

**Assemblierung und Stöchiometrie von
GABA_A-Rezeptoren: Bedeutung
einzelner Untereinheiten in einem
pentameren Komplex**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und
Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

vorgelegt von

Christian Sattler

geb. 14.09.1983 in Erfurt

Mainz, 2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Februar 2011 bis März 2015 unter Betreuung von Prof. Dr. H. L. im Molekulabiologischen Labor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Mainz angefertigt (D77).

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	10
Danksagung	11
1 Einleitung	12
1.1 Liganden gesteuerte Ionenkanäle (LGIC)	13
1.1.1 Cys-Loop-Rezeptoren.....	13
1.2 Heterogenität der GABA _A -Rezeptoruntereinheiten	14
1.3 Pharmakologie der GABA _A -Rezeptoren	15
1.3.1 GABA-Bindestelle	16
1.3.2 Benzodiazepine.....	17
1.3.3 Anästhetika	18
1.3.4 Furosemid	20
1.3.5 δ -enthaltende GABA _A -Rezeptoren.....	20
1.4 Konkatamerstrategie.....	21
1.4.1 Konkatamere GABA _A -Rezeptoren.....	23
1.4.2 Konkatamere weiterer Ionenkanäle	24
2 Ziele.....	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Material.....	27
3.2 Molekularbiologie	37
3.2.1 Restriktion von Nukleinsäuren	37
3.2.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren	37
3.2.3 Agarose Gelelektrophorese	38
3.2.4 Isolierung von DNA	38
3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
3.2.6 PCR.....	39
3.2.7 Ligation.....	40
3.2.8 Sequenzierung	40
3.2.9 DNA Präparationen	40
3.2.9.1 Plasmid DNA Miniprep zum Austesten von Kolonien	40
3.2.9.2 Plasmid DNA Miniprep zur Gewinnung reiner DNA.....	41
3.2.9.3 Plasmid DNA Midi- und Maxiprep	41
3.2.9.4 Plasmid DNA Maxiprep über einen CsCl-Gradienten	42

3.2.10 RNA-Synthese	43
3.3 Mikrobiologische Arbeiten.....	44
3.3.1 Kompetente Zellen	44
3.3.2 Transformation	44
3.4 Zellkultur	44
3.4.1 HEK293T	44
3.4.1.1 Auftauen von HEK293T-Zellen	45
3.4.1.2 Kultivieren von HEK293T-Zellen.....	45
3.4.1.3 Transfektion von HEK293T-Zellen	45
3.4.2 Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	46
3.4.2.1 Haltung und Präparation der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	46
3.4.2.2 Injektion der RNA zur Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	47
3.5 Proteinbiochemie	47
3.5.1 Membranproteine solubilisieren	47
3.5.2 Aufreinigung von membranständigen Proteinen mittels Biotinylierung.....	47
3.5.3 SDS-Gelelektrophorese	48
3.5.4 Western Blot.....	49
3.6 Elektrophysiologie.....	49
3.6.1 Patch-Clamp-Messungen an in HEK293T-Zellen exprimierten GABA _A - Rezeptoren.....	49
3.6.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme zur Charakterisierung von in <i>Xenopus</i> <i>laevis</i> Oozyten exprimierten GABA _A -Rezeptoren	52
3.7 Präparative Chemie	53
3.8 Datenanalyse und Statistik	53
4 Ergebnisse	54
4.1 GABA- und Pentobarbitalsensitivitäten der GABA _A -Rezeptoren	54
4.1.1 GABA-Dosiswirkungskurven	54
4.1.2 Pentobarbital-Dosiswirkungskurven	56
4.2 Auf DS1/2 basierende Liganden als potentielle δ -selektive Modulatoren	59
4.2.1 Screening von DS1/2 Derivaten mithilfe von $\alpha 6\beta 3\delta$ als Target.....	59
4.2.2 Evaluierung von DS1 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren.....	63
4.2.3 Evaluierung von DS2 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren.....	65
4.2.4 Evaluierung von SJ4T an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren	67
4.2.5 Evaluierung von SJ33 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren.....	68
4.3 E033-00233 als $\beta 2$ -selektiven Liganden	69
4.3.1 Testung von E033-00233 an δ -enthaltenden Rezeptoren.....	69
4.3.2 Untersuchung von Punktmutanten zum Mechanismus der $\beta 2$ - Selektivität von E033-00233	71
4.4 Charakterisierung von ($\beta\alpha$)-Dimeren.....	72
4.4.1 Western Blot.....	73

4.4.2	GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren	74
4.4.3	Modulation ($\beta\alpha$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine	75
4.5	Charakterisierung von ($\alpha\beta$)-Dimeren	75
4.5.1	Western-Blot.....	76
4.5.2	GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren	76
4.5.3	Modulation ($\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine	77
4.6	Charakterisierung von ($\beta\alpha\beta$)-Trimeren.....	78
4.6.1	Western Blot.....	79
4.6.2	GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren	80
4.6.2.1	GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen.....	80
4.6.2.2	GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen	82
4.6.3	Modulatoren	84
4.6.3.1	Modulation ($\beta\beta\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine	84
4.6.3.2	Inhibition ($\beta\beta\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Furosemid	84
4.6.3.3	Modulation und Aktivierung ($\beta\beta\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Etomidat	85
4.6.3.4	Modulation ($\beta\beta\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Loreclezol.....	86
4.7	Charakterisierung von ($\alpha\gamma\beta$)-Trimeren	87
4.7.1	Western Blot.....	87
4.7.2	GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta\gamma$)- und ($\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren.....	88
4.7.2.1	GABA _A -Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen in der Konfiguration ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$).....	88
4.7.2.2	GABA _A -Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen in der Konfiguration ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$)	92
4.7.3	Modulatoren	92
4.7.3.1	Modulation ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine	93
4.7.3.2	Modulation ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch E033-00233	93
4.7.3.3	Inhibition ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Furosemid.....	94
4.8	Charakterisierung von ($\beta\alpha\gamma$)-Trimeren	95
4.8.1	Western Blot.....	95
4.8.2	GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\gamma$)- und ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren.....	96
4.9	Charakterisierung von ($\alpha\beta\alpha$)-Trimeren	97
4.9.1	Western Blot.....	98
4.9.2	GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren	99
4.9.3	Modulatoren	100
4.9.3.1	Modulation ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine.....	100
4.9.3.2	Inhibition ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender Rezeptoren durch Furosemid	102
4.10	Rezeptorassamblierungen aus γ 2-enthaltenden Dimeren mit (α 1 β 2)- Dimeren	102

