



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Untersuchung des Einflusses ausgewählter  
Punktmutationen in TM2 und TM3 auf die Modulation  
von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren durch  $\beta$ 2/3-selektive Liganden“

verfasst von / submitted by

Matthias Zödl

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ, Prof. Dr. Steffen Hering

## Table of Contents

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Danksagung .....                                                                                       | 3  |
| Abstract .....                                                                                         | 5  |
| Zusammenfassung .....                                                                                  | 6  |
| Allgemeiner Teil.....                                                                                  | 7  |
| 1. $\gamma$ -Aminobuttersäure als inhibitorischer Neurotransmitter .....                               | 7  |
| 3.   GABA <sub>B</sub> -Rezeptoren.....                                                                | 13 |
| 4.   GABA <sub>A-RHO</sub> -Rezeptoren .....                                                           | 14 |
| 5. Liganden am GABA <sub>A</sub> -Rezeptor.....                                                        | 15 |
| 5.1 Agonisten.....                                                                                     | 15 |
| 5.2 Antagonisten.....                                                                                  | 16 |
| 5.3 Modulatoren des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors.....                                                  | 18 |
| Problemstellung und Zielsetzung .....                                                                  | 27 |
| Material und Methoden .....                                                                            | 28 |
| Ergebnisse .....                                                                                       | 34 |
| 1.   Pharmakologische Charakterisierung der exprimierten GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren.....            | 34 |
| 2.   Effekt ausgewählter Punktmutationen auf die Modulation von I <sub>GABA</sub> durch Etomidat ..... | 38 |
| Diskussion und Conclusio .....                                                                         | 46 |
| Literaturverzeichnis.....                                                                              | 49 |
| Curriculum Vitae .....                                                                                 | 56 |

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Möglichkeit meine Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie zu absolvieren herzlich bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Igor Baburin für Hilfe bei jeglichen Problemen technischer Natur, Frau Dr. Annette Hohaus für der Bereitstellung der cRNA und Herrn Peter Höflich.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Sophia Khom, welche mir nicht nur von praktischer Seite immer mit helfender Hand zur Seite stand, sondern auch für die Weitergabe ihres umfangreichen Wissens und den aufmunternden Gesprächen. Vielen Dank!

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Juliane Hintersteiner, die mich ebenso tatkräftig unterstützt hat.

Auch bei Frau Dr. Margot Ernst möchte ich mich an dieser Stelle für ihre Anregungen und Einblicke sehr herzlich bedanken.

Ebenso möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Die Gründe würden jedoch nicht auf diese Seite passen. Danke!



## Abstract

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitters in the mammalian brain. The actions of GABA are mediated by at least two different receptor classes: GABA type A (GABA<sub>A</sub>-) and GABA type B (GABA<sub>B</sub>-) receptors (Sieghart, 1995). GABA<sub>A</sub>-receptors are pentameric ligand-gated ion channels (pLGIC) (Olsen & Sieghart, 2008), which play a crucial role in various physiological as well as pathophysiological processes, and thus represent the molecular target for clinically applied drugs such as benzodiazepines or anesthetics (Macdonald & Olsen, 1994).

The binding pocket of the anesthetic etomidate is located in the transmembrane domain at the  $\alpha/\beta^+$ -interface and comprises amongst others amino acid residues  $\alpha 1$ M236 and  $\beta 3$ M286.

The aim of this diploma thesis was to determine the effect of 5 point mutations of amino acid residues in the suggested etomidate binding pocket on the modulation of GABA-induced chloride currents ( $I_{GABA}$ ) and to compare it to the effect of etomidate on wild-type  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ S and  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ S receptors. For this purpose,  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ S,  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ S, as well as GABA<sub>A</sub>-receptors containing mutated  $\beta 3$ -subunits ( $\beta 3$ T262S,  $\beta 3$ T266A,  $\beta 3$ N265S,  $\beta 3$ M286W, and  $\beta 3$ F289S) in combination with  $\alpha 1$ - and  $\gamma 2$ S-subunits were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and modulation of  $I_{GABA}$  through the resulting channels subsequently analyzed by means of the 2-microelectrode-voltage-clamp-technique.

Mutating amino acid residues  $\beta 3$ F289 to serine as well as  $\beta 3$ M286 to tryptophan completely abolished  $I_{GABA}$  enhancement by etomidate (enhancement of  $I_{GABA}$  by etomidate at concentrations  $<300\mu\text{M}$  did not significantly differ from 0;  $p>0.05$ ), while mutating the adjacent residue  $\beta 3$ N265 to serine significantly decreased  $I_{GABA}$  enhancement by etomidate compared to wild-type  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ S receptors ( $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ S:  $E_{\text{max}}=2395\pm 133\%$  vs.  $\alpha 1\beta 3$ N265S $\gamma 2$ S:  $E_{\text{max}}=1441\pm 54\%$ ). In contrast, mutating the threonine residue in positions 262 ( $\beta 3$ T262S) and 266 ( $\beta 3$ T262A), respectively, did not significantly affect efficacy and potency of  $I_{GABA}$  enhancement by etomidate.

Collectively, my data indicate that suggest that amino acid residues  $\beta 3$ N265,  $\beta 3$ M286 and  $\beta 3$ F289 play an essential role in efficacy and potency of  $I_{GABA}$  enhancement by etomidate.

## Zusammenfassung

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste, inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem der Säugetiere und vermittelt seine Wirkung durch mindestens zwei verschiedene Rezeptorklassen – GABA Typ A ( $\text{GABA}_A$ -) und GABA Typ B ( $\text{GABA}_B$ -) Rezeptoren (Sieghart, 1995).  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren gehören zur Superfamilie der pentameren, ligandengesteuerten Ionenkanälen (pLGIC – pentameric ligand-gated ion channels) oder Cys-loop Rezeptoren (Olsen & Sieghart, 2008), sind an vielen sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt und dienen daher als Angriffspunkt für zahlreiche klinisch verwendeten Arzneistoffe wie Benzodiazepine oder Anästhetika (Macdonald & Olsen, 1994).

Das Anästhetikum Etomidat bindet transmembranär am  $\alpha/\beta^+$ -interface des  $\text{GABA}_A$ -Rezeptors und beinhaltet unter anderem die Aminosäuren  $\alpha 1\text{M236}$  und  $\beta 3\text{M286}$ .

Ziel dieser Diplomarbeit war es, den Effekt ausgewählter Punktmutationen ( $\beta 3\text{T262S}$ ,  $\beta 3\text{T266A}$ ,  $\beta 3\text{N265S}$ ,  $\beta 3\text{M286W}$  und  $\beta 3\text{F289S}$ ) in dieser Bindungstasche auf die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen ( $I_{\text{GABA}}$ ) durch Etomidat zu bestimmen und mit der Modulation von  $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$  Rezeptoren zu vergleichen. Dafür wurden sowohl mutierte ( $\alpha 1\beta 3\text{T262S}\gamma 2\text{S}$ ,  $\alpha 1\beta 3\text{T266A}\gamma 2\text{S}$ ,  $\alpha 1\beta 3\text{N265S}\gamma 2\text{S}$ ,  $\alpha 1\beta 3\text{M286W}\gamma 2\text{S}$  und  $\alpha 1\beta 3\text{F289S}\gamma 2\text{S}$ ) als auch Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$  und  $\alpha 1\beta 1\gamma 2\text{S}$  Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die  $I_{\text{GABA}}$  Modulation mittels der 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik untersucht.

Meine Untersuchungen zeigen, dass Einführung der Mutationen  $\beta 3\text{F289S}$  bzw.  $\beta 3\text{M286W}$  zu einem vollständigen Wirkverlust von Etomidat führten (Ausmaß der  $I_{\text{GABA}}$  Modulation in Konzentrationen von  $<300\mu\text{M}$  Etomidat unterschied sich nicht signifikant von 0). Signifikant reduzierte Modulation von  $I_{\text{GABA}}$  konnte ebenfalls an  $\alpha 1\beta 3\text{N265S}\gamma 2\text{S}$  Rezeptoren beobachtet werden ( $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$ :  $E_{\text{max}}=2395\pm 133\%$  vs.  $\alpha 1\beta 3\text{N265S}\gamma 2\text{S}$ :  $E_{\text{max}}=1441\pm 54\%$ ). Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Unterschied in der Modulation von  $I_{\text{GABA}}$  durch die beiden mutierten Rezeptoren  $\alpha 1\beta 3\text{T262S}\gamma 2\text{S}$  bzw.  $\alpha 1\beta 3\text{T262S}\gamma 2\text{S}$  Rezeptoren im Vergleich zu Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$  Rezeptoren beobachtet werden.

Meine Daten legen nahe, dass die Aminosäuren  $\beta 3\text{N265}$ ,  $\beta 3\text{M286}$  und  $\beta 3\text{F289}$  eine wichtige Rolle in der Modulation von  $I_{\text{GABA}}$  durch Etomidat spielen.

## Allgemeiner Teil

### 1. $\gamma$ -Aminobuttersäure als inhibitorischer Neurotransmitter

Die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste, inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn der Säugetiere. Man vermutet, dass bis zu 50% aller Synapsen im Gehirn GABAerg sind (Sieghart, 1995) bzw. dass GABA von mehr als einem Drittel aller Neuronen als Transmitter verwendet wird (Ramachandran & Shekhar, 2011). GABA war schon vor ihrer Entdeckung als Neurotransmitter als Metabolit im Citratzyklus von Pflanzen und Bakterien bekannt. 1950 jedoch entdeckten die Forscher Roberts und Awapara unabhängig voneinander erstmals hohe Konzentrationen von GABA im ZNS von Säugetieren. Man vermutete, dass GABA, anstatt Teil des Signalwegs zu sein, am Metabolismus beteiligt sein müsste, da aufgrund der hohen Konzentration (mehr als 1000x höher als die der Monoamin-Neurotransmitter) und auch wegen der relativ einfachen chemischen Struktur den Forschern die Funktion als Neurotransmitter nicht plausibel erschien (Jorgensen, 2005). Erst in den 1960er Jahren wurde die Rolle der GABA als Neurotransmitter bestätigt (Kravitz et al., 1963; Otsuka et al., 1966).

Im Gehirn wird GABA überwiegend aus Glutamat, dem wichtigsten, exzitatorischen Neurotransmitter und somit dem Gegenspieler von GABA, unter Katalyse der Glutaminsäuredecarboxylase (GAD, 2 Isoformen synthetisiert – GAD65 bzw. GAD67) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Biosynthese von **GABA** (rechts) aus **Glutamat** (links)

Obwohl GAD65 in höheren Konzentrationen als GAD67 vorkommt, ist dennoch GAD 67 für den Großteil der Biosynthese von GABA verantwortlich (Fon & Edwards, 2001). GABA wird über den vesikulären GABA-Transporter (VGAT) in Vesikel aufgenommen und gespeichert und nach Depolarisation des präsynaptischen Neurons Calcium-abhängig über Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt (Owens & Kriegstein, 2002). Aus dem synaptischen Spalt wird GABA mittels GABA-Transporter (GAT1-3) wieder in Neuronen bzw. Gliazellen aufgenommen; dadurch wird die GABA-vermittelte Neurotransmission beendet (Cherubini & Conti, 2001).

Wie bereits erwähnt, stellt GABA den wichtigsten, inhibitorischen Neurotransmitter im adulten Gehirn dar. Daher ist es interessant, dass GABA vor allem während früher Stadien der Gehirnentwicklung jedoch exzitatorisch wirkt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in frühen Entwicklungsstadien der Neurone intrazellulär hohe Chloridkonzentrationen vorliegen. Dadurch kommt es nach Bindung von GABA bzw. Öffnung des Kanals zu einem Ausstrom von Chloridionen und somit zu exzitatorischen Effekten. Diese Depolarisation spielt einerseits eine wichtige Rolle in Bezug auf die Plastizität der Synapsen, sie steht aber in Zusammenhang mit verschiedenen Formen von frühkindlichen Epilepsien. Die Homöostase des Chloridhaushalts wird über mehrere Mechanismen gesteuert: Es existieren einige Chlorid-Cotransporter, Austauscher und Kanäle, welche mitunter starken Veränderungen während der Reifung und Entwicklung unterworfen sind. Die beiden wichtigsten sind der Na/K/2Cl-Co-transporter Typ 1 (NKCC1), welcher Chlorid in die Zelle transportiert, und der K/Cl-Co-transporter Typ 2 (KCC2), der Chlorid aus der Zelle pumpt (Ben-Ari et al., 2007; Meldrum & Rogawski, 2007).

## 2. GABA-aktivierte Rezeptoren

Es können prinzipiell 2 verschiedene Gruppen von GABA-aktivierten Rezeptoren unterschieden werden: GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>- Rezeptoren.

### 2.1 GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gehören zur Großfamilie der Cys-loop-Rezeptoren, die pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle sind. Dazu zählen auch nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (nACh), Glycin-Rezeptoren, der Serotonin (5-HT) - Typ 3 Rezeptor (5HT<sub>3</sub>) und ein Zn<sup>2+</sup>-aktivierter Ionenkanal. Während die nACh- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren kationenselektiv sind und exzitatorische Effekte vermitteln, sind die GABA<sub>A</sub>- und Glycin-Rezeptoren anionenselektiv und, bis auf die erwähnten Ausnahmen während der Entwicklung, von inhibitorischer Natur. All diese Rezeptoren sind als pentamere, die Membran durchspannende Proteine organisiert, die hierdurch eine Zentralpore und somit den durch die Membran verlaufenden Ionenkanal bilden (Olsen & Sieghart, 2008).

#### 2.1.1 Aufbau von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

Jede dieser fünf Untereinheiten besteht aus einer langen, N-terminalen, extrazellulären und hydrophilen Domäne von 200-250 Aminosäuren, gefolgt von vier  $\alpha$ -helikalen transmembranären Domänen (M1-M4) mit einem großen intrazellulären Loop zwischen der M3 und M4-Domäne bestehend aus 85-255 Resten. Das relativ kleine, C-terminale Endstück befindet sich auf extrazellulärer Seite (siehe **Abbildung 2**, Seite 10). Der Agonist GABA bindet extrazellulär zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, wodurch es zu Konformationsänderungen kommt, welche die transmembranäre Region durchziehen und die Ionenpore öffnen (Miller & Aricescu, 2014).

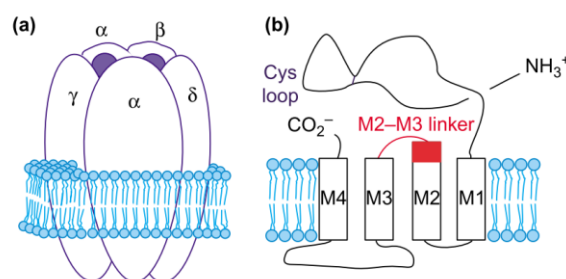
Im humanen Genom konnten Gene für 19 verschiedene GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten identifiziert werden:  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$  1-3 (Simon et al., 2004). Man nimmt an, dass die häufigsten, natürlich vorkommenden, heteromeren Rezeptoren aus 2  $\alpha$ -, 2  $\beta$ - und einer anderen, meist einer  $\gamma$ -Untereinheit, bestehen. Es können aber auch Homomere entstehen. Theoretisch kann eine Vielzahl von verschiedenen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in einer einzelnen Zelle vorkommen und in einigen Fällen wurden bis zu 8 verschiedene Rezeptorisoformen in einer Zelle gefunden. Es ist aber unklar, wieviele Isoformen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors tatsächlich nativ vorkommen (Sigel & Steinmann, 2012).

Der Großteil der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besteht aus  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Untereinheiten, gefolgt von  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ - und  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren. Die  $\alpha 4$ -,  $\alpha 5$ -,  $\alpha 6$ -,  $\beta 1$ -,  $\gamma 1$ -,  $\gamma 3$ -,  $\delta$ -,  $\pi$ - bzw.  $\theta$ -Untereinheiten inkorporierenden Rezeptoren machen bloß kleinere Populationen aus (siehe auch **Tabelle 1**).

| Identifizierte Untereinheiten-kombinationen | Untereinheitenkombinationen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nativ vorkommen | Untereinheitenkombinationen, die möglicherweise nativ vorkommen |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| $\alpha 1\beta 2\gamma 2$                   | $\alpha 1\beta 3\gamma 2$                                                     | $\rho 1$                                                        |
| $\alpha 2\beta 3\gamma 2$                   | $\alpha 1\beta \delta$                                                        | $\rho 2$                                                        |
| $\alpha 3\beta 3\gamma 2$                   | $\alpha 5\beta 3\gamma 2$                                                     | $\rho 3$                                                        |
| $\alpha 4\beta 3\gamma 2$                   | $\alpha \beta 1\gamma / \alpha \beta 1\delta$                                 | $\alpha \beta \gamma 1$                                         |
| $\alpha 4\beta 2\delta$                     | $\alpha \beta$                                                                | $\alpha \beta \gamma 3$                                         |
| $\alpha 4\beta 3\delta$                     | $\alpha 1\alpha \beta \gamma / \alpha 1\alpha 6\beta \delta$                  | $\alpha \beta \theta$                                           |
| $\alpha 5\beta 3\gamma 2$                   |                                                                               | $\alpha \beta \epsilon$                                         |
| $\alpha 6\beta 3\gamma 2$                   |                                                                               | $\alpha \beta \gamma \pi$                                       |
| $\alpha 6\beta 2\delta$                     |                                                                               |                                                                 |
| $\alpha 6\beta 3\delta$                     |                                                                               |                                                                 |
| $\rho$                                      |                                                                               |                                                                 |

**Tabelle 1: GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren** nach Olsen & Sieghart, 2008.

Durch unterschiedliche Kombinationen der verschiedenen Untereinheiten ergeben sich verschieden Rezeptorsubtypen. Diese unterscheiden sich stark bezüglich ihrer Topographie und Entwicklung, ihrer zellulären und intrazellulären Lokalisation, ihrer Rolle in den verschiedenen Hirnregionen, ihren Regulationsmechanismen und schließlich auch ihrer Pharmakologie (Olsen & Sieghart, 2008).



