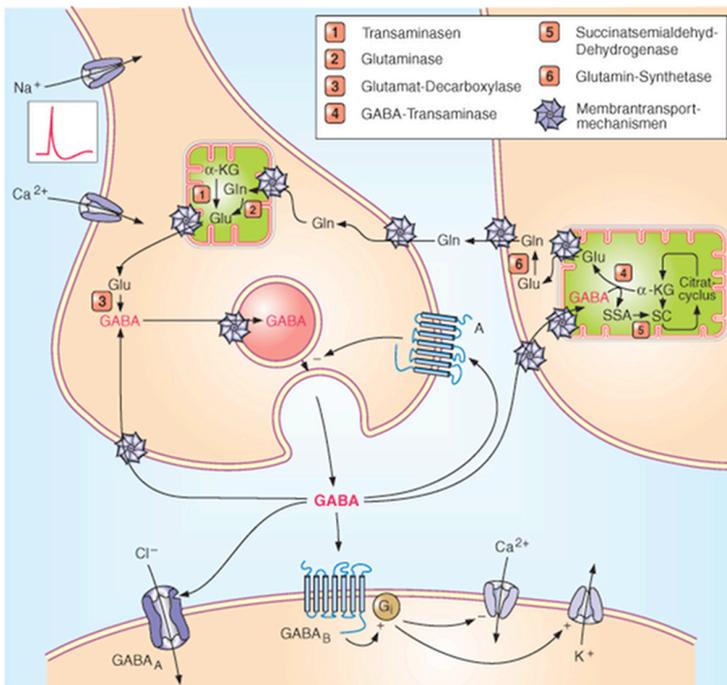
# A



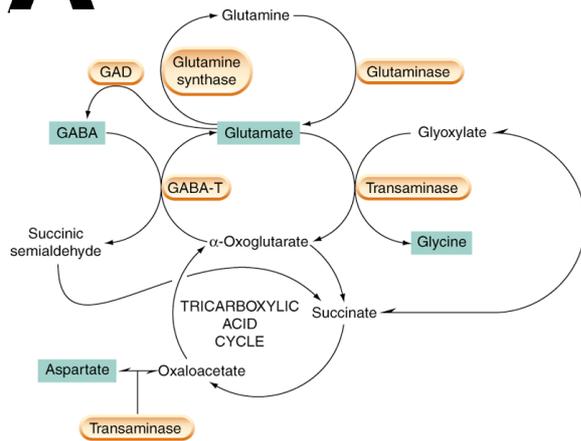
## Abbildung 2 Vorgänge an den Synapsen

**A** Darstellung der synaptischen Übertragung durch Glutamat: Im Bild besitzt die postsynaptische Zelle drei ionotrope Rezeptoren, nämlich AMPA-Rezeptoren ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), Kainat-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-d-aspartat); alle sind nach Prototyp-Agonisten benannt. Außerdem besitzt die Zelle einen metabotropen Glutamatrezeptor (mGluR), der die Phospholipase C (PI-PLC) stimuliert. Glutamat kann seine eigene Freisetzung über präsynaptische metabotrope Autorezeptoren hemmen oder steigern (A) (Aktories *et al.*, 2005).

# B



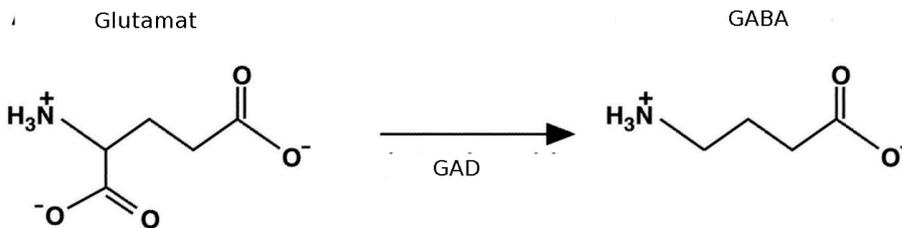
**B** Darstellung der synaptischen Übertragung durch GABA: Vorläufer von GABA ist Glutamat (Glu), für das zwei Quellen gezeigt sind:  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) und Glutamin (Gln). Im Bild besitzt die postsynaptische Zelle  $GABA_A$ - und  $GABA_B$ -Rezeptoren, die Letzteren über G-Proteine der Gi-Familie an  $Ca^{2+}$ - und  $K^+$ -Kanäle gekoppelt. GABA kann seine eigene Freisetzung über präsynaptische  $GABA_B$ -Autorezeptoren hemmen (A). GABA wird zu Succinatsemialdehyd (SSA) desaminiert, aus dem Bernsteinsäure (SC) entsteht (Aktories *et al.*, 2005).

**A**

### Abbildung 3 Beziehung von GABA und Glutamat

**A** Aminosäurenmetabolismus im ZNS. Die Transmitter sind durch grüne Kästchen gekennzeichnet (Rang *et al.*, 2007).

**B** Umwandlung von Glutamat in GABA. **GABA-T**, GABA Transaminase; **GAD**, Glutamat-decarboxylase (Jorgensen, 2005).

**B**

#### 2.2.2.1 Metabolismus

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine unüberwindbare Barriere für von außen zugeführte GABA. Daher müssen die Pools der im Gehirn benötigten GABA durch dort ablaufende Prozesse befüllt werden.

Die endogene GABA-Synthese wird durch die Glutamatdecarboxylase (GAD) katalysiert, das ausschließlich in GABAergen Neuronen des ZNS exprimiert wird. Durch Decarboxylierung entsteht aus Glutamat GABA (vgl. Abbildung 3 B)

GABA wird im Zuge einer Transaminierungsreaktion, bei der der Aminorest auf eine  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure übertragen wird, zu Succinaldehyd und in weiterer Folge zu Succininsäure abgebaut. Diese Reaktion wird durch die GABA-Transaminase katalysiert (vgl. Abbildung 3 A). GABAerge Neuronen und Astrozyten nehmen GABA mittels eines spezifischen Transporters wieder in die Neuronen auf. Dieser „Re-Uptake“, die Entfernung von GABA aus dem synaptischen Spalt, ist als maßgeblicher Mechanismus zur Beendigung der inhibitorischen Transmission zu betrachten (Rang *et al.*, 2007).

### **2.2.2.2 Beziehung zu Glutamat**

Glutamat stellt im ZNS den häufigsten exzitatorischen Neurotransmitter und somit den funktionellen GABA-Gegenspieler dar. Bemerkenswert ist, die strukturelle Verwandtschaft der beiden Aminosäuren, sowie die Umwandelbarkeit der einen in die andere. Glutamat unterscheidet sich von GABA nur durch das Vorhandensein einer Carboxylgruppe am  $\gamma$ -C-Atom. Wie bereits in Kapitel 2.2.2.1 erwähnt entsteht GABA durch Decarboxylierung von Glutamat (vgl. Abbildung 3 A,B).

### **2.2.3 Glycin**

Der Aminosäuretransmitter Glycin wird in hohen Konzentrationen in der grauen Substanz des Rückenmarks vorgefunden. Glycin erzeugt nach seiner Bindung an den zentralen Glycin Rezeptor, analog zu GABA, durch einen  $\text{Cl}^-$ -Ionen Einstrom eine Hyperpolarisation der Zelle, die auch synergistisch mit der GABAergen Hyperpolarisation auftritt. Der Glycin Rezeptor, ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal, ähnelt dem  $\text{GABA}_A$  Rezeptor. Er besteht aus fünf Untereinheiten, die eine Anionen-selektive Pore bilden. Verschiedene Untereinheiten des Rezeptors sind bekannt. Mutationen von Glycin-Rezeptor Untereinheiten konnten mit erblichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden.

Bislang sind keine selektiven Glycin Rezeptor modulierenden Substanzen bekannt, einige  $\text{GABA}_A$  modulierende Substanzen interagieren auch mit dem Glycin Rezeptor (Rang *et al.*, 2007).

## **3. Rezeptoren**

Die Mehrzahl der Rezeptoren im ZNS lässt sich in vier Klassen einteilen;

1. Nukleäre Rezeptoren: darunter versteht man lösliche intrazelluläre Proteine, die, nach der Bindung ihres intrazellulären lipophilen Liganden (z.B. Östrogen) im Kern die DNA-Transkription beeinflussen und somit langanhaltende (mehrere Stunden bis Tage) Effekte durch Änderung der Proteinexpressionsmuster erzielen.

Die übrigen Rezeptortypen akquirieren den Liganden extrazellulär, die Antwort erfolgt dann intrazellulär, unter Inanspruchnahme rezeptorspezifischer Mechanismen zur Signalweiterleitung (Luddens *et al.*, 1995).

2. Tyrosinkinase-Rezeptoren: mono- oder dimere Proteine, die durch eine einzige Transmembrandomäne je Protein in der Zellmembran verankert sind. Durch extrazelluläre Ligandenbindung (z. B. Insulin) und daraus resultierende Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase wird eine Phosphorylierungs- und Autophosphorylierungskaskade

verschiedener Substrate in Gang gesetzt. Die Effekte zeigen sich noch Minuten bis Stunden nach Erstaktivierung des Rezeptormoleküls (Luddens *et al.*, 1995).

3. G-Proteingekoppelte Rezeptoren (synonym metabotrope Rezeptoren oder G-protein coupled receptors - GPCRs) sind hinsichtlich ihrer Substrate die unspezifischsten Rezeptoren und werden beispielsweise durch UV-Strahlung (Bakteriorhodopsin), biogene Amine (Serotonin) oder große Hormonmoleküle (Thyreotropin) aktiviert. Das Rezeptormolekül besteht aus einem einzigen Polypeptid mit sieben Transmembrandomänen, und bindet an G-Proteine, die wiederum Second-Messenger-Systeme (Phospholipase C, Adenylatcyclase, Guanylatcyclase, Ionenkanäle) aktivieren und die, nach den Ionenkanälen, unmittelbarsten intrazellulären Effekte zeigen (Luddens *et al.*, 1995).

4. Liganden gesteuerte Ionenkanäle (synonym Ionotrope Rezeptoren oder Ligand gated Ion channels LGICs): mehrere Proteine formen eine Kanalpore, die die Plasmamembran durchspannt. Sie vermitteln schnelle (1-100ms) exzitatorische oder inhibitorische synaptische Neurotransmission im ZNS durch Erhöhung oder Erniedrigung der Permeabilität der Zellmembran für spezifische Ionen (Luddens *et al.*, 1995).

### **3.1 Zielstrukturen von GABA**

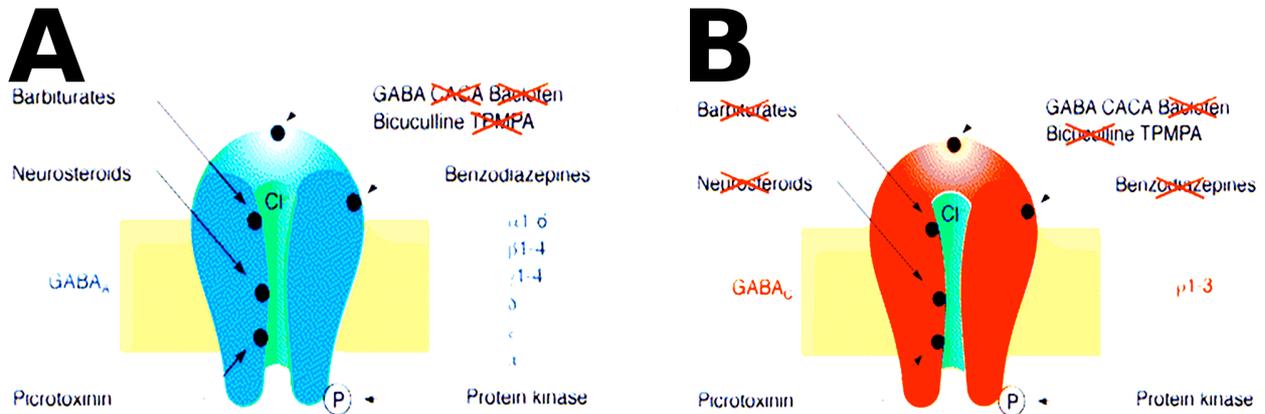
GABA aktiviert zwei der oben erwähnten Rezeptortypen: Einen ionotropen Rezeptor (GABA<sub>A</sub>) und einen metabotropen Rezeptor (GABA<sub>B</sub>). Gemein ist den beiden Rezeptortypen lediglich, dass sie GABA-induziert inhibitorische Effekte erzielen. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden von Bicucullin blockiert, GABA<sub>B</sub> Rezeptoren sind Bicucullin-insensitiv und werden von Baclofen aktiviert. Es lässt sich eine Parallele zu anderen „Rezeptorpaaren“ ziehen, wo ein und derselbe Ligand als Zielstruktur sowohl einen ionotropen, als auch einen metabotropen Rezeptor aktiviert, wie zum Beispiel beim nicotineren und muscarineren Acetylcholinrezeptor, beim 5-HT<sub>3</sub>- und metabotropen Serotoninrezeptor oder beim ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptor.

Ein weiterer Rezeptortyp wird von GABA moduliert, es handelt sich dabei wiederum um einen ionotroper Rezeptor, jedoch mit grundlegend anderen Charakteristika als jenen des GABA<sub>A</sub> Rezeptors. Der Rezeptor weist sowohl eine Bicucullin- als auch eine Baclofen-Insensitivität auf. Die Anforderungen zur Klassifizierung als GABA<sub>A</sub> oder GABA<sub>B</sub> Rezeptor werden hier nicht erfüllt, somit wurde ein weiterer Rezeptor-Typus (GABA<sub>C</sub>) eingeführt (vgl. Tabelle 1) (Drew *et al.*, 1984).

	GABA <sub>A</sub>	GABA <sub>B</sub>	GABA <sub>C</sub>
Rezeptortyp	Ionotrop (Cl <sup>-</sup> -Kanal)	Metabotrop	Ionotrop (Cl <sup>-</sup> -Kanal)
Proteinsubeinheiten	α <sub>1</sub> -α <sub>6</sub> , β <sub>1</sub> -β <sub>4</sub> , γ <sub>1</sub> -γ <sub>3</sub> , δ <sub>1</sub> , ε <sub>1</sub> , π <sub>1</sub>	GABA <sub>B1</sub> , GABA <sub>B2</sub>	ρ <sub>1</sub> -ρ <sub>3</sub>
Einzelkanalströme	30 pS		8pS
Mittlere Kanalöffnungszeit	25 ms		150 ms
Pharmakologie			
GABA	10 μM (EC <sub>50</sub> )	10 μM (EC <sub>50</sub> )	1 μM (EC <sub>50</sub> )
Muscimol	Starker Agonist	Inaktiv	Partialer Agonist
THIP, P4S	Starker Agonist	Inaktiv	Kompetitiver Antagonist
TACA	Starker Agonist	Inaktiv	Starker Agonist
CACA	Inaktiv	Inaktiv	Partialer Agonist
3-APMPA, 3-APPA	Inaktiv	Starker Agonist	Starker Kompetitiver Antagonist
3-APA	Inaktiv	Partialer Agonist	Starker Kompetitiver Antagonist
Baclofen	Inaktiv	Agonist	Inaktiv
Saclofen, Phaclofen	Inaktiv	Kompetitiver Antagonist	Inaktiv
Bicucullin	Kompetitiver Antagonist	Inaktiv	Inaktiv
Picrotoxinin	Nichtkompetitiver Antagonist	Inaktiv	Nichtkompetitiver Antagonist

**Tabelle 1 Charakteristika der GABA Rezeptoren**

**3-APA:** 3-Aminopropylphosphonic acid; **3-APMPA:** 3-Aminopropyl(Methyl)Phosphinic acid; **3-APPA:** 3-Aminopropylphosphonic acid; **CACA:** cis-4-Aminocrotonic acid; **P4S:** piperidine-4-sulphonic acid; **TACA:** trans-4-Aminocrotonic acid; **THIP:** 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazole(4,5-c)pyridin-3-ol (Johnston, 1996b);



#### Abbildung 4 Vergleich von GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub> Rezeptor

**A** Der GABA<sub>A</sub> Rezeptor ist ein Cl<sup>-</sup>-Kanal mit einem Durchmesser von 5 Å und besitzt Bindungsstellen für Benzodiazepine, Barbiturate und Neurosteroid. Die GABA induzierte Aktivierung wird durch Bicucullin kompetitiv und durch Picrotoxinin nicht kompetitiv antagonisiert. CACA (cis-4-aminocrotonic acid) und TPMPA [1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl(methylphosphinic acid)] und der GABA<sub>B</sub> Rezeptor Agonist Baclofen sind nicht aktiv (rote Kreuze) (Bormann *et al.*, 1995).

**B** Bezüglich der Membrantopologie ähnelt der GABA<sub>C</sub> Rezeptor dem GABA<sub>A</sub> Rezeptor. Der GABA<sub>C</sub> Rezeptor ist ebenfalls ein Cl<sup>-</sup>-Kanal und wird von TPMPA kompetitiv und von Picrotoxinin nicht kompetitiv antagonisiert. Bicucullin, Baclofen und die GABA<sub>A</sub> Modulatoren sind nicht aktiv (rote Kreuze). α<sub>1-6</sub>, β<sub>1-3</sub>, γ<sub>1-3</sub>, δ, ε, π und ρ<sub>1-3</sub>, Untereinheiten des GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub> Rezeptors (Bormann *et al.*, 1995).

### 3.1.1 Ionotrope Rezeptoren

Ionotrope Rezeptoren werden durch Bindung des Liganden aktiviert (geöffnet). Analog zum Spannungssensor der spannungsgesteuerten Ionenkanäle besitzen LGIC eine Ligandenbindungsstelle. Aktivierte Kanäle erlauben einen selektiven Ionenstrom in die oder aus der Zelle. Kationen oder Anionen verschieben, je nach Fließrichtung, das Membranpotential der Zelle in Richtung positiv oder negativ. Zu der Superfamilie der LGICs zählen neben den bereits angeführten GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub> Rezeptoren, beispielsweise auch der 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor, der nACh-Rezeptor und der Glycin-Rezeptor. Auch die Glutamat-Rezeptoren (NMDA-, AMPA und Kainat-Typ) entsprechen funktionell der Definition Ionotroper Rezeptoren, sie weisen jedoch strukturelle Unterschiede (hinsichtlich der transmembranären Domäne) zu den anderen Mitgliedern der Familie der LGIC auf.

Die LGICs weisen eine hohe Strukturhomologie auf, die bei der Aufklärung bislang noch unbekannter Rezeptormoleküle entscheidende Anhaltspunkte liefert. Das Rezeptormolekül besteht aus fünf Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten enthält neben vier Membrandurchspannenden α-helikalen Elementen (M1-M4), wobei die M2-Domänen der einzelnen

Untereinheiten die zentrale Kanalpore bilden, eine große extrazelluläre Domäne (synonym extracellular domain ECD) mit potentiellen Ligandenbindungsstellen. Durch eine gezielte Punktmutation an einer kritischen Stelle ( $\alpha_7V251T$ ) des Transmembransegments M2 am nACh Rezeptor konnte der kationenselektive in einen anionenselektiven Rezeptor überführt werden, der nach wie vor durch ACh aktiviert wird (Galzi *et al.*, 1992).

### **3.1.1.1 GABA<sub>A</sub> Rezeptor**

Schon lange ist bekannt, dass die schnelle, durch Bicucullin blockierbare Zellantwort auf GABA, auf eine direkte Aktivierung eines intrinsischen Anionen-Kanals zurückzuführen ist. Diese Rezeptor-Kanal-Einheit wird als GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bezeichnet (Barnard *et al.*, 1998).

GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, sind ionotrope Rezeptoren und selektive Chlorid-Kanäle, und weisen eine ubiquitäre Verteilung im ZNS auf, was auf eine tragende Rolle bei neuronalen Vorgängen schließen lässt. Deutlich wird die Rolle des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, durch die Vielzahl an psychoaktiven Substanzen, die dort ihre Wirkung entfalten und der großen Zahl an Krankheiten, die mit Dysfunktionen im GABAergen System assoziiert sind (Hevers *et al.*, 1998). Detaillierte Ausführungen über Struktur, Physiologie und Pharmakologie des GABA<sub>A</sub> Rezeptors, folgen im weiteren Verlauf dieser Arbeit.

### **3.1.1.2 GABA<sub>C</sub> Rezeptor**

#### **3.1.1.2.i Struktur**

Fünf Polypeptide (Untereinheiten) formen nach Assemblierung den ionotropen GABA<sub>C</sub> Rezeptor. Jede Untereinheit beinhaltet vier transmembranäre Segmente, (M1-M4) zwischen M3 und M4 befindet sich ein großer intrazellulärer „loop“. Die Membrantopologie des GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub> Rezeptors stimmen miteinander überein (vgl. Abbildung 4 A,B). Das Pentamer formt einen Chlorid-selektiven Ionenkanal, der Durchmesser der Kanalpore beträgt 5.1 Å und ist somit etwas geringer als der des GABA<sub>A</sub> Rezeptors.

Ein grundsätzlicher struktureller Unterschied zum GABA<sub>A</sub> Rezeptor ist der Aufbau des GABA<sub>C</sub> Rezeptors aus  $\rho$ -Untereinheiten. Bisher wurden 3 Untereinheiten ( $\rho_1$ - $\rho_3$ ) identifiziert, die jeweils ein homooligomeres oder pseudohomooligomeres (z.B.  $\rho_1\rho_2$ ) funktionelles Rezeptormolekül bilden (Bormann *et al.*, 1995). Die  $\rho$ -Untereinheiten weisen eine 30-38%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit den Untereinheiten des GABA<sub>A</sub> Rezeptors auf. Bei *in-vitro* Untersuchungen konnte die  $\rho$ -Untereinheit mit Untereinheiten des GABA<sub>A</sub> Rezeptors ( $\alpha,\beta$ ) in einem Rezeptormolekül exprimiert werden, *in-vivo* wurde eine solche Untereinheitenkombination noch nicht nachgewiesen (Bormann, 2000). Möglicherweise reflektiert das GABA<sub>A</sub> –GABA<sub>C</sub> Rezeptor Verhältnis, eine Evolution vom einfachen homologen zu einem vielfältigen heterologen Rezeptor (Johnston, 1996b).

### 3.1.1.2.ii Charakteristika

GABA<sub>C</sub> Rezeptoren sind deutlich GABA-sensitiver als GABA<sub>A</sub> Rezeptoren. Die halbmaximale Antwort (EC<sub>50</sub>) wird durch Applikation von Konzentrationen um 1-4 µM GABA erzielt (vgl. GABA<sub>A</sub> 10 µM) (Bormann *et al.*, 1995). Die „Hill- Slopes“ sind deutlich steiler, was wahrscheinlich mit dem Vorhandensein von fünf GABA-Bindungsstellen korreliert. Auch die pharmakokinetischen Rezeptoreigenschaften weichen von denen der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren ab. Sowohl die Aktivierungs- als auch die Inaktivierungszeitkonstanten sind erheblich verlängert (vgl. Tabelle 1) (Bormann, 2000).

Einen weiteren Unterschied zu GABA<sub>A</sub> Rezeptoren stellt die, selbst bei relativ hohen Konzentrationen des Agonisten, nur schwach ausgeprägte Desensibilisierung des Rezeptors dar. Die Einzelkanalleitfähigkeit ist zwar deutlich (vierfach) geringer als die der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, jedoch findet man eine bis zu fünffach längere mittlere Öffnungsdauer des Rezeptors (Bormann *et al.*, 1995).

Ein deutlich kumuliertes Vorkommen von GABA<sub>C</sub> Rezeptoren wurde für die Retina von Wirbeltieren beschrieben werden. In den Axonendigungen und Dendriten konnten sie präsynaptisch, in sogenannten „hot spots“ konzentriert, nachgewiesen werden. Wenn optische Signale die Retina durchqueren, ausgehend von den Photorezeptoren, über die bipolaren Zellen zu den Ganglion-Zellen, findet eine Modulation durch die horizontalen Zellen und die amakrinen Zellen (GABAerge Interneurone) statt. Horizontale Zellen bilden Synapsen mit Photorezeptor-Axonendigungen und Dendriten von bipolaren Zellen in der „outer Plexiform layer“ (OPL). Amakrine Zellen bilden Synapsen mit den Axonendigungen der bipolaren Zellen und Ganglion Zelldendriten in der „inner plexiform layer“ (IPL) (Lukasiewicz *et al.*, 2004; Lukasiewicz *et al.*, 1998).

### 3.1.1.2.iii Pharmakologie

GABA<sub>C</sub> Rezeptoren reagieren weder auf den GABA<sub>A</sub> Antagonisten Bicucullin, noch auf den GABA<sub>B</sub> Rezeptor Modulator Baclofen. GABA, Muscimol und Cis-4-Amino-Crotonsäure (CACA) sowie das trans -Enantiomer Trans-4-Amino-Crotonsäure (TACA) aktivieren den GABA<sub>C</sub> Rezeptor, 1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl (TPMPA) stellt einen potenten Antagonisten am GABA<sub>C</sub> Rezeptor dar. GABA<sub>C</sub> Rezeptoren interagieren nicht mit GABA<sub>A</sub> Rezeptor Modulatoren wie Benzodiazepinen, Barbituraten und Neurosteroiden. Der Kanalblocker Picrotoxin blockiert sowohl GABA<sub>A</sub> als auch homooligomere ρ<sub>1</sub>-GABA<sub>C</sub> Rezeptoren (5000fach schwächer), bei ρ<sub>2</sub>- und nativen (ρ<sub>1</sub>ρ<sub>2</sub>) GABA<sub>C</sub> Rezeptoren konnte diese Wirkung nicht nachgewiesen werden (Bormann, 2000). Die Pharmakologie und die Charakteristika des GABA<sub>C</sub> Rezeptors sind in Abbildung 4 B und Tabelle 1 zusammengefasst.

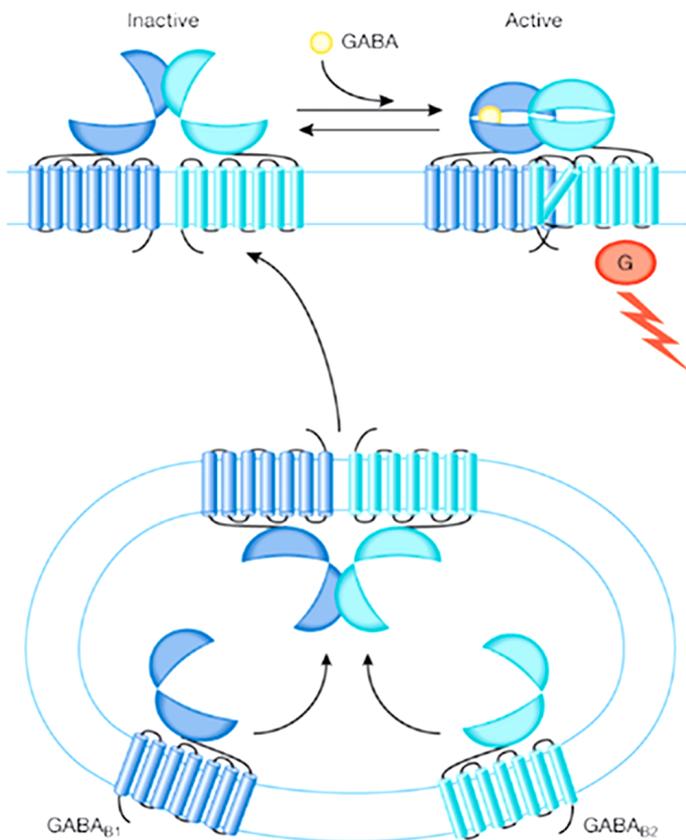
### 3.1.2 Metabotrope Rezeptoren

Metabotrope Rezeptoren transduzieren durch Koppelung an G-Proteine, welche wiederum an intrazelluläre „second-messenger-Systeme“ anknüpfen, Signale vom Extra- in den Intrazellulärraum. Die Superfamilie GPCR wird als größte aller Rezeptorfamilien gehandelt, dazu zählen zum Beispiel mACh-, 5HT<sub>3</sub>-, Opiat- oder Purin Rezeptoren.

Eine einzige Polypeptidkette aus bis zu 1100 Aminosäureresten bildet den Rezeptor, charakteristisch sind die sieben transmembranäre Helices, mit einer N-terminalen extrazellulären Domäne variabler Länge und einer C-terminalen intrazellulären Domäne. Der dritte zytoplasmatische Loop bindet an das G-Protein. Normalerweise spezifiziert sich ein Rezeptorsubtyp auf ein bestimmtes G-Protein. Innerhalb der Mitglieder einer Rezeptorenfamilie findet man eine signifikante Sequenzhomologie vor, dies gilt aber nicht beim Vergleich verschiedener Familien. Am häufigsten variieren die Länge des N-Terminus und die Position der Agonistenbindungsstelle.