4.10.1 Western Blots	103
4.10.2 GABA-Pharmakologie $\gamma 2$ -enthaltender Dimere koexprimiert mit ($\alpha 1\beta 2$)-Dimeren.....	103
5 Diskussion.....	105
5.1 GABA- und Pentobarbitalpharmakologie transient transfizierter GABA _A - Rezeptoren in HEK293T-Zellen.....	106
5.2 DS1/2-Derivate als neue Liganden für GABA _A -Rezeptoren	108
5.3 E033-00233 als $\beta 2$ -selektiver Ligand.....	111
5.4 Konkatamere zur Assemblierung definierter GABA _A -Rezeptoren.....	112
5.4.1 Ist die Uhrzeigersinnregel zur Anordnung der Untereinheiten im Pentamer allgemeingültig?	114
5.4.2 Weitere Grenzen der Definierbarkeit der UE-Anordnung im Pentamer mit Hilfe von Konkatameren	116
5.4.3 Einschätzung der Anwendbarkeit von Konkatameren bei Rezeptoren unbekannter Architektur am Beispiel δ -enthaltender GABA _A -Rezeptoren	118
5.5 GABA _A -Rezeptoren mit einer Bindestelle für GABA	120
5.6 GABA _A -Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Untereinheiten in einem Pentamer	123
6 Zusammenfassung und Ausblick	125
Literaturverzeichnis	127
Eidesstattliche Versicherung	138
Lebenslauf.....	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: GABA-erges System	12
Abbildung 2: Cys-Loop Rezeptoren	14
Abbildung 3: Heterogenität GABA _A -Rezeptoruntereinheiten.....	15
Abbildung 4: GABA-Bindestelle.....	16
Abbildung 5: Bindestelle für Benzodiazepine	18
Abbildung 6: Anästhetika	19
Abbildung 7: Strukturformeln der Imidazopyridine DS1 und DS2.....	21
Abbildung 8: Konkatamerstrategie	22
Abbildung 9: Linkerkonstruktion	23
Abbildung 10: Ersatzschaltbild Patch-Clamp.....	50
Abbildung 11: Messstand Patch-Clamp-Setup	51
Abbildung 12: Rezeptorassemblys aus individuellen Untereinheiten.....	54
Abbildung 13: GABA-Sensitivitäten ausgewählter Subtypen.....	56
Abbildung 14: Pentobarbital-Sensitivitäten ausgewählter Subtypen.....	58
Abbildung 15: GABA-Effizienz diverser Subtypen	59
Abbildung 16: Konkurrenz SJ4T.....	62
Abbildung 17: DS1-Modulation an $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren	64
Abbildung 18: Direkte Aktivierung durch DS1	65
Abbildung 19: DS2-Modulation an $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren	65
Abbildung 20: Direkte Aktivierung durch DS2.....	66
Abbildung 21: Direkte Aktivierung durch SJ4T.....	67
Abbildung 22: Direkte Aktivierung durch SJ33	69
Abbildung 23: Modulation δ -enthaltender GABA _A -Rezeptoren durch E033-00233	70
Abbildung 24: Direkte Aktivierung δ -enthaltender GABA _A -Rezeptoren durch E033-00233	71
Abbildung 25: Dosiswirkungskurven Modulation E033-00233.....	71
Abbildung 26: Rezeptoren mit einem ($\beta 3\alpha 1$)-Konkatamer.....	73
Abbildung 27: Western Blots ($\beta\alpha$)-Dimer.....	73
Abbildung 28: Modulation Benzodiazepine von ($\beta\alpha$) $\gamma 2$ -Rezeptoren	75
Abbildung 29: Rezeptoren mit einem ($\alpha 1\beta 3$)-Konkatamer.....	76
Abbildung 30: Modulation Benzodiazepine von ($\alpha\beta$) $\gamma 2$ -Rezeptoren	78
Abbildung 31: Rezeptoren mit einem ($\beta 3\alpha 1\beta 3$)-Konkatamer	78
Abbildung 32: Western Blot ($\beta\alpha\beta$)-Trimer	79
Abbildung 33: Western Blots dualer $\gamma 2$ -Konkatamere und ($\beta\alpha\beta$)-Trimer	80
Abbildung 34: Modulation durch Benzodiazepine ($\beta 3\alpha\beta 3$ -enthaltender Rezeptoren ..	84
Abbildung 35 Furosemidinhibition benötigt nur eine $\alpha 4$ -Untereinheit im Pentamer....	85
Abbildung 36 Etomidat zum Nachweis der $\beta 3$ -UE im Pentamer	86
Abbildung 37 Modulation durch 2 μ M Loreclezol.....	86
Abbildung 38: Rezeptoren mit einem ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)- und ($\alpha 1\beta 3$)-Konkatamer	87
Abbildung 39: Western Blots ($\alpha\gamma 2\beta$)-Trimer und ($\alpha\beta$)-Dimer	88

Abbildung 40: Stromdichten $\alpha 1$ -enthaltender Rezeptoren.....	89
Abbildung 41: GABA-Pharmakologie ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)– und ($\alpha 1\beta 3$)–enthaltender GABA _A -Rezeptoren mit selektiv mutierten GABA-Bindestellen	90
Abbildung 42: Modulation durch Diazepam zum Nachweis der $\alpha 1$ –UE in direkter Nachbarschaft zu der $\gamma 2$ –UE	93
Abbildung 43: Modulation durch Bretazenil zum Nachweis der $\alpha 6$ –UE in direkter Nachbarschaft zu der $\gamma 2$ –UE	93
Abbildung 44 Modulation E033-00233	94
Abbildung 45: Furosemidinhibition zum Nachweis der $\alpha 6$ -UE.....	94
Abbildung 46: Rezeptoren mit einem ($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)– und ($\beta 3\alpha 1$)–Konkatamer	95
Abbildung 47 : Western Blot ($\beta 3\alpha \gamma 2$)–Konkatamere	95
Abbildung 48: GABA-Pharmakologie ($\beta 3\alpha 6\gamma 2$)– und ($\beta 3\alpha 6$)–enthaltender GABA _A -Rezeptoren mit selektiv mutierten GABA-Bindestellen	97
Abbildung 49: Rezeptoren mit einem ($\alpha 1\beta 3\alpha 1$)– Konkatamer.	98
Abbildung 50 : Western Blots ($\alpha \beta 3\alpha$)–Trimere und dualer $\gamma 2$ -Konstrukte	98
Abbildung 51: Modulation von ($\alpha \beta \alpha$) + $\beta 3\gamma 2$ –Rezeptoren durch Benzodiazepine.....	100
Abbildung 52: Modulation von ($\alpha \beta \alpha$) + $\beta 3\gamma 2$ –Rezeptoren durch Flurazepam	101
Abbildung 53: Modulation von ($\alpha \beta \alpha$) + ($\gamma 2\beta 3$)/($\beta 3\gamma 2$)	101
Abbildung 54: Furosemidinhibition ($\alpha \beta \alpha$)–enthaltender Rezeptoren	102
Abbildung 55: Western Blots dualer $\gamma 2$ -Konstrukte.	103
Abbildung 56: Uhrzeigersinnregel.....	115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen.....	10
Tabelle 2: Verwendete Antikörper	27
Tabelle 3: Verwendete Kits	27
Tabelle 4: Stammlösungen der eingesetzten Liganden.....	28
Tabelle 5: Chemikalien	28
Tabelle 6: Verwendete Puffer	30
Tabelle 7: Primer	31
Tabelle 8: Geräte.....	33
Tabelle 9: Gebrauchsmaterialien	34
Tabelle 10: Software	34
Tabelle 11: Verwendete Vektoren aus dem Laborbestand	34
Tabelle 12: Selbst erstellte oder unter Anleitung* erstellte Punktmutanten	35
Tabelle 13: Selbst erstellte oder unter Anleitung* erstellte Konkatamere	35
Tabelle 14: Komponenten PCR	39
Tabelle 15: Reaktionsbedingungen PCR	39
Tabelle 16: Komponenten RNA-Synthese.	43