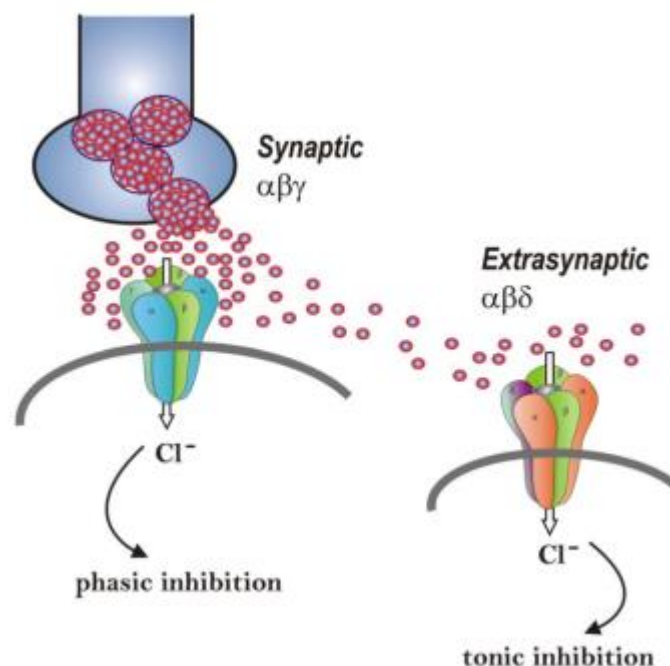
**Abbildung 2: Cys-loop-Rezeptor.** (a) Darstellung des gesamten Rezeptorkomplexes; (b) Struktur einer einzelnen Untereinheit (Lester et al., 2004) (Copyright © 2004 Elsevier Ltd.)

### 2.1.2 Verteilung und Funktion der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Gehirn

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren kommen in großer Dichte im Nervensystem, aber auch in nicht-neuronalen Geweben vor, wie beispielsweise im Pankreas, Flimmerepithel oder der Retina. Ihre Funktion in diesen Geweben ist zur Zeit noch nicht vollständig verstanden (Sigel & Steinmann, 2012).

Die zelluläre Lokalisation der Rezeptoren determiniert die Inhibitionsart. Man unterscheidet hierbei zwischen phasischer und tonischer Inhibition. Unter phasischer Inhibition versteht man eine schnelle, synaptische Neurotransmission, die hauptsächlich über synaptisch lokalisierte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\gamma$ 2-Untereinheiten vermittelt wird, wogegen die tonische Inhibition über Rezeptoren mit  $\delta$ -Untereinheiten, die peri- bzw. extrasynaptisch lokalisiert sind, vermittelt wird.

Die phasische, synaptisch vermittelte Inhibition ist zeitlich präzise festgelegt - funktioniert sozusagen als Punkt-zu-Punkt-Kommunikation - und postsynaptische Rezeptoren sind GABA nur sehr kurz ausgesetzt. Die tonische Inhibition wird vorwiegend von geringeren GABA-Konzentrationen über extrazelluläre Rezeptoren vermittelt (Goetz et al. 2007; Farrant & Nusser 2005).



**Abbildung 3: Phasische und tonische Inhibition** (Reddy, 2011) (Copyright © 2011 Reddy)

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden von zahlreichen klinisch verwendeten Arzneistoffgruppen wie den Benzodiazepinen sowie intravenösen Anästhetika (Etomidat und Propofol) und Inhalationsanästhetika (u.a. Isofluran, Sevofluran) moduliert. Des Weiteren vermitteln unter

anderem Barbiturate und Neurosteroiden ihre Wirkung über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Möhler, 2011). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermitteln im Gehirn rasche, inhibitorische synaptische Übertragung. Reduzierte bzw. anormale Aktivität dieser Rezeptoren wird mit verschiedensten neurologischen und psychiatrischen Krankheiten wie beispielsweise Schlafstörungen, Epilepsie, Panikattacken, Schizophrenie, Autismus und Down-Syndrom in Verbindung gebracht (Rudolph & Möhler, 2014).

### **2.1.3 Gating**

„Gating“ bezeichnet den Prozess der Bindung des Agonisten an den Rezeptor mit anschließender Konformationsänderung und darauffolgender Öffnung des Ionenkanals. Der genaue Ablauf des Gatings des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ist noch vollständig geklärt, doch gibt es einige Anhaltspunkte. So sind an den Seitenketten des „Eingangs“ zur Pore Aminosäuren mit –OH-Gruppen zu finden. Diese interagieren mit Wassermolekülen, welche die Hydrationshülle für Chloridionen bilden. Man nimmt an, dass dies zu einer energetischen Stabilisierung der Anionen führt, wenn diese in die Pore eintreten. Der sogenannte Selektivitätsfilter beschreibt vermutlich den engsten Teil der Pore. Dieser besitzt einige konservierte, positiv geladene Reste (Arginin und Lysin), welche um das extrazelluläre Ende der M1- und M2-Domänen angeordnet sind. Die Struktur von desensibilisierten und inaktiven Rezeptoren ist auch noch ungeklärt. Hierbei müssen physikalische Barrieren ausgebildet werden, die Ionen vom Durchfließen durch die Pore abhalten.

Für die Rezeptoraktivierung gibt es zwei Hypothesen. Die erste ist der sog. „pin-into-socket“-Mechanismus. Hier stellt ein einzelner Valinrest der extrazellulären Domäne (ECD) den einzigen Kontakt mit der transmembranären Domäne (TMD) her und dient hierbei als Drehpunkt, der eine Rotation der ECD nach Bindung eines Agonisten hervorruft und diese Rotation an M2-Segmente weitergibt. Diese Rotation in M2 erlaubt der Pore, sich an ihrer engsten Stelle zu erweitern. Ein Kritikpunkt an der „pin-into-socket“-Hypothese ist die Bewegung großer Bereiche der ECD bzw. einer ganzen Untereinheit, was angesichts energetischer Überlegungen unwahrscheinlich scheint.

Die zweite Hypothese ist der sog. „conformational wave“-Mechanismus. Hier werden Konformationsänderungen an die TMD über eine Serie von lokalen Bewegungen, anstatt einer ganzen Untereinheit, kommuniziert (Kash et al., 2004).

Eine wichtige Region ist die Verbindung zwischen M2 und M3. Dieser M2-M3 linker ist eine kurze, extrazelluläre Schleife, welche die beiden Domänen verbindet. Wichtige Aminosäuren

sind Arginin an Position 269 (R269), Leucin an Position 277 (L277) und Lysin an Position 279 (K279).

Loop 2 und Loop 7, beide befinden sich am unteren Ende, sind aufgrund ihrer örtlichen Nähe zur ECD und TMD ebenso von Bedeutung. Es wird angenommen, dass das gating hier von elektrostatischen Interaktionen zwischen negativ geladenen Resten der ECD und positiv geladenen Resten der TMD abhängt. So sind Asparaginsäure an Position 57 und 149 (beide negativ geladen) in den extrazellulären loops 2 und 7, die während des gatings näher zusammenrücken, sowie Lysin an Position 279 in der transmembranären Verbindung von M2 und M3 innerhalb der  $\alpha 1$ -Untereinheit identifiziert worden (Kash et al., 2003; Miller & Aricescu, 2014).

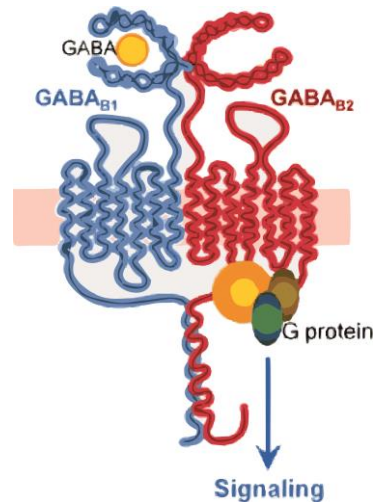
### **3. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren**

Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist ein heterodimerer, G<sub>i/o</sub>-Protein-gekoppelter Rezeptor, der aus den beiden Untereinheiten GBR1 und GBR2 besteht und für langsame und länger andauernde Inhibition verantwortlich ist. Die Liganden-Bindungsstelle des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors befindet sich in der extrazellulären Domäne der GBR1-Untereinheit, demgegenüber erhöht die GBR2-Domäne, welche selbst keine GABA<sub>B</sub>-Liganden binden kann, die Bindungsaffinität von GABA zur GBR1 und ist überdies für die Rezeptoraktivierung erforderlich. Die Koppelung der G-Proteine geschieht an der transmembranären Region von GBR2. Präsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren hemmen die Freisetzung von Neurotransmittern, wohingegen postsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren Neuronen hyperpolarisieren (Geng et al., 2013).

Die Aktivierung der postsynaptischen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren führt zur Öffnung von einwärts gleichrichtenden K<sup>+</sup>-Kanälen („inwardly rectifying potassium channels“; GIRK oder Kir3), welche die Spätphase des inhibitorischen, postsynaptischen Potentials determinieren. Die Aktivierung der präsynaptischen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren jedoch verringert die Neurotransmitter-Freisetzung durch die Hemmung von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (N- oder P/Q-Typ). Weiters führt die Aktivierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren zu einer Modulation der cAMP-Produktion - dadurch kommt es zu vielfältigen Effekten betreffend cAMP-abhängiger Ionenkanäle und Proteine und schließlich zur Modulation neuronaler und synaptischer Funktionen (Ben-Ari et al., 2007).

GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren werden, obwohl sie sich strukturell grundlegend von den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren unterscheiden, auch mit Lern- und Gedächtnisprozessen sowie Epilepsie, Angststörungen, Depressionen und kognitiven Defiziten in Verbindung gebracht (Kaupmann et al., 1997).

GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren konnten im Zentralnervensystem, im peripheren Nervensystem und in peripheren Organen identifiziert werden (Filip et al., 2015).



**Abbildung 4: GABA<sub>B</sub>-Rezeptor** (Benke 2013) (Copyright © 2013 Elsevier Inc.)

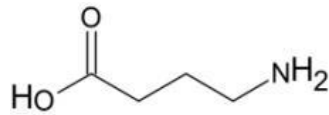
#### 4. GABA<sub>A-RHO</sub>-Rezeptoren

Früher wurde in der Literatur häufig auch von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren – damit waren die Rezeptoren bestehend aus 3  $\rho$ -Untereinheit gemeint – gesprochen. Diese Bezeichnung gilt mittlerweile als nicht mehr zeitgemäß und irreführend. Die gegenwärtige Nomenklatur fasst diese Rezeptoren unter dem Begriff GABA<sub>A-RHO</sub> zusammen. Der Grund für diese dritte Gruppe an GABA-Rezeptoren ist folgender: GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren wurden ursprünglich als solche bezeichnet, die, pharmakologisch gesehen, eine dritte Gruppe bildeten. Ihre Eigenschaften passten weder in die „A-Gruppe“ (= geblockt von Bicucullin), noch in die „B-Gruppe“ (=aktiviert von Baclofen). Diese  $\rho$ -Untereinheiten kommen primär in der Retina vor (Olsen & Sieghart, 2008).

## 5. Liganden am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

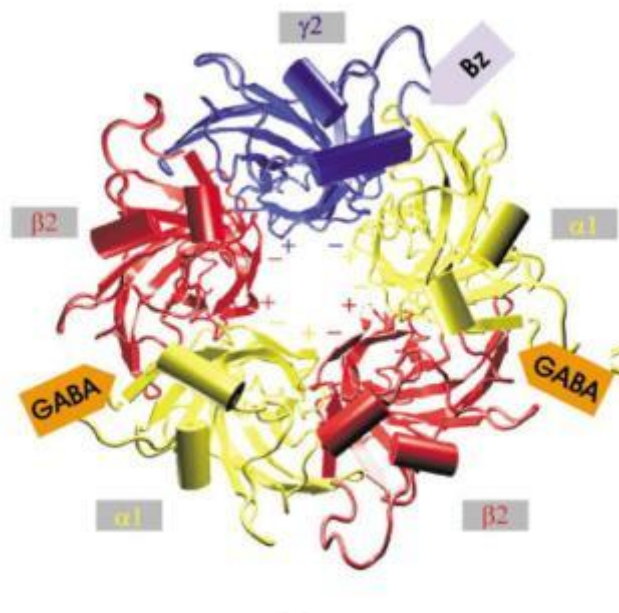
### 5.1 Agonisten

#### 5.1.1 GABA



**Abbildung 5: Strukturformel von GABA**

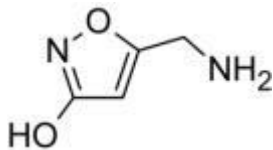
Die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist, wie oben nachzulesen, der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem. Bei Rezeptoren, die aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bestehen, bindet GABA in einem ersten Schritt an eine der 2 Bindungsstellen zwischen der  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheit. Dies führt zu einer Konformationsänderung, welche den Agonisten GABA noch fester in der Bindungstasche fixiert. Weitere Konformationsänderungen führen schließlich zur Öffnung des Ionenkanals (Sigel & Steinmann, 2012). Die Ligandenbindungsstellen bestehen aus 6 sogenannten „loops“ (A-F), wovon die loops A, B und C auf der „plus“- oder Hauptseite bzw.  $\beta$ -Untereinheit und D, E und F auf der „minus“- oder Komplementärseite bzw.  $\alpha$ -Untereinheit zu finden sind (Ernst et al., 2003).



**Abbildung 6: GABA<sub>A</sub>-Rezeptor mit  $\alpha$ 1,  $\beta$ 2 und  $\gamma$ 2 Untereinheit aus extrazellulärer Sicht mit (+) and (-) Seiten und Bindungsstellen für GABA (Ernst et al., 2003) (Copyright © 2003 IBRO. Published by Elsevier Ltd.)**

Es gibt zahlreiche Aminosäuren, welche für die Bindung von GABA an den Rezeptor essentiell sind: Dazu zählen unter anderem die aromatischen Aminosäuren  $\alpha$ 1F64,  $\beta$ 2Y97,  $\beta$ 2Y157,  $\beta$ 2Y205, die hydroxylierten Aminosäuren  $\beta$ 2T160,  $\beta$ 2T202,  $\beta$ 2S204,  $\beta$ 2209 und die geladenen Aminosäuren  $\alpha$ 1Arg66 bzw.  $\beta$ 2Arg207 (Czajkowski & Newell, 2003; Smith & Olsen, 1995; Czajkowski & Wagner, 2001; Kash et al., 2004).

### 5.1.2 Muscimol



**Abbildung 7: Muscimol**  
**(5-Aminomethyl-isoxazol-3-ol)**

Muscimol ist ein psychoaktives Isoxazol aus *Amanita muscaria* (Fliegenpilz). Es wirkt als selektiver Agonist an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und ist strukturell mit GABA, aber auch der Glutaminsäure verwandt - bei Muscimol agiert die 3-Hydroxyisoxazol-Gruppe als eine maskierte Carboxylgruppe. Weiters war Muscimol der erste selektive GABA<sub>A</sub>-Agonist, mit dem die Struktur-Aktivitäts-Beziehung bei Bicucullin-sensitiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren definiert wurde.

Muscimol ist ein potenter Agonist am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, ein potenter partieller Agonist am GABA<sub>C</sub>-Rezeptor und nicht aktiv am GABA<sub>B</sub>-Rezeptor. Im GABA-Metabolismus ist Muscimol ein schwaches Substrat bzw. Inhibitor der Wiederaufnahme von GABA, aber kein Substrat der GABA-Transaminase. Muscimol wird vorwiegend experimentell verwendet, diente aber auch als Leitstruktur für die Entwicklung zahlreicher Substanzen, die am GABAergen System angreifen wie zum Beispiel Tiagabin (GAT-Blocker) oder Gaboxadol (THIP) (Johnston, 2014).

## 5.2 Antagonisten

### 5.2.1 Bicucullin

Die krampfauslösende Substanz Bicucullin – ein natürlich vorkommendes Alkaloid der Gattung *Lamprocapnos* (veralteter Name hierfür ist *Dicentra*; zu Deutsch: Herzblumen) - ist seit ihrer ersten Erwähnung vor mehr als 40 Jahren eng mit der Geschichte der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verbunden. Anfangs war man sich noch im Unklaren, welche Rolle GABA im ZNS überhaupt einnimmt und auch welche verschiedenen GABA-Rezeptoren existieren bzw. wie diese funktionieren. Bicucullin leistete dazu äußerst wichtige Beiträge. Heute weiß man,

dass Bicucullin kompetitiv die Bindung von GABA an den Rezeptor hemmt und GABA seinerseits die Bindung von Bicucullin kompetitiv hemmt. Es hat keine Wirkung an GABA<sub>B</sub>- und GABA<sub>A-RHO</sub>-Rezeptoren (Johnston, 2013).

### **5.2.2 Picrotoxin**

Picrotoxin – das Gemisch aus Picrotoxinin und dem relativ inaktiven Picrotin - ist ein nicht-kompetitiver Antagonist des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Picrotoxin bindet vermutlich in der Pore des Ionenkanals und blockiert dadurch den Chloridflux. Neben GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren blockiert Picrotoxin auch Glycin- oder 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (Johnston, 2013).