G-Proteine sind benannt nach den Nukleotiden Guanosindi- bzw. Guanosintriphosphat, mit denen sie interagieren. Drei Proteinuntereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und ein Nukleotid bilden ein funktionelles G-Protein. Alle drei G-Protein Untereinheiten sind intrazellulär in der Membran verankert. Die  $\alpha$ - Untereinheit zeigt enzymatische Aktivität und katalysiert die Umwandlung von gebundenem GDP in GTP. Die G-Protein Familie umfasst vier pharmakologisch relevante Typen: G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub> und G<sub>o</sub> wobei jede G-Protein Klasse charakteristische Rezeptoren und Effektoren bedient. Die wichtigsten Effektoren der GPCR umfassen die Adenylylcyclase, die Phospholipase C, Ionenkanäle (v.a. Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Kanäle) und die Rho A/Rho Kinase (Rang *et al.*, 2007).

In der intrazellulären Signalkaskade haben die G-Proteine eine Vermittlerrolle zwischen Rezeptor und Zielstruktur, wobei ein G-Protein sowohl an mehrere Rezeptoren als auch Effektoren bindet. Im Ruhezustand liegt das G-Protein als Trimer vor, die  $\alpha$ -Untereinheit enthält GDP. Wird ein GPCR von einem Agonisten aktiviert, ändert sich die Rezeptorkonformation (zytoplasmatische Domäne), und die Affinität zum G-Protein erhöht sich. Bei Bindung von G-Protein und GPCR wird GDP durch GTP ersetzt, eine GTP- $\alpha$ - und eine  $\beta\gamma$ -Einheit entstehen, beide können die jeweiligen Effektoren (z.B. Enzyme, Ionenkanäle) aktivieren. Die Hydrolyse von GTP zu GDP durch GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit beendet die Signalübertragung, das Trimer re-assembliert und GDP bindet schließlich wieder an die  $\alpha$ -Einheit.



**Abbildung 5 GABA<sub>B</sub> Rezeptor**

GABA<sub>B</sub> Rezeptoren regulieren die Freisetzung von Neurotransmittern im ZNS. Nur das Heterodimer aus GABA<sub>B1</sub> und GABA<sub>B2</sub> Rezeptor ist voll funktional hinsichtlich der GABAergen Übertragung (vgl. Venus Flytrap Mechanismus), GABA<sub>B1</sub> vermittelt GABA induzierte Effekte, GABA<sub>B2</sub> aktiviert das G-Protein. GABA<sub>B1</sub> und GABA<sub>B2</sub> Rezeptoren assemblieren in Transportvesikeln und können nur als Heterodimer die Zellmembran erreichen (Moepps *et al.*, 2003).

### 3.1.2.1 GABA<sub>B</sub> Rezeptor

#### 3.1.2.1.i Charakteristika

GABA<sub>B</sub> Rezeptoren werden durch Baclofen aktiviert, Bicucullin wirkt nicht antagonistisch. G-Proteine werden bei Bindung von GABA an den Rezeptor durch ebendiesen moduliert und interagieren in ihrer aktivierten Form mit den Zielstrukturen (Ionenkanäle, Enzyme). GABA<sub>B</sub> Rezeptoren unterliegen zum einen einer ständigen (tonischen) und zum anderen einer bedarfsweisen temporären (phasischen) Aktivierung durch GABA.

Zwei Varianten des GABA<sub>B</sub> Rezeptors sind bekannt: 1) GABA<sub>B1</sub> mit den Spleißvarianten a und b, und 2) GABA<sub>B2</sub>.

GABA<sub>B</sub> Rezeptoren sind erst kürzlich pharmakologisch charakterisiert worden. Bei der Expression von GABA<sub>B1a</sub> Rezeptoren erhielt man ein Polypeptid, das alle Charakteristika eines GPCR und eine signifikante Sequenzhomologie mit anderen Mitgliedern der GPCR-Familie (z.B. metabotroper Glutamat-Rezeptor, Ca<sup>2+</sup>-sensing Rezeptor) aufwies. Jedoch

entsprach die GABA-Affinität bei weitem nicht der nativer GABA<sub>B</sub> Rezeptoren. Auch die Effektorsysteme (Ionenkanäle, Enzyme) wurden nicht in erwartetem Ausmaß stimuliert. Offenbar fehlte ein „Bauteil“ um die volle Funktionalität des Rezeptors herzustellen, nämlich der erst später identifizierte GABA<sub>B2</sub> Rezeptor.

Dieser Rezeptorsubtyp weist eine 35 %ige Sequenzhomologie mit dem GABA<sub>B1</sub> Rezeptor auf, sowie alle Merkmale eines GPCR. Beide Subtypen konnten in folgenden Arealen nachgewiesen werden: Cerebraler Cortex, Hippocampus, Purkinje und Granulazellen im Cerebellum, Thalamus und Wurzelganglien. Erst bei Co-Expression beider Subtypen und weiterführenden Analysen wurde die Vermutung bestätigt, dass GABA an den heterodimerisierten GABA<sub>B</sub> bindet, ein einzigartiger Mechanismus in der Superfamilie GPCR (Marshall *et al.*, 1999).

### 3.1.2.1.ii Aktivierung

Die GABA<sub>B1</sub> Einheit enthält die Agonistenbindungsstelle. Die Bindung von an die GABA<sub>B1</sub> Einheit des Heterodimers läuft gemäß dem „Venus Flytrap“ Modell ab. Bei diesem Mechanismus bindet der Agonist (GABA) in der großen extrazellulären globulären Domäne (engl. Venus Flytrap Modul - VFTM). Die namensgebende „Fangvorrichtung“ besteht aus zwei Lobi und einer gelenksartigen Region, die, nach Öffnung, eine Bindung der GABA ermöglicht. Nach Bindung der GABA ändert das VFTM der GABA<sub>B1</sub> Einheit seine Position (schließt sich), und eine Interaktion mit dem korrespondierenden Element der GABA<sub>B2</sub> führt zur G-Protein-Aktivierung (Bettler *et al.*, 2004).

Bislang noch ungeklärt ist, ob GABA an das N-Terminale Segment des GABA<sub>B2</sub> Rezeptors analog zum GABA<sub>B1</sub> Segment bindet oder „leer“ bleibt. Nur das Heterodimer erfüllt die strukturellen Kriterien für eine effektive G-Protein-Bindung, welche innerhalb der transmembranären Segmente stattfindet, unklar ist ob beide Untereinheiten beteiligt sind (Couve *et al.*, 2000).

Der GABA<sub>B2</sub> Rezeptor hat mehrere Funktionen: (1) er ermöglicht die Translokation des GABA<sub>B1</sub> Rezeptors vom Cytoplasma zur Zellmembran, (2) er erhöht im Heterodimer die Affinität zum natürlichen Liganden GABA, (3) durch Heterodimerisierung von GABA<sub>B1</sub> und GABA<sub>B2</sub> werden sowohl Ionenkanäle effektiver aktiviert als auch die Adenylcyclase inhibiert (Mohler *et al.*, 1999).

Die GABA<sub>B1</sub> Rezeptor Untereinheit enthält zwei extrazelluläre „Sushi repeats“ (Su1 und Su2) und interagiert mit ihrer C-terminalen coiled-coil-domain mit der coiled-coil-domain der GABA<sub>B2</sub> Untereinheit (Couve *et al.*, 2000).

### **3.1.2.1.iii Funktion**

GABA<sub>B</sub> Rezeptoren binden bevorzugterweise an G<sub>i</sub> und G<sub>o</sub>-α-Typ-Proteine. Präsynaptisch vorkommende Rezeptoren induzieren eine Inhibition von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen über die Gβγ-Untereinheit, und postsynaptische Rezeptoren eine Öffnung von K-Kanälen. Daraus resultiert eine Hyperpolarisation des nachgeschalteten Neurons, die die Spätphase des IPSP aufrechterhält. Außerdem stimulieren bzw. inhibieren GABA<sub>B</sub> Rezeptoren, über G<sub>i</sub>α, G<sub>o</sub>α und Gβγ-Untereinheiten, die Adenylcyclase (Bettler *et al.*, 2004).

#### **Ca<sup>2+</sup>-Kanäle**

Präsynaptische GABA<sub>B</sub> Rezeptoren werden eingeteilt in Autorezeptoren, die spezifisch GABA-Freisetzung hemmen, und Heterorezeptoren, die jegliche Neurotransmitterfreisetzung hemmen. Zielstrukturen der G-βγ-Untereinheit sind die Ca<sup>2+</sup>-Kanäle Ca<sub>v</sub>2.2 (N-Typ) und Ca<sub>v</sub>2.1 (P/Q-Typ), beide sind präsynaptisch lokalisiert und ermöglichen die Transmitterfreisetzung (Bettler *et al.*, 2004).

#### **K<sup>+</sup>-Kanäle**

Postsynaptisch induzieren GABA<sub>B</sub> Rezeptoren langsame IPSPs durch Aktivierung von „inwardly rectifying“ K<sup>+</sup>-Kanälen (GIRK oder Kir3). Die durch den Kanal ausströmenden K<sup>+</sup>-Ionen führen zu einer Hyperpolarisation, zeitlich versetzt zur schnellen Hyperpolarisation durch GABA<sub>A</sub> Rezeptor vermittelten Cl<sup>-</sup>-Ionen Einstrom (Bettler *et al.*, 2004).

#### **Adenylcyclase**

G<sub>i</sub>α- und G<sub>o</sub>α hemmen die Isoformen der Adenylcyclase Typ I, III, V und VI, die Gβγ-Untereinheit stimuliert Typ II, IV und VII. Bedingung für die Stimulation ist jedoch das Vorhandensein einer aktiven G<sub>s</sub>α-Untereinheit, was durch Ligandenbindung an einen entsprechenden Rezeptor (z.B. Noradrenalin, Histamin) bewirkt wird. Somit kann via GABA<sub>B</sub> Rezeptor die cAMP Konzentration je nach Neuron erhöht oder erniedrigt werden. Viele Ionenkanäle werden von cAMP abhängigen Kinasen (Proteinkinase A oder PKA) aktiviert (Bettler *et al.*, 2004).

### **3.1.2.1.iiii Pharmakologie**

Baclofen, der einzige GABA<sub>B</sub> Rezeptor Agonist mit klinischer Verwendung, wird aufgrund seiner antispastischen, muskelrelaxierenden Wirkung als Palliativum bei Erkrankungen wie Multipler Sklerose sowie Hemi- oder Tetraplegien eingesetzt. Weiters kommt Baclofen bei Spasmen (die zum Beispiel durch Hirnläsionen hervorgerufen werden), Dystonie und zerebral bedingten Lähmungserscheinungen zum Einsatz. Auch bei vom Stiff-Man-

Syndrom, Demenz-assoziierten- und von Tetanusinfektionen ausgelösten Muskelrigiditäten und Krämpfen trägt Baclofen zur Besserung der Symptomatik bei (Bettler *et al.*, 2004).

Man geht davon aus dass Baclofen seine Wirkung durch GABA<sub>B</sub> vermittelte Hemmung der Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern und Neuropeptiden im Rückenmark entfaltet. Der jahrelange klinische Einsatz von Baclofen zeigte weitere (Neben)Wirkungen, die für eine therapeutische Anwendung in weiteren Indikationen sprechen.

Baclofen scheint die Drogenentzugssymptomatik zu lindern, dies wurde im Zusammenhang mit dem Missbrauch von Kokain, Heroin, Alkohol und Nicotin gezeigt.

Weiters übt Baclofen antinozizeptive Effekte bei neuropathischen Erkrankungen mit Trigemini-, Glossopharynx-, Vasopharynx- und Herpesneuralgien, oder Migräne aus.

Studien mit GABA<sub>B</sub>1-Knockout Mäusen führten zu weiteren Krankheitsbildern und Hinweisen für den therapeutischen Einsatz von GABA<sub>B</sub> Rezeptor Modulatoren: Epilepsie, Intestinale oder Lungenfunktionsstörungen, Blasenfunktionsstörungen und Gedächtnisverlust.

Der Einsatz von Baclofen wird jedoch durch sein breites Nebenwirkungsspektrum, das unter anderem Sedierung, motorische Beeinträchtigungen und Toleranzentwicklung umfasst, limitiert. Daher wird nach neuen GABA<sub>B</sub> Wirkstoffen gesucht, die diese Nebenwirkungen nicht aufweisen (Bettler *et al.*, 2004).

## B. Spezieller Teil

### 4. GABA<sub>A</sub> Rezeptor

#### 4.1 Struktur

Die niedrigste Organisationsuntereinheit des GABA<sub>A</sub> Rezeptors ist ein circa 50 kD großes Polypeptid: Jede, der fünf Untereinheiten des GABA<sub>A</sub> Rezeptors, umfasst eine große extrazelluläre N-terminale Domäne, vier hydrophobe membrandurchspannende Domänen (M1 – M4) und eine, ebenfalls extrazelluläre, kleine C-terminale Domäne. Die N-terminale Domäne enthält einen „Cystein-Loop“ (Cys Loop), der in allen Ionotropen Rezeptoren konserviert ist. Einige Untereinheiten besitzen einen intrazellulären „Loop“ zwischen M3 und M4, der wahrscheinlich als Phosphorylierungsstelle dient (vgl. Abbildung 6 A, B, C, D) (Hevers *et al.*, 1998).

#### 4.1.1 Strukturelemente

##### 4.1.1.1 GABA-Bindungsstelle

Die Bindung von GABA an den Rezeptor erfolgt an  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten. Das zusätzliche Vorhandensein von  $\gamma$ -Untereinheiten beeinflusst zwar die Einzelkanalleitfähigkeit und die BZD-Sensitivität, hat jedoch keinen Effekt auf die GABA Bindung. Ein GABA<sub>A</sub> Rezeptor mit der klassischen Zusammensetzung  $2\alpha.2\beta.1\gamma$  inkorporiert zwei Bindungsstellen (Kash *et al.*, 2004).

Die GABA Bindungsstellen befinden sich je zwischen  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit und werden von sechs Polypeptidketten, die als Loop A bis Loop F (A-C: $\beta_2$ , D-F: $\alpha_1$ ) bezeichnet werden, gebildet. Die Bindungsstellen sind asymmetrisch am Rezeptor angeordnet. Bei der  $\alpha_1$  Untereinheit wurden die Positionen F64, R67 und S69 (Teil des  $\beta$ -strand 2) als notwendig für die GABA Bindung identifiziert (Smith *et al.*, 1994). Die Bindung seitens der  $\beta_2$  Untereinheit inkludiert die Positionen T202, S204, Y205, R207 und S209 (Teil des  $\beta$ -strand 10). Weitere beteiligte Reste sind R176, V178, V180 und D183 ( $\alpha_1$ ), sowie Y97 und L99 ( $\beta_2$ ) (vgl. Abbildung 7A, B, C) (Boileau *et al.*, 2002b; Kash *et al.*, 2004).

##### 4.1.1.2 Pore

Die einzelnen transmembranären Elemente der Untereinheiten des GABA<sub>A</sub> Rezeptors beschreiben eine  $\alpha$ -Helix, wobei das M2 Segment die Innenwand der Ionenpore bildet. Alle GABA<sub>A</sub> Untereinheiten weisen im Bereich des M2 Segments, besonders hinsichtlich einiger hydrophiler Reste, einen hohen Grad an Sequenzhomologie auf. Die

Hydroxylgruppen dieser Reste interagieren mit den, die Cl<sup>-</sup> Ionen umgebenden, Wassermolekülen und ermöglichen somit eine energetische Stabilisierung der eintretenden Anionen. Dies stellt jedoch keinen Selektionsmechanismus dar, sondern einen Leitfähigkeitsverstärker (Kash *et al.*, 2004).

#### **4.1.1.3 Selektivitätsfilter**

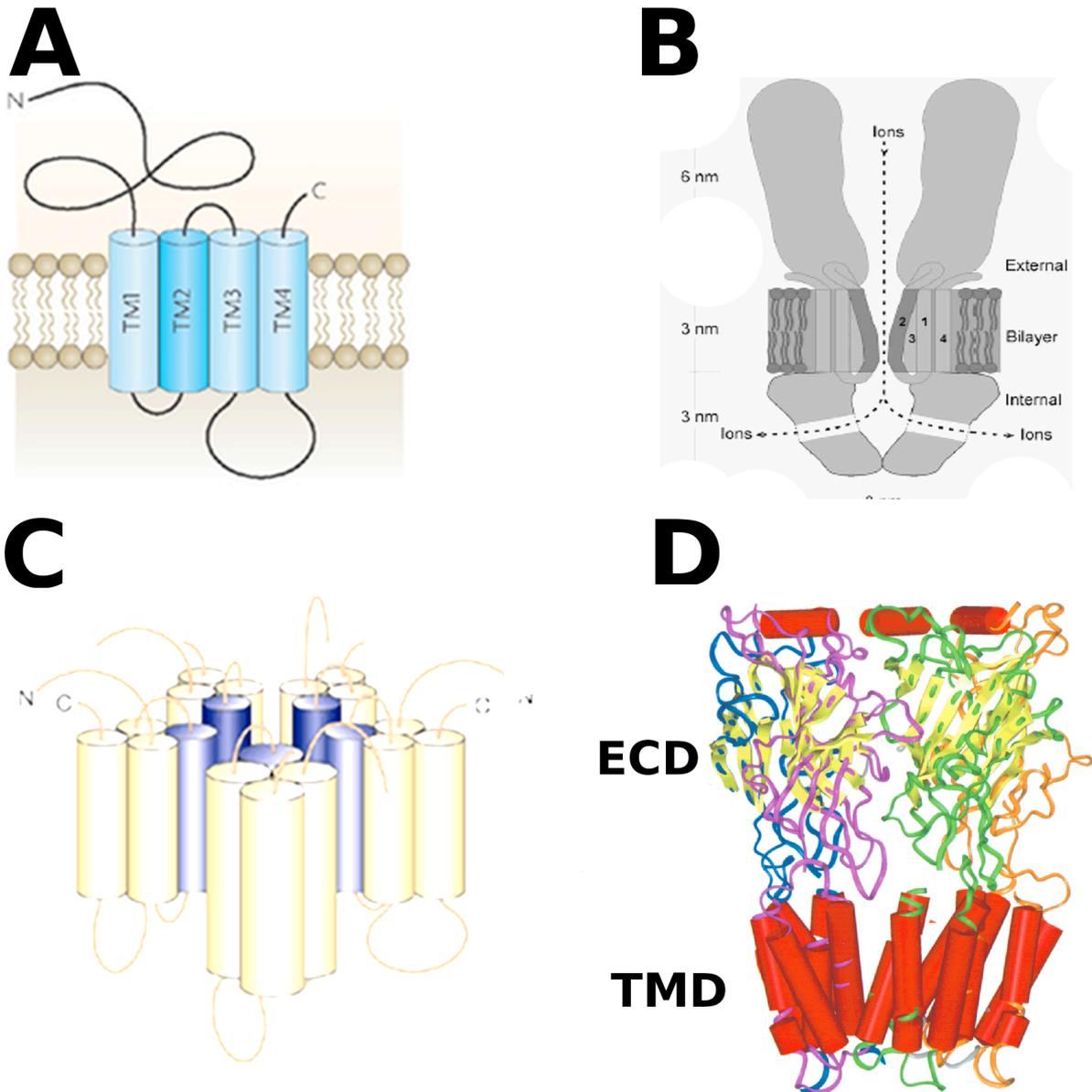
Die engste Stelle der Kanalpore weist einen Durchmesser von 5.6 Å auf und dient wahrscheinlich als Selektivitätsfilter (Bormann *et al.*, 1987). In allen Untereinheiten konserviert, findet man eine Anhäufung von positiv geladenen Aminosäureresten (Arginin, Lysin) um die extrazellulären Bereiche des M1 – und des M2-Segments. Diese geladenen Aminosäurereste bilden vermutlich einen positiv geladenen Eingang in den Kanal, wo negativ geladene Ionen gesammelt werden. Dies stellt aber nicht den eigentlichen Selektionsmechanismus dar, der, Experimenten mit Kationenreagentien zufolge, tiefer in der Kanalpore liegt. Determinierend für die Ionenselektivität des GABA<sub>A</sub> Rezeptors soll der M1-M2 loop der β-Untereinheit sein, eine asymmetrische Struktur ist dem Filter somit auferlegt (Kash *et al.*, 2004).

#### **4.1.1.4 Gates**

Als „Gates“ werden jene physikalischen Barrieren bezeichnet, die im geschlossenen und im desensibilisierten Zustand einen Ionenstrom durch den Kanal verhindern, beziehungsweise die, nach Aktivierung durch den Liganden, den Cl<sup>-</sup> - Ionenfluss ermöglichen.

Die Gates im desensibilisierten Zustand des Kanals sind wahrscheinlich andere, als jene im Ruhezustand, wobei über beide noch nicht viel bekannt ist. Interessant ist, dass die eng verwandten GABA<sub>C</sub> Rezeptoren keine Desensibilisierung zeigen, obwohl besonders im M2 Segment eine hohe Strukturhomologie der ρ Untereinheiten mit den GABA<sub>A</sub> Untereinheiten vorzufinden ist.

Die Asymmetrie des Selektivitätsfilters legt die Vermutung nahe, dass auch die Gates aus einer asymmetrischen Verformung der Pore, resultieren. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die Desensibilisierung Untereinheiten spezifisches Charakteristikum ist (Kash *et al.*, 2004).



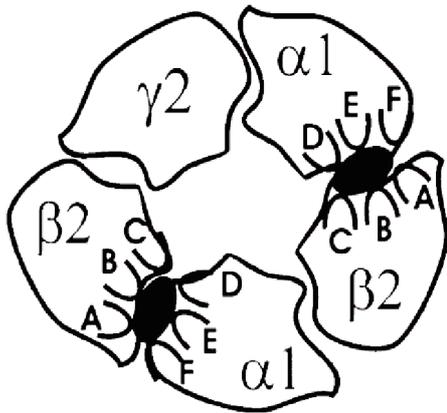
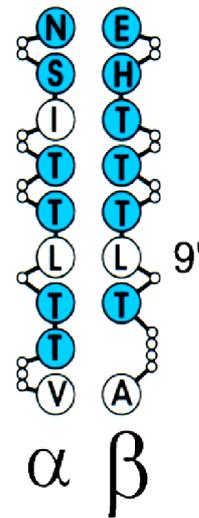
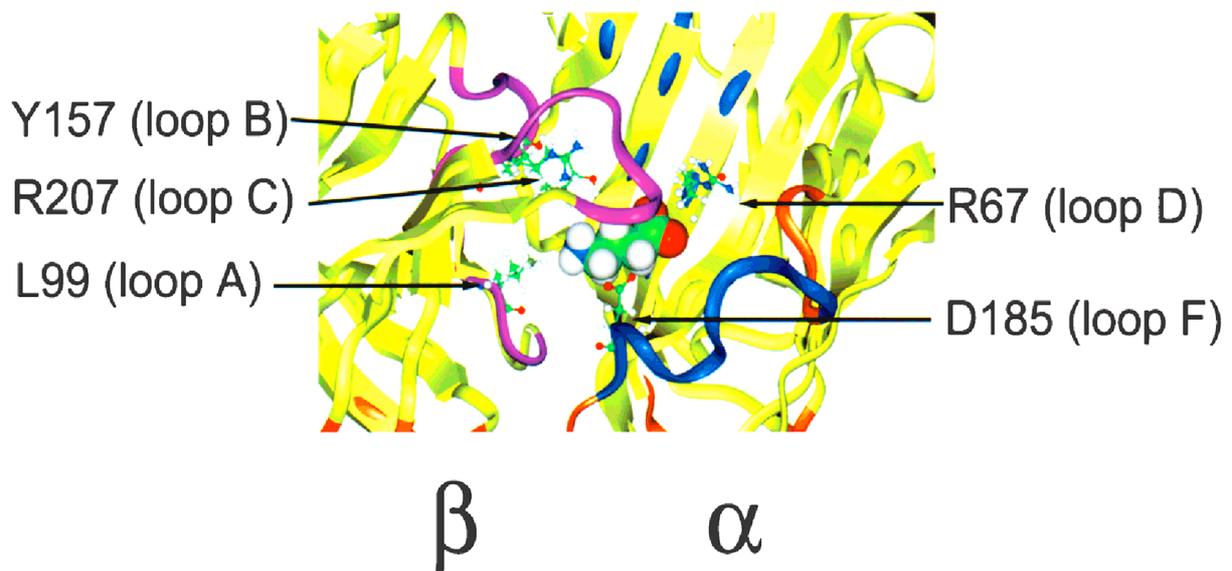
### Abbildung 6 Struktur des GABA<sub>A</sub> Rezeptors

**A** GABA<sub>A</sub> Rezeptoren Untereinheit. Eine Untereinheit besteht aus vier hydrophoben Transmembran-domänen (hier TM1-TM4). M2 formt die Cl<sup>-</sup>-Pore, an der Region zwischen M3 und M4 (Cys Loop) finden diverse Proteininteraktionen und posttranslationale Modifikationen statt. Dieser Loop trägt zu 10 % der Masse einer Untereinheit bei. An die große extrazelluläre Domäne binden GABA und einige Modulatoren (Jacob *et al.*, 2008)

**B** Längsschnitt des GABA<sub>A</sub> Rezeptors in der Membran (Clayton *et al.*, 2007)..

**C** Anordnung der Untereinheiten nach Assemblierung. Die Untereinheit assemblieren zu einem Pentamer (Kash *et al.*, 2004).

**D** Homologie-Modell des GABA<sub>A</sub> Rezeptors. ECD, extracellular domain; TMD, transmembrane domain (Kash *et al.*, 2004).

**A****B****C**

### Abbildung 7 Strukturelemente des GABA<sub>A</sub> Rezeptors

**A** Schematische Darstellung der GABA Bindungsstelle. GABA bindet an zwischen  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit. Ein Rezeptor besitzt zwei asymmetrische GABA Bindungsstellen. In der Abbildung wurde die klassische Bindungsstellen Loop-Nomenklatur verwendet (A-F) (Kash *et al.*, 2004).

**B** M2-Domäne von GABA<sub>A</sub>  $\alpha_1$  und  $\beta_2$  Untereinheiten, Gezeigt sind die Aminosäurereste, die die Pore bilden. Blau markiert sind Reste, die mit Wassermolekülen interagieren (Kash *et al.*, 2004).

**C** Ausschnitt eines Homologie Modells der GABA Bindungsstelle. Domänen in der  $\beta_2$  Untereinheit, die in die GABA Bindung involviert sind, sind lila markiert, Domänen in der  $\alpha_1$  Untereinheit blau (Kash *et al.*, 2004).

#### 4.1.2 Repertoire der Untereinheiten

Es wurden bisher 19 Untereinheiten der GABA<sub>A</sub> Rezeptor Familie identifiziert. Die Klassifikation der Untereinheiten erfolgte gemäß dem Grad der Aminosäuresequenzhomologie in acht Klassen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ ,  $\theta$ ), wobei die Klassen 30 – 40 % Sequenzhomologie, die Subtypen ( $\alpha_1$ – $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ – $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ – $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\rho_1$ – $\rho_3$  und  $\theta$ ) bis zu 80 % Sequenzhomologie untereinander zeigen (Hevers *et al.*, 1998; Mohler, 2006a; Mohler *et al.*, 1995).

Die Zahl der Untereinheiten wird noch erweitert, durch Untereinheiten von denen auch alternative Spleißprodukte bekannt sind. Dies gilt für  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  und  $\gamma_2$ , näher benannt werden die jeweiligen Produkte mit dem Zusatz S (short) für die kürzere und L (long) für die längere Produktvariante (z.B.  $\gamma_{2S}$ ,  $\gamma_{2L}$ ). Auch für  $\alpha_5$  wurden drei mRNA Varianten gefunden, die jedoch alle in derselben  $\alpha_5$ -Proteinsequenz resultieren, die Spleißvarianten von  $\alpha_6$  führen zu einem nicht funktionalen Produkt (Barnard *et al.*, 1998).

#### 4.1.3 Untereinheiten-Verteilung

Am häufigsten wird die  $\alpha_1$ -Untereinheit, oft gemeinsam mit der  $\beta_2$ -Untereinheit, exprimiert. Die  $\gamma_2$ -Untereinheit findet sich, wenn auch in variierender Intensität in nahezu allen Gehirnarealen, oft in Kombination mit  $\alpha_1$  und  $\beta_2$  Untereinheiten. Dies lässt darauf schließen, dass die Kombination  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  physiologisch am häufigsten anzutreffend ist (vgl. Abbildung 8 A) (Mohler *et al.*, 2002).

Abgesehen von  $\alpha_1$  zeigen die anderen Subtypen der  $\alpha$ -Klasse eine etwas limitiertere Verteilung.  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  sind vor allem dort nachweisbar, wo  $\alpha_1$  eine weniger stark exprimiert wird. Im Hippokampus herrschen  $\alpha_2\beta_1\gamma$  und  $\alpha_1\beta_3\gamma$  Kombinationen vor, in den Pyramidenzellen ebenso wie in den Raphekernen und cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns sind  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ -Kombinationen lokalisiert (Mohler *et al.*, 2002).