Tabelle 17: cDNA-Mengen für die Transfektionen.....	45
Tabelle 18: Komponenten Transfektionsansatz.....	46
Tabelle 19: Komponenten SDS-Gel	48
Tabelle 20: Übersicht GABA-Pharmakologie GABA _A -Rezeptoren exprimiert aus individuellen UE	55
Tabelle 21: Pentobarbital-Pharmakologie GABA _A -Rezeptoren exprimiert aus individuellen UE	56
Tabelle 22: Screening Modulation DS-Derivate an $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren.....	60
Tabelle 23: Evaluierung von DS1 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren.....	63
Tabelle 24: Evaluierung von DS2 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren.....	66
Tabelle 25: Evaluierung von SJ4T an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren.....	67
Tabelle 26: Evaluierung von SJ33 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren	68
Tabelle 27 Modulation δ -enthaltender GABA _A -Rezeptoren durch E033-00233	70
Tabelle 28 Modulation $\gamma 2$ -enthaltender GABA _A -Rezeptoren durch E033-00233	72
Tabelle 29: GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren	74
Tabelle 30: GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren	77
Tabelle 31: GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen	81
Tabelle 32 : GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A -Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen	83
Tabelle 33: GABA-Pharmakologie ($\alpha\gamma 2\beta$)- und ($\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A - Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen.....	90
Tabelle 34 : GABA-Pharmakologie ($\alpha\gamma 2\beta$)- und ($\alpha\beta$)-enthaltender GABA _A - Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen.....	92
Tabelle 35: GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\gamma 2$)- und ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA _A - Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen.....	96
Tabelle 36: GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta\alpha$)- enthaltender GABA _A -Rezeptoren.....	99
Tabelle 37: GABA-Pharmakologie $\gamma 2$ -enthaltender Dimeren mit ($\alpha 1\beta 2$)-Dimeren..	103
Tabelle 38: Übersicht GABA-Sensitivitäten von Rezeptoren mit mutierten GABA- Bindestellen.....	121
Tabelle 39: Vergleich GABA _A -Rezeptoren mit $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten	123

Abkürzungsverzeichnis

Es wurde sich an Publikationsrichtlinien des Fachjournals JBC orientiert, so dass die dort erwähnten Abkürzungen der Abkürzungsliste hier nicht aufgeführt wurden. Nicht genannte Abkürzungen sind im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 1: Abkürzungen

5-HT ₃ R	5-Hydroxytryptamin ₃ -Rezeptor/en
AS	Aminosäure/n
Bret	Bretazenil
BZ	Benzodiazepine
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabdits elegans</i>
Diaz	Diazepam
DV	Differentialverstärker
DS	deltaselektiv
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
Flura	Flurazepam
GABA _A -R	GABA _A -Rezeptoren
HBS	Hepes gepufferte Saline
KCC2	K-Cl-Kotransporter
Maxiprep	Plasmidpräparation im größerem Maßstab
Midiprep	Plasmidpräparation im mittlerem Maßstab
Miniprep	Plasmidpräparation im kleinem Maßstab
MW	Mittelwert
NKCC1(2)	Na-K-2Cl-Kotransporter
OPV	Operationsverstärker
PB	Pentobarbital
Pgp	P-Glykoprotein
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
THDOC	Tetrahydrodeoxycorticosteron
THIP	4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol
TM	Transmembrandomäne/n
UE	Untereinheit/en

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in der Promotionsphase und beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. L., der mir eine vielseitige Doktorarbeit ermöglichte und für die Freiheit und das Vertrauen eigenen Ideen nachgehen zu können. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. G. vom Fachbereich Chemie für die Betreuung der Promotion.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors Lüddens und des biochemischen Labors Endres. Insbesondere danke ich B. D. für die sehr verlässliche und umfangreiche Unterstützung bei den elektrophysiologischen Messungen sowie M. K. bei der Hilfe der Western Blots. Ebenso hervorheben möchte ich die Hilfe von Frau J. R. bei der Unterstützung in allen administrativen Notwendigkeiten.

Während der Auslandsaufenthalte in Helsinki und Uppsala durfte ich eine lehrreiche und anregende Zeit mit sehr hilfsbereiten Kollegen verbringen. Vielen Dank für das Ermöglichten gilt daher Prof. Dr. E. K. und Prof. Dr. B. B.. Ohne das Engagement von Dr. T. M. und S. M. wäre ich mit leeren Händen nach Hause gefahren. Kiitos!

In Mainz möchte ich mich bei den Kooperationspartnern aus der Chemie bedanken. Vielen Dank für die Mitarbeit am Projekt möchte ich daher Prof. Dr. F. R., Prof. Dr. T. S. und Dr. M. P. aussprechen. Besonders danken möchte ich S. J. und J. W. für die Synthese neuer Liganden und die Zusammenarbeit während ihrer Diplomarbeiten.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, möchte ich für das Vertrauen und die Unterstützung während meines Studiums und der Promotion danken.

Ganz besonderen Dank gebührt meiner Frau und meinem Sohn für ihre Aufmunterungen, ihren Frohsinn und ihre Unterstützung trotz vielen Verzichts während der Doktorarbeit.

1 Einleitung

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist als Transmitter an vielfältigen Funktionen im Organismus beteiligt. Zum einen ist GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im adulten Nervensystem der Vertebraten und wird von etwa 30 % der Synapsen benutzt (Sieghart und Sperk 2002). Zum andern spielt GABA auch in der Peripherie als Botenstoff z.B. im Immunsystem oder der Bauchspeicheldrüse eine Rolle (Jin et al. 2013; Jin et al. 2013). Im adulten Gehirn stellt GABA, dessen Wirkungen über ionotrope $GABA_A$ - sowie $GABA_C$ - und metabotrope $GABA_B$ -Rezeptoren vermittelt werden, das Gegenstück zu dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat dar. In der frühen Entwicklung sowie in der Pubertät kann GABA über $GABA_A$ -Rezeptoren, welche permeabel für Chloridionen sind, auch exzitatorisch wirken (Shen et al. 2010). Ob die Aktivierung von $GABA_A$ -Rezeptoren zu einem Chloridioneneinstrom und damit zu einer inhibitorisch wirkenden Hyperpolarisation oder zu einem depolarisierenden Cl^- -Ausstrom der Zelle führt, wird durch den Cl^- -Gradienten determiniert. Dieser wird durch die beiden Transporter NKCC1, welcher 1 Na^+ -, 1 K^+ - und 2 Cl^- -Ionen in die Zelle transportiert und in unreifen Neuronen hochreguliert ist, und KCC2, der 1 K^+ - und 1 Cl^- -Ion aus der Zelle herauspumpt und mit zunehmender Entwicklung stärker exprimiert wird, reguliert (Ben-Ari 2012).