## 5.3 Modulatoren des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors

### 5.3.1 $\alpha$ -Thujon

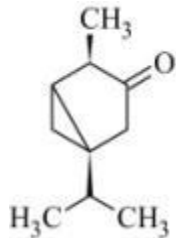


Abbildung 8:  $\alpha$ -Thujon

Das Monoterpen-Keton  $\alpha$ -Thujon, welches in dem bekannten, alkoholischen Getränk Absinth enthalten ist, ist ein nichtkompetitiver Antagonist des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors und wirkt somit krampfauslösend. Pflanzlichen Zubereitungen, die Thujone enthalten, wird eine antinozizeptive, insektizide und anthelminthische Wirkung zugeschrieben. Natürlich vorkommende Thujone sind eine Mischung aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thujonen, wobei das  $\alpha$ -Isomer die größere Toxizität besitzt. Es kommt in einer Vielzahl von Pflanzen vor, beispielsweise in *Artemisia absinthium* (Wermut) und *Salvia officinalis* (Echter Salbei) (Pelkonen et al., 2013; Szczot et al., 2012; Höld et al., 2000; Yagle et al., 2003).

### 5.3.2 Benzodiazepine

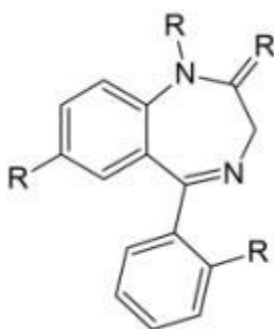


Abbildung 9: Grundstruktur der Benzodiazepine

(R = entsprechende Reste)

Der Name „Benzodiazepin“ kommt von der dieser Wirkstoffklasse zugrunde liegenden Struktur, welche eine Verbindung aus einem Benzol- und einem Diazepinring ist, wobei bei letztgenanntem die Stickstoffatome im Allgemeinen an Position 1 bzw. 4 zu finden sind (Rudolph & Knoflach, 2011). Die Geschichte der Benzodiazepine beginnt Mitte der 1950er Jahre, als man die klinische Relevanz von Beruhigungsmitteln mehr und mehr erkannte. Der erste Vertreter der Benzodiazepine war die Substanz Chlordiazepoxid, welche 1960 auf den Markt kam. Interessant hierbei ist, dass der Zeitraum zwischen der ersten pharmakologischen Untersuchung und der Markteinführung bloß zweieinhalb Jahre betrug. Da Chlordiazepoxid

wegen seines sehr bitteren Geschmacks gewisse Grenzen in der Therapie aufwies, war man auf der Suche nach einer Lösung dieses Problems. Schlussendlich kam es Ende des Jahres 1963 zur Einführung des wohl prominentesten Vertreters der Benzodiazepine: Diazepam (Sternbach, 1979).

Benzodiazepine wirken anxiolytisch, hypnotisch, antikonvulsiv und muskelrelaxierend. Am häufigsten finden sie Anwendung zur Anxiolyse und bei der Behandlung von Schlafstörungen. Nebenwirkungen beinhalten auf der subjektiven Seite Sedierung und auf der objektiven Seite kognitive und psychomotorische Beeinträchtigungen.

Weitere mögliche Nebenwirkungen umfassen eine schon erwähnte Sedierung, gepaart mit einem Gefühl der Schwere und Dysphorie. Dies ist jedoch stark dosisabhängig, lässt aber aufgrund von Toleranzentwicklung schnell nach. Bei höheren Dosen treten Unsicherheit, verwaschene Sprache und Verwirrtheit auf – besonders in der Kombination mit Alkohol. Ferner wird auch das Gedächtnis beeinträchtigt. Stürze und Hüftfrakturen sind ebenso ein nicht zu unterschätzender Risikofaktor. So kann bei Älteren das Auftreten von Hüftfrakturen bei Einnahme von Benzodiazepinen um 50% oder mehr beobachtet werden, gerade auch wenn andere Medikamente wie Antihypertensiva oder Antidepressiva verabreicht werden.

Es kann auch zu dem Phänomen der paradoxen Euphorisierung kommen. Hierbei führt ein disinhibitorischer Effekt des Benzodiazepins zu erhöhten Angstzuständen, akuter Erregung und Hyperaktivität. Wenn Langzeitanwender älter werden, werden sie auch empfindlicher gegenüber Benzodiazepinen. Dies begründet sich vermutlich durch eine Abnahme der Neuronenzahl bzw. der Rezeptoren. Daraus folgt eine größere Rezeptorbesetzung bei gleichbleibender Dosis. Eine daraus resultierende Beeinträchtigung kann auch zu einer falschen Diagnose von Demenz führen – der sogenannten „Pseudo-Demenz“ (Lader, 2012).

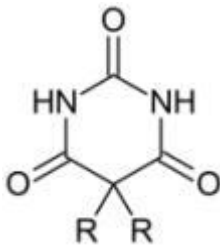
Eine erste Einteilung der Benzodiazepine erfolgt über ihre Eliminationshalbwertszeit. Kurz-wirksame Benzodiazepine haben eine mittlere Halbwertszeit von 1-12 Stunden (z.B. Midazolam, Triazolam), mittellang wirksame eine mittlere Halbwertszeit von 12-40 Stunden (z.B. Chlordiazepoxid, Flunitrazepam, Temazepam, Nitrazepam) und lang wirksame eine Halbwertszeit von 40-250 Stunden (z.B. Diazepam, Flurazepam).

Eine weitere Einteilung der Benzodiazepine kann auch über die relative Wirkstärke erfolgen. Die ersten Benzodiazepine waren von niedriger bis mittlerer Wirkstärke, wie zum Beispiel das lang wirksame Chlordiazepoxid, Oxazepam oder Temazepam. Dank ihrer Wirksamkeit und relativ geringen Toxizität wurden sie zu first-line Wirkstoffen bei Schlaflosigkeit und Angststörungen. Etwas später wurden die stark wirksamen Benzodiazepine wie Alprazolam, Lorazepam und Clonazepam entdeckt, welche auch neue Indikationen mit sich brachten. Dazu

zählen deren Einsatz bei Panikstörungen, als Beigabe zu selektiven Serotonin Reuptake Inhibitoren bei Zwangsstörungen und in der Kombination mit Antipsychotika bei akuter Manie oder Agitation (Griffin et al., 2013).

Die Benzodiazepin-Bindungsstelle formiert sich, wie weiter oben schon erwähnt, aus einer  $\alpha$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit (üblicherweise  $\gamma_2$ , welche in ungefähr 90% der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vorkommt) (Rudolph & Knoflach, 2011). Dabei werden nur GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren moduliert, welche  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\alpha_3$ - oder  $\alpha_5$ -Untereinheiten besitzen, da nur diese einen für die Modulation essentiellen Histidinrest in Position 101 ( $\alpha_1$ ) bzw. an korrespondierenden Stellen ( $\alpha_2$ -H101,  $\alpha_3$ -H126 und  $\alpha_5$ -H105) besitzen. Im Gegensatz dazu haben  $\alpha_4$ - bzw.  $\alpha_6$ -Untereinheiten, welche nicht auf Benzodiazepine ansprechen, einen Argininrest an der korrespondierenden Stelle (Rudolph et al., 1999). Die Entstehung von Toleranz bei Benzodiazepinen wird mit  $\alpha_5$ -Untereinheiten in Verbindung gebracht und für die Suchterzeugung sind  $\alpha_1$ -Untereinheiten verantwortlich (Rudolph & Knoflach, 2011).

### 5.3.3 Barbiturate



**Abbildung 10: Grundstruktur der Barbiturate**

Die Geschichte der Barbiturate geht weit zurück. Adolf von Baeyer synthetisierte die Barbitursäure erstmals im Jahr 1864, die klinische Einführung erfolgte 1904, den Höhepunkt markierte der Zeitraum zwischen 1930 und 1940 und in den 1950er Jahren begann langsam der Rückgang im Einsatz der Barbiturate. Die Gründe hierfür sind das hohe Abhängigkeitspotenzial und die geringe therapeutische Breite, welche sich durch sehr viele Todesfälle bemerkbar machte.

Anfangs erreichte man durch Barbituratgabe die besten Resultate in der Behandlung von Neurosen und Psychosen, später bei Schlafstörungen und schließlich als erste ernstzunehmende Therapie bei epileptischen Anfällen. Auch wurde die Anästhesie mit Barbituraten durchgeführt. Beispielhafte Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Phenobarbital, Amobarbital, Pentobarbital, Secobarbital und Thiopental (López-Muñoz et al., 2005).

Barbiturate greifen hauptsächlich an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an, aber auch an spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Kanälen (Mathers et al., 2007).

Barbiturate vermitteln dosisabhängig unterschiedliche Effekte am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor: in geringen Konzentrationen potenzieren sie die Aktivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und wirken so als allosterische Modulatoren. In höheren Konzentrationen aktivieren Barbiturate ohne das Vorhandensein von GABA den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, wirken somit als „direkte Agonisten“ und in noch höheren Konzentrationen schließlich blockieren sie den Chloridkanal (Thompson et al., 1996; Czajkowski & Sancar, 2011).

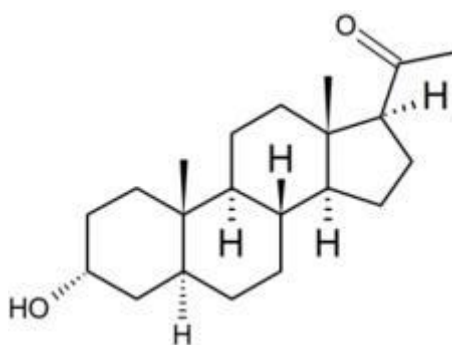
Nachfolgend sind beispielhaft die konzentrationsabhängigen Wirkungen von Pentobarbital aufgelistet (Jackson et al., 2009):

| <b>allosterische Modulation</b> | <b>direkte Aktivierung</b> | <b>Kanalblock</b> |
|---------------------------------|----------------------------|-------------------|
| 10-100 µM                       | 100-800 µM                 | 1-10 mM           |

Es wird angenommen, dass sich die Bindungsstelle der Barbiturate zwischen den M1-, M2- und M3-Regionen der β-Untereinheit befindet. So können Barbiturate, im Gegensatz zu GABA, deren Bindungsstelle sich extrazellulär zwischen den α- und β-Untereinheiten befindet, ebenfalls an Rezeptoren wirken, welche nur aus β-Untereinheiten (β-Homomere) bestehen (Jackson et al., 2009).

Kürzlich konnte mithilfe eines photoreaktiven Barbiturats gezeigt werden, dass Barbiturate vermutlich bei α1β3γ2-Rezeptoren an die α+/β- bzw. γ+/β-interfaces binden. Identifizierte Aminosäuren inkludieren α1A291, α1Y294, γ2S301 sowie β3M227.

#### 5.3.4 Neurosteroide



**Abbildung 11: 5α-pregnan-3α-ol-20-on**

Die Bezeichnung „Neurosteroid“ geht auf den französischen Endokrinologen Baulieu zurück, der diesen Begriff 1981 erstmals für diejenigen Steroide verwendete, welche - unabhängig von peripheren endokrinen Drüsen - *de novo* im Nervensystem aus Cholesterol synthetisiert werden (Carver & Reddy, 2013). Neurosteroid greifen sowohl an exzitatorischen NMDA-Rezeptoren, als auch an inhibitorischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an.

Die Konzentration von Neurosteroiden im Zentralnervensystem ändert sich ständig, da die lokale Produktion durch physiologische Prozesse (Stress, Schwangerschaft und Ovulationszyklus) als auch durch Einnahme von psychoaktiven Substanzen wie beispielsweise Ethanol,  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure (GHB) und Fluoxetin (Antidepressivum der SSRI-Klasse) beeinflusst wird und somit Schwankungen aufweist. Änderungen der Neurosteroid-Konzentration werden mit pathologischen Zuständen wie *postpartum* Depressionen, prämenstruellen Spannungszuständen, Panikattacken und auch Schizophrenie assoziiert (Lambert et al., 2009).

In den letzten Jahren fand man Hinweise darauf, dass gewisse Neurosteroid beim „fine tuning“ der neuronalen Inhibition eine Rolle spielen. Die Zusammensetzung der Rezeptor-Untereinheiten, Phosphorylierung, als auch der lokale Metabolismus der Steroide determinieren die Aktivierung von synaptischen und extrasynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Als Vertreter eines potenten Neurosteroids, welches GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren anspricht, kann 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on genannt werden (siehe Abbildung 11) (Mitchell et al., 2008).

Neurosteroid erhöhen in geringen Konzentrationen im nanomolaren Bereich (nM) bei Vorhandensein von GABA die Wahrscheinlichkeit für die Öffnung des GABA-gesteuerten Ionenkanals, wirken also als Modulatoren. Zusätzlich wirken diese Steroide in Konzentrationen von 100 nM direkt aktivierend auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor.

Die Neurosteroid-vermittelte GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Modulation wird nicht durch den Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil aufgehoben.

Es gibt zwei separate Bindungsstellen für Neurosteroid – die eine vermittelt modulatorische Aktivitäten bzw. Potenzierung, die andere ist für die direkte Aktivierung verantwortlich. Die modulatorische Aktivität geht von transmembranären Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit aus. Die direkte Rezeptoraktivierung wird von Aminosäureresten zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit vermittelt und wird durch Steroidbindung an die erstgenannte, für modulatorische Effekte verantwortliche Bindungsstelle verstärkt. Eine signifikante Rezeptoraktivierung durch Neurosteroid geschieht erst, wenn beide Stellen besetzt sind (Smart et al., 2007).

Strukturell gesehen benötigen Neurosteroid eine Hydroxylgruppe am C3 $\alpha$  des A-Rings und eine Ketongruppe an C20 des D-Rings, um am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor positiv zu modulieren. Eine

Grundregel besagt auch, dass  $5\alpha$ -reduzierte Steroide Ströme potenzieren, wogegen  $5\beta$ -reduzierte, geladene Steroide und das Hormon  $17\beta$ -Estradiol zumindest  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren mit  $\rho 1$ -Untereinheiten inhibieren. Steroidhormone verstärken also nicht nur die Wirkung von GABA, sondern können auch, je nach Struktur und Untereinheiten, den gegenteiligen Effekt haben. Diese inhibitorischen Neurosteroiden wurden von der Gruppe um Akk anhand von  $\rho 1$ -Untereinheiten näher untersucht. Es konnte eine Einteilung in drei Gruppen gemacht werden, welche Neurosteroiden für die Rezeptor-Inhibierung verantwortlich sind:  $5\beta$ -reduzierte, ungeladene Steroide, sulfatierte und carboxylierte Steroide und  $17\beta$ -Estradiol (Akk et al., 2013).

Threonin an Position 236 der  $\alpha$ -Untereinheit und Tyrosin an Position 284 der  $\beta$ -Untereinheit sind essentiell für die direkte Aktivierung des Rezeptors, wogegen Glutamin an Position 241 der  $\alpha$ -Untereinheit und Asparagin an Position 407 der  $\alpha$ -Untereinheit die Potenzierung des Effekts von GABA durch Neurosteroiden vermitteln (Smart et al., 2006).

Ferner finden sich Hinweise für potente Wirkungen von Neurosteroiden an  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren, welche eine  $\delta$ -Untereinheit besitzen. Solche Rezeptoren sind meist extrasynaptisch lokalisiert (Olsen, 2014).

### 5.3.5 Anästhetika

In Anbetracht des mehr als 165 jährigen Einsatzes von modernen Anästhetika im klinischen Bereich gibt es noch immer offene Fragen in Bezug auf die Mechanismen, wodurch Narkosemittel ihre Wirkung vermitteln. Die Schwierigkeit darin liegt an der Tatsache, dass Anästhetika chemisch gesehen eine sehr heterogene Gruppe bilden. Zum Einsatz kommen Substanzen wie Diethylether, halogenierte Kohlenwasserstoffe (zum Beispiel Isofluran, Sevofluran, Desfluran), Distickstoffmonoxid (Lachgas), Xenon, Ketamin, Propofol, Benzodiazepine, Etomidat, Alkohole und Barbiturate (Zhou et al., 2012). Generell versteht man unter einem Anästhetikum eine Substanz, die Immobilität, Amnesie, Muskelrelaxation und einen reversiblen Verlust des Bewusstseins zu induziert (Franks, 2006).

#### 5.3.5.1 Etomidat

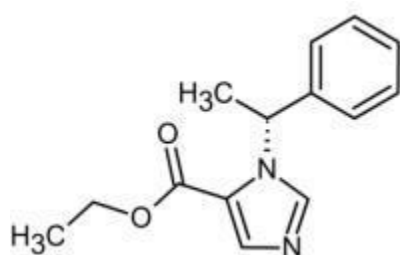


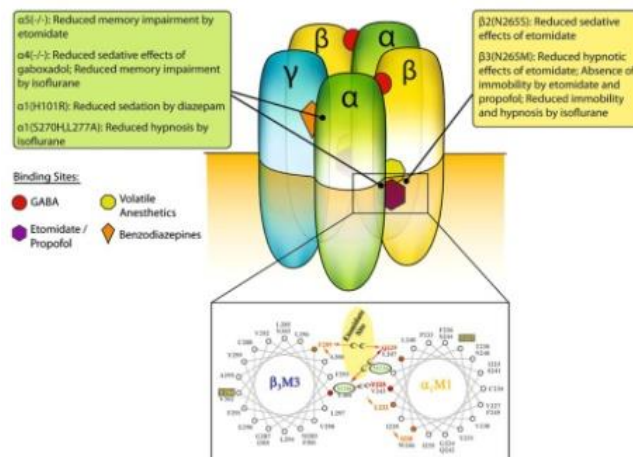
Abbildung 12: Strukturformel von R-(+)-Etomidat

Etomidat ist ein potentes Narkotikum, welches als allosterischer Modulator am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wirkt. Etomidat verstärkt die Aktivierung der Rezeptoren durch GABA – dies führt zu einer Erhöhung der Affinität bzw. einer Senkung der EC<sub>50</sub> von GABA. Etomidat aktiviert in hohen Konzentrationen auch direkt den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Stewart et al., 2013) .

