



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Punktmutationen in der Benzodiazepin-Bindungsstelle
auf die Modulation von GABA_A Rezeptoren durch ausgewählte
Liganden

Verfasserin

Amela Rešić

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: Univ. Prof. Dr. med. Steffen HERING

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

1.1. γ-Aminobuttersäure (GABA)	6
1.1.1. GABA als exzitatorischer Neurotransmitter	8
1.2. GABA-aktivierte Rezeptoren	9
1.2.1. GABA_A Rezeptor	9
1.2.1.1. Struktur und Vorkommen des GABA _A Rezeptors	10
1.2.1.2. Bindungsstellen	12
1.2.1.3. Kombinationsmöglichkeiten von GABA _A Rezeptor Untereinheiten	16
1.2.1.4. Untereinheiten und Vorkommen	17
1.3. Tonische Inhibition	18
1.4. GABA_A Rezeptor-vermittelte ZNS-Krankheiten	19
1.4.1. Schlafstörungen	19
1.4.2. Angststörungen	20
1.4.3. Epilepsie	20
1.5. Modulation am GABA_A Rezeptor	23
1.5.1. Benzodiazepine	23
1.5.1.1. Allgemeines	23
1.5.1.1.1. Unerwünschte Wirkungen	24
1.5.1.1.2. Abhängigkeit	25
1.5.1.1.3. Kontraindikationen	25
1.5.1.1.4. Pharmakokinetik	25

1.5.1.2. Wirkungsmechanismus	26
1.5.1.3. Angriffsort	27
1.5.1.4. Antagonisten	30
1.6. Barbiturate	31
1.7. Allgemeinanästhetika	33
1.8. Neurosteroid	35
1.9. Diverse	38
1.9.1. Muscimol, Bicucullin, Picrotoxin	38
1.9.2. Kationen	39
1.9.2.1. Zink Zn^{2+}	39
1.9.2.2. Lanthan La^{3+}	40
1.9.3. Ethanol	40
1.9.4. Furosemid	40
2. GABA_B Rezeptor	42
3. Problemstellung und Zielsetzung	45
4. Methoden	47
4.1. Oozytenpräparation	47
4.2. cRNA Vorbereitung	48
4.3. Injektion der cRNA	48
4.4. Messlösungen	49
4.5. 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Voltage Clamp)	50
4.6. Perfusionssystem	50
5. Ergebnisse	52
5.1. GABA Dosis-Wirkungskurven	52
5.3. Zaleplon	55
5.3. Triazolam	57
5.4. Midazolam	59

6. Diskussion	61
7. Zusammenfassung	64
8. Summary	65
9. Danksagung	66
10. Lebenslauf	67
11. Literaturverzeichnis	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Synthese von GABA aus Glutamat	7
Abbildung 2 : Metabolismus der γ -Aminobuttersäure	7
Abbildung 3 : Schematische Darstellung des GABA _A und des GABA _C Rezeptor-Chloridkanals	9
Abbildung 4 : Überblick über die bekannten GABA _A Rezeptoruntereinheiten	9
Abbildung 5 : Schematischer Aufbau einer GABA _A Rezeptoruntereinheit	11
Abbildung 6 : Schematische Darstellung einer GABA _A Rezeptoruntereinheit	12
Abbildung 7 : Bindungsstellen des GABA _A Rezeptors	13
Abbildung 8 : Darstellung der sechs Loops der extrazellulären N-terminalen Domäne	14
Abbildung 9 : Modell der extrazellulären Domänen eines pentameren GABA _A Rezeptors bestehend aus zwei α , zwei β und einer γ_2 Untereinheit	15
Abbildung 10 : Darstellung der Häufigkeit des Vorkommens der bekannten GABA _A Rezeptor-Subtypen	16
Abbildung 11 : Schematische Darstellung phasischer und tonischer GABAerger Inhibition	18
Abbildung 12 : Schematische Darstellung der Agonisten-Bindungsstellen innerhalb des GABA _A Rezeptors	24
Abbildung 13 : Modell der Benzodiazepin-Bindungstasche zwischen der α und der γ Untereinheit	30
Abbildung 14 : Schematische Darstellung des GABA _B Rezeptor-Chloridkanals	43
Abbildung 15 : GABA _B Rezeptor, bestehend aus den Untereinheiten GABA _{B1} und GABA _{B2}	44
Abbildung 16 : Die Schlüsselaminosäuren der γ -Untereinheiten des GABA _A Rezeptors, welche die Ligandenbindung der Benzodiazepinbindungsstelle bewirken	45
Abbildung 17 : Weiblicher <i>Xenopus leavis</i> Frosch	48
Abbildung 18 : <i>Xenopus leavis</i> Oozyten	49
Abbildung 19 : Schematische Darstellung der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik	50
Abbildung 20 : Schematischer Aufbau der Messkammer	51
Abbildung 21 : GABA-Dosis-Wirkungskurve (A) sowie die gemessenen GABA-Ströme bei den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M und 1 mM (B,C,D)	53
Abbildung 22 : Zaleplon-Dosis-Wirkungskurven/Diagramm(A,B,C,D) sowie Ströme (E)	56
Abbildung 23 : Triazolam-Dosis-Wirkungskurven (A,B,C,D) sowie Ströme (E)	58
Abbildung 24 : Midazolam-Dosis-Wirkungskurven/Diagramm (A,B,C,D) sowie Ströme (E)	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 :

Die Tabelle zeigt die GABA_A Rezeptor Dysfunktionen, verursacht durch Mutationen, die mit genetischen Epilepsiesyndromen assoziiert sind

21/22

Tabelle 2 :

Die Wirkungen ausgewählter GABA_A Rezeptor Untereinheiten

27

Tabelle 3 :

Einteilung der Allgemeinanästhetika

33

Tabelle 4:

Zusammenfassung der Parameter EC₅₀, EC₅₋₁₀, n_H und Anzahl der Experimente der GABA Dosis-Konzentrationskurven durch die angeführten GABA_A Rezeptor Subtypen

52

1. Einleitung

1.1. γ -Aminobuttersäure (GABA)

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn der Säugetiere (Sieghart et al., 1999; Olsen und Sieghart, 2008). GABA dient bei ungefähr 20-50% der neuronalen Synapsen als Neurotransmitter. Erstmals wurde GABA vor einem halben Jahrhundert im Gehirn von Säugetieren identifiziert. Zwischen 1950 und 1960 gab es starke Evidenz darüber, dass GABA als inhibitorischer Neurotransmitter, sowohl im Nervensystem von Vertebraten als auch von Invertebraten, fungiert (Roberts, 1988). Zum Beispiel enthielt ein Extrakt, der aus einem Säugetiergehirn entnommen wurde, eine Substanz, die die Impulsgenerierung in Neuronen von Flusskrebse blockierte. Diese Substanz wurde nachträglich als GABA identifiziert. In Krebstieren wurde gezeigt, dass GABA in inhibitorischen Neuronen 100-fach höher konzentriert, als in exzitatorischen Neuronen, vorkommt und dass als Antwort auf Nervenstimulation inhibitorische Nervenendigungen GABA sezernieren. Die Identifikation von biosynthetischen und metabolischen Stoffwechselwegen für GABA hat gezeigt, dass die Synthese, Freisetzung, Wiederaufnahme und der Metabolismus dieser Substanz im Nervensystem ablaufen. GABA zeigte bei der Applikation in Nerven- und Muskelzellen sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten, inhibitorische Effekte und generierte Änderungen in der Leitfähigkeit mit Ionenempfindlichkeiten, ähnlich denen, die nach der Aktivierung von inhibitorischen Nerven, beobachtet wurden. Schließlich, in den 1970er Jahren wurde GABA in Nervenendigungen von Säugetieren lokalisiert und Antikörper gegen GABA-biosynthetische Enzyme befanden sich bevorzugt in bekannten inhibitorischen Neuronen (Owens und Kriegstein, 2002).

Im Säugetiergehirn wird GABA primär durch Glutamat synthetisiert. Diese Reaktion wird durch die zwei Glutamatsäuredecarboxylase (GAD)-enzyme GAD 65 und GAD 67, bewirkt. GABA wird in synaptische Vesikel über vesikuläre Neurotransmittertransporter (VGAT) geladen und von Nervenendigungen durch calciumabhängige Exocytose freigesetzt. Es sind auch nicht-vesikuläre Formen der GABA Sekretion beschrieben, welche insbesondere während der Entwicklung von großer Bedeutung sein können (Wang und Kriegstein, 2009).

Die Effekte von GABA können entweder durch die Aktivierung von ionotropen oder metabotropen Rezeptoren, die sich prä-oder postsynaptisch befinden, vermittelt wer-

den. GABAerge Signale werden durch Wiederaufnahme des Neurotransmitters in die Nervenendigung und/oder in umgebende Gliazellen durch eine Klasse von Plasmamembran GABA Transportern (GATs) beendet. Schlussendlich wird GABA durch eine Transaminierungsreaktion, die durch die GABA Transaminase (GABA-T) katalysiert wird, metabolisiert.

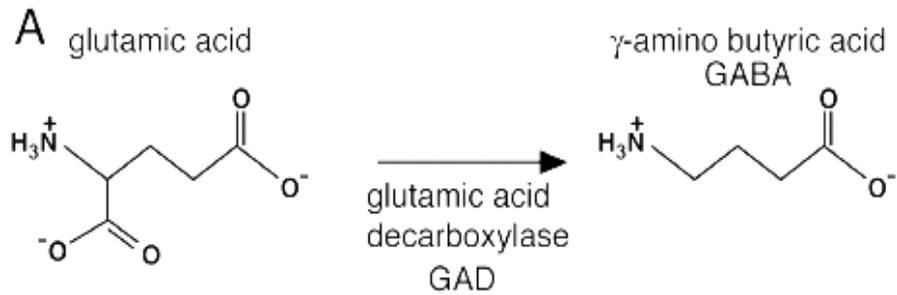


Abb. 1. Synthese von GABA aus Glutamat (Jorgensen, 2005)

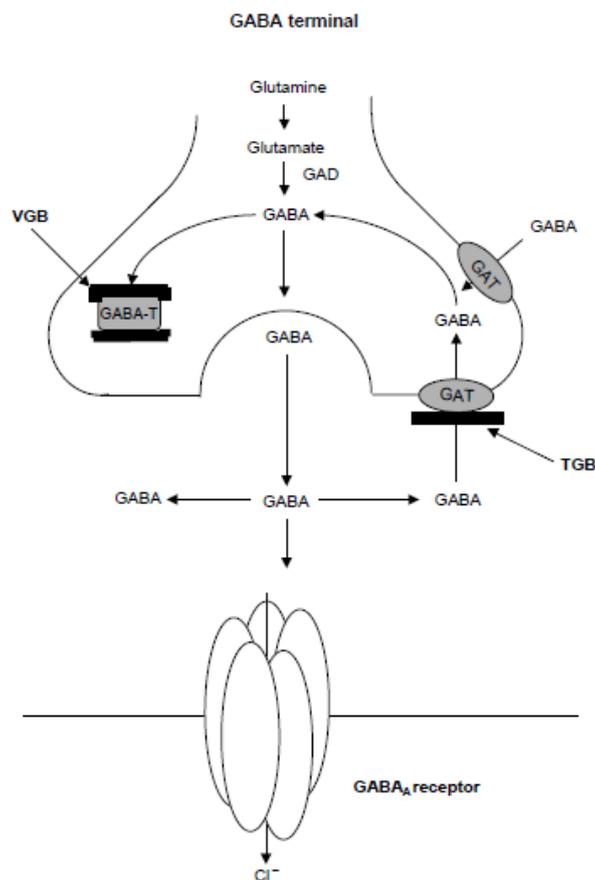


Abb.2. Metabolismus der γ -Aminobuttersäure (Zwanzger und Rupprecht, 2005)

Es existiert eine große Anzahl an GABA-produzierenden Neuronen im Gehirn. Im Neocortex sind die meisten GABA-enthaltenden Neuronen lokale Interneuronen mit wenigen Dendriten. Diese Neuronen sind über der gesamten kortikalen Lamina verteilt (Owens und Kriegstein, 2002; Takayama und Inoue, 2004).

1.1.1. GABA als exzitatorischer Neurotransmitter

Obwohl GABA den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter darstellt, gibt es Hinweise darauf, dass GABA auch exzitatorisch wirken kann.

Die ersten intrazellulären Aufzeichnungen im Zentralnervensystem von Wirbeltieren haben gezeigt, dass die Aktivierung von inhibitorischen Neuronen in einer Hyperpolarisation resultiert. Dies führte zu der Annahme, dass Inhibition dadurch bewirkt wird, indem das Membranpotential verändert wird. Die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials wird gehoben, die Zelle wird folglich schwerer erregt. Auf der anderen Seite haben Experimente im Nervensystem von Kriebstieren gezeigt, dass Inhibition durch einen Anstieg der Membranleitfähigkeit produziert werden kann, was entweder mit keiner Änderung im Membranpotential assoziiert ist oder sogar mit Depolarisation. Trotzdem bewirken GABA-vermittelte Signale in reifen kortikalen Zellen in fast allen Fällen eine Inhibition. Diese Beobachtungen zeigen also, dass eine Änderung des Membranpotentials nicht unbedingt den wichtigsten Faktor beim inhibitorischen Prozess darstellt. Das Schlüsselement bei synaptischer Inhibition ist der Anstieg der Membranleitfähigkeit für bestimmte Ionen und dies führt dazu, dass die Schwelle für die Auslösung von depolarisierenden Aktionspotentialen erhöht wird (Owens und Kriegstein, 2002).

Dieser Ansatz verlangt generell eine schnelle chloridabhängige GABA-vermittelte, synaptische Inhibition. In reifen Zellen beträgt das Gleichgewichtspotential für Chloridionen -60 bis -70 mV, was normalerweise weit unter der Aktionspotentialschwelle (-40 bis -50 mV) liegt. In reifen, kortikalen Neuronen kann GABA_A Rezeptor vermittelte synaptische Inhibition effektiv durch Depolarisierung der Membran bewirkt werden. Die Situation in unreifen Neuronen kann jedoch unterschiedlich sein. In noch entwickelnden Neuronen bewirkt die Aktivierung von GABA_A Rezeptoren eine robuste Membrandepolarisierung, die in einigen Fällen eine direkte Aktionspotentialentladung hervorrufen kann. Diese Depolarisierung von frühen GABA_A Rezeptoren resultiert in einer hohen intrazellulären Chloridkonzentration ($[Cl^-]$) von unreifen Neuronen und einem Membranpotential, das deutlich negativer als E_{Cl} ist. Mit der neuronalen Entwicklung sinkt die Chloridkonzentration und das Umkehrpotential wird negativer, was wiederum den inhibitorischen Effekt von GABA erlaubt. Diese Daten zeigen, dass

während der Entwicklung Zellen womöglich von einem Stadium der Chloridakkumulation bis hin zu einer Chloridverdrängung gehen (Owens und Kriegstein, 2002).

1.2. GABA-aktivierte Rezeptoren

GABA aktiviert sowohl ionotrope GABA_A als auch metabotrope GABA_B Rezeptoren. Früher sprach man auch noch von ionotropen GABA_C Rezeptoren, die nun aber nach Beschluss der IUPHAR auch zur Gruppe der GABA_A Rezeptoren gezählt werden (Barnard et al., 1998; Olsen und Sieghart, 2008b).



Abb. 3. Schematische Darstellung des GABA_A und des GABA_C Rezeptor-Chloridkanals (Owens und Kriegstein, 2002)

1.2.1. GABA_A Rezeptor

Subunit repertoire	
α	1-6
β	1-3
γ	1-3
δ	1
ε	1
θ	1
ρ	1-3

GABA_A Rezeptoren gehören, wie z.B. der nikotinerge Acetylcholin (ACh) Rezeptor, der Serotonin Subtyp 3 (5-HT₃) Rezeptor und der Glycin-glutamat-purinorezeptor P₂X, zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (Chebib, 1999; Olsen und Sieghart, 2009).

GABA_A Rezeptoren bestehen aus fünf Protein-Untereinheiten, die zu verschiedenen Klassen gehören. Es gibt 19 verschiedene Gene für GABA_A Rezeptor-Untereinheiten. 16 davon sind α₁₋₆, β₁₋₃, γ₁₋₃, δ, ε, θ, π, kombiniert als GABA_A, 3 davon sind ρ Untereinheiten, die einst als GABA_C bezeichnet wurden (Korpi et al., 2002a; Simon et al., 2004; Whiting, 2006).

Abb. 4. Überblick über die bekannten GABA_A Rezeptoruntereinheiten (Goetz et al., 2007)

Die Heterogenität des GABA_A Rezeptors ist die Grundvoraussetzung für dessen pharmakologisches Profil. Die Kombination der einzelnen Untereinheiten unterscheidet sich in den Zellen des gesamten Nervensystems und daher auch in ihrer Funktion (Barnard et al., 1998; Möhler, 2006).

Ein extrazelluläres Binden zweier GABA Moleküle zwischen der α und der β Untereinheit ist für ein effizientes Öffnen des GABA_A Rezeptorkanals notwendig. Wird GABA aus dem extrazellulären Raum entfernt und geht demzufolge die Bindung verloren, so schaltet der Rezeptorkanal vom offenen zurück in den geschlossenen Zustand. Der Kanal kann, gefolgt von einer Desensibilisierungsperiode, nach einer darauffolgenden Bindung wieder geöffnet werden. Die Zeitspanne dieser Übergänge ist von der Zusammenstellung der Untereinheiten des GABA_A Rezeptors abhängig und von der Verfügbarkeit von extrazellulärer γ -Aminobuttersäure. Bindet GABA, so kommt es zu einer Konformationsänderung, die in einem Anstieg der Chlorid (Cl⁻)- und, in einem geringeren Ausmaß, in der Bikarbonat (HCO₃⁻)-Permeabilität resultiert. Neuronen enthalten geringe intrazelluläre Chloridmengen (~8mM) aufgrund eines äußerst starken Chloridverdrängungsmechanismus, dem K⁺-Cl⁻-Cotransporter 2 (KCC2). Durch diesen Mechanismus ist das Gleichgewichtspotential von Chlorid geringer als das ruhende Membranpotential (~ -70mV). Die Öffnung des GABA_A Rezeptorkanals bewirkt demnach einen Chlorideinstrom und eine Hyperpolarisation des neuronalen Membranpotentials (Henschel et al., 2008).

Wegen ihrem weitverbreiteten Vorkommen im gesamten Nervensystem, spielen GABA_A Rezeptoren eine essentielle Rolle in praktisch allen physiologischen Funktionen des Gehirns und sind somit Ziel vieler klinisch und pharmakologisch relevanter Arzneistoffe bzw. Substanzen (Olsen und Sieghart, 2008b).

Der endogene Agonist des GABA_A Rezeptors ist GABA, daneben kann der GABA_A Rezeptor auch von Muscimol aktiviert werden. Typische Blocker von GABA_A Rezeptoren sind dagegen Bicucullin und Picrotoxin (Macdonald und Olsen, 1994; Sieghart, 1995).

1.2.1.1. Struktur und Vorkommen des GABA_A Rezeptors

Alle Mitglieder der Cys-loop pentameren LGIC(Ligand-Gated-Ion-Channel)-Superfamilie besitzen einen ähnlichen Aufbau. Die fünf Untereinheiten (Pentamer) bilden eine zentrale Pore -den Ionenkanal- durch die Membran. (Sieghart et al., 1999).

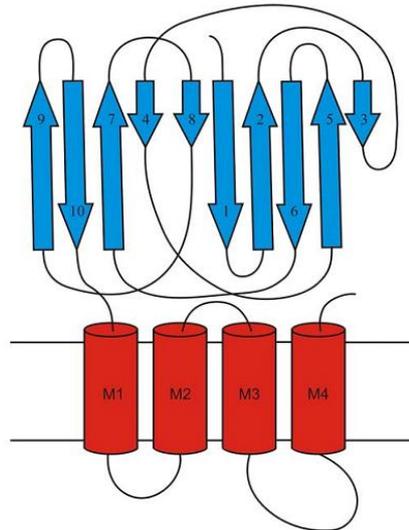


Abb.5. Schematischer Aufbau einer GABA_A Rezeptoruntereinheit (Cenderholm et al., 2009)

Jede Untereinheit besteht aus einer langen N-terminalen extrazellulären hydrophilen Region, die ungefähr 200 Aminosäuren beinhaltet und eine Cystein-Disulfidbrücke besitzt (der sogenannte „Cys-loop“) (Goetz et al., 2007).

Diese extrazelluläre Region beinhaltet einen Teil der Agonisten/Antagonisten Bindungsstelle (Möhler, 2006). Sie ist aus zehn β-Strängen aufgebaut. Die β-Stränge 1, 2, 3, 5, 6 und 8 machen den inneren β-Sheet aus. Der äußere β-Sheet (β-Stränge 4, 7, 9 und 10) und der innere β-Sheet interagieren und sind als ein β-Sandwich angeordnet (Cenderholm et al., 2009).