Die Vermutung liegt nahe, dass zum einen  $\alpha_2$ -, zum anderen  $\alpha_5$ - und  $\beta_3$ -Untereinheiten paarweise auftreten.  $\alpha_5$  findet man außerdem noch im Bulbus olfactorius.  $\alpha_4$  wird vor allem Hippokampus und Thalamus oft zusammen mit  $\delta$  exprimiert. Ebenso in Kombination mit  $\delta$  lässt sich  $\alpha_6$  nachweisen, jedoch findet man diese Untereinheit fast ausschließlich in den Granulazellen des Kleinhirns (Mohler *et al.*, 2002).

Wie bereits erwähnt wird  $\beta_2$  ubiquitär exprimiert außer im Hypothalamus und in bestimmten Regionen des Hippocampus, wo  $\beta_1$  und  $\beta_3$  vermehrt zu finden sind (Hevers *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu der ubiquitär anzutreffenden  $\gamma_2$ -Untereinheit, zeigen die anderen Mitglieder der  $\gamma$ -Klasse restriktivere Verteilungsmuster. Man findet  $\gamma_1$  lediglich in bestimmten Amygdala-Abschnitten, dem Septum, und dem Hypothalamus. Ähnlich die  $\gamma_3$  –

Untereinheit, die nur im Bulbus olfactorius, Cortex, den Basalganglien und in Teilen des Thalamus vorkommt.

Die erst später entdeckte  $\epsilon$  Untereinheit weist eine 45 % Sequenzhomologie mit  $\gamma_2$ -Untereinheiten auf, und wird vor allem in subthalamischen Regionen und in der Amygdala und im Thalamus, wenn auch in geringeren Konzentrationen, exprimiert.

Die  $\rho$  Untereinheiten findet man fast ausschließlich in der Retina, außerdem in Spuren auch im Rückenmark und Kleinhirn.  $\rho_2$ -Untereinheiten kommen vorallem im Hippokampus und im Kortex vor (Hevers *et al.*, 1998).

## 4.2 Rezeptorsubtypen

### 4.2.1 Rezeptorsubtypen in vivo

Theoretisch betrachtet bieten die Pentamerstruktur und der umfangreiche Untereinheitenpool des GABA<sub>A</sub> Rezeptors ein sehr großes Spektrum an Möglichkeiten zur Assemblierung. Bezieht man nun noch die Tatsache ein, dass auch die verschiedenartige positionelle Aneinanderreihung der Untereinheiten zu einem variablen Produkt führt (fünf Untereinheiten – 120 Möglichkeiten) erweitert sich das hypothetische Rezeptor-Subtypen Repertoire um ein weiteres.

Es ist primär von Interesse welche Untereinheiten-Kombinationen physiologisch im ZNS exprimiert werden, und nicht welche Untereinheiten sich theoretisch kombinieren lassen. Es gibt keine Hinweise, dass physiologisch homooligomere GABA<sub>A</sub> Rezeptoren vorliegen (Barnard *et al.*, 1998).

Die Mehrheit der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren beinhaltet  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheiten in einer Stöchiometrie 2:2:1. Kombinationen in der eine Untereinheit dreimal vertreten ist, sind selten. Diese Möglichkeit konnte für zwei der häufigsten GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkombinationen ( $\alpha_1 \beta_2 \gamma_{2S}$  und  $\alpha_3 \beta_2 \gamma_2$ ) sogar ausgeschlossen werden (Angelotti *et al.*, 1993; Barnard *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 1994).

Die  $\delta$ -Untereinheit wird oft anstatt von  $\gamma$ -Untereinheiten in das Rezeptormolekül eingebaut, zum Beispiel in  $\alpha_6 \beta \delta$  Rezeptoren. Ebenso scheinen sich  $\epsilon$  und  $\pi$  zu verhalten, denn auch diese Untereinheiten können  $\gamma$  in Position und Funktion ersetzen (Barnard *et al.*, 1998; Quirk *et al.*, 1994).

In vitro führt auch das Vorhandensein von lediglich  $\alpha$  und  $\beta$ , nicht aber  $\beta$  und  $\gamma$ , oder  $\alpha$  und  $\gamma$ , zur Bildung GABA-sensitiver und BZD insensitiver Chlorid-Kanäle. Auch in vivo scheint eine  $\gamma$ -Untereinheit nicht zwingend für die Assemblierung eines funktionellen Rezeptors

notwendig zu sein. Bei Analyse von  $\alpha_4$  –beinhaltenden Rezeptoren, stellte sich heraus, dass 50% keine  $\gamma$  oder  $\delta$  enthalten, sondern nur  $\alpha_4$  und  $\beta_{1-3}$  (Sieghart *et al.*, 1999).

Auch in  $\alpha\beta$ -Kombinationen hängt die Stöchiometrie von den beteiligten Untereinheiten ab; so konnten sowohl Kombinationen aus 2  $\alpha$  und 3  $\beta$  als auch aus 3  $\alpha$  und 2  $\beta$  nachgewiesen werden (Baumann *et al.*, 2001).

#### **4.2.2 Verteilung – zellulär**

Bestimmte Rezeptorsubtypen sind nicht nur auf einzelnen Zellarten in den verschiedenen Hirnarealen spezialisiert, auch zeigen sie innerhalb der Zelle und Synapse eine spezifische Verteilung, die der Tabelle 2 zu entnehmen ist (McKernan *et al.*, 1996).

#### **4.2.3 Genclustering**

Es wurden mehr als fünfzehn verschiedene strukturverwandte Gene für die GABA<sub>A</sub> Rezeptor Untereinheiten beschrieben, nach Aminosäuresequenzanalyse wurden sieben Klassen von Glykoproteinen unterschieden:  $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ - $\beta_4$ ,  $\gamma_1$ - $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\rho_1$ - $\rho_3$  und  $\theta$ , wobei  $\rho_1$ - $\rho_3$  der Expression von GABA<sub>C</sub> Rezeptoren dienen und keine Rolle bei der Assemblierung von GABA<sub>A</sub> Rezeptormoleküle spielen (Johnston, 1996a).

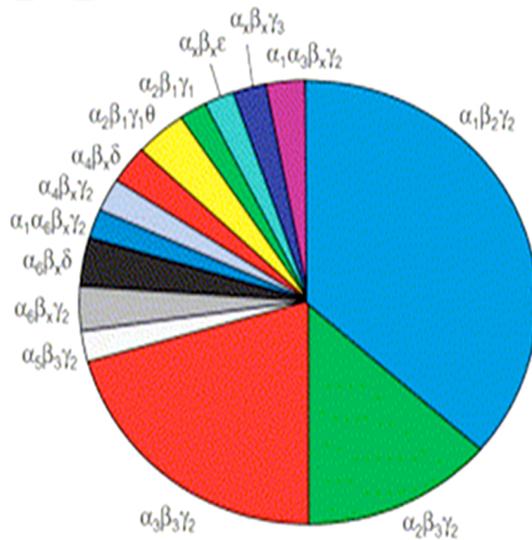
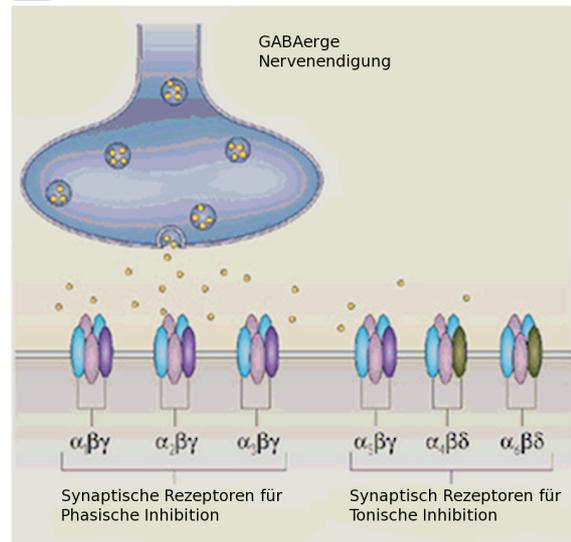
Eine molekulare Determinante kann mit dem vermehrten Auftreten von bestimmten Untereinheitenkombinationen in Verbindung gebracht werden. Die Gene für einige Subeinheiten treten in Clustern (drei oder vier) auf verschiedenen Chromosomen auf.

Dies gilt zum Beispiel für  $\alpha_1$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$  (Chromosom 5q32-q33),  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_1$  (Chromosom 4p13-q11),  $\rho_1$ ,  $\rho_2$ , (Chromosom 6),  $\alpha_5$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_3$  (Chromosom 15q11-q13) und  $\alpha_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\epsilon_1$  (Chromosom X). Diese gemeinsame Lokalisation der Gene für die einzelnen Untereinheiten lässt auf eine gemeinsame Expression und eine anschließende Assemblierung der aus einem Cluster stammenden Untereinheiten schließen.

Andererseits befinden sich die Gene für einen der drei häufigsten GABA<sub>A</sub> Rezeptorsubtypen  $\alpha_3\beta\gamma_2$  auf zwei verschiedenen Chromosomen, nämlich  $\alpha_3$  auf Chromosom 5 und  $\gamma_2$  auf dem X Chromosom (Barnard *et al.*, 1998; Buckle *et al.*, 1989; Hicks *et al.*, 1994; McKernan *et al.*, 1996).

Subtyp Klasse	Pharmakologische Eigenschaften	Gehirnareal und zelluläre Lokalisation	Subzelluläre Lokalisation	Anteil (%)
<b><math>\alpha_1 \beta_2 \gamma_{2s}</math></b> <b>A1a</b>	Verantwortlich für die sedative, amnestische und, zum größten Teil, antikonvulsive Wirkung der Wirkstoff an der Benzodiazepinbindungsstelle, hohe Affinität zu den klassischen Benzodiazepinen Zolpidem und Flumazenil	Cortex Cerebri (Lamina I – VI, Interneurone, Körnerzellen und Pyramidenzellen), Hippokampus (Interneurone, Körnerzellen und Pyramidenzellen), Pallidum, Striatum (Interneurone), Thalamische Relaiskerne; Bulbus olfactorius (Mitralzellen und Interneurone), Cerebellum (Purkinjezellen und Körnerzellen), Nucleus Cerebelli, Amygdala, Basales Vorderhirn, Substantia nigra Pars reticulata, Colliculi inferiores, Truncus Encephali;	Synaptisch (Soma und Dendriten) und extrasynaptisch in allen Neuronen mit einer hohen Expressionsrate	43
<b><math>\alpha_2 \beta_{2/3} \gamma_2</math></b> <b>A2b</b>	Verantwortlich für die anxiolytische Komponente der Benzodiazepin-Bindungsstelle-Agonisten, hohe Affinität zu den klassischen Benzodiazepinen und Flumazenil, mittlere Affinität zu Zolpidem	Cortex Cerebri (Lamina I – IV) Hippokampus (Körnerzellen und Pyramidenzellen, hauptsächlich an den Axonhügeln), Striatum (Bedornte Sternzellen); Bulbus olfactorius (Körnerzellen), Nuclei olivaris inferiores (hauptsächlich auf den Dendriten), Colliculi superiores, Hypothalamus, Amygdala, Motoneuronen;	Hauptsächlich synaptisch, angereichert in den Axonhügeln kortikaler oder hippocampaler Pyramidenzellen	18
<b><math>\alpha_3 \beta_n \gamma_2</math></b> <b>A3a</b>	Hohe Affinität zu klassischen Benzodiazepin-Agonisten und dem Antagonisten Flumazenil, mittlere Affinität zu Zolpidem	Cortex Cerebri (Pyramidenzellen und Körnerzellen in den Lamina V und VI, einige Axonhügel) Hippokampus (hiläre Zellen), Bulbus olfactorius (Pinselzellen), Nucleus reticularis thalami, Cerebellum (Golgizellen Typ III), Medulläre Formatio reticularis, Nucleus olivaris inferior, Amygdala, Colliculi superiores, Truncus Encephali, Medulla spinalis, Septum pellucidum, Basales Vorderhirn (Cholinerge Neuronen), Raphe und Locus coeruleus (serotonerge und katecholaminerge Neurone)	Hauptsächlich synaptisch, und in einigen Axonhügeln; extrasynaptisch in den Nuclei olivaris inferiores;	17
<b><math>\alpha_4 \beta_n \delta</math></b> <b>A4a</b>	Insensitiv auf Benzodiazepin-Agonisten und Zolpidem	Hippokampus (Körnerzellen des Gyrus Dentatus), Thalamus	Extrasynaptisch	3
<b><math>\alpha_5 \beta_3 \gamma_2</math></b> <b>A5a1</b>	Hohe Affinität zu den klassischen Benzodiazepinen und Flumazenil, niedrige Affinität zu Zolpidem	Hippokampus (Pyramidenzellen), Bulbus Olfactorius (Körnerzellen, Periplomerularzellen), Zerebraler Kortex, Amygdala, Hypothalamus, Superior Colliculi, Nucleus olivaris superior, Nucleus spinalis nervi trigemini, Medulla spinalis, Cerebellum (Körnerzellen), dorsaler Nucleus cochlearis;	Extrasynaptisch im Hippokampus, zerebralem Kortex und Bulbus Olfactorius, synaptisch und extrasynaptisch in Nucleus spinalis nervi trigemini und Nucleus olivaris superior	4
<b><math>\alpha_6 \beta_{2/3} \gamma_2/\delta</math></b> <b>A6a2/ A016</b>	Insensitiv auf die klassischen Benzodiazepine und Zolpidem, keine BZD-binding-site	Cerebellum (Körnerzellen), dorsaler Nucleus cochlearis;	Synaptisch (Glomeruli cerebelli) und extrasynaptisch auf den Dendriten und Soma der Körnerzellen	4

**Tabelle 2 Charakteristika der Rezeptorsubtypen (Mohler, 2006a)**

**A****B**

### Abbildung 8 Verteilung der Rezeptorsubtypen

**A** Rezeptorsubtypenverteilung im ZNS einer Ratte. Fußnote x zeigt an, dass die Untereinheiten Isoform unbekannt ist (Whiting, 2003).

**B** GABA<sub>A</sub> Rezeptoren mit einer Zusammensetzung aus (1–3), und Untereinheiten werden vorwiegend synaptisch exprimiert. 5 Rezeptoren hingegen findet man extrasynaptisch vor. Die vorher genannten GABA<sub>A</sub> Rezeptoren sind BZD sensitiv. Rezeptors bestehend aus (4 oder 6) sind BZD insensitiv und ebenfalls extrasynaptisch lokalisiert (Jacob *et al.*, 2008).

#### 4.2.4 Charakteristika in vivo

GABA<sub>A</sub> Rezeptor Subtypen weisen eine, wenn auch noch nicht vollständig geklärte, typische regionale, zelluläre und subzelluläre Verteilung auf, und sollen so auch, als fester Bestandteil eines distinkten neuronalen Schaltkreises, eine spezifische Funktion erfüllen. Daraus erklärt sich auch die Suche nach GABA<sub>A</sub> Subtyp spezifischen Substanzen, die auf diesem Wege einen defekten Schaltkreis beeinflussen können, ohne dabei physiologisch intakte GABAerge Transmission zu stören. Da die Verfügbarkeit Untereinheiten spezifischer Substanzen begrenzt ist, und vorhandene pharmakologisch oft noch nicht ausreichend charakterisiert sind, bedient man sich molekularbiologischen Methoden um die Funktion einzelner Rezeptorsubtypen aufzuklären (Sieghart, 2000).

Durch Punktmutationen an der BZD Bindungsstelle einer ausgewählten Rezeptoruntereinheit wird der resultierende Rezeptor BZD-insensitiv. Mäuse die punktmutierte Rezeptoren (z.B. Mutation  $\alpha_{1H101R}$ ) aufweisen, zeigen bei BZD Gabe im

Vergleich zu den Wildtypmäusen ein verändertes Ansprechen. Es lässt sich ein Zusammenhang zwischen der fehlenden BZD-Wirkung und der betreffenden Untereinheit herstellen, und man gewinnt einen näheren Einblick in die Funktionalität der GABA<sub>A</sub> Rezeptor Subtypen. Für viele Untereinheiten fehlen entsprechende Daten und Untersuchungen, deshalb ist nach-folgende Aufzählung als unvollständig zu verstehen (Mohler, 2006a).

#### **4.2.4.1 Alpha - Untereinheit**

##### **4.2.4.1.i BZD-sensitive Alpha-Subtypen**

###### **$\alpha_1$**

Sedierung kommt im Tiermodell als Abnahme an lokomotorischer Aktivität zum Ausdruck. Als hypnotisch wirkend wird eine schlafinduzierende und schlaferhaltende Substanz bezeichnet.  $\alpha_1$ -mutierte ( $\alpha_{1H101R}$ ) Mäuse zeigen bei Verabreichung von Diazepam keinerlei durch Sedierung bedingte Verhaltensweisen, unabhängig von der Höhe der Dosis.

Die EEG Veränderung während Schlafphasen, wie Supression von REM-Schlaf und Herabsetzen der Häufigkeit von „slow-wave“-Schlaf, blieben bei den  $\alpha_1$ -mutierten Tieren überraschenderweise unverändert. Diazepam konnte in diesen Mäusen trotz fehlender BZD-Sensitivität der  $\alpha_1$ GABA Rezeptoren eine hypnotische Wirkung entfalten. Die EEG Veränderungen scheinen mit der primär hypnotischen Wirkung nicht in Zusammenhang zu stehen, unklar ist welcher Mechanisms den hypnotischen Effekt des  $\alpha_1$ -selektiven Zolpidems hervorruft. Offensichtlich werden die sedative und die hypnotische Komponente der BZD Wirkung nicht von ein und demselben GABA<sub>A</sub> Rezeptortyp vermittelt (Rudolph *et al.*, 2001).

Auch die  $\alpha_1$  assoziierte anterograde Amnesie, die beim Menschen bei BZD-Applikation oft als unerwünschte Nebenwirkung auftritt, fehlte bei den  $\alpha_1$ -Mutanten. Weiters auf Interaktion mit  $\alpha_1$ GABA<sub>A</sub> Rezeptoren zurückzuführen scheint zumindest ein Teil der beobachteten antikonvulsiven Aktivität von BZD, nach Gabe der prokonvulsiven Substanz Pentylentetrazole, zu sein (Rudolph *et al.*, 2001).

###### **$\alpha_2$**

Die anxiolytische Wirkung der BZD wird vorallem der Interaktion mit den  $\alpha_2$  GABA<sub>A</sub> Rezeptoren zugeschrieben, dies bestätigte sich auch im Tierversuch mit  $\alpha_2$  mutierten ( $\alpha_{2H101R}$ ) Mäusen, die trotz BZD-Gabe keine auf Anxiolyse zurüchzuführenden Verhaltensmuster zeigten.  $\alpha_2$  Untereinheiten befinden sich vorallem in der Amygdala, dem

Zentrum für Emotionen, im Hippokampus und im Cortex Cerebri, die Anxiogenese findet in diesen Regionen statt. Dort lokalisierte  $\alpha_2$  Rezeptoren sind für die anxiolytische Wirkung der BZD essentiell (Mohler, 2006a). Eine Mutation in  $\alpha_2$  GABA<sub>A</sub> Rezeptoren führt weiters zu einer im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich herabgesetzten BZD-induzierten Veränderung des EEG-Profiles in den Schlaf- und Einschlafphasen, in welcher Korrelation dies mit der schlaffördernden Wirkung steht, ist nicht geklärt (Rudolph *et al.*, 2001).

### $\alpha_3$

Aus Versuchen mit  $\alpha_3$  selektiven Liganden geht hervor, dass auch dieser Subtyp an der Anxiogenese bzw. Anxiolyse beteiligt ist. Ein selektiv mit  $\alpha_3$  Rezeptoren interagierender inverser Agonist zeigt (neben einer prokonvulsiven) eine deutliche anxiogene Wirkung, ein Modulator vermittelt dagegen, vorallem in hohen Dosen, Anxiolyse. Es scheint, als ob über  $\alpha_3$ , zusätzlich zu den „low-receptor-occupancy“ vermittelten  $\alpha_2$  GABA<sub>A</sub> Effekten, durch allosterische positive Modulation bei „high-receptor-occupancy“ anxiolytische Effekte generiert werden können (Rudolph *et al.*, 2001).

Eine Überaktivität des dopaminergen Systems kann bei den meisten Schizophreniepatienten festgestellt werden und ist auch durch den Verlust des GABAergen Regulationsmechanismus erklärbar. Vor allem  $\alpha_3$  Rezeptoren vermitteln diese physiologisch wichtige Inhibition, die in verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen, neben Schizophrenie, nicht korrekt funktioniert. Eine  $\alpha_3$  selektive Modulation des GABA<sub>A</sub> Rezeptors könnte somit zur Entwicklung einer neuen Neuroleptika-Klasse, mit einer geringen Zahl an Nebenwirkungen führen (Rudolph *et al.*, 2006).

### $\alpha_5$

In den Pyramidalzellen des Hippokampus findet man neben den synaptisch angesiedelten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Rezeptorsubtypen unter anderem auch extrasynaptische  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, die, aufgrund ihrer spezifischen zellulären und subzellulären Verteilungsmuster dazu prädestiniert sind, Glutamat vermittelte, NMDA Rezeptor abhängige, exzitatorische Transmission zu antagonisieren. Nun zeigte sich im Tierversuch, dass Mäuse mit einer verringerten Zahl an oder ohne  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> Rezeptoren im Hippokampus im zu, Vergleich zu ihren Wildtyp-Verwandten, gesteigerten Gedächtnis- und Lernleistungen befähigt sind. Die hippokampale  $\alpha_5$ GABA-vermittelte neuronale Inhibition scheint ein maßgeblicher Regulator für die Wissens- und Verhaltensakquirierung zu sein. Möglicherweise tragen inverse Agonisten am  $\alpha_5$  Rezeptor ebenso zur Verbesserung der Gedächtnisfunktion bei (Mohler *et al.*, 2004). Weiters zeigte ein  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> selektiver inverser Agonist sowohl anxiogene als

auch anti-aggressive Wirkkomponenten (Rudolph *et al.*, 2006). Die Toleranzentwicklung in Bezug auf die sedierende Wirkung von Diazepam wurde mit der  $\alpha_5$  Untereinheit in Verbindung gebracht (van Rijnsoever *et al.*, 2004).

#### **4.2.4.1.ii BZD insensitive Alpha-Subtypen**

##### **$\alpha_6$**

In  $\alpha_6$ -GABA<sub>A</sub> Knock-out Mäusen ändert sich das Wirkprofil von Barbituraten, Anästhetika oder Ethanol nicht, jedoch sprechen sie stärker auf die sedierende Wirkung von Diazepam an. Außerdem wurde in diesen Tieren eine verminderte Expression von  $\delta$  –Untereinheiten festgestellt, was auf eine posttranslationale Co-Assemblierung dieser beiden Untereinheiten zurückzuführen ist (Rudolph *et al.*, 2006).

Verhaltensbiologische Experimente müssen in diesem Knock-out Experimenten jedoch kritisch beurteilt werden. Die Präzision bei dem Ausschalten eines einzelnen Genes ist nicht immer ausreichend evaluiert, dem zufolge kann es zu Down-Regulierungen der Expression benachbarter Gene für funktionell verschiedene Untereinheiten kommen.

Weiters, wie im Fall von  $\alpha_6$  (Up-Regulation der Expression eines inhibitorischen K<sup>+</sup>-Kanals), kann es zu adaptiven Veränderungen kommen, die den „neuen“ Genotyp dem ursprünglichen Phänotyp entsprechen lassen und somit keine Subtyp spezifischen Erkenntnisse liefern können (Rudolph *et al.*, 2001).

#### **4.2.4.2 Beta-Untereinheit**

##### **$\beta_3$**

Das Ausschalten des Genes, das für  $\beta_3$  kodiert, führt zu einer massiven Abnahme der Dichte von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren im gesamten ZNS, resultierend in einem frühen Tod der meisten Versuchstiere. Die wenigen Überlebenden zeigen erhöhtes Ansprechen auf sensorische Stimuli, epileptische Anfälle und eine starke motorische Beeinträchtigung.  $\beta_3$  GABA<sub>A</sub> Rezeptoren werden für die Desynchronisierung der neuronalen Signalleitung verantwortlich gemacht, ein Mechanismus, welcher der Epileptogenese entgegenwirkt (Rudolph *et al.*, 2001). Knock-in- $\beta_3$ -GABA<sub>A</sub> Mäuse reagierten auf Pentobarbital im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unverändert. Etomidat und Propofol wirkten in diesem Fall gar nicht, die Inhalationsnarkotika (Enfluran, Isofluran, Halothan) nur zum Teil, immobilisierend. Zusätzlich zu  $\beta_3$  wird der hypnotische Effekt von Etomidat auch über  $\beta_2$  vermittelt. Die atemdepressive Wirkung der Narkotika Etomidat und Propofol kommt ebenfalls über diesen Rezeptorsubtyp zustande (Rudolph *et al.*, 2001).

#### **4.2.4.3 Gamma- Untereinheit**

##### **$\gamma_1$**

Auch  $\gamma_1$  formt in Kombination mit  $\alpha$  und  $\beta$  eine BZD Bindungsstelle, bewirkt allerdings eine verminderte Sensitivität gegenüber bestimmten BZD Liganden ( z.B. Flumazenil, Zolpidem). Als interessant stellten sich die Geschlechtsunterschiede heraus, die bei der Expression der  $\gamma_1$  in Kombination mit  $\alpha_2$  und  $\beta_3$  im präoptischen Areal des Hypothalamus festgestellt werden konnten. Möglicherweise wird die Expression dort von Sexualhormonen reguliert, was zu einer geschlechtsabhängigen Pharmakologie beitragen könnte (Korpi *et al.*, 2002).

##### **$\gamma_2$**

Die  $\gamma_2$  Untereinheit tritt in den zwei Spleißvarianten  $\gamma_{2S}$  und  $\gamma_{2L}$  auf, das Knock-out der einen ( $\gamma_{2L}$ ) führt zu einer adaptiven Up-Regulation der anderen ( $\gamma_{2S}$ ), es entsteht ein physiologisch intakter Phänotyp. Knock-out beider Spleißvarianten führt zu totaler BZD-Insensitivität und in den meisten Fällen zu perinataler Sterblichkeit, die wahrscheinlich durch das fehlende  $\gamma_2$ -abhängige Rezeptorclustering an den Synapsen bedingt ist (Rudolph *et al.*, 2001).

#### **4.2.4.4 Delta-Untereinheit**

$\delta$ -Knock-out Mäuse sprechen unverändert auf die Narkotika Etomidat, Propofol, Ketamin und Midazolam an. Nach Verabreichung von Neurosteroiden kommt es zu einer verminderten schlafprolongierenden Wirkung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Rudolph *et al.*, 2001).

#### **4.2.4.5 Seltene Untereinheiten: $\epsilon$ , $\theta$ und $\pi$**

Die genauen pharmakologischen Eigenschaften dieser Untereinheiten wurden noch nicht ausreichend untersucht. Möglicherweise bilden sie Bindungsstellen für Non-BZD-Liganden für die Modulation der Locus Coeruleus Aktivität, zum Beispiel bei Angstzuständen oder einer Drogenentzugssymptomatik (Korpi *et al.*, 2002).

Die  $\pi$  Untereinheit wird vor allem in den weiblichen Reproduktionsorganen exprimiert, im ZNS wurde sie selten bis gar nicht identifiziert. Die  $\pi$  Untereinheit bildet *in vitro* funktionale rekombinante Rezeptoren. Der resultierende Rezeptor zeigt BZD Insensitivität und spezifische pharmakologische und biophysikalische Eigenschaften. Die tatsächliche Existenz von  $\pi$  Einheiten im ZNS ist noch nicht gesichert (Korpi *et al.*, 2002).

### 4.3 GABA<sub>A</sub> Rezeptor: Lebenszyklus in vivo

Die breitgefächerten Funktionen des GABA<sub>A</sub> Rezeptors werden nicht nur durch seine Strukturheterogenität begründet sondern auch durch ein vielfältiges Rezeptor-„Trafficking“, das heißt ein interaktives zellinternes Handling (Assemblierung, Membranintegration, synaptische Aggregation, Degradierung) des Rezeptorproteins, das mit der aktuellen Bedarfslage korreliert (vgl. Abbildung 9)

#### 4.3.1 Assemblierung/ ER Processing

GABA<sub>A</sub> Rezeptor Untereinheiten befinden sich nach Translation im endoplasmatischen Retikulum (ER), wo sie sich, unter Beanspruchung der ER-Hilfsproteine (Chaperone), zu einem Rezeptormolekül formieren. Fehlerhafte Untereinheiten, sowie unphysiologische Kombinationen (Homooligomere,  $\alpha\gamma$ -,  $\beta\gamma$ -Heterooligomere) werden an dieser Stelle entfernt und abgebaut. Sequenzen im N-Terminus jeder Untereinheit enthalten Informationen für eine Untereinheiten spezifische Rezeptoroligomerisierung (Kittler *et al.*, 2002). Die ER assoziierte Degradierung (ERAD) vollzieht sich via Ubiquitylierung und nach-folgendem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Die Ubiquitylierung besitzt einen Feedback-Mechanismus: Bei kontinuierlicher Blockade der neuronalen Aktivität findet die Ubiquitylierung in größerem Ausmaß statt, demzufolge werden mehr inhibitorische GABA<sub>A</sub> Rezeptoren abgebaut. Bei chronischer neuronaler Erregung wird weniger ubiquityliert, mehr Rezeptormoleküle finden den Weg in die Zellmembran (Jacob *et al.*, 2008; Saliba *et al.*, 2007).