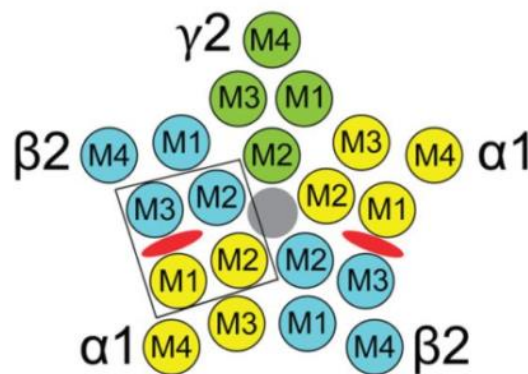
Eine wichtige Bindungsstelle für Etomidat stellt das transmembranäre  $\beta+\alpha$ - interface dar. Mit Hilfe zweier verschiedener photoaktiver Etomidat-Derivate ([<sup>3</sup>H]Aziatomidat und [<sup>3</sup>H]TDBzl-Etomidat)), welche ihre anästhetische Potenz *in vivo* behalten und die Funktion der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren *in vitro* verstärken, wurden zwei Aminosäurereste -  $\alpha$ 1Met-236 in der M1-Domäne der  $\alpha$ <sub>1</sub>-Untereinheiten und  $\beta$ 3Met-286 in der M3-Domäne der  $\beta$ <sub>3</sub>-Untereinheiten – während der allosterischen Modulation wie auch beim direkten Öffnen des Kanals von Etomidat irreversibel markiert. Diese beiden Aminosäuren befinden sich im oberen Teil, nahe der extrazellulären Region der transmembranären Domäne des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors an der  $\beta+\alpha$ - Schnittstelle und daher unterhalb der GABA-Bindungsstelle (siehe **Abbildung 13** und **Abbildung 14**) (Cohen et al., 2012; Olsen et al., 2006).

Eine weitere Bindungsstelle für Etomidat befindet sich an der transmembranen  $\beta_3+\beta_3$ - Schnittstelle von  $\alpha_1\beta_3$ -Rezeptoren. Dies erklärt auch die allosterische Modulation, welche Etomidat an homo-oligomeren  $\beta_3$ -Rezeptoren hervorruft (Slany et al., 1995). Des weiteren wird bei einer Aktivierung des Rezeptors durch GABA die Affinität von Etomidat zu dessen Bindungsstelle erhöht (Stewart et al., 2013).

Weiters spielt Asparagin an Position 265 (N265) bei  $\beta$ 2- und  $\beta$ 3-Untereinheiten eine wichtige Rolle für die Sensitivität zu Etomidat. So führt eine Mutation dieses Asparagins zu Methionin zu einer Reduktion des Effekts von Etomidat (Stewart et al., 2014). Etomidat vermittelt seine anästhetische Wirkung über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\beta$ 3-Untereinheiten, während für die sedierende Wirkkomponente Rezeptoren mit  $\beta$ 2-Untereinheiten verantwortlich sind (Reynolds et al., 2003).



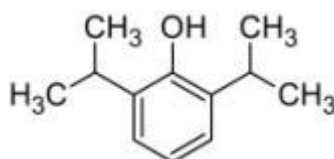
**Abbildung 13: GABA<sub>A</sub>-Rezeptor mit Bindungsstellen von GABA, Etomidat/Propofol und Benzodiazepinen** (Wang & Orser, 2011) (Copyright © 2010, Canadian Anesthesiologists' Society)



**Abbildung 14: Schematischer Querschnitt eines α1β2γ2 GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Der Chloridkanal ist grau, die Bindungsstellen von Etomidat sind rot dargestellt**

(Stewart et al., 2013) (Copyright © 2013 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.)

#### 5.3.5.2 Propofol



**Abbildung 15: Strukturformel von Propofol**

Propofol moduliert nicht nur GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, sondern aktiviert daneben auch die Proteinkinase C und blockiert nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren wie auch Calcium-

Kanäle des L-Typs (Chau, 2010). Propofol potenziert den Effekt von GABA bei GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, ist aber bei Abwesenheit von GABA größtenteils unwirksam (Hales & Lambert, 1991).

Wichtige Aminosäuren für die Bindung von Propofol befinden sich in der  $\beta$ -Untereinheit an Position 153 (Glutamat) und an Position 196 (Lysin) (Venkatachalan & Czajkowski, 2008). Ein photoaktives Propofol-Analogon markierte drei Aminosäuren in der  $\beta 3$ - $\alpha 1$ -Schnittstelle – Methionin an Position 286 ( $\beta 3$ M286) und an Position 236 ( $\alpha 1$ M236). Diese beiden Aminosäuren sind auch für die Bindung von Etomidat essentiell (siehe **Kapitel 3.3.5.2**). Außerdem wurde Methionin an Position 227 in der transmembranären Region der  $\beta$ -Untereinheit identifiziert (Cohen et al., 2014). Untersuchungen an  $\beta 3$ -Homomeren ergaben vier weitere Aminosäuren, welche für die Bindung von Propofol verantwortlich sind – Tyrosin an Position 143, Phenylalanin an 221, Glutamin an 224 und Threonin an Position 266 (Akk et al., 2015). Weitere Aminosäurereste, welche den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor betreffen, finden sich in der folgenden Tabelle (Chau, 2010; Richardson et al., 2007):

| $\beta 1$ | $\beta 2$     | $\beta 3$     | $\gamma 2$ |
|-----------|---------------|---------------|------------|
| Serin 265 | Glycin 129    | Asparagin 265 | Leucin 287 |
| Serin 290 | Methionin 286 | Asparagin 289 |            |
|           | Tyrosin 444   |               |            |

**Tabelle 2: Aminosäuren für Propofolbindung** nach Chau, 2010

## Problemstellung und Zielsetzung

Das Anästhetikum Etomidat ist ein  $\beta 2/3$ -präferierender Modulator von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Die Bindungsstellen von Etomidat befinden sich in den transmembranären Domänen zwischen  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten (Olsen et al., 2006).

Ziel meiner Diplomarbeit war es, den Einfluss ausgewählter Aminosäuren, die sich vermutlich in dieser Bindungstasche befinden, auf die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen ( $I_{\text{GABA}}$ ) zu untersuchen.

### Ziele:

1. **Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und funktionelle Charakterisierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Wildtyp und mutierten Kanälen)**
  - $\alpha 1\beta 1\gamma 2\text{S}$
  - $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$
  - $\alpha 1\beta 3\text{T}262\text{S}\gamma 2\text{S}$
  - $\alpha 1\beta 3\text{T}266\text{A}\gamma 2\text{S}$
  - $\alpha 1\beta 3\text{N}265\text{S}\gamma 2\text{S}$
  - $\alpha 1\beta 3\text{M}286\text{W}\gamma 2\text{S}$
  - $\alpha 1\beta 3\text{F}289\text{S}\gamma 2\text{S}$
2. **Untersuchung konzentrationsabhängiger Effekte auf die Modulation von  $I_{\text{GABA}}$  durch die mutierten Kanäle durch Etomidat und anschliessender Vergleich der  $\text{EC}_{50}$ -Werte und maximalen Potenzierung ( $E_{\text{max}}$ ) mit Wild-Typ  $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$  Rezeptoren**

## Material und Methoden

Alle hier beschriebenen Vorgänge wurden bereits in zahlreichen Diplomarbeiten, die in der Vergangenheit am Department für Pharmakologie und Toxikologie (Universität Wien) durchgeführt wurden, beschrieben und sind daher nur geringfügig adaptiert noch einmal zusammengefasst (siehe unter anderem die Diplomarbeit von Mag. Verena Hiebl (2013) „*In vitro Untersuchung der möglichen beta-selektiven Modulation von GABAA Rezeptoren durch Píperin-Derivate*“).

### Verwendete Substanzen, Materialien, Software und Geräte

| Chemikalien                                                                                                   | Hersteller                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <i>Tricain</i> (Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoesäureethylesters)                                      | Sigma, Österreich            |
| Collagenase 1A                                                                                                | Sigma, Österreich            |
| OR2 (82,5 mM NaCl, 2mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O, 5 mM HEPES)                            | Sigma, Österreich            |
| ND96 (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O, 5 mM HEPES, 1 mM CaCl <sub>2</sub> ) | Sigma, Österreich            |
| GABA (γ-Aminobuttersäure)                                                                                     | Sigma, Österreich            |
| Diazepam                                                                                                      | Sigma, Österreich            |
| Etomidat                                                                                                      | Sigma, Österreich            |
| Materialien                                                                                                   | Hersteller                   |
| Borsilikat-Glaskapillaren                                                                                     | Harvard Apparatus, UK        |
| <i>Xenopus laevis</i> Frösche                                                                                 | NASCO, USA                   |
| Software                                                                                                      | Hersteller                   |
| Robosoft                                                                                                      | Robosoft Corporation, USA    |
| Clampfit 10.2                                                                                                 | Axon Instruments Inc., USA   |
| Origin 7.0                                                                                                    | Origin Lab Corporation, USA  |
| Clampex 10.2                                                                                                  | Axon Instruments Inc., USA   |
| Geräte                                                                                                        | Hersteller                   |
| TURBO TEC O1C Amplifier                                                                                       | npi electronics, Deutschland |
| TECAN Miniprep 60                                                                                             | Tecan, Österreich            |

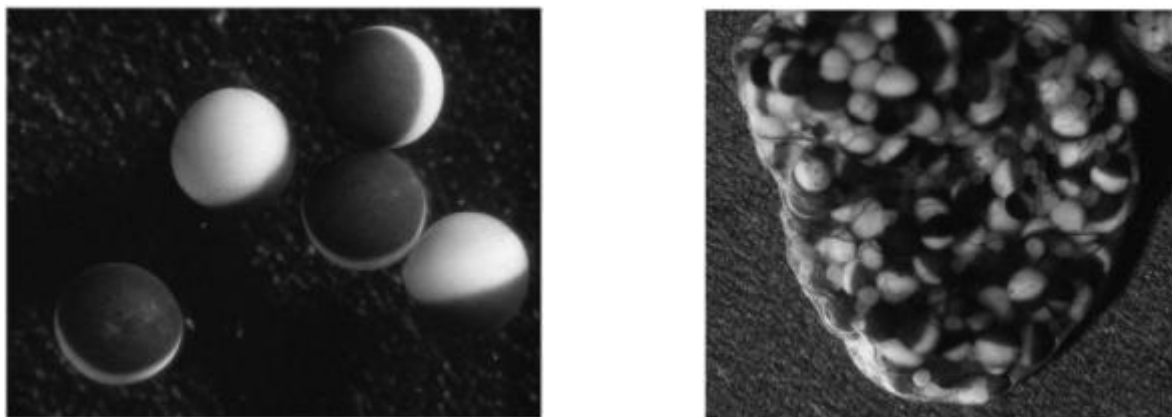
### ***Xenopus laevis***

*Xenopus laevis* bezeichnet den afrikanischen Krallenfrosch, der auch unter dem Namen „Apothekerfrosch“ bekannt ist. Diese Gattung ist in Südafrika heimisch und lebt dort in der Natur in ungünstiger Umgebung. Dies ist einer der Gründe, weshalb sich die Frösche und auch die Eizellen (Oozyten) für die Arbeit im Labor sehr gut eignen, da sie relativ widerstandsfähig sind. Die Oozyten besitzen alle Zellorganellen, Nährstoffe, Enzyme und Substrate, welche für die frühen Stufen der Entwicklung nach der Befruchtung gebraucht werden. Weiters besitzt die Membranoberfläche der Oozyten relativ wenige endogene Ionenkanäle.

Die Oozyten von *Xenopus laevis* sind ein weitverbreitetes System für die Expression von Proteinen, vor allem für Plasmamembranproteine. Dieses System erlaubt die Transformation von genetischer Information in der Form von DNA oder RNA in das kodierte Protein. Die Funktion und Modulation eben dieses kodierten Proteins kann daraufhin beobachtet werden.

Es gibt 6 Stufen der Oozytenentwicklung, welche auch zur gleichen Zeit vorkommen können, da die Oogenese asynchron verläuft. Die ausgewachsenen Stufen V oder VI werden für Expressionsstudien bevorzugt. Diese sind große, runde Zellen mit 1,1-1,2 mm Durchmesser. Die Zellen teilen sich in eine dunkelbraune und eine weiß-gelbliche Hemisphäre (siehe **Abbildung 16**) (Sigel & Minier, 2005).

Die *Xenopus* Oozyten sind schon länger als Expressionssystem für Proteine bekannt. Dazu gibt es Arbeiten von Gurdon aus dem Jahr 1971 (Gurdon et al., 1971).



**Abbildung 16: links - selektierte Oozyten; rechts - Eierstock mit Oozyten, vor Verdauung** (Sigel & Minier, 2005) (Copyright © 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)



**Abbildung 17: Entnahme der Oozyten** (Sigel & Minier, 2005) (Copyright © 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

### ***Präparation der Oozyten und Expression funktioneller GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren***

Weibliche *Xenopus laevis* wurden für 10-15 Minuten einer 0,2% MS-222 (= Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters; = Tricain)-Lösung ausgesetzt und dadurch anästhesiert. Danach wurden Teile des Eierstockes operativ entfernt. Dazu wurde der Frosch auf ein nasses Tuch gelegt und mit Hilfe zwei kleiner Schnitte erst die Oberhaut, dann die Bauchmuskelschicht geöffnet und anschließend die direkt darunter liegenden Ovarien entnommen (siehe **Abbildung 17**). Diese wurden in ein mit OR2-Lösung gefülltes Tube gegeben. Die einzelnen Oozyten sind von Follikelgewebe umgeben, welches entfernt werden muss. Dazu teilt man die Ovarien vorher in kleine „Häufchen“ aus ungefähr 10 Oozyten und setzt danach die enzymatische Verdauung an. Dazu stellt man Kollagenase (Typ 1a, Sigma)-Lösung (2mg/ml) her, versetzt diese mit den zu verdauenden Oozyten und gibt dies für ungefähr 90 Minuten in den Inkubator bei 18°C. Anschließend folgen mehrere Waschvorgänge mit einer ND96-Lösung. Die verdauten und gewaschenen Oozyten der Stadien V-VI werden für die spätere Injektion verwendet.

Die Oozyten wurden mit ungefähr 10 – 50 nl einer Lösung von Diethylpyrocarbonat-hältigem Wasser, welches die zu injizierende cRNAs in einer Konzentration von 100 – 2500 ng/µl/Untereinheit enthält, injiziert. Die Menge an cRNA wurde mit Hilfe des Nano-Drop ND-1000 (Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland) bestimmt. Um die Expression der  $\gamma$ -Untereinheiten zu gewährleisten ( $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ ,  $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2S$ ,  $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$ ,

$\alpha 1\beta 3M286W\gamma 2S$  und  $\alpha 1\beta 3F289S\gamma 2S$  Rezeptoren), wurden die cRNAs in einem Verhältnis von 1:1:10 gemischt (Boileau et al., 2002).

Für die Expression von  $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$ -Rezeptoren wurden die cRNAs in einem Verhältnis von 1:1:10 gemischt (Krishek et al., 1996).

Die Injektion an sich geschah mit einem speziellen pneumatischen Gerät, womit ungefähr 50 nl des cRNA-Gemisches mit Hilfe von Druck in jede Eizelle injiziert wurde. Eine erfolgreiche Injektion zeigte sich durch Volumenzunahme des Oozyts. Die injizierten Oozyten wurden anschließend wieder mit Antibiotika-haltiger ND96-Lösung bei 18°C im Inkubator gelagert und konnten nach 24h für die Messung verwendet werden.

### **Messlösungen**

Die täglich frisch hergestellte GABA-Stammlösung (GABA + ND96) hatte eine Konzentration von 1mM. Daraus wurden die bei den Messungen verwendeten GABA-Konzentrationen durch Verdünnen mit ND96 täglich frisch hergestellt.

Etomidat lag als Stammlösung in einer Konzentration von 100mM, gelöst in DMSO, vor. Daraus wurden ebenso die verschiedenen Konzentrationen (0.1  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M und 500  $\mu$ M) durch Verdünnen mit ND96 täglich frisch hergestellt.

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

Die Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik – oder two-electrode-voltage-clamp (TEVC) technique – ist die am weitesten verbreitete elektrophysiologische Methode, um Spannungen bzw. Ströme zu messen, welche durch in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten Kanäle fließen. Hierbei werden zwei Elektroden durch die Membran des Oocyten geführt. Eine der Elektroden, die „voltage-electrode“, misst das Membranpotential und schickt dieses Signal an einen Verstärker, wo dieses Signal mit dem Kontrollpotential von -70 mV verglichen wird. Die andere Elektrode, die „current-electrode“, schickt den Strom, welcher sich aus der Differenz zwischen des von der „voltage-electrode“ gemessenen und des gewünschten Membranpotentials von -70 mV ergibt, durch die Membran und zur Referenzelektrode. Die Elektroden bestehen aus Glas, welches mit einer 2 M KCl-Lösung gefüllt ist. Sie haben einen elektrischen Widerstand zwischen 1 und 3 M $\Omega$ . Die Elektroden werden an speziellen Halterungen angebracht, welche einen Silberdraht besitzen, der mit einer AgCl<sub>2</sub>-Schicht überzogen ist. Dadurch wird das Signal von der KCl-Lösung durch den Silberdraht zum

Verstärker übertragen. Ein Stereomikroskop mit einer Kaltlichtquelle wird über einem Tisch platziert.

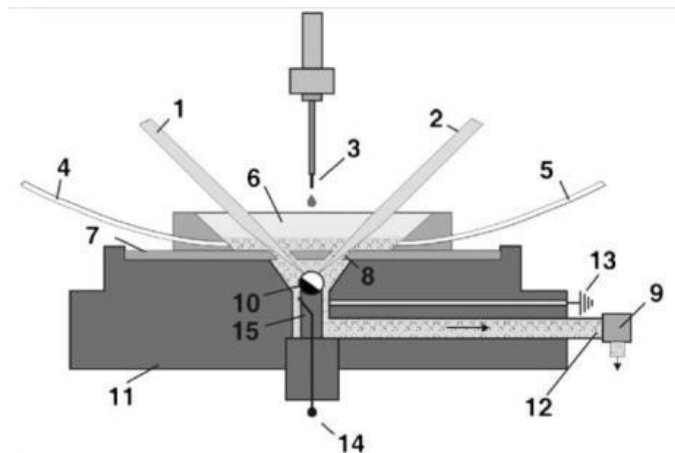
### **Perfusionssystem**

Die elektrophysiologischen Experimente wurden mit der zwei-Elektroden voltage-clamp Methode unter Verwendung eines TURBO TEC 01C Verstärkers (NPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland) bei einem Haltepotential von -70 mV durchgeführt. Alle Lösungen wurden mithilfe einer modifizierten Version eines „fast-perfusion“-Systems nach Hering appliziert (Hering, 1998).

