



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Molekulare Determinanten der Modulation von GABA_A-
Rezeptoren durch den Liganden NYV25“

verfasst von

Yazid Albaba

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 499

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering

DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: meiner Mutter, meinem Vater und meinem Bruder, die mich während meines gesamten Studiums in jeder Situation immer unterstützt und motiviert haben. Ich weiß, dass ich heute mein Diplom, ohne diese drei ganz besonderen Menschen, nicht in meinen Händen halten würde.

Natürlich gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering des *Departments für Pharmakologie und Toxikologie* der Universität Wien für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Mag. Denise Luger die mich während meiner Diplomarbeit betreut und sowohl mit zahlreichen Tipps und Anregungen während den praktischen Arbeiten unterstützt, als auch sehr viel Geduld und Zeit in die Korrektur meiner Arbeit investiert hat.

Zu tiefem Dank bin ich auch Frau Dr. Sophia Khom verpflichtet, die mir stets mit hilfreicher und kompetenter Unterstützung mit großem Engagement zur Seite stand.

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

Weiters möchte ich mich noch bei Herrn Prof. Marko Mihovilovic und DI Maximilian Haider, aus dem *Institut für Angewandte Synthesechemie* an der TU-Wien, für die Bereitstellung des Liganden NYV25 bedanken.

Außerdem möchte ich mich sowohl beim *Department für Pharmakologie und Toxikologie* für die ganz besonders angenehme Arbeitsatmosphäre, als auch bei allen Studienkollegen und Freunden bedanken, die mich bei meinen Prüfungen und Praktika immer stets unterstützt und begleitet haben.

ZUSAMMENFASSUNG

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS von Säugetieren. Eine Dysfunktion der GABAergen Neurotransmission kann Ursache für zahlreiche neurologische und psychiatrische Erkrankungen wie beispielsweise Angst- und Schlafstörungen, Epilepsie oder Schizophrenie sein. GABA-Subtyp-A($GABA_A$)-Rezeptoren sind daher wichtige Angriffspunkte für die Therapie derartiger Erkrankungen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte der Einfluss von sechs ausgewählten Mutationen in der α_1 - (α_1M235W) bzw. β_3 -Untereinheit (β_3T262S , β_3N265S , β_3T266A , β_3M286W , β_3F289S) des $GABA_A$ -Rezeptors auf die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch den Liganden NYV25 untersucht werden. Dazu wurden der $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$ -Rezeptor Wildtyp sowie die mutierten Rezeptoren ($\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{2S}$ und $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{2S}$) in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) exprimiert und die Potenzierung von I_{GABA} durch NYV25 mit Hilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und einem schnellen Perfusionssystem gemessen.

Die Ergebnisse zeigten, dass zwei Positionen in der β_3 -Untereinheit (M286, F289) für die Interaktion von NYV25 mit dem $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $GABA_A$ -Rezeptor von besonderer Bedeutung sind: Während die NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Wildtyp-Rezeptoren maximal $356 \pm 81\%$ betrug, konnte an $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{2S}$ Rezeptoren eine drastische Reduktion der modulierenden Wirkung beobachtet werden (β_3M286W : $E_{(500\mu M)} = 56 \pm 15\%$; β_3F289S : $E_{(500\mu M)} = 80 \pm 20\%$). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die vier zusätzlich untersuchten Aminosäuren (α_1M235 , β_3T262 , β_3N265 , β_3T266) für die Potenzierung von I_{GABA} durch NYV25 vermutlich von geringerer Bedeutung sind, da Punktmutationen in diesen Positionen die maximale NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} im Vergleich zu $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ Wildtyp-Rezeptoren nur trendmäßig reduziert (α_1M235W ; β_3N265S) bzw. sogar verstärkten (β_3T266A ; β_3T262S).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ausgewählte Punktmutationen in den Transmembrandomänen der β_3 -Untereinheit des $GABA_A$ -Rezeptors die Modulation von I_{GABA} durch den Liganden NYV25 signifikant beeinflussen. Zusätzliche Studien könnten zeigen, ob weitere Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung von β_3M286 bzw. β_3F289 ebenfalls molekulare Determinanten für die modulierende Wirkung von NYV25 darstellen und gemeinsam mit den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren Teil der Bindungstasche für NYV25 an $GABA_A$ -Rezeptoren darstellen.

ABSTRACT

γ -amino butyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) of mammals. Dysfunctions of GABAergic dysregulation can cause neurological or psychiatric diseases such as anxiety and sleeping disorders, epilepsy or schizophrenia. Therefore GABA-subtype-A ($GABA_A$)-receptors represent important targets for the treatment of such diseases.

Within the scope of this work I studied the influence of 6 different point mutations in α_1 - (α_1M235W) and β_3 -subunits (β_3T262S , β_3N265S , β_3T266A , β_3M286W , and β_3F289S) of the $GABA_A$ -receptor on the modulation of GABA-induced chloride currents (I_{GABA}) by the ligand NYV25. For that purpose wild-type $GABA_A$ -receptor ($\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$) and the mutated receptors ($\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{25}$, $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{25}$, $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{25}$, $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{25}$, $\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{25}$ and $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{25}$) were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and the potentiating effect of I_{GABA} by NYV25 was studied using the two-electrode voltage clamp technique and fast perfusion system.

The results showed that two positions in the β_3 -subunit (M286, F289) are very important for an interaction of NYV25 with the $GABA_A$ -receptor $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$: While NYV25 displayed a maximum potentiating effect of $356 \pm 81\%$ on $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ wild-type receptors, a significant decrease of the modulation on $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{25}$ and on $\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{25}$ (β_3M286W : $E_{(500\mu M)} = 56 \pm 15\%$; β_3F289S : $E_{(500\mu M)} = 80 \pm 20\%$) was observed. On the contrary, the other four investigated amino acids (α_1M235 , β_3T262 , β_3N265 , β_3T266) were shown to be less relevant for an efficient potentiating effect of I_{GABA} by NYV25, as point mutations introduced to these positions did only partially reduce (α_1M235W ; β_3N265S) or even increase (β_3T266A ; β_3T262S) the I_{GABA} -modulation induced by NYV25.

To summarize the results, it was shown that selected point-mutations in transmembrane domains of β_3 -subunits of $GABA_A$ -receptors significantly influence the modulation of I_{GABA} by NYV25. Additional studies could identify further amino acids close to β_3M286 or β_3F289 which could also represent molecular determinants for the modulation by NYV25 and might form part of a binding site for NYV25 on $GABA_A$ -receptors.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Allgemeiner Teil

1.1 γ - AMINOBUTTERSÄURE (GABA) ALS NEUROTRANSMITTER	1
1.1.1 Freisetzung und Wirkmechanismus	2
1.1.2 GABA-aktivierte Rezeptoren.....	2
1.2 DER GABA _A - REZEPTOR	3
1.2.1 Aufbau und Untereinheiten	3
1.2.1.1 Isoformen und ihre Lokalisation im Gehirn	4
1.2.1.2 Pharmakologische Bedeutung der Untereinheiten des GABA _A -Rezeptors	6
1.2.2 Liganden	7
1.2.2.1 Agonisten	8
1.2.2.2 Antagonisten	9
1.2.2.3 Modulatoren	10
1.2.3 Bedeutung bei Erkrankungen	15

2. Praktischer Teil

2.1 ZIELSETZUNG.....	17
2.2 MATERIALIEN UND METHODEN	19
2.2.1 Versuchstiere	19
2.2.2 Operation.....	19
2.2.3 cRNA-Zusammenstellung	19
2.2.4 Injektion	20
2.2.5 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik.....	20
2.2.6 Auswertung.....	21

2.3 ERGEBNISSE	22
2.3.1 GABA Konzentrations-Wirkungs-Kurven	22
2.3.2 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA}	28
2.3.2.1 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$	29
2.3.2.2 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$	31
2.3.2.3 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{2s}$	33
2.3.2.4 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{2s}$	35
2.3.2.5 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{2s}$	37
2.3.2.6 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2s}$	39
2.3.2.7 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$	41
2.4 DISKUSSION	43
2.5 LITERATURVERZEICHNIS	47
2.6 CURRICULUM VITAE	54

Die in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Experimente wurden gemeinsam mit Katharina Keusch (siehe Diplomarbeit: „Einfluss von verschiedenen Punktmutationen in den transmembranären Domänen der α - und β -Untereinheit des $GABA_A$ -Rezeptors auf die Modulation von I_{GABA} durch den Liganden BK06“) durchgeführt.

1. Allgemeiner Teil

1.1 γ - AMINOBUTTERSÄURE (GABA) ALS NEUROTRANSMITTER

γ -Aminobuttersäure ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS (Zentralnervensystem) von Säugetieren und reguliert unter anderem Schlaf- und Wachrhythmus, Muskeltonus und Krampfbereitschaft, Wahrnehmung und Emotionen sowie Konzentrations- und Reaktionsfähigkeit. Außerdem ist er beteiligt an Bewegungsabläufen, der Reproduktion, dem Lernen, der Proliferation und der Differenzierung von Neuronen in der embryonalen Entwicklung. (Trifonov S, et al 2014)

Die Synthese von GABA erfolgt im Rahmen des Glutamat-GABA-Zyklus. Aus Astrozyten wird die Aminosäure Glutamin freigesetzt, welche in GABAergen Neuronen aufgenommen und dort zuerst zu Glutaminsäure umgewandelt wird. (Anne BW, et al 2014) GABA wird anschließend über das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) aus Glutaminsäure im Rahmen einer Decarboxylierungsreaktion synthetisiert (Abbildung 1.1). (Trifonov S, et al 2014)

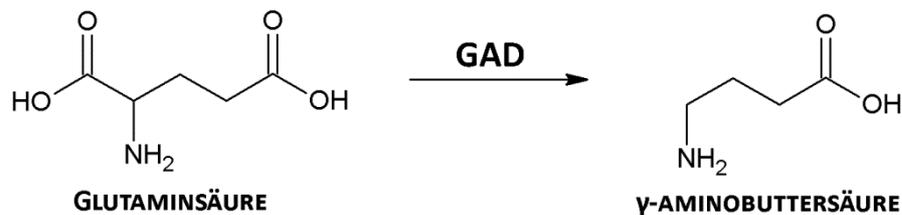


Abb. 1.1: Die Abbildung zeigt die Umwandlung von Glutaminsäure zu γ -Aminobuttersäure durch das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD)

1.1.1 Freisetzung und Wirkmechanismus

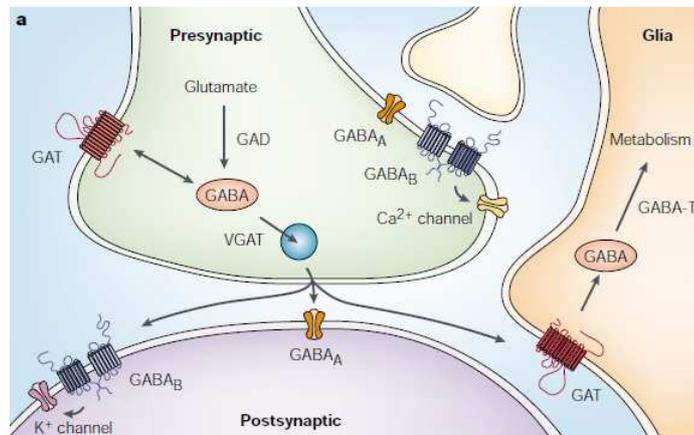


Abb.1.2: Die Abbildung zeigt die Synthese, Freisetzung und Metabolisierung von GABA in einer Nervenzelle. (Owens DF und Kriegstein AR, 2002)

In Abbildung 1.2 wird gezeigt wie GABA aus Glutamat durch GAD synthetisiert wird, über vesikuläre GABA Transporter (VGAT) in Vesikeln gespeichert und anschließend Calcium-abhängig in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. GABA bindet postsynaptisch sowohl an ionotrope Rezeptoren ($GABA_A$) als auch an metabotrope Rezeptoren ($GABA_B$) (siehe Kapitel 1.1.2). Über einen GABA-Transporter (GAT) wird GABA wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt und über die GABA-Transaminase metabolisiert. (Owens DF und Kriegstein AR, 2002)

1.1.2 GABA-aktivierte-Rezeptoren

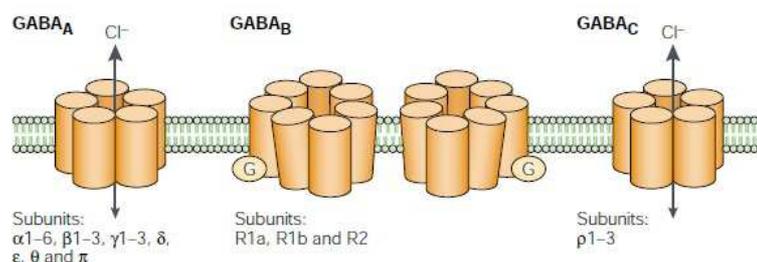


Abb. 1.3: schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von ionotropen ($GABA_A$, $GABA_{Ap}$) und metabotropen ($GABA_B$) GABA-aktivierten Rezeptoren (Owens DF und Kriegstein AR, 2002)

GABA-aktivierte-Rezeptoren unterscheiden sich unter anderem im strukturellen Aufbau, in ihrer Signaltransduktion (ionotrop/metabotrop) und in der Regulation verschiedener Ionenströme. Der **GABA_A-Rezeptor** ist ein pentamerer Ionenkanal und für Chloridionen durchlässig (siehe Kapitel 1.2). Der **GABA_B-Rezeptor** ein heterodimerer $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelter Rezeptor. Jeder GABA_B-Rezeptor besteht aus einer R1 (R1a oder R1b) und einer R2 Untereinheit. (Owens DF und Kriegstein AR, 2002)

GABA_B-Rezeptoren sind über G-Proteine an Ca²⁺-, K⁺-Kanäle und second-messenger Systeme gekoppelt. (Bormann J, 2000) Nach Bindung von GABA an GABA_B-Rezeptoren wird durch Auto- und Heteroinhibition an **präsynaptischen** Endigungen die Ca²⁺-Leitfähigkeit reduziert und somit die Transmitterfreisetzung vermindert. Weiters wird **postsynaptisch** die K⁺-Leitfähigkeit in den Extrazellulärraum verstärkt, wodurch eine Hyperpolarisation der Zellmembran induziert wird. (Bowery NG, et al 2002)

Im Gegensatz dazu ist der GABA_A-Rezeptor ein pentamerer Ionenkanal, der für Chloridionen durchlässig ist (siehe Kapitel 1.2)

1.2 DER GABA_A-REZEPTOR

Allgemein

Der GABA_A-Rezeptor ist anionenselektiv mit einer erhöhten Permeabilität für Chloridionen. Die Bindung von GABA am GABA_A-Rezeptor induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors und nachfolgend eine Öffnung des Ionenkanals, wodurch Chloridionen entlang ihren Konzentrationsgradienten vermehrt durch die Kanalpore ins Zelleinnere einströmen. Daraus resultiert eine Verschiebung des Membranpotentials zu negativieren Werten (Hyperpolarisation der Zellmembran), wodurch die neuronale Erregbarkeit vermindert wird. (Olsen RW und Sieghart W, 2008)

1.2.1 Aufbau und Untereinheiten

GABA_A-Rezeptoren sind Teil der LGIC (Ligand Gated Ion Channel) Cys-Loop-Superfamilie. Dazu gehören ebenfalls nikotinische Acetylcholin Rezeptoren (nAChR), Glycin Rezeptoren (GlyR), ionotrope Serotonin Typ 3 Rezeptoren

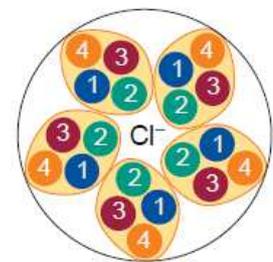
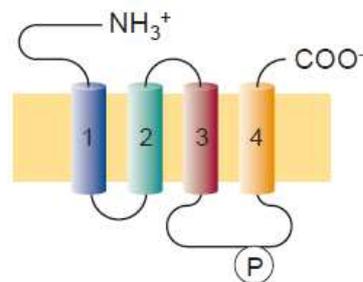


Abb.1.4: schematische Darstellung der transmembranären Domänen (M₁₋₄) des GABA_A-Rezeptors (Bormann J, 2000)

(5-HT₃R) und Zn²⁺-aktivierte Kanäle. Innerhalb dieser Superfamilie findet man eine etwa 30%ige Übereinstimmung in der Primärstruktur der verschiedenen LGIC's. Diese Rezeptoren liegen alle als pentamere und membrandurchspannende Proteine vor, mit einer zentralen Pore, welche den Ionenkanal formt. Jeder der fünf Untereinheiten besteht aus einem langen N-terminalen, extrazellulären und hydrophilem Rest und vier transmembranäre α-Helices (M1-M4) mit einem intrazellulären Loop zwischen ihrer M3- und M4-Domäne. (Olsen RW und Sieghart W, 2008; Sieghart W, 1995; Lüscher B und Keller CA, 2004). In diesem Loop befindet sich ein hydrophiler Bereich mit variablen Mechanismen zur intrazellulären Regulation des Kanals, wie zum Beispiel Phosphorylierungssequenzen (siehe Abbildung 1.4). (Macdonald RL und Olsen RW, 1994) Jede Untereinheit endet mit einer kurzen C-terminalen

extrazellulären Domäne. M2 bildet mit Einwirkungen von M1 die Pore durch die Membran (siehe Abbildung 1.4)

Mittlerweile ist bekannt, dass 19 Gene im humanen Genom existieren die für 19 verschiedene GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3}) kodieren. (Olsen RW und Sieghart W, 2008; Lüscher B und Keller CA, 2004). Es besteht eine 70-80%ige Strukturähnlichkeit zwischen den einzelnen Untereinheiten derselben Untergruppe (zum Beispiel α_1 im Vergleich zu α_3) und eine 30-40% Homologie zwischen den einzelnen Untergruppen (zum Beispiel α_{1-6} im Vergleich zu β_{1-3}). (Macdonald RL und Olsen RW, 1994)

Obwohl diese 19 Untereinheiten theoretisch in einer Vielzahl von Rezeptorisoformen kombiniert sein können, besteht die Mehrheit der GABA_A-Rezeptoren im Säugergehirn aus 2 α , 2 β und einer γ , δ oder ϵ -Untereinheit. Der im Säugergehirn am häufigsten exprimierte GABA_A-Rezeptor Subtyp ist der $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Kanal (Olsen RW und Sieghart W, 2008; Rudolph U und Knoflach F, 2011)