#### 4.3.2 GABA<sub>A</sub> Rezeptor Trafficking

Nach der Assemblierung im ER gelangen GABA<sub>A</sub> Rezeptormoleküle in den Golgi Apparat. In Transportvesikeln wandern sie zur Zellmembran und werden dort insertiert. Erleichtert bzw. gesteuert werden diese Vorgänge durch spezifische intrazelluläre Proteine (Jacob *et al.*, 2008).

Das GABA<sub>A</sub> Rezeptor assoziierte Protein (GABARAP) vermittelt den Weg des Rezeptors im Vesikel vom Golgi Apparat zur Zellmembran, scheinbar nicht konstitutiv sondern vorallem nach Induktion. Antagonisiert werden die Wirkungen der GABARAPs vom „N-ethylmaleimid-sensitive factor“ (NSF) (Jacob *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 1999).

„Phospholipase-C-related catalytically inactive proteins“ (PRIPs) binden Inositoltriphosphat. PRIP1 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, PRIP2 ubiquitär. Dieses Protein bildet eine Brücke zwischen GABA<sub>A</sub> Rezeptoren und GABARAP, besonders bei  $\gamma_2$ Rezeptoren. Weiters sind diese Proteine befähigt den Phosphorylierungsgrad der Rezeptormoleküle zu

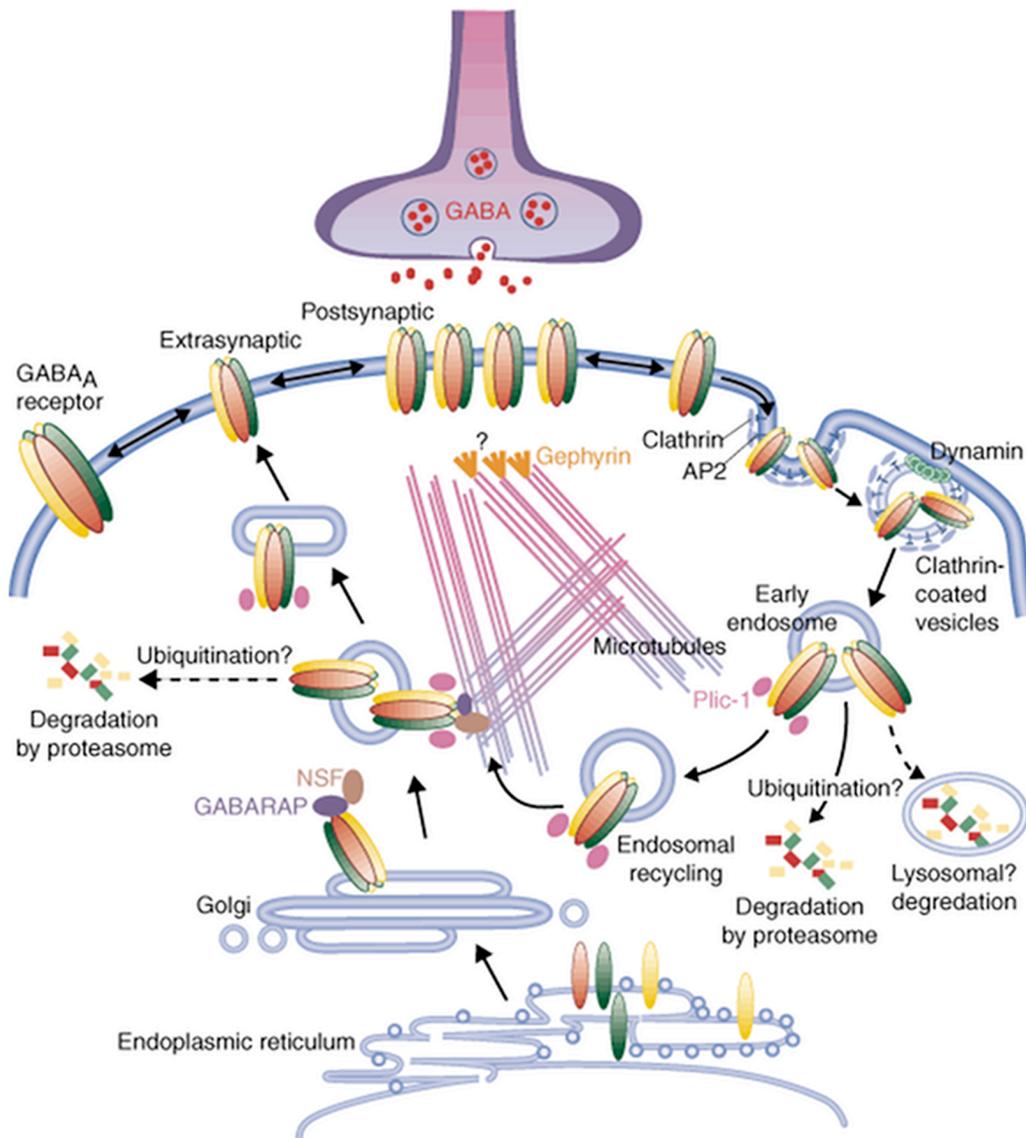
modifizieren. Die  $\beta$ -Untereinheiten enthalten Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und die cAMP abhängige Proteinkinase A. Diese, durch Phosphorylierung erwirkte, Modulation wird durch die Proteinphosphatase 1 $\alpha$  beendet. PRIP1 bindet an dieses Enzym und was sich somit indirekt positiv auf den Phosphorylierungsgrad des Rezeptors auswirkt. Möglicherweise spielen die PRIPs auch bei der Internalisierung von Rezeptoren eine Rolle. Im Allgemeinen wird diesen Proteinen eine große Relevanz beim konstitutiven Rezeptorhandling zuerkannt (Jacob *et al.*, 2008; Kanematsu *et al.*, 2002).

Zwei Cysteinreste in den intrazellulären Domänen von  $\gamma$ -Einheiten sind Substrate für Palmitoylierung, die Bindung von Palmitat an ein Protein katalysiert das Enzym Golgi specific DHHC zinc-finger-domain protein (GODZ). Dieses Enzym findet sich im Golgi Apparat und erweist sich als essentiell für die Aggregation von  $\gamma_2$  beinhaltenden Rezeptoren in den Synapsen im Zuge des Transports vom Golgi Apparat zur Plasmamembran (Keller *et al.*, 2004).

Weiters beteiligen sich die Proteine Brefeldin-A-inhibited GDP/GTP exchange facilitator (BIG2) und GABA<sub>A</sub> Receptor-interacting factor 1 (GRIF) an der Kaskade, wobei beide am Transportmechanismus der Vesikel vom Golgi Apparat an die Plasmamembran beteiligt sind und stimulierend auf selbigen einwirken (Jacob *et al.*, 2008).

#### **4.3.3 Clustering in den Synapsen**

Nach Erreichen der Plasmamembran werden GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, entsprechend der Untereinheiten-Zusammensetzung entweder postsynaptisch oder extrasynaptisch in Clustern angereichert, oder sie existieren in diffusen Populationen. Durch laterale Diffusion kann das Rezeptormolekül in der Membran wandern (Thomas *et al.*, 2005). Die meisten  $\gamma_2$ GABA<sub>A</sub>Rezeptoren kann man in synaptischen Clustern nachweisen,  $\beta_3$ GABA<sub>A</sub>Rezeptoren wiederum diffus oder in extrasynaptischen Clustern, und  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>Rezeptoren hauptsächlich extrasynaptisch geclustert. Rezeptoren, die  $\delta$ -Einheiten beinhalten findet man vor allem extra- und perisynaptisch, diffus verteilt vor (vgl. auch Abbildung 8 B) (Jacob *et al.*, 2008).



### Abbildung 9 GABA<sub>A</sub> Rezeptor Trafficking

GABA<sub>A</sub> Rezeptoren werden im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und assembliert, die Reifung erfolgt im Golgi Apparat, in sekretorischen Vesikeln werden sie zur Zellmembran transferiert, reguliert von GABARAP (GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein) und NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor). In der synaptischen Membran erreichen die Rezeptormoleküle die Zielregion durch laterale Diffusion. Phosphorylierung von AP-2 führt zur Internalisierung der Rezeptormoleküle durch Clathrin-vermittelte Endozytose. Der Abbau erfolgt in Lysosomen. Weiters werden Rezeptormoleküle nach Ubiquitynylierung in Proteasomen abgebaut (Luscher *et al.*, 2001).

Das Protein Gephyrin spielt eine wesentliche Rolle bei der Anreicherung und Erhaltung der Cluster der, durch Untereinheitenkombination ( $\alpha_{2,3}$ ,  $\beta_{2,3}$ ,  $\gamma_2$ ) entsprechend determinierten, GABA<sub>A</sub> Rezeptoren in den inhibitorischen Synapsen.

Die Interaktion mit Gephyrin scheint einerseits mit spezifischen intrazellulären Domänen der Untereinheiten, andererseits mit dem Mikrotubulingerüst der Zelle stattzufinden. Die tatsächlichen Vorgänge sind aber noch größtenteils ungeklärt. Da auch in Gephyrin-Knock-Out Mäusen GABA<sub>A</sub> Rezeptor Clustering nachzuweisen ist, gilt die Existenz weiterer Proteine beziehungsweise Mechanismen sehr wahrscheinlich, jedoch müssen auch diese erst näher untersucht werden (Jacob *et al.*, 2008; Tretter *et al.*, 2008).

#### **4.3.4 Endozytose und Post-endozytische Vorgänge**

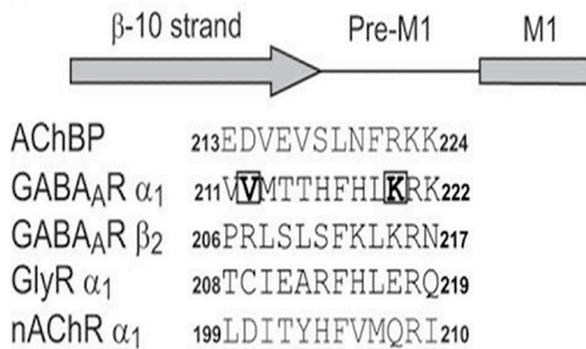
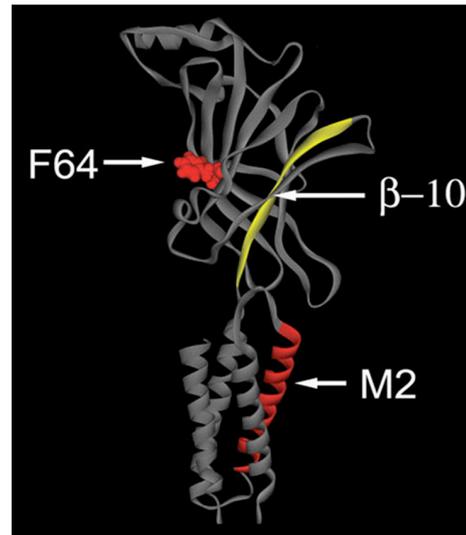
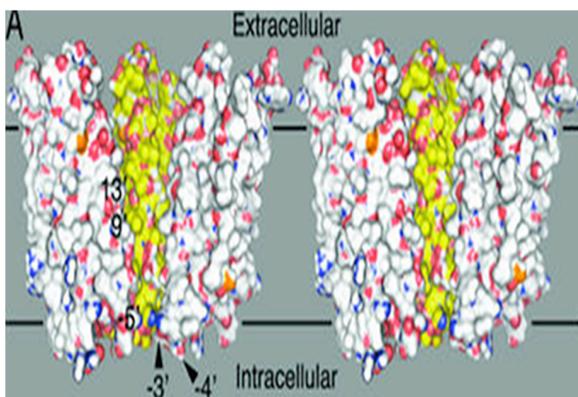
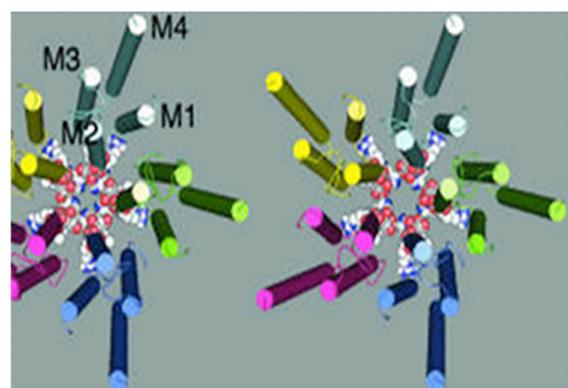
GABA<sub>A</sub> Rezeptoren unterliegen in großem Ausmaß der Clathrin-abhängigen Endozytose. Nach Endozytose wird ein Großteil der internalisierten Moleküle wieder an die Plasmamembran recycelt, ein weiterer Teil unterliegt einem lysosomalen Abbauprozess (Jacob *et al.*, 2008; Kittler *et al.*, 2004).

#### **4.4 GABA<sub>A</sub> Rezeptor: Channel Gating Mechanismus**

Der GABA<sub>A</sub> Rezeptor gehört der Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle an, und teilt seine strukturellen Eigenschaften mit der so genannten Cys-Loop Gruppe dieser Familie, das heißt mit dem Typ nACh Rezeptor und dem Typ 5-HT-3 Rezeptor. Diese Art von Rezeptoren besteht aus fünf Untereinheiten, die eine zentrale Pore bilden. Jede Untereinheit umfasst eine große extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Domäne bestehend aus vier  $\alpha$ -helikalen Segmenten und einer großen intrazellulären Domäne. Das Binden des Agonisten (GABA) an der extrazellulären Domäne führt im Transmembranären Bereich zu konformationellen Änderungen, was in der Öffnung und selektiven Durchlässigkeit für Cl<sup>-</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Ionen der Kanalpore resultiert (Kash *et al.*, 2003).

##### **4.4.1.1 Verknüpfung von Agonist-Bindung und Gating**

Um einerseits die Bindung des Agonisten (GABA), und andererseits die Konformationsänderung, die zur Öffnung des Kanals führt, in Verbindung zu bringen, bedarf es einer Brücke zwischen ECD und TMD. Zwei mögliche Mechanismen werden diskutiert:

**A****B****C****D****Abbildung 10 Strukturelemente zur Aktivierung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren**

**A** Das Prä-M1-Segment der  $\alpha_1$  Untereinheit ist an der Aktivierung des GABA<sub>A</sub> Rezeptors beteiligt. Die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -10 strands von  $\alpha_1$  und  $\beta_2$  GABA<sub>A</sub> Untereinheiten, AChBP,  $\alpha_1$  Untereinheit des Glycin und des nACh Rezeptors werden miteinander verglichen, Die in die Aktivierung des GABA<sub>A</sub> Rezeptors involvierten Aminosäuren sind fett gedruckt dargestellt (Keramidas *et al.*, 2006).

**B** Schematische Darstellung der GABA A  $\alpha_1$  Untereinheit, mit  $\beta$ -10 strand, dem involvierten Aminosäurerest F64 und der M2 Helix (Keramidas *et al.*, 2006).

**C** Molekulare Darstellung eine Cys-Loop Rezeptormoleküls. Linke Darstellung: geschlossener Kanal, rechte Darstellung, offener Kanal (Paas *et al.*, 2005).

**D** Blick von oben in den geschlossenen (linke Darstellung) bzw. offenen (rechte Darstellung) Kanal (Paas *et al.*, 2005).

„pin-into-socket“: ein einzelner Valin-Rest bildet die Verbindungsstelle zwischen dem, bei GABA Bindung, rotierenden Anteil der ECD und dem zur Kanalöffnung beitragenden Anteil der TMD. Dieser Rest dient als Achse, um die sich nach Rotation der ECD auch der relevante Teil der TMD dreht, wodurch die Pore sich an der engsten Stelle öffnet.

„conformational wave“: die Übertragung des Öffnungssignals nach GABA-Bindung könnte eine sukzessive Konformationsänderung einzelner Strukturelemente, angefangen in der ECD bis ins TMD, darstellen.

Letztere These wird durch die Tatsache gestützt, dass Mutationen in der ECD und TMD zu einer Funktionsunfähigkeit des GABA<sub>A</sub> Rezeptors führen. Wäre nun nur eine Region für die Übersetzung des Signals verantwortlich, wären derartige Mutationen vermutlich ohne Auswirkung. Außerdem bedeutet die Rotation einer so großen Domäne („pin-into-socket“) einen erheblichen energetischen Aufwand, was kinetisch ungünstig ist, und somit ebenfalls gegen erstere Variante spricht.

Mittels gezielter Mutationsanalysen wurden einige „Coupling“-Strukturen identifiziert, die essentiell für die Funktionalität des Rezeptors sind: das präM1 Segment ( $\beta$ -strand 10) ( $\alpha_1$  und  $\beta_2$ ), die M2-3 linker ( $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ ) und die Loops 2 und 7 ( $\alpha_1$  und  $\beta_2$ ) (vgl. Abbildung 10 A, B) (Kash *et al.*, 2004).

Insbesondere dem PräM1 Segment wird eine wichtige Rolle bei der Kopplung zugeschrieben. In allen LGIC Untereinheiten kann in dieser Region ein Cluster von kationischen Ladungen gefunden werden. Das PräM1 Segment soll jene Region sein, die nach GABA Bindung durch elektrostatische Interaktion mit anderen Strukturelementen kommuniziert und die Bewegung im TMD auslöst (Keramidas *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2006). Betrachtet man den M2-3 linker in der Familie der LGICs, fällt auf dass Mutationen in dieser Region zu neurologischen Krankheitsbildern führen können (nAch Rezeptor: Myasthenia Syndrom, Glycin Rezeptor: Hyperekplexia, GABA<sub>A</sub> Rezeptor: Epilepsie) (Kash *et al.*, 2003). Der Loop 7 befindet sich zwischen zwei Cysteinresten, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Cys – Loop Familie). Loop 2 und 7 scheinen zwei flexible Elemente zu sein, die elektrostatisch mit anderen Elementen (M2-3 Linker) interagieren. Die Bindung des Agonisten GABA induziert lokal an der Bindungsstelle eine Konformationsänderung, was auch als „induced-fit“ bezeichnet wird. Der Kanal kann sich daraufhin sehr schnell öffnen aber auch wieder schließen, selbst wenn GABA die Bindungsstelle noch besetzt.

Der Gating-Mechanismus ist eine einfache Bewegung, zum Beispiel ein Kippen oder eine Rotation der zentralen Strukturelemente. Weiters ist zu beachten, dass die Differenz der Menge an freier Energie zwischen Ruhe- und Öffnungszustand gering ist, also nur niedrig energetische Intermediärzustände und -reaktionen möglich sind zum Beispiel Bildung von Wasserstoffbrücken oder schwache elektrostatische Wechselwirkungen (Kash *et al.*, 2004). Wenn GABA an den Rezeptor bindet, induziert dies eine Konstriktion der Bindungsstelle (Wagner *et al.*, 2001).

Diese Verengung bewirkt eine initiale konformationelle Veränderung der ECD, welche, der „conformational wave“-Theorie nach weitere Strukturänderungen bis hin zum TMD nach sich zieht. Im ECD bewegen sich mehrere Loops: Loop 7 in der  $\alpha$  Untereinheit nähert sich an M2-3 Linker an, und die Loops 2 und 7 in der  $\beta$ -Untereinheit an die präTM1 Domäne ( $\beta$ 10). Die linksorientierten  $\alpha$ -Helices der fünf Untereinheiten verändern durch eine Bewegung im M2-3 Linker ihren Überkreuzungswinkel, woraus eine signifikante strukturelle Veränderung in M2 und im M1-2 Loop resultiert. Der Raum zwischen den vier Helices der TMD jeder einzelnen Untereinheit vergrößert sich während des Übergangs vom Ruhe- in den geöffneten Zustand und das M2 Segment rotiert. Dies stimmt mit der Zunahme der Kreuzungswinkel der Helices überein, was bildlich der Öffnung des Dachs eines vierpoligen „Tipis“ entspricht (vgl. Abbildung 10 C,D) (Kash *et al.*, 2004).

#### **4.5 Physiologie des GABA<sub>A</sub> Rezeptors**

Üblicherweise wird unter GABAergem Signalling die schnelle synaptische (phasische) Transmission verstanden. Im Laufe der Zeit wurde aber evident, dass manche Rezeptoren durch chronische Aktivierung tonische Inhibition vermitteln. Diese Rezeptoren befinden sich im extrasynaptischen Bereich (vgl. Abbildung 8 B). Zudem wurde eine langsame Variante der phasischen Inhibition festgestellt, die sich, ausgelöst durch ein Überlaufen des Transmitters, im peri- und extrasynaptischen Raum abspielt (Mody *et al.*, 2004).

##### **4.5.1 Phasische Inhibition**

Phasische Inhibition findet an den Synapsen statt und erfordert hohe Konzentrationen an GABA (0.3mM -1mM) im synaptischen Spalt, die in dieser Form für eine sehr kurze Zeit (<1ms) existieren. Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt, je nach Zahl, vollständig (gesättigt) oder unvollständig, und produziert das IPSP. Das Ausmaß und die Eigenschaften des IPSP hängen von der Zahl an Rezeptoren und den Eigenschaften des GABA Stroms ab.

Auch außerhalb oder im Umkreis der Synapse findet man GABA<sub>R</sub>, die bei einem phasischen Überlaufen des Transmitters aktiviert werden können. Demzufolge findet phasische Trans-mission auch extra- oder perisynaptisch statt. Genauere Untersuchungen dieser Vorgängen fehlen aber noch (Mody *et al.*, 2004).

#### **4.5.2 Tonische Inhibition**

Mikromolekulare Konzentrationen von GABA, die immer im extrazellulären Raum anzufinden sind, induzieren an bestimmten GABA<sub>A</sub> Rezeptoren tonische Inhibition. Im Gegensatz zur phasischen Inhibition erreicht die tonische keine großen Frequenzamplituden, zeichnet aber für einen Anteil von 75 % an den durchschnittlich ablaufenden Inhibitionsvorgängen verantwortlich. Die tonische Inhibition kontrolliert die Exzitabilität und kann unter Umständen auch die inhibitorische Transmission verstärken.  $\alpha_6(-/-)$  Mäuse zeigen keine GABA vermittelte tonische Inhibition, weisen jedoch eine kompensatorisch erhöhte K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit auf. Im Zusammenhang mit der tonischen Inhibition sind vor allem ausschließlich extrasynaptisch anzu-treffende  $\delta$ -beinhaltende Rezeptoren zu erwähnen. Sie scheinen einen großen Anteil der tonischen Inhibition zu vermitteln (Mody *et al.*, 2004). Die selektive Ausblendung von tonischer Inhibition durch niedrige Konzentrationen von Picrotoxin bewirkt eine Zunahme von spontanen IPSP (sIPSP), zum Beispiel in Pyramidal-neuronen. Die tonische Inhibition scheint ein Mechanismus zu sein um andere GABAerge Neurone zu kontrollieren (Mody *et al.*, 2004).

#### **4.5.3 Diversität des GABA-vermittelten Signalling**

Die variantenreiche Art mit der GABA Rezeptoren kommunizieren ist auf mehrere Umstände zurückzuführen. Die große Zahl an Subtyp Rezeptoren scheint einer der Hauptgründe zu sein. Diese Subtypen (siehe dort) weisen ein unterschiedliches pharmakologisches Profil auf, und zeigen auch eine unterscheidbare Kinetik. Weiters spielt die verschiedenartige Spezialisierung in bestimmten Zellen, die Anzahl der Rezeptoren pro Synapse sowie die Verteilung unter einem subzellulären Aspekt eine wichtige Rolle (Mody *et al.*, 2004).

##### **4.5.3.1 Desensibilisierung**

Die Desensibilisierung des GABA<sub>A</sub> Rezeptors tritt als „use-dependent“ Charakteristikum auf. Wenn isolierte/exprimierte Rezeptoren kontinuierlich oder schnell gepulst sättigenden Konzentrationen von GABA ausgesetzt werden, reduziert sich die Amplitude der Antwort. Obwohl solche extremen experimentalen Bedingungen physiologischen nicht entsprechen, können einige Schlüsse aus dieser Rezeptoreigenschaft gezogen werden. Eine komplexe

Kinetik der Synapsen wird erklärbar: Kurze Pulse der Sättigungskonzentration von GABA, wie sie auch physiologisch vorkommen, ziehen als Antwort primär einen schnellen Desensibilisierungsschritt nach sich, der von einem langsameren zuerst überlagert und dann abgelöst wird. Die langsamere Desensibilisierung zeugt von einem Zyklus, in dem sich die Rezeptoren nach einiger Zeit erholen und wieder aktivierbar werden. Die postsynaptischen Rezeptoren können nicht auf hochfrequente Pulse von GABA ansprechen. Schon mikromolare Konzentrationen von GABA können die Verfügbarkeit von Rezeptoren durch Desensibilisierung drastisch reduzieren. Eine oszillierende Aktivierung kann sich demzufolge nur schwer ausbreiten, das inhibitorische Netzwerk von Neuronen hemmt und kontrolliert sich auch so gegenseitig (Mody *et al.*, 2004).

#### **4.5.3.2 Cl<sup>-</sup> Reversal Potential**

Das „Cl<sup>-</sup> Reversal Potential“ ist dafür ausschlaggebend, ob eine GABAerge Synapse Depolarisierung oder Hyperpolarisierung bewirkt. Neuronen enthalten in der pränatalen Phase eine höhere intrazelluläre Konzentration an Cl<sup>-</sup> Ionen. Noch im neonatalen Gehirn wirkt daher GABA als exzitatorischer Transmitter, GABA hat mehr oder weniger die Rolle der erst zeitlich versetzt gebildeten Glutamat Funktion. Die spätere Entwicklung eines Cl<sup>-</sup> Transporters (Exporter) führt dann zum Shift der Cl<sup>-</sup> Konzentration und macht GABA zum inhibitorischen Transmitter (Ben-Ari, 2002). Auch ältere Neuronen können eine erhöhte intrazelluläre Cl<sup>-</sup> Konzentration aufweisen, und werden deswegen durch GABA erregt. Die Umstände und Reversibilität dieses Zustands unterliegen adaptiven Prozessen und sind der neuronalen Plastizität zuzuschreiben (Mody *et al.*, 2004).

#### **4.5.3.3 Phosphorylierung**

Intrazelluläre Domänen der GABA<sub>A</sub> Rezeptor Untereinheiten können durch diverse Kinasen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung könnte, wie in anderen Ionenkanälen, die Rezeptorplastizität und -funktion modifizieren. Insbesondere die β-Untereinheiten sind oft Substrat von Serin und Threonin Kinasen, dies beeinflusst auch das Zellmembran Trafficking.

Die Phosphorylierung von Ser410 durch die Proteinkinase B der β<sub>2</sub>-Untereinheit führt unverzüglich zur Integration des Rezeptormoleküls in die Membran und vergrößert die Zahl der membranständigen Rezeptoren. Im Gegensatz dazu bewirkt die Phosphorylierung von Tyrosinresten der β<sub>2</sub> oder β<sub>3</sub>-Untereinheiten eine Verbesserung der Funktion der Rezeptoren, unabhängig von der Zahl der Rezeptoren. Auch γ<sub>2</sub> Untereinheiten werden im erwachsenen Gehirn konstitutiv phosphoryliert. Der NMDA abhängige Ca<sup>++</sup>Einstrom in die

Zelle, ein Kinase-aktivierender Mechanismus, könnte unter anderem auf diese Weise die transmittorische Funktion von GABA beeinflussen (Mody *et al.*, 2004).

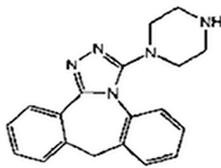
#### **4.5.3.4 Präsynaptische Regulation durch Neurotransmitter**

Interneurone werden von einer großen Zahl von Neurotransmittern reguliert, zum Beispiel GABA, Glutamat, Opioiden, 5-HT, ACh und Endocannabinoide. Zusätzlich zur postsynaptischen Funktion der jeweiligen Transmitter üben diese auch präsynaptisch Effekte aus, die die Transmitterfreisetzung beeinflussen. Wenn GABA in den synaptischen Spalt freigesetzt wird, diffundiert es nicht nur zu postsynaptischen Arealen, sondern bindet auch an präsynaptische GABA<sub>B</sub> Rezeptoren. Via Verminderung des Ca<sup>++</sup>Einstroms reduziert dies die Transmitterfreisetzung innerhalb sehr kurzer Zeit (weniger als eine Milisekunde). Dieser Limitierungsmechanismus ist der Desensibilisierung entgegengerichtet und verhindert die Entstehung repetitiver Stimuli. Nicht alle GABAergen Interneurone besitzen diese Autorezeptoren (Mody *et al.*, 2004).