Der N-terminalen Domäne folgen vier transmembranäre (TM) α - Helices von ungefähr 20 Aminosäuren mit einem langen intrazellulären Loop zwischen TM3 und TM4. Viele GABA_A Rezeptoren haben eine ähnliche Aminosäuresequenz in der TM2 Domäne. Fünf dieser TM2 Domänen formen den Ionenkanal. TM1, TM3 und TM4 grenzen TM2 von der Lipidmembran ab (Goetz et al., 2007). Der intrazelluläre Loop kann von variabler Länge sein (Möhler, 2006). Das Ende des GABA_A Rezeptors bildet eine kurze extrazelluläre C-terminale Domäne (Sieghart et al., 1999). Nachdem sich der N-Terminus und der C-Terminus von GABA_A Rezeptoren außerhalb der Zellmembran befinden, ist der intrazelluläre Loop zwischen TM3 und TM4 die wichtigste Domäne für das Interagieren mit der intrazellulären Umgebung (Chen und Olsen, 2007). Dieser intrazelluläre Loop enthält zahlreiche Interaktionsstellen für Proteine und auch verschiedene Phosphorylierungsstellen um den Rezeptorumsatz und die Membranclusterung zu modulieren. Die Bindung des GABA_A Rezeptors an den Adaptin-Komplex AP2 wird durch den intrazellulären Loop der β und der γ Untereinheit vermittelt. Ein spezifisches Leucinmotiv in der β Untereinheit (LL 343/344) ist für die Rezeptorinternalisierung wichtig. Die γ₂ Untereinheit bindet an einige Proteine inklusive dem Gephyrin. Gephyrin ist ein Tubulin-bindendes Protein, das den Rezeptor mit dem Cytoskelett verbindet. Es wurde gezeigt, dass Gephyrin und die γ₂ Unterein-

heit für den Umsatz und die Clustering des GABA_A Rezeptors auf der postsynaptischen Seite wichtig ist. Ein weiteres Protein, welches den Rezeptor auf der Zelloberfläche stabilisiert, ist das Ubiquitin-ähnliche Protein Plic-1. Plic-1 erleichtert die Expression des GABA_A Rezeptors auf der Zelloberfläche ohne dabei die Rate der Rezeptorinternalisierung zu beeinträchtigen. Es wirkt in der Weise, indem es durch dessen carboxyterminale ubiquitin-assoziierte Domäne an den intrazellulären Loop der α und β Untereinheit bindet. Internalisierte Rezeptoren werden entweder schnell zurück an die Zelloberfläche recycled oder in einem langsameren Schritt durch lysosomale Enzyme abgebaut (Henschel et al., 2008).

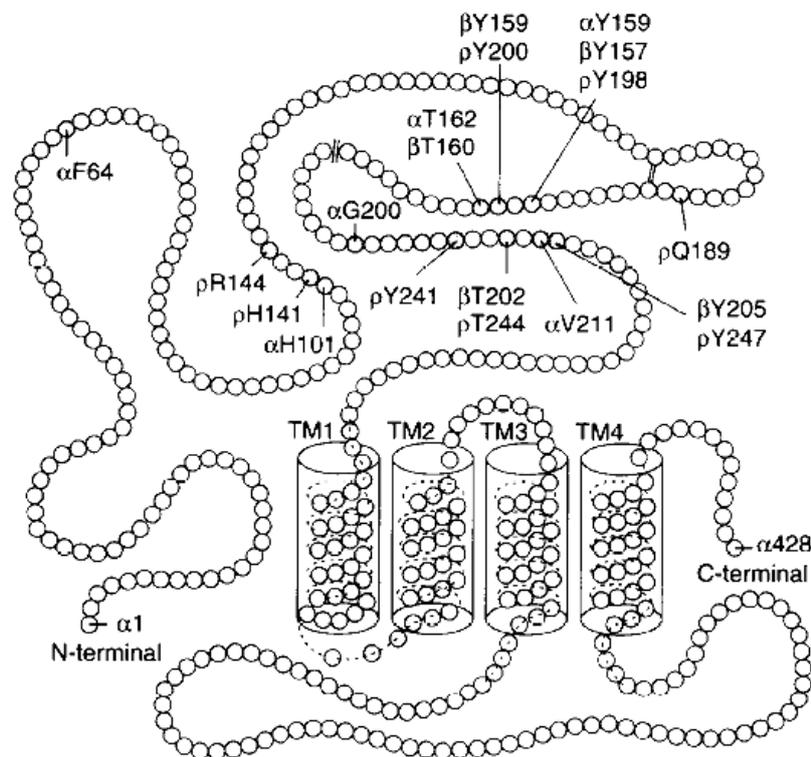


Abb.6. Schematische Darstellung einer GABA_A Rezeptoruntereinheit (Smith und Olsen, 1995).

1.2.1.2. Bindungsstellen

Der GABA_A Rezeptor besitzt zahlreiche Bindungsstellen (Sieghart, 1993; Smith und Olsen, 1995; Möhler et al., 2002), wobei zwei davon zwischen den beiden α / β Untereinheiten die GABA Bindungsstelle bilden und die Bindungsstelle zwischen den α / γ Untereinheiten von Benzodiazepinen angegriffen wird (Lüddens et al., 1994; Sigel und Buhr, 1997; Sharkey und Czajkowski, 2008).

Wie alle ligandenaktivierte Kanäle, wandelt der GABA_A Rezeptor chemische Bot-schaften in elektrisches Signal um. In weniger als einer Millisekunde induziert die

Bindung zweier kleiner GABA Moleküle zwischen der α und der β Untereinheit eine Konformationsänderung im Rezeptor und öffnet somit den zentralen Ionenkanal. Dieser Prozess wird „gating“ bezeichnet (Goetz et al., 2007).

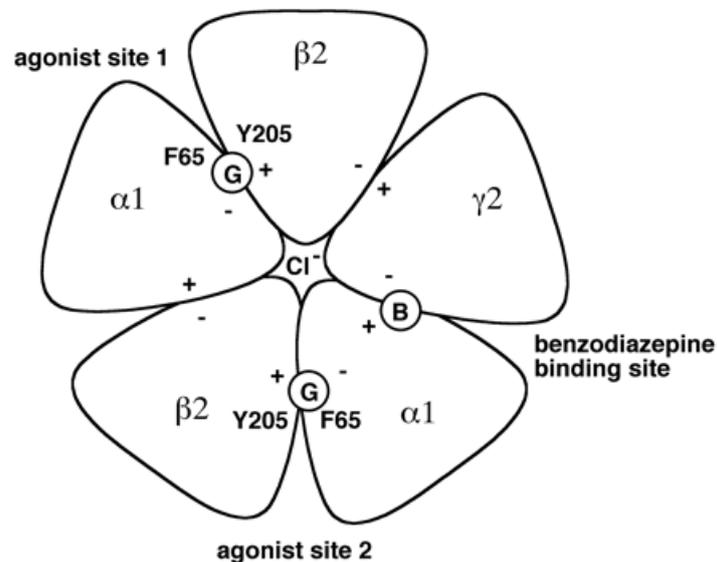


Abb.7. Bindungsstellen des GABA_A Rezeptors (Baumann et al., 2003).

Studien belegen die Tatsache, dass beide Bindungsstellen von GABA besetzt werden müssen, um den Kanal effizient zu öffnen. Im Gegensatz dazu genügt bei dem Antagonisten Bicucullin die Besetzung einer Bindungsstelle, um eine Kanalöffnung zu verhindern. Wie kann demnach erklärt werden, dass diese zwei Bindungsstellen unterschiedliche Eigenschaften für Agonisten, aber ähnliche Eigenschaften für kompetitive Antagonisten zeigen? Jeder Agonist oder Antagonist knüpft an etliche Atome im Rezeptor. Die Tatsache, dass beide Bindungsstellen sich an der Oberfläche von der α / β Untereinheit befinden aber unterschiedliche Eigenschaften aufweisen kann durch einen feinen Unterschied in der Konformation dieser beiden Bindungsstellen, was wiederum von der Natur der angrenzenden Untereinheiten abhängt, erklärt werden (Baumann et al., 2003).

Die Bindungstasche von GABA befindet sich auf der Oberfläche der extrazellulären aminoterminalen Domäne der Untereinheit und wird aus sechs Loops geformt (A-F). Loops A, B und C tragen eine der beiden Untereinheiten, Loops D, E und F die benachbarte Untereinheit. Das Binden von GABA induziert eine strukturelle Änderung innerhalb der Bindungstasche. Diese strukturelle Umgestaltung wird dann als eine Konformationswelle auf den Kanal übertragen. Der Kanal wird geöffnet und Chloridionen wandern durch die Kanalpore in die Zelle. Es wird angenommen, dass die Ami-

nosäurereste der Loops A-E im Inneren der Bindungstasche mit dem Liganden interagieren. Die Rolle von Loop F wird momentan kontrovers diskutiert. Dieser Loop ist vermutlich für die Ligandenbindung essentiell, spielt aber keine direkte Rolle bei der Transduktion. Es ist möglich, dass Loop F eine unterschiedliche Aufgabe bei der Aktivierung der einzelnen Untereinheiten hat. Eine Theorie ist, dass Loop F ein Teil des Mechanismus darstellt, der dazu dient, den Liganden Richtung Bindungstasche zu locken. Strukturmodelle zeigen, dass Loop C und Loop F in der Primärsequenz der Untereinheit nebeneinander liegen und etwa sechs verbindende Reste besitzen. Es ist also denkbar, dass diese beiden Loops eng gekoppelt sind und demnach jegliche Umstrukturierungen in Loop C auch direkt auf Loop F übertragen werden und umgekehrt. Einig ist man bei der Tatsache, dass Loop F zwei funktionelle Regionen hat. Die eine Hälfte von Loop F ist mit der Bindung eines Moleküls, die andere Hälfte mit der Aktivierung des Kanals assoziiert (Khatri und Weiss, 2010). Die Umordnung in Loop F könnte auch damit zusammenhängen, dass dieser Loop sich zwischen Loop A und C befindetet. Er verbindet auch Loop A und C der benachbarten Bindungsstellen. Demzufolge ist Loop F in der Lage, allosterischen Kopplungen zwischen angrenzenden Bindungsstellen zu übertragen.

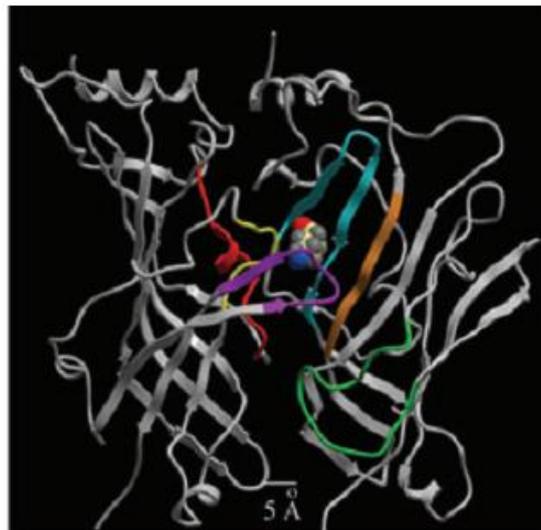


Abb.8. Darstellung der sechs Loops der extrazellulären N-terminalen Domäne (Khatri und Weiss, 2010).

Die Aminogruppe von GABA befindet sich in der Bindungstasche in der Nähe von Loop C und die Carboxylgruppe in der Nähe von Arginin 158 in Loop E. Loop C enthält Aminosäurereste, die für die Ligandenbindung essentiell sind. Zum Beispiel spielt das Tyrosin eine direkte Rolle in der Stabilisierung des Agonistenmoleküls,

möglicherweise durch π Elektronen aus dessen aromatischen Ring. Loop C unterscheidet dabei nicht zwischen Agonist und Antagonist. Zusätzlich scheint Loop F in der γ_2 Untereinheit die allosterische Modulation von Benzodiazepinen in $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ Rezeptoren zu vermitteln (Khatri et al., 2009).

Loop E grenzt an den N-terminalen Cys-Cys-Loop, der wahrscheinlich mit dem Linker zwischen TM2 und TM3 durch eine Salzbrücke interagiert und so zu einer Kanalöffnung führt. Konkreter gesagt, durch Isomerisierung eines Prolins im TM2-TM3 Loop von der trans in die cis Konformation könnte die strukturelle Änderung der N-terminalen Domäne mit der strukturellen Umordnung der TM2, die die Pore öffnet, in Verbindung stehen (Khatri et al., 2009).

Die derzeitige „conformational change wave“ Hypothese besagt, dass die Bindung eines Liganden eine Rotation der β -Sheets um eine Achse, die durch den Cys-loop geht, einleitet. Aufgrund dieser Rotation werden der Cys-loop und Loop 2 verschoben. Eine Bewegung des TM2-TM3 Loops bewirkt dann eine Drehung der TM2 Domäne und führt dadurch zu einer Trennung dieser beiden Helices. Die Pore wird geöffnet und Chloridionen können fließen (Cenderholm et al., 2009).

Der Aminosäurerest F64 (Phenylalanin) in der α_1 Untereinheit ist für die GABA Affinität zur Kanalöffnung und für die kompetitive Antagonistenaffinität wichtig. Es wurde auch gezeigt, dass Tyrosin Y157, Threonin T160, T202 und Y205 auf der β_2 Untereinheit wichtig für die GABA Affinität sind und dass diese Aminosäurereste direkt an der Bindung beteiligt sind und nicht an der darauffolgenden Konformationsänderung, welche eine Kanalöffnung bewirkt (Sigel und Buhr, 1997).

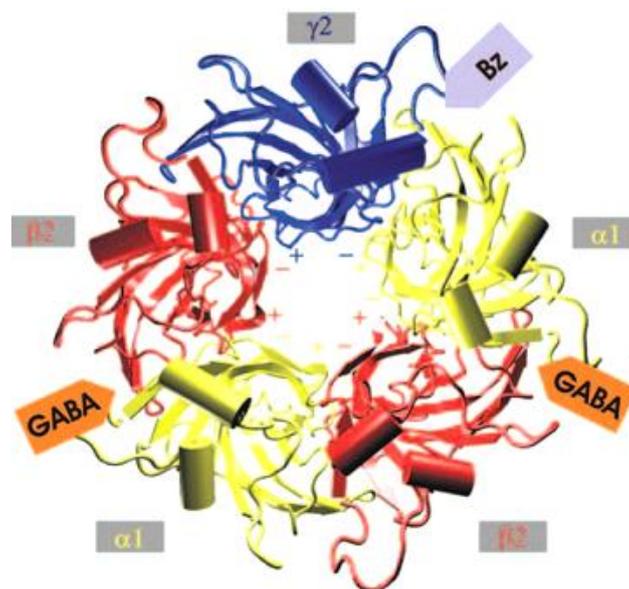


Abb.9. Modell der extrazellulären Domänen eines pentameren $GABA_A$ Rezeptors bestehend aus zwei α , zwei β und einer γ_2 Untereinheit (Ernst et al., 2003).

1.2.1.3. Kombinationsmöglichkeiten von GABA_A Rezeptor-Untereinheiten

Studien haben gezeigt, dass γ -Untereinheiten nicht mit anderen γ -Untereinheiten kombiniert werden können, genauso wenig mit δ Untereinheiten. Es konnte eine allgemeine Stöchiometrie von 2α - 2β - 1γ oder 1δ Untereinheit ermittelt werden (Sieghart und Sperk, 2002; Olsen und Sawyer, 2004). $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ Rezeptoren sind die am häufigsten vorkommenden GABA_A Rezeptoren im Gehirn (Sieghart, 1999; Baumann et al., 2001; Olsen und Sieghart, 2008). Genauso scheinen $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$, $\alpha_4\beta\gamma_2$, $\alpha_5\beta\gamma_2$, $\alpha_6\beta\gamma_2$, $\alpha_4\beta\delta$ und $\alpha_6\beta\delta$ häufig vorzukommen, jedoch in geringerem Ausmaß (Olsen und Sieghart, 2008). Es gibt auch Hinweise, dass GABA_A Rezeptoren nur aus α und β Untereinheiten bestehen können. Im Gegensatz dazu stehen die α_1 Rezeptoren, die hauptsächlich mit γ_1 , γ_2 , γ_3 oder δ Untereinheiten aufzufinden sind. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass der $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptor für GABA sensitiver ist im Vergleich zu $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren (Sieghart et al., 1999). Eine bewiesene Stöchiometrie von $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren ist $2\alpha:3\beta$ und $3\alpha:2\beta$ (Rosen et al., 2007). Ein weiterer Beweis für die Existenz von GABA_A Rezeptoren bestehend nur aus α und β Untereinheiten sind etliche γ_2 knock-out Mäuse sowie δ knock-out Mäuse (Olsen und Sieghart, 2008).

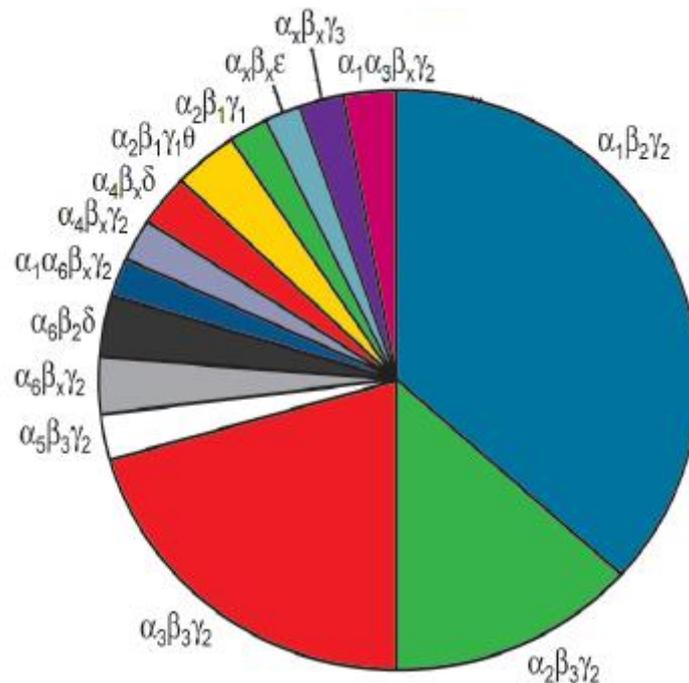


Abb. 10. Darstellung der Häufigkeit des Vorkommens der bekannten GABA_A Rezeptor-Subtypen (Nutt, 2006).

1.2.1.4. Untereinheiten und Vorkommen

Die unterschiedlichen Kombinationen der GABA_A Rezeptor Untereinheiten, die im Gehirn gefunden wurden, werden hauptsächlich dadurch bestimmt, welche Zelltypen welche Gene exprimieren und welche Kombinationen die verschiedenen Untereinheiten innerhalb einer gewissen Zelle bevorzugen (Sieghart et al., 1999).

Einige Untereinheiten, wie α_1 , β_1 und β_2 sowie γ_2 werden im gesamten Gehirn von Säugetieren gefunden, obwohl Unterschiede in deren Verteilung festgestellt wurden. Andere Untereinheiten wie α_{2-6} , γ_1 , und δ sind auf spezifische Regionen begrenzt, wie die cerebralen Granulazellen für α_6 . Neben dieser regionalen Diversität gibt es zusätzlich unterschiedliche Kombinationen der Untereinheiten innerhalb derselben Zelle, was wiederum zu unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen des Rezeptors führt. Zum Beispiel ist die γ Untereinheit für die postsynaptische Transmission wichtig, während hingegen Rezeptoren die α_4 , α_5 , α_6 oder δ Untereinheiten enthalten, extrasynaptisch lokalisiert sind (Henschel et al., 2008).

Punktmutationen in der TM2 Domäne (TM2-15') beweisen die Existenz von Rezeptor-Subtypen mit spezifischen β Untereinheiten. β_1 Untereinheiten existieren auch, kommen aber seltener vor als andere β Untereinheiten (Sieghart et al., 1999).

δ , ϵ und π Untereinheiten scheinen die γ Untereinheit in GABA_A Rezeptoren ersetzen zu können, während hingegen die θ Untereinheit möglicherweise die β Untereinheit zu ersetzen vermag. Im Gegensatz dazu steht die ρ Untereinheit, die sich, wie es scheint, mit keiner Klasse von GABA_A Rezeptoren kombinieren lässt. Es ist jedoch bis jetzt auch nicht geklärt, ob die 3 ρ Untereinheiten alle untereinander in einem Rezeptor kombiniert werden können (Sieghart et al., 1999). ρ Untereinheiten werden hauptsächlich in der Retina exprimiert (Olsen und Sieghart, 2008). ρ_1 Rezeptoren sind nicht sensitiv für Benzodiazepine oder andere intravenöse Anästhetika. Ausnahme sind hier neuroaktive Steroide (Walters et al., 2000). ρ_1 Untereinheiten formen den GABA_C Rezeptor (Khatri und Weiss, 2010). Dieser homomere GABA_C Rezeptor hat theoretisch fünf Bindungsstellen für GABA, obwohl vermutlich nur drei GABA Moleküle gebraucht werden um die Pore zu öffnen (Khatri et al., 2009).

α_4 und α_6 Untereinheiten gehen bevorzugt Kombinationen mit δ Untereinheiten ein (Goetz et al., 2007). δ Untereinheit enthaltende Rezeptoren zeigen eine höhere Sensitivität für den Agonisten GABA im Vergleich zu anderen GABA_A Rezeptor Subtypen (Möhler, 2006). GABA_A Rezeptoren, gepaart mit α_4 oder α_6 und vor allem mit β_3 Untereinheiten, die zusätzlich eine δ Untereinheit enthalten, sind sensitiver als γ_2 enthaltende Rezeptoren für Anästhetika, Neurosteroid, GABA Analoge (wie Gaboxadol) und Ethanol (Olsen und Sieghart, 2008; Wallner et al., 2006). δ Untereinheiten finden sich ausschließlich extrasynaptisch im Kleinhirn und sind maßschneidernd für die

tonische Inhibition aufgrund ihrer hohen Affinität für GABA und der langsamen Desensibilisierungskinetik (Möhler, 2006). Schnelle synaptische (phasische) Inhibition wird primär durch γ_2 -enthaltende Rezeptoren vermittelt. δ Untereinheit enthaltende Rezeptoren, peri- oder extrasynaptisch lokalisiert, werden tonisch durch GABA aktiviert (Bateson, 2004; Goetz et al., 2007).

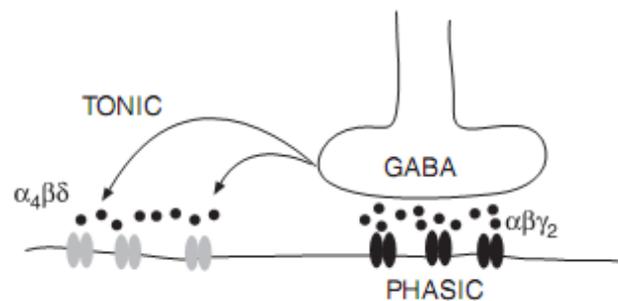


Abb. 11. Schematische Darstellung phasischer und tonischer GABAerger Inhibition (Goetz et al., 2007)

1.3. Tonische Inhibition

Synaptische Übertragung ist die schnellste chemische Kommunikation innerhalb des Körpers, verlangt aber die Anwesenheit von zwei Synapsen zwischen zwei kommunizierenden Zellen. GABAerge Synapsen waren lange dafür bekannt, schnelle inhibitorische Aktivität in Form von inhibitorischen postsynaptischen (phasischen) Strömen zu generieren. Während des letzten Jahrzehntes wurde das Interesse an diffuser, inhibitorischer Neurotransmission immer größer. Diese wird durch $GABA_A$ Rezeptoren vermittelt, die außerhalb von Synapsen liegen und welche durch GABA aus dem extrazellulären Raum aktiviert werden. Diese Form der Inhibition wird als tonische Inhibition bezeichnet. Diese wurde in einer Vielzahl an Neuronen im Kleinhirn, Hirnrinde, Thalamus, Hippokampus und Rückenmark gefunden. Nur vier Typen von heteropentameren $GABA_A$ Rezeptoren, die entweder die δ , α_5 , β oder ϵ Untereinheit enthalten oder Rezeptoren, die nur aus α und β Untereinheiten aufgebaut sind, vermitteln individuell oder in Kombination, tonische Inhibition (Goetz et al., 2007).