1.2.1.1 Isoformen und ihre Lokalisationen im Gehirn

Kombinationen von α - und β -Untereinheiten (α_{1-6} , β_{1-3}) und von α -, β - und γ - Untereinheiten (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3}) können sehr robuste GABA_A-Kanäle ausbilden. 75-80% aller GABA_A-Kanäle enthalten eine γ_2 -Untereinheit. Unter den α -Untereinheiten ist α_1 diejenige, die am häufigsten exprimiert wird und unter den β -Untereinheiten ist es β_2 . α_2 - und α_3 -Untereinheiten sind ebenfalls in hoher Dichte, im gesamten Gehirn verteilt. α_5 -Untereinheiten kommen eher selten vor, meist im Hippocampus. α_4 und α_6 -Untereinheiten sind im Vorderhirn und Kleinhirn zu finden. Unter den β -Untereinheiten ist β_1 am seltensten zu finden. Im Gegensatz dazu kommen β_3 -Untereinheiten in beinahe allen Bereichen des Gehirns vor. (Olsen RW und Sieghart W, 2008 Lüscher B und Keller CA, 2004)

Die Kombination der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten nimmt auch einen Einfluss auf die Lokalisation des Rezeptors innerhalb eines Neurons. GABA_A-Rezeptoren können sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch vorliegen (siehe Abbildung 1.5 und Tabelle 1.1). So kommen Subtypen mit einer γ_2 -Untereinheit zusammen mit α und β meist als synaptische Rezeptoren vor. Sie vermitteln eine sogenannte „**phasische**“ Inhibition, als Antwort auf eine hohe GABA-Konzentration im synaptischen Spalt. (Herd MB, et al 2007)

Die Sensibilität von synaptischen Rezeptoren für GABA ist geringer im Vergleich zu extrasynaptischen Rezeptoren (siehe Abbildung 1.5). δ -hältige GABA_A-Rezeptoren kommen vorwiegend extrasynaptisch vor (z.B.: $\alpha_4\beta_3\delta$ im Thalamus oder $\alpha_6\beta_3\delta$ im Kleinhirn oder Hippocampus). Sehr hohe Potenz zeigt GABA an Subtypen, die δ - gemeinsam mit α_6 -Untereinheiten enthalten, wohingegen synaptische Rezeptoren wie beispielsweise $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ deutlich geringere Sensibilität für GABA zeigten. (Lüscher B und Keller CA, 2004; Mortensen M, et al 2012). Extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren desensibilisieren langsamer und vermitteln eine sogenannte „**tonische**“ Inhibition, als Antwort auf geringe GABA Konzentrationen,

welche Rezeptoren im extrasynaptischen Bereich normalerweise ausgesetzt sind. (Herd MB, et al 2007; Farrant M und Nusser Z, 2005)

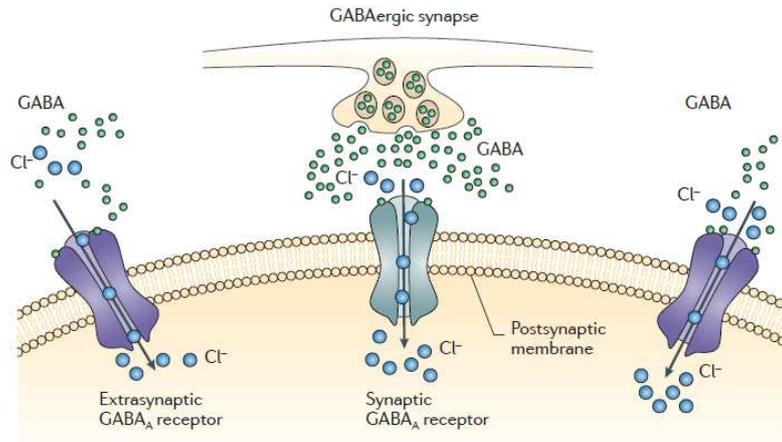


Abb.1.5: schematische Darstellung von synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren und ihrer GABA-vermittelten Wirkung. (Rudolph U und Knoflach F, 2011)

Isoformen	synaptisch / extrasynaptisch	Lokalisation im Gehirn
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$	S/(E)	im gesamten Gehirn, weitverbreitet
$\alpha_2\beta_3\gamma_{2s}$	S/(E)	Im gesamten Gehirn, weitverbreitet
$\alpha_3\beta_3\gamma_{2s}$	S/(E)	Nucleus reticularis, Hypothalamus, Gyrus dentatus, Locus caeruleus
$\alpha_4\beta_3\gamma_{2s}$	S/(E)	thalamische Zellen
$\alpha_5\beta_3\gamma_{2s}$	E/S	Pyramidenzellen im Hippocampus
$\alpha_6\beta_3\gamma_{2s}$	(S)/E	Granularzellen im Kleinhirn
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2s}$	S/(E)	Im Gehirn nur begrenzt verbreitet
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$	S/(E)	weitverbreitet im gesamten Gehirn und am häufigsten vorkommend
$\alpha_4\beta_3$	E	thalamische Zellen
$\alpha_4\beta_3\delta$	E	thalamische Zellen
$\alpha_6\beta_3$	E	Granularzellen im Kleinhirn
$\alpha_6\beta_3\delta$	E	Granularzellen im Kleinhirn
$\alpha_1\beta_2$	E	Im gesamten Gehirn, weitverbreitet
$\alpha_3\beta_3$	E	Thalamus, Hypothalamus, Locus Caeruleus
$\alpha_1\beta_2\delta$	E	Interneuronen des Hippocampus

$\alpha_4\beta_2\delta$	E	Granularzellen im Hippocampus
$\alpha_3\beta_3\theta$	E	Hypothalamus, Locus Caeruleus
$\alpha_3\beta_3\varepsilon$	E	Hypothalamus, Locus Caeruleus

Tabelle 1.1: Auflistung der wichtigsten GABA_A-Rezeptor Subtypen und ihrer Distribution im Gehirn (bearbeitet nach Mortensen M, et al 2012)

1.2.1.2 Pharmakologische Bedeutung der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors

Die genaue Zusammensetzung der Untereinheiten von GABA_A-Rezeptoren ist ein entscheidender Faktor für die pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors. (Hill-Venning C, et al 1997). Unterschiedliche **α -Subtypen** in Kombination mit β und γ weisen beispielsweise unterschiedliche Modulationen von I_{GABA} durch Benzodiazepine oder Steroide auf, sie haben jedoch **keinen Einfluss** auf die Sensitivität von **Barbituraten, Picrotoxin** und **Bicucullin**. (siehe Kapitel 1.2.2.3; Macdonald RL und Olsen RW, 1994).

Durch eine Histidin-Arginin-Mutation innerhalb der Bindungsstelle von Benzodiazepinen am GABA_A-Rezeptor (α_1 (H101R), α_2 (H101R), α_3 (H126R), α_5 (H106R)), konnte gezeigt werden, dass die vielfältigen Wirkungen des GABA_A-Rezeptor-Modulators Diazepam über die verschiedenen α -Untereinheiten vermittelt werden. (siehe Kapitel 1.2.2.3: Benzodiazepine). (Rudolph U und Knoflach F 2011)

1.2.2 Liganden

Im Rahmen meiner Diplomarbeit werden folgende GABA_A-Rezeptor-Liganden besprochen:

- **AGONISTEN:** GABA, Muscimol
- **ANTAGONISTEN:** Picrotoxin, Bicucullin
- **MODULATOREN:** Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroid, Anästhetika (Etomidat, Propofol)
Loreclezol, Mefenaminsäure

Allgemein

Wie in Abbildung 1.6 dargestellt, ist der GABA_A-Rezeptor Angriffspunkt für eine Reihe von Liganden. Während sich die Bindungsstelle von GABA, Muscimol, Bicucullin und von Benzodiazepinen im extrazellulären Teil des Rezeptors befindet, greifen Picrotoxin, Barbiturate und Anästhetika im transmembranären Teil des Rezeptors an. (siehe Kapitel 1.2.2.1; 1.2.2.2; 1.2.2.3) (Olsen RW, 2014; Bormann J, 2000).

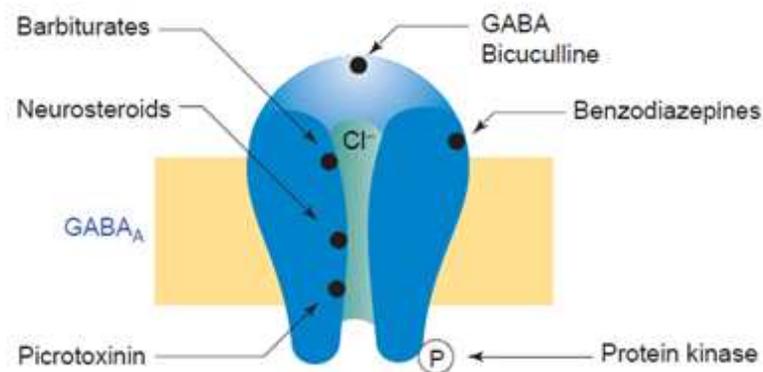


Abb.1.6: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors und verschiedene Angriffspunkte ausgewählter Liganden (bearbeitet nach Bormann J, 2000)

1.2.2.1 AGONISTEN

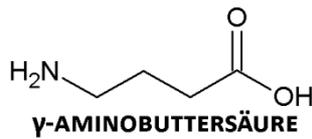
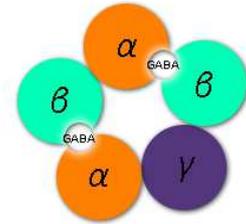


Abb.1.7: Strukturformel der GABA



Wie in Abbildung 1.8 gezeigt sind die meisten GABA_A-Rezeptoren aus 2 α-Untereinheiten, 2 β-Untereinheiten und eine γ-Untereinheit aufgebaut und besitzen zwei homologen Bindungsstellen für GABA

Abb. 1.8: schematische Darstellung der Bindungsstelle von GABA an den Untereinheiten α₁ und β₂.

zwischen der α- und β - Untereinheit des Rezeptors (Rudolph U und Knoflach F, 2011) Die Bindungstasche für GABA wird vor allem durch aromatische und hydrophobe Aminosäuren (**α₁Phe65**, **β₂Tyr97**, **β₂Tyr157**, **β₂Tyr205**) aufgebaut (Abbildung 1.9). Diese Aminosäuren bilden eine sogenannte „aromatische Box“, welche Wasser aus der Bindungsstelle ausschließt und Interaktionen mit dem Liganden ermöglicht, einschließlich der Kation-π Interaktion, die durch Protonierung der Aminogruppe von GABA mit den Aromaten in der aromatischen Box entsteht. (Padgett CL, et al 2007)

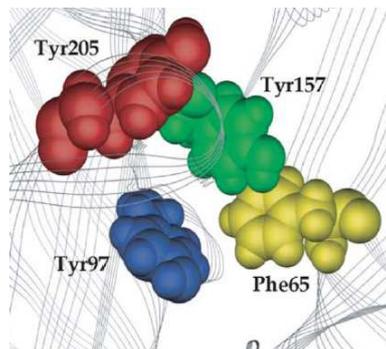


Abb.1.9: Darstellung der „aromatischen Box“ durch die Aminosäuren: β₂Tyr205, β₂Tyr157, β₂Tyr97 und α₁Phe65. (Padgett CL, et al 2007)

Muscimol ist ein halluzinogenes Toxin aus dem Fliegenpilz (*Amanita muscaria*). Die Wirkung von Muscimol entsteht durch die selektive Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren. Muscimol bindet an derselben Bindungsstelle wie GABA, wirkt im Unterschied zu GABA jedoch als Superagonist. (Mortensen M, et al 2010). Durch die photomarkierte Substanz [³H]Muscimol, konnte gezeigt werden, dass die Bindung an GABA_A-Rezeptoren, Teile der α₁-Untereinheit sowie der β₃-Untereinheit benötigt. (Korpi ER, et al 2002; Macdonald RL und Olsen RW 1994)

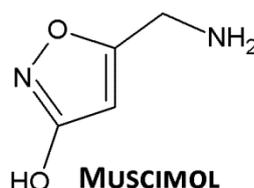


Abb.1.10: Strukturformel von Muscimol

1.2.2.2 ANTAGONISTEN

Picrotoxin ist ein Pflanzengift und ein nicht-kompetitiver Antagonist am GABA_A-Rezeptor. Picrotoxin blockiert sowohl GABA_A-Rezeptoren, welche spontan öffnen, als auch jene die allosterisch aktiviert wurden und wirkt unabhängig von der Komposition der Untereinheiten des Rezeptors. Es ist noch nicht eindeutig ob seine Bindung durch eine allosterische Konformationsänderung die Hemmung des Rezeptors bewirkt oder die Pore physikalisch blockiert. (Macdonald RL und Olsen RW, 1994). Die Bindungstasche befindet sich jedenfalls in der transmembranären Kanalpore (siehe Abb. 1.6) des GABA_A-Rezeptors. (Olsen RW, 2014)

Bicucullin ist im Gegensatz zu Picrotoxin ein kompetitiver Antagonist an der GABA-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors, wirkt wie Picrotoxin ebenfalls erregend und konvulsiv und besitzt zu dem neurodegenerative Fähigkeiten. (Facciolo RM, et al 2009; Gaston MS, et al 2015) Es konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen an der β_2 -Untereinheit (β_2Y157S und β_2Y205S) mit einer Abnahme der Affinität von Bicucullin für den GABA_A-Rezeptor einhergeht. Eine Punktmutation an der α_1 -Untereinheit (F64) zeigte ebenfalls eine Abnahme der Affinität, was darauf hindeutet, dass alle 3 genannten Aminosäuren für die Wirkung von Bicucullin von Bedeutung sind. (Ueno S, et al 1997)

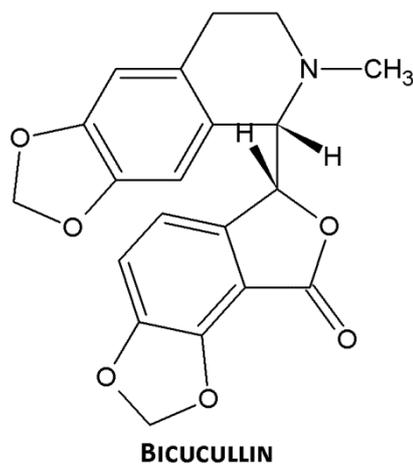


Abb.1.11: Strukturformel von Bicucullin

1.2.2.3 MODULATOREN

Benzodiazepine (BZP) besitzen sedative, hypnotische, anxiolytische, muskelrelaxierende und antikonvulsive Wirkungen. Sie werden unter anderem gegen Angst und Schlafstörungen eingesetzt und haben dabei die Barbiturate ersetzt. (Rudolph U und Knoflach F, 2011) Die Modulation durch Benzodiazepine bewirkt eine Konformationsänderung

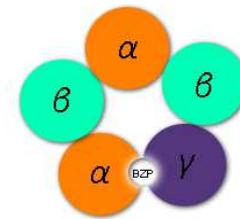


Abb. 1.12: schematische Darstellung der Bindungsstelle von Benzodiazepinen (BZP) an den Untereinheiten α_1 und γ_2 .

des Rezeptors und dadurch eine Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Chloridkanals durch GABA, wodurch sowohl dessen Effekte (Sedierung, Hypnose, Anxiolyse, erniedrigte Krampfschwelle, Muskelrelaxation) wie auch eine Reihe von ungewollten Wirkungen (Suchtgefahr, Toleranzentwicklung, Atemdepression, usw.) vermittelt werden. (Rudolph U und Knoflach F, et al 2011) Die Bindungsstelle von Benzodiazepinen befindet sich zwischen einer $\alpha(\alpha_{1/2/3/5})$ - und der γ_2 -Untereinheit des Rezeptors (siehe Abbildung 1.12). Im Gegensatz dazu sind Rezeptoren, die α_4 - bzw. α_6 -Untereinheit enthalten, insensitiv gegenüber Benzodiazepinen. Grund dafür ist ein Histidinrest in Position α_1101 (bzw. in den homologen Positionen α_2101 , α_3126 , α_5105), der in α_4 und α_6 durch ein Arginin ersetzt ist, wodurch die Modulation durch Benzodiazepine verhindert wird. (Rudolph U und Knoflach F, et al 2011) Um den Zusammenhang zwischen den einzelnen Untereinheiten und den Diazepam-vermittelten Wirkungen zu untersuchen, wurden an den Benzodiazepin-sensitiven α -Untereinheiten (α_1 , α_2 , α_3 , α_5) des GABA_A -Rezeptors Punktmutationen (Histidin nach Arginin) eingeführt, die den Rezeptor für Diazepam insensitiv machen. (Rudolph U, et al 1999) Diese Untersuchungen zeigten, dass die verschiedenen α -Untereinheiten für bestimmte Wirkungen von Diazepam verantwortlich waren. Bei **$\alpha_1(\text{H101R})$** -knock-in Mäusen (Histidin gegen Arginin an Position 101) verschwand die sedative, anterograd amnestische und teilweise die antikonvulsive Wirkung von Diazepam, die anxiolytische Wirkung blieb jedoch erhalten. In **$\alpha_2(\text{H101R})$** -knock-in Mäusen verschwand die anxiolytische und muskelrelaxierende Wirkung, wobei die sedative Wirkung erhalten blieb. In **$\alpha_3(\text{H126R})$** - und **$\alpha_5(\text{H105R})$** -knock-in Mäusen, war die muskelrelaxierende Wirkung von Diazepam abgeschwächt, wohingegen die sedative und anxiolytische Wirkung erhalten blieb. (Rudolph U und Knoflach F, 2011; Lüscher BP, et al 2012) Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die anxiolytische Wirkung von Diazepam vor allem durch α_2 gesteuert und die sedative Wirkung über α_1 vermittelt wird. Die Beteiligung von α_3 -Untereinheiten an der anxiolytischen Wirkung ist im Gegensatz dazu noch uneindeutig und wird kontrovers diskutiert. (Rudolph U und Knoflach F, 2011) Pharmakologische Untersuchungen mit einem selektiven inversen Agonisten für α_3 -hältige Rezeptoren zeigten angstauslösende Wirkungen. Außerdem zeigten Liganden (wie zum Beispiel: **6-(4-pyridyl)-5-(4-methoxyphenyl)-3-carbomethoxy-1-methyl-1H-pyridin-2-on** (Atack JR, et al 2005)) mit einer höheren Potenz für α_3 -hältige Rezeptoren einen stärkeren anxiolytischen Effekt als Substanzen die eine höhere Potenz zu α_2 -hältige Rezeptoren besitzen (wie zum

Beispiel **Norfloxacin** (Johnstone TB, et al 2004)). Da jedoch keine Abnahme der anxiolytischen Wirkung von Diazepam an α_3 (H126R)-knock-in Mäusen beobachtet werden konnte, ist noch nicht vollständig geklärt, ob die anxiolytische Wirkung auch über α_3 -Untereinheiten vermittelt wird. (Dias R, et al 2005) Weiters konnte gezeigt werden, dass die Toleranzentwicklung zur sedativen Wirkung von Benzodiazepinen über α_5 und die Suchtgefahr über α_1 vermittelt wird. (Vashchinkina E, et al 2014).