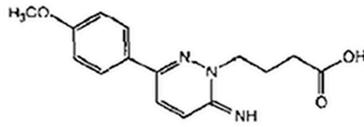
## **4.6 Pharmakologie des GABA<sub>A</sub> Rezeptors**

### **4.6.1 GABA<sub>A</sub> Rezeptor: Antagonisten**

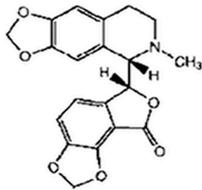
Schon 1970 wurde bei dem Alkaloid Bicucullin eine prokonvulsive Wirkung festgestellt. Dieser Effekt wurde später auf eine Interaktion mit dem GABA<sub>A</sub> Rezeptor zurückgeführt. Mittlerweile wird nach GABA<sub>A</sub> Antagonisten gesucht, die ein ausführlich charakterisiertes Untereinheiten-spezifisches pharmakologisches Profil aufweisen. Solche Verbindungen sollen vor allem als „scientific tools“ der Erforschung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren dienen, und haben im Allgemeinen keine therapeutische Indikation (Johnston, 1996a). einige Angonisten und Antagonisten sind mit ihren chemischen Strukturformeln in Abbildung 11 A und B gezeigt.

**A**

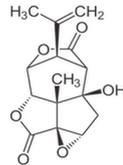
Pirtazepin



Gabazin



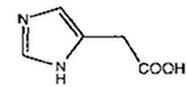
Bicucullin



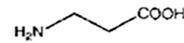
Picrotoxinin

**B**

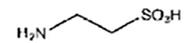
GABA



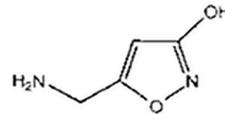
Imidazol-4-essigsäure



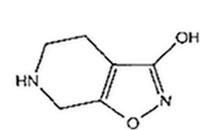
β-Alanin



Taurin



Muscimol



THIP

**Abbildung 11 Einige Agonisten und Antagonisten am GABA<sub>A</sub> Rezeptor**

**A** Kompetitive (Pirtazepin, Gabazin, Bicucullin) und nicht kompetitive (Picrotoxinin) Antagonisten am GABA<sub>A</sub> Rezeptor (Johnston, 1996a).

**B** Endogene (GABA, Imidazol-4-essigsäure, β-Alanin, Taurin) und Exogene Antagonisten (Muscimol) am GABA<sub>A</sub> Rezeptor (Johnston, 1996a).

**4.6.1.1 Kompetitive Antagonisten**

Kompetitive GABA<sub>A</sub> Antagonisten binden an der GABA Bindungsstelle des Rezeptors und zeigen aus diesem Grund oft eine strukturelle Verwandtschaft mit GABA und anderen GABA<sub>A</sub> Agonisten (Johnston, 1996a).

**4.6.1.1.i Bicucullin und Phalid-Isochinolinalkoloidderivate**

Bicucullin ist ein Isochinolin-Alkaloid und wurde erstmals aus der Pflanze *Dicentra cucullaria* isoliert. Die konvulsive Wirkung einiger Isochinolinalkaloide wurde bei frühen Untersuchungen in den meisten Fällen auf einen Antagonismus am Glycin Rezeptor zurückgeführt (z.B. Strychin).

Nur Phalid-Isochinoline mit einer 1S,9R-Konfiguration, wie zum Beispiel Isochinolin, Corlumin und (+)-Hydrastin zeigen einen GABA<sub>A</sub> Antagonismus. Die Aktivität von Bicucullin ist vom Lactonring abhängig, der wiederum nur im sauren Milieu stabil ist. Der Lactonring ist unter physiologischen Bedingungen (37 °C, neutraler pH) nur wenige Minuten stabil.

Bicucullin ist ein kompetitiver Antagonist an so genannten „low-affinity“ GABA-Bindungsstellen (Johnston, 1996a).

#### **4.6.1.1.ii Gabazin und Pyradazinyl GABA Derivate**

Gabazin (synonym SR95531) ist der bekannteste GABA<sub>A</sub> Antagonist unter den Pyradazinyl GABA Derivaten, ein kompetitiver Antagonist an „high affinity“ GABA Bindungsstellen und ein nicht kompetitiver Antagonist an „low affinity“ GABA Bindungsstellen. Dies stellt ein wichtiges Unterscheidungskriterium zu Bicucullin dar.

Interessanterweise hemmt Gabazin auch die Monoaminoxidase, was gemeinsam mit der Hemmung noradrenerger GABA Interneurone, zu einem synergistischen pronoradrenergen Effekt führt, und möglicherweise für die Therapie von Depressionen geeignet ist.

Auch eine Reihe anderer Pyradazinyl GABA Derivate zeigte in vitro eine bestimmte Aktivität, möglicherweise weisen diese Derivate auch eine Untereinheitenspezifität auf (Johnston, 1996a).

#### **4.6.1.1.iii Pitrazepin und andere N-Arylpiperazine**

Pitrazepin ist ein drei- bis zehnfach potenterer kompetitiver GABA<sub>A</sub> Rezeptor Antagonist als Bicucullin und antagonisiert außerdem Glycin am Glycinrezeptor.

N-Aryl-Piperazine aus anderen Wirkstoffklassen, einschließlich der Antidepressiva Amoxapin und Mianserin sowie der Antipsychotika Clothiapine, Loxapin, Metiapin, Clozapin und Flurazepin, sind ebenfalls schwache Antagonisten am GABA<sub>A</sub> Rezeptor (Johnston, 1996a).

#### **4.6.1.2 Nicht Kompetitive Antagonisten**

Viele Verbindungen antagonisieren den GABA<sub>A</sub> Rezeptor nicht kompetitiv. Besonders relevant scheinen hierbei die „cage“-Konvulsiva zu sein, die direkt im Cl<sup>-</sup>Ionen Kanal angreifen (Johnston, 1996a).

Weitere hier angeführte Verbindungen stellen das Gegenstück zu den positiven allosterischen Modulatoren, negative allosterische Modulatoren (synonym inverse Agonisten), dar (Johnston, 1996a).

#### **4.6.1.2.i Picrotoxin und verwandte Terpenoide**

Picrotoxin ist eine äquimolare Mischung aus Picrotoxinin und Picrotin, und wird aus der Pflanze *Anamirta cocculus* gewonnen. Picrotoxinin ist ein 50fach stärkerer GABA<sub>A</sub> Anta-

gonist als Picrotin. Weiters üben die strukturverwandten Terpenoide pflanzlichen Ursprungs Coriamyrtin und Tutin eine hemmende Wirkung auf den GABA<sub>A</sub> Rezeptor aus. Picrotoxin-ähnliche Verbindungen werden als neue Insektizide erforscht.

Picrotoxinin beeinflusst weder die Bindung von GABA und GABA<sub>A</sub> Agonisten noch die von BZD, sondern bindet wahrscheinlich in der Kanalpore. (Krishek *et al.*, 1996a)

In gleicher Art und Weise wirken die strukturverwandten Terpenoide Picrodendrine. TBPS (t-Butylbicyclo-phosphorothionat). Aus Struktur-Aktivitäts Untersuchungen geht hervor, dass Substanzen mit Spiro- $\alpha$ -Ethyliden- $\gamma$ -Lacton Struktur an die Picrotoxinin Bindungsstelle binden. Schon relativ einfache Verbindungen mit  $\gamma$ -Lacton-Struktur besitzen Affinität für die Picrotoxinin Bindungsstelle (Johnston, 1996a).

#### **4.6.1.2.ii Diverse**

Noch etliche weitere Verbindungen besitzen antagonistische Eigenschaften am GABA<sub>A</sub> Rezeptor, zum Beispiel der endogene Stoff  $\delta$ -Guanidinovalerensäure, m-Benzensulfonsäureazoniumchlorid, das Analeptikum Dimeflin, und Cunaniol, um nur einige zu nennen.

Bei einigen im Handel erhältlichen Arzneistoffen werden eventuelle prokonvulsive Nebenwirkungen auf einen Antagonismus am GABA<sub>A</sub> Rezeptor zurückgeführt, wie zum Beispiel bei Chinolon Antibiotika (Enoxazin, Norfloxazin) und dem Diuretikum Furosemid (Johnston, 1996a).

### **4.6.2 GABA<sub>A</sub>Rezeptor: Agonisten und Partielle Agonisten**

#### **4.6.2.1 Endogene Agonisten**

##### **4.6.2.1.i Imidazol-4-essigsäure**

Der Histamin-Metabolit Imidazol-4-essigsäure stimuliert zentrale GABA<sub>A</sub> Rezeptoren und senkt so nach systemischer Administration Blutdruck und Herzfrequenz (Johnston, 1996a).

##### **4.6.2.1.ii Taurin und $\beta$ -Alanin**

Taurin, eine nicht proteinogene schwefelhaltige Aminosäure, kommt besonders in Phasen des Hirnwachstums in höherer Konzentration im ZNS vor. Taurin stimuliert die Bildung von „low-affinity“ GABA Bindungsstellen und fungiert zudem als partieller Agonist bei BZD-Bindung am GABA<sub>A</sub> Rezeptor (Johnston, 1996a).

$\beta$ -Alanin unterscheidet sich strukturell von GABA nur durch das Fehlen eines Kohlenstoffatoms. Die Wirkstärke am GABA<sub>A</sub> Rezeptor entspricht GABA, die Affinität ist jedoch

230mal geringer.  $\beta$ -Alanin und Taurin desensibilisieren im *in-vitro* Experiment sowohl GABA<sub>A</sub> als auch Glycin Rezeptoren (Johnston, 1996a).

#### **4.6.2.2 Exogene Agonisten**

##### **4.6.2.2.i Muscimol**

Muscimol, ein Inhaltsstoff des Pilzes *Amanita Muscaria*, wirkt agonistisch am GABA<sub>A</sub> Rezeptor und erzeugt so psychogene Effekte.

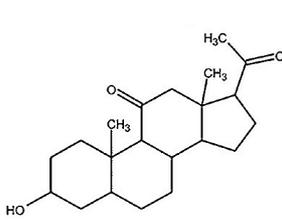
Von der Muscimol Struktur abgeleitet wurden die Isoxazolderivate Thiomuscimol, Dihydromuscimol und Nipecotylsäure. Der 3-Hydroxisoxazolanteil von Muscimol und seinen Derivaten wird vom GABA<sub>A</sub> Rezeptor wie eine Carboxylgruppe behandelt, weder der GABA<sub>B</sub> Rezeptor noch GABA abbauenden Enzyme im synaptischen Spalt erkennen die Muscimol Struktur.

##### **4.6.2.2.ii Diverse**

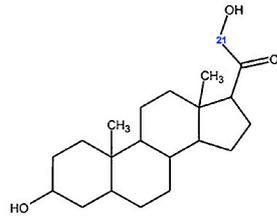
Weiters sind in dieser Reihe der GABA<sub>A</sub> Agonisten zu nennen THIP, Isoguvacin, ZAPA und die partialen Agonisten 4-PIOL und Thio-THIP (Johnston, 1996a).

**A**

Neurosteroide



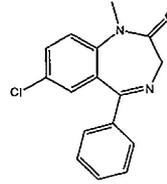
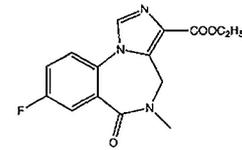
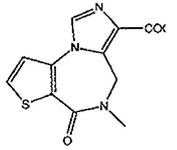
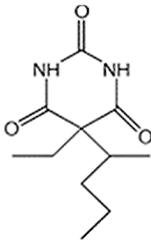
Alphaxolon



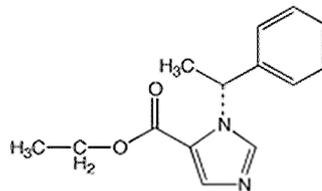
3α,5αTHDOC

**B**

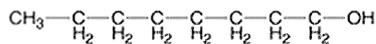
Benzodiazepine

Diazepam  
Positiver Allosterischer  
ModulatorFlumazenil  
Kompetitiver Antagonist an der  
BZD BindungsstelleR019-4603  
Negativer Allosterischer  
Modulator**C**

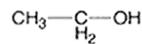
Pentobarbital



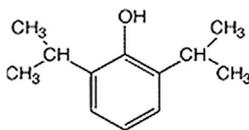
Etomidat



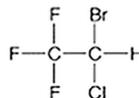
Octanol



Ethanol

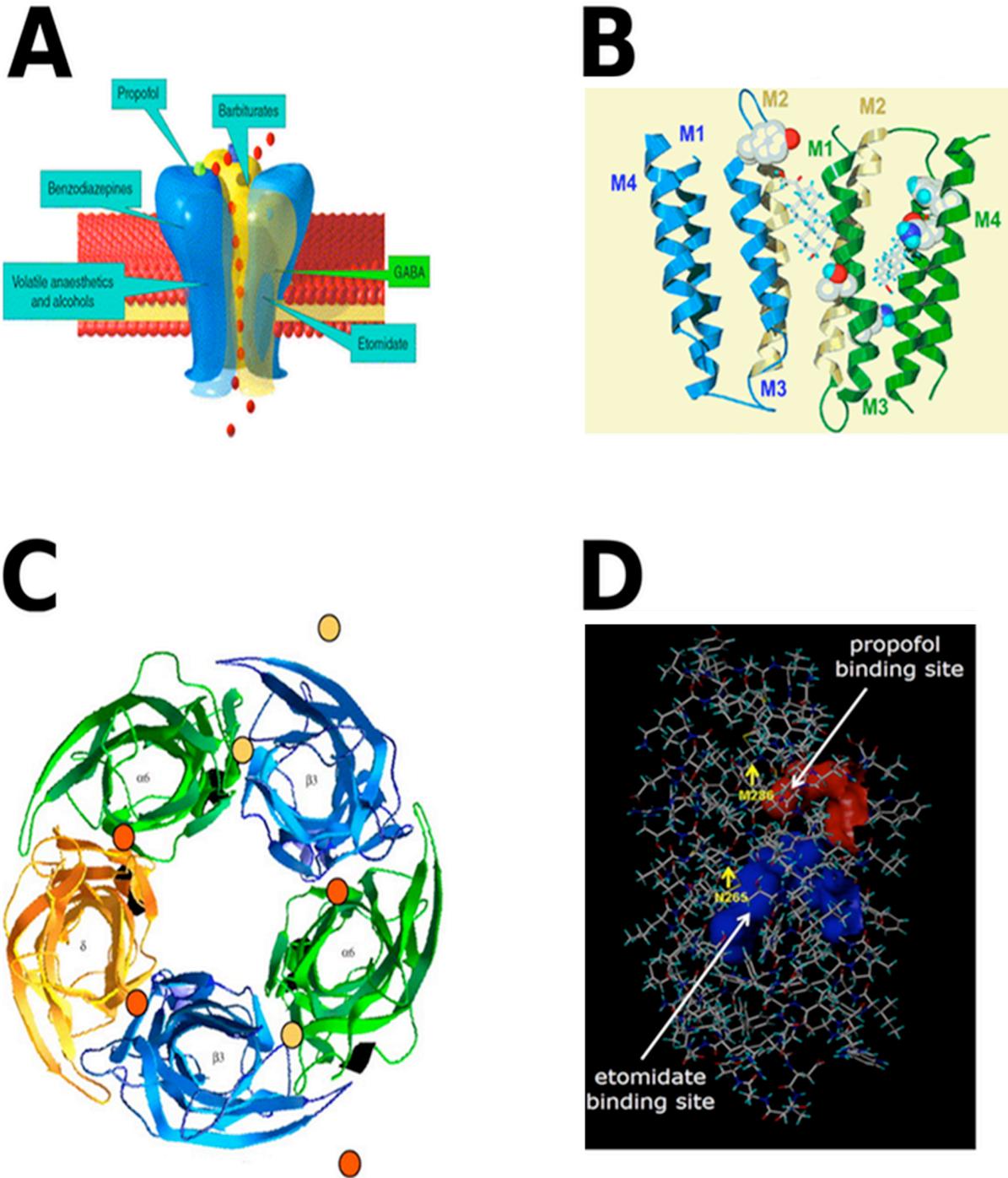


Propofol



Halothan

**Abbildung 12 Einige Allosterische Modulatoren am GABA<sub>A</sub> Rezeptor****A** synthetische (Alphaxolon) und (3α5αTHDOC) endogene Neurosteroide (Johnston, 1996a)**B** Benzodiazepine (Johnston, 1996a)**C** Diverse: Pentobarbital (Barbiturate), Etomidat (Anästhetika), Octanol und Ethanol (Alkohole), Propofol (Anästhetika), Halothan (Inhalationsanästhetika) (Johnston, 1996a)



**Abbildung 13 Bindungsstellen am GABA<sub>A</sub> Rezeptor**

**A** Schematische Darstellung einiger Bindungsstellen am GABA<sub>A</sub> Rezeptor. Cl<sup>-</sup>-Ionen sind als rote Punkte dargestellt (Whiting, 2003).

**B** Homologie Modell der TMD einer α1 und einer β2 Untereinheiten (eines Pentamers) mit 2 gedockten 3α,5α-THDOC. In diesem Modell wurden folgende Aminosäurereste in die Bindung des Neurosteroids involviert: Modulierende Bindungsstelle: Q241, N407, und Y410 in α1(grün) Aktivierende Bindungsstelle: T236 in der α1 Untereinheit und Y284 in der β2 Untereinheit (blau) (Hosie *et al.*, 2007)

**C** 3D Model eines heteromeren α<sub>6</sub>β<sub>3</sub>δ GABA<sub>A</sub> Rezeptors. GABA Bindungsstelle, gelb; Ethanol Bindungsstelle, orange (Olsen *et al.*, 2004).

**D** Bindungsstellen von Etomidat (blau) und Propofol (rot) (Campagna-Slater *et al.*, 2007)

### **4.6.3 GABA<sub>A</sub>Rezeptor: Allosterische Modulatoren**

GABA<sub>A</sub> Rezeptoren besitzen mehrere Bindungsstellen für Substanzen, die die Agonistenaktivität modulieren, vorausgesetzt der Agonist ist an den Rezeptor gebunden. Solche Substanzen werden als allosterische Modulatoren bezeichnet. Sie beeinflussen die Rezeptoraktivität, ohne dabei an die Agonistenbindungsstelle zu binden, sondern interagieren mit eigenen Bindungsstellen (vgl. Abbildung 13 A).

Zu diesen Stoffen zählen neben einer Reihe von Arzneimitteln wie den BZD und Barbituraten auch die endogen synthetisierten Neurosteroiden. Die Art der Modulation ist bei den genannten Stoffgruppen unterschiedlich, es findet eine positive oder negative allosterische Modulation statt. Weiters, wie im Fall von Flumazenil, wird nach Bindung an den Rezeptor kein modulatorischer Effekt erzielt (neutraler Modulator). Die Barbiturate verlängern die Öffnungszeit des Chlorid-Kanals, die BZD verursachen eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und die Neurosteroiden verlängern die Kanalöffnungszeit und erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass sich der Kanal öffnet. Auch negativ allosterisch modulierende Substanzen (z.B. 6,7-Dimethoxy-4-ethyl-β-carboline-3-carboxylat DCMC) sind bekannt. Diese haben nur experimentelle Bedeutung in der Pharmakologie (Johnston, 1996a).

#### **4.6.3.1 Barbiturate**

Zu den heute noch therapeutisch angewendeten Barbituraten zählen Pentobarbital, Phenobarbital, Secobarbital, Amobarbital, Primidon, Aprobarbital, Butobarbital, Mephobarbital, Methohexital und Thiopental. Diese Substanzen zeigen nach Verabreichung sedative, hypnotische, antikonvulsive und anästhetische Effekte (Charney *et al.*, 2001).

Verabreicht werden Barbiturate nur mehr bei speziellen Indikationen. Phenobarbital und Primidon werden zum einen bei bestimmten Epilepsieformen (partielle und generalisierte Anfälle), zum anderen bei Krampfanfällen in Zusammenhang mit Tetanus, Eklampsie, Status Epilepticus oder Vergiftungen angewendet. Zur intravenösen Anästhesie verwendete man Barbiturate mit sehr kurzer Halbwertszeit (Thiopental, Methohexital) (Charney *et al.*, 2001).

In den meisten ursprünglichen Anwendungsgebieten (Sedierung, Hypnotische Wirkung) wurden sie von Benzodiazpinen, die eine größere therapeutische Breite aufweisen, abgelöst.

Barbiturate verlängern die Öffnungsdauer der GABA<sub>A</sub> Rezeptor assoziierten Cl<sup>-</sup>-Kanäle. Die Bindung von GABA und BZD an den Rezeptor wird durch Barbiturate verstärkt, BZD und Barbiturate wirken also synergistisch. Man vermutet, dass eine eigene Barbiturat Bindungsstelle existiert.

Barbiturate modulieren den GABA<sub>A</sub> Rezeptor, interagieren weiters aber mit Glutamat Rezeptoren, und beeinflussen die Glutamatfreisetzung. Die Summe dieser Interaktion führt zu den antikonvulsiven, hypnotischen und anästhetischen Effekten dieser Substanzklasse.

Bei Konzentrationen von mehr als 50 µM, wie sie zum Beispiel bei der Anästhesie mit Pentobarbital gefunden werden, können die Barbiturate den Kanal ohne Anwesenheit von GABA an der Bindungsstelle, aktivieren. Man nimmt an, dass eine zusätzliche Bindungsstelle bei höheren Konzentrationen, neben der allosterisch-modulierenden Bindungsstelle, besetzt wird und zu diesem Agonismus führt. Ein weiterer Anstieg der Konzentration führt zu einem totalen Kanalblock (MacDonald *et al.*, 1989).

Diese pharmakologischen Charakteristika verleihen den Barbituraten, zusätzlich zur Abhängigkeitsproblematik, eine sehr geringe therapeutische Breite. Eine Überdosierung von Barbituraten kann lethal sein. Aus diesen Gründen werden Barbiturate heute nur mehr sehr restriktiv eingesetzt.

#### **4.6.3.2 Neurosteroide**

Neurosteroide werden im ZNS synthetisiert, vor allem bei Stress, während der Schwangerschaft und nach exzessivem Alkoholkonsum. Störungen der Steroid regulierten GABAergen Transmission haben das vermehrte Auftreten diverser Erkrankungen, wie z. B. Panikattacken, Depression, Schizophrenie, Alkoholabhängigkeit und katameniale Epilepsie zur Folge (Hosie *et al.*, 2006).

Die Konzentration der Steroide im ZNS hängt zum einen von der Freisetzung aus peripheren Drüsen, zum anderen von der Syntheserate aus lokalem Cholesterol ab.

Im Gegensatz zu anderen endogenen Steroiden üben Neurosteroide und neuroaktive Steroide keine genregulative Funktion aus, sondern interagieren stereoselektiv mit Ionenkanälen (GABA<sub>A</sub> Rezeptor, NMDA Rezeptor, spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanal (Johnston, 1996a).

Als erstes wurde 3α-Hydroxy-5α-Pregnan-11,20-dion (Alphaxolon) als positiver GABA<sub>A</sub> Modulator identifiziert. Bei nachfolgenden Untersuchungen konnte auch bei den endogenen Progesteronderivate 3α-Hydroxy-5α-Pregnan-20-on (Allopregnanolon, 3α-5α THP) und dem Desoxycorticosteronmetabolit 3α,21-Dihydroxy-5α-pregnan-20-on (Tetrahydrodesoxycorticosteron 3α,5α-THDOC) ein Interaktion mit dem GABA<sub>A</sub>Rezeptor festgestellt werden (Peters *et al.*, 1988). Neben endogenen Stoffen zählen auch die synthetischen Derivate Alphaxolon, Ganoxolon, und 3,5-17-Phenylandrosteron-16-en-3-ol (17PA) zu den Neurosteroiden (vgl. abbildung 12 A). Sie modulieren sowohl extrasynaptische als auch synaptische GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, eine Untereinheitenspezifität konnte nicht festgestellt werden (Hosie *et al.*, 2006).

*In-vitro* Untersuchungen zeigten, dass bei Konzentration, die größer sind als für den maximalen modulatorischen Effekt notwendig, der GABA<sub>A</sub> Rezeptor direkt aktiviert wird (Peters *et al.*, 1988). Wie die Barbiturate verlängern die Neurosteroid die Dauer des geöffneten Zustands des Kanals. Außerdem erhöhen Neurosteroid die Öffnungsfrequenz des Kanals, analog zu den BZD.

Neurosteroid besitzt je eine Bindungsstelle für die potenzierenden und die direkt aktivierende Wirkung am GABA<sub>A</sub> Rezeptor. Erstere befindet sich in einer grubenartigen Region der transmembranären Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit, letzere zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (vgl. Abbildung 13 B). Für die direkte Aktivierung müssen diese beiden Bindungsstellen besetzt sein (Hosie *et al.*, 2007).

Neurosteroid wirken sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen ausgeprägt antikonvulsiv. Eine Alphaxolon-Alphadon Kombination oder Ganaxolon wurde erfolgreich zur Therapie epileptischer Anfälle verabreicht. Man beobachtet einen Zusammenhang zwischen der Anfallshäufigkeit und der Progesteronkonzentration bei Frauen, die unter katamenialer Epilepsie leiden. Zum Zeitpunkt der Ovulation (Progesteronkonzentration erhöht) treten weniger Anfälle auf als während der Menstruation (Progesteronkonzentration erniedrigt). Neurosteroid wirken in diesem Fall als endogene Antikonvulsiva (Lambert *et al.*, 1995).

Schon in geringen Konzentrationen wirken Neurosteroid im Tiermodell anxiolytisch, außerdem verstärken sie die Wirkung von BZD. Das neuroaktive Steroid Co26749 wurde für die klinische Prüfung als neues Anxiolytikum ausgewählt (Gasior *et al.*, 1999).

Eine Alphaxolon-Alphadon-Kombination wird als intravenöses Anästhetikum in die klinisch angewendet. Trotz der großen therapeutischen Breite und des vorteilhaften pharmakologischen Wirkprofils wurde die Kombination nach einer Reihe von allergischen Reaktionen (die später auf den Lösungsvermittler zurückgeführt wurden) vom Markt genommen (Lambert *et al.*, 1995).

Die Anwendung von Neurosteroiden bei Migräne, Drogenentzugssymptomatik und Schlafstörungen wird diskutiert, bedarf aber noch weiterer Untersuchungen (Gasior *et al.*, 1999).

#### 4.6.3.3 Ethanol

Ethanol interagiert im ZNS spezifisch mit membrangebundenen Proteinen, vor allem mit LGICs und spannungsabhängigen Ionenkanälen. GABA induzierte Ionenströme am GABA<sub>A</sub> Rezeptor werden durch Ethanol potenziert. Unter den LGICs scheint der GABA<sub>A</sub> Rezeptor eine zentrale Rolle bei der Vermittlung neurodepressiver Effekte von Ethanol einzunehmen (Harris, 1999). Niedrige Ethanolkonzentrationen (< 20mM) am GABA<sub>A</sub> Rezeptor bedingen unter Alkoholeinfluss auftretende Motorikstörungen und Sedierung, hohe Konzentrationen (100-400mM) die anästhetische Wirkung (Johnston, 1996a).

Man beobachtet auch einen Zusammenhang zwischen genetischen determinierten Ausprägungen des GABAergen Systems und der Ethanolmodulation. Dies wird als vererbliche Prädisposition für Alkoholismus diskutiert (Buck *et al.*, 1999).

Neben Ethanol zeigen andere Alkohole analoge Effekte am GABA<sub>A</sub> Rezeptor, z. B. Methanol, Butanol, Hexanol, Octanol, Decanol und Dodecanol (vgl. Abbildung 12 C). Ethanol moduliert alle bislang untersuchten Rezeptorsubtypen Untereinheiten, der  $\alpha_4\beta_1\delta$  Rezeptor weist interessanterweise eine erhöhte Ethanolsensitivität auf (Davies, 2003). Durch Modulation der  $\delta$  Rezeptoren, die vor allem extrasynaptisch zu finden sind, verstärkt Ethanol schon in geringen Konzentrationen (10mM) die tonische Inhibition (Santhakumar *et al.*, 2007).