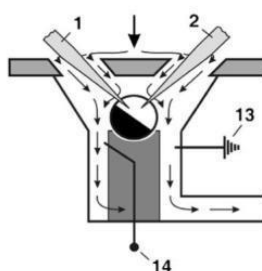
Der Oocyt liegt hierbei in einem kleinen Bad (ungefähr 15 µl), welches mit einer Glasplatte (Nummer 7 in **Abbildung 18**) abgedeckt ist. Zwei schräge Einlasskanäle (Nummer 1 und 2 in **Abbildung 18**) mit einem Durchmesser von <1 mm in dieser Glasplatte ermöglichen den Zugang für die beiden Mikroelektroden zum Oozyten (Nummer 10 in **Abbildung 18**). Darüber befindet sich ein Trichter (Nummer 6 in **Abbildung 18**) für die Applikation der Messlösungen. Die Messlösungen werden mit einem Roboter, dem Miniprep 60 (Tecan, Durham, NC), in den Trichter appliziert.

Mithilfe eines Computers und der Software „Robosoft“ kann somit eine Automatisierung erreicht werden. Die elektronische Aufzeichnung der Ströme erfolgte mit dem Programm „Clampex 10.2“, die Auswertung mit „Clampfit 10.2“ und die weitere Verarbeitung mit „Origin 7.0“ bzw. „CorelDRAW X5“ (Baburin et al., 2006).

**A)**



**B)**



**C)**



**Abbildung 18:** A) Aufsicht auf die Perfusionskammer; B) schematische Darstellung des Flusses; C) Foto der Perfusionskammer;

(1) und (2) Mikroelektroden; (3) Applikationsarm; (4) und (5) Abflüsse des Trichters; (6) Trichter; (7) Glasabdeckung; (8) Einlässe für Elektroden; (9) Pumpe; (10) Oozyte; (11) Gehäuse; (12) Abfluss; (13) Referenzelektrode

(Baburin et al., 2006) (Copyright © 2006, Springer-Verlag)

## Ergebnisse

Das Ziel meiner Diplomarbeit war die Untersuchung des Effekts 5 ausgewählter Punktmutationen in der TM2 bzw. TM3 Domäne der  $\beta 3$ -Untereinheit auf die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen ( $I_{\text{GABA}}$ ) durch das Anästhetikum Etomidat mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und eines schnellen Perfusionssystems.

Dafür wurden sowohl Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$ - bzw.  $\alpha 1\beta 1\gamma 2\text{S}$ - Rezeptoren als auch mutierte Rezeptoren  $\alpha 1\beta 3\text{T}262\text{S}\gamma 2\text{S}$ -,  $\alpha 1\beta 3\text{N}265\text{S}\gamma 2\text{S}$ -,  $\alpha 1\beta 3\text{T}266\text{A}\gamma 2\text{S}$ -,  $\alpha 1\beta 3\text{M}286\text{W}\gamma 2\text{S}$ -, und  $\alpha 1\beta 3\text{F}289\text{S}\gamma 2\text{S}$ -Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert.

### 1. Pharmakologische Charakterisierung der exprimierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

Für die pharmakologische Charakterisierung der zu untersuchenden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wurden die bereits erwähnten Untereinheiten-Kombinationen in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und mittels 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und eines schnellen Perfusionssystems GABA-Konzentrationswirkungskurven erstellt. Dafür wurden an jedem Rezeptorsubtyp ansteigende Konzentrationen von GABA appliziert, die erhaltene Stromamplituden abgemessen und anschliessend nach folgender Formel normiert:

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

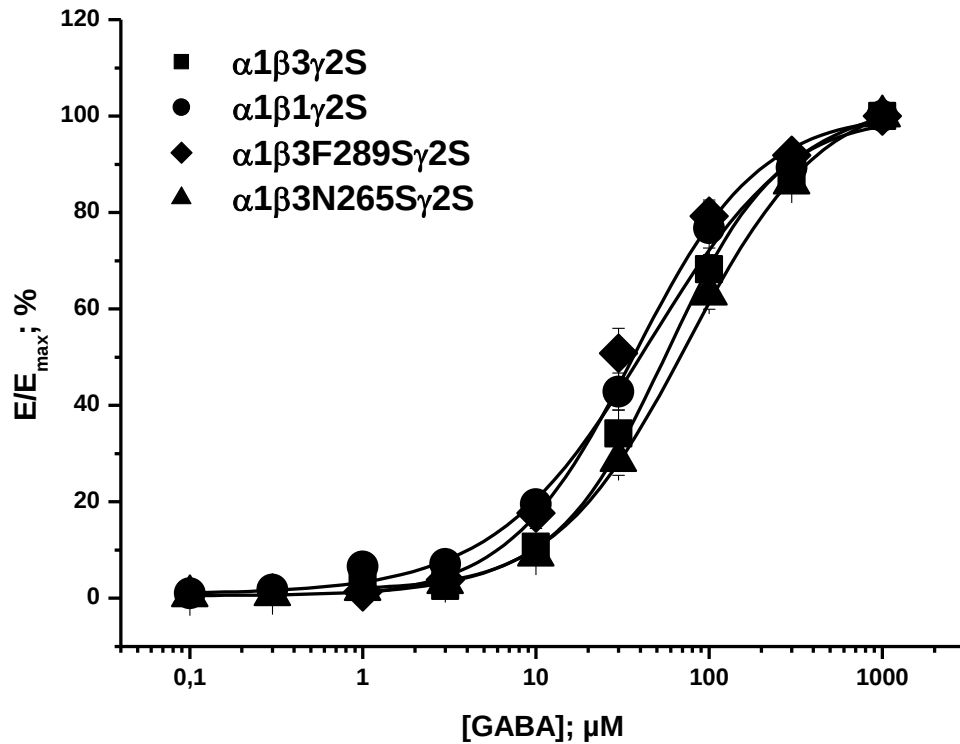
Amplitude<sub>x</sub>... Amplitude bei jeweiliger Konzentration

Amplitude<sub>max</sub>... Amplitude induziert von 1mM GABA

Die so bestimmten Werte wurden in ein halblogarithmisches Koordinatensystem eingetragen und durch die Datenpunkte wurde darauf eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung gelegt. Anhand der so erhaltenen Konzentrationswirkungskurve konnte ich dann die EC<sub>50</sub>-Werte, d.h. jene Konzentration, welche den halbmaximalen Effekt auslöst, bzw. die EC<sub>3-7</sub>-Werte (die anschliessend für die Untersuchung der Modulation von  $I_{\text{GABA}}$  durch Etomidat verwendet wurden) abgelesen werden.

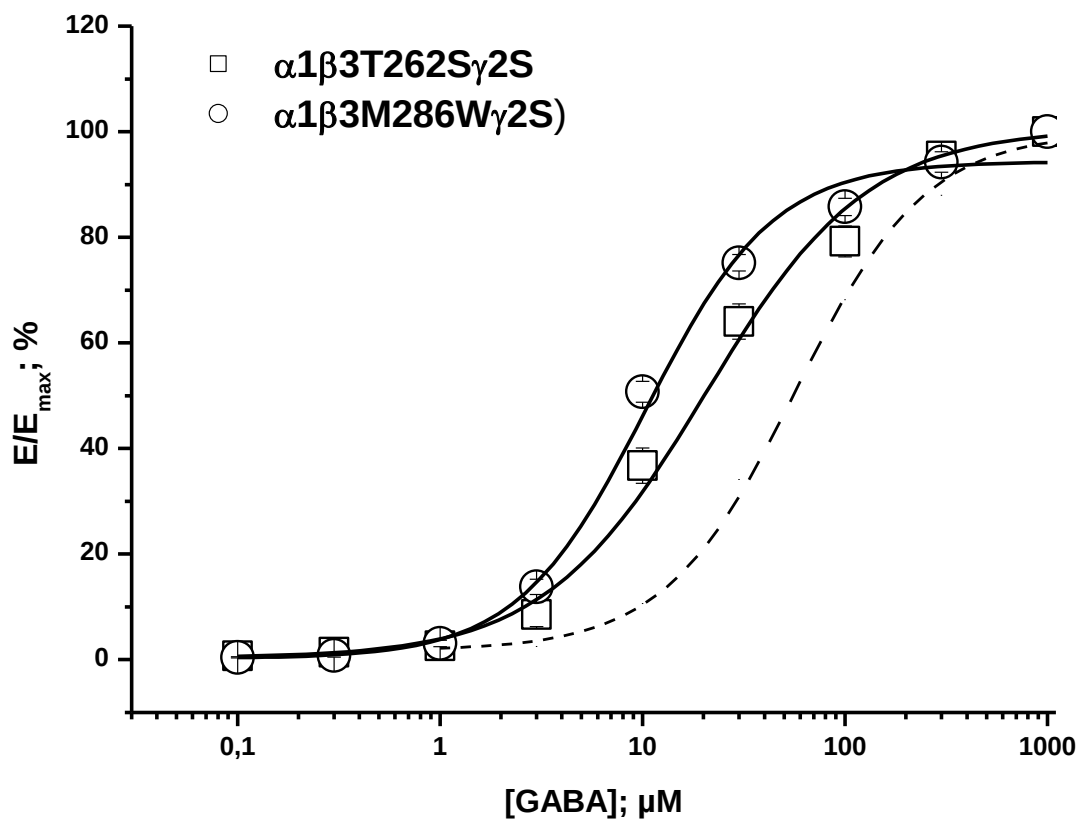
Wie in **Abb. 19** gezeigt, unterschieden sich die Konzentrationswirkungskurven für  $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$ ,  $\alpha 1\beta 1\gamma 2\text{S}$ ,  $\alpha 1\beta 3\text{N}265\text{S}\gamma 2\text{S}$  und  $\alpha 1\beta 3\text{F}289\text{S}\gamma 2\text{S}$ -Rezeptoren nicht signifikant. Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte lagen für  $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{S}$ -Rezeptoren bei  $60.5 \pm 7.7 \mu\text{M}$  (n=6), für  $\alpha 1\beta 1\gamma 2\text{S}$ -Rezeptoren bei  $44.9 \pm 5.7 \mu\text{M}$  (n=7), für  $\alpha 1\beta 3\text{N}265\text{S}\gamma 2\text{S}$ -Rezeptoren bei  $75.7 \pm 4.3 \mu\text{M}$  (n=7) und für  $\alpha 1\beta 3\text{F}289\text{S}\gamma 2\text{S}$ -Rezeptoren bei  $38.9 \pm 4.9 \mu\text{M}$  (n=6; p>0.05; statistische Signifikanz gegen

Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren wurde mittels one-way ANOVA mit anschliessendem Dunnett Mittelwert-Vergleich berechnet; siehe auch Tabelle 3).



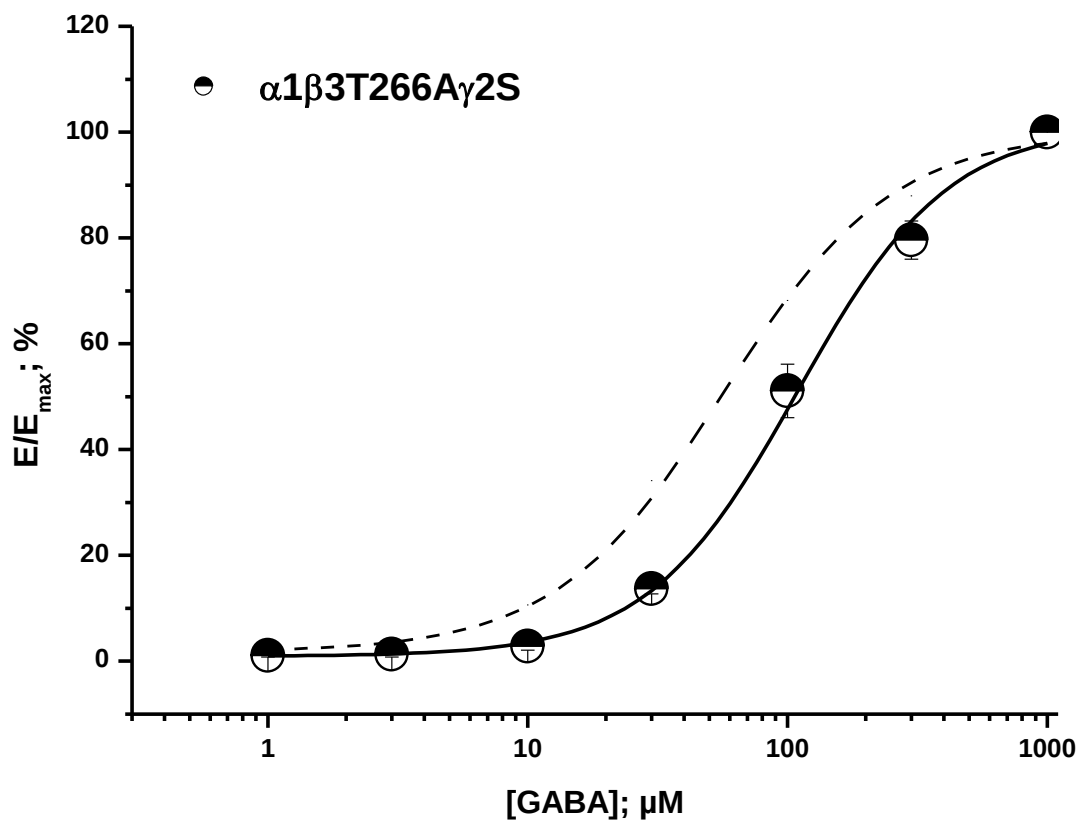
**Abbildung 19:** GABA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an (■)  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -, (●)  $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$ -, (♦)  $\alpha 1\beta 3F289S\gamma 2S$ - und (▲)  $\alpha 1\beta 3N265S\gamma 2S$ -Rezeptoren.

Im Gegensatz dazu kam es durch Einführen der Punktmutationen  $\beta 3T262S$  bzw.  $\beta 3M286W$  zu einer signifikanten Erhöhung der GABA-Sensitivität im Vergleich zu Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren ( $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ :  $EC_{50} = 60.5 \pm 7.7 \mu M$  vs.  $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2S$   $EC_{50} = 21.4 \pm 2.7 \mu M$ ,  $n=6$ ,  $p < 0.001$  vs.  $\alpha 1\beta 3M286W\gamma 2S$   $EC_{50} = 12.3 \pm 1.5 \mu M$ ,  $n=8$ ,  $p < 0.0001$ ; siehe **Abb. 20**).



**Abbildung 20:** Konzentrations-Wirkungs-Kurven von GABA an (□)  $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2S$  – und (○)  $\alpha 1\beta 3M286W\gamma 2S$ - Rezeptoren im Vergleich zu  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Kanälen (strichlierte Linie).

Der gegenteilige Effekt konnte durch Einführen der Punktmutation  $\beta 3T266A$  beobachtet werden: hier führte der Austausch eines Threonin-Restes durch ein Alanin zu einer signifikanten Reduktion der GABA-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor ( $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ :  $EC_{50} = 60.5 \pm 7.7 \mu M$  vs.  $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$ :  $EC_{50} = 116.5 \pm 12.7 \mu M$ ,  $n=8$ ,  $p < 0.0001$ , siehe auch **Abb. 21**).