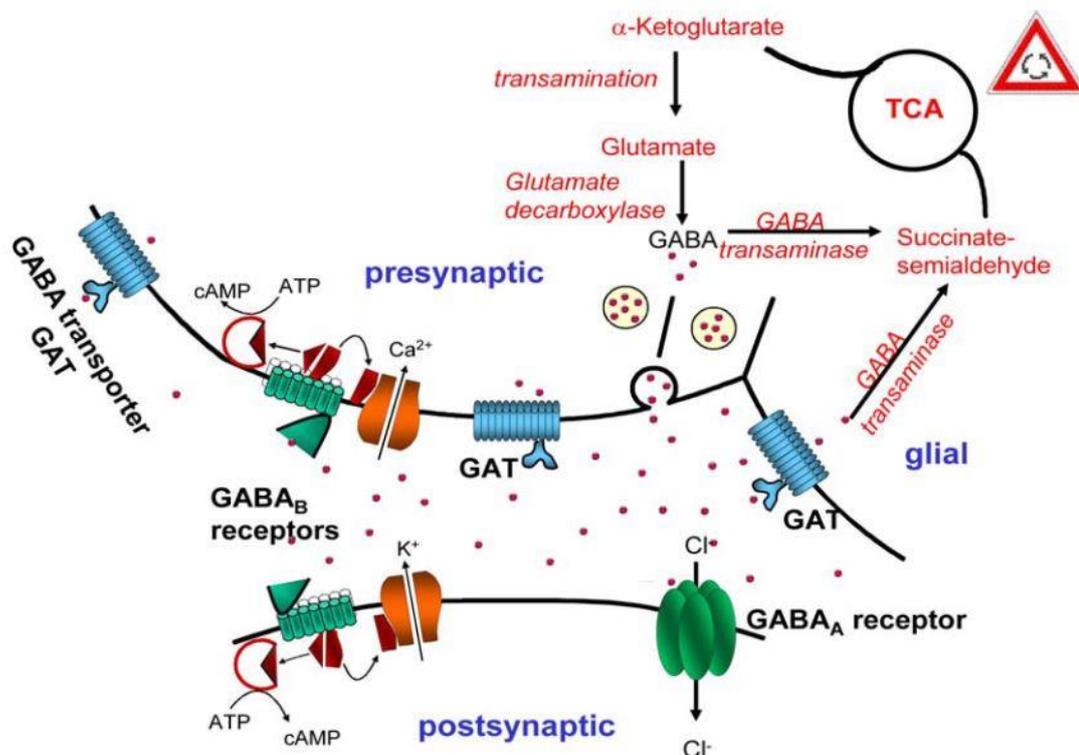


Abbildung 1: GABA-erges System Schematische Darstellung des synaptisches Spaltes (nach Böhme und Lüddens 2001)

Im Cytoplasma der präsynaptischen Zelle oder in Gliazellen wird GABA durch das Enzym Glutamat-Decarboxylase aus Glutamat synthetisiert und die Freisetzung kann in den synaptischen Spalt, wie auch in anderen Regionen von Nervenzellen erfolgen (Lee et al. 2010). Von den Zellen durch GABA-Transporter (GAT) wieder aufgenommenes GABA kann durch eine Transaminase zu Succinat-Semialdehyd umgesetzt werden, wobei aus α -Ketoglutarat wieder Glutamat entsteht (Abb.1).

1.1 Liganden gesteuerte Ionenkanäle (LGIC)

Im Gegensatz zu metabotropen Rezeptoren wie den G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind Liganden gekoppelte Ionenkanäle zur sehr schnellen Signalweiterleitung im Bereich von wenigen Millisekunden geeignet. Zu den wichtigsten Superfamilien gehören die trimeren Purin-Rezeptoren, die tetrameren Glutamat-Rezeptoren sowie die pentameren Cys-Loop-Rezeptoren (Collingridge et al. 2009).

1.1.1 Cys-Loop-Rezeptoren

Den Cys-Loop-Rezeptoren zugehörig sind die in dieser Arbeit untersuchten GABA_A-Rezeptoren. Weiterhin zählen die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR), die Serotonin-Rezeptoren des Subtyps 5HT₃-R und die Glycin-Rezeptoren zu dieser Superfamilie. Allen gemein ist der namensgebende Cys-Loop, welcher zwischen zwei dreizehn Aminosäuren auseinander liegenden Cysteinen im ca. 200 AS großen extrazellulären N-terminalen Bereich gebildet wird (Abb. 2 A). Jede Untereinheit besitzt vier α -helikale Transmembrandomänen, wovon jeweils die zweite an der Porenbildung beteiligt ist (Abb. 2 A&B). Zwischen der dritten und vierten TM befindet sich eine große intrazelluläre Schleife, welche bei der Rezeptorassemblierung und bei der Interaktion mit Adapterproteinen wie z.B. Gephyrin bei GABA_A- und Glycin-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielt (Tretter 2012).

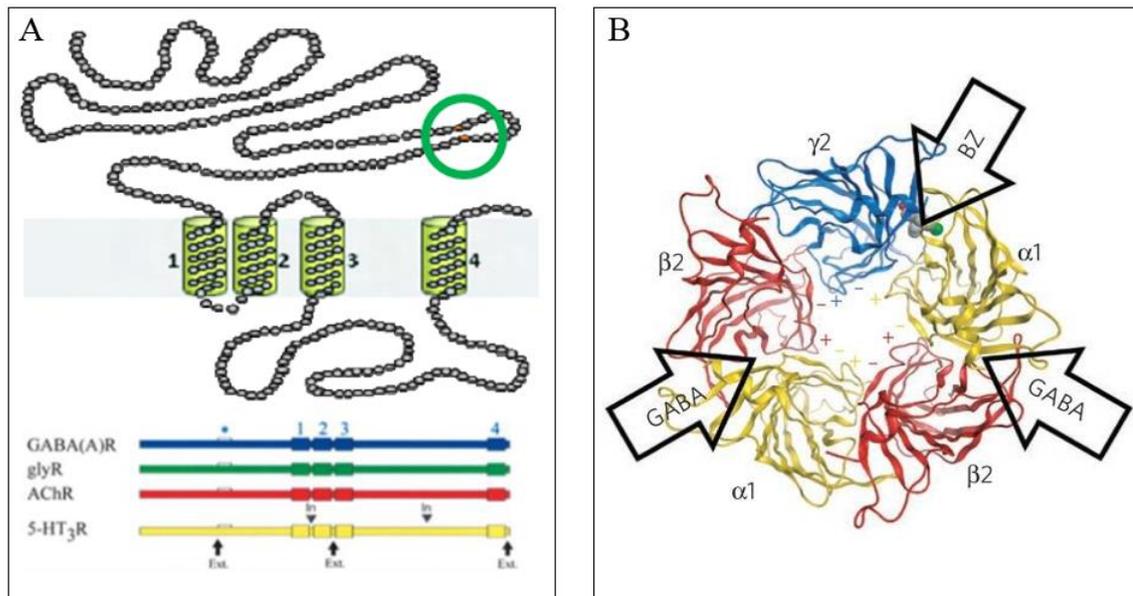


Abbildung 2: Cys-Loop Rezeptoren A: Topologie einer Rezeptoruntereinheit mit den Transmembrandomänen 1-4 (Kästen in der Primärsequenz unten), Cys-Loop (grüner Kreis oder Stern in der Primärsequenz), sowie schematisches Sequenzalignement Cys-Loop-Rezeptoruntereinheiten (oben: nach Gurba 2010; unten: nach Connolly und Wafford 2004) **B:** Modell der Quartärstruktur des GABA_A-Rezeptors von oben mit den Bindestellen für GABA und Benzodiazepine (nach Richter 2012)

Mit der Kristallisation des Acetylcholinbindepoteins, des Glutamat-gesteuerten Chloridkanals (GluCl) aus *C.Elegans* und des prokaryotischen LGICs (ELIC) und der folgenden Röntgenkristallanalyse konnten Modelle entwickelt werden, die eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zwischen den Mitgliedern der Superfamilie aufzeigen (Bergmann et al. 2013). So ist es zum Beispiel möglich, dass ohne hochauflösende Struktur der GABA_A-Rezeptoren die Bindestellen für GABA und die Benzodiazepine modelliert werden können. Dies kann somit zur Entwicklung neuer Liganden beitragen.