Die Theorien zur Relevanz von  $\gamma_{2L}$  Untereinheiten für die Ethanolwirkung divergieren stark. Eine Hypothese besagt, dass Ethanol intrazellulär die PKC Aktivität, und somit die Phosphorylierung des GABA<sub>A</sub> Rezeptor, moduliert. Die  $\gamma_{2L}$  Untereinheit besitzt eine PKC-Phosphorylierungsstelle und wird als essentiell für die Ethanolmodulation bei niedrigen Konzentrationen angeführt (Johnston, 1996a). Andererseits weisen  $\gamma_{2L}$  Knockout Mäuse kein verändertes Ansprechen auf Ethanol auf (Davies, 2003).

Die Potenzierung des Cl<sup>-</sup>Stroms durch Ethanol kommt durch Verlängerung der Öffnungszeit und Erhöhung der Öffnungsfrequenz des Cl<sup>-</sup>-Kanals zustande. Zudem wird die Zeit verkürzt, in der sich der Kanal im geschlossenen Zustand befindet (Davies, 2003).

Am GABA<sub>A</sub> Rezeptor konnte eine Ethanolbindungsstelle identifiziert werden. Ethanol bindet an eine 45 AS große Region, die sich zwischen M2 und M3 befindet. Innerhalb dieser Region erweisen sich die AS Reste  $\alpha_1S$  270 und  $\alpha_1A291$  als essentiell für die Ethanolbindung (vgl. Abbildung 13 C). Inhalative Anästhetika binden vermutlich an derselben Stelle (Mihic *et al.*, 1997).

Chronischer Alkoholkonsum führt zu globalen Änderungen im ZNS und der neuronalen Exzitabilität. Bei fortwährender Ethanolexposition kommt zu einer verminderten Konzentration an  $\alpha_1$  mRNA und  $\alpha_1$  Proteinen, und in bestimmten ZNS Regionen (z.B: Cortex cerebri) zu einer Erhöhung der  $\alpha_4$  mRNA und  $\alpha_4$  Proteinkonzentration (Devaud *et al.*, 1997). Weiters erfolgt eine Toleranzentwicklung hinsichtlich der Ethanol- und aber auch BZD –Sensibilität. Bei Knockout Experimenten konnte bei  $\delta_{(-/-)}$  Mäusen ein verändertes Ansprechen auf Ethanol festgestellt werden (Matthews *et al.*, 1998).

#### 4.6.3.4 Benzodiazepine und Benzodiazepin-Analoga

Die BZD zählen zu den meistverschriebenen Arzneistoffen und werden als Anxiolytika, Hypnotika, Anticonvulsiva, Muskelrelaxantien und zur Narkoseeinleitung verabreicht.

BZD bestehen aus einem siebengliedrigen Ring, der an einen Aromatischen Ring anneliert ist. Vier Reste außerhalb dieses Ringsystems können modifiziert werden, ohne dass die agonistischen Eigenschaften verloren gehen (vgl. Abbildung 12 B) (Rang *et al.*, 2007).

Eine Übersicht über die am häufigsten klinisch angewendeten BZD, ihre pharmakokinetische Eigenschaften und das Anwendungsgebiet ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Zolpidem und Zopiclon unterscheiden sich strukturell von den Benzodiazepinen, besitzen aber dieselbe Bindungsstelle und analoge pharmakologische Eigenschaften. Die pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen BZD sind im Allgemeinen sehr ähnlich. Das Anwendungsgebiet ist vor allem von pharmakokinetischen Parametern abhängig. BZD führen *in vivo* zu folgenden Effekten:

- Anxiolyse und Reduktion von aggressivem Verhalten
- Sedierung, Schlafinduktion
- Muskelrelaxation und Beeinträchtigung der motorischen Funktionen
- Unterdrückung/Minderung von Krämpfen (antiepileptisch)
- Anterograde Amnesie

BZD besitzen eine große therapeutische Breite, Überdosierungen sind daher bei Monotherapie ungefährlich. Nachteilig ist, dass die BZD nach Verabreichung alle oben genannten Effekte zeigen, auch wenn nur eine (z.B. Sedierung) erwünscht ist. Zudem führt die Einnahme von BZD zu einer „hangover-Symptomatik“ beim Abfallen der Wirkung, Wechselwirkungen in Kombination mit Alkohol und bei Dauereinnahme zu Abhängigkeitserscheinungen und Toleranzentwicklung (Rang *et al.*, 2007).

ARZNEI-STOFF	t <sub>1/2</sub> PRO-DRUG (h)	AKTIVER METABOLIT	t <sub>1/2</sub> AKTIVER METABOLIT (h)	WIRKDAUER	ANWENDUNG
Triazolam, Midazolam	2-4	Hydroxyliertes Derivat	2	Ultrakurz (< 6 h)	Hypnotikum, Midazolam auch als i.v. Anästhetikum
Zolpidem	2	-	-	Ultrakurz (~ 4 h)	Hypnotikum
Lorazepam, Oxazepam, Temazepam, Lormetazepam	8 - 12	-	-	Kurz (12-18 h)	Anxiolytikum, Hypnotikum
Alprazolam	6 - 12	Hydroxyliertes Derivat	6	Mittel (24 h)	Anxiolytikum
Nitrazepam	16-40	-	-	Mittel	Hypnotikum, Anxiolytikum
Diazepam, Chlordiazepoxide	20-40	Nordazepam	60	Lang (24-48 h)	Anxiolytikum, Muskelrelaxans, Diazepam i.v. als Antikonvulsivum
Flurazepam	1	Desmethylflurazepam	60	Lang	Anxiolytikum
Clonazepam	50	-	-	Lang	Anticonvulsivum, Anxiolytikum

**Tabelle 3 Charakteristika klinisch angewendeter Benzodiazepine**

BZD binden an die BZD Bindungsstelle und potenzieren GABA induzierte Cl<sup>-</sup> - Ströme durch allosterische Modulation des Rezeptors. Sie erhöhen die Affinität des Rezeptors für GABA und vice versa (Hevers *et al.*, 1998). Durch die Affinitätserhöhung für GABA ergibt sich eine erhöhte Kanalöffnungsfrequenz, die Kanalleitfähigkeit und die mittlere Kanalöffnungszeit werden jedoch von BZD nicht beeinflusst (Mohler *et al.*, 2002). Die Beziehung zwischen Untereinheitszusammensetzung und Sensitivität des Rezeptors für BZD wird in Kapitel 4.2.4 erläutert.

Die BZD Bindungsstelle wird als sehr komplex beschrieben. Nicht nur Liganden mit Benzodiazepin-Struktur können an ihr binden, sondern auch β-Carboline, Imidazopridine, Triazolopyridine oder Cyclopyrrolone (Sigel *et al.*, 1997).

Über die BZD-Bindungsstelle kann der Cl<sup>-</sup> - Strom, je nach Ligand, sowohl positiv als auch negativ allosterisch moduliert werden.

Ein Beispiel für einen neutralen allosterischen Modulator an der BZD-Bindungsstelle ist Flumazenil. Es hebt BZD-induzierte Effekte durch Competition an der Bindungsstelle auf. Ein negativer allosterischer Modulator am GABA<sub>A</sub> Rezeptor ist Ro19-4603. Beide Substanzen haben mit den klinisch angewendeten BZD den Grundkörper gemein und unterscheiden sich lediglich durch die extrazyklischen Substituenten. Dennoch besitzen sie gegensätzliche pharmakologische Eigenschaften (vgl. Abbildung 12 B). Ein punktmutierter Rezeptor ( $\gamma_2$ T142S) wird von Flumazenil positiv und von z.B. Diazepam verstärkt positiv moduliert (Johnston, 1996a).

Die BZD Bindungsstelle liegt zwischen der  $\alpha$  und der  $\gamma_2$  Untereinheit. Einige an der Bindungstasche beteiligte AS sind bekannt, dazu zählen unter anderem:  $\alpha_1$ H101,  $\alpha_1$ Y159,  $\alpha_1$ T206,  $\alpha_1$ Y209,  $\gamma_2$ F77,  $\gamma_2$ M130. Diese sechs Aminosäurereste beeinflussen die Bindungsaffinität zu BZD in großem Ausmaß, eine Änderung bewirkt eine Abnahme der Affinität auf ein Zehntel des Ausgangswerts. Sie befinden sich in fünf verschiedenen Arealen des Proteinkomplexes und weisen eine räumliche Nahbeziehung auf (Sigel *et al.*, 1997).

#### **4.6.3.5 Inhalations- und Injektionsanästhetika**

Neben einzelnen Substanzen aus bereits erwähnten Arzneistoffklassen (Steroide, Barbiturate, BZD) die klinisch als Anästhetika verabreicht werden, kommen noch weitere chemisch verschiedene Substanzen für diese Anwendung zum Einsatz.

Als Wirkmechanismus der Inhalationsanästhetika und Injektionsanästhetika wurde eine, durch die geringe Molekülgröße und hohe Lipidlöslichkeit der Substanzen bedingte, unspezifische Interaktion mit Plasmaproteinen diskutiert. Für diese so genannte Lipidtheorie spricht, dass die Potenz des Anästhetikums mit seiner Lipidlöslichkeit zunimmt, dagegen spricht dass Enantiomere mit gleicher Lipidlöslichkeit nicht narkotisch wirken. Heutzutage geht man davon aus, dass Inhalationsanästhetika und Injektionsanästhetika die Leitfähigkeit von Ionenkanälen spezifisch modulieren, besonders die des GABA<sub>A</sub> Rezeptors (Rang *et al.*, 2007).

Zu den inhalativen Anästhetika zählen Isofluran, Enfluran und Halothan. Ursprünglich ging man davon aus, dass inhalative Anästhetika aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit durch Einlagerung in die Membran und physikalische Veränderungen derselben sowie unspezifische Interaktion mit Ionenkanälen wirksam sind (Rang *et al.*, 2007).

Inhalationsanästhetika potenzieren einerseits GABA induzierte Cl<sup>-</sup> - Ströme, andererseits aktivieren sie den GABA<sub>A</sub> Rezeptor direkt, sofern die Konzentration am Rezeptor

entsprechend hoch ist. Die Bindungsstelle für Inhalationsanästhetika stimmt mit der Ethanolbindungsstelle überein, und befindet sich zwischen M2 und M3. In dieser 45 AS großen Region sind die AS Reste  $\alpha_1$ S 270 und  $\alpha_1$ A291 essentiell für eine ausreichend große Affinität der inhalativen Anästhetika zum GABA<sub>A</sub> Rezeptor. Außerdem wurden in der Bindungstasche die Aminosäurenreste  $\alpha_1$ L232,  $\alpha_1$  Y411,  $\alpha_1$  T414 und  $\alpha_1$  Y415 als essentiell für die Bindung identifiziert (Mihic *et al.*, 1997). Zu den Injektionsanästhetika zählen Thiopental (Barbiturat), Metohexital (Barbiturat), Propofol, Etomidat und Ketamin (NMDA-Antagonist). In der  $\beta_2$  und  $\beta_3$  Untereinheit des GABA<sub>A</sub> Rezeptors ist N265 essentiell hinsichtlich der Modulation durch Etomidat. Die  $\beta_1$  Untereinheit, mit einem Serin an der korrespondierenden Stelle wird nicht von Etomidat moduliert (Campagna-Slater *et al.*, 2007). In der  $\beta_2$  Unterheit ist M286 essentiell für eine ersichtliche Modulation durch Propofol. Man geht davon aus, dass Etomidat und Propofol unterschiedliche Bindungsstellen am Rezeptor haben (Campagna-Slater *et al.*, 2007).

#### **4.6.3.6 Loreclezol**

Loreclezol ist ein Breitband-Antiepileptikum und weist ein ähnliches pharmakologisches Wirkprofil auf wie als Antikonvulsiva verabreichte Barbiturate oder BZD. Im Unterschied zu den beiden letztgenannten Antiepileptikagruppen zeigt Loreclezol keine hypnotische (Neben-)Wirkung (Sanna *et al.*, 1996). Loreclezol ist ein positiver allosterischer Modulator des GABA<sub>A</sub> Rezeptors, bezüglich der Untereinheitenspezifität und der Pharmakokinetik *in vitro* weist Loreclezol Ähnlichkeiten mit Etomidat auf (Siegwart *et al.*, 2002). Loreclezol potenziert in geringen Konzentrationen GABA induzierte Cl<sup>-</sup> Ströme und aktiviert in höheren Konzentrationen den Rezeptor direkt. Außerdem ist es  $\beta$ -Untereinheiten selektiv, das heißt nur Rezeptoren die  $\beta_2$  oder  $\beta_3$  enthalten, nicht Rezeptoren mit  $\beta_1$ , werden moduliert (Siegwart *et al.*, 2002).

## C. Praktischer Teil

### 5. Material und Methoden

Diese Arbeit untersucht die Modulation GABA induzierter Ionenströme ( $I_{\text{GABA}}$ ) durch eine Substanz biogenen Ursprungs. In *Xenopus laevis* Oozyten wurden GABA<sub>A</sub> Rezeptoren heterolog exprimiert, anschließend erfolgt die Inkubation mit GABA und der Testlösung (SG-C 1). Zur Bestimmung der elektrophysiologischen Parameter (Ionenströme) stehen verschiedene Testsysteme zur Verfügung. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik verwendet.

#### 5.1 Verwendete Lösungen

Zur Präparation der Oozyten wurde OR 2 (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES; pH = 7,5 (1M NaOH) verwendet (Bianchi *et al.*, 2006).

Als Standardlösung zur Verdünnung und als physiologisches Medium für die Oozyten wurde ND 96 verwendet (90mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES; pH = 7,4 (1M NaOH). Die Mikroelektroden wurden mit 2M KCl befüllt (Bianchi *et al.*, 2006). Von der zu untersuchenden Substanz SG-C 1 (Reinsubstanz) wurde eine Stammlösung (in 100% DMSO) hergestellt (Konzentration 100 mM). Anschließend wurde diese Stammösung mit ND 96 verdünnt, um Konzentrationen von 1µM – 100 µM (1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM) zu erhalten. Dimethylsulfonoxid (DMSO) war in allen Lösungen in einer Maximalkonzentration von 0,3 % enthalten (Bianchi *et al.*, 2006). Die GABA-Lösung (in ND 96) wurde ebenfalls an jedem Versuchstag frisch bereitet (Konzentration 1mM), und mit ND 96 auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Die Testlösungen wurden nach Abschluss der Messungen an einem Tag verworfen.

#### 5.2 Oozytenpräparation

*Xenopus laevis* Weibchen (NASCO, USA) wurden für circa 30 Minuten einer 0,2 %igen Lösung von MS-222 (Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobezoesäureethylesters, Sandoz, Germany) ausgesetzt um sie zu anästhesieren. Danach wurden die Oozyten mit umgebendem Follikelgewebe operativ entnommen, und in eine Petrischale mit OR2-Lösung transferiert.

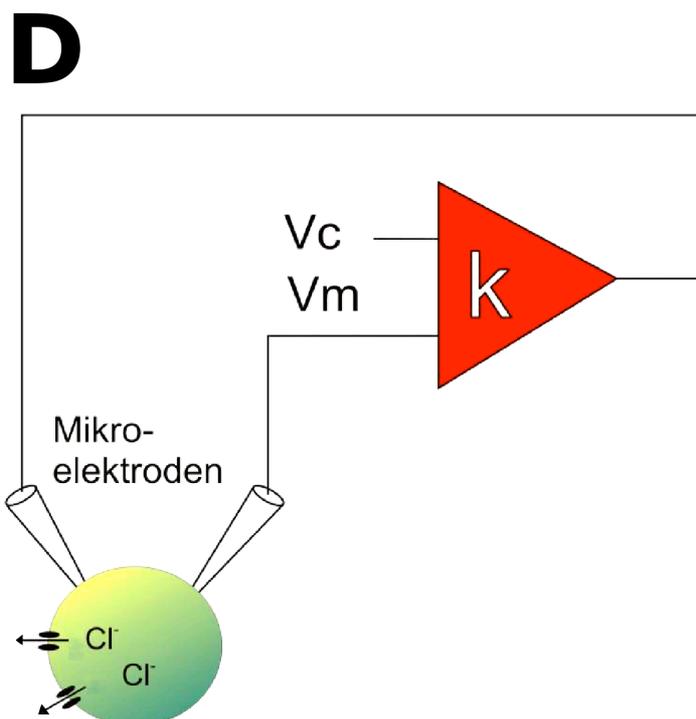
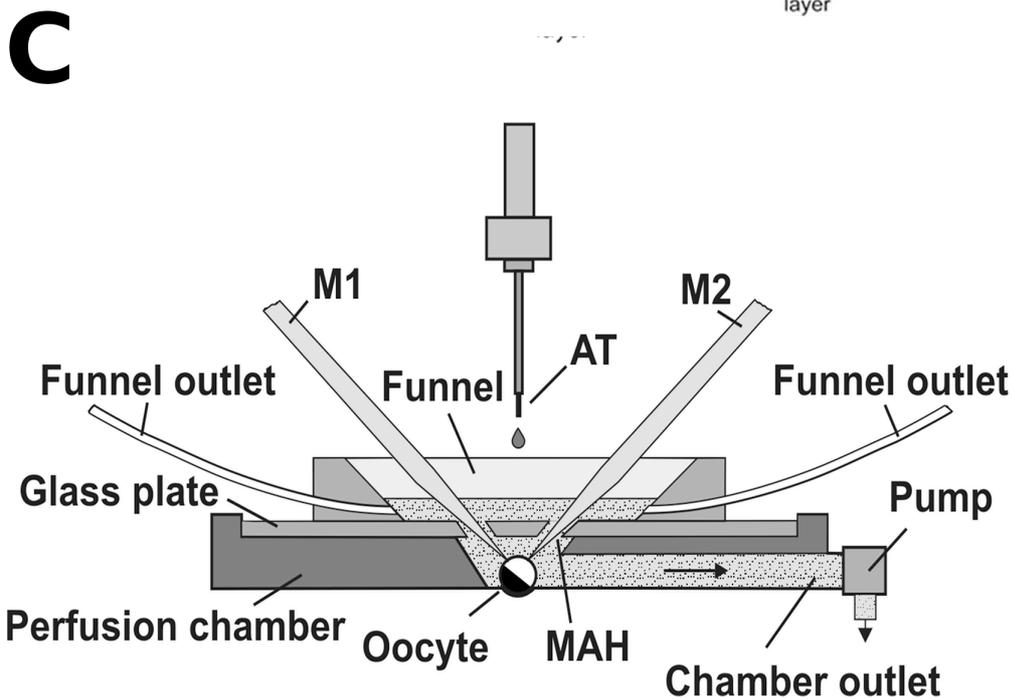
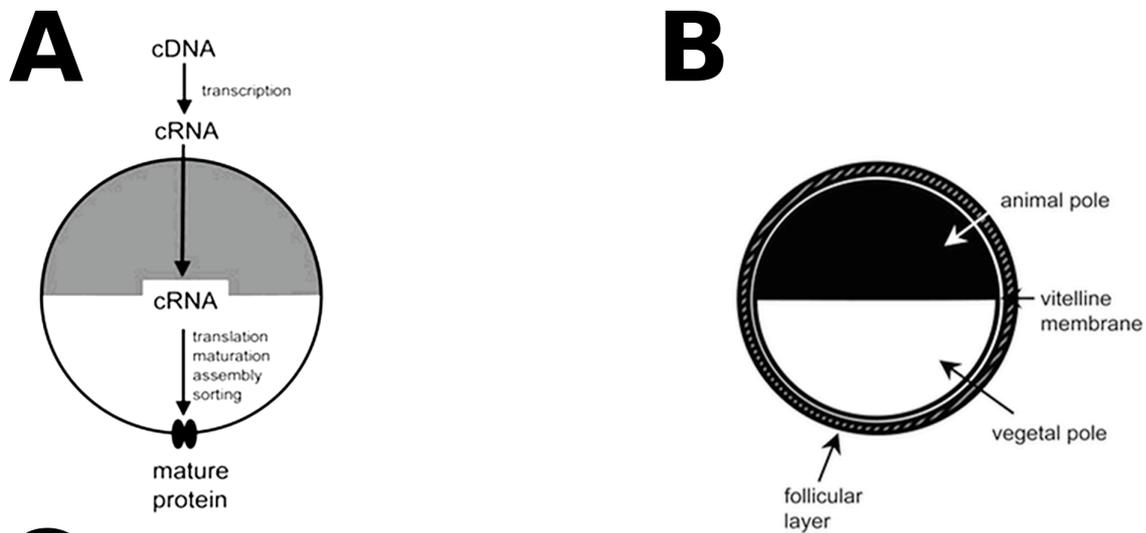
Nach mechanischer Zerkleinerung des gewonnen Follikelgewebes wurde eine Collagenase-Lösung (Collagenase Sigma Typ IA 2mg/ml in OR2) zugesetzt und für 90 Minuten bei 18 °C inkubiert (Bianchi *et al.*, 2006).

Nach dieser enzymatischen Behandlung lagen die Oozyten größtenteils ohne umgebendes Follikelgewebe, einzeln vor. Ein gründliches Auswaschen der Collagenase-Lösung mit OR2-Lösung war von großer Wichtigkeit, da in der später zugefügten ND96-Lösung enthaltenes Calcium nachträglich zu einer Aktivierung von Proteasen führen kann, was für die Zelle schädlich ist (Bianchi *et al.*, 2006; Bossi *et al.*, 2007).

Anschließend wurden die Oozyten in eine Petrischale mit ND96-Lösung überführt und einige Stunden bei 18°C inkubiert. Die besten Oozyten (Stadium IV-V) mit einem Durchmesser von 1000 – 1200 µm wurden nach äußerlichen Kriterien mit einer Pasteurpipette selektiert und weiterverwendet (Bianchi *et al.*, 2006; Bossi *et al.*, 2007; Gurdon *et al.*, 1971).

### **5.3 Injektion der cRNA**

Durch Klonierung (pCMV Vektor) linearisierter Poly(A<sup>+</sup>)cRNA Transkripte der jeweiligen GABA<sub>A</sub> Rezeptor Untereinheit wurde die notwendige Menge an cRNA hergestellt und anschließend in DEPC(Diethylpyrocarbonat)-Wasser gelöst (Bianchi *et al.*, 2006). Kurz vor der Injektion wurden die, den benötigten GABA<sub>A</sub>Rezeptor Untereinheiten entsprechenden cRNA-Lösungen in einem bestimmten Verhältnis gemischt: 1:1:10 bei  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ , 1:1 bei  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_3$  und  $\alpha_1\beta_{2S265N}$  beziehungsweise 3:1 bei  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_1\beta_{1S290N}$ , um die Expression von  $\beta_1$ -Homooligomeren zu vermeiden (Boileau *et al.*, 2002a; Krishek *et al.*, 1996b). 10 – 50 nl der erhaltenen Lösung wurden mithilfe einer pneumatischen Injektionsvorrichtung mit einer Glaskapillare in die Oozyten injiziert. Eine erfolgreiche Injektion konnte durch eine sichtbare volumsmäßige Größenzunahme verifiziert werden. Nach erfolgreicher Injektion wurden die Oozyten mindestens 24 Stunden in ND96-Lösung (Penicillin 100U/ml und Streptomycin 100µg/ml) inkubiert. Intakte Oozyten konnten nun zur Messung verwendet werden.



#### Abbildung 14 Methoden

**A** Schematische Darstellung der Expression eines exogenen Proteins in einem *Xenopus* Oozyten (Bianchi *et al.*, 2006)

**B** Stadium V oder VI Oozyt. Wenn das Follikelgewebe mit Collagenase-Lösung behandelt wird, setzt es einzelne Oozyten frei (Baburin *et al.*, 2006).

**C** Perfusionskammer. Die Erklärung zur Abbildung ist dem Text zu entnehmen

**D** Schematische Darstellung des Messprinzips (aus Praktikumsheft Pharmakologie, Institut für Pharmakologie, Universität Wien)

#### **5.4 Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik**

Die Messungen wurden mit einem modifizierten schnellen Perfusionssystem (nach Baburin *et al.*, 2006)) durchgeführt. In Abb. 14 C ist verwendete die Oozyten-Perfusionskammer schematisch dargestellt. Der Oozyt (oocyte) liegt auf einer zylindrischen Halterung. Die Applikation der Lösungen erfolgt von oben (application tube AT), gesteuert von einem Roboter (TECAN Miniprep 60), in einen Trichter aus Quartz (funnel), der die Mikroelektroden (M1 und M2) umschließt und auf die Oozytenkammer aufgesetzt ist. Durch Öffnungen (microelectrode access holes MAH) in der Deckplatte (glass plate) gelangen die Mikroelektroden zum Oozyten. Die Mikroelektroden werden manuell in den Oozyten eingeführt. Applizierte Volumina werden durch eine Pumpe (pump) des Miniprep 60, die mit einem Ausgang der Kammer (chamber outlet) verbunden ist, entfernt und somit die Perfusion ermöglicht. Eventuelle Restvolumina werden durch am Trichter befestigte Abflüsse (funnel outlet) abgesaugt.

#### **5.5 Messprinzip**

Bei der Applikation einer den LGIC aktivierenden Substanz kommt es zu einer Öffnung des Kanals und einem selektiven Ionenstrom. Dieser Ionenstrom folgt einem elektrochemischen Gradienten. Das Prinzip dieser Technik ist ein konstant gehaltenes Membranpotential (-70 mV), das die Messung transmembranärer Ionenströme ermöglicht. Cl<sup>-</sup>Ionen strömen aus dem Oozyten, es kommt zur intrazellulären Potentialänderung (Baburin *et al.*, 2006).

Der Versuchsaufbau besteht aus zwei in den Oozyten insertierten Mikroelektroden, wobei eine Elektrode („potential electrode“) das membranäre Potential misst und die zweite Elektrode („current electrode“) Strom in die Oozyte injiziert. Zwischengeschaltet ist ein Rückkopplungsverstärker (TURBO TEC Amplifier), der die Differenz zwischen Haltepotential und tatsächlichem Potential misst. Der Verstärker injiziert über die „current electrode“ die Menge an Strom in den Oozyten, die nötig ist um das Haltepotential zu erreichen. Diese Menge wiederum entspricht dem von der Oozytenmembran generierten Ionenstrom und wird gemessen (Baburin *et al.*, 2006).

#### **5.6 Arbeitsprotokoll**

GABA-Konzentrationen, die 5-10 % der maximalen Stimulation hervorrufen, wurden alleine oder in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen (1 – 100 µM) von SG-C appliziert. Nach 20 Sekunden wurde die applizierte Lösung mit ND96-Lösung ausgewaschen („wash-out“). Es folgte eine Waschphase, abhängig von der vorher applizierten Konzentration an SG-C (1µM – 2 Min., 3µM – 2 Min., 10 µM – 8. Min, 30 µM – 15 Min, 100 µM – 25 Min).

## 5.7 Software

Der Roboter wurde durch das Programm ROBOSOFT gesteuert. Die Aufzeichnung der Ionenströme erfolgte mit pCLAMP v.9.2.

## 5.8 Auswertung

Die Potenzierung des Cl<sup>-</sup>-Stroms durch SG-C 1 wurde bei GABA Konzentrationen gemessen, die 5-10 % der maximalen induzierbaren Amplitude entsprachen. Diese Konzentration wurde am Anfang des Experiments ermittelt und wird nachfolgend als Kontrollstrom bezeichnet. Da die Injektion nicht vollautomatisiert ablief, ergab sich eine gewisse Schwankungsbreite hinsichtlich der Injektionsmenge von cRNA je Oozyt, woraus eine Variabilität bei der Menge an exprimierten Membranproteinen (GABA<sub>A</sub>Rezeptoren) resultierte. Unter anderem aus diesem Grund waren verschiedene Konzentrationen für das Erreichen der, am Beginn jedes Experiments ermittelten, EC<sub>5-10</sub> nötig.

Die Potenzierung durch SG-C 1 wurde berechnet als Stimulation =  $[(I_{\text{GABA+SGC}}/I_{\text{GABA}}) - 1] \times 100\%$ , wobei  $I_{\text{GABA+SGC}}$  den durch SG-C1 ko-appliziert mit GABA hervorgerufenen Strom, und  $I_{\text{GABA}}$  den GABA Kontrollstrom (EC<sub>5-10</sub>) bezeichnet. EC<sub>50</sub> ist die Konzentration von GABA bzw. SG-C1, die den halbmaximalen Effekt/Amplitude hervorruft,  $n_H$  ist der Hill Koeffizient.

Die Dosis-Wirkungskurven wurden mit der Software ORIGIN erstellt.

## 6. Problemstellung

Im ZNS herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission. Die inhibitorische Neurotransmission wird vorwiegend durch GABAerge Neuronen vermittelt. Störungen im GABAergen System führen zu neurologischen Erkrankungen wie z.B. Angststörungen, Epilepsie, Schizophrenie und Schlafstörungen. Der GABA<sub>A</sub> Rezeptor ist demnach ein wichtiges molekulares Target für Arzneistoffe zur Behandlung dieser Erkrankungen. Die Untereinheitenkombination des GABA<sub>A</sub> Rezeptors bestimmt seine pharmakologischen Eigenschaften.