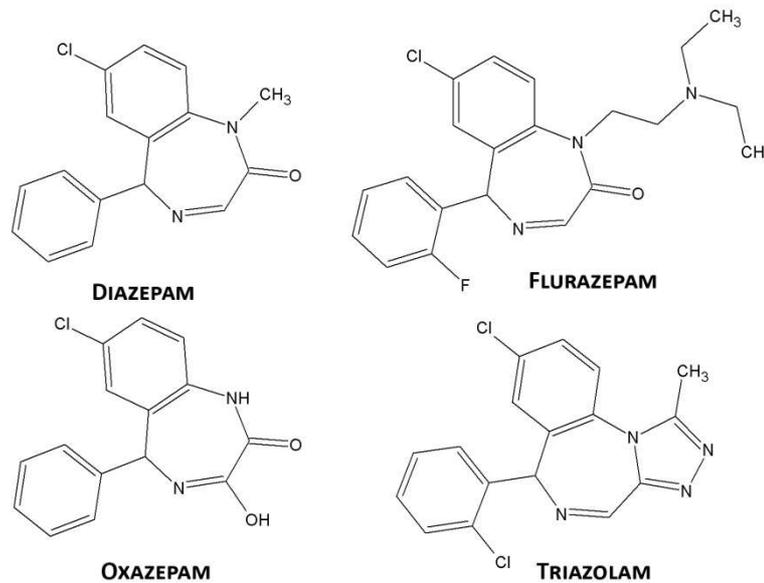


Abb. 1.13: Strukturformeln von verschiedenen Benzodiazepinen (Diazepam, Flurazepam, Oxazepam und Triazolam)

Während Benzodiazepine nur in Anwesenheit von GABA wirken, können **Barbiturate** in hohen Konzentrationen den Rezeptor auch direkt aktivieren. Aufgrund des hohen Überdosierungs- und Suchtpotentials wurden Barbiturate jedoch schnell und erfolgreich durch die therapeutisch relativ sicheren Benzodiazepine abgelöst. (Lopez-Munoz F, et al 2005; Ito T, et al 1996; Löscher W und Rogawski MA, 2012)

Phenobarbital wird daher nur noch gelegentlich als Einschlafhilfe und als Antikonvulsivum bei einem Status epilepticus eingesetzt (Raj D, et al 2011; Oakley S, et al 2012), während Thiopental als Injektionsanästhetikum und

Pentobarbital als Anästhetikum in der Veterinärmedizin Verwendung finden (Oakley S, et al 2012). Die Bindungsstelle dieser Substanzgruppe befindet sich an den zweiten und dritten transmembranären Domänen der β -Untereinheiten und an Teilen der α -Untereinheit. (Löscher W und Rogawski MA, 2012)

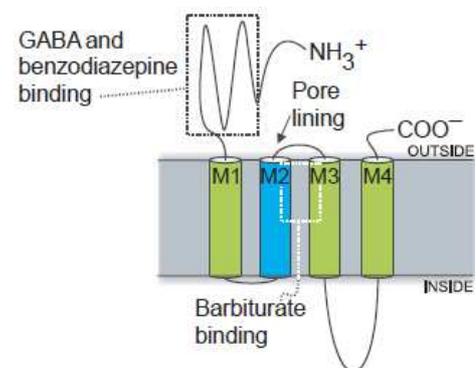
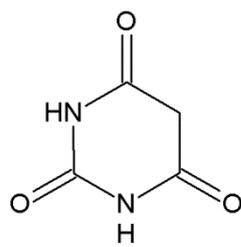
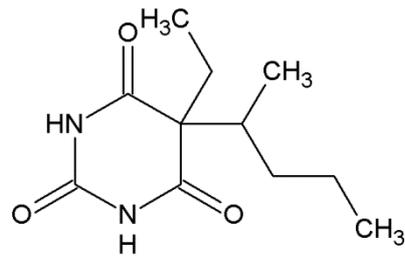


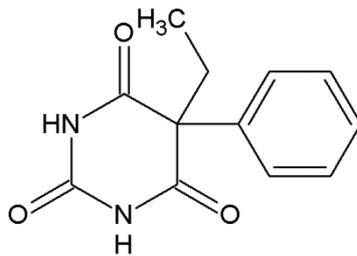
Abb.1.14: schematische Darstellung der extrazellulären Bindungsstelle von GABA und Benzodiazepinen und der transmembranären Bindungsstelle von Barbituraten. (siehe auch Abbildung 1.21.1) (Löscher W und Rogawski MA 2012)



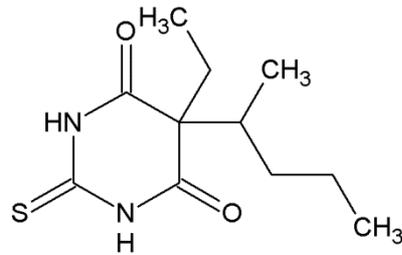
BARBITURSÄURE



PENTOBARBITAL



PHENOBARBITAL



THIOPENTAL

Abb. 1.15: Strukturformeln von Barbitursäure und deren Derivate: Pentobarbital, Phenobarbital und Thiopental

Endogene Neurosteroide und ihre synthetischen Analoga sind Modulatoren des GABA_A-Rezeptors, daher haben sie sowohl physiologische als auch klinische Relevanz bei der inhibitorischen Regulation im ZNS. Da GABA_A-Rezeptoren ubiquitär im ZNS des Menschen verteilt sind, können endogene Neurosteroid, die im Gehirn und Rückenmark synthetisiert werden, die Erregbarkeit des ZNS stark beeinflussen. (Herd MB, et al 2007)

In niedrigen Konzentrationen modulieren sie den Rezeptor allosterisch und **erhöhen** so die **Sensibilität** des Rezeptors für GABA. In höheren Konzentrationen können sie GABA_A-Rezeptoren auch **direkt** in Abwesenheit von GABA **aktivieren**. Dabei dominiert, sowohl bei Ausschüttung von Neurosteroiden durch den menschlichen Körper als auch durch Einnahme von Neurosteroid in Form von Arzneimitteln, der allosterische Mechanismus. (Chisari, et al 2010) Neurosteroid weisen keine Selektivität für bestimmte Rezeptorsubtypen auf, sie besitzen jedoch eine erhöhte Sensibilität für α_5 und δ -haltige (extrasynaptische) Isoformen. Für Neurosteroid existieren mehrere Bindungsstellen am GABA_A-Rezeptor: Die Bindung an α T236 und β Y284 beeinflusst die direkte Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren durch hohe Neurosteroid-Konzentrationen, wohingegen α Q241, α N407, α Y410 für die Modulation von GABA_A-Rezeptoren bei niedrigen Konzentrationen eine Rolle spielen. (Chisari M, et al 2010; Hosie AM, et al 2007)

Ähnlich wie Neurosteroid und Barbiturate, können auch Anästhetika wie **Propofol** oder **Etomidat** den GABA_A-Rezeptor sowohl modulieren als auch direkt aktivieren, abhängig von ihrer Konzentration. In

niedriger Konzentration potenzieren sie GABA-induzierte Chloridströme (I_{GABA}), während sie in höheren Konzentrationen den Kanal auch in Abwesenheit von GABA öffnen. In noch höheren Konzentrationen können Etomidat oder Propofol sogar inhibitorisch auf den GABA_A -Rezeptor wirken. (Groves JO, et al 2006; Hill-Venning C, et al 1997)

Die sedativen Effekte von **Etomidat** werden über β_2 -Untereinheiten vermittelt, (Groves JO, et al 2006), während β_3 -hältige Isoformen die anästhetischen Eigenschaften von Etomidat vermitteln. Im Gegensatz dazu werden β_1 -hältige GABA_A -Rezeptoren durch Etomidat nur schwach moduliert. Die Substanz besitzt somit eine β_2/β_3 Selektivität. Grund für diese β -selektive Wirkung ist ein Asparaginrest in Position $\beta_{2/3}\text{N265}$ des GABA_A -Rezeptors, der in der β_1 -Untereinheit durch ein Serin ersetzt ist. (Steward et al, 2014)

Es konnte weiters gezeigt werden, dass ein Methionin in Position 286 der **β_2 -Untereinheit** ($\beta_2\text{M286}$) für die Wirkung von Etomidat von besonderer Bedeutung ist. Auch in der α_1 -Untereinheit ($\alpha_1\text{M235}$) konnte ein Methioninrest als molekulare Determinante für die allosterische Modulation durch Etomidat identifiziert werden. Untersuchungen von Forman und Steward (2012) legen nahe, dass die Bindung des hydrophoben Moleküls Etomidat (siehe Abbildung 1.15) an den Rezeptor vorgetäuscht werden kann, indem diese beiden Methioninreste ($\alpha_1\text{M235}$ und $\beta_2\text{M286}$) durch die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Tryptophan ersetzt werden. Die so simulierte Bindung von Etomidat an den Rezeptor resultierte in einer erhöhten Sensitivität der mutierten Rezeptoren für GABA sowie in einer deutlich reduzierten Modulation dieser Rezeptoren durch exogene Applikation von Etomidat. (Forman SA und Stewart D, 2012)

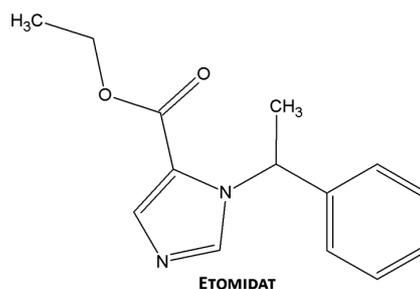
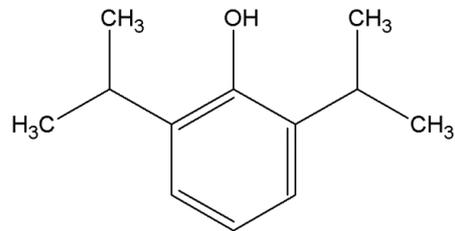


Abb. 1.15: Strukturformel von Etomidat

Es wird vermutet, dass sich der größte Teil der Bindungsstelle von **Propofol** am extrazellulären Ende der β -Untereinheit, an der M3-Domäne, befindet. Untersuchungen ergaben im Gegensatz zu Etomidat keine Hinweise auf eine β -selektive Wirkung von Propofol, da GABA_A -Rezeptoren mit $\beta_{1/2/3}$ -Untereinheiten ähnlich stark moduliert werden. Durch verschiedene biochemische und experimentelle Untersuchungen (Mutationsstudien und Photolabeling) wurden einige Aminosäuren identifiziert, die an der Bindung von

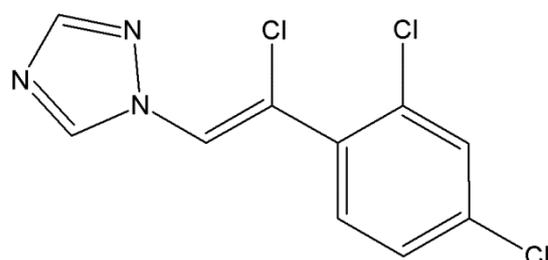
Propofol beteiligt sind, wie zum Beispiel: β_2 M286 und β_2 T254 in der M3-Domäne, β_2 A307 in der M4-Domäne und β_2 M205 in der M1-Domäne. (Hill-Venning C, et al 1997; Bali M und Akabas MH, 2004; Chiara DC, et al 2014)



PROPOFOL

Abb. 1.16: Strukturformel von Propofol

Die Wirkung des Antikonvulsivums **Loreclezol** ist ebenfalls stark von der β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors abhängig. Loreclezol zeigt eine deutliche Potenzierung von β_2 und β_3 -hältigen Isoformen, während es β_1 -hältige GABA_A-Rezeptoren kaum moduliert. Durch Mutation einzelner Aminosäuren der β_1 -Untereinheit zu den jeweiligen homologen Aminosäuren in β_2 und β_3 konnte man zeigen, dass die Wirkung des Liganden an mutierten Rezeptoren (β_2 N264S und β_3 N265S) fast vollständig aufgehoben wird. Im Gegenzug dazu konnte durch die Einführung der homologen Mutation in β_1 (β_1 S265N) die Modulation durch Loreclezol wiederhergestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass das Asparagin an β_3 N265 (homolog zu β_2 N264) in der Domäne M2 eine wichtige Rolle für die Wirkung von Loreclezol an GABA_A-Rezeptoren spielt. (Groves JO, et al 2006; Wingrove PB, et al 1994)



LORECLEZOL

Abb. 1.17: Strukturformel von Loreclezol

Mefenaminsäure besitzt sowohl antikonvulsive als auch pro-convulsive Effekte *in vivo* und es zeigt sowohl eine Potenzierung, direkte Aktivierung und Inhibierung von GABA_A-Rezeptoren *in vitro*, abhängig von der Konzentration und der Untereinheiten-Kombination des GABA_A-Rezeptors: Während Mefenaminsäure β_2/β_3 -Isoformen direkt aktiviert und moduliert, zeigt es eine Inhibition von β_1 -Isoformen. Der Grund für diese β_2/β_3 -selektive Wirkung ist - wie auch bei Etomidat und Loreclezol - das

Vorhandensein eines einzelnen Asparaginrestes in β_2/β_3 (N265), der in β_1 durch ein Serin ersetzt ist. Mutationsstudien zeigten, dass ein Austausch des Asparagins in Pos 265 gegen ein Serin (homologe Aminosäure in der β_1 -Untereinheit) zu einer signifikanten Reduktion der Verstärkung von I_{GABA} durch Mefenaminsäure führte, während die Rückmutation in β_1 (β_1 S266N) die Mefenaminsäure-Wirkung wiederherstellt. (Halliwell RF, et al 1999)

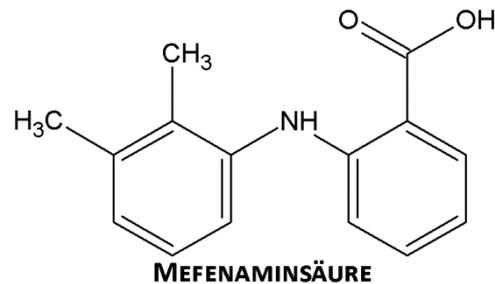


Abb. 1.18: Strukturformel von Mefenaminsäure

1.2.3 Bedeutung bei Erkrankungen

Angst und **Furcht** sind zwei wichtige und grundlegende Emotionen, die einen Menschen ein ganzes Leben lang begleiten. Die Angst wird in der Neurowissenschaft als eine Emotion definiert, die durch eine ungewisse und potenziell gefährliche Situation hervorgerufen wird. Furcht entsteht jedoch aus einer eindeutig bekannten Gefahr. Auch wenn diese zwei Emotionen ziemlich ähnlich sind, lösen sie verschiedene Verhaltensweisen aus. Angst soll uns vor Gefahren warnen und schützen, jedoch kommt es bei manchen Menschen oft zu unkontrollierbaren, persistierenden und exzessiven Reaktionen die einen Einfluss auf die Lebensqualität haben können. (Sartori SB, et al 2011) Für die Entstehung von Angststörungen spielen intrinsische und extrinsische Faktoren eine wichtige Rolle. 30-40% aller Angststörungen sind erblich bedingt. Ein sehr großer Anteil wird durch verschiedene Umweltfaktoren ausgelöst, wobei die Anfälligkeit für Umweltfaktoren ebenfalls genetisch bedingt sein kann. (Hettema JM, et al 2001)

Untersuchungen ergaben, dass Stressoren an Mäusen im Alter von 26-28 Tagen, zu einer Veränderung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit Expression (vor allem von α_2 , α_3 , α_5 und γ_2 -Untereinheiten) führen können. Dies steigerte das Angstverhalten der Mäuse auch im Erwachsenenalter (Jacobson-Pick S, et al 2012). Bei HAB (**h**igh **a**nxiety-related **b**ehavior)-Mäusen war die Expression von α_4 -, β_1 -, β_2 - und γ_2 -Untereinheiten stark erhöht, wohingegen die Expression von α_5 - und γ_1 -Untereinheiten geringer war als in NAB (**n**ormal **a**nxiety-related **b**ehavior)-Mäusen. Da bei HAB-Mäusen ebenfalls eine verstärkte Expression GABA-synthetisierender Enzyme (GABA-Decarboxylase; GAD) zu finden war, liegt die Vermutung nahe, dass die verringerte Expression einzelner Untereinheiten, eine kompensatorisch verstärkte GABA-Synthese induziert. (Tasan RO, et al 2011)

Schlafstörung (Insomnia) ist ein bekannter Krankheitszustand, der durch die Schwierigkeiten den Schlaf zu initiieren und aufrechtzuerhalten charakterisiert ist. Heutzutage leiden 10-20% aller Menschen unter Insomnia, bei 50% der Betroffenen ist sich die Krankheit chronisch. GABA spielt als inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS eine wichtige Rolle in unserem Schlafzyklus (Shi Y, et al 2014). Die aktuell verwendeten Therapien gegen chronische Insomnia beinhalten häufig Gaben von Benzodiazepinen und sogenannten Z-Drugs (wie z.B.: Zolpidem, Zaleplon, Zopiclone). (Shi Y, et al 2014) Sie sind jedoch aufgrund der Toleranzentwicklung und der Suchtgefahr für eine langfristige Therapie ungeeignet. (Rudolph U und Knoflach F, 2011; Lugoboni F, et al 2014)

Epilepsie ist die am häufigsten verbreitete neurologische Störung. Sie betrifft über 50 Millionen Menschen weltweit. Die periodisch auftretenden Anfälle dieser Erkrankung werden mit einem gestörten Gleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Einflüssen im Gehirn assoziiert. (Groves JO, et al 2006). Im Gehirn von Epileptikern konnte eine reduzierte Inhibition durch GABA, eine generell verringerte Konzentration von GABA (Pavlov I und Walker MC, 2012), sowie eine verringerte Aktivität der Glutamatdecarboxylase (GAD) im Hirngewebe und der Rückenmarksflüssigkeit nachgewiesen werden (Treiman DM, 2001). So wird vermutet, dass eine Störung der GABAergen Transmission einen starken Einfluss auf die Entstehung von Epilepsie haben kann. (Pavlov I und Walker MC, 2012)

Auch **Schizophrenie** kann durch eine Dysbalance des Gleichgewichts zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission ausgelöst werden. Diese Erkrankung kann sich sowohl durch negative (zB. Depressionen) und positive (zB. Halluzinationen) Symptome als auch durch kognitive Störungen ausdrücken. GABAerge Neuronen spielen eine zentrale Rolle in der Ätiologie und Progression von Schizophrenie, jedoch sind Mechanismen ihrer Entstehung und die Beteiligung der Hirnareale, noch nicht ganz geklärt. (Reichel JM, et al 2015) Vermutlich ist der Hauptgrund für die Entstehung von Schizophrenie eine Überaktivität des dopaminergen Systems, welches durch GABA-Inhibition reguliert wird. (Rudolph U und Möhler H, 2006)

2. Praktischer Teil

2.1 ZIELSETZUNG

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte der Einfluss verschiedener Punktmutationen in der α_1 - und β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors auf die Modulation des GABA-induzierten Chloridstroms durch den Liganden NYV25 untersucht werden.