**Abbildung 21:** Konzentrations-Wirkungs-Kurven von GABA an  $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$

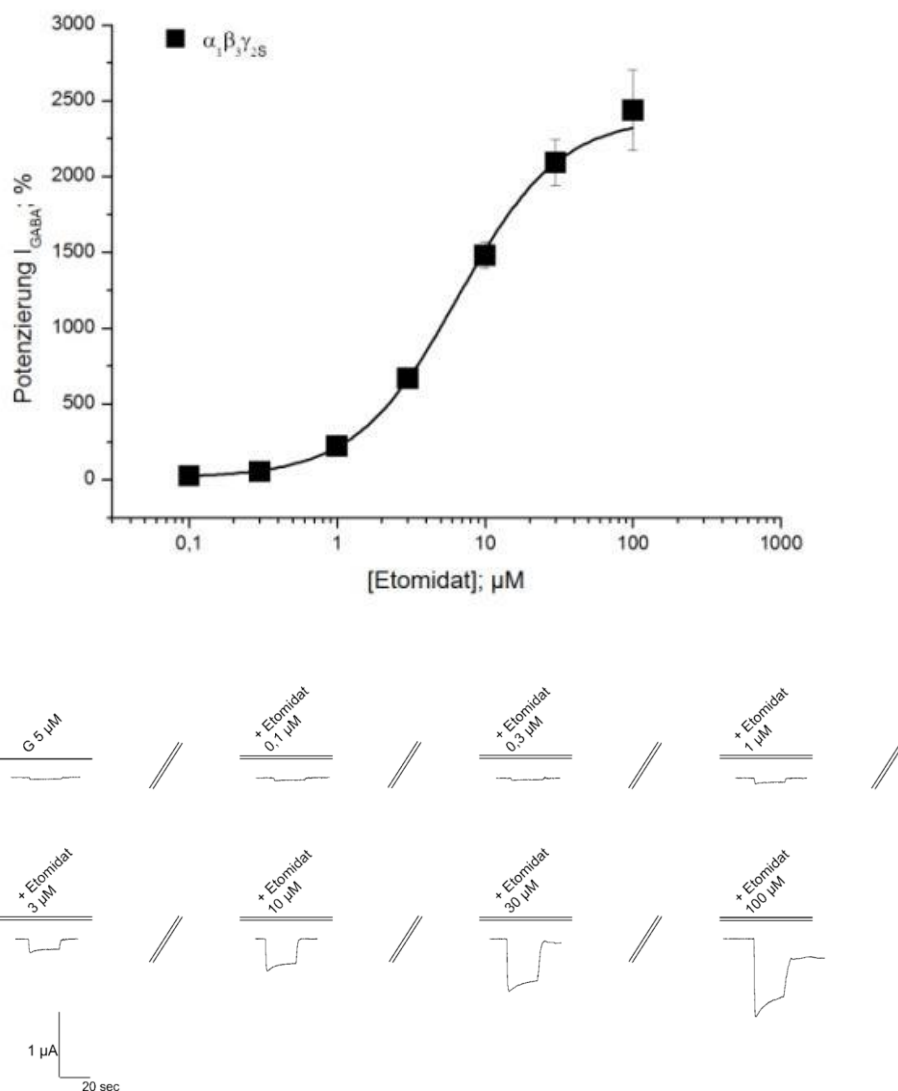
| Rezeptorsubtyp                  | Substanz | EC <sub>50</sub> (μM) | N |
|---------------------------------|----------|-----------------------|---|
| $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$      | GABA     | 60,5±7,7              | 6 |
| $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$      | GABA     | 44.9±5.7              | 7 |
| $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2S$ | GABA     | 21.4±2.7 (***)        | 6 |
| $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$ | GABA     | 116.5±12.7 (****)     | 5 |
| $\alpha 1\beta 3N265S\gamma 2S$ | GABA     | 75.7±4.3              | 7 |
| $\alpha 1\beta 3M286W\gamma 2S$ | GABA     | 12.3±1.5 (****)       | 8 |
| $\alpha 1\beta 3F289S\gamma 2S$ | GABA     | 38.9±4.9              | 6 |

**Tabelle 3:** Rezeptorsubtypen mit der EC<sub>50</sub> von GABA, Anzahl der Experimente (= n) und statistischer Signifikanz berechnet im Vergleich zu  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$  Rezeptoren durch one-way ANOVA mit anschliessendem Dunnet-Mittelwertvergleich. (\*\*\*) bedeutet  $p < 0,001$  bzw. (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

## 2. Effekt ausgewählter Punktmutationen auf die Modulation von $I_{GABA}$ durch Etomidat

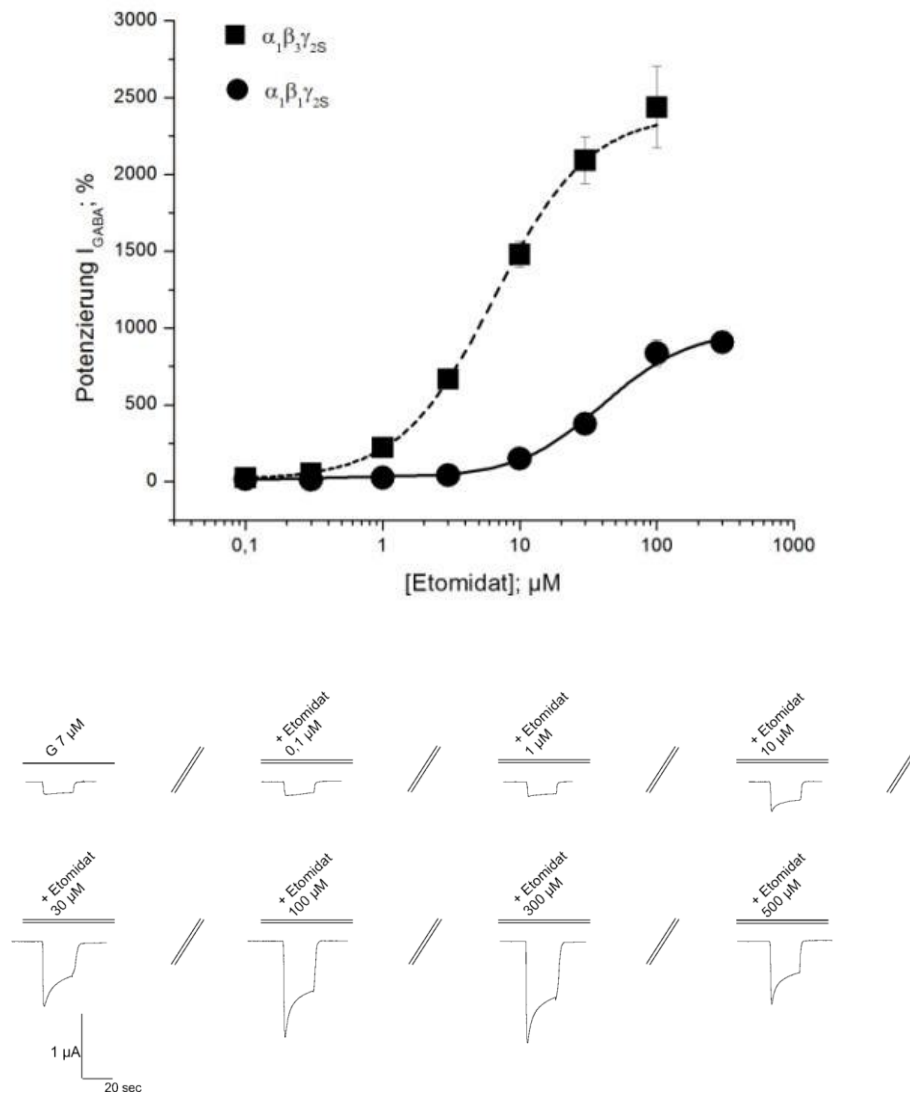
Anschließend wurde nun die konzentrations-abhängige Modulation von  $I_{GABA}$  ( $EC_{3-7}$  Konzentrationen) von Etomidat durch die einzelnen, punktmutierten Rezeptoren untersucht:

Wie in **Abb. 22** illustriert, modulierte Etomidat Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren konzentrations-abhängig: erste statisch signifikante Potenzierung von  $I_{GABA}$  wurde bei Konzentrationen  $\geq 0,3\mu M$  beobachtet; der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert lag bei  $6,5 \pm 0,7\mu M$  und die maximale Potenzierung von  $I_{GABA}$  ( $EC_{3-7}$ ) lag bei  $2395 \pm 133\%$  ( $n=7$ , siehe **Abb. 22** für ein typisches Experiment).



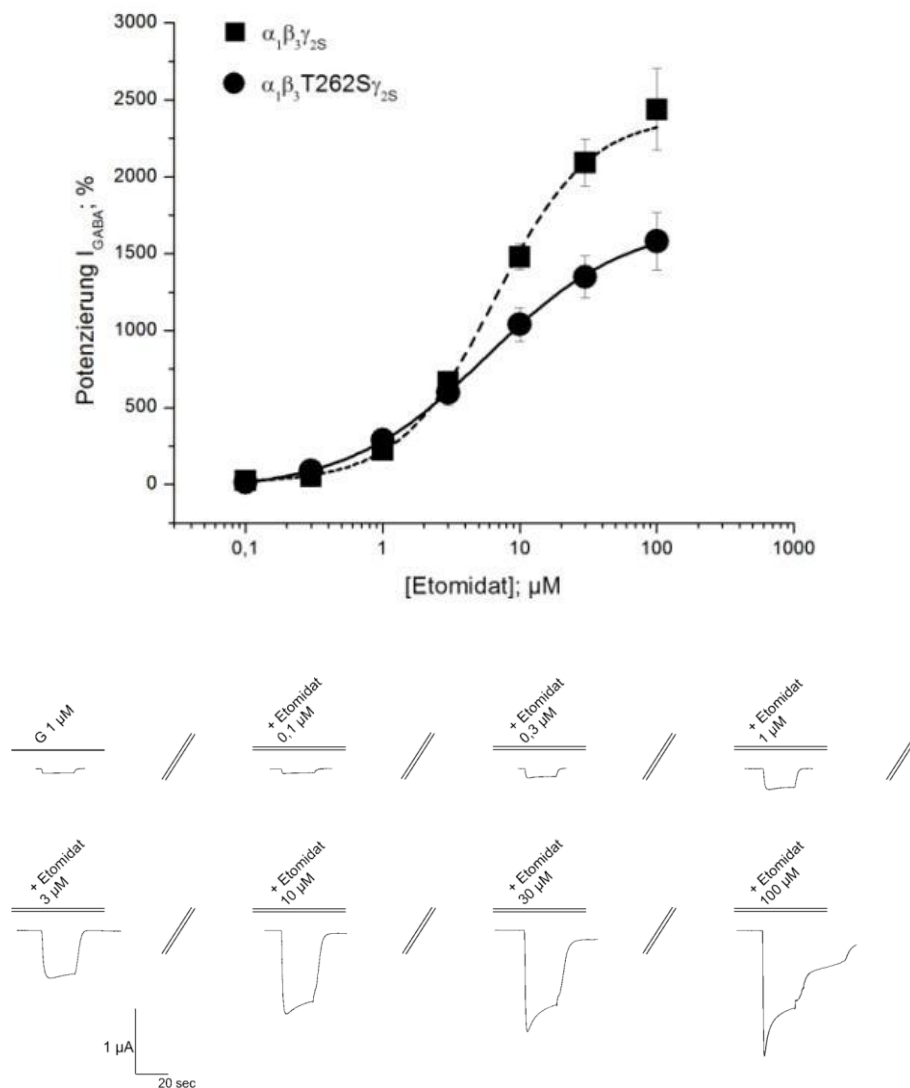
**Abbildung 22:** Konzentrations-Wirkungskurve von Etomidat an  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM von 7 Oozyten von mindestens 2 verschiedenen Fröschen. Repräsentative Ströme für die Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch die angezeigten Konzentrationen von Etomidat.

Austausch der  $\beta 3$ -Untereinheit durch die  $\beta 1$ -Untereinheit (siehe auch Abb. 23 für die ermittelte Konzentrations-Wirkungskurve und ein repräsentatives Experiment) führte zu einer signifikanten Reduktion der maximalen Modulation des GABA-induzierten Chloridstroms durch Etomidat ( $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ :  $E_{\max}=991\pm 58\%$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $E_{\max}=2395\pm 133\%$ ;  $p<0,001$ ). Desweiteren konnte auch eine signifikante Reduktion der  $EC_{50}$  ( $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ :  $EC_{50}=40,2\pm 6,3\mu M$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $EC_{50}=6,5\pm 0,7\mu M$ ;  $p<0,001$ ) beobachtet werden.



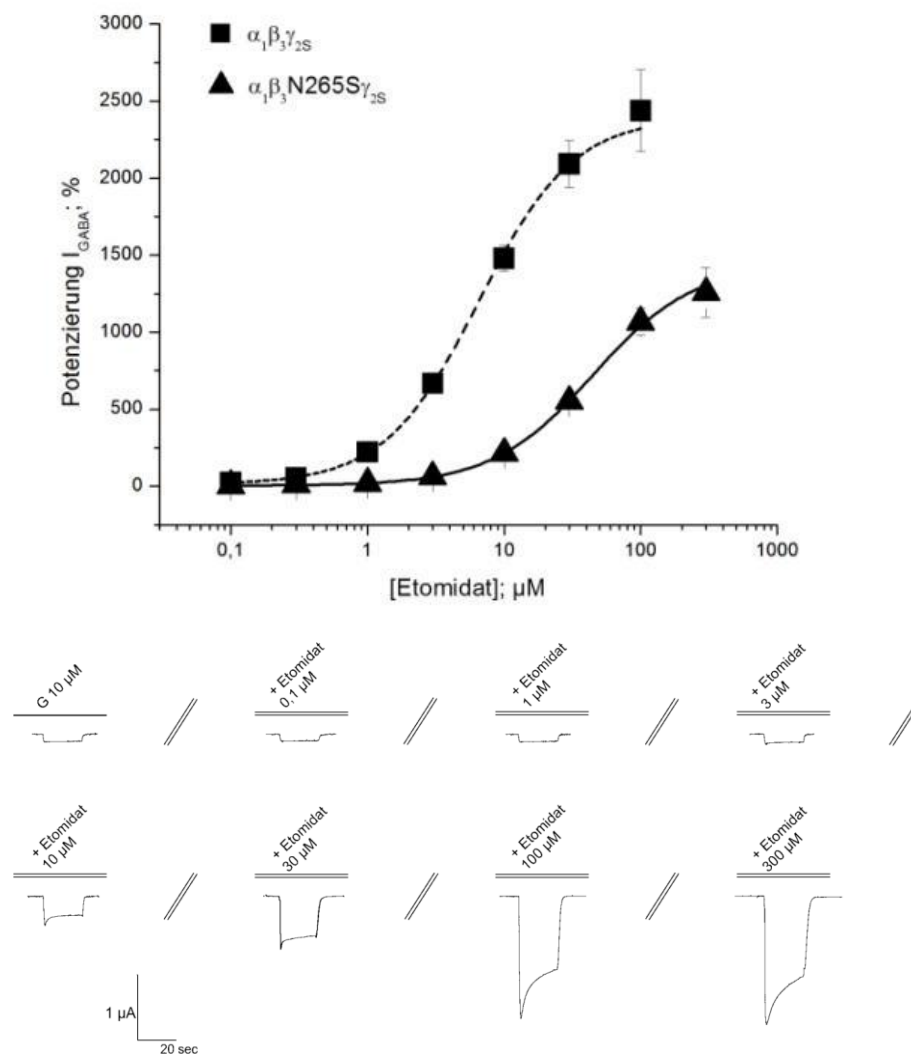
**Abbildung 23:** Konzentrations-Wirkungskurve von Etomidat an  $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$ -Rezeptoren (strichlierte Linie zeigt im Vergleich dazu die Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch Etomidat an  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren). Jeder Datenpunkt repräsentiert hierbei den Mittelwert  $\pm$  SEM von 6 Oozyten von mindestens 2 verschiedenen Fröschen. Repräsentative Ströme für die Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch die angezeigten Konzentrationen von Etomidat.

Wie in **Abb. 24** gezeigt, resultierte der Austausch des Threonin-Restes in Position 262 durch einen Serin-Rest in der  $\beta 3$ -Untereinheit ( $\beta 3T262S$ ) zwar in einer signifikanten Reduktion der maximalen Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch Etomidat ( $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2$ :  $E_{max}=1710\pm 30\%$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $E_{max}=2395\pm 133\%$ ;  $p<0,001$ ), während sich der  $EC_{50}$ -Werte für Etomidat aber nicht signifikant von dem für Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren unterschied ( $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2$ :  $EC_{50}=5,7\pm 0,3\mu M$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $EC_{50}=6,5\pm 0,7\mu M$ ;  $p>0.05$ ).



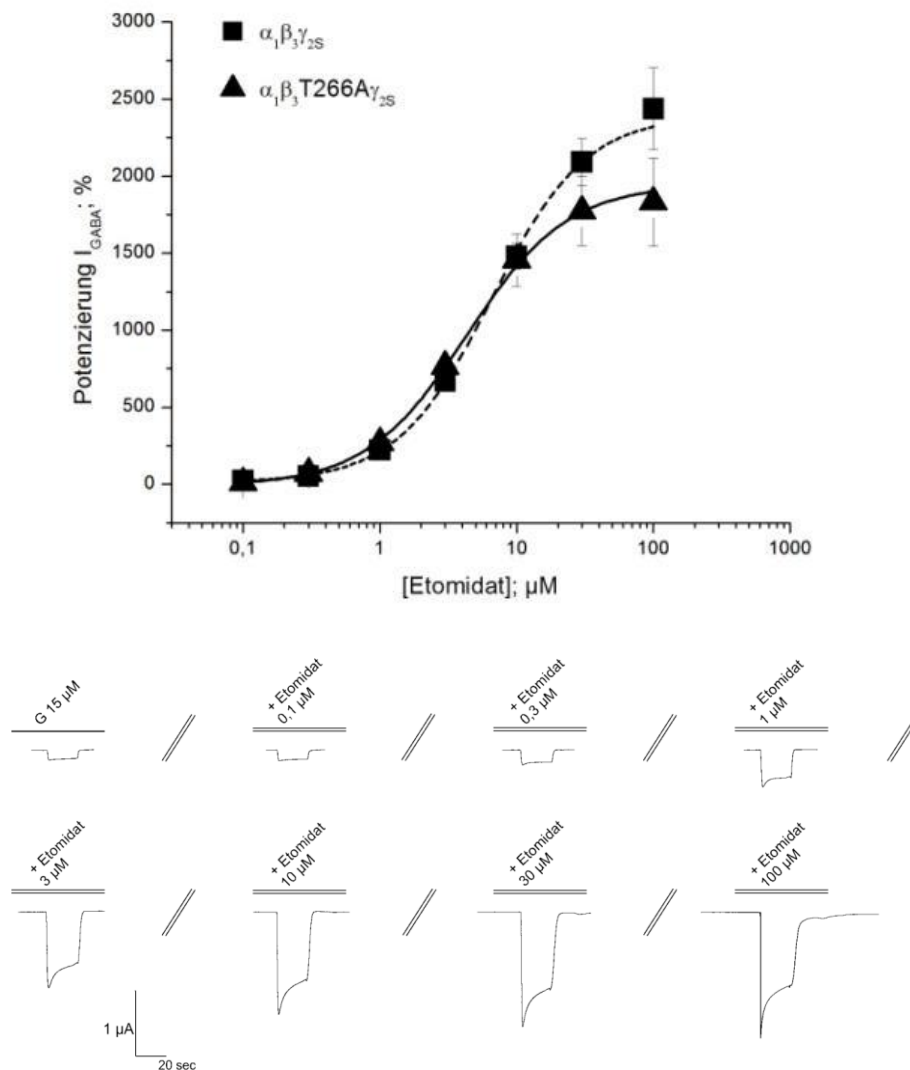
**Abbildung 24:** Konzentrations-Wirkungskurve von Etomidat an  $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2S$ -Rezeptoren im Vergleich zu  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren (strichlierte Linie). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert  $\pm$  SEM von 8 Oozyten von mindestens 2 verschiedenen Fröschen dar. Unter der Konzentrations-Wirkungskurve ist ein typisches Experiment für die Modulation von  $I_{GABA}$  durch die angezeigten Konzentrationen von Etomidat dargestellt.