Theoretisch könnte eine große Anzahl an unterschiedlichen $GABA_A$ Rezeptor Untereinheiten miteinander kombiniert werden. Es wird jedoch davon ausgegangen,

dass im ZNS nur bestimmte Subtypen GABA_A Rezeptoren bilden (Sieghart et al., 1999; Olsen und Sieghart, 2008; Olsen und Sieghart, 2009).

Eine Kenntnis von der Struktur und Funktion von GABA_A Rezeptoren ist dementsprechend wichtig, weil dadurch auch die allosterische Modulation von klinisch wichtigen ZNS-Substanzen erklärt werden kann. Mikrodomänen innerhalb der Rezeptor-Protein-Struktur, die leicht variieren, aber eine große Bedeutung bei den einzelnen Rezeptor-Untereinheiten haben, spielen dabei eine große Rolle (Olsen und Sieghart, 2008).

1.4. GABA_A Rezeptor-vermittelte ZNS-Krankheiten

1.4.1. Schlafstörungen

Aufgrund neurophysiologischer, insbesondere elektroenzephalographischer Messungen können verschiedene Schlafarten unterschieden werden: der orthodoxe, „synchronisierte“ Schlaf (NREM-Schlaf) und der paradoxe oder REM-Schlaf. Der REM (Rapid Eye Movements)-Schlaf ist einerseits durch starke elektrische Aktivität charakterisiert, während andererseits sonstige Parameter dem Tiefschlaf entsprechen (minimaler Muskeltonus, hohe Weckschwelle). Die Dauer des orthodoxen und des REM-Schlafes nimmt mit zunehmendem Lebensalter ab. Alte Menschen benötigen weniger Schlaf als junge. Diese Tatsache ist für die Beurteilung von Schlafstörungen bedeutsam.

Der Schlafende ist äußeren Reizen gegenüber unempfindlicher, außerdem ist das Bewusstsein aufgehoben. Doch bestehen zwischen Schlaf und Narkose prinzipielle Unterschiede: Schlaf ist ein lebensnotwendiger, aktiver Prozess, bei dem in fast allen Organen Regenerations- und Aufbauvorgänge ablaufen, bei der Narkose handelt es sich dagegen um eine Hemmung zentralnervöser Funktionen. Im Schlaf sind die Schutzreflexe (z.B. Hustenreiz) erhalten, in der Narkose aufgehoben. Ein Schlafender ist jederzeit erweckbar, ein Narkotisierter nicht.

Gesichert ist, dass GABA und Adenosin an der Induktion und Aufrechterhaltung des Schlafes beteiligt sind. Histamin wirkt dagegen durch Erregung von H₁ Rezeptoren schlafhemmend (Mutschler et al., 2008).

1.4.2. Angststörungen

Studien über Jahre hinweg haben ergeben, dass die Amygdala und die Bettkerne der Stria terminalis eine wichtige Rolle bei Angst und Unruhe spielen. Diese beiden Regionen haben jedoch eine unterschiedliche Wirkung bezüglich Angst. Die Amygdala ist dafür bekannt, eine sogenannte konditionierte Angst zu vermitteln, während hingegen die Bettkerne der Stria terminalis bei der Antwort von kontext-abhängigen Angst wichtiger sind. Die Anwesenheit der α_2 Untereinheit in der Amygdala weist darauf hin, dass diese Untereinheit eine Rolle bei Amygdala-vermittelten Angst spielt. Es stellt sich hier jedoch die Frage, in welcher Weise Angst, im Vergleich von α_2 gegenüber α_3 Untereinheiten, assoziiert ist. Studien haben nichtselektive Benzodiazepine (wie Diazepam) mit selektiven Benzodiazepinen (Imidazopyridine) verglichen und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass nichtselektive Benzodiazepine einen anxiolytischen Effekt bei α_2 , jedoch keinen Effekt bei α_3 zeigen. Im Gegensatz dazu stehen selektive Benzodiazepine, die durchaus einen anxiolytischen Effekt in Tierversuchen zeigen. Sollte dieser Effekt auch für menschliche Angst gelten, könnte mit weniger Nebenwirkungen, wie sie jetzt mit nichtselektiven Benzodiazepinen existieren, gerechnet werden (Dias et al., 2005).

1.4.3. Epilepsie

Krampfanfälle tauchen häufig während des ersten Lebensjahres auf. Antikonvulsive Medikation wird dafür verwendet, eine Vielzahl an neurologischen Erkrankungen zu behandeln und wird auch oft während der Schwangerschaft oder bei Kindern eingesetzt. Die Auswirkungen der antiepileptischen Medikation auf die neuronale Entwicklung und spätere kognitive Funktionen sind erwähnenswert. Antikonvulsiva senken die neuronale Erregung durch mehrere Mechanismen, inklusive der Potenzierung von GABA_A Rezeptoren, der Inhibition von NMDA- und AMPA/kainat-type Glutamatrezeptoren, Natriumkanalblockierung oder Inhibition von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Medikamente (wie Ethanol und Allgemeinanästhetika) zeigten nach Applikation weitverbreitete Apoptose. Es existieren auch Beweise für kognitive- sowie Lerndefizite bei Menschen nach früher antiepileptischer Medikation. Besonders bei Medikamenten, die die GABA_A Rezeptoraktivität erhöhen, wurden einige negative Effekte für Kognition beobachtet. Die Gabe von Phenobarbital zum Beispiel während der Schwangerschaft, insbesondere im dritten Trimester, wurde mit kognitiven Defiziten und niedrigeren sprachlichen Intelligenzwerten im späteren Kindes- und Erwachsenenalter assoziiert (Henschel et al., 2008)

Epilepsie wird bei Menschen diagnostiziert, die zwei oder mehr grundlose Krampfanfälle erleben. Es ist eines der häufigsten neurologischen Erkrankungen, die 0,5-1% der Weltbevölkerung betrifft. Es wird angenommen, dass viele Epilepsieformen eine genetische Basis haben und sich in ihrer Stärke unterscheiden. Es gibt die relativ gutartige Absence-Epilepsie des Kindesalters (CAE) bis zum ernstesten Epilepsiesyndrom Dravet Syndrome (DS). Der Begriff generalisierte Epilepsie mit fiebrigen Krampfanfällen (GEFS+) wurde Familien zugrundegelegt, in denen mehrere Mitglieder fiebrige Krampfanfälle oder andere generalisierte Epilepsiesyndrome erleben. Obwohl komplexe polygenetische Vererbung wahrscheinlich mit den meisten genetischen Epilepsiesyndromen assoziiert ist, verursachen auch monogenetische Mutationen von transmembranären Ionenkanälen Epilepsie. Mutationen von Ionenkanälen, die entweder direkt oder indirekt die exzitatorische Neurotransmission erhöhen oder die inhibitorische Neurotransmission erniedrigen, würden im Gehirn eine Übererregbarkeit verursachen und prädisponieren somit Patienten zu Krampfanfällen (Macdonald et al., 2010).

Mutation	Genetische Epilepsiesyndrom	Strukturelle Eigenschaften	GABA_A Rezeptor-Dysfunktion
γ_2 (R82Q)	CAE/FS	N-terminus von γ_2/β_2 Untereinheitgrenzfläche	Beeinträchtigte Oligomerisierung, ER Retention, verminderte Oberflächenexpression, verminderte Ströme
γ_2 (K328M)	GEFS+	M2–M3 loop	Verminderte mittlere Öffnungszeiten, beschleunigte Deaktivierung,
δ (E177A)	GEFS+ ¹	Angrenzend an den Cys-Loop	Verminderte mittlere Öffnungszeiten, beschleunigte Deaktivierung
δ (R220H)	GEFS+	Zwischen Cys-Loop und M1 N-Terminus	Verminderte mittlere Öffnungszeiten, beschleunigte Deaktivierung
γ_2 (R177G)	FS ²	Insertion einer neutralen AS am N-Terminus	Veränderte Strom-Kinetik
α_1 (A322D)	JME ³	Insertion einer geladenen AS in M3	Missfaltung, veränderte Struktur, Verminderte Oberflächenexpression, verminderte Ströme
β_3 (P11S)	CAE ⁴ , autism	Signalpeptid Missense-Mutation	Abnormale N-vermittelte Glykosylierung und verminderte Ströme
β_3 (S15F)	CAE	Signalpeptid Missense-Mutation	Abnormale N-vermittelte Glykosylierung und verminderte Ströme
β_3 (G32R)	CAE	N-Terminus Missense-	Abnormale N-vermittelte

		Mutation	Glykosylierung und verminderte Ströme
$\gamma_2(Q390X)$	GEFS+/DS ⁵	Intrazellulärer Loop zwischen M3 und M4	ER-Retention, dominante, negative Reduktion von Wildtyp-Rezeptoren, verminderte Ströme
$\gamma_2(Q40X)$	DS	1st residue of mature peptide	Führt wahrscheinlich zu NMD ⁶
$\gamma_2(Q429X)$	GEFS+	Intrazellulärer Loop zwischen M3 und M4	Führt wahrscheinlich zu NMD
$\alpha_1(S326fs328X)$	CAE	Frameshift und PTC in M3	NMD gefolgt durch ERAD ⁷ von subunit protein
GABRG2(IVS6 + 2T→G)	CAE/FS	Splice-donor site intron 6	soll PTC an 5th/7th exon junction verursachen
GABRB ₃ haplo-type 2	CAE	Exon 1a promoter	Beeinträchtigte Bindung von N-Oct-3 transkriptionsaktivator

Tabelle adaptiert nach Macdonald et al., 2010

Tabelle 1 : Die Tabelle zeigt die GABA_A Rezeptor Dysfunktionen, verursacht durch Mutationen, die mit genetischen Epilepsiesyndromen assoziiert sind

¹ GEFS+ : generalized epilepsy with febrile seizures plus

² FS : febrile seizures

³ JME : juvenile myoclonic epilepsy

⁴ CAE : childhood absence epilepsy

⁵ DS : Dravet Syndrome

⁶ NMD : Nonsense-mediated mRNA decay

⁷ ERAD : endoplasmic reticulum-associated degradation

Rezeptoren, welche α_4 Untereinheiten enthalten, repräsentieren einen kleinen Prozentsatz von der GABA_A Rezeptorpopulation im Gehirn von Säugetieren. Die α_4 Untereinheit ist kolokalisiert mit γ_2 Untereinheiten im Hippocampus und Thalamus und die Assemblierung dieser beiden Untereinheiten scheint eine wichtige Rolle in der Epileptogenese zu spielen. Tiermodelle von Epilepsie beobachteten einen stetigen Anstieg von $\alpha_4\beta\gamma_2$ Rezeptoren in den Granulazellen des Gyrus dentatus mit einer parallel laufenden verminderten Expression von $\alpha_4\beta\delta$ Rezeptoren (You et al., 2010). Ein Anstieg in GAT-1-positiven Interneuronen wurde im Neocortex von Ratten nach corticotropinfreisetzenden, hormoninduzierten Krampfanfällen beschrieben, sowie ein vorübergehender Anstieg von GAT-3 mRNA (nicht aber vom Protein) Expression im Tiermodell eine Stunde nach dem letzten Krampfanfall. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Krampfaktivität mit einer Upregulation von neocorticaler GAT Expression einhergeht. Daten von transgenen Mäusen, die GAT-1 überexprimieren, weisen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber chemisch induzierten Krämpfen auf, obwohl sie keine spontane Krampfaktivität zeigen. Verstärkter GAT-1 vermittelter

GABA Transport, der mit Krämpfen in genetischen, epileptischen Mäusen assoziiert ist, unterstützt diese Theorie (Conti et al., 2004).

1.5. Modulation von GABA_A Rezeptoren

Allgemein werden positiv allosterische Modulatoren am GABA_A Rezeptor in der Medizin weit verbreitet eingesetzt. Beispiele dafür sind die Einleitung und Aufrechterhaltung der Allgemeinanästhesie, die Behandlung von Angststörungen, der allgemein gesteigerten Erregbarkeit, Epilepsie oder Schlafstörungen.

Eine Eigenschaft aller allosterischen Modulatoren ist die Tatsache, dass sie für gewöhnlich nur bei submaximal aktivierenden GABA-Konzentrationen wirken (<1mM) und bei Abwesenheit von GABA keine Wirkung zeigen. Viele Substanzen greifen an einer anderen Stelle als der GABA Bindungsstelle des GABA_A Rezeptors an. Diese Substanzen verändern die Struktur der GABA Bindungsstelle in der Weise, dass sie die Affinität von GABA bezüglich Kanalöffnung entweder erhöhen (positiv allosterische Agonisten wie z.B. Diazepam) oder erniedrigen (negativ allosterische Agonisten wie β -Carboline) (Goetz et al., 2007).

1.5.1. Benzodiazepine

1.5.1.1. Allgemeines

Die Haupteffekte von Benzodiazepinen (bekannte Vertreter: Diazepam, Triazolam, Flunitrazepam, Clobazam, Alprazolam oder Midazolam) beruhen auf Sedierung, Anxiolyse, Unterdrückung von Krampfanfällen und Muskelrelaxation. Sedierung wird über α_1 Untereinheiten, Anxiolyse über α_2 Untereinheiten und Muskelrelaxation über α_2 und α_3 Untereinheiten vermittelt. Benzodiazepine brauchen Rezeptoren vom Typ $\alpha\beta\gamma_2$ (z.B. $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_1\beta_3\gamma_2$) um wirken zu können. Ihre Bindungsstelle befindet sich zwischen der α und der γ_2 Untereinheit des GABA_A Rezeptors (Sigel und Buhr, 1997; Ernst et al., 2003). Substanzen, die an der Benzodiazepin-Bindungsstelle wirken, sind klassische Benzodiazepine wie Diazepam aber auch chemisch unterschiedliche Substanzen wie Imidazopyridine (Zolpidem). Entsprechend dem Liganden führt die Benzodiazepin-Bindungsstelle unterschiedliche Effekte aus. Benzodiazepin-Antagonisten wie Flumazenil unterdrücken die Wirkung beider Agonisten (posi-

tiv allosterische Modulatoren) und inverser Agonisten (negativ allosterische Modulatoren) (Goetz et al., 2007).

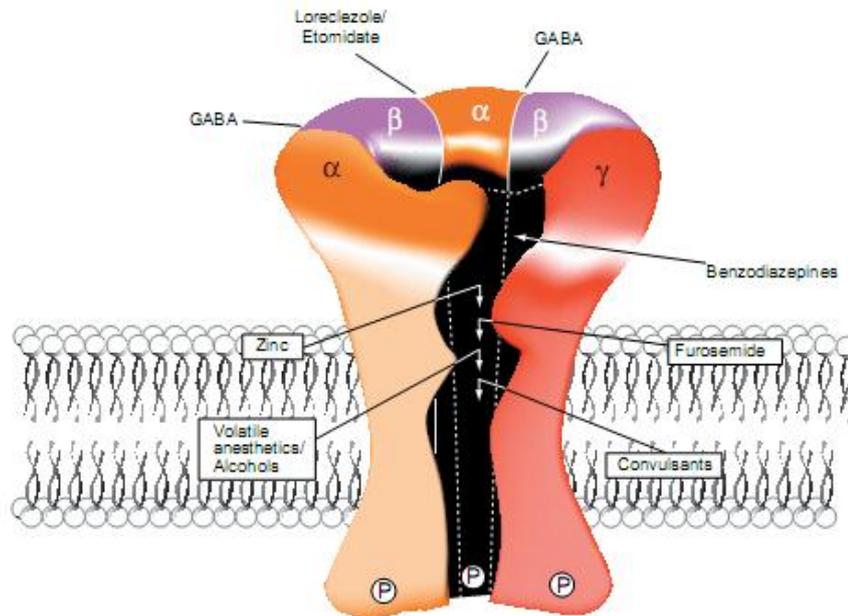


Abb.12. Schematische Darstellung der Agonisten Bindungsstellen innerhalb des GABA_A Rezeptors (Nutt, 2006)

1.5.1.1.1. Unerwünschte Wirkungen

Bei gelegentlicher Anwendung und niedriger Dosierung sind unerwünschte Nebenwirkungen selten. Bei chronischer Einnahme und höherer Dosierung kommt es zu Sedierung, Müdigkeit, Schwindelgefühl, Muskelschwäche, Ataxie, Reaktionszeitverlängerung, Verwirrtheit und Gedächtnisstörungen. Bei älteren Patienten können Stürze und Hüftbrüche aufgrund von Benzodiazepineinnahme resultieren. Die Fahrtüchtigkeit kann bereits in therapeutischer Dosis beeinträchtigt sein. Es kann zur Reduzierung der Selbstkontrolle, Nachlassen kognitiver Fähigkeiten, Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit und Störung motorischer Funktionen führen. Besonders bei gleichzeitiger Einnahme von anderen Hypnotika oder in Kombination mit Alkohol sind Erinnerungslücken sowie motorische Koordinationsprobleme möglich (Norman et al., 1997).

1.5.1.1.2. Abhängigkeit

Eine längere Einnahme von Benzodiazepinen ist mit der Entwicklung einer Abhängigkeit assoziiert. Neben der Entwicklung einer körperlichen Abhängigkeit scheint die anxiolytische und beruhigende Wirkung der Benzodiazepine auch eine psychische Abhängigkeitsentwicklung zu begünstigen. Bei abruptem Absetzen der Benzodiazepineinnahme wurden typische Entzugssymptome (wie Angst, Kopfschmerzen, Tremor, Schläfrigkeit sowie Depressionen) beobachtet. Entzugserscheinungen bei kurzwirksamen Benzodiazepinen nach abruptem Absetzen sind normalerweise heftiger als bei langwirksamen (Heberlein et al., 2009).

1.5.1.1.3. Kontraindikationen

Aufgrund der muskelrelaxierenden Wirkung sind Benzodiazepine bei Patienten mit Myasthenia gravis kontraindiziert. Ebenso können Benzodiazepine die Lage von Patienten mit respiratorischen Atemproblemen verschlechtern. Bei der Anwendung von Benzodiazepinen in der Schwangerschaft ist Vorsicht geboten. Sie werden für gewöhnlich im ersten Trimester der Schwangerschaft nicht empfohlen. In der Spätschwangerschaft sind Atemdepression sowie Versorgungsschwierigkeiten des Kindes möglich. Da Benzodiazepine mit der Muttermilch ausgeschieden werden, können sie vom Säugling aufgenommen werden und folglich Nebenwirkungen hervorrufen (Norman et al., 1997).

1.5.1.1.4. Pharmakokinetik

Die einzelnen Benzodiazepine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften. Sie werden durch verschiedene Isoformen der Cytochrom P450 Enzyme biotransformiert (Mandrioli et al., 2008). Alle Benzodiazepine gelangen schnell ins Gehirn. Es gibt jedoch Unterschiede in den Halbwertszeiten (Rey et al., 1999). Es gibt Evidenz darüber, dass ältere Menschen Benzodiazepine langsamer metabolisieren und damit höhere Plasmakonzentrationen resultieren (Greenblatt et al., 1991).

1.5.1.2. Wirkungsmechanismus

Benzodiazepine und analoge Verbindungen greifen am GABA-System an, und zwar in der Weise, dass sie die hemmende Funktion GABAerger Neuronen verstärken. Es wurden spezifische modulatorische Bindungsstellen für Benzodiazepine an den α -Untereinheiten von GABA_A Rezeptoren im gesamten Zentralnervensystem, in hoher Dichte vor allem in der frontalen und okzipitalen Hirnrinde, im Hippocampus und im Kleinhirn, gefunden. Benzodiazepine reagieren dabei unselektiv mit verschiedenen α -Untereinheiten von GABA_A Rezeptor-Subtypen. Sie wirken an diesen Bindungsstellen als Agonisten. Durch Interaktion mit ihren Bindungsstellen wird die Affinität von GABA zu deren Bindungsstelle, die Teil des Chloridkanals ist, erhöht. Die Benzodiazepine steigern somit durch allosterische Wechselwirkung die Bindungsaffinität von GABA zu ihren Rezeptoren und verstärken dadurch die GABA-Wirkung. Diese kommt dadurch zustande, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit von Chloridkanälen erhöht wird, wodurch vermehrt Chloridionen in die Zelle einströmen. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der entsprechenden Zellen mit der Folge einer verminderten Erregbarkeit (Mutschler et al., 2008).

Substanzen, die eine Selektivität für $\alpha_1\beta_2$ Rezeptoren aufweisen, zeigen bevorzugt sedative und hypnotische Eigenschaften, im Gegensatz zu Rezeptoren vom Typ $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_3\beta_2$ oder $\alpha_5\beta_2$, die hauptsächlich anxiolytisches Potential haben (Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2008).

Benzodiazepine bewirken bereits in nanomolaren Konzentrationen einen Chloridstrom durch GABA_A Rezeptorkanäle. Man beobachtet Sedierung in niedrigeren Dosen, sowie anästhetische Effekte bei höherer Dosierung. Allgemein kann man sagen, dass $\alpha_1\beta_2$ Rezeptoren die sedativen und teilweise antikonvulsiven Eigenschaften vermitteln, sowie die muskelrelaxierende Wirkung und anterograde Amnesie. Die anxiolytische Wirkung wird, wie erwähnt, primär durch $\alpha_2\beta_2$ Rezeptoren und, bei hoher Rezeptoranzahl, auch durch $\alpha_3\beta_2$ Rezeptoren (Walters et al., 2000).