Am *Institut für Pharmakologie und Toxikologie* der *Universität Wien* wird die Interaktion von Naturstoffen mit GABA<sub>A</sub> Rezeptoren erforscht. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Diplomarbeit hatte folgende Zielsetzungen:

1. Erlernung der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Messung von Ionenströmen mithilfe eines schnellen automatischen Perfusionssystem
2. Expression von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten und Messung von  $I_{\text{GABA}}$

3. Untersuchung der konzentrationsabhängigen Interaktion eines Naturstoffs (SG-C 1) mit GABA<sub>A</sub> Rezeptoren ( $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Subtyp) unter Verwendung der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik in einem schnellen automatischen Perfusionssystem, Ermittlung von EC<sub>50</sub>, Hill Koeffizient;
4. Untersuchung einer möglichen Untereinheitenspezifität (Abhängigkeit der Modulation von I<sub>GABA</sub> durch SG-C 1 vom Vorhandensein einer bestimmten  $\beta$ -Untereinheit)
5. Untersuchung des Effekts von Mutationen in der  $\beta$ -Untereinheit auf die Modulation von I<sub>GABA</sub> durch SG-C 1
6. Untersuchung der direkten Aktivierung des Cl<sup>-</sup>-Kanals durch SG-C 1

## 7. Ergebnisse

### 7.1 GABA Dosiswirkungskurve

In *Xenopus* Oozyten wurden  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  GABA<sub>A</sub> Rezeptoren exprimiert. Verschiedene Konzentrationen von GABA wurden appliziert (1  $\mu$ M - 1 mM) und die Amplituden der induzierten Cl<sup>-</sup>-Ströme analysiert. Wie auf Abbildung 15 A gezeigt lag der EC<sub>50</sub> Wert bei  $49,93 \pm 3,5 \mu$ M (n $\geq$ 2). In Abbildung 15 B sind typische GABA induzierte Ströme bei verschiedenen Konzentrationen gezeigt. Weiters wurde auch die EC<sub>5</sub> (ca. 5 $\mu$ M) bestimmt. Diese Konzentration sollte bei den folgenden Experimenten zur Normalisierung der Daten verwendet werden und wird in Folge immer als Kontrollstrom bezeichnet. Der n<sub>H</sub> Wert liegt bei  $1,36 \pm 0,24$ (n $\geq$ 2).

### 7.2 SG-C 1

Ziel dieser Diplomarbeit war, die Untersuchung der Modulation von I<sub>GABA</sub> durch den Naturstoff SG-C 1. Dafür wurden unterschiedliche GABA<sub>A</sub> Rezeptorsubtypen in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Modulation von I<sub>GABA</sub> mithilfe der Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik analysiert. In Abbildung 15 A sind die Dosis-Wirkungskurven aller untersuchten Untereinheitenkombination dargestellt, in Tabelle 4 findet man die entsprechenden ermittelten Parameter (EC<sub>50</sub>, Maximale Stimulation, Hill-Koeffizient) und eine Angabe zur jeweiligen Anzahl der durchgeführten Experimente.

#### 7.2.1 Modulation von I<sub>GABA</sub> durch den Naturstoff SG-C 1

Um festzustellen ob SG-C 1 am GABA<sub>A</sub> Rezeptor Effekte zeigt wurden  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  Untereinheiten exprimiert und die Modulation von I<sub>GABA</sub> in Abhängigkeit der Konzentration von SG-C 1 untersucht. Es konnte ein dosisabhängiger, potenzierender Effekt festgestellt werden. Die EC<sub>50</sub> betrug  $17,5 \pm 0,5 \mu$ M (n $\geq$ 5), die maximale Stimulation von I<sub>GABA</sub> liegt bei  $685,8 \pm 5,0 \%$  und der Hill-Koeffizient n<sub>H</sub> bei  $2,0 \pm 0,1$ . siehe Tabelle 4). In Abbildung 15 A sind typische Ströme aus den Untersuchungen am  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  GABA<sub>A</sub> Rezeptor dargestellt.

### 7.2.2 Abhängigkeit des Effekts von einer $\gamma$ Untereinheit

Um eine Abhängigkeit des Effekts von SG-C 1 vom Vorhandensein einer  $\gamma$  Untereinheit zu analysieren, wurden nun  $\alpha_1\beta_2$  Untereinheiten exprimiert und die Modulation von  $I_{GABA}$  untersucht. In diesen Messungen wurden eine  $EC_{50}$  von  $13,1 \pm 0,7 \mu M$  ( $n \geq 4$ ), eine maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  von  $797,8 \pm 18,5 \%$ , und ein Hill-Koeffizient  $n_H$  bei  $2,9 \pm 0,4$  festgestellt (siehe Tabelle 4). Da die Parameter mit ( $\alpha_1\beta_2$ ) und ohne ( $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ )  $\gamma$  Untereinheit nicht signifikant unterschiedlich waren, konnte in eine  $\gamma$ -Abhängigkeit des Effekts ausgeschlossen werden. In den nachfolgenden Experimenten wurden  $\alpha$   $\beta$  Rezeptoren exprimiert, da die Abwesenheit der  $\gamma$  Untereinheit keinen Einfluss auf die Stimulation durch SG-C 1 gezeigt hat.

### 7.2.3 Abhängigkeit des Effekts von einer $\beta$ Untereinheit

Um eine Abhängigkeit des Effekts von SG-C 1 vom Vorhandensein einer bestimmten  $\beta$  Untereinheit zu analysieren, wurden nun  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_1\beta_3$  Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Modulation von  $I_{GABA}$  untersucht.

Hierbei konnten für die  $\alpha_1\beta_1$  Rezeptorkombination eine  $EC_{50}$  von  $16,5 \pm 1,8 \mu M$  ( $n \geq 4$ ), eine maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  durch SG-C 1 von  $210,4 \pm 4,7 \%$ , und der Hill-Koeffizient  $n_H = 2,1 \pm 0,3$  bestimmt werden (siehe Tabelle 4, Abbildung 16 A, Abbildung 17 A, B).

Für die  $\alpha_1\beta_3$  Rezeptorkombination wurde eine  $EC_{50}$  von  $17,0 \pm 0,2 \mu M$  ( $n \geq 3$ ), eine maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  von  $757,0 \pm 5,0 \%$ , und der Hill-Koeffizient  $n_H = 2,8 \pm 0,01$  bestimmt (siehe Tabelle 4, Abbildung 16 A, Abbildung 17 A, B).

### 7.2.4 Effekt von Mutationen in der $\beta$ -Untereinheit

Da eine  $\beta$  Untereinheiten-Abhängigkeit festgestellt werden konnte, wurden jeweils  $\alpha_1$  und  $\beta_{1S290N}$  und  $\alpha_1$  und  $\beta_{2N265S}$  Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Modulation von  $I_{GABA}$  untersucht. Dabei wurden folgende Parameter ermittelt:

Für  $\alpha_1\beta_{1S290N}$  Rezeptoren lag die  $EC_{50}$  bei  $15,6 \pm 0,7 \mu M$  ( $n \geq 3$ ), die maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  durch SG-C 1 bei  $845,8 \pm 17,6 \%$ , und der Hill-Koeffizient  $n_H = 2,1 \pm 0,3$  bestimmt werden (siehe Tabelle 4, Abbildung 16 A, Abbildung 18 A, B).

Bei  $\alpha_1\beta_{2N265S}$  Rezeptoren betrug die  $EC_{50}$   $16,4 \pm 0,4 \mu M$  ( $n \geq 4$ ), die maximale Stimulation von  $I_{GABA}$  lag bei  $743,5 \pm 8,4 \%$  und der Hill-Koeffizient  $n_H$  bei  $1,9 \pm 0,1$  (siehe Tabelle 4, Abbildung 16 A, Abbildung 18 A, B).

### 7.2.5 Direkte Aktivierung durch SG-C 1

Um eine mögliche direkte Aktivierung des GABA<sub>A</sub> Rezeptors durch SG-C 1 zu untersuchen, wurden  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Induktion von Strömen durch verschiedene Konzentrationen von SG-C 1 in Abwesenheit von GABA untersucht. Interessanterweise induzierte die Substanz ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ( $n \geq 3$ ) sichtbare Ströme. Wie in Abbildung 19 gezeigt, war dieser Effekt dosisabhängig, das Maximum des Effekts wurde bei 100  $\mu\text{M}$  SG-C 1 erreicht. Der maximale Effekt war jedoch nie größer als 10 % des maximalen durch GABA induzierbaren Stroms ( $I_{\text{max}}$ ).

Untereinheiten-kombination	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Maximale Stimulation von I <sub>GABA</sub> (EC <sub>5-10</sub> ) (%)	Hill-Koeffizient (n <sub>H</sub> )	Anzahl (n) der Experimente
$\alpha_1\beta_1$	16.5 ± 1.8	<b>210.4 ± 4.7</b>	2.1 ± 0.3	4
$\alpha_1\beta_2$	13.1 ± 0.7	<b>797.8 ± 18.5</b>	2.9 ± 0.4	4
$\alpha_1\beta_3$	17.0 ± 0.2	<b>757.0 ± 5.0</b>	2.8 ± 0.01	3
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	17.5 ± 0.5	<b>685.8 ± 5.0</b>	2.0 ± 0.01	5
$\alpha_1\beta_{1S290N}$	15.6 ± 0.7	<b>845.8 ± 17.6</b>	3.0 ± 0.2	3
$\alpha_1\beta_{2N265S}$	16.4 ± 0.4	<b>743.5 ± 8.4</b>	1.9 ± 0.1	4

**Tabelle 4 Zusammenfassung der Ergebnisse**

## 8 Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Modulation von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren durch den Naturstoff SG-C 1 untersucht. Dafür wurden verschiedenen GABA<sub>A</sub> Rezeptorsubtypen in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Modulation von I<sub>GABA</sub> mithilfe der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht.

Zuerst wurde der Effekt von SG-C 1 auf I<sub>GABA</sub> durch den häufigsten physiologischen Rezeptorsubtyp ( $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ ) untersucht. Dabei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt, wobei der Schwellenwert bei  $> 3 \mu\text{M}$  lag und ein Maximum bei  $100 \mu\text{M}$  erreichte, das 685,8 % betrug. Um zu untersuchen ob der Effekt von der Anwesenheit einer  $\gamma$  Untereinheit abhängt wurden nun  $\alpha\beta$  Rezeptoren exprimiert. Wie in Abbildung 16 A gezeigt unterschied sich die Modulation von I<sub>GABA</sub> durch  $\alpha\beta\gamma$  und  $\alpha\beta$  Rezeptoren kaum. Daher konnte eine Interaktion der Substanz mit der BZD Bindungsstelle ausgeschlossen werden.

Um Hinweise auf die mögliche Bindungsstelle der Substanz zu erhalten wurden nun verschiedenen Rezeptorsubtypen ( $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_1\beta_3$ ) exprimiert und die Modulation von I<sub>GABA</sub> untersucht. Interessanterweise zeigte SG-C 1 an Rezeptoren aus  $\alpha_1\beta_1$  Untereinheiten einen drastisch reduzierten Maximaleffekt, während die EC<sub>50</sub> sich nicht signifikant von der von  $\alpha_1\beta_{2/3}$  Rezeptoren unterschied.  $\alpha_1\beta_3$  Rezeptoren wurden in vergleichbar Ausmaß wie  $\alpha_1\beta_2$  Rezeptoren moduliert.

Aus der Literatur sind zahlreiche Substanzen bekannt, die ausschließlich Rezeptoren mit  $\beta_2$  und  $\beta_3$  modulieren wie Loreclezol, Etomidat, Propofol (siehe auch Kapitel 4.6.3.5 und Kapitel 4.6.3.6) (Campagna-Slater *et al.*, 2007; Siegwart *et al.*, 2002; Wafford *et al.*, 1994; Wingrove *et al.*, 1994). Dieses pharmakologische Profil (Insensitivität für  $\beta_1$  Rezeptoren und Sensitivität an  $\beta_2$  und  $\beta_3$  Rezeptoren) weist auf eine Interaktion mit der so genannten Loreclezol Bindungsstelle hin.

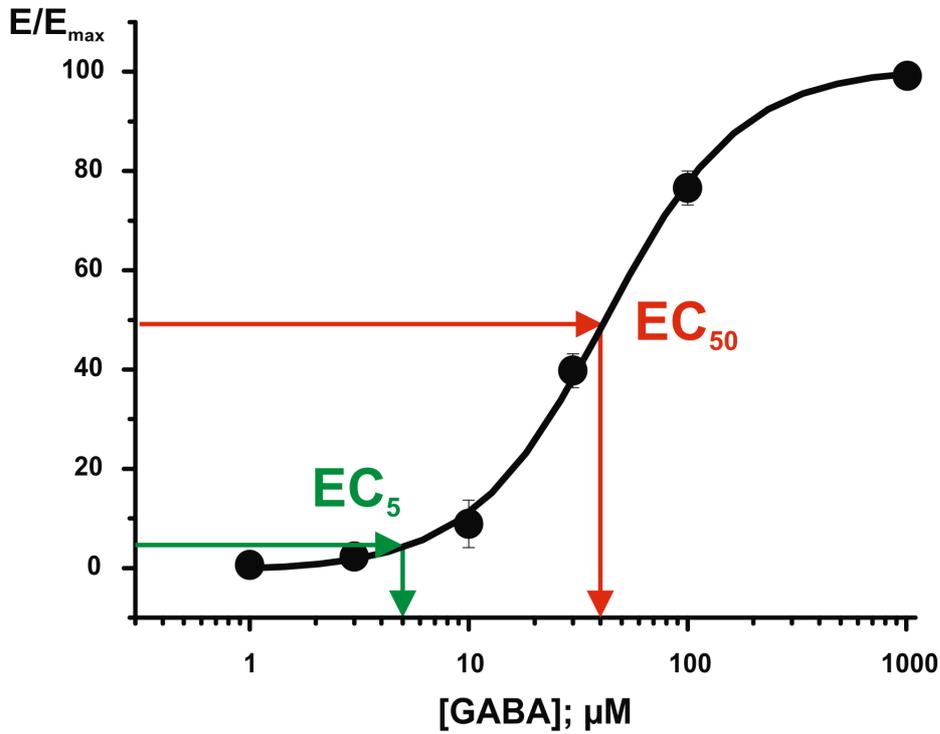
Um diese mögliche Interaktion zu prüfen wurden nun  $\alpha_1\beta_{1S290}$  und  $\alpha_1\beta_{2N265S}$  Rezeptoren exprimiert. Während Einführung der Mutation in der  $\beta_1$  Untereinheit den erwarteten Effekt zeigte, das heißt der resultierende Rezeptor war sensitiv für SG-C 1, zeigte die Mutation der  $\beta_2$  Untereinheit überraschenderweise keinen Effekt. Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise weisen diese Resultate auf eine völlig neue, bislang noch nicht beschriebene Bindungsstelle an GABA<sub>A</sub> Rezeptoren hin. Dies soll in Zukunft untersucht werden.

Eine weitere interessante Eigenschaft von SG-C 1 ist, dass sie auch in Abwesenheit des Agonisten GABA den Kanal direkt aktiviert. Dieses Verhalten findet sich nicht bei BZDs, sehr

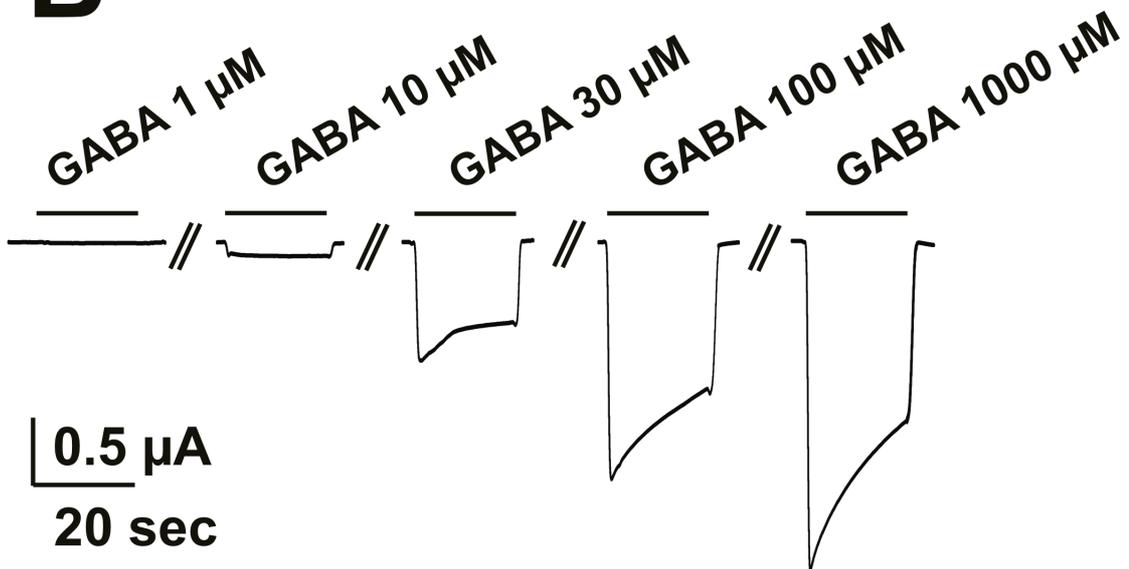
wohl bei Etomidat, Propofol oder Loreclezol (Feng *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 1998; Sanna *et al.*, 1996). Die direkte Aktivierung durch SG-C 1 erreicht zwar nur 10% von  $I_{max}$ , kann jedoch in der praktischen Anwendung durchaus von großer Bedeutung sein, da dieses Verhalten unter Umständen auch die therapeutische Breite reduziert (vgl. Barbiturate).

Von großem Interesse wäre unter anderem auch die Untersuchung einer etwaigen  $\alpha$  Spezifität, um in weiterer Folge Hinweise auf die Bindungsstelle zu erhalten bzw. dieselbe identifizieren zu können. Des Weiteren werden den verschiedenen  $\alpha$  Untereinheiten unterschiedliche therapeutische Effekte zugeschrieben. Durch Experimente könnte erste Vorhersagen für die *in vivo* Effekte der Substanz getroffen werden (Crestani *et al.*, 2001; Low *et al.*, 2000; Mohler, 2006b). Außerdem wäre eine Derivatisierung, wenn möglich, von Interesse, um einerseits eine Blut-Hirnschrankengängigkeit zu erleichtern und andererseits um die Affinität zu erhöhen. Von großer Relevanz wäre weiters die Untersuchung des Effekts der Substanz bei maximalen GABA Konzentrationen, wie sie bei phasischer Neurotransmission in der Synapse vorzufinden sind. Außerdem soll die Modulation von  $I_{GABA}$  über einen weiten GABA Konzentrationsbereich untersucht werden, um den Wirkmechanismus von SG-C 1 zu verstehen. Zusammenfassend wurde ein weiterer Naturstoff als selektiver GABA<sub>A</sub> Rezeptor Ligand identifiziert, der partiell agonistischen Eigenschaften besitzt und mit einer vermutlich unbeschriebene Bindungsstelle interagiert.

# A



# B

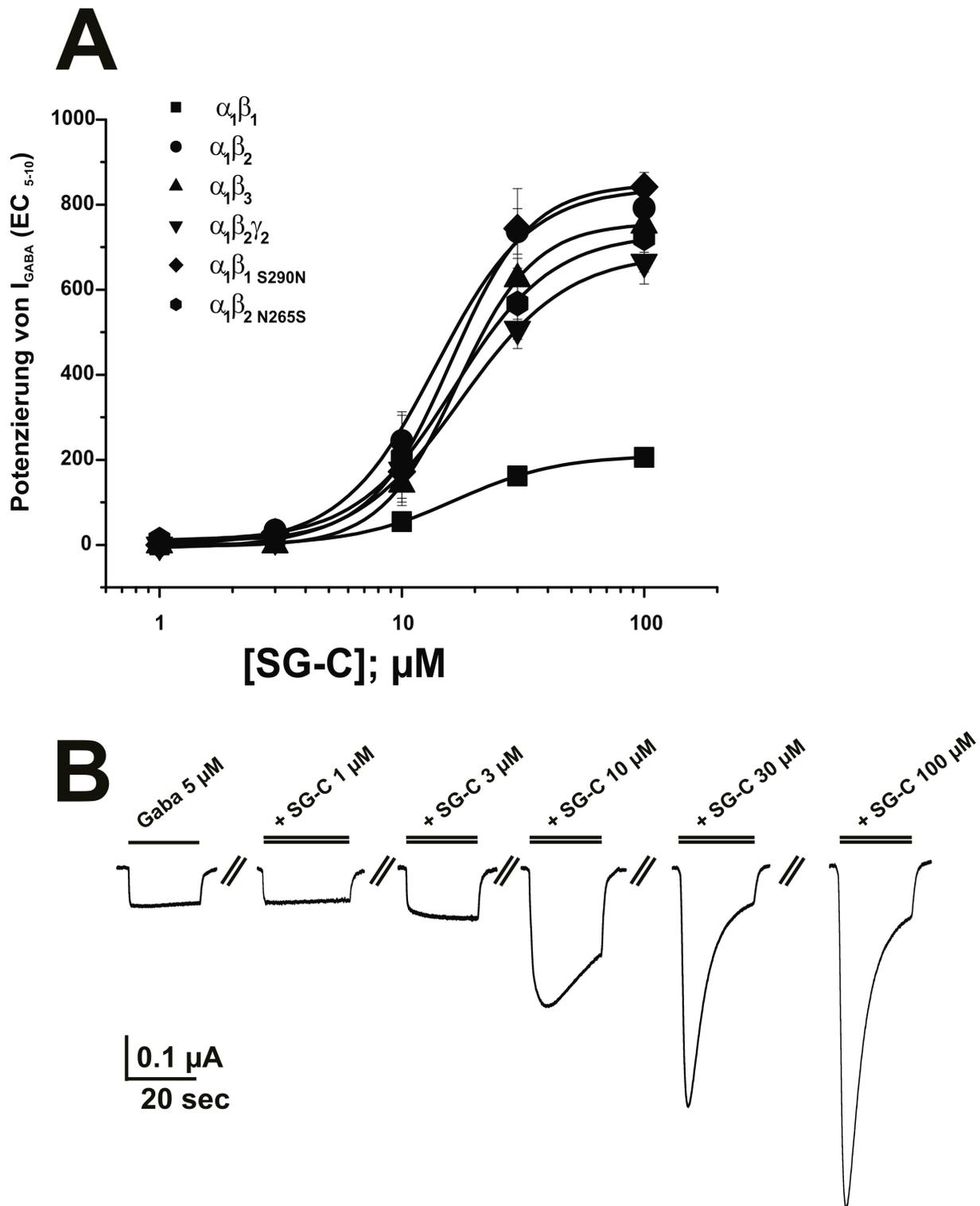


**Abbildung 15 GABA Dosiswirkungskurve**

**A** GABA Dosiswirkungskurve am  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$  GABA<sub>A</sub> Rezeptoren. Die EC 50 (49,95  $\mu\text{M}$ , n=2) ist mit einem roten Pfeil markiert, die EC 5 ist mit einem grünen Pfeil markiert.

**B** Typische GABA induzierte Ströme am  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$  GABA<sub>A</sub> Rezeptor

**Abbildung A und B** in Kooperation mit Aida Hodzic erstellt.

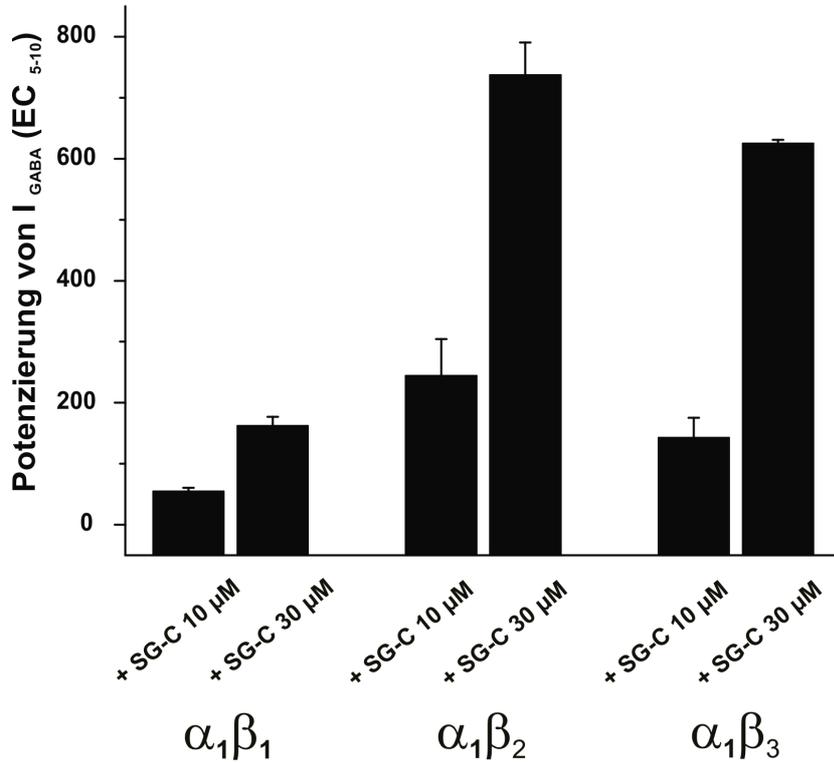


**Abbildung 16 Zusammenfassung der Ergebnisse**

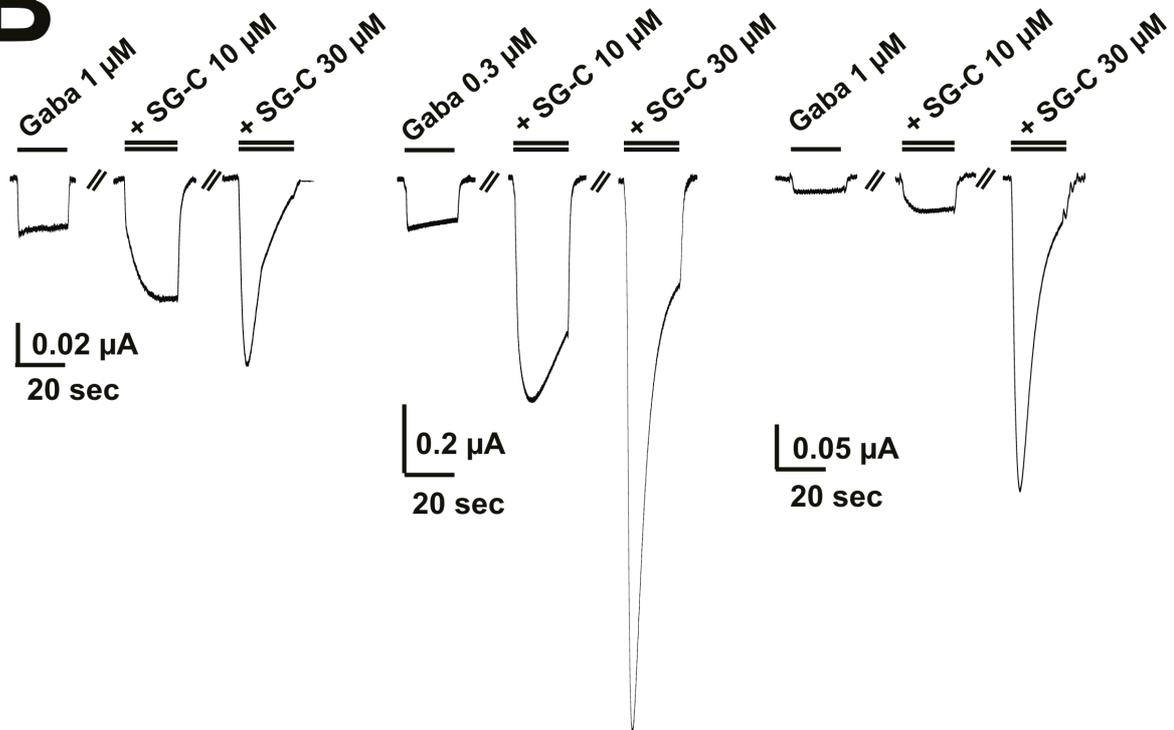
**A** Konzentrationsabhängiger potenzierender Effekt von SG-C 1 an  $\alpha_1\beta_1$  (■),  $\alpha_1\beta_2$  (●),  $\alpha_1\beta_3$  (▲),  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  (▼),  $\alpha_1\beta_1$ S290N (◆) und  $\alpha_1\beta_2$ N265S (●) Rezeptoren bei GABA  $EC_{5-10}$

**B** Typische Ströme am  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  GABA<sub>A</sub> Rezeptor bei Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$  SG-C 1, gemeinsam appliziert mit 5  $\mu\text{M}$  GABA (=EC<sub>5-10</sub>), Ko-Applikation von GABA und SG-C 1 ist durch einen Doppelbalken oberhalb des Stroms angezeigt