Um molekulare Determinanten für die Interaktion von NYV25 mit GABA_A-Rezeptoren zu identifizieren, wurden insgesamt 6 Punktmutationen am Wildtyp-Rezeptor $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ eingeführt. Wildtyp und mutierte GABA_A-Rezeptoren wurden in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches exprimiert. Anschließend wurde die NYV25-induzierte Modulation durch punktmutierte Rezeptoren mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gemessen und mit der Wirkung am Wildtyp verglichen. Folgende Punktmutationen wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht:

α_1 M235W

β_3 T266A

β_3 M286W

β_3 T262S

β_3 N265S

β_3 F289S

2.2 MATERIAL UND METHODEN

Die in Kapitel 2.1 beschriebenen Methoden wurden aus in der Vergangenheit am Department für Pharmakologie und Toxikologie unter der Betreuung von Univ. Prof. Dr. Steffen Hering durchgeführten Diplomarbeiten übernommen (siehe Diplomarbeit von Bernd Weber „Untersuchung der Wirkung neuer, ausgewählter Liganden von GABA_A Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten“ im Sommersemester 2012)

2.2.1 Versuchstiere

Dabei handelte es sich um weibliche afrikanische Krallenfrösche (*Xenopus laevis*), deren Oozyten zur Expression des GABA_A-Rezeptors herangezogen wurden. Die Frösche wurden 15 min lang in einer 0,2% Lösung von Tricain (Methanyulfonsauresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters; MS-222) anästhesiert und anschließend für die Entnahme der Oozyten vorbereitet.

2.2.2 Operation

Nach der Anästhesie wurde der Frosch auf den Rücken gelegt und Haut und Muskelschicht im Bauchbereich durchtrennt. Es wurde vorsichtig Teile der Ovarien aus dem Bauchraum mit einer Pinzette entnommen, welche anschließend in eine Petrischale mit OR2-Lösung (82,5mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl₂ * 6 H₂O und 5 mM HEPES; pH = 7,4 (mit 1M NaOH eingestellt)) übergeführt wurden.

Zuerst wurde das Follikelgewebe mechanisch vorsichtig zerkleinert (möglichst ohne die darin befindlichen Oozyten zu verletzen) und danach für etwa 90 Minuten bei 18°C in einer Kollagenaselösung (2mg Kollagenase Sigma Typ IA/ml OR2) inkubiert um Bindegewebe und Follikelzellen zu entfernen. So konnte rasch eine große Anzahl einzelner Oozyten präpariert werden. Nach der Kollagenase-Behandlung wurden die Oozyten gründlich mit OR2-Lösung gewaschen. Danach wurden die Oozyten im Reifestadium V-VI unter einer Stereolupe selektiert und anschließend in eine antibiotische ND96-Lösung (90mM NaCl, 1mM KCl, 1mM MgCl₂ * 6 H₂O, 1mM CaCl₂, 5mM HEPES; pH = 7,4 (mit 1M NaOH eingestellt)) übergeführt.

2.2.3 cRNA-Zusammenstellung

Poly(A+)cRNA-Transkripte von linearisierter cDNA wurden in einem pCMV-Vektor kloniert. Die cRNAs, die für die einzelnen Untereinheiten kodieren, wurden in DEPC (Diethylpyrocarbonat)-hältigen Wasser gelöst. Kurz vor der Injektion mussten die für die jeweiligen Untereinheiten codierende cRNAs zusammengestellt werden: α_1 , β_3 und γ_{25} -cRNA wurden in einem Verhältnis von 1:1:10 gemischt um eine ausreichende γ_2 -Inkorporation sicher zu stellen.

2.2.4 Injektion

Die Oozyten wurden zur Injektion zuerst auf einem Gitter positioniert, anschließend wurde eine feine Borosilikat-Glaskapillare zur cRNA-Aufnahme an der Spitze angebrochen, die cRNA-Mischung mit einer pneumatischen Injektionsvorrichtung aufgesogen in die Oozyten injiziert. Eine erfolgreiche Injektion war durch eine deutlich sichtbare Größenzunahme zu erkennen. Nach der Injektion wurden die Oozyten für 24 Stunden bei 18°C in einer ND96-Lösung mit Antibiotikum (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) inkubiert und waren anschließend für die Messung bereit.

2.2.5 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Die zu untersuchende Substanz NYV25 wurde in 100% DMSO gelöst und in einer Konzentration von 100mM für die Herstellung der Testlösungen verwendet. Für die Verdünnung der 100mM Stammlösung wurde ND96 verwendet. Die Konzentration der GABA-Stammlösung betrug 1mM (5,15mg GABA in 50ml ND96). Alle Lösungen wurden täglich frisch vorbereitet.

Die Modulation der GABA-induzierten Chloridströme durch NYV25 wurde mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik bestimmt. Dabei wurden 2 Elektroden (Potential-Elektrode; Strom-Elektrode) durch die Oozytenmembran gestochen. Eine dritte Elektrode befand sich direkt unterhalb des Oozyten, die Referenz-Elektrode (**grounding-electrode**). Die Potential-Elektrode (**voltage-electrode**) maß das Membranpotential des Oozyten und war mit einem Rückkopplungsverstärker verbunden, der die Abweichung des tatsächlichen Potentials zum benötigten Potential (sogenanntes „Haltepotential“ oder „command-potential“; -70mV) maß. Die zweite Elektrode (Strom-Elektrode; **current-electrode**), speiste Strom ein, und sorgte dafür, dass das Membranpotential aufrechterhalten wurde. Bei einem Ionenstrom (zum Beispiel ausgelöst durch das Öffnen des GABA_A-Rezeptors durch GABA) änderte sich die Spannung und somit das Potential, und die Strom-Elektrode speiste Strom über die Membran zur Referenzelektrode ein, um das Potential wieder auf das gewünschte Haltepotential zu bringen. Der Strom, der injiziert wurde, floss mit umgekehrtem Vorzeichen zum Aktionsstrom.

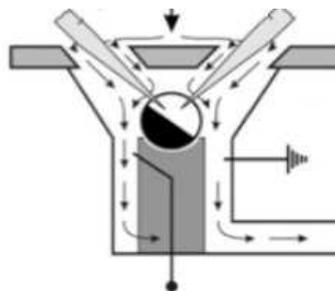


Abb.2.2: Darstellung des Flüssigkeitsflusses in der Perfusionkammer. (bearbeitet nach Barburin, et al 2006)

2.2.6 Auswertung

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde der Einfluss verschiedener Punktmutationen auf die Modulation einer GABA EC₃₋₇ Konzentration durch die Substanz NYV25, ein Modulator des GABA_A-Rezeptors, getestet.

Für die Bestimmung der EC₃₋₇ (jene GABA-Konzentration, die 3-7% des Maximaleffekts hervorruft) wurde zuerst der maximale Effekt (I_{max} (μA); durch 1mM GABA ausgelöst) am jeweiligen Oozyten gemessen). Anschließend wurden verschiedene submaximale GABA-Konzentrationen appliziert und jene Konzentration bestimmt, deren Amplitude 3-7% des Maximalwerts entsprach:

$$E(\%) = I_{GABA} * \frac{100}{I_{max}}$$

E	Effekt (%)
I _{GABA}	GABA-induzierter Chloridstrom durch submaximale GABA-Konzentration (μA)
I _{max}	Maximale Amplitude ausgelöst durch 1mM GABA (μA)

Die Potenzierung von I_{GABA} durch NYV25 konnte mit folgender Formel errechnet werden:

$$I_{GABA} \text{ Potenzierung}(\%) = \frac{I_{moduliert} * 100}{I_{kontrolle}} - 100$$

I _{moduliert}	Modulierter Chloridstrom durch NYV25 (μA)
I _{kontrolle}	GABA-EC3-7 Kontrollstrom (μA)

Es wurde die I_{GABA} Potenzierung durch verschiedene Konzentrationen von NYV25 (0,1 μM; 1 μM; 3 μM; 10 μM; 30 μM; 100 μM; 300 μM; 500 μM) an α₁β₃γ_{2s} und mutierten GABA_A-Rezeptoren gemessen. Die Werte wurden mit Hilfe eines Programms (*Origin 7.0*) in ein semilogarithmisches Koordinatensystem eingetragen. Anschließend wurde an den erhaltenen Punkten eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung angelegt. E_{max} (%) und EC₅₀ (μM) wurden bestimmt.

2.3 ERGEBNISSE

2.3.1 GABA Konzentrations-Wirkungs-Kurven

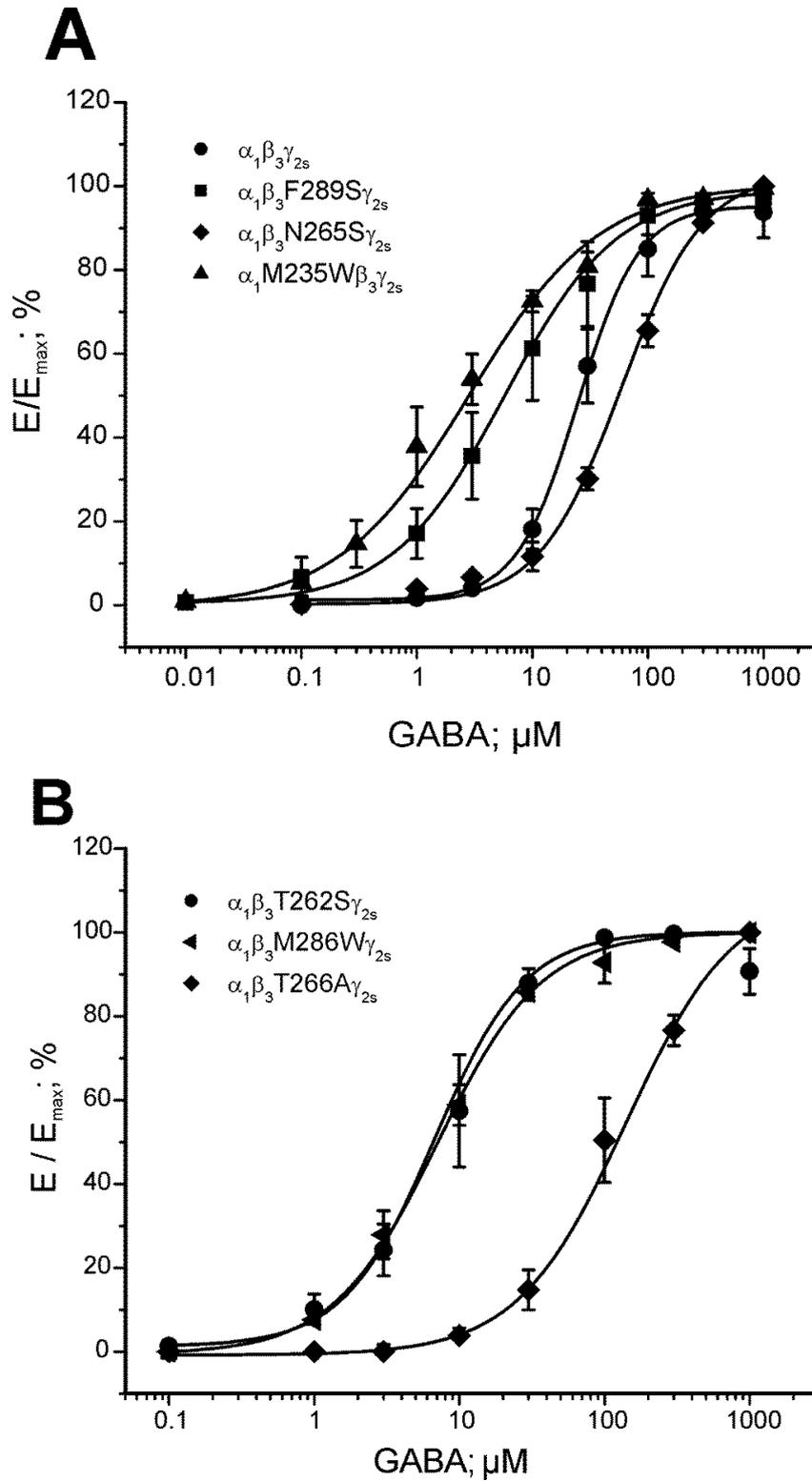
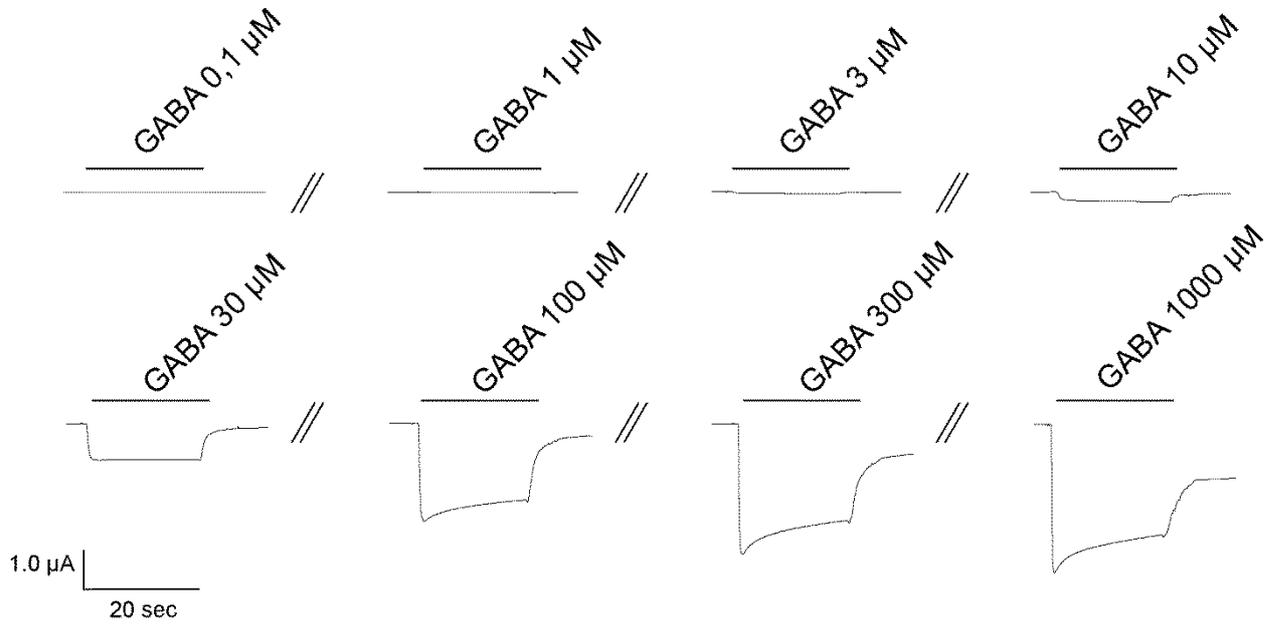


Abbildung 2.3: (A und B) Konzentrations-Wirkungs-Kurven von GABA an Wildtyp ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$), und an folgenden mutierten GABA_A-Rezeptoren: $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{N265S}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\text{M235W}\beta_3\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{T266A}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{M286W}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{T262S}\gamma_{2s}$. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.

A

$\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$



B

$\alpha_1\beta_3\text{N265S}\gamma_{2s}$

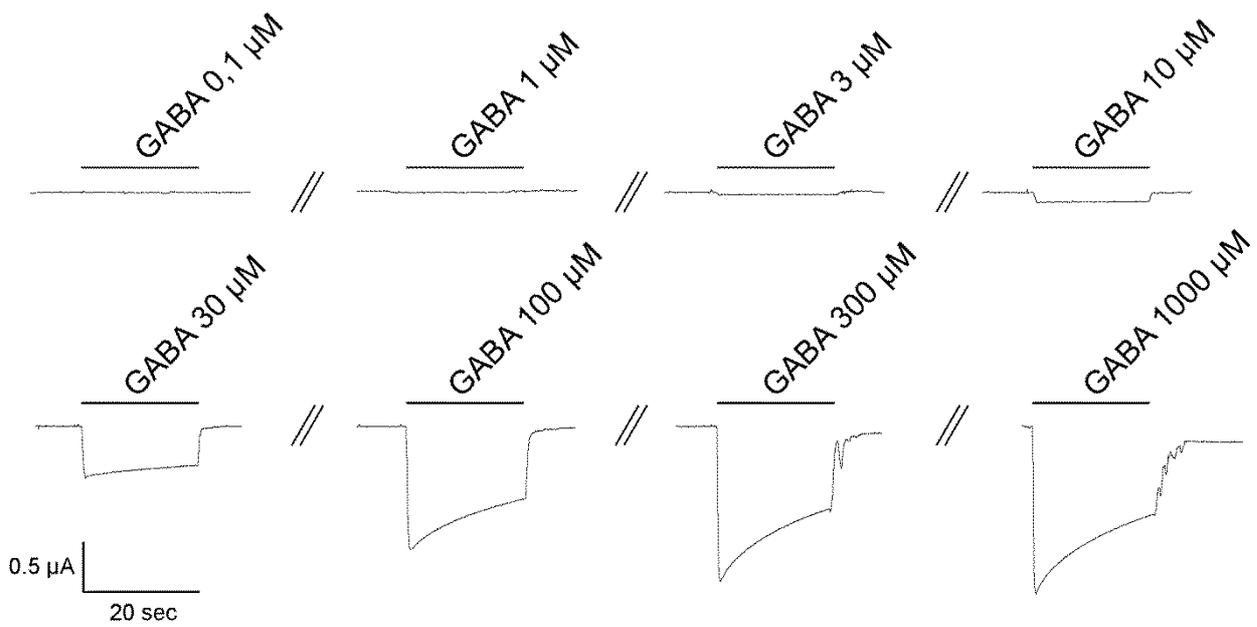
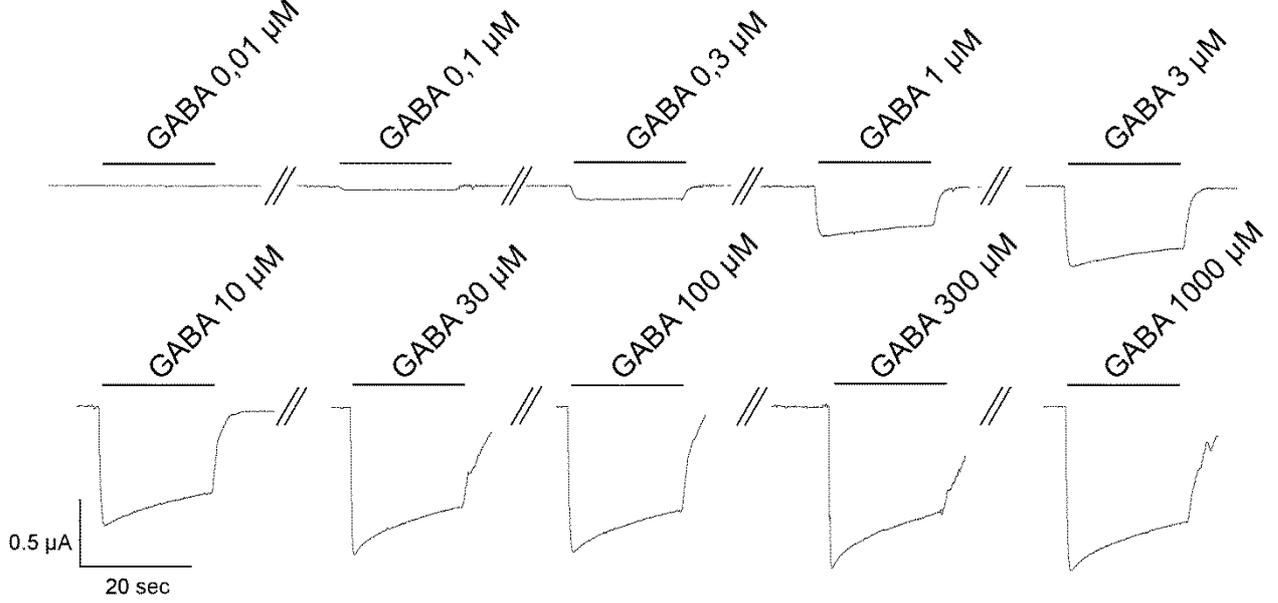