	α_1	α_2	α_3	α_5	γ_2	β_2	β_3	δ
<u>Effekte der Benzodiazepine :</u>								
Sedierung	+	-	-	-		+		
Anxiolyse	-	+	-/+	-				
Amnesie	+			+				
Muskelrelaxation	-		+					
Einschränkung motorischer Funktionen	-	-	-					
antikonvulsiv	+	-	-	-				
Alkoholverstärkung	-			+				
Anästhetische Effekte	+					+	+	+
Angst					+			
Lernen/Gedächtnis				+				+

Tabelle adaptiert nach Rudolph U, 1999

Tabelle 2 : Die Wirkungen ausgewählter GABA_A Rezeptor Untereinheiten

1.5.1.3. Angriffsort

Benzodiazepine greifen bevorzugt an Rezeptoren vom Typ $\alpha_1\beta\gamma_2$, $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$ oder $\alpha_5\beta\gamma_2$ an. Die verantwortlichen Aminosäuren befinden sich innerhalb der N-terminalen Domäne der α und der γ Untereinheit (Walters et al., 2000; Baur und Siegel, 2005).

Sie zeigen hingegen keine Aktivität an $\alpha_4\beta\gamma_2$ und $\alpha_6\beta\gamma_2$ Rezeptoren und eine verringerte Aktivität an Rezeptoren, welche γ_1 oder γ_3 Untereinheiten enthalten. (Olsen und Sieghart, 2008). Die Resultate vieler biochemischer Untersuchungen und Mutationsstudien schreiben die Diazepam-sensitivität primär dem Austausch einer einzigen Aminosäure zu. In der Diazepam-sensitiven α Untereinheit wird ein Histidin in der Position H101 durch ein Arginin, das sich an äquivalenter Stelle bei α_4 und α_6 Untereinheiten befindet, ersetzt. Eine Mutation von Histidin zu Arginin in Position 101 bei den Untereinheiten α_1 , α_2 , α_3 und α_5 verhindert die Bindung von Benzodiazepinen. Die Benzodiazepin-insensitiven α_4 und α_6 Untereinheiten enthalten naturgemäß ein Arginin an der homologen Position (You et al., 2010).

Die Benzodiazepin-Bindungstasche ist größer als die von GABA. Sie kommuniziert mit dem Cystein-loop der α Untereinheit und zieht sich hinunter bis zu dem membranahnen Teil, der möglicherweise Seitenketten von der Verbindung zwischen der transmembranären Region 2 und 3 der α Untereinheit enthält (Goetz et al., 2007).

Hauptangriffsort der Benzodiazepine ist das limbische System. Die vom limbischen System ausgehende emotionsbedingte Aktivierung des „Wach-Systems“ in der Formatio reticularis wird unterdrückt. Es kommt zu einer indirekt schlaffördernden Wirkung. Benzodiazepine erleichtern das Einschlafen, erhöhen die Weckschwelle und verringern die Häufigkeit des gelegentlichen Aufwachens. Der Schlaf ist tief und erfrischend bei kurzzeitiger Anwendung. Häufiges Anwenden hingegen führt zur Gewöhnung (Forth et al., 2001).

Studien haben eine Unterteilung zwischen zwei Gruppen von Rezeptoren vorgeschlagen. Die Gruppe, welche die Untereinheiten α_1 , α_2 , α_3 und α_5 beinhalten, ist sensitiv für klassische Benzodiazepine wie Diazepam, während hingegen Rezeptoren mit α_4 oder α_6 Untereinheiten Diazepam-insensitiv sind. Eine Studie zeigte jedoch, dass Diazepam und Flunitrazepam GABA induzierte Ströme potenziert, die von $\alpha_4\beta_3\gamma_{2L}$ Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus leavis* Oozyten, vermittelt werden. Sie zeigte auch, dass die beobachteten Effekte anscheinend von der Isoform der β Untereinheit abhängen. Im Gegensatz zu Rezeptoren, die β_3 Untereinheiten enthalten, weisen $\alpha_4\beta_1\gamma_{2L}$ und $\alpha_4\beta_2\gamma_{2L}$ Rezeptoren eine solche Modulation nicht auf. Obwohl die β Untereinheit davor nicht in der direkten Bindung von Benzodiazepinen eingeschlossen war, wird die gesamte Rezeptorstruktur wahrscheinlich durch die Anwesenheit aller Untereinheiten im Pentamer geformt, zumal diese die unterschiedlichen Eigenschaften in den Oberflächen der Bindungsstellen erteilen. Weiters wurde bewiesen, dass die Effekte dieser Liganden in einem ähnlichen Konzentrationsbereich auftauchen, wie sie schon für den $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ Rezeptor berichtet wurden. In einer vorhergehenden Studie jedoch wurde kein Beweis für Modulation durch klassische Benzodiazepine an menschlichen $\alpha_4\beta_3\gamma_{2L}$ Rezeptoren, die in Säugetierzellen exprimiert wurden, gefunden. Übereinstimmend mit früheren Daten wurde auch keine hohe Bindungsaffinität von Diazepam oder Flunitrazepam bei derselben Untereinheit, exprimiert in HEK293, entdeckt. Weiters modulierte keiner dieser Liganden GABA vermittelte Ströme, die in diesen Säugetierzellen exprimiert wurden. Obwohl Ergebnisse, die in unterschiedlichen rekombinanten Systemen durchgeführt werden, normalerweise vergleichbar sind, wurden hier eindeutige Unstimmigkeiten beschrieben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Modulation durch Benzodiazepine auf die $\alpha_4\beta_3\gamma_{2L}$ Untereinheit ein oozytenspezifisches Phänomen sein könnte (You et al., 2010).

Folgende Aminosäurereste werden als Teil der Bindungstasche für Benzodiazepinliganden gesehen, bzw. befinden sie sich in deren Nähe: Histidin 101, Tyrosin 159, Glycin 200, Threonin 206 und Tyrosin 209 auf der α_1 Untereinheit und Phenylalanin 77, Alanin 79, Threonin 81 und Methionin 130 auf der γ_2 Untereinheit. Die Region um γ_2 -Phenylalanin 77 zeigte Betasheet-Strukturen und unterliegt Konformationsänderungen bei der Kanalöffnung. Viele der erwähnten Aminosäurereste sind homolog zu Aminosäureresten auf der α_1 und der β_2 Untereinheit, die an der Formation der Bindungsstelle für GABA teilnehmen oder sie befinden sich in deren Nähe. Die oben aufgelisteten Aminosäuren, die entweder die Benzodiazepin-Bindungsstelle oder die GABA Bindungsstelle formen, sind alle homolog zu den Aminosäureresten, die die Bindungsstelle für Acetylcholin auf dem nikotinergen Acetylcholinrezeptor bilden. Untersuchungen deuten drauf hin, dass der Phenylrest von klassischen Benzodiazepinen in der Nähe von γ_2 -Phenylalanin 77 und α_1 -Histidin 101 lokalisiert sein könnte. Weiters wurde gezeigt, dass die Aminosäurereste in der Position 101 der α_1 Untereinheit den allosterischen Effekt der Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle kontrollieren (Berezhnoy et al., 2004).

Die meisten Bindungsstudien wurden mit humanen embryonischen Zellen (HEK) 293 durchgeführt. Diese Experimente haben zahlreiche Aminosäurereste auf Isoformen der α -Untereinheit identifiziert, welche die Bindungsaffinität der Liganden auf der Benzodiazepinbindungsstelle beeinflussen. Wenn Glutaminsäure 225 in der α_3 Untereinheit zu einem Glycin (das sich an derselben Stelle in α_1 G200 befindet), mutiert, verzehnfacht sich die Bindungsaffinität z.B. für Zolpidem. Der Austausch von Histidin 101 durch ein Arginin in der α_1 Untereinheit (α_1 H101R) führt, wie erwähnt, zu einem kompletten Verlust der Bindung von Diazepam oder Zolpidem. Genauso verändern zusätzliche Aminosäurereste wie Isoleucin 210 (entspricht dem Valin V211 in α_1) die Bindungstasche für Benzodiazepine. Der Austausch eines Tyrosinrestes in Position 159 der α_1 Untereinheit durch ein Serin resultiert in einem Verlust der Bindung des Antagonisten Flumazenil. Ersetzt man Tyrosin α_1 Y209 durch Phenylalanin auf der einen Seite und Serin oder Alanin auf der anderen Seite, so wird die Bindungsaffinität für Flumazenil auch gesenkt bzw. aufgehoben. Zwei Aminosäuren in der γ_2 Untereinheit zeigen ausgeprägte Änderungen in der Spezifität der Rezeptorbindung: der Aminosäurerest 77 und 130. Die γ_2 F77I (Phenylalanin gegen Isoleucin) Mutation bewirkt einen kompletten Verlust der Bindungsaffinität für Zolpidem, während die hohe Affinität des Benzodiazepins Flunitrazepam erhalten bleibt. Ein Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin erhöht die Affinität von Zolpidem. Die Mutation γ_2 M130L

(Methionin gegen Leucin) führt zu einem bis zu 51-fachem Verlust der Affinität für Zolpidem (Sigel und Buhr, 1997).

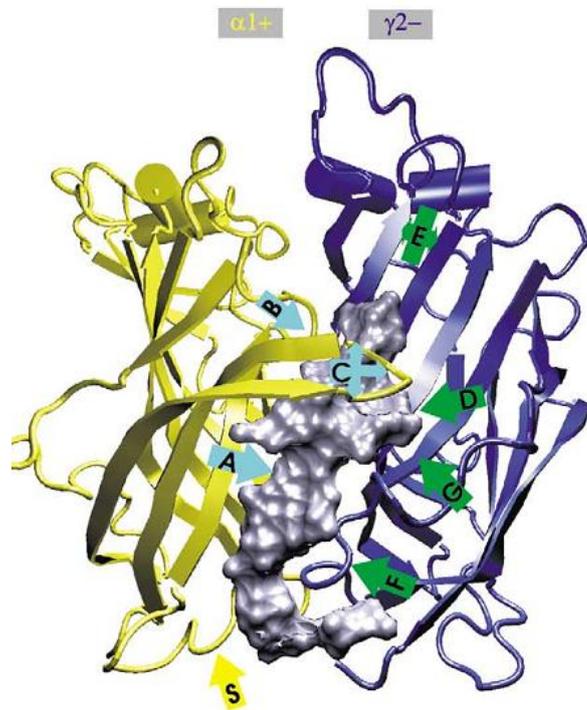


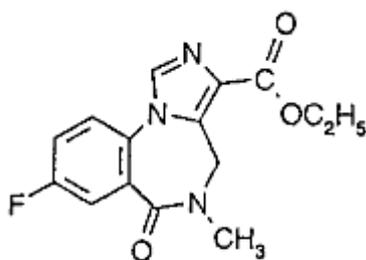
Abb.13. Modell der Benzodiazepin-Bindungstasche zwischen der α und der γ Untereinheit (Ernst et al., 2003)

1.5.1.4. Antagonisten

Vorteilhaft ist, dass mit dem Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil die Wirkung von Benzodiazepinen am Rezeptor spezifisch aufgehoben werden kann. Flumazenil verdrängt Benzodiazepine kompetitiv von deren Bindungsstelle am GABA-Benzodiazepin-Barbiturat-Chloridkanal-Rezeptor-Komplex. Dadurch ist es möglich, die Vigilanz von Patienten gezielt zu steuern und eventuelle, durch Benzodiazepine verursachte Atemstörungen zu beseitigen. Flumazenil kann ferner bei Überdosierungen von Benzodiazepinen angewandt werden (Forth et al., 2001).

Flumazenil interagiert mit GABA_A Rezeptoren vom Typ $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und verhindert somit eine Modulation von GABA-induzierten Strömen verursacht durch Benzodiazepine. Eine Studie beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob Flumazenil auch an $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren die Wirkung von Benzodiazepinen (Triazolam, Clotiazepam) verhindert. Die Studie führte zu dem Ergebnis, dass Flumazenil nicht in der Lage ist, die Effekte von Triazolam und Clotiazepam an $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren zu unterbinden. Diese Daten deuten darauf hin, dass Flumazenil entweder keine oder eine nur sehr schwache

Affinität für die Bindungsstelle in $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren besitzt: Eine andere Theorie ist, dass Flumazenil bei diesen Rezeptoren womöglich mit einer anderen Bindungsstelle als der für Triazolam und Clotiazepam interagiert. Die erste Behauptung wird mit der Untersuchung bestätigt, dass die Bindungsaffinität für Flumazenil etwa 1000-fach in $GABA_A$ Rezeptoren, welche die Mutation γ_2F77I enthalten, reduziert wird. Bei dieser Mutation wird das Phenylalanin in Position 77 der γ_2 Untereinheit durch die korrespondierende Aminosäure (Isoleucin) der γ_1 Untereinheit ersetzt (Khom et al., 2006).



Flumazenil

Barnard et al., 1998

1.6. Barbiturate

Barbiturate beeinflussen auch die Aktivität von $GABA_A$ Rezeptoren. Sie erhöhen die Dauer der Kanalöffnung ohne einen Einfluss auf die Öffnungsfrequenz oder die Kanalleitfähigkeit zu haben. Mehrere Interaktionsstellen der Barbiturate mit dem $GABA_A$ Rezeptor wurden bis jetzt untersucht. Konzentrationen über 50 μM öffnen den $GABA_A$ Rezeptor assoziierten Chloridkanal direkt in Abwesenheit von GABA und in höheren Konzentrationen ändern sie die Desensibilisierung des Rezeptors (Henschel et al., 2008).

Barbiturate haben ihre frühere Bedeutung als Schlaf- und Beruhigungsmittel verloren. Sie dürfen bei Schlafstörungen und zur Sedierung nicht mehr eingesetzt werden. Aus der großen Gruppe der Barbiturate werden in der Anästhesie nur noch das N-methylierte Barbiturat Methohexital (Brevimytal[®] Natrium) und Thiopental (Thiopental Rotexmedica, Thiopental Inresa, Trapanal[®]) eingesetzt. Wegen der schlechten Haltbarkeit der wässrigen Lösung kommen sie als Natriumsalze in Form von Trockenampullen in den Handel und werden als 1 bzw. 2,5 %ige, stark alkalische Lösung

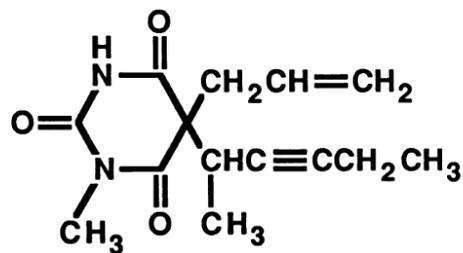
intravenös injiziert. Günstig ist, dass die narkotische Wirkung der beiden Wirkstoffe sehr rasch eintritt, am Ende der Narkose es nur selten zu Erregungszuständen oder zum Erbrechen kommt, nach klinisch üblichen Dosen die Patienten rasch wieder erwachen und auch Zwischenfälle selten vorkommen. Barbiturate bzw. Thiobarbiturate führen durch Angriff am „GABA-Benzodiazepin-Barbiturat-Chloridkanal-Rezeptor-Komplex“ – allerdings an anderen Bindungsstellen als die Benzodiazepine – zu einem verstärkten Einstrom von Chloridionen und damit zu einer Hyperpolarisation von Nervenzellen. In höherer Dosierung unterdrücken sie zusätzlich zentralnervöse Prozesse. Nachteilig ist, dass Barbiturate und Thiobarbiturate nicht analgetisch wirken. Im subnarkotischen Dosisbereich rufen sie sogar eine erhöhte Schmerzempfindung (Hyperalgesie) hervor. Wegen Gefahr vegetativer Reaktionen auf Schmerzreize dürfen daher chirurgische Eingriffe bei einer Barbiturat- bzw. Thiobarbiturat-Narkose nur bei gleichzeitiger ausreichender Gabe von stark analgetisch wirkenden Substanzen durchgeführt werden. Die Atmung wird dosisabhängig unterdrückt, bei Überdosierung kann es zu einer vollständigen Lähmung des Atemzentrums kommen. Am Herzen wirken Barbiturate und Thiobarbiturate negativ inotrop, das Herzzeitvolumen nimmt ab, weshalb die Herzfrequenz reflektorisch steigt. Barbiturate können ferner zu Histaminfreisetzung aus Gewebemastzellen führen. Darüber hinaus begünstigen sie das Auslösen von Bronchospasmen. Methohexital wird größtenteils in der Leber zu unwirksamen Metaboliten biotransformiert. Aus Thiopental entsteht durch partiellen Austausch des Schwefels gegen Sauerstoff das relativ lang wirkende Pentobarbital. Methohexital und Thiopental sind zur Narkoseeinleitung sowie zusammen mit analgetisch wirkenden Substanzen bei kurzdauernden chirurgischen Eingriffen indiziert (Mutschler et al., 2008).

Es wurden nachteilige Effekte auf Kognition und Intelligenz nach einer Barbiturataussetzung während der ersten drei Lebensjahre beobachtet (Henschel et al., 2008).

Pentobarbital kann die GABA_A Rezeptoren $\alpha_1\beta_3\gamma_2$, $\alpha_1\beta_3$, $\beta_3\gamma_2$ und β_3 direkt aktivieren. Wildtyp ρ Untereinheiten sind für Barbiturate insensitiv. Unterschiedlicher Austausch von Tryptophan W238 in der TM3 Domäne der ρ_1 Untereinheit macht den homomeren Rezeptor für Pentobarbital sensitiv. Genauso macht die Mutation ρ_1 (I314S-Isoleucin gegen Serin) in TM2 den Kanal sensitiv für Pentobarbital, nicht jedoch für Propofol (Injektionsnarkotikum) und Pregnanolon (Neurosteroid) (Korpi et al., 2002a). Weiters hängt die Modulation von GABA_A Rezeptoren durch Pentobarbital auch von der β Untereinheit (besondere Bedeutung hat dabei die TM2 Domäne) ab. Die Mutation β_3 (N265S-Asparagin gegen Serin) macht den normalerweise Pentobarbital-sensitiven homomeren Rezeptor insensitiv. Dasselbe gilt für die weniger sensitiven homomeren β_1 Rezeptoren. Außerdem scheint auch ein Glycinrest in der extrazellu-

lären Domäne von TM1 der β_2 (und weniger der α_1) Untereinheit für die steigende und direkte Wirkung von Pentobarbital (und Propofol) wichtig zu sein. Studien mit β_3/ρ_1 Chimären deuten darauf hin, dass die Bindungsstelle für Pentobarbital sich C-terminal von der Mitte der TM2 Domäne befindet. Es sollte hinzugefügt werden, dass die α Untereinheit von heteromeren Rezeptoren auch die Sensitivität für eine direkte Aktivierung durch Barbiturate beeinflusst. Die α_6 Untereinheit ist dabei die sensitivste (Korpi et al., 2002a).

Methohexital



Martone et al., 1991

1.7. Allgemeinanästhetika

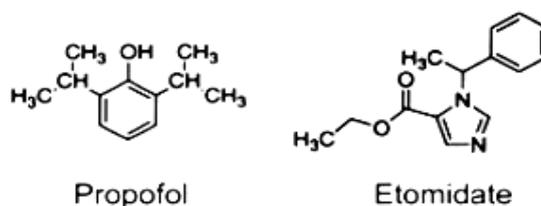
Bei Allgemeinanästhetika unterscheidet man Inhalationsnarkotika und Injektionsnarkotika. Folgende Vertreter sind bekannt:

Inhalationsnarkotika :	Injektionsnarkotika:
Halothan	N-methylierte Barbiturate; Thiobarbiturate
Enfluran	Etomidat
Isofluran	Propofol
Sevofluran	Ketamin
Desfluran	4-Hydroxybuttersäure
Lachgas (N ₂ O)	Opiode (Fentanyl, Alfentanil, Sufentanil, Remifentanil)
	intravenös applizierbare Benzodiazepine

Tabelle adaptiert nach Mutschler et al., 2008

Tabelle 3: Einteilung der Allgemeinanästhetika

Die meisten dieser Anästhetika üben drei separate Effekte an GABA_A Rezeptoren aus: in geringen Konzentrationen modulieren sie GABA-induzierte Ströme, während sie in höheren Konzentrationen den Rezeptor direkt, in Abwesenheit von GABA, aktivieren. Bei noch höheren Konzentrationen unterbinden viele Anästhetika sowohl GABA- als auch Anästhetika-induzierte Ströme. Diese unterschiedlichen Wirkungen lassen darauf zurückschließen, dass GABA_A Rezeptoren mehrere verschiedenartige Bindungsstellen enthalten. Zumindest für einige Anästhetika ist ihre Bindungsstelle eine andere als die GABA Bindungsstelle. Übereinstimmend damit wurde gezeigt, dass die Konformation vom M3-Segment oder von der Proteindomäne, welche diese umgibt, unterschiedlich ist in Anwesenheit von potenzierenden und aktivierenden Konzentrationen von Propofol, einem häufig verwendeten Allgemeinanästhetikum. Einzelkanalstudien haben ähnliche Leitfähigkeiten gezeigt, aber eine unterschiedliche Kinetik nach Aktivierung durch GABA und durch Allgemeinanästhetika. Dies führte zu der Annahme, dass obwohl die Bindungsstelle der Anästhetika eine andere ist als die GABA Bindungsstelle, der Zustand der geöffneten Kanalstruktur ein ähnlicher sowohl in Anwesenheit von GABA als auch von Anästhetika, ist. (Rosen et al., 2007). Studien über GABA-unabhängige Wirkung von Propofol sind zu der Erkenntnis gekommen, dass die α Untereinheit eine bedeutende Rolle für Propofol spielt. Es wurde keine direkte Aktivierung von $\alpha_4\beta_1\gamma_2$ Rezeptoren beobachtet, aber eine höhere Wirkung in $\alpha_6\beta_3\gamma_2$ als in $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren, obwohl Propofol eine höhere Wirksamkeit in der Potenzierung von GABA Effekten in dem letztgenannten Rezeptor zeigt. Carlson et al. (2000) fand heraus, dass die α_1 (G233F-Glycin gegen Phenylalanin) Mutation den maximalen Effekt von Propofol vermindert. In $\alpha_2\beta_3$ (N265M-Asparagin gegen Methionin) γ_2 und $\alpha_2\beta_3$ (M286W-Methionin gegen Tryptophan) γ_2 Rezeptoren ist die potenzierende Wirkung von Propofol erniedrigt, aber nur $\alpha_2\beta_3$ (N265M-Asparagin gegen Methionin) γ_2 Rezeptoren zeigen auch eine verminderte direkte Aktivierung durch Propofol (Korpi et al., 2002a).