Einführen der Mutation  $\beta 3N265S$  führte zu einer signifikanten Reduktion der maximalen Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch Etomidat im Vergleich zu Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren ( $\alpha 1\beta 3N265S\gamma 2S$ :  $E_{max} = 1440 \pm 54\%$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $E_{max} = 2395 \pm 133\%$ ;  $p < 0,001$ ); darüberhinaus kam es durch diese Mutation ebenfalls zu einer signifikante Reduktion der Etomidat  $EC_{50}$  ( $\alpha 1\beta 3N265S\gamma 2S$ :  $EC_{50} = 44,7 \pm 3,3\mu M$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $EC_{50} = 6,5 \pm 0,7\mu M$ ;  $p < 0,001$ ; siehe auch **Abb. 25** für die Konzentrations-Wirkungskurve von Etomidat an mutierten  $\alpha 1\beta 3N265S\gamma 2S$ -Rezeptoren im Vergleich zu Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren und ein typisches Experiment für die Modulation von  $I_{GABA}$  durch die mutierten Rezeptoren durch Etomidat.



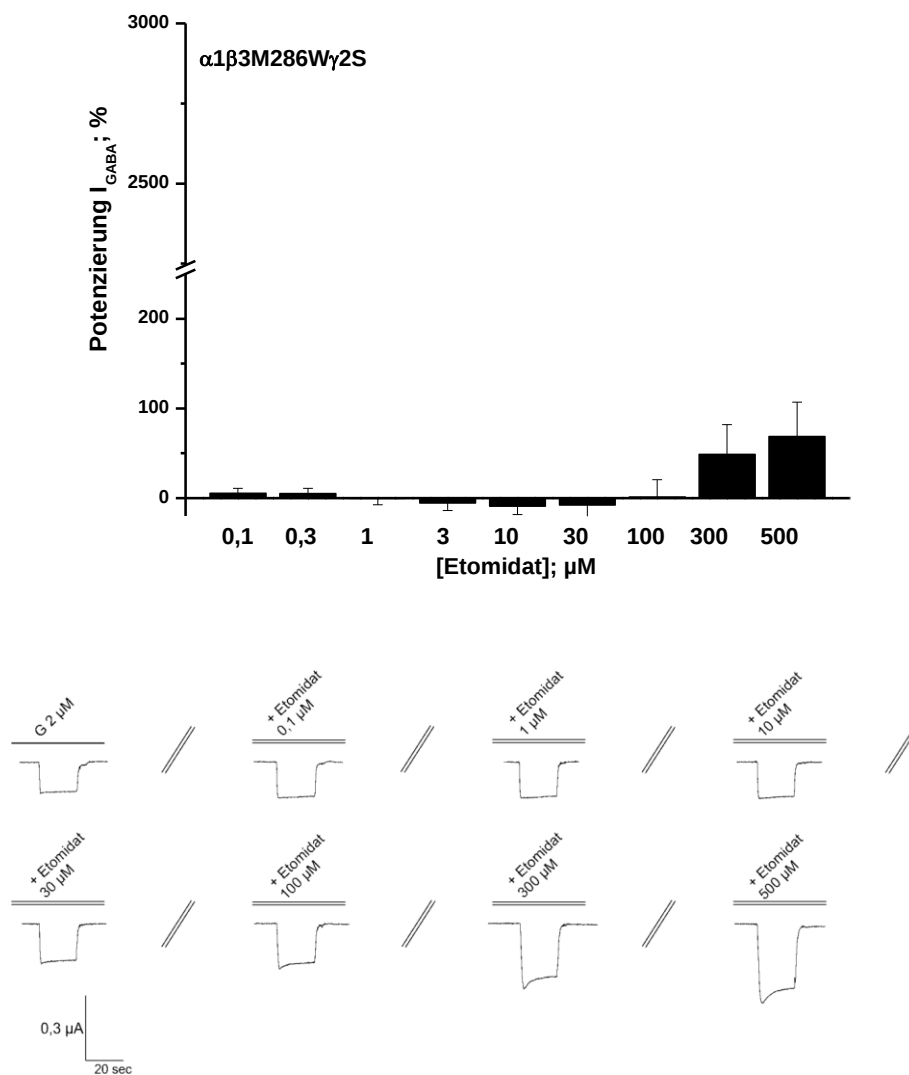
**Abbildung 25:** Konzentrations-Wirkungskurve von Etomidat an  $\alpha 1\beta 3N265S\gamma 2S$ -Rezeptoren im Vergleich zu  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren (strichlierte Linie). Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von 6 Oozyten von mindestens 2 verschiedenen Fröschen. Unter der Konzentrations-Wirkungskurve ist ein repräsentatives Experiment für die Modulation von  $I_{GABA}$  an  $\alpha 1\beta 3N265S\gamma 2S$ -Kanälen durch ansteigende Konzentrationen von Etomidat gezeigt.

Wie in **Abb. 26** gezeigt, führte der Austausch eines weiteren, benachbarten Threonin-Restes ( $\beta 3T266$ ) durch einen Alanin-Rest ( $\beta 3T266A$ ) ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der maximalen Modulation von  $I_{GABA}$  durch Etomidat ( $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$ :  $E_{max} = 1949 \pm 74\%$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $E_{max} = 2395 \pm 133\%$ ;  $p < 0,05$ ); ähnlich wie bei  $\alpha 1\beta 3T262S\gamma 2S$ -Rezeptoren, kam es durch diese Threonin-Mutation auch zu keiner signifikanten Änderung der Etomidat-Sensitivität ( $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$ :  $EC_{50} = 4,3 \pm 0,3 \mu M$  vs.  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ :  $EC_{50} = 6,5 \pm 0,7 \mu M$ ;  $p > 0,05$ ).



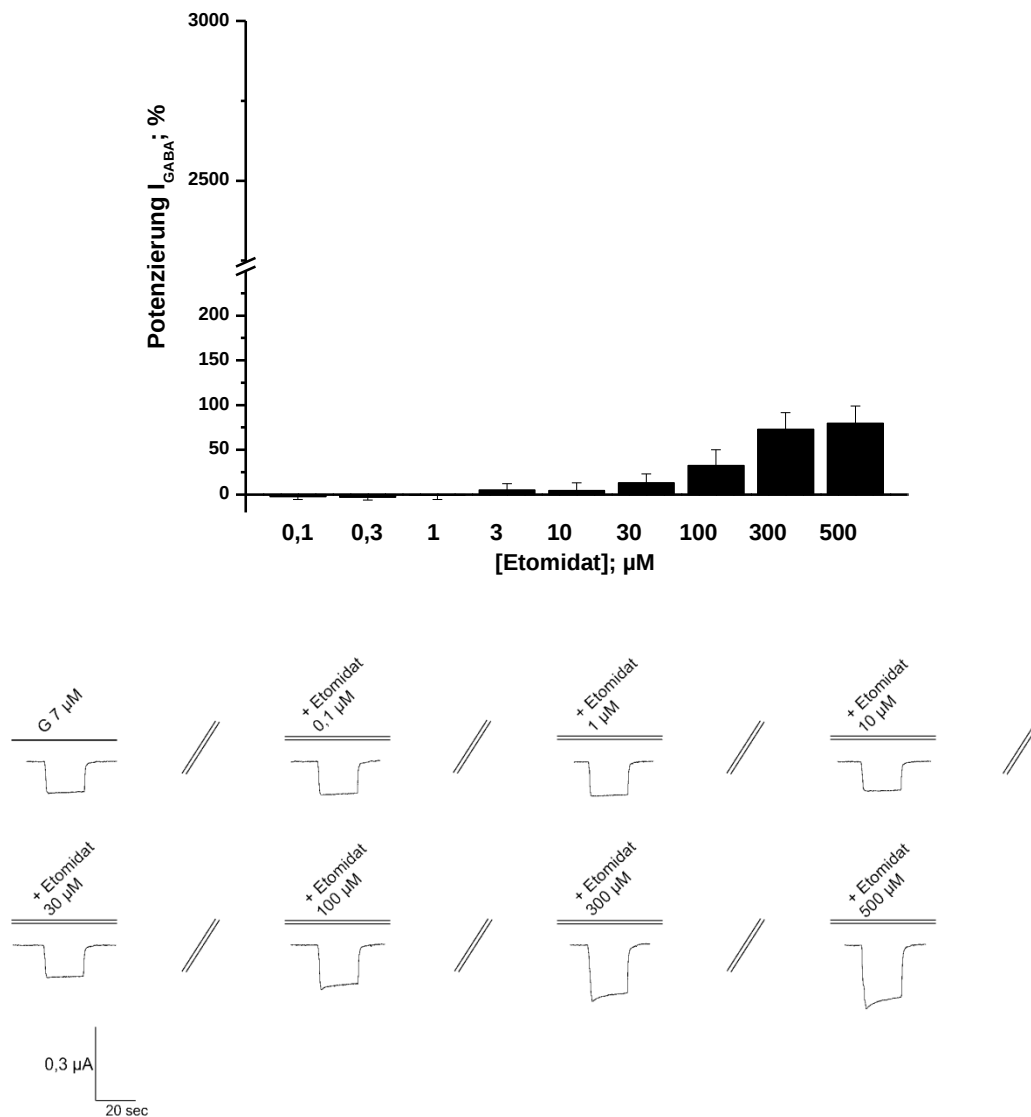
**Abbildung 26: A)** Konzentrations-Wirkungskurve von Etomidat an  $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$ -Rezeptoren im Vergleich zu Wildtyp  $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -Rezeptoren (strichlierte Linie). Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 Oozyten von mindestens 2 verschiedenen Fröschen. Unter der Konzentrations-Wirkungskurve ist ein repräsentatives Experiment für die Modulation von  $I_{GABA}$  an  $\alpha 1\beta 3T266A\gamma 2S$ -Kanälen durch ansteigende Konzentrationen von Etomidat gezeigt.

Mutation des Methionin-Restes in Position 286 ( $\beta$ 3M286) in der  $\beta$ 3-Untereinheit nach Tryptophan ( $\beta$ 3M286W) führte zu einem völligen Verlust der Modulation von  $I_{\text{GABA}}$  durch Etomidat. Bei keiner der untersuchten Konzentrationen (0,1-500  $\mu\text{M}$ ) konnte ein signifikanter Effekt ( $p > 0,05$ ) auf  $I_{\text{GABA}}$  durch  $\alpha$ 1 $\beta$ 3M286W $\gamma$ 2S-Kanäle bestimmt werden (siehe auch Abb. 27)



**Abbildung 27:** Balkendiagramm für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Etomidat an  $\alpha$ 1 $\beta$ 3M286W $\gamma$ 2S-Rezeptoren. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM von 7 Oozyten von mindestens 2 verschiedenen Fröschen. Repräsentatives Experiment für die Wirkung von Etomidat in ansteigende Konzentrationen auf  $I_{\text{GABA}}$  (EC<sub>3-7</sub>) durch  $\alpha$ 1 $\beta$ 3M286W $\gamma$ 2S-Rezeptoren.

Ein ähnlicher Effekt konnte auch durch Einführen der Punktmutation  $\beta 3F289S$  beobachtet werden: wiederum konnte bei keiner der applizierten Konzentration ( $>500\mu M$ ) von Etomidat eine signifikante Modulation von  $I_{GABA}$  ( $EC_{3-7}$ ) durch  $\alpha 1\beta 3F289S\gamma 2S$ -Kanäle gemessen werden (siehe auch **Abb. 28**).



**Abbildung 28:** Balkendiagramm für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Etomidat an  $\alpha 1\beta 3F289S\gamma 2S$ -Rezeptoren. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM von 7 Oozyten von mindestens 2 verschiedenen Fröschen. Repräsentatives Experiment für die Wirkung von Etomidat in ansteigende Konzentrationen auf  $I_{GABA}$  ( $EC_{3-7}$ ) durch  $\alpha 1\beta 3F289S\gamma 2S$ -Rezeptoren.

| Rezeptortyp  | Substanz | E <sub>max</sub> (%) | EC <sub>50</sub> (μM) | n |
|--------------|----------|----------------------|-----------------------|---|
| α1β1γ2S      | Etomidat | 991±58 (***)         | 40,2± 6,3 (***)       | 6 |
| α1β3γ2S      | Etomidat | 2395±133             | 6,5±0,7               | 7 |
| α1β3T262Sγ2S | Etomidat | 1710±30 (***)        | 5,7±0,3               | 8 |
| α1β3T266Aγ2S | Etomidat | 1945±74 (*)          | 4,3±0,3               | 4 |
| α1β3N265Sγ2S | Etomidat | 1441±54 (***)        | 44,7±3,3 (***)        | 6 |
| α1β3M286Wγ2S | Etomidat | 70±77                | n.d                   | 7 |
| α1β3F289Sγ2S | Etomidat | 227± 288             | n.d                   | 7 |

**Tabelle 4:** Rezeptorsubtypen mit der E<sub>max</sub> und der EC<sub>50</sub>, Anzahl der Experimente (= n). Statistisch signifikante Unterschiede zu Wildtyp α1β3γ2S Rezeptoren wurden mittels one-way ANOVA mittels anschliessendem Dunnet-Mittelwertvergleich berechnet. (\*) p<0,05; (\*\*) p<0,01; (\*\*\*) p<0,005. Keine von 0 signifikant unterschiedliche Modulation von I<sub>GABA</sub> durch Etomidat konnte an den mutierten Rezeptoren α1β3M286Wγ2S bzw. α1β3F289Sγ2S ermittelt werden; Daher werden die Effekte von 500 μM Etomidat gelistet.

## Diskussion und Conclusio

Das Ziel meiner Diplomarbeit war es, den Einfluß ausgewählter Punktmutationen in den TM2 bzw. TM3-Domänen auf die Modulation von  $I_{GABA}$  durch das Anästhetikum Etomidat zu untersuchen.

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor besitzt spezifische Bindungsstellen für strukturell diverse Substanzen wie GABA, Barbiturate, Benzodiazepine oder Anästhetika (Macdonald & Olsen, 1994). Erkrankungen, welche mit einem Ungleichgewicht des GABAergen Systems einhergehen, reichen von Angst- und Schlafstörungen über Depressionen bis hin zu Epilepsie (Möhler, 2012). Auch Lern- und Gedächtnisprozesse sind eng mit dem GABAergen System verknüpft (Möhler et al., 2004). Aufgrund des pentameren Aufbaus des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors aus einem Pool von insgesamt neunzehn verschiedenen Untereinheiten, und aufgrund des therapeutischen Potentials, welches aus den vielfältigen Erkrankungsfeldern resultiert, ist der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor besonders interessant (Hines et al., 2012). So greifen beispielsweise Benzodiazepine an die extrazelluläre Region zwischen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit an (Sieghart, 1995). Anästhetika, wie Etomidat, binden im Gegensatz dazu an die transmembranäre Domäne der  $\alpha/\beta$ -Schnittstelle (Olsen & Li, 2011).

Aus der Literatur sind bereits einige Aminosäuren bekannt, welche für die Bindung bzw. auch die Modulation von  $I_{GABA}$  durch Etomidat essentiell sind: Dazu zählen unter anderem Methionin an Position 286 innerhalb der transmembranären Region von  $\beta 2$ - und  $\beta 3$ -Untereinheiten ( $\beta 2/3M286$ ) (Miller & Smart, 2010), Asparagin an Position 265 innerhalb der zweiten transmembranären Region der  $\beta 3$ -Untereinheit ( $\beta 3N265$ ) (Jurd et al., 2002) und Methionin an Position 236 innerhalb der  $\alpha 1$ -Untereinheit ( $\alpha 1M236$ ) (Cohen et al., 2012).

Daher sollte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit untersuchen, wie sich ausgewählte Punktmutationen der  $\beta 3$ -Untereinheit auf die Potenzierung bzw. Modulation des von Etomidat auf durch GABA-induzierte Chloridströme ( $I_{GABA}$ ; GABA EC<sub>3-7</sub>) auswirken. Zwei der untersuchten Punktmutationen wurden ausgehend von der Literatur ausgewählt ( $\beta 3M286W$  und  $\beta 3N265S$ ).  $\beta 3F289$  befindet sich eine helikale Drehung unter  $\beta M286$ , ebenso scheinen  $\beta 3T262$  (ausgewählte Mutation  $\beta 3T262S$ ) bzw.  $\beta 3T266$  (Threonin mutiert nach Alanin  $\beta 3T266A$ ) interessant. Weiters wurde der Einfluß von  $\beta 1$ -Untereinheiten auf die Modulation von  $I_{GABA}$  durch Etomidat untersucht. Ein untersuchter Rezeptor beinhaltete zwei  $\alpha$ - (alle  $\alpha 1$ ), zwei  $\beta$ - (unterschieden sich durch Punktmutationen bloß durch eine Aminosäure) und einer  $\gamma$ -Untereinheit (alle  $\gamma_{2s}$ ). Diese fünf Punktmutationen und zwei Wildtypen wurden heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und anschließend wurde die Modulation von  $I_{GABA}$  mit Hilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik bestimmt.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Wie erwartet, kam es an  $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptoren zu einer potenten und effizienten Modulation von  $I_{GABA}$  durch Etomidat. Austausch der  $\beta_3$ -Untereinheit durch eine  $\beta_1$ -Untereinheit ( $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ -Rezeptoren) führte zu signifikanter Reduktion der maximalen Potenzierung von  $I_{GABA}$  ( $E_{max}$ ); ebenso konnte eine signifikante Reduktion (nahezu 6-fach) der apparenten Affinität ( $EC_{50}$ ) beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass  $\beta_3$ -Untereinheiten eine essentielle Rolle für die Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch Etomidat spielen. Einführen der Punktmutationen führte in allen untersuchten Rezeptorsubtypen zu einer signifikanten Reduktion der  $E_{max}$ . Der geringste Wirkverlust wurde an  $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2S}$ - bzw.  $\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2S}$ -Rezeptoren beobachtet. Weiters kam es an diesen beiden mutierten Kanälen auch zu keiner signifikanten Änderung der Etomidat  $EC_{50}$ .