Abb.2.4: (A) repräsentative I_{GABA} durch Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_2$; (B) repräsentative I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_3\text{N265S}\gamma_2$;

A

$\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{2s}$



B

$\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{2s}$

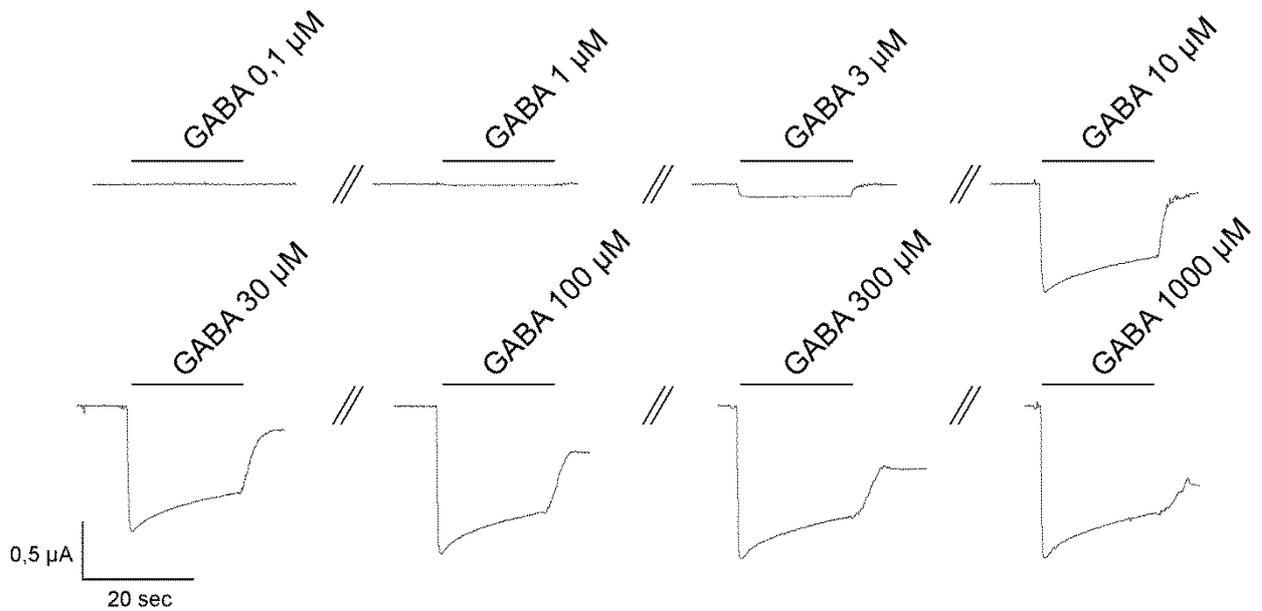
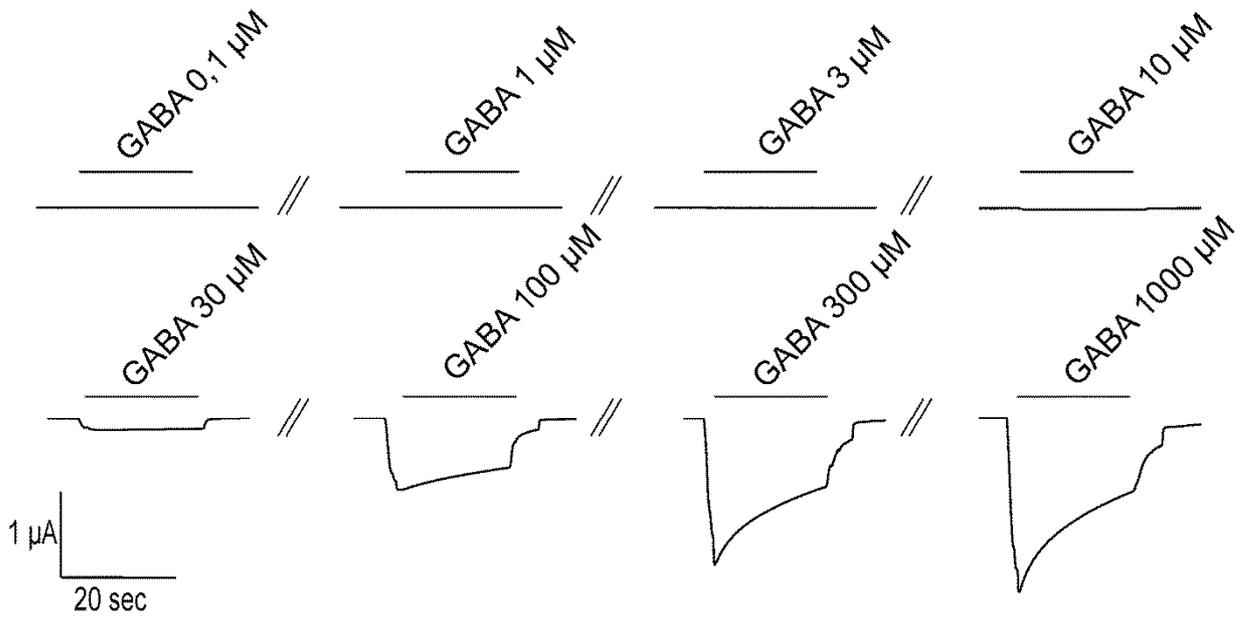


Abb.2.5: repräsentative I_{GABA} durch (A) $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{2s}$, (B) $\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{2s}$

A

$\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$



B

$\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$

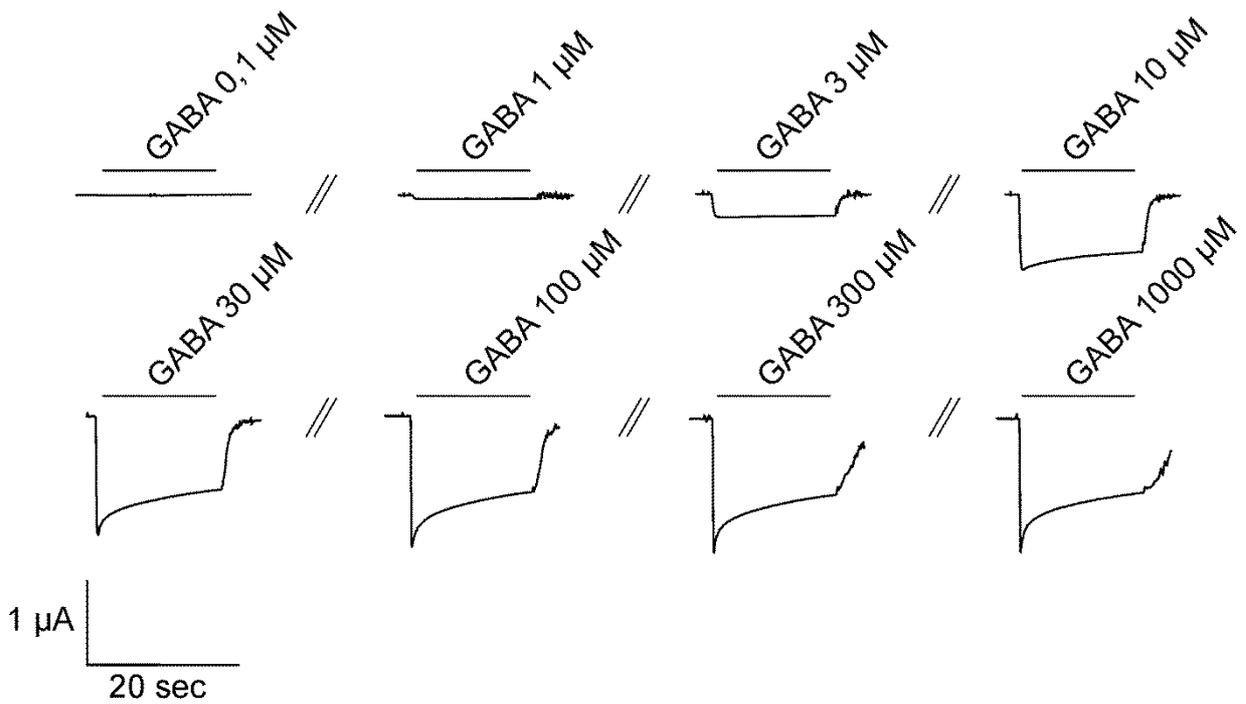


Abb.2.6: repräsentative I_{GABA} durch (A) $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$, (B) $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$

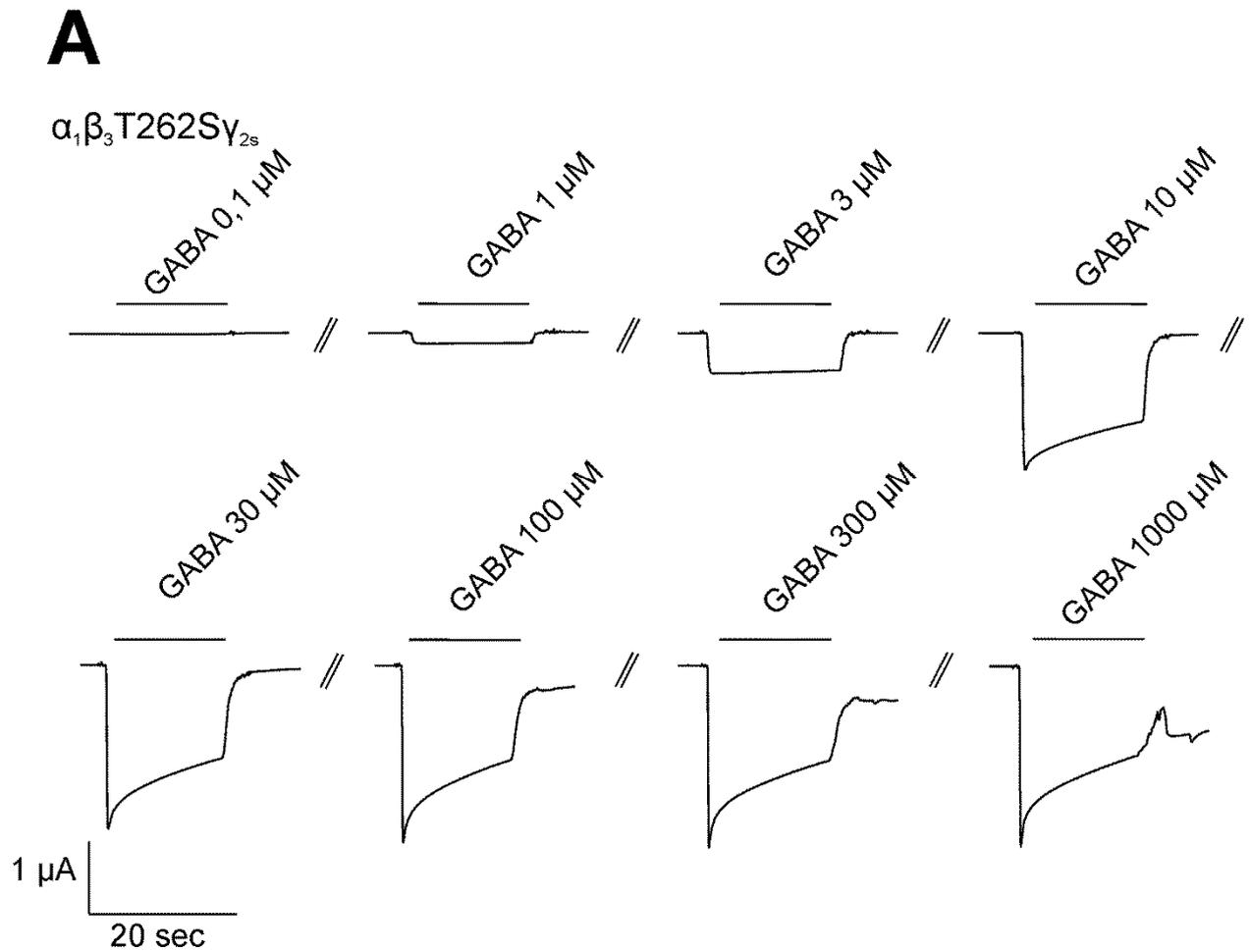


Abb.2.7: repräsentative I_{GABA} durch: (A) $\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2s}$

Rezeptorsubtyp	EC ₅₀ (μM)	n
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$	61,8 ± 6,6	5
$\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2s}$	6,7 ± 1,0 (***)	4
$\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$	149,8 ± 27,9 (*)	5
$\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$	7,1 ± 0,7 (***)	5
$\alpha_1\beta_3F289S\gamma_{2s}$	5,7 ± 1,7 (***)	5
$\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{2s}$	58,8 ± 3,8	5
$\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{2s}$	2,8 ± 0,5 (***)	5

Tabelle 2.1: Auflistung der GABA EC₅₀ und Anzahl der Experimente (n) an den jeweiligen Rezeptorsubtypen.

Sterne zeigen statistische signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp:

(*) $p < 0,05$

(***) $p < 0,005$

Methode: unpaired t-Test

Bevor die Modulation von I_{GABA} durch die Substanz NYV25 an den verschiedenen Mutationen erfolgen konnte, mussten zuerst GABA-Konzentrations-Wirkungskurven von Wildtyp und jeder Mutante erstellt werden, um die Sensitivität von GABA selbst am jeweiligen Rezeptorsubtyp zu bestimmen (siehe Abbildung 2.3 und Tabelle 2.1):

Wie in Abbildung 2.3 gezeigt, liegt die halbmaximale Wirkkonzentration (EC_{50}) von GABA am Wildtyprezeptor bei **$61,8 \pm 6,6 \mu\text{M}$** . Der Austausch eines Asparagins gegen ein Serin in Position β_3265 ($\alpha_1\beta_3\mathbf{N265S}\gamma_{25}$ -Rezeptor) veränderte im Vergleich dazu die GABA-Sensitivität nicht signifikant (EC_{50} : **$58,8 \pm 3,8 \mu\text{M}$**)

Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant ($p < 0,05$) höhere EC_{50} von GABA an $\alpha_1\beta_3\mathbf{T266A}\gamma_{25}$ Rezeptoren gezeigt werden ($149,8 \pm 27,9 \mu\text{M}$) Dies deutet darauf hin, dass diese Punktmutation zu einer Abnahme der Sensitivität des Rezeptorsubtyps für GABA führt.

Alle anderen punktmultierten Rezeptoren wiesen eine signifikant ($p < 0,005$) erhöhte Sensitivität für GABA im Vergleich zum unmutierten Wildtyprezeptor auf ($\alpha_1\beta_3\mathbf{M286W}\gamma_{25}$: $EC_{50} = 7,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $\alpha_1\beta_3\mathbf{F289S}\gamma_{25}$: $EC_{50} = 5,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$, $\alpha_1\beta_3\mathbf{M235W}\gamma_{25}$: $EC_{50} = 2,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ und $\alpha_1\beta_3\mathbf{T262S}\gamma_{25}$: $EC_{50} = 6,7 \pm 1,0 \mu\text{M}$; siehe Tabelle 2.1).

2.3.2 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA}

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Modulation von I_{GABA} durch die Substanz NYV25 am Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ und an 6 punktmutierten Rezeptoren ($\alpha_1\mathbf{M235W}\beta_3\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\mathbf{M286W}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\mathbf{F289S}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\mathbf{N265S}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\mathbf{T262S}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\mathbf{T266A}\gamma_{2s}$) gemessen, um den Einfluss bestimmter Aminosäuren auf die Modulation von I_{GABA} durch NYV25 zu untersuchen. In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.2) sind sowohl die maximalen Potenzierungen von I_{GABA} (E_{max}), als auch die halbmaximalen Wirkkonzentrationen (EC_{50}) des Modulators NYV25 an den verschiedenen Rezeptorsubtypen zusammengefasst.

Rezeptorsubtypen	Substanz	E_{max} (%)	EC_{50} (μ M)	n
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$	NYV25	356 ± 81	110,7 ± 39,4	6
$\alpha_1\beta_3\mathbf{T262S}\gamma_{2s}$	NYV25	734 ± 78 (**)	106,7 ± 24,6	5
$\alpha_1\beta_3\mathbf{T266A}\gamma_{2s}$	NYV25	1021 ± 216 (*)	111,4 ± 36,0	7
$\alpha_1\beta_3\mathbf{M286W}\gamma_{2s}$	NYV25	500 μ M: 56 ± 15 (*)	_____	6
$\alpha_1\mathbf{M235W}\beta_3\gamma_{2s}$	NYV25	500 μ M: 200 ± 38	_____	6
$\alpha_1\beta_3\mathbf{N265S}\gamma_{2s}$	NYV25	500 μ M: 165 ± 20	_____	5
$\alpha_1\beta_3\mathbf{F289S}\gamma_{2s}$	NYV25	500 μ M: 80 ± 20 (*)	_____	5

Tabelle 2.2: Auflistung von E_{max} , EC_{50} und der Anzahl der Experimente (n) an den jeweiligen Rezeptorsubtypen.