1.2 Heterogenität der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten

Bis heute sind für die GABA_A-Rezeptoren 19 verschiedene Untereinheiten beschrieben. Diese werden aufgrund ihrer Sequenzidentitäten in 8 verschiedene Klassen unterteilt. Dies sind: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π , $\rho 1-3$ (Abb. 3, Hevers und Lüddens 1998). Erweitert wird das Spektrum durch Splicevarianten der Untereinheiten $\alpha 6$, $\beta 2$ und $\gamma 2$ (Korpi et al. 2002). Durch die große Vielfalt der Untereinheiten ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Rezeptorkombinationen mit unterschiedlichen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften, so dass das Rezeptorrepertoire einer Zelle, einer Gehirnregion oder eines Entwicklungszustands auf die jeweilige Funktion abgestimmt werden kann.

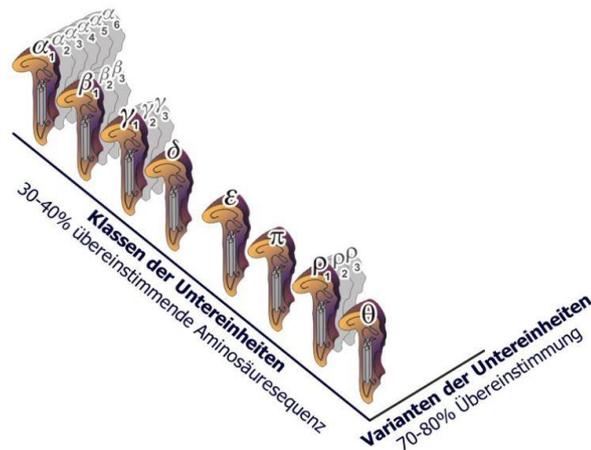


Abbildung 3: Heterogenität GABA_A-Rezeptoruntereinheiten (nach Hevers und Lüddens 1998)

$\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren stellen mit ~40% den größten Anteil der GABA_A-Rezeptoren im Gehirn. Die Untereinheiten sind in der Sequenz γ - β - α - β - α , gelesen gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus gesehen, assembliert (Baumann et al. 2002). Dieser Subtyp kommt im Wesentlichen synaptisch vor und ist somit für eine schnelle phasische Inhibition verantwortlich. Tonische Inhibition wird hingegen durch extrasynaptische Rezeptoren vermittelt, diese enthalten oft die δ -Untereinheit (Farrant und Nusser 2005). Mit der δ -Untereinheit sind hauptsächlich die $\alpha 6$ - (Körnerzellen des Cerebellums) $\alpha 4$ - (Thalamus, Hippocampus und Neostriatum) und $\alpha 1$ - (Dentate Gyrus des Hippocampus) Untereinheit zusammen mit einer β -Untereinheit assembliert (Hörtnagl et al. 2013; Wei et al. 2003 und 2004). Vereinfachend wird der Aufbau analog zu den $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren betrachtet, wobei die $\gamma 2$ -Untereinheit lediglich durch eine δ -Untereinheit ersetzt wird (Baumann 2002). Jedoch setzt sich zunehmend die Idee durch, dass die δ -Untereinheit mehrere Positionen im Pentamer einnehmen kann (Kaur et al. 2009; Eaton et al. 2014), was zur Folge hätte, dass sich die Anzahl möglicher Assemblierungen erhöht. Unterstützt wird die Idee von der Beobachtung, dass in Abhängigkeit der Ratios der für die Untereinheiten codierender DNA in Transfektionsexperimenten bei δ -enthaltenden Rezeptoren unterschiedliche Rezeptoreigenschaften gemessen werden (Hadley und Amin 2007). Der genaue Aufbau dieser Rezeptoren kann somit als offen betrachtet werden.

1.3 Pharmakologie der GABA_A-Rezeptoren

Die Bedeutung des GABAergen Systems in der Physiologie und Pathophysiologie hat ein großes Interesse an dessen pharmakologischer Modulation zur Folge gehabt, noch bevor die GABA_A-Rezeptoren überhaupt kloniert wurden. Die Klonierungen der einzelnen Untereinheiten intensivierten die Suche nach subtypspezifischen Liganden (Schofield et al. 1987; Levitan et al. 1988; Khrestchatsky et al. 1989; Pritchett et al. 1989; Shivers et al.

1989; Ymer et al. 1989). Mit zunehmenden Kenntnissen über die molekularen Strukturen beispielsweise durch Homologiemodelle von kristallisierten Acetylcholinrezeptoren konnten immer mehr Einsichten in die molekularen Funktionen gewonnen werden. Man kann daher heute die Mechanismen der Liganden auf der Ebene von für die Liganden selektiven Untereinheiten, Nachbarschaften von Untereinheiten oder gar auf der Ebene von einzelnen Aminosäuren diskutieren (Bergmann et al. 2013).

1.3.1 GABA-Bindestelle

Die für GABA_A-Rezeptoren wahrscheinlich am besten untersuchte Bindestelle ist die Bindestelle für den rezeptornamensgebenden und endogenen Liganden GABA selbst. Weitere Liganden wie die Agonisten Muscimol und THIP (Abb. 4 B) und Antagonisten wie Gabazin und Bicucullin binden daran. Es konnte eine Vielzahl von Aminosäuren in der α - und der β -Untereinheit identifiziert werden, welche die Bindung und Funktion von GABA beeinflussen. Sehr früh wurde z.B. in elektrophysiologischen Versuchen das Phenylalanin in der Position 64 der α 1-Untereinheit als Parameter für die GABA-Sensitivität gefunden (Sigel et al. 1992). Durch eine Markierung von photoaktivierten radioaktiv markierten Muscimol an der gleichen Position konnten G.B. Smith und R. W. Olsen (1994) bestätigen, dass sie an der Bindestelle beteiligt ist. Weiterhin konnten in der β 2-Untereinheit in zwei unterschiedlichen Domänen die Aminosäure Tyrosin in den Positionen 157 und 205 als wichtig für die GABA-Sensitivität herausgearbeitet werden (Amin und Weiss 1993). Durch auf Kristallstrukturen basierende Modelle des Acetylcholinbindeproteins konnte gezeigt werden, dass sechs Proteinschleifen (Loop A-F), wovon A, B und C auf der β -Untereinheit und E, F und D auf der α -Untereinheit lokalisiert sind, die GABA- Bindestelle zwischen den benachbarten Untereinheiten bilden (Ernst et al. 2003) (Abb. 4 A).