# A



# B

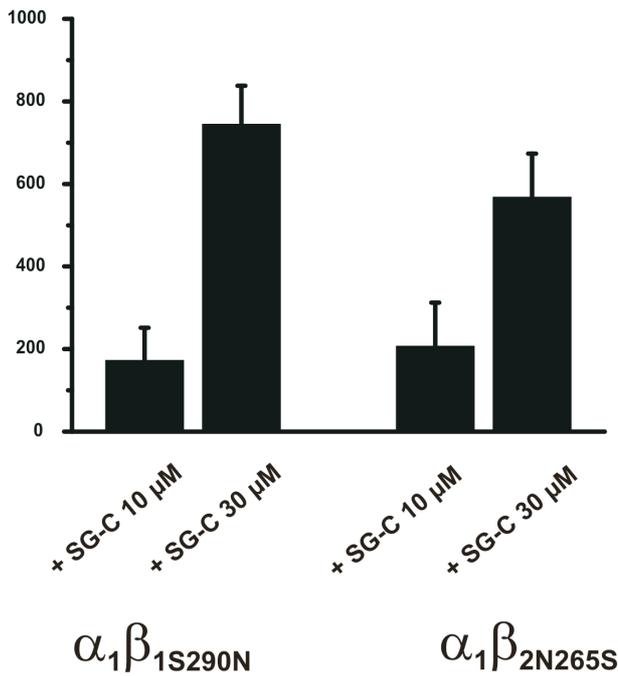


**Abbildung 17 Betaspezifität von SG-C 1**

**A.** Vergleich der Modulation von  $I_{GABA}$  durch SG-C 1 an  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_1\beta_2$  und  $\alpha_1\beta_3$  Rezeptoren bei Konzentrationen von 10 und 30  $\mu$ M im Balkendiagramm

**B** Typische Ströme an  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_1\beta_2$  und  $\alpha_1\beta_3$  Rezeptoren bei Konzentration von 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M SG-C 1, gemeinsam appliziert mit GABA (EC<sub>5-10</sub>), Ko-Applikation von GABA und SG-C 1 ist durch einen Doppelbalken oberhalb des Stroms angezeigt

# A

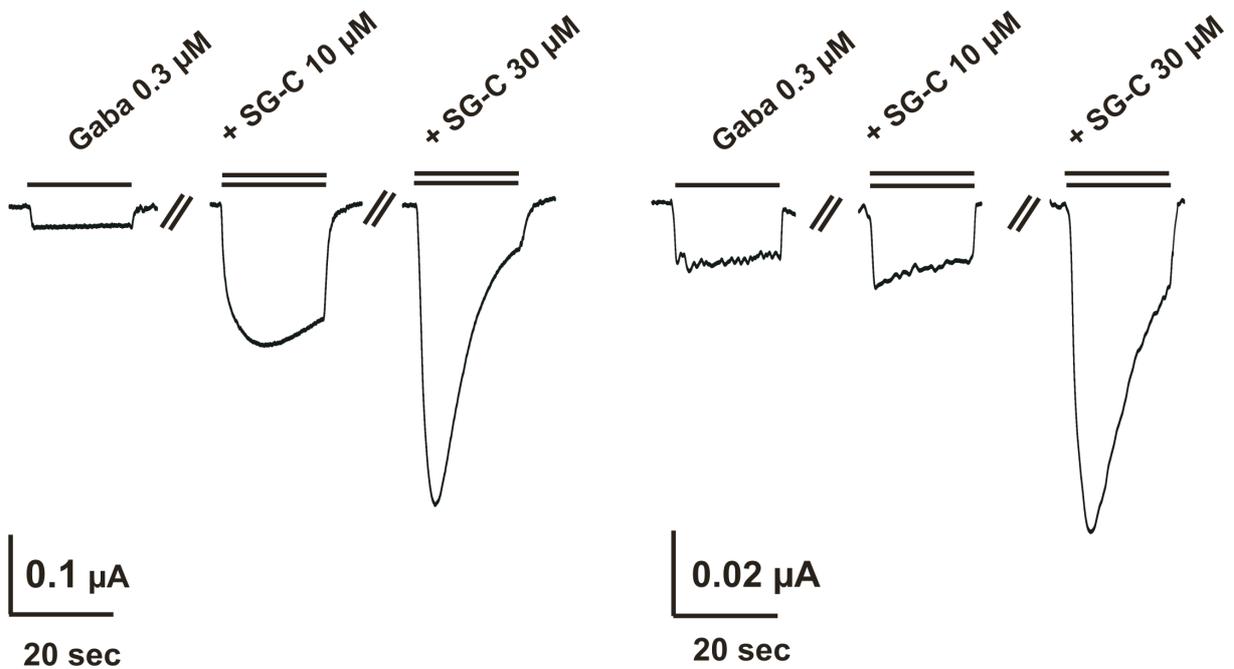


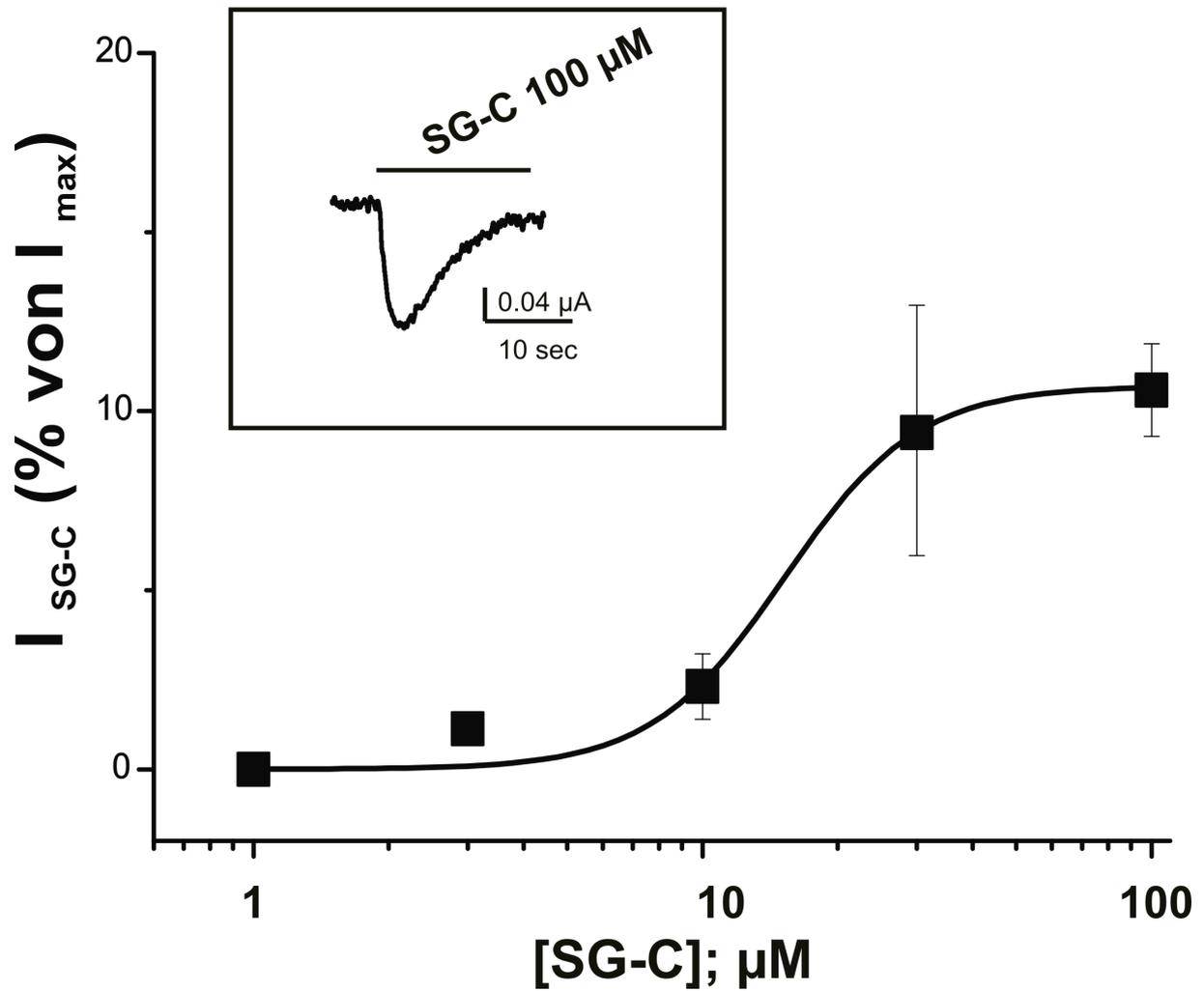
## Abbildung 18 Vergleich der $\beta$ Mutanten

**A.** Vergleich der Modulation von  $I_{GABA}$  durch SG-C 1 an  $\alpha_1\beta_{1S290N}$  und  $\alpha_1\beta_{2N265S}$  Rezeptoren bei Konzentrationen von 10 und 30  $\mu\text{M}$  im Balkendiagramm

**B** Typische Ströme an  $\alpha_1\beta_{1S290N}$  und  $\alpha_1\beta_{2N265S}$  Rezeptoren bei Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  SG-C 1, gemeinsam appliziert mit 0,3  $\mu\text{M}$  GABA ( $=EC_{5-10}$ ), Ko-Applikation von GABA und SG-C 1 ist durch einen Doppelbalken oberhalb des Stroms angezeigt

# B





**Abbildung 19 Direkte Aktivierung durch SG-C 1**

Dosiswirkungskurve der direkten Aktivierung durch SG-C 1 an  $\alpha_1\beta_2$  Rezeptoren, dargestellt als prozentualer Anteil von  $I_{max}$ . Weiters ist ein typischer, bei 100  $\mu M$  SG-C 1 induzierter Strom abgebildet.

## **Abbildungsverzeichnis**

- a) **Abbildung 1** Neurotransmitter und Neurotransmission  
Nach Aktories *et al.*, 2005
- b) **Abbildung 2**  
A und B nach Aktories *et al.*, 2005
- c) **Abbildung 3** Beziehung von GABA und Glutamat  
A nach Rang *et al.*, 2007  
B nach Jorgensen 2005
- d) **Tabelle 1** Vergleich der drei GABA-Zielstrukturen.  
Nach Johnston, 1996b
- e) **Abbildung 4** Vergleich von GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub> Rezeptor  
A und B nach Bormann *et al.*, 2000
- f) **Abbildung 5** GABA<sub>B</sub> Rezeptor  
nach Moepps *et al.*, 2003
- g) **Abbildung 6** Struktur des GABA<sub>A</sub> Rezeptors  
A nach Jacobs *et al.*, 2008  
B nach Clayton *et al.*, 2007  
C und D nach Kash *et al.*, 2004
- h) **Abbildung 7** Strukturelemente des GABA<sub>A</sub> Rezeptors GABA Bindungsstelle  
A, B und C nach Kash *et al.*, 2004
- i) **Tabelle 2** Charakteristika der Rezeptorsubtypen  
Nach Mohler, 2006
- j) **Abbildung 8** Verteilung der Rezeptorsubtypen  
A nach Whiting, 2003  
B nach Jacobs *et al.*, 2008
- k) **Abbildung 9** GABA<sub>A</sub> Rezeptor Trafficking  
nach Lüscher, Keller 2001
- l) **Abbildung 10** Strukturelemente zur Aktivierung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren  
A und B nach Keramidas *et al.*, 2006  
C und D nach Paas *et al.*, 2005
- m) **Abbildung 11** Einige Agonisten und Antagonisten am GABA<sub>A</sub> Rezeptor  
A und B nach Johnston, 1996a
- n) **Abbildung 12** Einige Allosterische Modulatoren am GABA<sub>A</sub> Rezeptor  
A, B und C nach Johnston, 1996a

- o) **Abbildung 13** Bindungsstellen am GABA<sub>A</sub> Rezeptor  
A nach Whiting, 2003  
B nach Hosie *et al.*, 2007  
C nach Olsen *et al.*, 2004  
D nach Campagna-Slater *et al.*, 2007
- p) **Tabelle 3** Charakteristika klinisch angewendter Benzodiazepine  
Nach Rang *et al.*, 2007
- q) **Abbildung 14** Methoden  
A nach Bianchi *et al.*, 2006  
B nach Baburin *et al.*, 2006  
C Praktikumsheft Pharmakologie 2, Institut für Pharmakologie, Universität Wien
- r) **Abbildungen 15 – 19**  
Erstellt mit *Corel Draw* anhand der gesammelten Daten

## **Abkürzungsverzeichnis**

3 $\alpha$ -5 $\alpha$ THP	Allopregnanolon
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THDOC	Tetrahydrodesoxycorticosteron
5-HT <sub>3</sub>	Serotonin
17-PA	3,5-17-Phenylandroster-16-en-3-ol
ACh	Acetylcholin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
BIG2	Brefeldin-A-inhibited GDP/GTP exchange facilitator
BZD	Benzodiazepin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cys Loop	Cystein Loop
DCMC	6,7-Dimethoxy-4-ethyl- $\beta$ -carbolin-3-carboxylat
DEPC	(Diethylpyrocarbonat)-Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	extrazelluläre Domäne
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziiertes Abbau
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GABARAP	GABA <sub>A</sub> Rezeptor assoziiertes Protein
GABA-T	GABA Transaminase
GAD	Glutamatdecarboxylase
GODZ	Golgi specific DHHC zinc-finger-domain protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRIF	GABA <sub>A</sub> Receptor-interacting factor 1
I <sub>GABA</sub>	GABA induzierter Ionenstrom
I <sub>max</sub>	maximalen durch GABA induzierbarer Strom
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential

LGIC	Liganden-gesteuerter Ionenkanal
M <sub>1-4</sub>	Transmembranärsegmente
MS-222	Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobezoesäureethylesters
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSF	N-ethylmaleimid-sensitive factor
PKC	Proteinkinase C
PRIPs	Phospholipase-C-related catalytically inactive proteins
SG-C 1	untersuchte Substanz
sIPSP	spontanen IPSP
Su1, Su2	Sushi Repeat1/2
TBPS	t-Butylbicyclophosphorothionat
TMD	transmembranäre Domäne
VFTM	Venus Flytrap Modul
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Literaturverzeichnis

Aktories, K, Forth, W (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*. 9., völlig überarb. Aufl. edn. Urban & Fischer: München.

Angelotti, TP, Macdonald, RL (1993) Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci* **13**(4): 1429-1440.

Baburin, I, Beyl, S, Hering, S (2006) Automated fast perfusion of Xenopus oocytes for drug screening. *Pflugers Arch* **453**(1): 117-123.

Barnard, EA, Skolnick, P, Olsen, RW, Mohler, H, Sieghart, W, Biggio, G, Braestrup, C, Bateson, AN, Langer, SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* **50**(2): 291-313.

Baumann, SW, Baur, R, Sigel, E (2001) Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* **276**(39): 36275-36280.

Ben-Ari, Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**(9): 728-739.

Bettler, B, Kaupmann, K, Mosbacher, J, Gassmann, M (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84**(3): 835-867.

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

Birbaumer, N, Schmidt, RF (2006) *Biologische Psychologie*. 6., vollst. überarb. u. erg. Aufl. edn. Springer Medizin Verlag: Heidelberg.

Boileau, AJ, Baur, R, Sharkey, LM, Sigel, E, Czajkowski, C (2002a) The relative amount of cRNA coding for gamma2 subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABA(A) receptors expressed in Xenopus oocytes. *Neuropharmacology* **43**(4): 695-700.

Boileau, AJ, Newell, JG, Czajkowski, C (2002b) GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J Biol Chem* **277**(4): 2931-2937.

Bormann, J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **21**(1): 16-19.

Bormann, J, Feigenspan, A (1995) GABAC receptors. *Trends Neurosci* **18**(12): 515-519.

Bormann, J, Hamill, OP, Sakmann, B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* **385**: 243-286.

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

Buck, K, Metten, P, Belknap, J, Crabbe, J (1999) Quantitative trait loci affecting risk for pentobarbital withdrawal map near alcohol withdrawal loci on mouse chromosomes 1, 4, and 11. *Mamm Genome* **10**(5): 431-437.

Buckle, VJ, Fujita, N, Ryder-Cook, AS, Derry, JM, Barnard, PJ, Lebo, RV, Schofield, PR, Seeburg, PH, Bateson, AN, Darlison, MG, et al. (1989) Chromosomal localization of GABAA receptor subunit genes: relationship to human genetic disease. *Neuron* **3**(5): 647-654.

Campagna-Slater, V, Weaver, DF (2007) Anaesthetic binding sites for etomidate and propofol on a GABAA receptor model. *Neurosci Lett* **418**(1): 28-33.

Charney, DS, Mihic, SJ, Harris, RA (2001) Hypnotics and sedatives In: *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman, JG, L.E., L (eds), 10th ed. edn, pp p. 399-427. [New York]: MacGraw-Hill.

Clayton, T, Chen, JL, Ernst, M, Richter, L, Cromer, BA, Morton, CJ, Ng, H, Kaczorowski, CC, Helmstetter, FJ, Furtmuller, R, Ecker, G, Parker, MW, Sieghart, W, Cook, JM (2007) An updated unified pharmacophore model of the benzodiazepine binding site on gamma-aminobutyric acid(a) receptors: correlation with comparative models. *Curr Med Chem* **14**(26): 2755-2775.

Couve, A, Moss, SJ, Pangalos, MN (2000) GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* **16**(4): 296-312.

Crestani, F, Low, K, Keist, R, Mandelli, M, Mohler, H, Rudolph, U (2001) Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol* **59**(3): 442-445.

Davies, M (2003) The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* **28**(4): 263-274.

Devaud, LL, Fritschy, JM, Sieghart, W, Morrow, AL (1997) Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Neurochem* **69**(1): 126-130.

Drew, CA, Johnston, GA, Weatherby, RP (1984) Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett* **52**(3): 317-321.

Feng, HJ, Bianchi, MT, Macdonald, RL (2004) Pentobarbital differentially modulates alpha1beta3delta and alpha1beta3gamma2L GABAA receptor currents. *Mol Pharmacol* **66**(4): 988-1003.

Galzi, JL, Devillers-Thiery, A, Hussy, N, Bertrand, S, Changeux, JP, Bertrand, D (1992) Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* **359**(6395): 500-505.

Gasior, M, Carter, RB, Witkin, JM (1999) Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci* **20**(3): 107-112.

Gurdon, JB, Lane, CD, Woodland, HR, Marbaix, G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**(5316): 177-182.

Harris, RA (1999) Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol Clin Exp Res* **23**(10): 1563-1570.

Hevers, W, Luddens, H (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**(1): 35-86.

Hicks, AA, Bailey, ME, Riley, BP, Kamphuis, W, Siciliano, MJ, Johnson, KJ, Darlison, MG (1994) Further evidence for clustering of human GABAA receptor subunit genes: localization of the alpha 6-subunit gene (GABRA6) to distal chromosome 5q by linkage analysis. *Genomics* **20**(2): 285-288.

Hosie, AM, Wilkins, ME, da Silva, HM, Smart, TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**(7118): 486-489.

Hosie, AM, Wilkins, ME, Smart, TG (2007) Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* **116**(1): 7-19.

Jacob, TC, Moss, SJ, Jurd, R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* **9**(5): 331-343.

Johnston, GA (1996a) GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* **69**(3): 173-198.

Johnston, GA (1996b) GABA<sub>c</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci* **17**(9): 319-323.

Jorgensen, EM (2005) Gaba. *WormBook*: 1-13.

Kanematsu, T, Jang, IS, Yamaguchi, T, Nagahama, H, Yoshimura, K, Hidaka, K, Matsuda, M, Takeuchi, H, Misumi, Y, Nakayama, K, Yamamoto, T, Akaike, N, Hirata, M, Nakayama, K (2002) Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *Embo J* **21**(5): 1004-1011.

Kash, TL, Jenkins, A, Kelley, JC, Trudell, JR, Harrison, NL (2003) Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* **421**(6920): 272-275.

Kash, TL, Trudell, JR, Harrison, NL (2004) Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt3): 540-546.

Keller, CA, Yuan, X, Panzanelli, P, Martin, ML, Alldred, M, Sassoe-Pognetto, M, Luscher, B (2004) The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci* **24**(26): 5881-5891.

Keramidas, A, Kash, TL, Harrison, NL (2006) The pre-M1 segment of the alpha1 subunit is a transduction element in the activation of the GABAA receptor. *J Physiol* **575**(Pt 1): 11-22.

Khan, ZU, Gutierrez, A, De Blas, AL (1994) The subunit composition of a GABAA/benzodiazepine receptor from rat cerebellum. *J Neurochem* **63**(1): 371-374.

Kittler, JT, McAinsh, K, Moss, SJ (2002) Mechanisms of GABAA receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol* **26**(2-3): 251-268.

Kittler, JT, Thomas, P, Tretter, V, Bogdanov, YD, Haucke, V, Smart, TG, Moss, SJ (2004) Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12736-12741.

Korpi, ER, Grunder, G, Luddens, H (2002) Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol* **67**(2): 113-159.

Krishek, BJ, Moss, SJ, Smart, TG (1996a) A functional comparison of the antagonists bicuculline and picrotoxin at recombinant GABAA receptors. *Neuropharmacology* **35**(9-10): 1289-1298.

Krishek, BJ, Moss, SJ, Smart, TG (1996b) Homomeric beta 1 gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties. *Mol Pharmacol* **49**(3): 494-504.

Lam, DW, Reynolds, JN (1998) Modulatory and direct effects of propofol on recombinant GABAA receptors expressed in xenopus oocytes: influence of alpha- and gamma2-subunits. *Brain Res* **784**(1-2): 179-187.

Lambert, JJ, Belelli, D, Hill-Venning, C, Peters, JA (1995) Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **16**(9): 295-303.

Low, K, Crestani, F, Keist, R, Benke, D, Brunig, I, Benson, JA, Fritschy, JM, Rulicke, T, Bluethmann, H, Mohler, H, Rudolph, U (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **290**(5489): 131-134.

Luddens, H, Korpi, ER (1995) Biological function of GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity. *J Psychiatr Res* **29**(2): 77-94.

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

Lukasiewicz, PD, Shields, CR (1998) A diversity of GABA receptors in the retina. *Semin Cell Dev Biol* **9**(3): 293-299.

Luscher, B, Keller, CA (2001) Ubiquitination, proteasomes and GABA(A) receptors. *Nat Cell Biol* **3**(10): E232-233.

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

Marshall, FH, Jones, KA, Kaupmann, K, Bettler, B (1999) GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* **20**(10): 396-399.

Matthews, DB, Devaud, LL, Fritschy, JM, Sieghart, W, Morrow, AL (1998) Differential regulation of GABA(A) receptor gene expression by ethanol in the rat hippocampus versus cerebral cortex. *J Neurochem* **70**(3): 1160-1166.

McKernan, RM, Whiting, PJ (1996) Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* **19**(4): 139-143.

Mercado, J, Czajkowski, C (2006) Charged residues in the alpha1 and beta2 pre-M1 regions involved in GABAA receptor activation. *J Neurosci* **26**(7): 2031-2040.

Mihic, SJ, Ye, Q, Wick, MJ, Koltchine, VV, Krasowski, MD, Finn, SE, Mascia, MP, Valenzuela, CF, Hanson, KK, Greenblatt, EP, Harris, RA, Harrison, NL (1997) Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* **389**(6649): 385-389.

Mody, I, Pearce, RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* **27**(9): 569-575.

Moepps, B, Fagni, L (2003) Mont Sainte-Odile: a sanctuary for GPCRs. Confidence on signal transduction of G-protein-couple receptors. *EMBO Rep* **4**(3): 237-243.

Mohler, H (2006a) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* **326**(2): 505-516.

Mohler, H (2006b) GABAA receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* **26**(5-6): 731-740.

Mohler, H, Benke, D, Benson, J, Luscher, B, Fritschy, JM (1995) GABAA-receptor subtypes in vivo: cellular localization, pharmacology and regulation. *Adv Biochem Psychopharmacol* **48**: 41-56.

Mohler, H, Fritschy, JM (1999) GABAB receptors make it to the top--as dimers. *Trends Pharmacol Sci* **20**(3): 87-89.

Mohler, H, Fritschy, JM, Crestani, F, Hensch, T, Rudolph, U (2004) Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochem Pharmacol* **68**(8): 1685-1690.

Mohler, H, Fritschy, JM, Rudolph, U (2002) A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **300**(1): 2-8.

Olsen, RW, Chang, CS, Li, G, Hancher, HJ, Wallner, M (2004) Fishing for allosteric sites on GABA(A) receptors. *Biochem Pharmacol* **68**(8): 1675-1684.

Paas, Y, Gibor, G, Grailhe, R, Savatier-Duclert, N, Dufresne, V, Sunesen, M, de Carvalho, LP, Changeux, JP, Attali, B (2005) Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 15877-15882.

Peters, JA, Kirkness, EF, Callachan, H, Lambert, JJ, Turner, AJ (1988) Modulation of the GABAA receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol* **94**(4): 1257-1269.

Quirk, K, Gillard, NP, Ragan, CI, Whiting, PJ, McKernan, RM (1994) Model of subunit composition of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes expressed in rat cerebellum with respect to their alpha and gamma/delta subunits. *J Biol Chem* **269**(23): 16020-16028.

Rang, HP, Dale, MM (2007) *Rang & Dale's pharmacology*. 6th ed. edn. Churchill Livingstone: [Edinburgh].

Rudolph, U, Crestani, F, Mohler, H (2001) GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* **22**(4): 188-194.

Rudolph, U, Mohler, H (2006) GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* **6**(1): 18-23.

Saliba, RS, Michels, G, Jacob, TC, Pangalos, MN, Moss, SJ (2007) Activity-dependent ubiquitination of GABA(A) receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *J Neurosci* **27**(48): 13341-13351.

Sanna, E, Murgia, A, Casula, A, Usala, M, Maciocco, E, Tuligi, G, Biggio, G (1996) Direct activation of GABAA receptors by loreclezole, an anticonvulsant drug with selectivity for the beta-subunit. *Neuropharmacology* **35**(12): 1753-1760.

Santhakumar, V, Wallner, M, Otis, TS (2007) Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol* **41**(3): 211-221.

Sieghart, W (2000) Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* **21**(11): 411-413.

Sieghart, W, Fuchs, K, Tretter, V, Ebert, V, Jechlinger, M, Hoyer, H, Adamiker, D (1999) Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int* **34**(5): 379-385.

Sieghart, R, Jurd, R, Rudolph, U (2002) Molecular determinants for the action of general anesthetics at recombinant alpha(2)beta(3)gamma(2)gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *J Neurochem* **80**(1): 140-148.

Sigel, E, Buhr, A (1997) The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**(11): 425-429.

Smith, GB, Olsen, RW (1994) Identification of a [3H]muscimol photoaffinity substrate in the bovine gamma-aminobutyric acidA receptor alpha subunit. *J Biol Chem* **269**(32): 20380-20387.

Thews, G, Vaupel, P, Mutschler, E (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 5., völlig neu bearb. und erw. Aufl. edn. Wissenschaftl. Verlagsges.: Stuttgart.

Thomas, P, Mortensen, M, Hosie, AM, Smart, TG (2005) Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* **8**(7): 889-897.

Tretter, V, Jacob, TC, Mukherjee, J, Fritschy, JM, Pangalos, MN, Moss, SJ (2008) The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* **28**(6): 1356-1365.

van Rijnsoever, C, Tauber, M, Choulli, MK, Keist, R, Rudolph, U, Mohler, H, Fritschy, JM, Crestani, F (2004) Requirement of alpha5-GABAA receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice. *J Neurosci* **24**(30): 6785-6790.

Wafford, KA, Bain, CJ, Quirk, K, McKernan, RM, Wingrove, PB, Whiting, PJ, Kemp, JA (1994) A novel allosteric modulatory site on the GABAA receptor beta subunit. *Neuron* **12**(4): 775-782.

Wagner, DA, Czajkowski, C (2001) Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* **21**(1): 67-74.

Wang, H, Bedford, FK, Brandon, NJ, Moss, SJ, Olsen, RW (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**(6714): 69-72.

Whiting, PJ (2003) GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* **8**(10): 445-450.

Wingrove, PB, Wafford, KA, Bain, C, Whiting, PJ (1994) The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the beta 2 and beta 3 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4569-4573.

## ***Lebenslauf***

Sarah Maria Trattnig

Kirchengasse 11/ 18

A – 1070 Wien

[a0402094@unet.univie.ac.at](mailto:a0402094@unet.univie.ac.at)

\* 06.09.1985 in Villach

### Ausbildung:

10 2004 - 01 2009

1996 – 2004

### Arbeitserfahrung

07-08 2007

07 2006

### **Universität Wien**

Diplomstudium der Pharmazie

### **BG/ BRG Peraustraße Villach**

Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg (Notendurchschnitt 1,0)

Praktikum

### **Engelapotheke**

Bahnhofstrasse 17

A – 9500 Villach

Praktikum

### **Perau Apotheke**

Ossiacherzeile 11

A – 9500 Villach