Lü und Xu, 2002

1.8. Neurosteroide

Neuroaktive Steroide modulieren den GABA_A Rezeptor in vielen Gehirnregionen. Natürlich vorkommende Steroidmetabolite bilden sich lokal im Gehirn: 5 α - Reduktase wandelt Progesteron in 5 α -DP (Dihydroprogesteron), das wiederum von der 3 α -hydroxysteroid-oxidoreduktase zu Allopregnanolon (3 α 5 α -THP) reduziert wird. Allopregnanolon aktiviert den GABA_A Rezeptor. Neurosteroide besitzen keine absolute Spezifität für bestimmte Kombinationen von Rezeptoruntereinheiten (Goetz et al., 2007).

Steroide werden sowohl in der Peripherie als auch im Gehirn synthetisiert. Im Gehirn heißen sie dann Neurosteroide. Sie sind dafür bekannt, langsam entwickelnde Effekte auf die Stimmungslage und das Verhalten zu besitzen. Sie agieren direkt mit dem GABA_A Rezeptor indem sie die synaptische Transmission modulieren. Wie bei den Barbituraten geht man bei Steroiden davon aus, dass sie mindestens zwei unterschiedliche Bindungsstellen am GABA_A Rezeptor haben. Diese Behauptung wird durch dosisabhängige Wirkungen mancher Steroide bestätigt. Bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich erhöhen Alphaxalon und einige andere Metabolite von Progesteron die GABA-induzierte Chloridleitfähigkeit. In höheren Konzentrationen (≥ 100 nM) wird der GABA_A Rezeptor direkt, in Abwesenheit von GABA, aktiviert. Die neuroaktiven Steroide wie Allopregnanolon und Allotetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC) sind potente positive allosterische Modulatoren von GABA_A Rezeptoren mit sedativen, anxiolytischen und antikonvulsiven Eigenschaften. Darüber hinaus sind sulfatierte Neurosteroide wie Pregnanolonsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat negative GABA_A Rezeptormodulatoren und bewirken angstauslösende und konvulsive Effekte (Henschel et al., 2008).

In vitro Experimente haben bewiesen, dass GABA_A Rezeptoren auf niedrige Steroidkonzentration sensitiv sind. Niedrige Konzentrationen kommen physiologisch vor. Diese natürlich vorkommenden Neurosteroidspiegel sind nicht statisch, sondern ändern sich zum Beispiel während Stress oder im letzten Schwangerschaftsabschnitt oder nach dem Konsum verschiedener psychoaktiver Mittel wie z.B. Ethanol. Berücksichtigt man die Tatsache, dass GABA_A Rezeptoren ubiquitär im gesamten Nervensystem von Säugetieren exprimiert werden, könnte erwartet werden, dass solche Änderungen des Neurosteroidspiegels eine generalisierte Erhöhung neuronaler Inhibition bewirken würden. Diese Effekte wären jedoch physiologisch nicht vereinbar. Es gibt jedoch Beweise dafür, dass GABA-potenzierende Wirkungen der Neurosteroide nur in gewissen Gehirnregionen vorkommen und durchaus neuronspezifisch sind.

Die Auswirkungen der Pregnansteroide sind ähnlich denen anderer positiv allosterischer Regulatoren des GABA_A Rezeptors und zwar haben sie auch anxiolytische, antikonvulsive, und sedative Eigenschaften. In hohen Dosen bewirken sie sogar eine Allgemeinanästhesie.

Die Effekte der Neurosteroiden auf die einzelnen Untereinheiten des GABA_A Rezeptors:

α Untereinheit:

Die Isoformen der α Untereinheit (α₁₋₆) beeinflussen die GABA-modulatorische Wirkung von 3α, 5α-THP nicht stark, wenn sie mit β₁ und γ_{2L} Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden. Demzufolge werden GABA-hervorgerufene Effekte, die durch α₁β₁γ₂ und α₃β₁γ₂ Rezeptoren vermittelt werden, schon bei relativ niedrigen Konzentrationen (3nM) von 3α, 5α-THP signifikant potenziert. Dagegen wird bei α₆β₁γ₂ Rezeptoren ein ähnlicher Einfluss von 3α, 5α-THP erst bei 10 nM beobachtet. Außerdem ist eine Steroidkonzentration von 30nM notwendig, um die Wirkung der korrespondierenden Rezeptoren mit α₂-, α₄- oder α₅ Untereinheiten signifikant zu erhöhen. Es sollte jedoch hinzugefügt werden, dass die Steroidsensitivität von α₄ – enthaltenden Rezeptoren auch von den anderen Untereinheiten des Rezeptors abhängt, da z.B. δ Untereinheit enthaltende Rezeptoren eine hohe Sensitivität für Steroide aufweisen (Lambert et al., 2003).

β-Untereinheit:

Anders als bei Allgemeinanästhetika und Antikonvulsiva, deren Wirkung stark von den β-Isoformen abhängig ist, zeigen sie bei Neurosteroiden eine geringe Beeinflussung auf die Modulation von GABA (Lambert et al., 2003).

γ-Untereinheit:

Die Anwesenheit einer γ Untereinheit innerhalb des GABA_A Rezeptorkomplexes ist zwar essentiell für die Wirkung der Benzodiazepine in sub-mikromolaren Konzentrationen, aber sie ist nicht notwendig für eine Wirkung der Neurosteroiden. Dies beweist ein Vergleich der Modulation von GABA Effekten durch 3α, 5α-THP bei α₁β₁ und α₁β₁γ₂ Rezeptoren. Der Vergleich zeigte einen höheren Effekt der Steroide bei α₁β₁ Rezeptoren in der Weise, dass der GABA-hervorgerufene Effekt über dem maximal möglichen Effekt von GABA erhöht wurde. Die Isoform der γ-Untereinheit hat wenig bis keinen Effekt auf die maximale GABA-modulatorische Wirkung von 3α, 5α-THP

aber sie hat einen signifikanten Einfluss auf die Wirkung (EC_{50}) der Steroide bei physiologischen Konzentrationen (3-30nM). Neurosteroiden sind bei γ_1 enthaltenden Rezeptoren nicht wirksam (Lambert et al., 2003).

ϵ -Untereinheit:

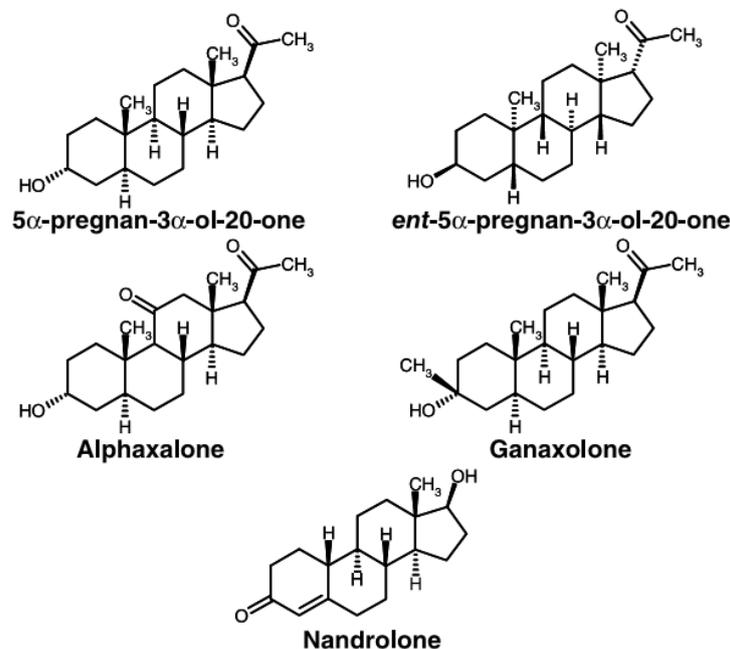
Es wurde berichtet, dass die ϵ -Untereinheit insensitive für Pregnandsteroiden ist, obwohl Steroide durchaus eine sichtbare direkte Aktivierung des $GABA_A$ Rezeptors induzieren. Eine Interpretation dieser direkten Aktivierung legt die Beobachtung zugrunde, dass der Einbau einer ϵ -Untereinheit innerhalb des Rezeptorkomplexes einen konstitutiv aktiven $GABA_A$ Rezeptor generiert. Somit ist nicht klar, ob das Steroid den Rezeptor direkt aktiviert oder als ein Modulator dabei spielt, spontane Kanalöffnungen zu erhöhen (Lambert et al., 2003).

δ Untereinheit:

Neurosteroiden steigern die Affinität von GABA an $GABA_A$ Rezeptoren, die δ Untereinheiten enthalten (Glykys und Mody, 2007). Zum Beispiel ist der $\alpha_4\beta_3\delta$ Rezeptor hochsensitiv im Vergleich zum korrespondierenden $\alpha_4\beta_3\gamma_2$ Rezeptor. In vivo Studien mit Mäusen, bei denen die δ Untereinheit genetisch gelöscht wurde, zeigten abgeschwächte antikonvulsive und anästhetische Effekte der Neurosteroiden. Weiters ist erwähnenswert, dass für bestimmte Neuronen wie zerebrale Granuloneuronen, gezahnte Granulazellen des Hippokampus und Neuronen des ventrobasalen Komplexes der Thalamus, δ Untereinheit enthaltende Rezeptoren sich extrasynaptisch befinden und durch ihre hohe Affinität für GABA einen erheblichen Teil zu der tonischen Inhibition, die in diesen Neuronen vorkommen, beitragen. Es wird demnach immer klarer, dass solche tonischen Ströme einen beachtlichen Einfluss auf die neuronale Signalweiterleitung ausüben und diese Rezeptoren somit ein wichtiges Target für Neurosteroiden sein könnten (Lambert et al., 2003).

Immer mehr Daten liefern den Beweis, dass eine Phosphorylierung einen zusätzlichen Beitrag dazu leistet, die Interaktion der Neurosteroiden mit $GABA_A$ Rezeptoren dynamisch zu regulieren. Die Auswirkung der Phosphorylierung von $GABA_A$ Rezeptoren ist komplex und abhängig von der Art der Kinase, der Zusammenstellung der Untereinheiten des Rezeptors und von den Aminosäureresten, die phosphoryliert werden. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen könnten einen Einfluss auf die Funktion von $GABA_A$ Rezeptoren haben und zusätzliche Effekte auf den Rezeptorumsatz und Rezeptorassemblierung. Die GABA-modulatorischen Effekte von Neurosteroiden auf rekombinanten $GABA_A$ Rezeptoren werden durch Phorbolester erleichtert, die für die Proteinkinase C (PKC) eine Rolle spielen. Es ist also be-

wiesen, dass eine Phosphorylierung die Interaktion von Neurosteroiden mit synaptischen GABA_A Rezeptoren beeinflussen kann. Aus den bisherigen Daten kann man entnehmen, dass die Auswirkung der Phosphorylierung auf die Neurosteroidmodulation von synaptischen GABA_A Rezeptoren neuronspezifisch zu sein scheint. So sind z.B. gezahnte Granulazellen im Hippokampus insensitiv gegenüber 3 α , 5 α -THP und 3 α , 5 β -THP. Diese Granulazellen wiederum sind äußerst sensitiv gegenüber nanomolaren Konzentrationen von Ganaxolon, ein metabolisch stabiles Analogon von 3 α , 5 α -THP (Lambert et al., 2003).

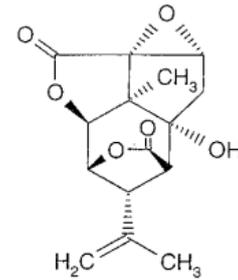
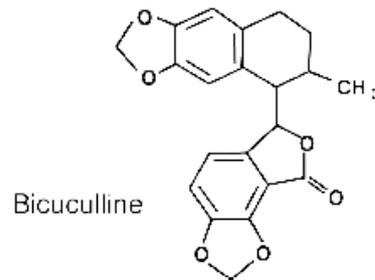
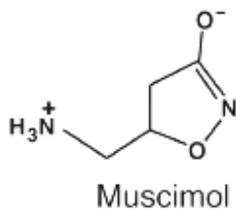


Die chemischen Strukturen einiger synthetischer und endogener Neurosteroide (Lambert et al., 2003).

1.9. Diverse

1.9.1. Muscimol, Bicucullin, Picrotoxin

Allgemein werden GABA_A Rezeptoren selektiv durch den GABA Agonisten Muscimol aktiviert und kompetitiv durch den GABA Antagonisten Bicucullin geblockt. Rezeptoren mit ρ Untereinheiten sind Bicucullin und Barbiturat-insensitiv, da sie eine eigene spezielle Pharmakologie besitzen. Picrotoxin blockiert den GABA_A Rezeptor nicht-kompetitiv, wahrscheinlich bindet es seitlich im Kanal (Goetz et al., 2007).



Jorgensen, 2005

Barnard et al., 1998

1.9.2. Kationen

1.9.2.1. Zink Zn^{2+}

Der Effekt von Zn^{2+} auf $GABA_A$ Rezeptoren wurde bisher intensiv studiert. Die Effekte unterscheiden sich je nach Art und Reife der Neuronen und nach der Zusammenstellung der Untereinheiten der $GABA_A$ Rezeptoren (Korpi et al., 2002a).

Wenige allosterische Modulatoren befinden sich natürlich im Gehirn (Zn^{2+} , Neurosteroid). Zn^{2+} inhibiert den $GABA_A$ Rezeptor und wird zusammen mit anderen Neurotransmittern wie GABA und Glutamat freigesetzt. In rekombinanten $GABA_A$ Rezeptoren hat Zn^{2+} eine 3400-mal stärker inhibierende Wirkung an $\alpha\beta$ Rezeptoren als an $\alpha\beta\gamma_2$. Demnach senkt die γ_2 Untereinheit die Empfindlichkeit von $GABA_A$ Rezeptoren für Zn^{2+} (Goetz et al., 2007).

$\alpha_6\beta_3\delta$ $GABA_A$ Rezeptoren sind für Zn^{2+} Inhibition am sensitivsten, wobei ein Austausch der δ Untereinheit durch eine γ Untereinheit die Sensitivität reduziert. Darüber hinaus mindert auch eine Substitution der α_6 Untereinheit durch eine α_1 Untereinheit den Effekt von Zn^{2+} . Auch eine Mutation in TM2 (H292A-Histidin gegen Alanin) in homomeren β_3 und heteromeren $\alpha_1\beta_3$ (H292A) Rezeptoren inhibiert die Wirkung von Zn^{2+} und somit kann man darauf schließen, dass dieser Aminosäurerest für die Bindung von Zn^{2+} innerhalb des anionenspezifischen Kanals von $GABA_A$ Rezeptoren wichtig sein muss. Auch die α Untereinheit in $\alpha_x\beta_3\gamma_{2L}$ Rezeptoren beeinflusst die Sensitivität und Wirksamkeit der Zn^{2+} Inhibition, wobei durch α_1 eine höhere Sensitivität aber eine geringere Wirksamkeit als durch α_2 und α_3 vermittelt wird. All diese Daten deuten darauf hin, dass Zn^{2+} Bindungsstellen besitzt, die durch Interaktion der verschiedenen Untereinheiten geformt werden (Korpi et al., 2002a).

1.9.2.2. Lanthan La^{3+}

Studien haben gezeigt, dass La^{3+} GABA-aktivierte Ströme in nativen und rekombinanten GABA_A Rezeptoren erhöht, indem es die Sensitivität vom Rezeptor für GABA steigert. GABA_A Rezeptoren sind für La^{3+} in einer α Untereinheit abhängigen Weise sensitiv. La^{3+} potenziert Ströme von $\alpha_1\beta_3\gamma_{2L}$ Rezeptoren, während hingegen $\alpha_6\beta_3\gamma_{2L}$ Ströme schwach und die von $\alpha_6\beta_3\delta$ stark inhibiert werden (Korpi et al., 2002a).

1.9.3. Ethanol

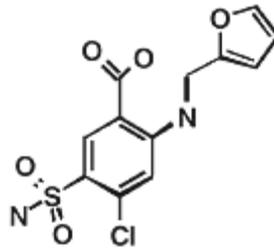
Ethanol beeinflusst viele Kanäle, inklusive dem N-methyl-D-aspartat (NMDA) Glutamaterezeptor. Die Wirkung von Ethanol auf GABA_A Rezeptoren dagegen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. So schien die Modulation von GABA_A Rezeptoren durch geringe Ethanolkonzentrationen von der Anwesenheit einer γ_{2L} Untereinheit abhängig zu sein. Die acht zusätzlichen Aminosäuren der γ_{2L} Variante enthalten, verglichen mit der kürzeren γ_{2S} Variante eine spezifische Phosphorylierungsstelle für PKC (Proteinkinase C) in dessen intrazellulärem Loop zwischen TM3 und TM4. Eine andere Vermutung ist, dass Ethanol die Funktion des GABA_A Rezeptors direkt über diese Phosphorylierungsstelle beeinflusst und bei höheren Konzentrationen über eine andere Stelle im Rezeptor. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass einige Studien keinen Unterschied in der Potenzierung von GABA Effekten durch Ethanol bei den beiden Isoformen fanden (Korpi et al., 2002a).

Gesichert ist heute, dass niedrige Ethanolkonzentrationen (ungefähr 3mM) spezifisch die GABA Wirkung von $\alpha_4\beta\delta$ und $\alpha_6\beta\delta$ Rezeptoren in *Xenopus leavis* Oozyten potenzieren. Dieser Effekt ist von der β Untereinheit anhängig. β_3 Untereinheiten stellen dabei die größte Empfindlichkeit für Ethanol dar (Goetz et al., 2007; Wallner et al., 2006).

1.9.4. Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid mindert GABAerge Effekte in neuronalen Zellpopulationen auf unterschiedliche Art und Weise. Furosemid interagiert mit der Aufrechterhaltung des Cl^- Gradienten mit Hilfe des gut beschriebenen Chlorid/Kation-Cotransporters. Ebenso blockiert Furosemid den Kalium/Chlorid Cotransporter KCC2, der an der Entstehung des Gradienten für Chloridionen beteiligt ist, der für die Hyperpolarisationswirkung durch GABA_A Rezeptoren wichtig ist.

GABA_A Rezeptor Effekte im Cortex cingularis werden nicht automatisch nach Applikation von Furosemid beeinflusst, sondern eher nach anhaltender Furosemidperfusion. Furosemid antagonisiert schnell und reversibel GABA Effekte von rekombinanten $\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2$, nicht aber von $\alpha_6\beta_1\gamma_2$ Rezeptoren oder dem weit verbreiteten $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ Rezeptor in *Xenopus leavis* Oozyten. Studien mit verschiedenen β Variationen in $\alpha_6\beta_x\gamma_2$ haben gezeigt, dass die Interaktion mit Furosemid identisch ist für $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ und $\alpha_6\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren, während hingegen β_1 enthaltende Rezeptoren für Furosemid insensitiv sind. Demzufolge wird die Furosemid Sensitivität sowohl durch α_6 als auch durch die $\beta_{2/3}$ Untereinheiten bestimmt. Durch Studien vermutet man, dass Furosemid-sensitive GABA_A Rezeptoren in Neuronen des Hippocampus vorkommen (Korpi et al., 2002a).



Furosemid (Korpi et al., 2002a).

2. GABA_B Rezeptor

Im Gegensatz zu schnellen Effekten über ionotrope GABA_A Rezeptoren, wird langsame inhibitorische Neurotransmission durch metabotrope GABA_B Rezeptoren vermittelt (Owens und Kriegstein, 2002). GABA kann die Erregbarkeit der Zellmembran auch verhindern, indem K⁺ Kanäle geöffnet und Ca²⁺ Kanäle geschlossen werden (Jorgensen, 2005).

Gegen Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre gab es erste Evidenz für Bicucullin-insensitive und chloridunabhängige GABA-vermittelte Effekte im Gehirn. Später erkannte man, dass diese Wirkung nicht von ionotropen GABA_A Rezeptoren, sondern durch metabotrope GABA_B Rezeptoren vermittelt wird. GABA_B Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert und verwenden an diesen Stellen unterschiedliche Mechanismen, um die Zellerregbarkeit zu regulieren. Präsynaptische Inhibition entsteht durch GABA_B Rezeptor vermittelte Reduktion von Calciumströmen an den Nervenendigungen und eine darauffolgende Reduktion der Transmitterfreisetzung. Während hingegen postsynaptische Inhibition durch GABA_B Rezeptoren eine Aktivierung von Kaliumströmen, die eine Hyperpolarisation am Neuron bewirken, entsteht (Owens und Kriegstein, 2002; Bettler und Tiao, 2006; Ulrich und Bettler, 2007).

GABA_B Rezeptor vermittelte postsynaptische Potentiale sind kaliumabhängig und hyperpolarisieren für gewöhnlich die Membran bis hin zum Gleichgewichtspotential für Kaliumionen (unter -70 mV). Diese Potentiale produzieren eine geringere Änderung in der Membranleitfähigkeit als GABA_A Potentiale. Sie sind aber stark inhibitorisch, weil sie das Auslösen eines Aktionspotentials erschweren (Owens und Kriegstein, 2002).

Es wurden fünf Hauptgruppen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren identifiziert, die jedoch keine Sequenzähnlichkeit aufweisen. Allerdings haben diese Rezeptoren eine zentrale Kerndomäne gemeinsam, die aus sieben transmembranären Helices aufgebaut ist und die für die G-Proteinkopplung verantwortlich ist. GABA_B Rezeptoren sind Vertreter der Klasse C G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Klasse C Rezeptoren besitzen zwei besondere Eigenschaften, die für ihre Regulation und Funktion wichtig sind. Die erste Besonderheit vieler Klasse C Rezeptoren ist die Anwesenheit einer langen extrazellulären Domäne, an die natürliche Liganden binden können. Die zweite spezifische Eigenschaft ist ihre grundlegende dimere Form (Goudet et al., 2009).