Sterne zeigen statistische signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp:

(*) $p < 0,05$

(**) $p < 0,01$

Methode: unpaired t-Test

2.3.2.1 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$

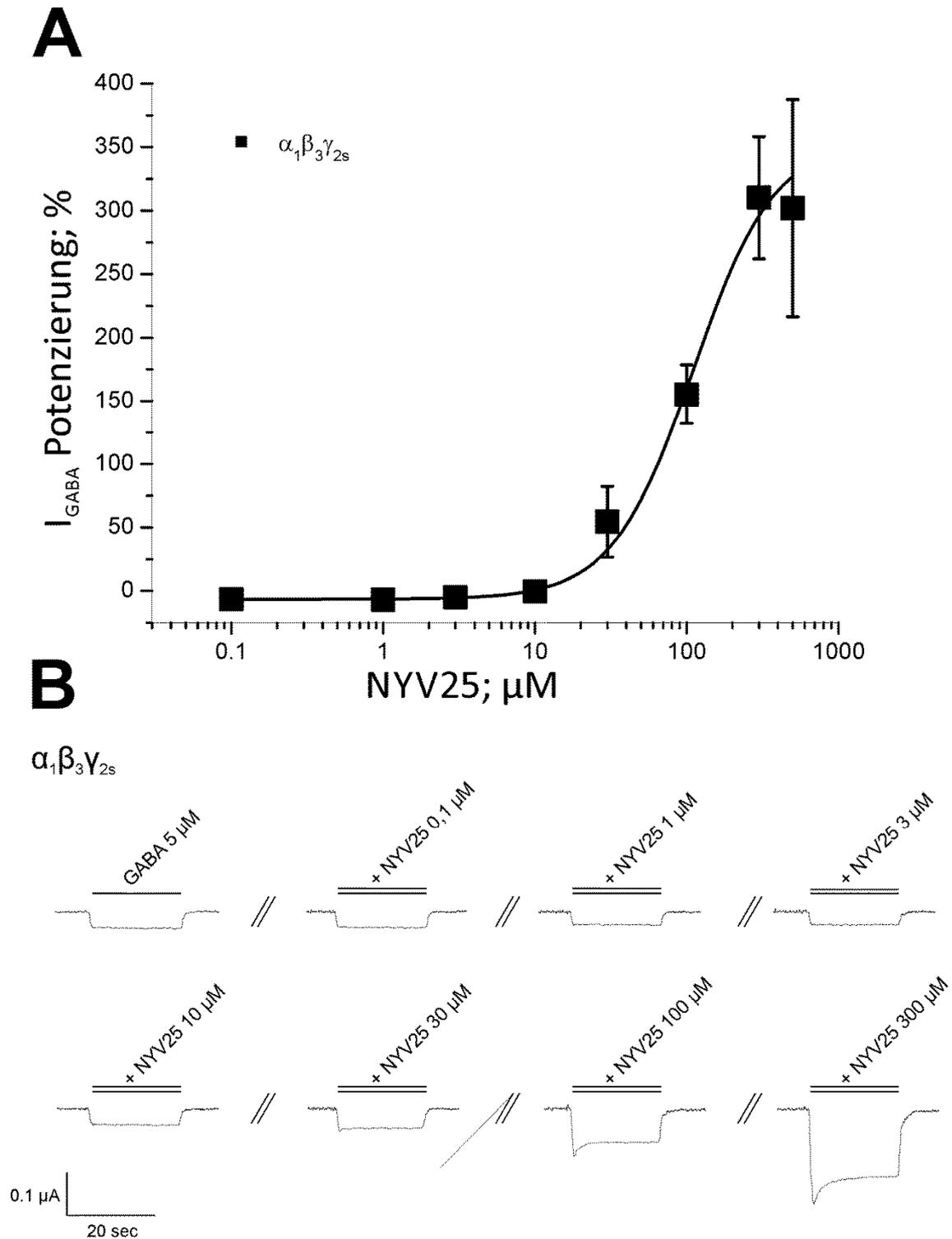


Abb.2.8:
(A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NYV25 am Wildtyp ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$). Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.
(B) repräsentative $I_{GABA+NYV25}$ durch Wildtyp ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$)

Wie in Abbildung 2.8 **A** und **B** dargestellt, induziert die Applikation einer GABA EC₃₋₇ mit ansteigenden Konzentrationen von NYV25 eine signifikante Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ Rezeptoren:

Niedrige Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 10 μ M NYV25 induzierten noch keine statistisch signifikante Modulation des $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ Rezeptors, bei Konzentrationen über 30 μ M konnte jedoch eine deutliche Verstärkung von I_{GABA} gezeigt werden. Die halbmaximale Wirkkonzentration (EC₅₀) von NYV25 lag am getesteten Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ bei 110,7 \pm 39,4 μ M. Der maximale Effekt (E_{max}: 356 \pm 81%; n=6) der NYV25-induzierten Modulation am Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ wurde bei einer Konzentration von 300 μ M erreicht. Höhere Konzentrationen konnten im Gegensatz dazu keine zusätzliche Potenzierung von I_{GABA} bewirken.

2.3.2.2 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$

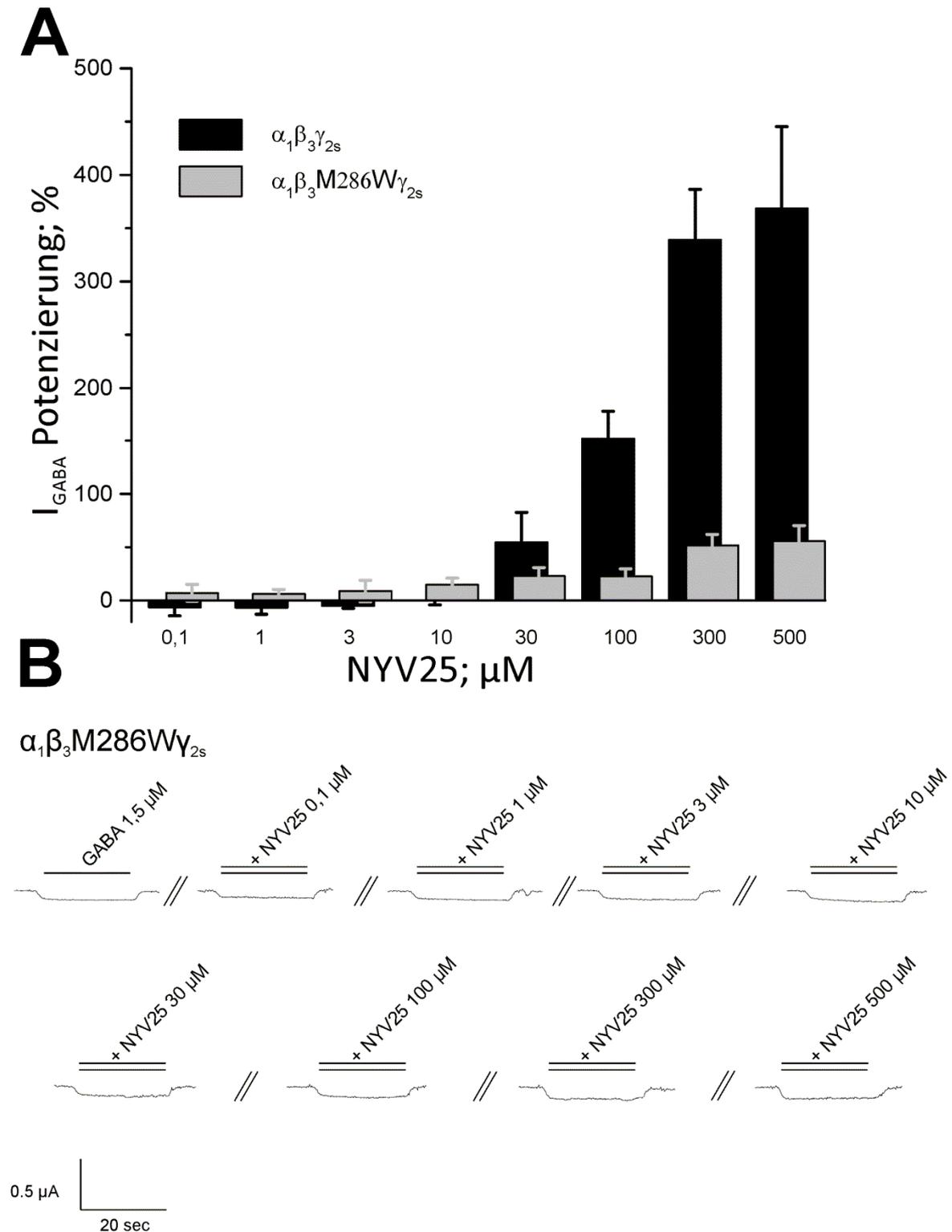


Abb.2.9:

(A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NYV25 an $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.

(B) repräsentative $I_{GABA+NYV25}$ durch $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$

Wie in Abbildung 2.9 dargestellt, führt ein Austausch der Aminosäure Methionin gegen Tryptophan in Position 286 der β_3 -Untereinheit zu einer drastische Abnahme der I_{GABA} Modulation durch NYV25 im Vergleich zum unmutierten $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ Rezeptor.

Wie auch zuvor schon am Wildtypen $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ beobachtet wurde, führte NYV25 an $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$ GABA_A-Rezeptoren bei niedrigen Konzentrationen (<30 μ M) zu keiner signifikanten Modulation von I_{GABA} . Im Gegensatz zu $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptoren, die durch NYV25 in höheren Konzentration deutlich moduliert werden ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$: $E_{max} = 356 \pm 81\%$), zeigen mutierte $\alpha_1\beta_3M286W\gamma_{2s}$ Rezeptoren jedoch auch bei Applikation von höheren Konzentrationen (30-500 μ M NYV25) keine signifikante Modulation von I_{GABA} : $\geq 500\mu$ M NYV25 induzierte eine Potenzierung von I_{GABA} von maximal $E_{500} = 56 \pm 15 \%$, was einer Reduktion um das 6-fache im Vergleich zum Wildtyp entspricht. Da an diesem Rezeptorsubtyp auch in hohen Konzentrationen keine signifikante Modulation von I_{GABA} beobachtet werden konnte, konnte keine eindeutige EC_{50} bestimmt werden.

2.3.2.3 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$

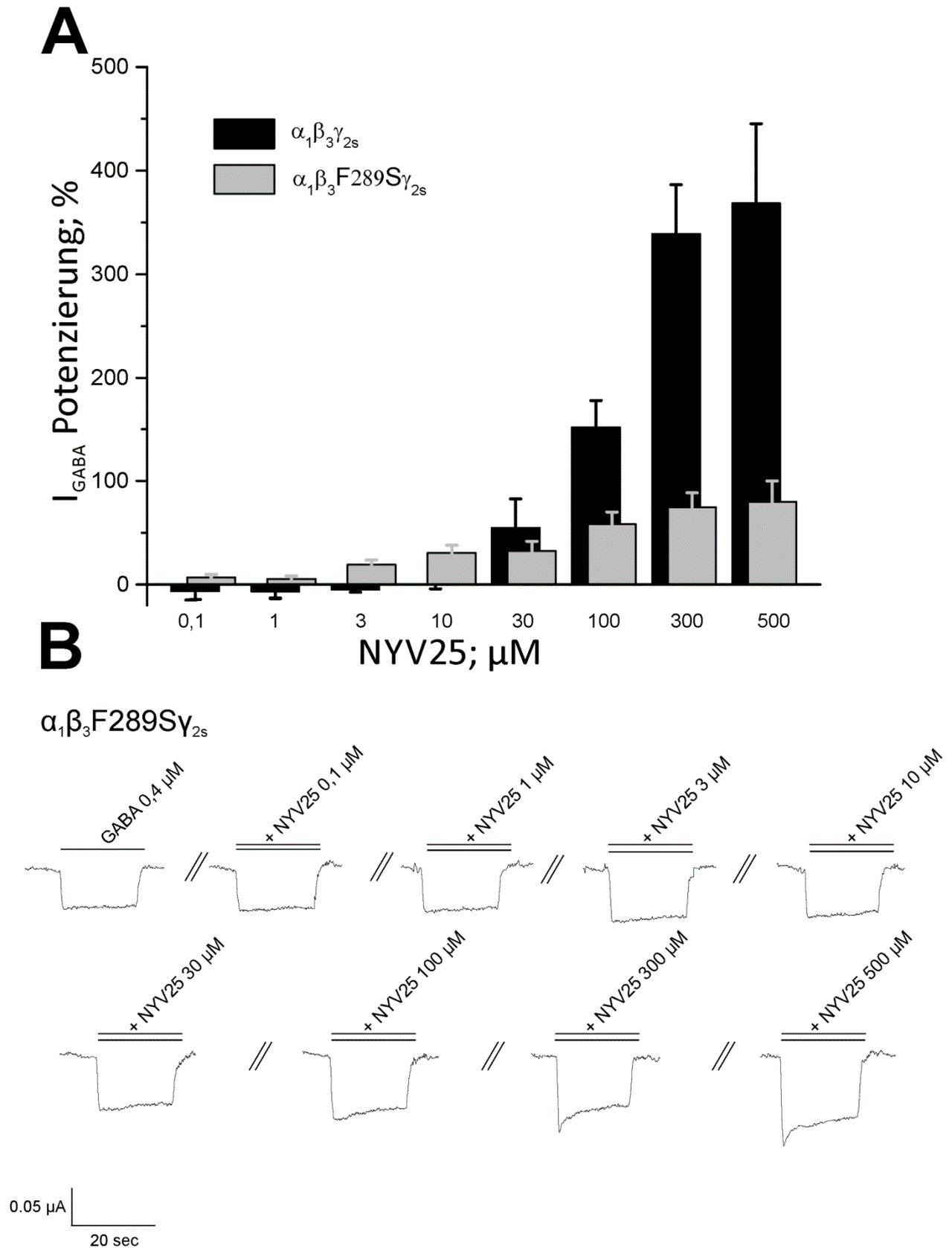


Abb.2.10:
(A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NYV25 an $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{2s}$. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.
(B) repräsentative $I_{GABA+NYV25}$ durch $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{2s}$

In Abbildung 2.10 sind die Auswirkungen auf die Potenzierung durch NYV25 beim Austausch der Aminosäure Phenylalanin durch Serin an Position 289 der β_3 -Untereinheit gezeigt:

Niedrige Konzentrationen ($\leq 30\mu\text{M}$) des GABA_A-Rezeptor Modulators NYV25 modulierten I_{GABA} sowohl an Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ als auch an mutierten $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{2s}$ -Rezeptoren nur marginal und erzielten eine Potenzierung von $54,5 \pm 28,0\%$ ($30\mu\text{M}$; $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$; $n=6$) bzw. $32,4 \pm 7,5\%$ ($30\mu\text{M}$; $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{2s}$; $n=5$). Durch Applikationen einer GABA EC₃₋₇ gemeinsam mit höheren Konzentrationen von NYV25 konnte jedoch gezeigt werden, dass die NYV25-induzierte Potenzierung von I_{GABA} durch Austausch eines Phenylalanins in Position β_3289 durch ein Serin drastisch reduziert wird: Ab $100\mu\text{M}$ NYV25 ist eine deutliche und statistisch signifikante Abnahme ($p<0,05$) der Stimulation durch NYV25 zu erkennen. Die Potenzierung von $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{2s}$ durch $100\mu\text{M}$ NYV25 betrug $58,3 \pm 11,8\%$ ($n=5$) und war damit etwa um das 3-fache reduziert im Vergleich zum Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ ($155,3 \pm 23,2\%$; $n=6$). Der signifikante Einfluss der Punktmutation $\beta_3\text{F289S}$ auf die Modulation von I_{GABA} durch NYV25 war bei Konzentrationen $\geq 300\mu\text{M}$ ($n=5$) noch deutlicher sichtbar: $500\mu\text{M}$ NYV25 induzierten eine Potenzierung von I_{GABA} um etwa $310,2 \pm 48,1\%$ an Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren, während die Modulation an $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{2s}$ -Rezeptoren nur etwa $80 \pm 20\%$ betrug.

2.3.2.4 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{2s}$

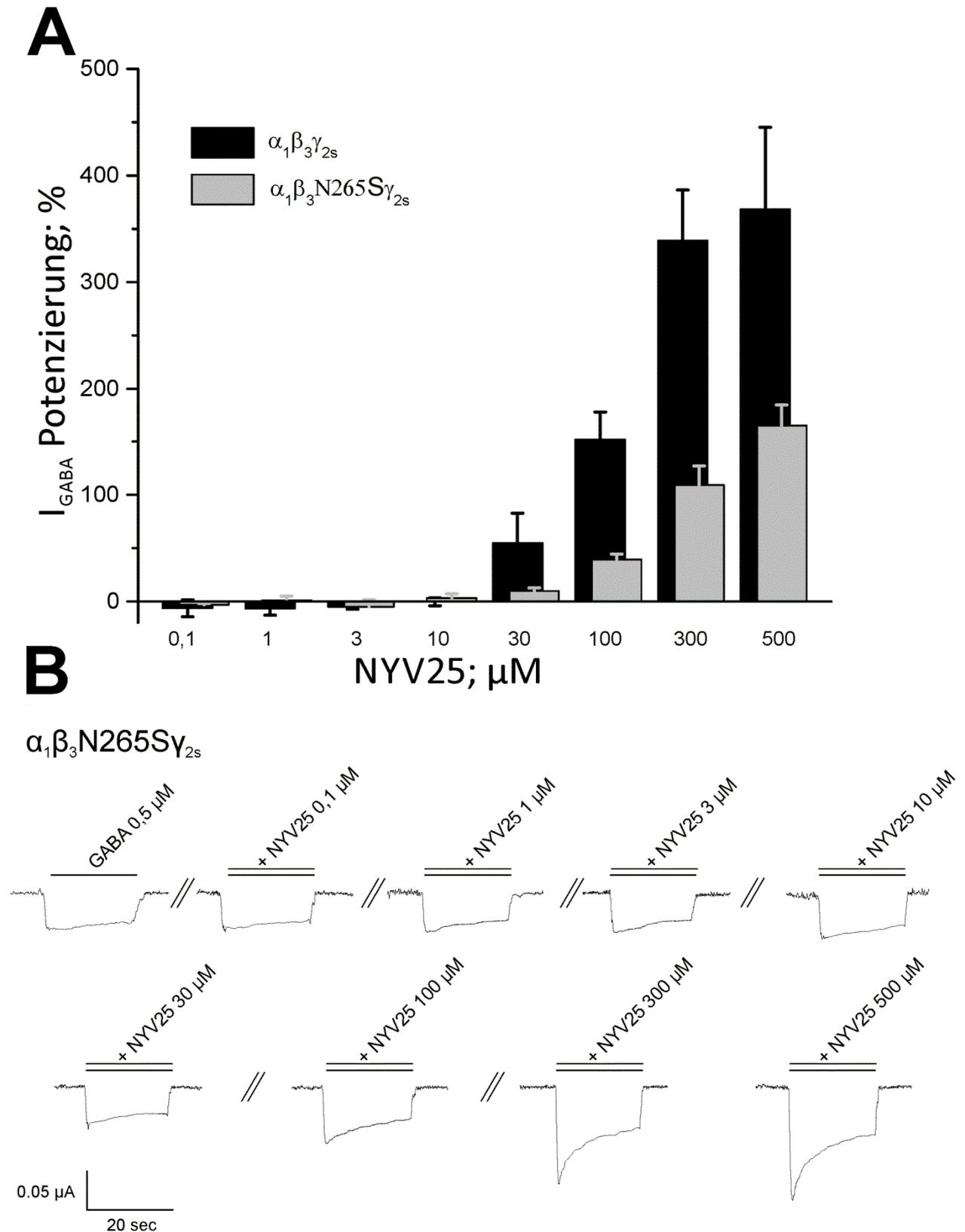


Abb.2.11:
(A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NYV25 an $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{2s}$. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.
(B) repräsentative $I_{GABA+NYV25}$ durch $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{2s}$

Die nächste Abbildung (2.11) beschreibt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Modulation von I_{GABA} durch NYV25 an $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{25}$ -Rezeptoren.