Deutlich stärker ausgeprägte Effekte auf die  $I_{GABA}$  Modulation durch Etomidat zeigte Punktmutation  $\beta_3N265S$ : Hier kam es beinahe zu einer Reduktion der  $E_{max}$  um 50%, desweiteren kam es zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve für Etomidat an  $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{2S}$ -Rezeptoren im Vergleich zu Wildtyp  $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptoren. Dies zeigt – wie auch bereits aus der Literatur bekannt –, dass Asparagin an Position 265 innerhalb der  $\beta_3$ -Untereinheit essentiell für eine effektive Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch Etomidat ist. Die stärksten Effekte auf die  $I_{GABA}$  Modulation durch Etomidat wurden durch das Einführen der Mutationen  $\beta_3M286W$  bzw.  $\beta_3F289S$  beobachtet. Etomidat konnte an keinem der beiden mutierten Kanäle  $I_{GABA}$  in Konzentrationen  $>500\mu M$  potenzieren: einer der Gründe für den kompletten Wirkungsverlust für Etomidat an  $\beta_3M286W$  könnte die Sperrigkeit des Tryptophan-Restes sein, der Etomidat den Weg zur Bindungstasche versperrt. Man kann aber auch vermuten, dass durch das hydrophobe Tryptophan der Kanal sich wie in einem bereits Etomidat-gebundenen Zustand befindet und dadurch nicht mehr weiter modulierbar ist (Stewart et al., 2012). Ebenso gibt es für den Verlust für die Etomidat-Sensitivität an  $\beta_3F289S$ -Rezeptoren verschiedene Überlegungen: Bali und Akabas stellten die Hypothese auf, dass sowohl  $\beta_3M286$  wie auch  $\beta_3F289$ , welches genau eine Drehung unter  $\beta_3M286$  liegen soll, in Richtung der Schnittstelle zur  $\alpha$ -Untereinheit ausgerichtet sind (Bali & Akabas, 2009). Hierbei ist denkbar, dass das relativ polare Phenylalanin einen stabilisierenden Effekt auf das darüber an  $\beta_3M286$  bindende Etomidat ausüben könnte. Beim Tausch zu Serin würde folglich diese Stabilisierung verloren gehen und die Potenzierung von  $I_{GABA}$  durch Etomidat deutlich abfallen.

Zusammengefasst kann man also sagen, dass im Rahmen meiner Diplomarbeit die Wichtigkeit von 3 Aminosäureresten innerhalb der  $\beta$ 3-Untereinheit für die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen durch Etomidat gezeigt werden konnte:  $\beta$ 3N265,  $\beta$ 3M286 und  $\beta$ 3F289. Threonin an Position 262 und 266, wobei die Position 262 von größerer Bedeutung ist, scheint ebenso eine Rolle zu spielen, wenn auch der Effekt nicht so hoch ausfiel wie bei den erstgenannten.

Einige Fragen bleiben aber noch offen: So wäre es durchaus von Interesse, weitere Aminosäuren an anderen Positionen (auch in der  $\alpha$ -Untereinheit) zu untersuchen. Es sollten auch die Gründe, weshalb es bei einigen Punktmutationen zu den beobachteten Veränderungen der Etomidat-Modulation, aber ebenso der veränderten GABA-Sensitivitäten gekommen ist, geklärt werden. So sind sterische Veränderungen denkbar, wie auch mögliche Konformationsänderungen des Rezeptors, sowohl bei Bindung von GABA als auch von Etomidat. Diesen Fragen sollten in weiterführenden Untersuchungen nachgegangen werden.

## Literaturverzeichnis

- Akk, G. et al., 2013. Modulation of the human  $\rho 1$  GABAA receptor by inhibitory steroids. *Psychopharmacology*, pp.1–12.
- Akk, G. et al., 2015. Mutational Analysis of the Putative High-Affinity Propofol Binding Site in Human  $\beta 3$  Homomeric GABAA Receptors. *Molecular Pharmacology*. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.115.100347>.
- Baburin, I., Beyl, S. & Hering, S., 2006. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 453, pp.117–123.
- Bali, M. & Akabas, M.H., 2009. GABA-induced intersubunit conformational movement in the GABAA receptor  $\alpha 1\beta 1$ - $\beta 2\beta 3$  transmembrane subunit interface: experimental basis for homology modeling of an intravenous anesthetic binding site. *neuros*, 29(10), pp.3083–3092.
- Ben-Ari, Y. et al., 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological reviews*, 87, pp.1215–1284.
- Benke, D., 2013. GABAB receptor trafficking and interacting proteins: Targets for the development of highly specific therapeutic strategies to treat neurological disorders? *Biochemical Pharmacology*, 86(11), pp.1525–1530. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.016>.
- Boileau, A.J. et al., 2002. The relative amount of cRNA coding for  $\gamma 2$  subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology*, 43, pp.695–700.
- Carver, C.M. & Reddy, D.S., 2013. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology*, 29(6), pp.997–1003.
- Chau, P.L., 2010. New insights into the molecular mechanisms of general anaesthetics. *British Journal of Pharmacology*, 161, pp.288–307.
- Cherubini, E. & Conti, F., 2001. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends in Neurosciences*, 24(3), pp.155–162.
- Cohen, J.B. et al., 2012. Mapping general anesthetic binding site(s) in human  $\alpha 1\beta 3$   $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors with [ $^3\text{H}$ ]TDBzl-etomidate, a photoreactive etomidate analog. *Biochemistry*, 51(4), pp.836–847.
- Cohen, J.B. et al., 2014. Multiple Propofol Binding Sites in a gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor (GABAAR) Identified Using a Photoreactive Propofol Analog. *Journal of Biological Chemistry*, 289(40), pp.27456–27468. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M114.581728>.
- Czajkowski, C. & Newell, J.G., 2003. The GABAA receptor  $\alpha 1$  subunit Pro174-Asp191

- segment is involved in GABA binding and channel gating. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), pp.13166–13172.
- Czajkowski, C. & Sancar, F., 2011. Allosteric modulators induce distinct movements at the GABA-binding site interface of the GABA-A receptor. *Neuropharmacology*, 60, pp.520–528.
- Czajkowski, C. & Wagner, D. a, 2001. Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(1), pp.67–74.
- Ernst, M. et al., 2003. Comparative modeling of GABAA receptors: Limits, insights, future developments. *Neuroscience*, 119, pp.933–943.
- Farrant, M. & Nusser, Z., 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(March), pp.215–229.
- Filip, M. et al., 2015. GABAB receptors as a therapeutic strategy in substance use disorders: Focus on positive allosteric modulators. *Neuropharmacology*, 88, pp.36–47.
- Fon, E. a & Edwards, R.H., 2001. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle & Nerve*, 24(May), pp.581–601.
- Franks, N.P., 2006. Molecular targets underlying general anaesthesia. *British Journal of Pharmacology*, 147, pp.S72–S81.
- Geng, Y. et al., 2013. Structural mechanism of ligand activation in human GABA(B) receptor. *Nature*, 504(7479), pp.254–261. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3865065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Goetz, T. et al., 2007. GABAA receptors: structure and function in the basal ganglia. *Progress in Brain Research*, 160, pp.21–41.
- Griffin, C.E. et al., 2013. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *The Ochsner Journal*, 13(2), pp.214–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3684331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gurdon, J.B. et al., 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233(5316), pp.177–182.
- Hales, T.G. & Lambert, J.J., 1991. The actions of propofol on inhibitory amino acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurones. *British journal of pharmacology*, 104(3), pp.619–628.
- Hering, S., 1998. Small-volume and rapid extracellular solution exchange around *Xenopus* oocytes during voltage- clamp recordings. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 436(2), pp.303–307.
- Hines, R.M. et al., 2012. Functional regulation of GABA A receptors in nervous system

- pathologies. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), pp.552–558. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.007>.
- Höld, K.M. et al., 2000. Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), pp.3826–3831.
- Jackson, M.B. et al., 2009. Distinct structural changes in the GABA A receptor elicited by pentobarbital and GABA. *Biophysical Journal*, 96(2), pp.499–509. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.037>.
- Johnston, G. a R., 2013. Advantages of an antagonist: Bicuculline and other GABA antagonists. *British Journal of Pharmacology*, 169(2), pp.328–336.
- Johnston, G. a R., 2014. Muscimol as an Ionotropic GABA Receptor Agonist. *Neurochemical Research*, pp.1–6.
- Jorgensen, E.M., 2005. GABA. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1, pp.1–13.
- Jurd, R. et al., 2002. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Kash, T.L. et al., 2003. Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature*, 421(6920), pp.272–275.
- Kash, T.L., Trudell, J.R. & Harrison, N.L., 2004. Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochemical Society transactions*, 32(Part 3), pp.540–546.
- Kaupmann, K. et al., 1997. Expression cloning of GABAB receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386(6622), pp.239–246. Available at: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf> <http://www.nature.com/nature/journal/v386/n6622/abs/386239a0.html> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9069281>.
- Khom, S. et al., 2006. Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits. *Molecular Pharmacology*, 69(2), pp.640–649. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/69/2/640.short>.
- Kravitz, E.A., Kuffler, S.W. & Potter, D.D., 1963. *Gamma-Aminobutyric Acid and other blocking compounds in Crustacea - III. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons*,
- Krishek, B.J., Moss, S.J. & Smart, T.G., 1996. Homomeric beta 1 gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties. *Molecular Pharmacology*, 49 (3 ), pp.494–504. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/49/3/494.abstract>.

- Lader, M., 2012. Benzodiazepine harm: How can it be reduced? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(2), pp.295–301.
- Lambert, J.J. et al., 2009. Neurosteroids: Endogenous allosteric modulators of GABAA receptors. *Psychoneuroendocrinology*, 34(SUPPL. 1), pp.48–58.
- Lester, H. a. et al., 2004. Cys-loop receptors: New twists and turns. *Trends in Neurosciences*, 27(6), pp.329–336.
- López-Muñoz, F., Ucha-Udabe, R. & Alamo, C., 2005. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 1(4), pp.329–343.
- Macdonald, R.L. & Olsen, R.W., 1994. GABAA receptor channels. *Annual review of neuroscience*, 17, pp.569–602.
- Mathers, D. a., Wan, X. & Puil, E., 2007. Barbiturate activation and modulation of GABAA receptors in neocortex. *Neuropharmacology*, 52(4), pp.1160–1168.
- Meldrum, B.S. & Rogawski, M. a, 2007. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(1), pp.18–61.
- Miller, P.S. & Aricescu, a R., 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature*, 512, pp.270–275. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909990>.
- Miller, P.S. & Smart, T.G., 2010. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(4), pp.161–174. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.005>.
- Mitchell, E. a. et al., 2008. Neurosteroid modulation of GABAA receptors: Molecular determinants and significance in health and disease. *Neurochemistry International*, 52, pp.588–595.
- Möhler, H. et al., 2004. Specific GABA A circuits in brain development and therapy. *Biochemical Pharmacology*, 68, pp.1685–1690.
- Möhler, H., 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62(1), pp.42–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.040>.
- Möhler, H., 2011. The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology*, 60(7-8), pp.1042–1049. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.020>.
- Olsen, R.W., 2014. Analysis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Type A Receptor Subtypes Using Isosteric and Allosteric Ligands. *Neurochemical Research*, 39, pp.1924–1941.
- Olsen, R.W. et al., 2006. Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(45), pp.11599–11605.

- Olsen, R.W. & Li, G.-D., 2011. GABAA receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Canadian Journal of Anesthesia*, 58, pp.206–215.
- Olsen, R.W. & Sieghart, W., 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology and function. Update. *Pharmacological Reviews*, 60(3), pp.243–260.
- Otsuka, M. et al., 1966. Release of gamma-aminobutyric acid from inhibitory nerves of Lobsters. *Department of Neurobiology, Harvard Medical School*, August, pp.1110–1115.
- Owens, D.F. & Kriegstein, A.R., 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature reviews. Neuroscience*, 3(September), pp.715–727.
- Pelkonen, O., Abass, K. & Wiesner, J., 2013. Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: Toxicological assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(1), pp.100–107. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.002>.
- Ramachandran, P.V. & Shekhar, A., 2011. Welcome to “GABAergic drugs”. *Future medicinal chemistry*, 3(2), pp.139–140.
- Reddy, D.S., 2011. Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Frontiers in endocrinology*, 2(October), p.38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22654805>.
- Reynolds, D.S. et al., 2003. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(24), pp.8608–8617.
- Richardson, J.E. et al., 2007. A conserved tyrosine in the beta2 subunit M4 segment is a determinant of gamma-aminobutyric acid type A receptor sensitivity to propofol. *Anesthesiology*, 107(3), pp.412–418.
- Rudolph, U. et al., 1999. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*, 401(October), pp.796–800.
- Rudolph, U. & Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA(A) receptor subtypes. *Nature Reviews. Drug discovery*, 10(September), pp.685–697. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3502>.
- Rudolph, U. & Möhler, H., 2014. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 54, pp.483–507. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24160694>.
- Sieghart, W., 1995. Structure and Pharmacology of Gamma-Aminobutyric Acid A Receptor Subtypes. *Pharmacological Reviews*, 47(2), pp.181–234.

- Sigel, E. & Minier, F., 2005. The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Molecular nutrition & food research*, 49, pp.228–234.
- Sigel, E. & Steinmann, M.E., 2012. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), pp.40224–40231.
- Simon, J. et al., 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *The Journal of biological chemistry*, 279(40), pp.41422–41435.
- Slany, A. et al., 1995. Rat beta 3 subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells form high affinity [35S]t-butylbicyclophosphorothionate binding sites modulated by several allosteric ligands of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Molecular pharmacology*, 48(3), pp.385–391.
- Smart, T.G. et al., 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444(November), pp.486–489.
- Smart, T.G., Hosie, A.M. & Wilkins, M.E., 2007. Neurosteroid binding sites on GABAA receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 116(1), pp.7–19.
- Smith, G.B. & Olsen, R.W., 1995. Functional domains of GABAA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 16(May), pp.162–168. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624971>.
- Sternbach, L.H., 1979. The Benzodiazepine Story. *Journal of Medicinal Chemistry*, 22(1).
- Stewart, D.S. et al., 2013. Cysteine Substitutions Define Etomidate Binding and Gating Linkages in the alpha-M1 Domain of gamma-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. *The Journal of biological chemistry*, 288(42), pp.30373–30386.
- Stewart, D.S. et al., 2014. Mutations at Beta N265 in  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A Receptors Alter Both Binding Affinity and Efficacy of Potent Anesthetics. *PLoS ONE*, 9(10), p.e111470. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111470>.
- Stewart, D.S., Forman, S.A. & Guitchounts, G., 2012. The Two Etomidate Sites in  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA Receptors Contribute Equally and Non-cooperatively to Modulation of Channel Gating. *Anesthesiology*, 116(6), pp.1235–1244.
- Szczot, M. et al., 2012. Modulation of GABAergic synaptic currents and current responses by  $\alpha$ -Thujone and dihydroumbellulone. *Journal of Natural Products*, 75(4), pp.622–629.
- Thompson, S. a, Whiting, P.J. & Wafford, K. a, 1996. Barbiturate interactions at the human GABAA receptor: dependence on receptor subunit combination. *British journal of pharmacology*, 117(3), pp.521–527.
- Venkatachalan, S.P. & Czajkowski, C., 2008. A conserved salt bridge critical for GABA(A) receptor function and loop C dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), pp.13604–13609.
- Wang, D.S. & Orser, B. a., 2011. Inhibition of learning and memory by general anesthetics.

*Canadian Journal of Anesthesia*, 58(2), pp.167–177.

Yagle, M. a. et al., 2003. [3H]Ethynylbicycloorthobenzoate ([3H]EBOB) Binding in Recombinant GABAA Receptors. *NeuroToxicology*, 24(6), pp.817–824.

Zhou, C., Liu, J. & Chen, X.-D., 2012. General anesthesia mediated by effects on ion channels. *World Journal of Critical Care Medicine*, 1(3), pp.80–93.

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

# Curriculum Vitae

Matthias Zödl

matthias.zoedl@gmx.at

---

## **Persönliche Daten**

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| Geburtsdatum:       | 11. Juni 1987 |
| Geburtsort:         | Vöcklabruck   |
| Staatsbürgerschaft: | Österreich    |
| Familienstand:      | ledig         |

---

## **Ausbildung:**

|              |                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------|
| 1993 – 1997: | Volksschule Ampflwang im Hausruckwald            |
| 1997 – 2005: | Bundesgymnasium Vöcklabruck mit Matura           |
| 2006:        | Zivildienst bei der Lebenshilfe Ried im Innkreis |
| 2006 – 2009: | Studium der Psychologie an der Universität Wien  |
| 2007 – 2015: | Studium der Pharmazie an der Universität Wien    |

---

## **Relevante Berufserfahrung:**

|                                                                |
|----------------------------------------------------------------|
| Apotheke zur hl. Barbara, Ampflwang im Hausruckwald            |
| Anstaltsapotheke der barmherzigen Schwestern, Ried im Innkreis |

---

## **Sprachkenntnisse:**

|                         |
|-------------------------|
| Deutsch (Muttersprache) |
| Englisch                |
| Französisch             |
| Latein                  |