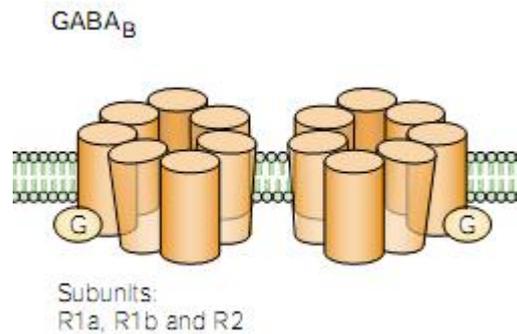


Abb. 14. Schematische Darstellung des GABA_B Rezeptor-Chloridkanals (Owens und Kriegstein, 2002)

GABA_B Rezeptoren sind Heteromere, die durch Assemblierung von GABA_{B1} mit GABA_{B2} Untereinheiten geformt werden. GABA_B Rezeptoren sind Mitglieder einer Unterfamilie der KCTD (potassium channel tetramerization domain-containing)-protein. KCTD Proteine 8, 12, 12b und 16 zeigen ein unterschiedliches Expressionsprofil im Gehirn von Säugetieren und assoziieren stark mit dem Carboxyterminus von GABA_{B2} Rezeptoren zu Tetrameren. Diese Coassemblierung ändert die Eigenschaften von GABA_{B(1,2)} Kernrezeptoren. Die KCTD Proteine erhöhen die Wirksamkeit von Agonisten und modifizieren deutlich die G-Protein-gekoppelte Signalübermittlung von Rezeptoren durch Beschleunigung des Effektes und indem sie die Desensibilisierung in einer KCTD-subtypspezifischen Weise fördern. Zusammenfassend kann man sagen, dass KCTD Proteine Hilfs-Untereinheiten von GABA_B Rezeptoren darstellen, die die Pharmakologie und die Kinetik der Rezeptorwirkung festlegen (Schwenk et al., 2010).

Die GABA_{B1} Untereinheit ist für die Ligandenerkennung verantwortlich, ist aber nicht fähig, die Zelloberfläche zu erreichen bzw. G-Proteine zu aktivieren. Im Gegensatz dazu steht die GABA_{B2} Untereinheit, die zwar nicht in der Lage ist GABA zu binden, die jedoch für die G-Proteinkopplung verantwortlich ist. Folglich müssen GABA_{B1} und GABA_{B2} assoziiert sein, um einen funktionsgemäßen Rezeptor zu formen (Goudet et al., 2009).

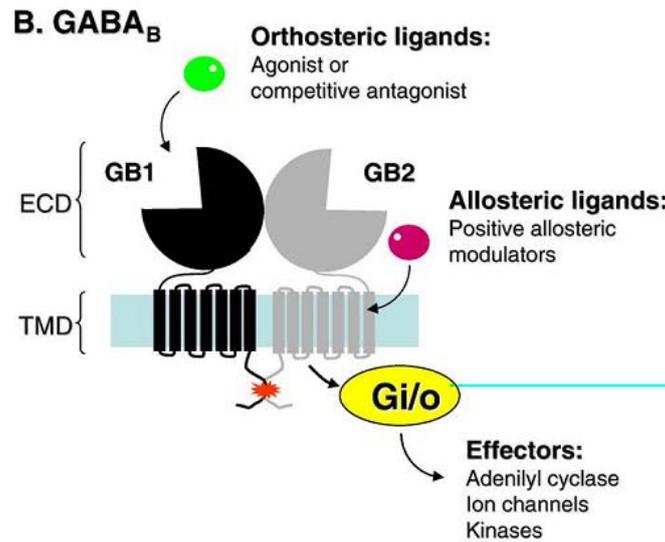
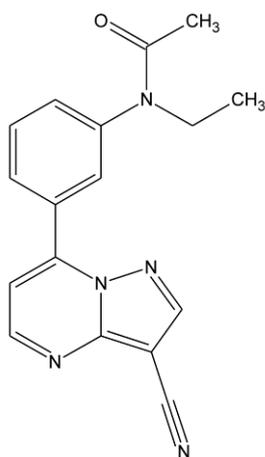


Abb. 15. GABA_B Rezeptor, bestehend aus den Untereinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2} (Goudet et al., 2009).

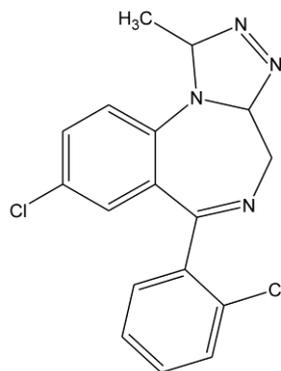
Kürzlich wurden Mäuse mit nicht funktionierenden GABA_B Rezeptoren generiert. Diese entwickelten eine spontane Epilepsie und Abnormalitäten im Verhalten, Hyperalgesie inkludiert sowie beeinträchtigte Gedächtnisleistungen. Ihre Gehirnmorphologie schien jedoch normal zu sein (Owens und Kriegstein, 2002).

Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit mit 3 ausgewählten Liganden (Zaleplon, Triazolam, Midazolam) untersucht werden. Dafür sollten folgende Experimente durchgeführt werden:

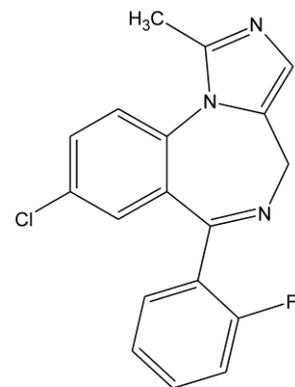
- Expression von $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ und $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$ Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten und Messung der GABA-induzierten Ströme mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik
- Erstellung einer Zaleplon Konzentrations - Wirkungskurve an $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$ Rezeptoren und Vergleich der potentiell unterschiedlichen Effekte an verschiedenen Rezeptor-Subtypen bzw. mutierten Rezeptoren
- Erstellung einer Triazolam Konzentrations - Wirkungskurve an $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$ Rezeptoren und Vergleich der Effekte an den zwei natürlich vorkommenden Rezeptor-Subtypen ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$ und $\alpha_2\beta_2\gamma_1$) und zwei mutierten Rezeptoren
- Erstellung einer Midazolam Konzentrations - Wirkungskurve an $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$ Rezeptoren und Vergleich der potentiell unterschiedlichen Effekten an verschiedenen Rezeptor-Subtypen bzw. mutierten Rezeptoren



Zaleplon



Triazolam



Midazolam

4. Methoden

Zur Untersuchung von elektrischen Membranvorgängen werden in der Elektrophysiologie verschiedene Messtechniken verwendet. Für meine Untersuchungen wurde die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gewählt. Diese Technik ermöglicht es, transmembranäre Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential zu messen.

Xenopus laevis Oozyten sind heute ein Standardobjekt für die Expression und funktionelle Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren. Gurdon et al. entdeckten schon 1971 die Fähigkeit funktioneller Expression exogener mRNA-Spezies durch Injektion der mRNA in das Zytoplasma der Froschoozyten.

4.1. Oozytenpräparation:

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) wurden 15-30 min lang in einer 0,2 %igen Lösung von Tricain (= Methansulfonsäuresalz des 3- Aminobenzoessäurethylesters; MS-222) anästhetisiert. Daraufhin wurde vorsichtig mit einer Pinzette Follikelgewebe operativ entnommen.

Das Follikelgewebe wurde in einer Petrischale mit OR2- Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 5 mM HEPES; pH=7,5 (1M NaOH)) übergeführt. Dann wurde es zuerst mechanisch zerkleinert und danach für etwa 90 min in einer Collagenase- Lösung inkubiert (2mg Collagenase Sigma Typ IA/ml OR2), um das Bindegewebe und die Follikelzellen zu entfernen (Boyle et al., 1991; Goldin 1993).

Durch diese Kollagenasebehandlung konnte rasch eine große Anzahl von einzelnen Oozyten präpariert werden. Da Calcium durch die Aktivierung unspezifischer Proteasen toxisch wirkt (Goldin, 1993), mussten die Oozyten vor und vor allem aber nach der Kollagenase-Behandlung gründlich mit OR2- Lösung gewaschen werden. Danach wurden sie in ND96- Lösung (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES; pH=7,4 (1M NaOH)) transferiert.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von einigen Stunden wurden Stadium V-VI Oozyten (Durchmesser 1000-1200 µm) ausgewählt, da diese sich am besten zur Injektion eignen (Goldin, 1993).



Abb. 17. Weiblicher Xenopus laevis Frosch

<http://www.mcdb.lsa.umich.edu/images/research/areasoffocus/neurobiology/neuropicture.jpg>

4.2. cRNA-Vorbereitung:

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

4.3. Injektion von cRNA:

Bei der Injektion von cRNA in den Oozyten musste auf ausreichende, mechanische Stabilität geachtet werden, um die Oozyten nicht zu verletzen. Vor der Injektion wurden die einzelnen cRNAs, die für die verschiedenen Untereinheiten kodieren, im Verhältnis 1:1:10 für die zu untersuchenden Rezeptoren gemischt. Meine Rezeptoren waren $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$ und $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79Fx132M$. Etwa 10 bis 50 nl dieser Lösung wurden mithilfe eines pneumatischen Injektionsgerätes in die einzelnen Oozyten injiziert (d.h. bis der Oozyt deutlich an Größe zugenommen hatte).

Nach der Injektion wurden die Oozyten für weitere 24 Stunden bei 18° in ND96 + Penicillin 100 U/ml und Streptomycin (100 µg/ml) inkubiert und konnten danach für die Messungen verwendet werden.

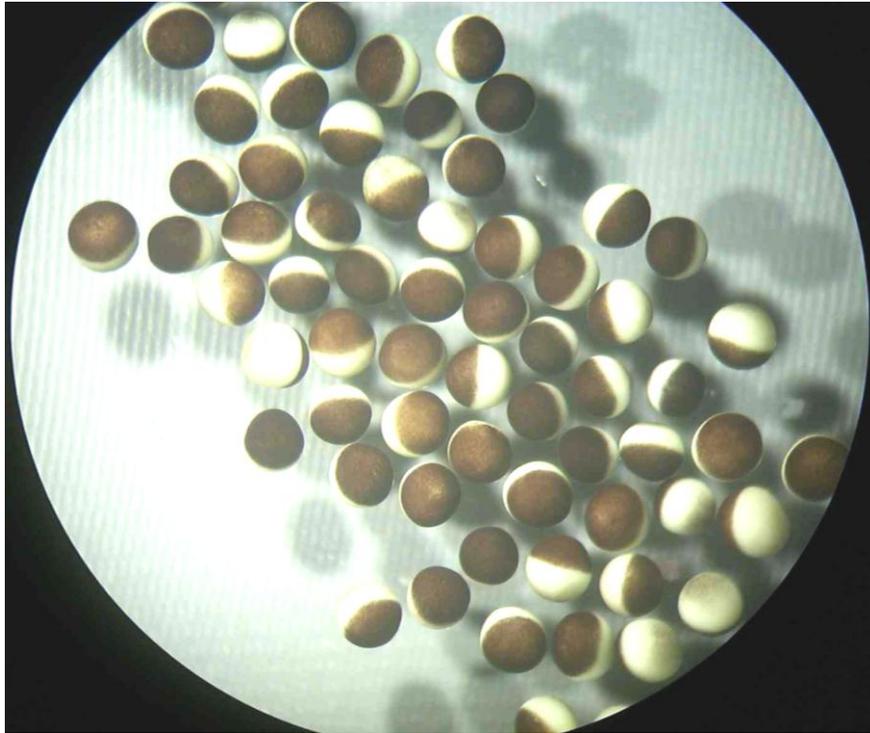


Abb. 18. Xenopus laevis Oozyten

http://www.innovations-report.de/bilder_neu/10964_ionenkanal_2.jpg

4.4. Messlösungen:

Eine Stammlösung von Midazolam, Triazolam und Zaleplon (Konzentration 10 mM) wurde in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Eine 1 mM GABA- Stammlösung musste jeden Tag frisch bereitet werden (5.15 mg GABA in 50 ml ND 96). Bei den Testlösungen war zu beachten, dass die DMSO- Konzentration 0.3% nicht überstieg. Lösungen für die Messungen mussten ebenfalls täglich frisch zubereitet werden.

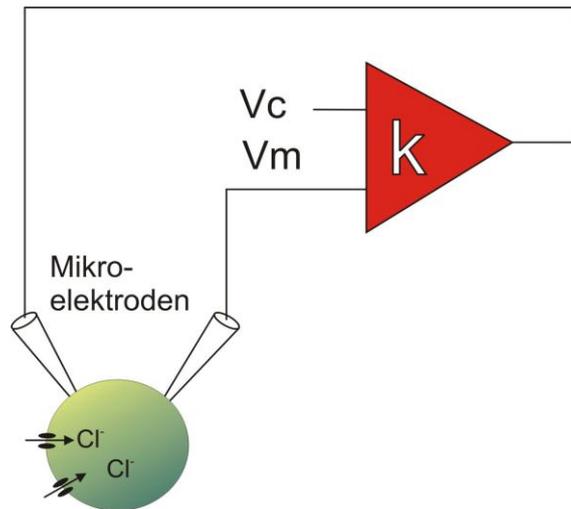


Abb. 19. Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

4.5. 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Voltage Clamp):

Der Versuchsaufbau für die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik von *Xenopus laevis* Oozyten ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt.

Die Versuchsanordnung besteht aus einer intrazellulären Elektrode (V) zur Messung des transmembranären Potentials, einem Rückkopplungsverstärker, der die Abweichung des tatsächlichen Potential zum benötigten Potentials (Haltepotential) misst und einer zweiten, intrazellulären Elektrode (I), die den um das Haltepotential zu erreichen bzw. konstant zu halten benötigten Strom in den Oozyten injiziert („voltage clamp“- Prinzip).

Der Verstärker funktioniert nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung, da der über die zweite Mikroelektrode injizierte Strom jeweils mit umgekehrtem Vorzeichen zum von der Zellmembran generierten Aktionsstrom fließt (Hille, 1992).

4.6. Perfusionssystem:

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

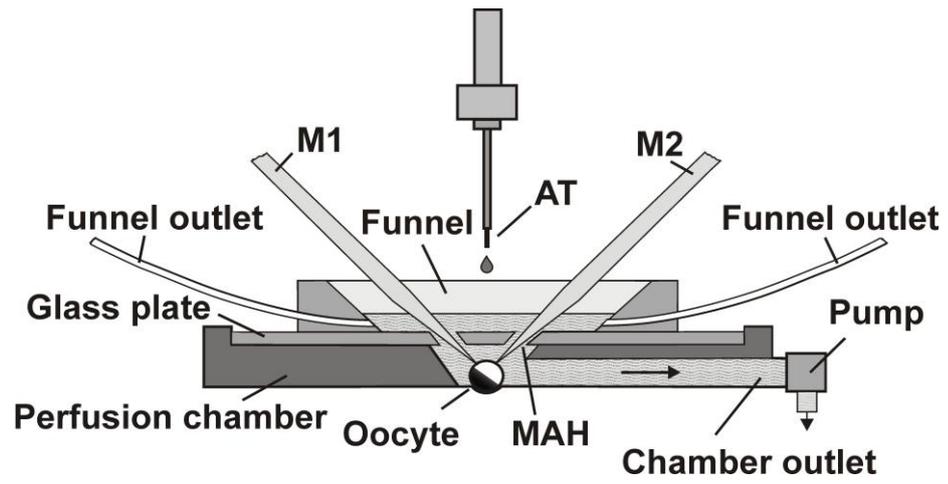


Abb.20. Schematischer Aufbau der Messkammer (Baburin et al., 2006)

5. Ergebnisse

5.1. GABA Dosis-Wirkungskurven

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte der Effekt ausgewählter Benzodiazepin Modulatoren auf Wildtyp und mutierte GABA_A Rezeptoren untersucht werden. GABA_A Rezeptoren wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht.

Da die Experimente bei konstanter und geringer GABA Konzentration durchgeführt werden sollten, mussten im Vorfeld GABA Dosis-Wirkungskurven erstellt und die Parameter EC₅₋₁₀ und EC₅₀ ermittelt werden.

Die gemittelten Amplituden wurden nach folgender Formel normiert:

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

Amplitude_x... Amplitude bei jeweiliger Konzentration

Amplitude_{max}... Amplitude induziert von 1mM GABA

Die Werte wurden in ein Koordinationsystem (siehe Abbildung 21A) eingetragen. Durch die Datenpunkte konnte danach eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung gelegt werden. Die EC₅₀ beschreibt jene Konzentration, die 50% des maximalen Effektes auslöst.

Subtyp	EC ₅₀	EC ₅₋₁₀	n _H	N
α ₂ β ₂ γ _{2S}	72.65 ± 5.27	8-14 μM	1.48 ± 0.09	4
α ₂ β ₂ γ ₁	42.38 ± 8.05	3-7 μM	1.44 ± 0.28	4
α ₂ β ₂ γ _{1179F}	62.15 ± 15.4	4-11 μM	1.36 ± 0.22	4
α ₂ β ₂ γ _{2179FxL132M}	50.10 ± 9.30	5-10 μM	1.33 ± 0.22	4

n_H.... Hill-Koeffizient

n.....Anzahl der Experimente

Tabelle 4: Zusammenfassung der Parameter EC₅₀; EC₅₋₁₀, n_H und Anzahl der Experimente der GABA Dosis-Konzentrationskurven durch die angeführten GABA_A Rezeptoren Subtypen

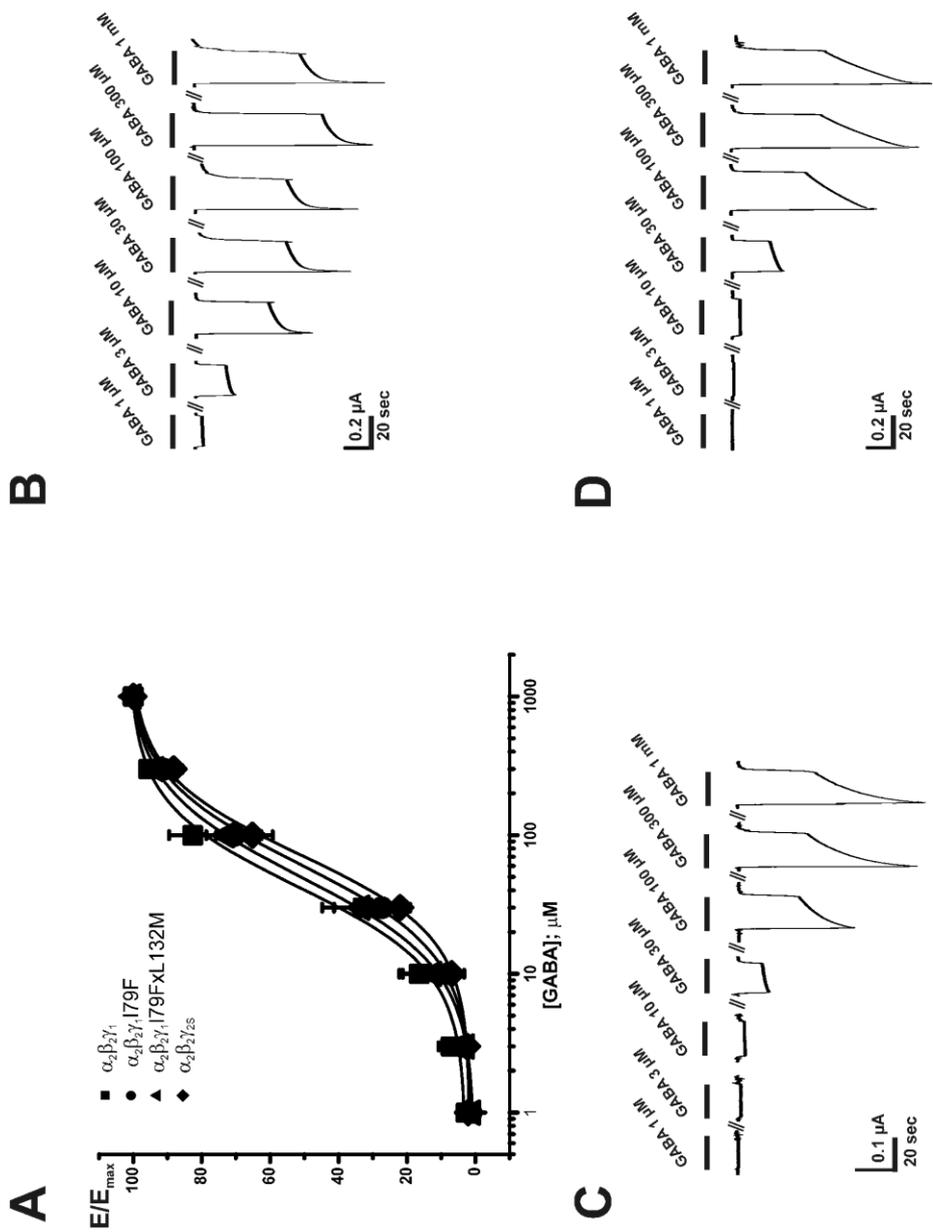


Abb. 21. GABA-Dosis-Wirkungskurve (A) sowie die gemessenen GABA-Ströme bei den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM und 1 Mm (B,C,D)

Nach der Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften der GABA_A Rezeptorsubtypen $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79F$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1I79FxL132M$ (inklusive Ermittlung der EC₅₀ bzw. EC₅₋₁₀ Konzentrationen), konnte nun in weiterer Folge der Einfluss der Punktmutationen auf die Modulation von I_{GABA} durch die ausgewählten Liganden untersucht werden.

5.2. Zaleplon

Bevor der Einfluss der Punktmutation γ_1 I79F bzw. der Doppelmutation γ_1 I79FxL132M auf die Modulation von I_{GABA} durch Zaleplon untersucht wurde, musste der Effekt von Zaleplon auf γ_1 und γ_{2S} Rezeptoren untersucht werden.