Wie beim Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ erreichten Konzentrationen von $0,1\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$ der Substanz NYV25 keine signifikante Modulation von I_{GABA} an der Mutante $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{25}$. Im Gegensatz zu $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ -Rezeptoren, an welchen eine NYV25-induzierte Potenzierung von bis zu $356 \pm 81\%$ (E_{max} ; $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$; $n=6$) beobachtet wurde, resultierte der Austausch des Asparagins in Position β_3265 durch ein Serin in einer trendmäßigen Abnahme der Modulation: statistisch signifikante ($p<0,05$) Unterschiede zeigten Konzentrationen von $100\mu\text{M}$ und $300\mu\text{M}$. Bei diesen Konzentrationen konnte eine Abnahme der Potenzierung um zirka das 4-fache ($100\mu\text{M}$; $39,4 \pm 5,1\%$; $n=5$) bzw. um etwa das 3-fache ($300\mu\text{M}$; $109,1 \pm 18,1\%$; $n=5$) im Vergleich zum Wildtyp ($100\mu\text{M}$: $155,3 \pm 23,2\%$, $n=6$; $300\mu\text{M}$: $310,2 \pm 48,1\%$, $n=6$) beobachtet werden. Auch $500\mu\text{M}$ NYV25 induzierten trendmäßig eine geringe Modulation an $\alpha_1\beta_3N265S\gamma_{25}$ ($165 \pm 20\%$; $n=5$) im Vergleich zum Wildtyp ($302,0 \pm 85,5\%$; $n=6$), diese Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant. Wie in Abbildung 2.11 dargestellt, führten $500\mu\text{M}$ NYV25 ($165 \pm 20\%$; $n=5$) im Vergleich zu $300\mu\text{M}$ NYV25 ($109,1 \pm 18,1\%$; $n=5$) zu einer weiteren Zunahme der NYV25-induzierten I_{GABA} -Potenzierung, weshalb weder der Maximaleffekt noch die halbmaximale Wirkkonzentration bestimmt werden konnte.

2.3.2.5 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{2s}$

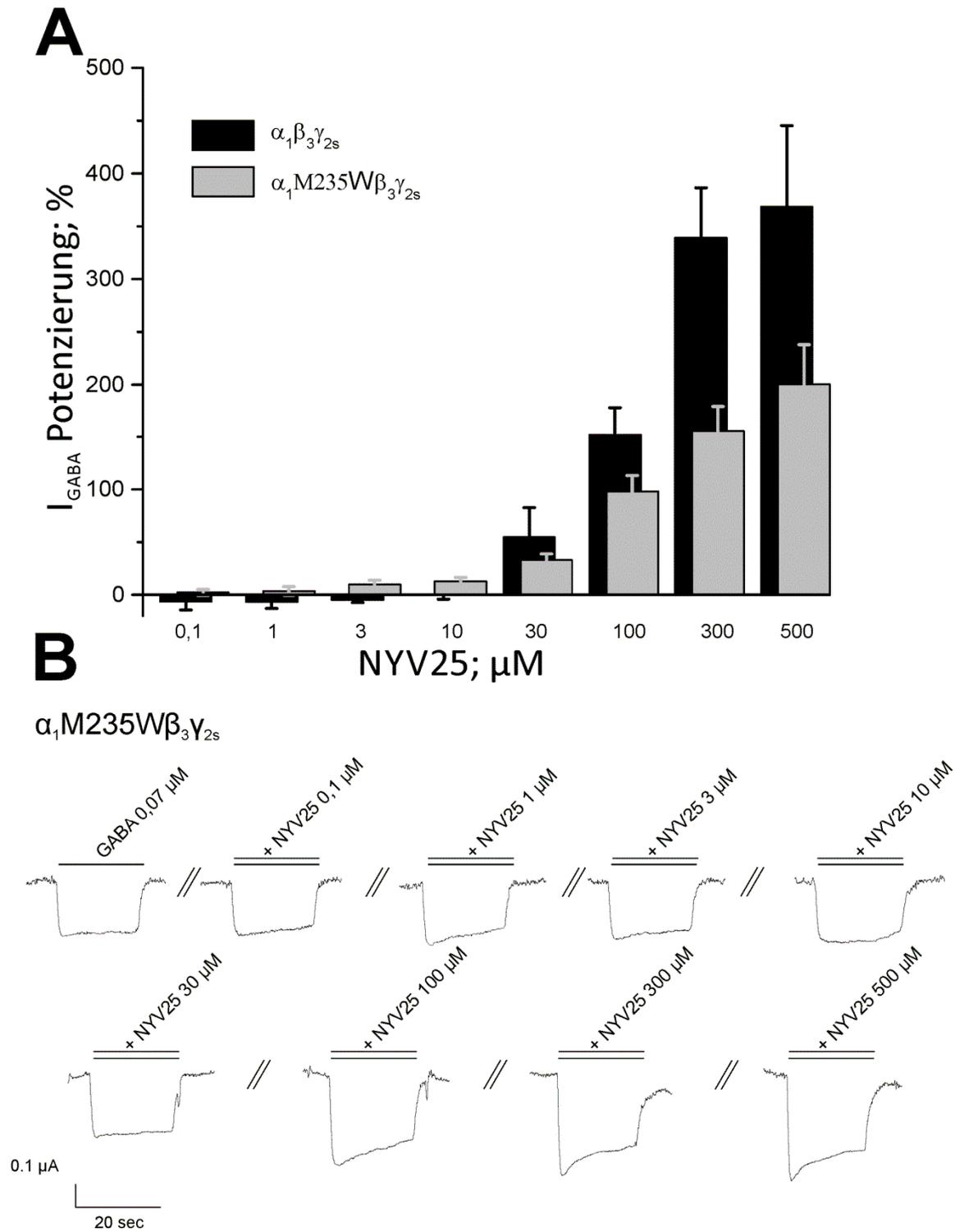


Abb.2.12:
(A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NYV25 an $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{2s}$. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.
(B) repräsentative $I_{GABA+NYV25}$ durch $\alpha_1M235\beta_3W\gamma_{2s}$

Abbildung 2.12 zeigt die NVY25-induzierte Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{25}$ -Rezeptoren: Während bei Konzentrationen von $\leq 100\mu M$ keine signifikanten Unterschiede der Stimulation von Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$ und mutierten $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{25}$ -Rezeptoren beobachtet werden konnte, konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen $\geq 100\mu M$ NVY25 $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{25}$ -Rezeptoren deutlich schwächer modulieren: Während $300\mu M$ NVY25 am Wildtyp eine Potenzierung von I_{GABA} um $310,2 \pm 48,1\%$ ($n=6$) induziert, war die gemessene Modulation am mutierten $\alpha_1M235W\beta_3\gamma_{25}$ -Rezeptor etwa auf die Hälfte reduziert ($155,2 \pm 24,3\%$; $n=6$; $p<0,05$). Diese Reduktion konnte trendmäßig auch bei höheren Konzentrationen ($500\mu M$) beobachtet werden, war jedoch statistisch nicht signifikant. $500\mu M$ NVY25 reichten auch an diesem Rezeptorsubtyp nicht aus um eine Sättigung zu erreichen, weshalb kein Maximaleffekt und keine EC_{50} bestimmt wurde.

2.3.2.6 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2s}$

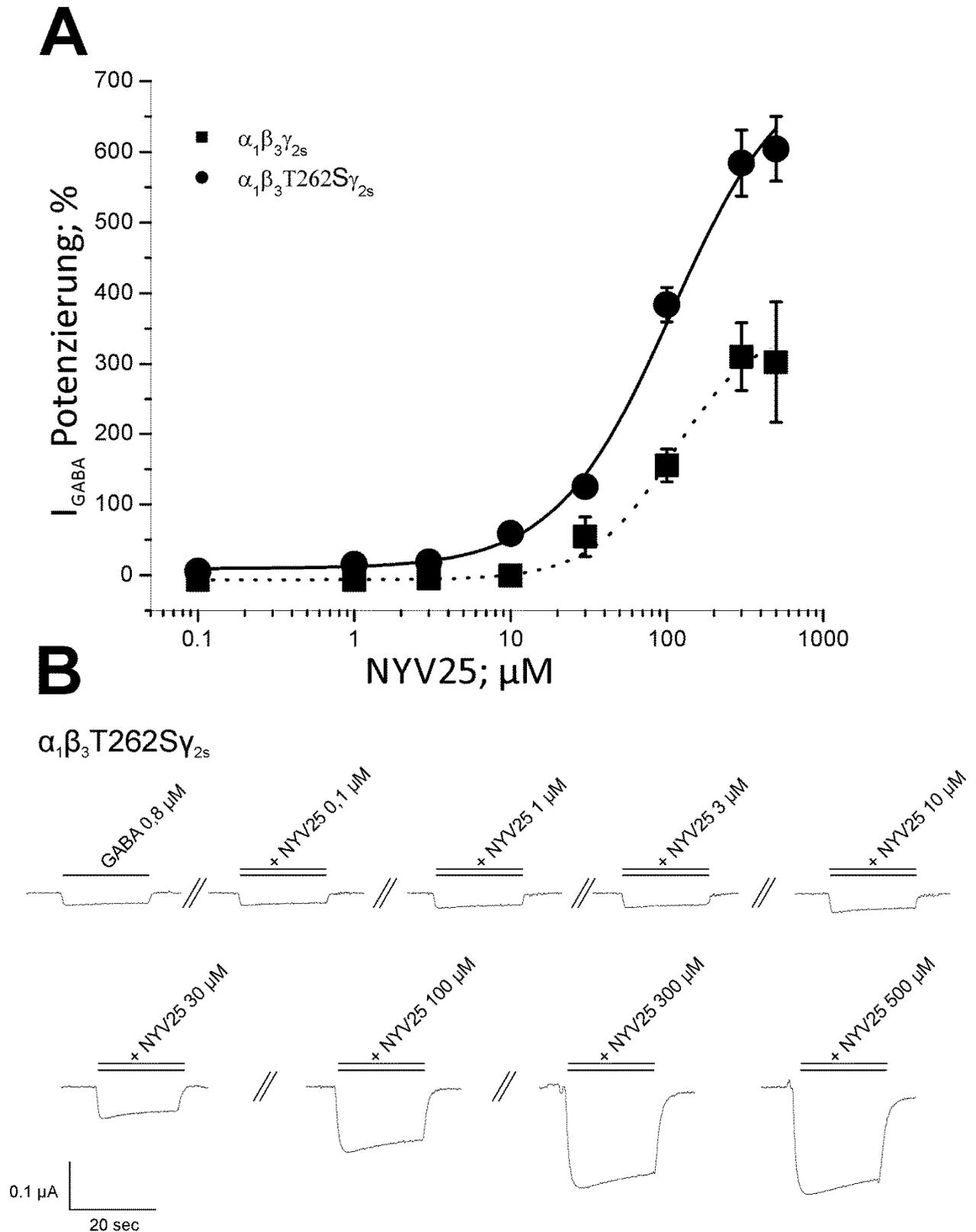


Abb.2.13:
(A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NYV25 an $\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2s}$. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.
(B) repräsentative $I_{GABA+NYV25}$ durch $\alpha_1\beta_3T262S\gamma_{2s}$

Wie in Abbildung 2.13 gezeigt, hat der Austausch des Threonins an Position β_3 T262 gegen ein Serin deutliche Auswirkungen auf die NYV25-vermittelte Potenzierung von I_{GABA} : Schon bei niedrigen Konzentrationen (1 μ M: $15,2 \pm 2,2\%$; $p < 0,05$; 3 μ M: $18,6 \pm 2,8\%$; $p < 0,0005$; 10 μ M: $58,9 \pm 7,2\%$; $p < 0,0005$) ist eine statistisch signifikante Zunahme der Modulation im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Der maximale Effekt des Liganden am $\alpha_1\beta_3$ T262 γ_{25} -Rezeptor war im Vergleich zur maximalen Modulation des Wildtypen etwa doppelt so stark ausgeprägt ($\alpha_1\beta_3$ T252 γ_{25} : $734 \pm 78\%$ n=5; vgl. mit $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$: $356 \pm 81\%$ n=6), während die halbmaximale Wirkkonzentration an beiden Rezeptorsubtypen ($\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$: $EC_{50} = 110,7 \pm 39,4\mu$ M; n=6, $\alpha_1\beta_3$ T262 γ_{25} : $EC_{50} = 106,7 \pm 24,6\mu$ M; n=7) vergleichbar war.

2.3.2.7 NYV25-induzierte Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$

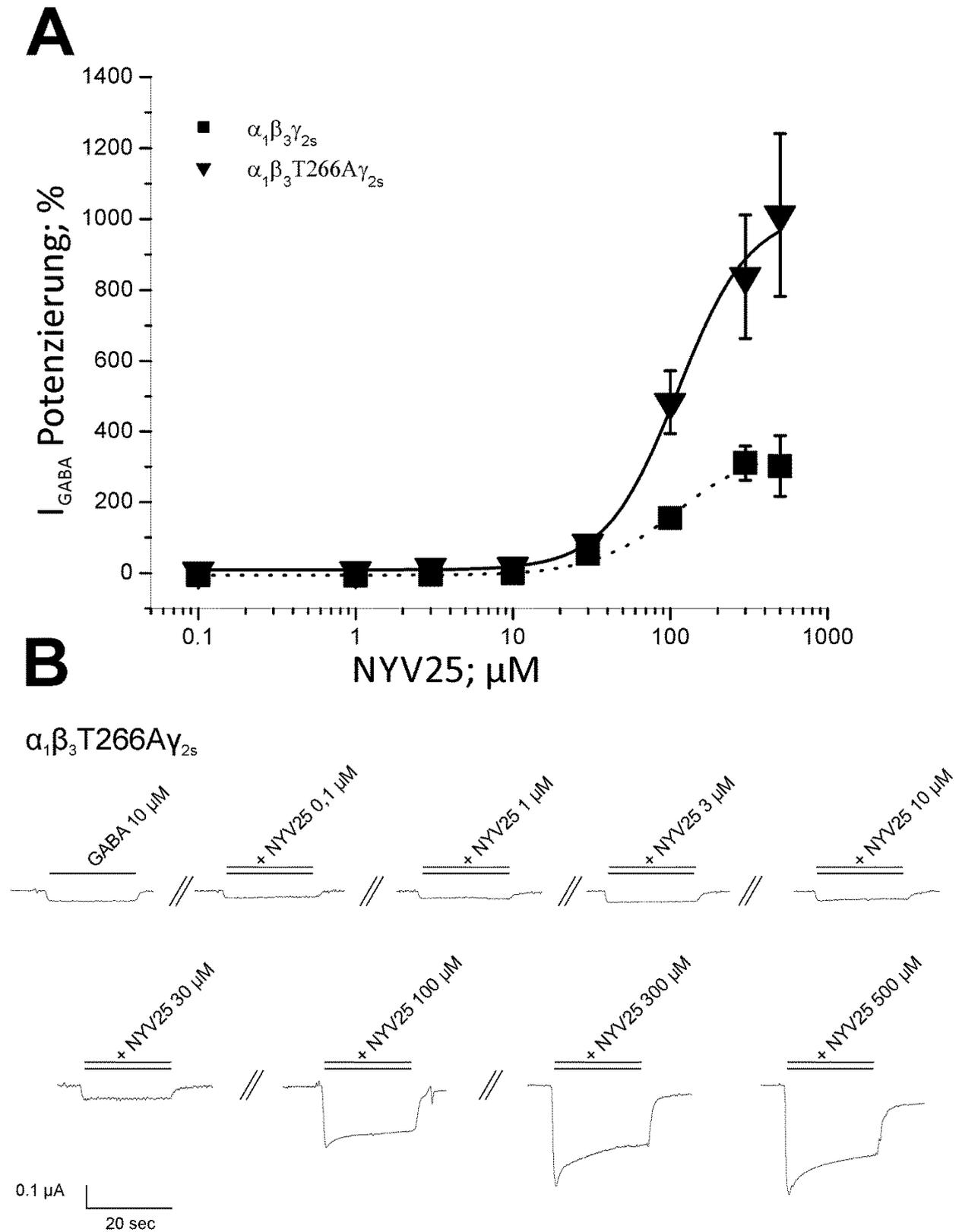


Abb.2.14:
 (A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NYV25 an $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von min. 4 Oozyten und 2 verschiedenen Fröschen.
 (B) repräsentative $I_{GABA+NYV25}$ durch $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$

Wie in Abbildung 2.14 dargestellt, hatte auch der Austausch von Threonin gegen Alanin an Position 266 der β_3 -Untereinheit großen Einfluss auch die Modulation von GABA_A-Rezeptoren durch den Liganden NYV25:

Während die Modulation an $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$ durch niedrige Konzentrationen ($\leq 30\mu\text{M}$) von NYV25 im Vergleich zum Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ kaum Unterschiede aufwies, ist eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Potenzierung ab $100\mu\text{M}$ NYV25 ($\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$: $100\mu\text{M}$: $482,9 \pm 89,5\%$; $300\mu\text{M}$: $837,6 \pm 173,9\%$; $500\mu\text{M}$: $1011,6 \pm 229,1\%$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$: $100\mu\text{M}$: $155,3 \pm 23,2\%$; $300\mu\text{M}$: $310,2 \pm 48,1\%$; $500\mu\text{M}$: $302,0 \pm 85,5\%$) deutlich zu erkennen. Die E_{max} von NYV25 an $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$ -Rezeptoren ($1021 \pm 216\%$; $n=7$) betrug knapp das 3-fache im Vergleich zum Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ ($356 \pm 81\%$; $n=6$). Im Gegensatz dazu war die halbmaximale Wirkkonzentrationen EC_{50} an $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$ statistisch nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp ($\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$: $EC_{50} = 110,7 \pm 39,4\mu\text{M}$; $n=6$ im Vergleich zu $\alpha_1\beta_3T266A\gamma_{2s}$: $EC_{50} = 111,4 \pm 36,0\mu\text{M}$; $n=7$).