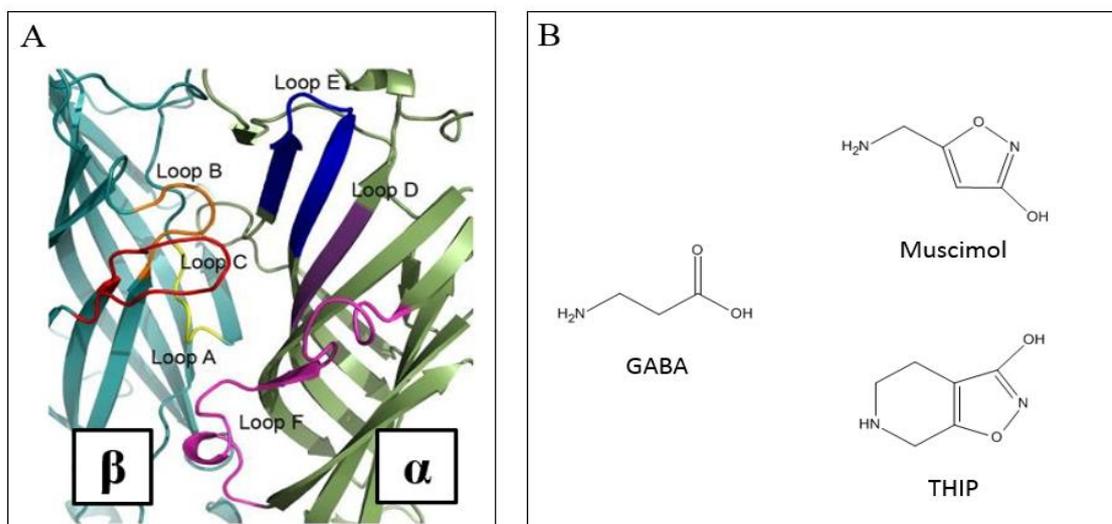


Abbildung 4: GABA-Bindestelle A: Dargestellt ist die putative Bindestelle für GABA zwischen der β - und α -UE, gebildet durch die Loops A, B, C (β +) und D, E, F (α -). (modifiziert nach Bergmann 2013) **B:** Strukturformeln typischer Liganden für die GABA-Bindestelle

Eine systematische Analyse der sechs Loops mit elektrophysiologischen Methoden und vor allem der Substituted Cystein Accessibility Method (SCAM) konnten Aminosäuren in allen Loops als bindestellenkonstituierend bestätigt werden. In der Bindetasche werden vor allem aromatische Seitenketten (F64 in der $\alpha 1$ -UE, Y97 in der $\beta 3$ -UE) für eine Kationen- Π -Wechselwirkung mit der protonierten Aminogruppe des GABA-Moleküls verantwortlich gemacht. Positiv geladene Arginine (R66, R131 in der $\alpha 1$ -UE, R207 in der $\beta 3$ -UE) wechselwirken wahrscheinlich mit der Carboxylatgruppe (Boileau et al. 1999; Wagner und Czajkowski 2001; Boileau et al. 2002; Newell und Czajkowski 2003; Newell et al. 2004; Kloda et al. 2007).

Die GABA-Pharmakologie weist eine hoch- und eine niederaffine Komponente auf. Die hochaffine wird im nanomolaren Bereich vor allem in Bindungsstudien teilweise mit tritierten Muscimol gemessen und beschreibt den Gleichgewichtszustand des geschlossenen Kanals im desensitisierten Zustand (Chang et al. 2002). Die niederaffine wird im mikromolaren Bereich in elektrophysiologischen Versuchen gemessen und beschreibt Kanalöffnungen im funktionellen Zustand. Es wird diskutiert, ob es sich dabei um ein und dieselbe Bindestelle in verschiedenen Zuständen handelt oder ob die Bindestellen räumlich voneinander getrennt sind (Baur und Sigel 2003). Ein interessanter Aspekt dabei ist, dass es nur geringe Unterschiede in der hohen Affinität in Abhängigkeit des Subtyps gibt, die niederaffine Komponente aber in drei Größenordnungen variiert (von 0,5 μM für $\alpha 6\beta 2\delta$ und bis 50 μM für $\alpha 3\beta 2\gamma 2$). Es konnte von Böhme et. al. 2004 gezeigt werden, dass die Sensitivität, welche die niederaffine Komponente beschreibt, durch ein Motiv von vier Aminosäuren determiniert wird, ohne dabei den hochaffinen Zustand zu beeinflussen.

1.3.2 Benzodiazepine

Eine zweite Bindestelle, für die hochaffine Liganden existieren, ist die Bindestelle für Benzodiazepine (Pritchett et al. 1989). Diese Bindestelle wird von Aminosäuren im N-terminalen Bereich der α - und der $\gamma 2$ -Untereinheiten gebildet, sie liegt also höchst wahrscheinlich zwischen der α - und der $\gamma 2$ -Untereinheit und zeigt deren Nachbarschaft in nur einer möglichen Orientierung an (Abb. 5 A). Interessant dabei ist, dass an der Bindetasche beteiligte Aminosäuren in der $\gamma 2$ -Untereinheit (z.B. F77) homolog zu Aminosäuren der Bindetasche für GABA in der α -Untereinheit (F64 in der $\alpha 1$) sind. Weiterhin sind Aminosäuren in der α -Untereinheit (F99 in der $\alpha 1$) homolog zu Aminosäuren der β -Untereinheit (Y97 in der $\beta 2$). Es wird daher diskutiert, dass die Bindestelle für Benzodiazepine homolog zu der GABA-Bindestelle ist (Bergmann et al. 2013).

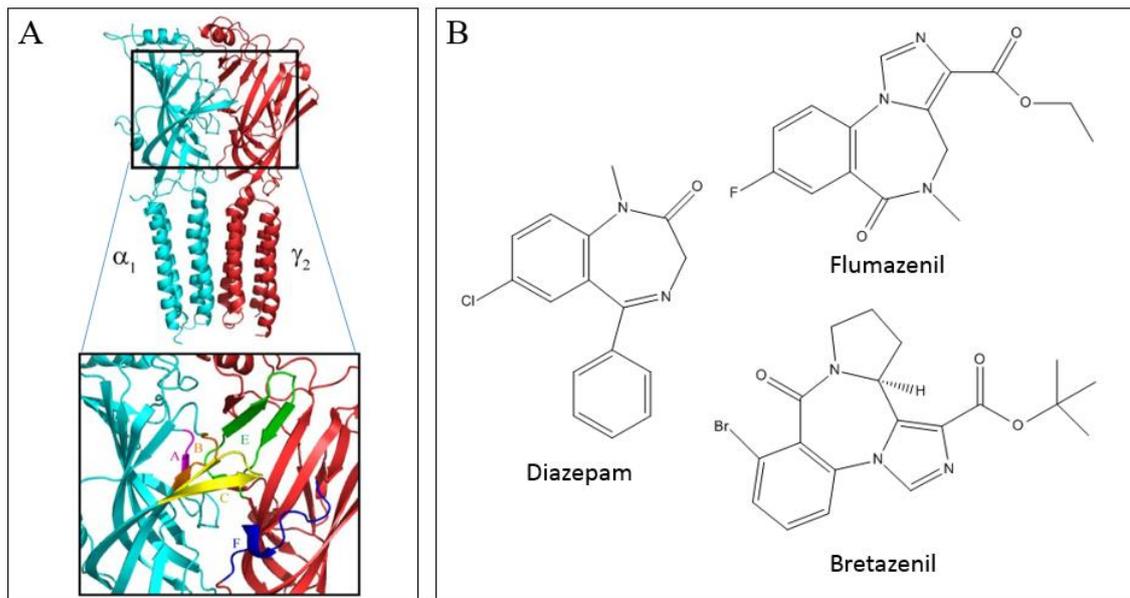


Abbildung 5: Bindestelle für Benzodiazepine A: Die extrazellulären Domänen der α - und γ -UE bilden die Bindetasche (oben), wobei die Loops A-F der UE vergrößert sind (unten). (modifiziert nach Morlock und Czajkowski 2011) **B:** Strukturformeln typischer Liganden für die Benzodiazepin-Bindestelle