Wie in Abbildung **A** gezeigt, konnte bei $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren kein signifikanter Effekt von Zaleplon auf I_{GABA} (EC_{5-10}) beobachtet werden ($p > 0.05$, $n=6$). Dagegen induzierte Zaleplon eine starke, dosis-abhängige Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren. Erste signifikante Effekte waren bei Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ zu beobachten ($p < 0.05$, $n=6$). Die maximale Stimulation von I_{GABA} lag dabei bei $279.11 \pm 49.95 \%$ und die EC_{50} betrug $1.79 \pm 0.98 \mu\text{M}$ (Abbildung **D**).

Wurde nun die γ_1 Untereinheit mutiert (γ_1 I79F) und diese Untereinheit in Kombination mit α_2 und β_2 Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert, konnte nun interessanterweise eine deutliche Modulation von I_{GABA} beobachtet werden. Erste signifikante Effekte waren bereits bei Konzentrationen $\geq 100 \text{ nM}$ zu beobachten ($p < 0.05$, $n=8$). Die maximale Stimulation von I_{GABA} lag dabei bei $262.85 \pm 20.46 \%$ und die EC_{50} betrug $1.23 \pm 0.40 \mu\text{M}$ (Abbildung **B**).

An Rezeptoren bestehend mit α_2 , β_2 und der doppelmutierten γ_1 I79FxL132M Untereinheit wurden erste signifikante Effekte waren schon bei Konzentrationen $\geq 300 \text{ nM}$ beobachtet ($p < 0.05$, $n=9$). Wie in der Abbildung **C** zu sehen ist, konnte an diesem Rezeptorsubtyp keine Saturation erreicht werden.

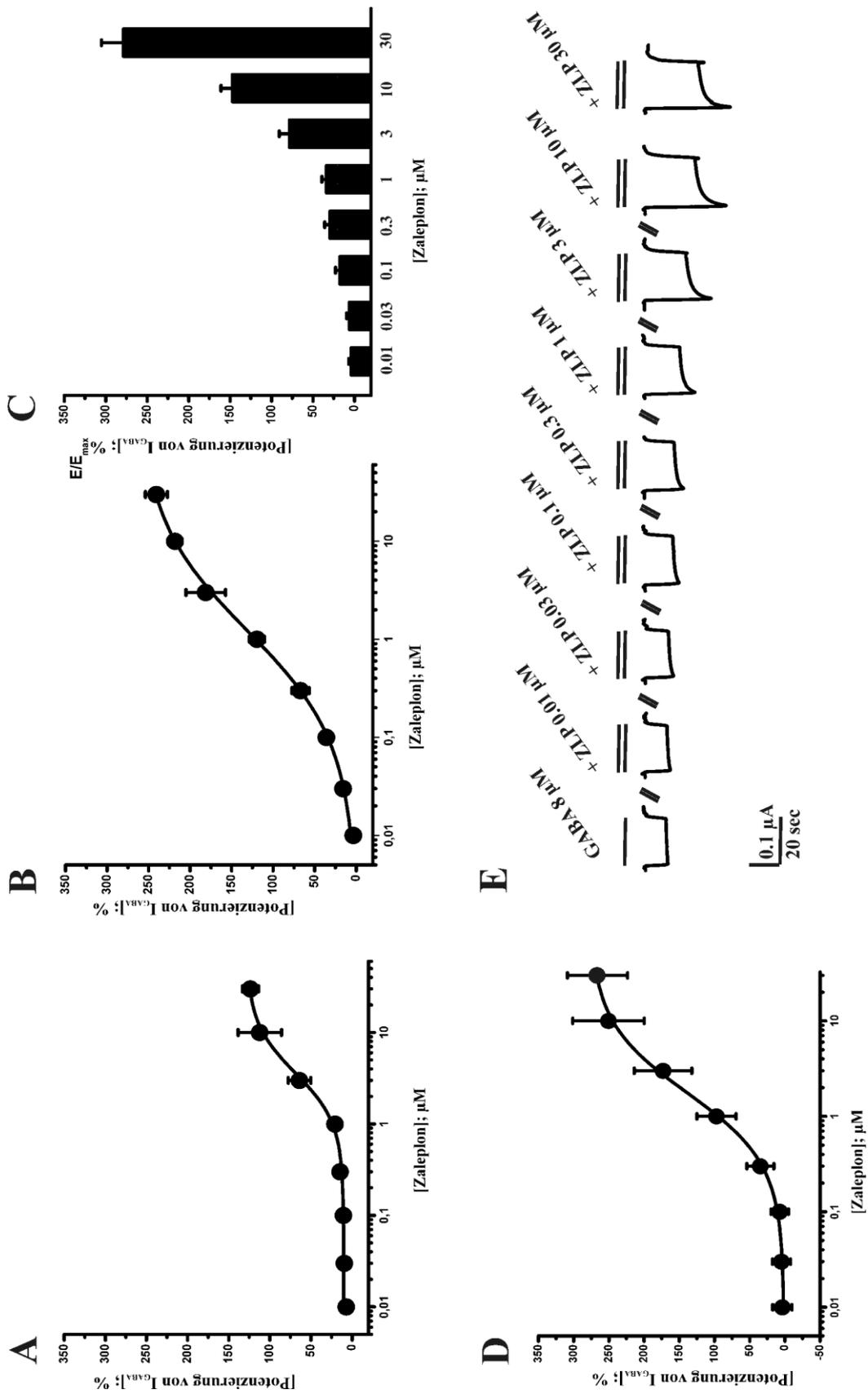


Abb. 22. Zaleplon-Dosis-Wirkungskurven/Diagramm (A,B,C,D) sowie Ströme (E)

5.3. Triazolam

Bevor der Einfluss der Punktmutation γ_1I79F bzw. der Doppelmutation $\gamma_1I79FxL132M$ auf die Modulation von I_{GABA} durch Triazolam untersucht wurde, musste der Effekt von Triazolam auf γ_1 und γ_{2S} Rezeptoren untersucht werden.

Aus der Abbildung **A** kann man entnehmen, dass bei $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren ein schwacher, aber doch signifikanter Effekt auf I_{GABA} (EC_{5-10}) zu beobachten war ($p < 0.05$, $n=7$). Dagegen bewirkte Triazolam bei $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren eine starke, dosisabhängige Potenzierung von I_{GABA} . Bei Konzentrationen ≥ 10 nM waren schon erste signifikante Effekte zu beobachten ($p < 0.05$, $n=7$). Die maximale Stimulation von I_{GABA} lag dabei bei 301.61 ± 27.7 % und die EC_{50} betrug 0.32 ± 0.10 μM (Abbildung **D**).

Bei der Einfachmutation der γ_1 Untereinheit (γ_1I79F) in Kombination mit α_2 und β_2 Untereinheiten, konnte auch hier eine deutlich stärkere Modulation von I_{GABA} im Vergleich zu $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren beobachtet werden. Erste signifikante Effekte waren bereits bei Konzentrationen ≥ 30 nM zu beobachten ($p < 0.05$, $n=9$). Die maximale Stimulation von I_{GABA} lag dabei bei 300.57 ± 26.82 % und die EC_{50} betrug 0.31 ± 0.08 μM (Abbildung **B**). An Rezeptoren, die die Doppelmutation $\gamma_1I79FxL132M$ enthielten konnte man erste signifikante Effekte schon bei Konzentrationen ≥ 30 nM feststellen ($p < 0.05$, $n=7$). Die maximale Stimulation von I_{GABA} betrug für Triazolam bei der Doppelmutation 618.2 ± 131 % und die EC_{50} lag bei 0.24 ± 0.14 μM (Abbildung **C**). Der Effekt von Triazolam an den doppelmutierten Rezeptoren war insgesamt signifikant stärker als an $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ und $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren.

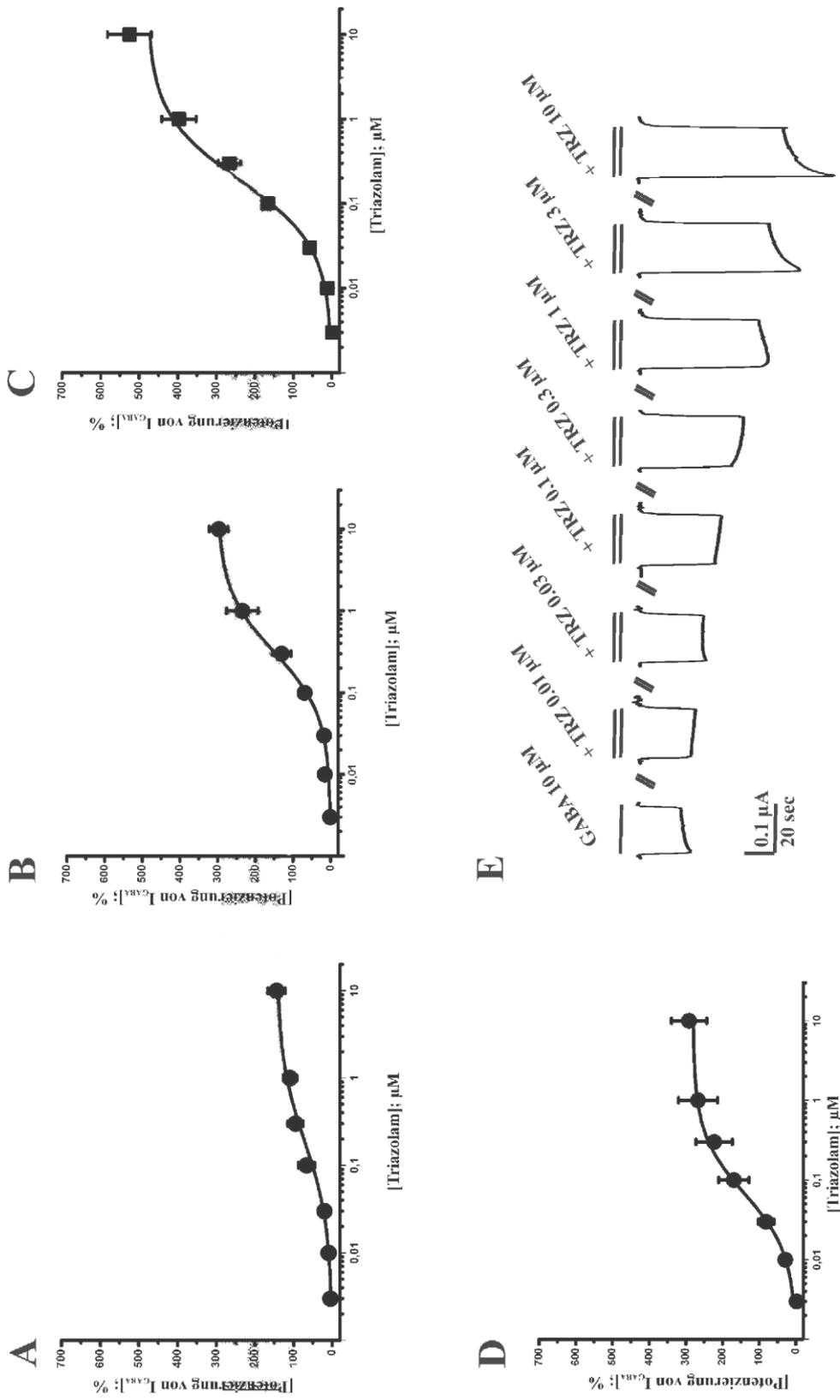


Abb. 23. Triazolam-Dosis-Wirkungskurven (A,B,C,D) sowie Ströme (E)

5.4. Midazolam

Auch bei Midazolam wurde zuerst der Effekt auf γ_1 und γ_{2S} Rezeptoren untersucht, bevor der Einfluss der Punktmutation γ_1I79F bzw. der Doppelmutation $\gamma_1I79FxL132M$ auf die Modulation von I_{GABA} durch Midazolam untersucht wurde.

Wie in Abbildung **A** zu sehen, konnte bei $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren kein signifikanter Effekt von Midazolam auf I_{GABA} (EC_{5-10}) beobachtet werden ($p>0.05$, $n=5$). Bei $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren induzierte auch Midazolam eine deutliche, dosisabhängige Potenzierung von I_{GABA} . Erste signifikante Effekte waren bereits bei Konzentrationen ≥ 3 nM festzustellen ($p<0.05$, $n=4$). Die maximale stimulation von I_{GABA} lag dabei bei 426.41 ± 81.08 % und die EC_{50} betrug 0.44 ± 0.23 μ M (Abbildung **D**).

Die Punktmutation γ_1I79F induzierte eine signifikante Modulation von I_{GABA} ($p<0.05$, $n=8$) durch Midazolam. Bei Konzentrationen ≥ 1 μ M waren erste signifikante Effekte zu beobachten ($p<0.05$, $n=8$). Die maximale Stimulation von I_{GABA} lag dabei bei 444.45 ± 152.21 % und die EC_{50} betrug 0.78 ± 0.58 μ M (Abbildung **B**).

An Rezeptoren, die die Doppelmutation $\gamma_1I79FxL132M$ enthielten, konnte man erste signifikante Effekte schon bei Konzentrationen ≥ 300 nM feststellen ($p<0.05$, $n=6$). Die maximale Stimulation von I_{GABA} betrug bei der Doppelmutation 444.70 ± 139.58 % und die EC_{50} lag bei 1.19 ± 0.93 μ M (Abbildung **C**). Die Modulation von I_{GABA} durch Midazolam an den mutierten Rezeptoren und dem Wildtyp $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ war insgesamt vergleichbar.

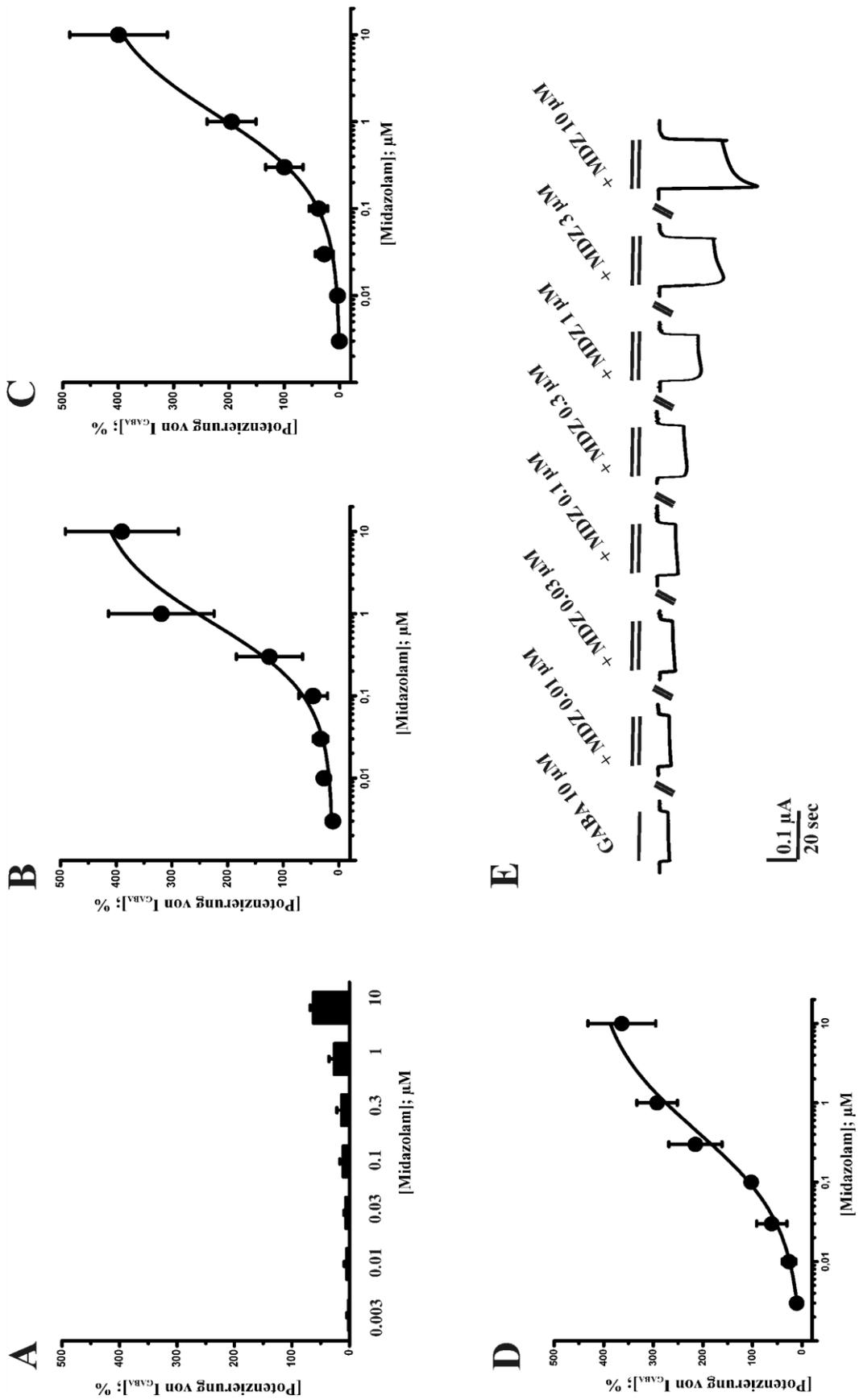


Abb. 24. Midazolam-Dosis-Wirkungskurven/Diagramm (A,B,C,D) sowie Ströme (E)

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Wirkung von drei aus einem zuvor durchgeführten Screening ausgewählten Benzodiazepinliganden auf γ_1 Mutanten mit dem Wildtyp-Rezeptor ($\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$) verglichen werden.

Die Wirkung von Benzodiazepinen ist schon lange bekannt. Sie wirken hauptsächlich an α_1 , α_2 , α_3 und α_5 Rezeptoren. Über diese Rezeptoren werden die unterschiedlichen Wirkungen der Benzodiazepine vermittelt. Die einzelnen Untereinheiten im menschlichen Gehirn haben ein spezifisches Verteilungsmuster und üben demnach unterschiedliche Effekte aus. α_1 Untereinheiten z.B. findet man in der Großhirnrinde. Sie sind für die sedierende Wirkung verantwortlich. Während hingegen α_2 und α_3 Untereinheiten hauptsächlich im limbischen System vorkommen. Wie bereits erwähnt spielt dieser Bereich des menschlichen Gehirns eine wesentliche Rolle bei Emotionen wie Angst oder Stress (Baxter und Murray, 2002).

Ein wichtiger Teil der Bindungsstelle für die häufig verwendeten Benzodiazepine ist die γ_2 -Untereinheit. Die meisten Benzodiazepine wirken nur an Rezeptoren, die eine γ_2 Untereinheit enthalten. Nur wenige Benzodiazepine wie Triazolam, Midazolam oder Clotiazepam modulieren auch $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren (Khom et al., 2006), jedoch haben sie einen schwächeren Effekt im Vergleich zu $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren.

γ_2 Untereinheiten befinden sich ubiquitär im gesamten zentralen Nervensystem, während hingegen γ_1 Untereinheiten vereinzelt vorkommen. γ_1 Untereinheiten werden nur in wenigen Gehirnregionen exprimiert wie zum Beispiel in der Amygdala (zentrale und mediale Nuclei), im Pallidum, in der Substantia nigra und im Thalamus (zentrolaterale und mediale Nuclei). Diese Bereiche des menschlichen Gehirns sind demzufolge entscheidend für kognitive Funktionen wie zum Beispiel Emotionen (z.B. Angst), Lernen, Gedächtnis, Aufmerksamkeit und Wahrnehmung (Baxter und Murray, 2002).

Trotz der Wirkung von Benzodiazepinen auf γ_1 Rezeptoren in vitro, ist bis heute nicht geklärt, ob diese Benzodiazepine auch in vivo an diesen Rezeptoren einen Effekt ausüben, da derzeit noch keinen Ligand bekannt ist, der in vivo selektiv an γ_1 Rezeptoren angreift.

Rezeptoren mit γ_2 und γ_1 Untereinheiten unterscheiden sich hinsichtlich der Modulation durch Benzodiazepine im Wesentlichen durch folgende Aminosäuren: Neben Phenylalanin in der Position 77 in der γ_2 Untereinheit ist auch das Methionin in Position 130 von essentieller Bedeutung. In der γ_1 Untereinheit gibt es diese Aminosäuren

nicht. Im Gegensatz dazu findet man bei der γ_1 Untereinheit in Position 79 ein Isoleucin und in Position 132 ein Leucin (Wingrove et al., 1997). Für einige Liganden wie Zolpidem ist bereits bekannt, dass durch den Austausch von Phenylalanin in Position 77 der γ_2 Untereinheit keine Modulation mehr zu beobachten ist (Cope et al., 2004). Andere Liganden wiederum wie z.B. Diazepam zeigen eine deutlich reduzierte Wirkung, jedoch existiert noch eine gewisse Restaktivität (Buhr und Sigel, 1997; Ramerstorfer et al., 2010).

Welcher Effekt wird aber erwartet, wenn man γ_1 Rezeptoren mutiert, folglich Reste der γ_2 Untereinheit in die γ_1 Untereinheit mutiert? Können Benzodiazepin-Liganden an diesen Rezeptoren den gleichen Effekt erzielen wie an γ_2 Rezeptoren?

Dieser Fragestellung sollte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit nachgehen und untersuchte dafür die Wirkungen von Zaleplon, Triazolam und Midazolam an Rezeptoren bestehend aus α_2 , β_2 und den verschiedenen γ -Untereinheiten (in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert) mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik.

Zaleplon modulierte dabei Rezeptoren mit der γ_1 Untereinheit nicht, während es einen starken Effekt an Rezeptoren mit der γ_{2S} Untereinheit ausübte. Nur durch den Austausch der Aminosäure Isoleucin durch Phenylalanin zeigte Zaleplon eine beinahe identische Wirkung an γ_1 -einfachmutierten Rezeptoren wie an γ_2 Wildtyp-Rezeptoren. Diese Erkenntnisse führen zu dem Schluss, dass die Wirkung von Zaleplon ausschließlich von einer Aminosäure in dieser Position (77) abhängig ist.