2.4 DISKUSSION

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollten molekulare Determinanten der Modulation von GABA_A Rezeptoren durch den Liganden NYV25 untersucht werden. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Punktmutationen in der α_1 - und β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors auf die Potenzierung von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch den Modulator NYV25 bestimmt werden. Folgende Aminosäuren wurden ausgewählt:

- Methionin in Position 235 der α_1 -Untereinheit → Tryptophan
- Methionin in Position 286 der β_3 -Untereinheit → Tryptophan
- Asparagin in Position 265 der β_3 -Untereinheit → Serin
- Phenylalanin in Position 289 der β_3 -Untereinheit → Serin
- Threonin in Position 262 der β_3 -Untereinheit → Serin
- Threonin in Position 266 der β_3 -Untereinheit → Alanin

Punktmutationen wurden in die jeweiligen Positionen eingeführt und die I_{GABA} Modulation durch NNYV25 an Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ und mutierten $\alpha_1\text{M235}\beta_3\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{M286W}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{N265S}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{F286S}\gamma_{2s}$, $\alpha_1\beta_3\text{T262S}\gamma_{2s}$ und $\alpha_1\beta_3\text{T266A}\gamma_{2s}$ Rezeptoren, mithilfe der 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik gemessen und Konzentrations-Wirkungskurven erstellt:

$\alpha_1\text{M235W}\beta_3\gamma_{2s}$

Die Substanz NYV25 zeigte an diesem Mutanten eine trendmäßige Abnahme der Potenzierung von I_{GABA} im Vergleich zum Wildtypen. Da die Modulation von I_{GABA} durch den Liganden NYV25 an diesem Rezeptorsubtyp im Vergleich zum Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ nur geringfügig reduziert wurde, liegt nahe, dass ein Methionin in Position 235 der α_1 -Untereinheit für eine effiziente Modulation durch NYV25 möglicherweise nicht zwingend nötig ist. Der Austausch des Methioninrestes gegen die vergleichsweise sperrige Tryptophangruppe könnte jedoch die Bindung von NYV25 an den Rezeptor erschweren, da der Zugang zur Bindungsstelle teilweise blockiert sein könnte.

$\alpha_1\beta_3\text{N265S}\gamma_{2s}$

Bei dieser Mutante konnte eine trendmäßig reduzierte Modulation von I_{GABA} durch NYV25 im Vergleich zum Wildtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ gezeigt werden. Während die Potenzierung von I_{GABA} durch 100-300 μM NYV25 an $\alpha_1\beta_3\text{N265S}\gamma_{2s}$ im Vergleich zum Wildtyp etwa um das 2-3fache reduziert war, war die NYV25-induzierte Modulation bei höheren Konzentrationen (500 μM) an beiden Rezeptorsubtypen vergleichbar. Die Ergebnisse zeigen, dass das Asparagin an Position $\beta_3\text{N265}$ für die modulierende Wirkung des Liganden

NVY25 vermutlich von geringer Bedeutung ist, da ein Austausch dieses Restes durch ein Serin toleriert wird und mutierte $\alpha_1\beta_3\text{N265S}\gamma_{25}$ Rezeptoren im Vergleich zum Wildtyp nur trendmäßig schwächer moduliert werden.

$\alpha_1\beta_3\text{M286W}\gamma_{25}$, $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{25}$

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Austausch des Methioninrestes an Position $\beta_3\text{286}$ durch ein Tryptophan als auch der Austausch eines Phenylalaninrestes an Position $\beta_3\text{289}$ durch ein Serin, deutliche Auswirkungen auf die Modulation von I_{GABA} durch den Liganden NVY25 haben:

Der stärkste Effekt konnte an $\alpha_1\beta_3\text{M286W}\gamma_{25}$ Rezeptoren beobachtet werden: Auch hohe Ligandenkonzentrationen ($\geq 300\mu\text{M}$) potenzierten I_{GABA} nur um etwa 50-55%, was einer Reduktion um das 7-fache im Vergleich zum Wildtyp entspricht. Die signifikante Reduktion der modulierenden Wirkung des Liganden NVY25 an diesem Rezeptorsubtyp legt nahe, dass die Punktmutation in dieser Position die Wirkung von NVY25 stark beeinflussen kann. Ähnlich wie beim Rezeptor $\alpha_1\text{M235W}\beta_3\gamma_{25}$ könnte der sperrige Tryptophanrest ebenfalls den Zugang zur Bindungsstelle teilweise erschwert haben. Bei $\alpha_1\beta_3\text{F289S}\gamma_{25}$ erkennt man ebenfalls eine eindeutige statistisch signifikante Abnahme der Potenzierung von I_{GABA} durch NVY25 im Vergleich zu $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$. Die Position $\beta_3\text{289}$ scheint für die Wirkung von NVY25 ebenfalls von besonderer Bedeutung zu sein, da die I_{GABA} Modulation an diesem mutierten Rezeptor im Vergleich zum Wildtyp auch in hohen Konzentration um das 4-5fache reduziert ist.

$\alpha_1\beta_3\text{T266A}\gamma_{25}$, $\alpha_1\beta_3\text{T262S}\gamma_{25}$

An den Mutanten $\alpha_1\beta_3\text{T266A}\gamma_{25}$ und $\alpha_1\beta_3\text{T262S}\gamma_{25}$ war eine deutliche Zunahme der Potenzierung durch NVY25 zu erkennen. Bei diesen Mutanten wurde jeweils ein Threonin gegen ein Alanin ($\beta_3\text{T266}$) bzw. ein Serin ($\beta_3\text{T262}$) ausgetauscht. Beide Mutationen verstärkten die maximale Potenzierung im Vergleich zu Wildtyp um das 2-fache ($\beta_3\text{T262S}$) bzw. das 3-fache ($\beta_3\text{T266A}$). Im Gegensatz dazu waren die halbmaximalen Wirkkonzentrationen an beiden Rezeptorsubtypen vergleichbar mit dem Wildtyp ($\alpha_1\beta_3\text{T266A}\gamma_{25}$: $\text{EC}_{50}=111,4 \pm 36,0 \mu\text{M}$ und $\alpha_1\beta_3\text{T262S}\gamma_{25}$: $\text{EC}_{50}=106,7 \pm 24,6 \mu\text{M}$; $\alpha_1\beta_3\gamma_{25}$: $\text{EC}_{50}=110,7 \pm 39,4 \mu\text{M}$). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die beiden Threoninreste in diesen Positionen nicht essentiell für die Wirkung des GABA_A -Rezeptor Modulators NVY25 sind, da ein Austausch gegen ein Serin ($\beta_3\text{T262}$) bzw. ein Alanin ($\beta_3\text{T266}$) die Potenzierung von I_{GABA} im Vergleich zum Wildtyp sogar verstärkt. Möglicherweise erlaubt der Austausch durch das kleinere Serin bzw. Alanin einen erleichterten Zugang zur Bindungsstelle.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen in den transmembranären Domänen der α_1 - und β_3 -Untereinheit des GABA_A Rezeptors deutliche Einflüsse auf die modulierende Wirkung des Liganden NVY25 haben: Vor allem die Positionen $\beta_3\text{M286}$ sowie $\beta_3\text{F289}$

sind für die NYV25-induzierte Modulation essentiell, da Punktmutationen in diesen Positionen die Wirkung signifikant beeinflussen. Zwei weitere der untersuchten Aminosäuren (β_3 N265 sowie α_1 M235) scheinen für die Wirkung nur von geringer Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass β_3 T262 und β_3 T266 für die Potenzierung von I_{GABA} durch NYV25 nicht von Bedeutung sind.

2.5 LITERATURVERZEICHNIS

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

Atack JR, Huston PH, Collinson N, Marshall G, Bentley G, Moyes C, Cook SM, Collins I, Wafford K, McKernan RM, Dawson GR (2005) *Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for alpha3 subunit-containing GABA A receptors.* Br J Pharmacol. 144(3):357-66

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

Bormann J (2000) *The 'ABC' of GABA receptors.* Trends Pharmacol Sci. 21(1):16-9

Bouvier M (2001) *Oligomerization of G-Protein-coupled transmitter receptors.* Nat Rev Neurosci. 2(4):274-86

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) *International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function.* Pharmacol Rev. 54(2):247-64

Chiara DC, Gill JF, Chen Q, Tillman T, Dailey WP, Eckenhoff RG, Xu Y, Tang P, Cohen JB (2014) *Photoaffinity labeling the propofol binding site in GLIC.* Biochemistry. 53(1):135-42

Chisari M, Eisenman LN, Covey DF, Mennerick S, Zorumski CF (2010) *The sticky issue of neurosteroids and GABA(A) receptors.* Trends Neurosci 33(7): 299-306

Cuevas ME, Haensgen H, Sepúlveda FJ, Zegers G, Roa J, Opazo C, Aguayo LG (2011) *Soluble Aβ(1-40) peptide increases excitatory neurotransmission and induces epileptiform activity in hippocampal neurons.* J Alzheimers Dis. 23(4):673-87

Dias R, Sheppard WF, Fradley RL, Garrett EM, Stanley JL, Tye SJ, Goodacre S, Lincoln RJ, Cook RM, Conley R, Hallett D, Humphries AC, Thompson SA, Wafford KA, Street LJ, Castro JL, Whiting PJ, Rosahi TW, Atack JR, McKernan RM, Dawson GR, Reynolds DS (2005) *Evidence for a significant role of alpha-3-containing GABAA receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines.* J Neurosci 25(46):10682-8

Facciolo RM, Crudo M, Giusi G, Canonaco M (2010) *GABAergic influences on ORX receptor-dependent abnormal motor behaviors and neurodegenerative events in fish.* *Toxicol Appl Pharmacol.* 243(1):77-86

Farrant M, Nusser Z (2005) *Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors.* *Nat Rev Neurosci.* 6(3):215-29

Ginterová P, Sokolová B, Ondra P, Znaleziona J, Petr J, Ševčík J, Maier V (2014) *Determination of mushroom toxins ibotenic acid, muscimol and muscarine by capillary electrophoresis coupled with electrospray tandem mass spectrometry.* *Talanta.* 125:242-7

Gaston MS, Schiöth HB, De Barioglio SR, Salvatierra NA (2015) *Gabaergic control of anxiety-like behavior, but not food intake, induced by ghrelin in the intermediate medial mesopallium of the neonatal chick.* *Horm Behav.* 67:66-72

Groves JO, Guscott MR, Hallett DJ, Rosahl TW, Pike A, Davies A, Wafford KA, Reynolds DS (2006) *The role of GABABeta2 subunit-containing receptors in mediating the anticonvulsant and sedative effects of loreclezole.* *Eur J Neurosci.* 24(1):167-74

Halliwel RF, Thomas P, Patten D, James CH, Martinez-Torres A, Miledi R, Smart TG (1999) *Subunit-selective modulation of GABAA receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid.* *Eur J Neurosci.* 11(8):2897-905

Hettema JM, Neale MC, Kendler KS (2001) *A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders.* *Am J Psychiatry.* 158(10):1568-78

Hettema JM, Prescott CA, Kendler KS (2001) *A population-based twin study of generalized anxiety disorder in men and women.* *J Nerv Ment Dis.* 189(7):413-20

Herd MB, Belelli D, Lambert JJ (2007) *Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors.* *Pharmacol Ther.* 116(1):20-34

Hill-Venning C, Belelli D, Peters JA, Lambert JJ (1997) *Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor.* *Br J Pharmacol.* 120(5):749-56

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

Ito T, Suzuki T, Wellman SE, Ho IK (1996) *Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABAA receptors and molecular aspects*. Life Sci 59(3):169-95

Jacobson-Pick S, Audet MC, McQuaid RJ, Kalvapalle R, Anisman H (2012) *Stressor exposure of male and female juvenile mice influences later responses to stressors: modulation of GABAA receptor subunit mRNA expression*. Neuroscience. 215:114-26

Johnstone TB, Hogenkamp DJ, Coyne L, Su J, Halliwell RF, Tran MB, Yoshimura RF, Li WY, Wang J, Gee KW (2004) *Modifying quinolone antibiotics yields new anxiolytics*. Nat Med. 10(1):31-2

Korpi ER, Gründer G, Lüddens H (2002) *Drug interactions at GABA(A) receptors*. Prog Neurobiol. 67(2):113-59

Langen B, Egerland U, Bernöster K, Dost R, Unverferth K, Rundfeldt C (2005) *Characterization in rats of the anxiolytic potential of ELB139 [1-(4-chlorophenyl)-4-piperidin-1-yl-1,5-dihydro-imidazol-2-on], a new agonist at the benzodiazepine binding site of the GABAA receptor*. J Pharmacol Exp Ther 314(2):717-24

López-Muñoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C (2005) *The history of barbiturates a century after their clinical introduction*. Neuropsychiatr Dis Threat. 1(4):329-43

Löscher W, Rogawski MA (2012) *How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates*. Epilepsia. 8:12-25

Lugoboni F, Mirijello A, Faccini M, Casari R, Cossari A, Musi G, Bissoli G, Quaglio G, Addolorato G (2014) *Quality of life in a cohort of high-dose benzodiazepine dependent patients*. Drug Alcohol Depend. 142:105-9

Lüscher B, Keller CA (2004) *Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses*. Pharmacol Ther. 102(3):195-221

Lüscher BP, Baur R, Goeldner M, Sigel E (2012) *Influence of GABA(A) receptor α subunit isoforms on the benzodiazepine binding site.* PLoS One. 7(7):e42101

Macdonald RL, Olsen RW (1994) *GABAA receptor channels.* Annu Rev Neurosci. 17:569-602

Mascia MP, Ledda G, Orrù A, Marongiu A, Loriga G, Maciocco E, Biggio G, Ruiu S (2014) *Differential modulation of GABA(A) receptor function by aryl pyrazoles.* Eur J Pharmacol. 15;733:1-6

Mortensen M, Patel B, Smart TG (2012) *GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones.* Front Cell Neurosci. 20;6:1

Mortensen M, Ebert B, Wafford K, Smart TG (2010) *Distinct activities of GABA agonists at synaptic- and extrasynaptic-type GABAA receptors.* J Physiol. 588(Pt 8):1251-68

Oakley S, Vedula LS, Bu W, Meng QC, Xi J, Liu R, Eckenhoff RG, Loll PJ (2012) *Recognition of anesthetic barbiturates by a protein binding site: a high resolution structural analysis.* PLoS One. 7(2):e32070

Olsen RW (2014) *Analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes using isosteric and allosteric ligands.* Neurochem Res. 39(10):1924-41

Olsen RW, Sieghart W (2008) *International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update.* Pharmacol. Rev. 60(3):243-60

Olsen RW, Li GD (2011) *GABA(A) receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation.* Can J Anaesth. 58(2):206-15

Owens DF, Kriegstein AR (2002) *Is there more to GABA than synaptic inhibition?* Nat Rev Neurosci. 3(9):715-27

Padgett CL, Hanek AP, Lester HA, Dougherty DA, Lummis SC (2007) *Unnatural amino acid mutagenesis of the GABA(A) receptor binding site residues reveals a novel cation- π interaction between GABA and beta 2Tyr97.* J Neurosci. 27(4):886-92

Pavlov I, Walker MC (2013) *Tonic GABA(A) receptor-mediated signaling in temporal lobe epilepsy.* Neuropharmacology 69:55-61

Reddy DS (2011) *Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy.* Front Endocrinol (Lausanne) 2:38

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H (1999) *Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes.* Nature 401(6755):796-800

Reichel JM, Nissel S, Rogel-Salazar G, Mederer A, Käfer K, Bedenk BT, Martens H, Anders R, Grosche J, Michalski D, Härtig W, Wotjak CT (2015) *Distinct behavioral consequences of short-term and prolonged GABAergic depletion in prefrontal cortex and dorsal hippocampus.* Front Behav Neurosci. 8:452

Rudolph U, Knoflach F (2011) *Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes.* Nat Rev Drug Discov. 29;10(9):685-97

Rudolph U, Möhler H (2004) *Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 44:475-98

Raj D, Gulati S, Lodha R (2011) *Status epilepticus.* Indian J pediatr. 78(2):219-26

Sartori SB, Landgrad R, Singewald N (2011) *The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety.* Future Neurol. 6(4):531-571

Shi Y, Dong JW, Tang LN, Kang RX, Shi JG, Zhang JJ (2014) *N(6)-(3-methoxy-4-hydroxybenzyl) adenine riboside induces sedative and hypnotic effects via GAD enzyme activation in mice.* Pharmacol Biochem Behav. 126:146-51

Sieghart W (2015) *Structure and Pharmacology γ -Aminobutyric Acid_A Receptor Subtypes.* Pharmacological Reviews 47(2):181-234

Sigel E, Buhr A (1997) *The benzodiazepine binding site of GABAA receptors.* Trends Pharmacol Sci. 18(11):425-9

Stewart DS, Pierce DW, Hotta M, Stern AT, Forman SA (2014) *Mutations at beta N265 in γ -aminobutyric acid type A receptors alter both binding affinity and efficacy of potent anesthetics.* PLoS One. 9(10):e111470

Tasan RO, Bukovac A, Peterschmitt YN, Sartori SB, Landgraf R, Singewald N, Sperk G (2011) *Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety.* Neuroscience 183:71-80

Trifonov S, Yamashita Y, Kase M, Maruyama M, Sugimoto T (2014) *Glutamic acid decarboxylase 1 alternative splicing isoforms: characterization, expression and quantification in the mouse brain.* BMC Neurosci 16;15:114

Uchida N (2014) *Bilingual neurons release glutamate and GABA.* Nat Neurosci. 17(11):1432-4

Ueno S, Bracamontes J, Zorumski C, Weiss DS, Steinbach JH (1997) *Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor.* J Neurosci 17(2):625-34

Vashchinkina E, Panhelainen A, Aitta-Aho T, Korpi ER (2014) *GABAA receptor drugs and neuronal plasticity in reward and aversion: focus on the ventral tegmental area.* Front Pharmacol. 5:256

Wang CY, Li JR, Xia QP, Wu XL, Gao HB (2014) *Influence of exogenous gamma-aminobutyric acid (GABA) on GABA metabolism and amino acid contents in roots of melon seedling under hypoxia stress.* Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 25(7):2011-8

Walls AB, Waagepetersen HS, Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U (2015) *The Glutamine-Glutamate/GABA-Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism.* Neurochem Res. 40(2):402-9

Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Whiting PJ (1994) *The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the beta 2 and beta 3 subunit.* Proc Natl Acad Sci U S A. 91(10):4569-73

2.6 CURRICULUM VITAE

persönliche Daten

Name: ALBABA Yazid
Geburtsdatum: 21.January 1990
Geburtsort: Vienna
Staatsbürgerschaft: Austria

Ausbildung

1996 - 2000 Volksschule Vorgartenstrasse 210
2000 - 2008 Sigmund Freud Bundesrealgymnasium Wohlmutstraße 3
2008 - 2015 Diplomstudium Pharmazie Hauptuniversität Wien

relevante Berufserfahrungen

2013 - 2015 Allerheiligen Apotheke Herbert Baldia KG