Ein wichtiger Ligand für diese Bindestelle ist Diazepam (Abb. 5 B), welches an die klassischen α 1,2,3,5 benzodiazepinsensitiven GABA_A-Rezeptoren im nanomolaren Bereich bindet und an dessen GABA-induzierten Ströme allosterisch positiv moduliert. Die Eigenschaft, dass die α -Untereinheit die Benzodiazepinsensitivität beeinflusst, wird durch eine Aminosäure determiniert (H101 in α 1,2,3,5 und R100 in α 4,6) (Wieland et al. 1992). Bretazenil hingegen wirkt auch als Positivmodulator an den sonst benzodiazepininsensitiven GABA_A-Rezeptoren, die die α 4- und α 6-Untereinheit enthalten (Knoflach et al. 1996). Flumazenil ist ein Beispiel für einen Nullmodulator an den benzodiazepinsensitiven GABA_A-Rezeptoren und wirkt somit antagonistisch gegenüber Positivmodulatoren wie Diazepam oder Flunitrazepam. Im mikromolaren Bereich wirkt es aber auch positiv modulierend an den α 6-enthaltenden Rezeptoren (Sigel und Baur 2000).

1.3.3 Anästhetika

Neben den Benzodiazepinen spielen die Anästhetika eine wichtige klinische Rolle bei der Modulation GABAerger Signale. Historisch von Bedeutung sind vor allem die Barbiturate, wie z.B. Pentobarbital (Abb. 6 B). Diese wirken im unteren mikromolaren Bereich (Franks und Lieb 1994) zentral anästhesierend und wurden lange Zeit als Schlaf- und Beruhigungsmittel eingesetzt. Sie besitzen eine geringe Subtypspezifität und kennzeichnen sich durch eine in geringen Konzentrationen modulierende Wirkung GABA-induzierter Ströme und intrinsisch aktivierende Wirkung in hohen Konzentration aus (Thompson et al. 1996). Bei vermutlich klinisch nicht relevanten Konzentrationen wirken sie inhibitorisch auf GABA_A-Rezeptoren (Gingrich et al. 2009). Diese vielfältigen Wirkungen

Eine weitere, noch experimentelle Substanz ist E00233-033. Diese zeigt ebenfalls Parallelen, wie die modulierende, die intrinsisch aktivierende und in höheren Konzentrationen inhibierende Wirkung zu den beschriebenen Anästhetika auf. Außerdem kennzeichnet sich dieser Ligand durch eine präferierte Modulation $\beta 2$ - und $\alpha 1,2,6$ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren. Molekulare Details sind aber noch offen (unpubliziert Rabe).

1.3.4 Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid, welches den NKCC2 hemmt, wirkt auch bei bestimmten Subtypen der GABA_A-Rezeptoren inhibitorisch (Korpi et al 1995). Die Sensitivität hängt im Wesentlichen von der α -Untereinheit ab und ist bei $\alpha 6$ ($IC_{50} \sim 12 \mu M$), gefolgt von $\alpha 4$ ($IC_{50} \sim 200 \mu M$) am höchsten. Bei den restlichen α -Untereinheiten ist die Sensitivität im millimolaren Bereich (Thompson et al. 1999). Furosemid wird daher häufig in *in-situ* Studien verwendet, um $\alpha 6$ - oder $\alpha 4$ -enthaltende Rezeptoren funktionell nachzuweisen (Korpi et al 1999).

Weiterhin konnten Thompson et al. (1999) zeigen, dass ähnlich wie bei Etomidat und Loreclezol die höhere Sensitivität von $\beta 2/3$ - im Vergleich zu $\beta 1$ -enthaltenen Rezeptoren durch die Aminosäure in Position 265 vermittelt wird.

Die Autoren Sigel und Minier (2004) konnten in einer Studie, bei der die Konkatamerstrategie angewendet wurde, mit $\alpha 6$ - und $\alpha 1$ -Mischrezeptoren zeigen, dass eine $\alpha 6$ -Untereinheit im Pentamer ausreicht, um die gleiche Wirkung wie bei Rezeptoren mit zwei $\alpha 6$ -Untereinheiten zu erzielen.

1.3.5 δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren

Aufgrund der funktionellen Besonderheit, dass δ -enthaltende Rezeptoren ausschließlich extrasynaptisch vorkommen und tonische Inhibition vermitteln (Farrant und Nusser 2005) und u.a. im Zusammenhang mit Sucht, Epilepsie, und Gedächtnisbildung diskutiert werden (Brickley und Mody 2012), besteht ein großes Interesse selektive Liganden für diese Subtypen zu finden (Wafford et al. 2009). Bisher gibt es Substanzen, welche δ -enthaltende Rezeptoren als sogenannter Superagonist wie THIP, effizienter aktivieren als GABA (Mortensen et al. 2010) oder Neurosteroid wie THDOC, die sie effizienter modulieren als $\gamma 2$ -enthaltende Rezeptoren (Wohlfahrth et al. 2002). Ethanol wird als weiterer Ligand als δ -selektiv im millimolaren Bereich beschrieben (Sundstrom-Poro-maa 2002 et al.; Wallner et al. 2003). Diese Beobachtung wird aber in der Literatur sehr kontrovers diskutiert (Korpi et al. 2007). Es gibt daher noch keine etablierten hochaffinen Liganden, welche eine Bindestelle besetzen, die nur in δ -enthaltenden Rezeptoren vor-

kommt. Diese hätten neben der Möglichkeit zur selektiven Modulation Anwendungspotential als PET-Ligand, wo radioaktiv markierte Liganden zur Visualisierung im lebenden Organismus genutzt werden oder als immobilisierter Ligand an einer Säulenmatrix zur Aufreinigung dieser Rezeptoren.

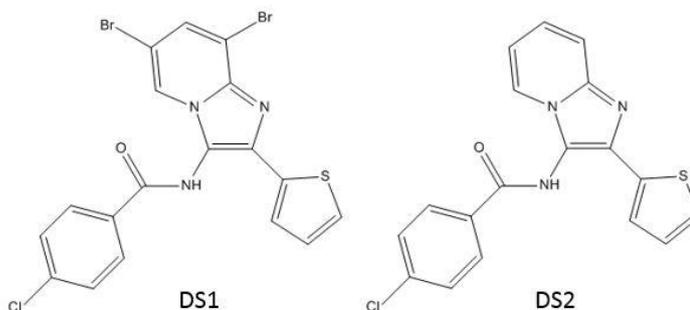


Abbildung 7: Strukturformeln der Imidazopyridine DS1 und DS2

Wafford et al. (2009) beschrieben DS1 und DS2 (Abb.7) aus der Klasse der Imidazopyridine als neue Modulatoren, die im nanomolaren Bereich (~ 14 nM für DS1 an $\alpha 4\beta 2\delta$) selektiv für $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren sind. In einer weiteren Studie (Jensen et al. 2013) wurde die Wirkung von DS2 detaillierter analysiert, dabei wurde zum einen bestätigt, dass die δ -Untereinheit Voraussetzung für die positive Modulation ist. Es wurde gezeigt, dass die α -Untereinheit geringen Einfluss auf die Effizienz hat, wobei die $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren am stärksten moduliert werden. Für die β -Untereinheit konnte keine Präferenz festgestellt werden. Weiterhin wurden Versuche zur Interaktion von DS2 mit verschiedenen bekannten Bindestellen (GABA-, Benzodiazepin-, Etomidat-, Neurosteroid- und Pentobarbital-Bindestelle) unternommen, dabei konnte keinerlei Wechselwirkung erkannt werden, was zur Schlussfolgerung führte, dass eine neue unbekannte Bindestelle vorliegt.