Zu dem Zeitpunkt war zu vermuten, dass das Einführen der zweiten Mutation, d.h. ein weiterer Rest der γ_2 Untereinheit (Methionin 130) wird in die γ_1 Untereinheit statt dem Leucin in Position 132 mutiert (L132M), einen möglicherweise noch stärkeren Effekt auf die Modulation von I_{GABA} durch Zaleplon bewirkt. Interessanterweise konnte aber keine Potenzierung von I_{GABA} mehr beobachtet werden. Die Bedeutung dieses Ergebnisses ist zu dem jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Es weist aber darauf hin, dass neben Bindungseffekten immer auch Transduktionseffekte beachtet werden müssen. Möglicherweise kommt es durch die zweite Mutation zu veränderten Transduktionsmechanismen, welche die Wirkung nachteilig beeinflussen. Diese Vermutung müsste jedoch weiter untersucht werden.

Triazolam wies, wie aus der Literatur bereits bekannt, einen schwächeren, aber signifikanten ($p < 0.05$) Effekt an γ_1 Rezeptoren auf und einen sehr starken Effekt an γ_2 Rezeptoren. Bei der Einfachmutation war die Wirkung identisch mit der des γ_2 Wildtyp-Rezeptors. Daraus lässt sich schließen, dass die Wirkung von Triazolam von einer Aminosäure, nämlich Phenylalanin in Position 77, abhängig ist. Bei der Doppelmutation (I79FxL132M) bewirkte Triazolam eine Verdoppelung des Effektes. Es entstand somit quasi ein „Super- γ_2 -Rezeptor“.

Häufig sind solche Ergebnisse auf typische Messfehler zurückzuführen wie z.B. die Messung der Modulation bei zu niedrigen GABA Konzentrationen. Bei meinen Experimenten wurde aber bei jedem Experiment der maximale GABA-Effekt und demzufolge auch die entsprechende GABA-EC, bei der gearbeitet wurde, bestimmt. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Stärke der Modulation von I_{GABA} durch doppelmutierte Rezeptoren durch eine einfache Messungenauigkeit entstanden ist, sondern dass auch die zweite Aminosäure (Methionin 130) für die Modulation von I_{GABA} durch Triazolam von großer Wichtigkeit ist.

Interessant wäre es nun auch zu wissen, welchen Effekt eine Einfachmutation L132M auf die Modulation von I_{GABA} durch Triazolam zeigt? Dies wäre in weiterführenden Experimenten zu untersuchen.

Die letzte untersuchte Substanz Midazolam zeigte an γ_1 Rezeptoren keinen Effekt, während hingegen eine starke Modulation an γ_2 Rezeptoren beobachtet wurde. Dieses Ergebnis ist überraschend, da in vorhergehenden Untersuchungen bereits eine signifikante Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\gamma_1$ Rezeptoren gezeigt werden konnte. Daher ist nicht klar, ob der fehlende Effekt auf die Anwesenheit der γ_1 Untereinheit zurückzuführen ist oder ob es womöglich mit der α_2 Untereinheit zusammenhängt. Möglicherweise deutet dieses Ergebnis auf das Fehlen einer Midazolam-Bindungsstelle zwischen α_2 und γ_1 Untereinheiten hin.

Die Einfachmutation reichte bei Midazolam aus, um den Effekt vergleichend mit γ_2 -Wildtyp-Rezeptoren vollständig wiederherzustellen. Das Einführen der Doppelmutation zeigte keine weitere Wirkungssteigerung. Die Wirkung von Midazolam ist folglich nur von der Aminosäure in Position 77 (Phenylalanin) abhängig.

Die Ergebnisse meiner Diplomarbeit liefern einen weiteren Beweis, dass die sogenannten Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle unterschiedliche Aminosäuren für ihre Bindung an den Rezeptor benötigen bzw. für die Transduktion ihres Effektes. Dies könnte in den strukturellen Unterschieden der einzelnen Substanzen begründet sein. So hat sich in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit gezeigt, dass für die sogenannten klassischen Benzodiazepine (Diazepam, Clobazam) mehr Aminosäuren für einen vergleichbaren Effekt wie an γ_2 Rezeptoren notwendig sind, als für die von mir untersuchten Substanzen. Demnach sollten unbedingt noch weitere Experimente zu diesem Thema durchgeführt werden.

7. Zusammenfassung

γ -Aminobuttersäure (GABA) Typ A (GABA_A) Rezeptoren sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren im Gehirn der Säugetiere und werden von zahlreichen klinisch relevanten Substanzen, z.B. den Benzodiazepinen, moduliert. Benzodiazepine binden zwischen der α und der γ_2 Untereinheit an GABA_A Rezeptors. Ein Austausch der γ_2 -Untereinheit durch die seltener vorkommende γ_1 -Untereinheit bewirkt eine Wirkungsabschwächung von Benzodiazepinen. Grund dafür sind unterschiedliche Aminosäuren an Positionen, welche für die Bindung von Benzodiazepinen essentiell sind (u.a. γ_2 F77 bzw. γ_1 I79 und γ_2 M130 bzw. γ_1 L132).

Problemstellung:

Kann in GABA_A Rezeptoren mit einer γ_1 -Untereinheit durch die Mutationen γ_1 I79F und γ_1 L132M eine Sensitivität für ausgewählte Liganden (Zaleplon, Triazolam und Midazolam) induziert werden?

Methoden:

4 GABA_A -Rezeptor-Subtypen wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch Zaleplon, Triazolam und Midazolam wurde bei konstant gehaltenem Membranpotential mit der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gemessen.

Ergebnisse und Diskussion:

Zaleplon:

Es konnte keine Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren beobachtet werden, während $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren signifikant stimuliert wurden. Durch die Punktmutation γ_1 I79F war der Effekt von Zaleplon vergleichbar mit γ_2 -enthaltenden Wildtyp-Rezeptoren. Bei Rezeptoren, die beide Mutationen trugen (γ_1 I79FxL132M) kam es zu einem Sensitivitätsverlust. Daraus lässt sich schließen, dass die Aminosäure F79 eine Schlüsselrolle bei der Modulation von I_{GABA} durch Zaleplon spielt.

Triazolam und Midazolam:

Beide Benzodiazepine zeigten keinen (Midazolam) bzw. einen schwachen, aber signifikanten Effekt (Triazolam) an $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ Rezeptoren. Durch das Einführen der Punktmutation γ_1 I79F konnte eine in beiden Fällen mit γ_2 vergleichbare Modulation von I_{GABA} induziert werden. Die Doppelmuation bewirkte keinen weiteren Effekt für Midazolam, während es hingegen bei Triazolam zu einer Verdoppelung des Effektes kam. Die Bedeutung dieses Ergebnisses ist momentan noch nicht geklärt.

8. Summary

Background:

γ -aminobutyric acid (GABA) type A (GABA_A) receptors are the major inhibitory neurotransmitter receptors in the vertebrate brain and are modulated by several clinically relevant drugs e.g. benzodiazepines. Benzodiazepines bind to the interface of α and γ subunits of the GABA_A receptor. Replacing the γ_2 subunit by the less abundant γ_1 subunit results in most cases in a significantly reduced modulation of the receptor by benzodiazepines. This might be explained by different amino acids that are essential for benzodiazepine binding ($\gamma_2\text{F77}$ vs. $\gamma_1\text{I79}$ and $\gamma_2\text{M130}$ vs. $\gamma_1\text{L132}$, respectively).

Aims:

Will the mutations $\gamma_1\text{I79F}$ and $\gamma_1\text{L132M}$ induce sensitivity for the modulation of γ_1 containing receptors by selected compounds?

Methods:

4 recombinant GABA_A receptor subtypes were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and the modulation of GABA-induced chloride currents (I_{GABA}) by zaleplone, triazolam and midazolam were measured using the 2-Microelectrode-Voltage-Clamp-technique.

Results and discussion:

Zaleplone:

No modulation of I_{GABA} through $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ was observed, while $\alpha_2\beta_2\gamma_{2S}$ receptors were significantly stimulated by zaleplone. Introducing the point mutation $\gamma_1\text{I79F}$ resulted in a modulation of I_{GABA} by zaleplone comparable to that of γ_2 -containing wildtype receptors. Interestingly, receptors carrying both mutations were again virtually insensitive to zaleplone. This indicates that solely $\gamma_2\text{F77}$ plays a key role in the modulation of I_{GABA} by zaleplone.

Triazolam and Midazolam:

Both benzodiazepines revealed no (midazolam) or a weak, but significant effect (triazolam) on $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ receptors. Introduction of the point mutation $\gamma_1\text{I79F}$ induced in both cases a stimulation of I_{GABA} comparable to that of γ_2 receptors. Interestingly, the double mutation did not induce any further effect for midazolam, while I_{GABA} modulation by triazolam was further enhanced, i.e. nearly doubled. The implication of this finding is so far not understood.

9. Danksagung

Ich möchte einigen Personen meine Anerkennung aussprechen, die sowohl zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, als auch mich auf meinem Weg dorthin im Studium begleitet haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Dr. Sophia Khom, die mich während der gesamten Diplomarbeitszeit umfangreich unterstützt und motiviert hat, sowie hilfreiche Ratschläge gegeben hat. Ihre professionelle Kompetenz sowie ihr Engagement möchte ich hier besonders hervorheben.

Ein besonderes Dankeschön gebührt Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Ermöglichung der Durchführung meiner Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens sowie die Unterstützung bei diversen Angelegenheiten.

Ich bedanke mich weiters bei Dr. Annette Hohaus für die Bereitstellung der cRNA.

Weiters bedanke ich mich bei Neda Panic, die mich vor allem während des praktischen Arbeitens moralisch unterstützt hat.

Bei allen anderen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts, die an dieser Diplomarbeit direkt oder indirekt beteiligt waren, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Meiner Familie möchte ich ein spezielles Dankeschön aussprechen. Sie hat mich vom ersten Tag des Studiums unterstützt und immer an mich geglaubt. Ohne ihre Hilfe wäre ich mit Sicherheit nicht so schnell an mein Ziel gelangt. Daher widme ich diese Diplomarbeit meiner Familie.

10. Lebenslauf

Amela Rešić

Adresse: Versorgungenheimstraße 19/19
1130 Wien

Geburtsdatum: 23.07.1987

Geburtsort: Bijeljina/Bosnien und Herzegovina

Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

Volksschule in Wien 1994-1998

Gymnasium in Wien mit gutem Maturaabschluss von
1998-2006

Pharmaziestudium an der Universität Wien ab Oktober
2006

Fertigkeiten

Bosnisch und Deutsch als Muttersprache

Englisch fließend

Französisch gut

Sehr gute Computerkenntnisse

Führerschein: B

Wien, im Juli 2011

11. Literaturverzeichnis

- Baburin, I., S. Beyl, and S. Hering. 2006. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch.* 453:117-123.
- Baburin, I., S. Khom, E. Timin, A. Hohaus, W. Sieghart, and S. Hering. 2008. Estimating the efficiency of benzodiazepines on GABA(A) receptors comprising gamma1 or gamma2 subunits. *Br J Pharmacol.* 155:424-433.
- Barnard, E.A., P. Skolnick, R.W. Olsen, H. Mohler, W. Sieghart, G. Biggio, C. Braestrup, A.N. Bateson, and S.Z. Langer. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* 50:291-313.
- Bateson, A.N. 2004. The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential? *Sleep Med.* 5 Suppl 1:S9-15.
- Baumann, S.W., R. Baur, and E. Sigel. 2001. Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem.* 276:36275-36280.
- Baumann, S.W., R. Baur, and E. Sigel. 2003. Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci.* 23:11158-11166.
- Baur, R., and E. Sigel. 2005. Benzodiazepines affect channel opening of GABA A receptors induced by either agonist binding site. *Mol Pharmacol.* 67:1005-1008.
- Baxter, M.G., and E.A. Murray. 2002. The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci.* 3:563-573.
- Berezhnoy, D., Y. Nyfeler, A. Gonthier, H. Schwob, M. Goeldner, and E. Sigel. 2004. On the benzodiazepine binding pocket in GABAA receptors. *J Biol Chem.* 279:3160-3168.
- Bertrand, D., and J.P. Changeux. 1999. Nicotinic receptor: a prototype of allosteric ligand-gated ion channels and its possible implications in epilepsy. *Adv Neurol.* 79:171-188.
- Bettler, B., and J.Y. Tiao. 2006. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther.* 110:533-543.
- Buhr, A., and E. Sigel. 1997. A point mutation in the gamma2 subunit of gamma-aminobutyric acid type A receptors results in altered benzodiazepine binding site specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8824-8829.
- Carlson, B.X., A.C. Engblom, U. Kristiansen, A. Schousboe, and R.W. Olsen. 2000. A single glycine residue at the entrance to the first membrane-spanning do-

- main of the gamma-aminobutyric acid type A receptor beta(2) subunit affects allosteric sensitivity to GABA and anesthetics. *Mol Pharmacol.* 57:474-484.
- Chebib, M., and G.A. Johnston. 1999. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26:937-940.
- Chen, Z.W., C.S. Chang, T.A. Leil, and R.W. Olsen. 2007. C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci.* 27:6655-6663.
- Conti, F., A. Minelli, and M. Melone. 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev.* 45:196-212.
- Cope, D.W., P. Wulff, A. Oberto, M.I. Aller, M. Capogna, F. Ferraguti, C. Halbsguth, H. Hoeger, H.E. Jolin, A. Jones, A.N. McKenzie, W. Ogris, A. Poeltl, S.T. Sinkkonen, O.Y. Vekovischeva, E.R. Korpi, W. Sieghart, E. Sigel, P. Somogyi, and W. Wisden. 2004. Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Neuropharmacology.* 47:17-34.
- Dias, R., W.F. Sheppard, R.L. Fradley, E.M. Garrett, J.L. Stanley, S.J. Tye, S. Goodacre, R.J. Lincoln, S.M. Cook, R. Conley, D. Hallett, A.C. Humphries, S.A. Thompson, K.A. Wafford, L.J. Street, J.L. Castro, P.J. Whiting, T.W. Rosahl, J.R. Atack, R.M. McKernan, G.R. Dawson, and D.S. Reynolds. 2005. Evidence for a significant role of alpha 3-containing GABAA receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J Neurosci.* 25:10682-10688.
- Duncalfe, L.L., M.R. Carpenter, L.B. Smillie, I.L. Martin, and S.M. Dunn. 1996. The major site of photoaffinity labeling of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by [3H]flunitrazepam is histidine 102 of the alpha subunit. *J Biol Chem.* 271:9209-9214.
- Ernst, M., D. Brauchart, S. Boresch, and W. Sieghart. 2003. Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience.* 119:933-943.
- Forth, W et al. (2001) "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie" 8., völlig überarbeitete Auflage. – München, Deutschland : Urban & Fischer
- Glykys, J., and I. Mody. 2007. Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron.* 56:763-770.
- Goetz, T., A. Arslan, W. Wisden, and P. Wulff. 2007. GABA(A) receptors: structure and function in the basal ganglia. *Prog Brain Res.* 160:21-41.
- Goldin, A.L. 1992. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods*

- Enzymol.* 207:266-279.
- Goudet, C., V. Magnaghi, M. Landry, F. Nagy, R.W.t. Gereau, and J.P. Pin. 2009. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain Res Rev.* 60:43-56.
- Greenblatt, D.J., J.S. Harmatz, and R.I. Shader. 1991. Clinical pharmacokinetics of anxiolytics and hypnotics in the elderly. Therapeutic considerations (Part I). *Clin Pharmacokinet.* 21:165-177.
- Heberlein, A., S. Bleich, J. Kornhuber, and T. Hillemacher. 2009. [Benzodiazepine dependence: causalities and treatment options]. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 77:7-15.
- Henschel, O., K.E. Gipson, and A. Bordey. 2008. GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 7:211-224.
- Jorgensen, E.M. 2005. Gaba. *WormBook*:1-13.
<http://www.mcdb.lsa.umich.edu/images/research/areasoffocus/neurobiology/neuropicture.jpg>
http://www.innovations-report.de/bilder_neu/10964_ionenkanal_2.jpg
- Khatri, A., A. Sedelnikova, and D.S. Weiss. 2009. Structural rearrangements in loop F of the GABA receptor signal ligand binding, not channel activation. *Biophys J.* 96:45-55.
- Khatri, A., and D.S. Weiss. The role of Loop F in the activation of the GABA receptor. *J Physiol.* 588:59-66.
- Khom, S., I. Baburin, E.N. Timin, A. Hohaus, W. Sieghart, and S. Hering. 2006. Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits. *Mol Pharmacol.* 69:640-649.
- Korpi, E.R., G. Grunder, and H. Luddens. 2002. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol.* 67:113-159.
- Lambert, J.J., D. Belelli, D.R. Peden, A.W. Vardy, and J.A. Peters. 2003. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol.* 71:67-80.
- Lu, H., and T.L. Xu. 2002. The general anesthetic pentobarbital slows desensitization and deactivation of the glycine receptor in the rat spinal dorsal horn neurons. *J Biol Chem.* 277:41369-41378.
- Luddens, H., E.R. Korpi, and P.H. Seeburg. 1995. GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology.* 34:245-254.
- Macdonald, R.L., J.Q. Kang, and M.J. Gallagher. Mutations in GABAA receptor sub-

- units associated with genetic epilepsies. *J Physiol.* 588:1861-1869.
- Macdonald, R.L., and R.W. Olsen. 1994. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci.* 17:569-602.
- Mandrioli, R., L. Mercolini, and M.A. Raggi. 2008. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective. *Curr Drug Metab.* 9:827-844.
- Martone, C.H., J. Nagelhout, and S.M. Wolf. 1991. Methohexital: a practical review for outpatient dental anesthesia. *Anesth Prog.* 38:195-199.
- Mohler, H. 2006. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* 326:505-516.
- Mohler, H., J.M. Fritschy, and U. Rudolph. 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:2-8.
- Mutschler, E et al., (2008) "Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie" Stuttgart, Deutschland. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mBh
- Norman, T.R., S.R. Ellen, and G.D. Burrows. 1997. Benzodiazepines in anxiety disorders: managing therapeutics and dependence. *Med J Aust.* 167:490-495.
- Nutt, D. 2006. GABAA receptors: subtypes, regional distribution, and function. *J Clin Sleep Med.* 2:S7-11.
- Olsen, R.W., and W. Sieghart. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev.* 60:243-260.
- Olsen, R.W., and W. Sieghart. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology.* 56:141-148.
- Owens, D.F., and A.R. Kriegstein. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci.* 3:715-727.
- Ramerstorfer, J., R. Furtmuller, E. Vogel, S. Huck, and W. Sieghart. The point mutation gamma 2F77I changes the potency and efficacy of benzodiazepine site ligands in different GABAA receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 636:18-27.
- Roberts, R.C., and M. Difiglia. 1988. Localization of immunoreactive GABA and enkephalin and NADPH-diaphorase-positive neurons in fetal striatal grafts in the quinolinic-acid-lesioned rat neostriatum. *J Comp Neurol.* 274:406-421.
- Rosen, A., M. Bali, J. Horenstein, and M.H. Akabas. 2007. Channel opening by anesthetics and GABA induces similar changes in the GABAA receptor M2 segment. *Biophys J.* 92:3130-3139.
- Rudolph, U., F. Crestani, D. Benke, I. Brunig, J.A. Benson, J.M. Fritschy, J.R. Martin, H. Bluethmann, and H. Mohler. 1999. Benzodiazepine actions mediated by

- specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. Nature. 401:796-800.*
- Schwenk, J., M. Metz, G. Zolles, R. Turecek, T. Fritzius, W. Bildl, E. Tarusawa, A. Kulik, A. Unger, K. Ivankova, R. Seddik, J.Y. Tiao, M. Rajalu, J. Trojanova, V. Rohde, M. Gassmann, U. Schulte, B. Fakler, and B. Bettler. *Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. Nature. 465:231-235.*
- Sharkey, L.M., and C. Czajkowski. 2008. *Individually monitoring ligand-induced changes in the structure of the GABAA receptor at benzodiazepine binding site and non-binding-site interfaces. Mol Pharmacol. 74:203-212.*
- Sieghart, W. 1995. *Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. Pharmacol Rev. 47:181-234.*
- Sieghart, W., K. Fuchs, V. Tretter, V. Ebert, M. Jechlinger, H. Hoger, and D. Adami-ker. 1999. *Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. Neurochem Int. 34:379-385.*
- Sieghart, W., and G. Sperk. 2002. *Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Curr Top Med Chem. 2:795-816.*
- Sigel, E., and A. Buhr. 1997. *The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. Trends Pharmacol Sci. 18:425-429.*
- Simon, J., H. Wakimoto, N. Fujita, M. Lalande, and E.A. Barnard. 2004. *Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. J Biol Chem. 279:41422-41435.*
- Smith, G.B., and R.W. Olsen. 1995. *Functional domains of GABAA receptors. Trends Pharmacol Sci. 16:162-168.*
- Takayama, C., and Y. Inoue. 2004. *GABAergic signaling in the developing cerebellum. Anat Sci Int. 79:124-136.*
- Ulrich, D., and B. Bettler. 2007. *GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. Curr Opin Neurobiol. 17:298-303.*
- Wallner, M., H.J. Hanchar, and R.W. Olsen. 2006. *Low dose acute alcohol effects on GABA A receptor subtypes. Pharmacol Ther. 112:513-528.*
- Walters, R.J., S.H. Hadley, K.D. Morris, and J. Amin. 2000. *Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. Nat Neurosci. 3:1274-1281.*
- Wang, D.D., and A.R. Kriegstein. 2009. *Defining the role of GABA in cortical development. J Physiol. 587:1873-1879.*
- Whiting, P.J. 2006. *GABA-A receptors: a viable target for novel anxiolytics? Curr Opin Pharmacol. 6:24-29.*

- Wingrove, P.B., S.A. Thompson, K.A. Wafford, and P.J. Whiting. 1997. Key amino acids in the gamma subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site. *Mol Pharmacol.* 52:874-881.
- You, H., J.L. Kozuska, I.M. Paulsen, and S.M. Dunn. Benzodiazepine modulation of the rat GABAA receptor alpha4beta3gamma2L subtype expressed in *Xenopus oocytes*. *Neuropharmacology.* 59:527-533.
- Zwanzger, P., and R. Rupprecht. 2005. Selective GABAergic treatment for panic? Investigations in experimental panic induction and panic disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 30:167-175.