Die bisherigen Daten bilden den Ausgangspunkt neue Liganden zu synthetisieren, um δ -enthaltende Rezeptoren weiter biochemisch und pharmakologisch zu charakterisieren.

1.4 Konkatamerstrategie

Rezeptoren, welche aus mehreren Untereinheiten bestehen, bieten zum einen eine große Vielfalt an physiologisch potentiell möglichen Rezeptoren, erschweren aber die Interpretation von Ergebnissen in rekombinanten Systemen. Es ist zum Beispiel nicht möglich in rekombinanten Systemen GABA_A-Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen in einem Pentamer, welche u.a. in den Kombinationen $\alpha 1/\alpha 6$ vorkommen (Lüddens et al. 1991), so zu exprimieren, dass nur eine definierte Rezeptorpopulation vorliegt. Weiterhin

werden zur rekombinanten Expression die für die verschiedenen Untereinheiten kodierenden cDNAs in bestimmten Verhältnissen kotransfiziert (Lüddens und Korpi 1997). Verändern sich nun die Eigenschaften mit dem Ändern der Verhältnisse der transfizierten Untereinheiten, so spricht dies für mehrere Assemblierungsmöglichkeiten. Dies wurde zum Beispiel bei δ -enthaltenden Rezeptoren beobachtet (Hadley und Amin 2007, Wagoner und Czajkowski 2010). Die Idee, die Untereinheiten auf DNA-Ebene zu verknüpfen, so dass man sogenannte Konkatomere erhält und die Nachbarschaften der Untereinheiten im Rezeptor vordefinieren kann, wurde am Beispiel von Kaliumkanälen zuerst angewandt und scheint daher ein nützliches Werkzeug zu sein, um die Struktur-Funktions-Beziehungen besser studieren zu können (Liman et al. 1992). Diese Strategie könnte dazu beitragen: (1) die genaue Architektur von Rezeptorheteromeren herauszufinden; (2) Isoformen zu beschreiben, bei denen die Untereinheiten mehrere Positionen einnehmen können (Abb. 8A), wie dies z.B. bei $\alpha 4\beta 2$ -nACh-Rezeptoren diskutiert wird (Nichols et al. 2014); (3) Rezeptoren, welche eine einzelne Mutation in mehrfach vorkommenden Untereinheiten tragen, zu charakterisieren. Der letzte Punkt ist vor allem interessant, wenn einzelne Ligandenbindestellen ausgeschaltet werden und so die Ligandenstöchiometrie untersucht werden kann (Abb. 8B). Weiterhin können so potentielle Rezeptoren von heterozygot vorkommenden Erbkrankheiten untersucht werden, bei denen eine Mischung aus Wildtypuntereinheiten und mutierten Untereinheiten vorkommen kann.

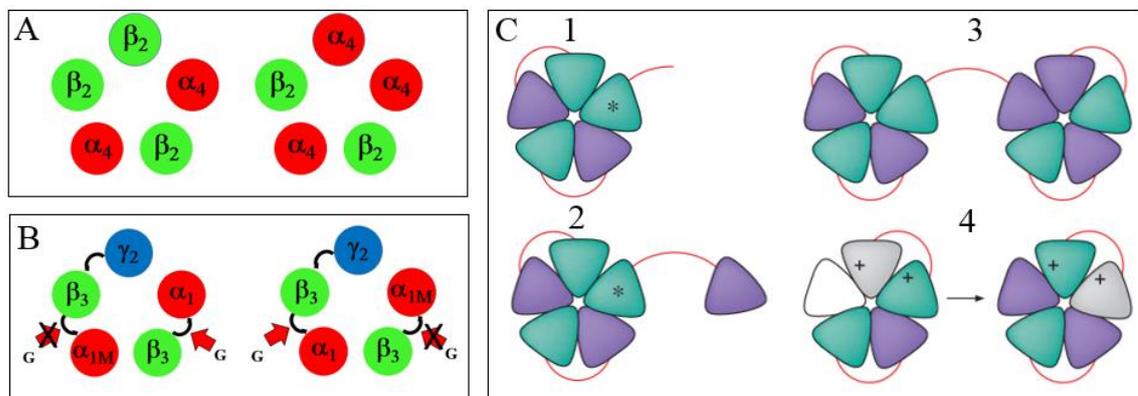


Abbildung 8: Konkatomerstrategie **A:** mögliche Assemblierungen von $\alpha 4\beta 2$ -nACh-Rezeptoren **B:** Möglichkeit zum selektiven Mutieren einer GABA-Bindestelle (G) in GABA_A-Rezeptoren durch Verlinkung der UE (schwarze Pfeile) **C:** diskutierte Artefakte durch Proteolyse der Fusionsproteine (1), partiellen Einbau eines Dimers (2), Bildung von Rezeptormultimeren (3) und Umlagerung von Untereinheiten (4). (modifiziert nach Minier und Sigel 2004)

Um die Vorteile dieser Strategie nutzen zu können, müssen folgende Anforderungen erfüllt sein: (1) Zum Verknüpfen der Untereinheiten müssen N- und C-Terminus zusammen extra- oder intrazellulär vorliegen. (2) Es muss eine ausreichend gute Expressierbarkeit, die aufgrund der größeren Proteine eingeschränkt sein kann, möglich sein. (3) Es darf keine Proteolyse und Neukombination der Untereinheiten stattfinden. (4) Es dürfen sich

keine Rezeptormultimere bilden. (5) Es darf keine Umlagerung der verknüpften Untereinheiten stattfinden (Abb. 8C). (6) Die Funktionen der Rezeptoren, welche z.B. anhand von EC_{50} -Werten, Hill-Koeffizienten oder dem Strombild beschrieben werden können, dürfen keine Funktion der Linkerlänge oder –struktur sein.

1.4.1 Konkatomere $GABA_A$ -Rezeptoren

Aufgrund der Vielzahl an Untereinheiten der $GABA_A$ -Rezeptoren und der damit einhergehenden möglichen Rezeptorvielfalt bietet sich hier die Strategie Rezeptoren aus Konkatomeren aufzubauen besonders an. Bereits 1995 wurden von Im et al. ($\alpha 6\beta 2$)-Konstrukte mit einer einzelnen $\gamma 2$ -Untereinheit exprimiert beschrieben. Diese Rezeptoren hatten in HEK293-Zellen als Expressionssystem die gleichen Eigenschaften wie die aus individuellen Untereinheiten assemblierenden Rezeptoren. Systematischer wurden beginnend mit 2001 von der Gruppe um Erwin Siegel in bis heute über 15 Publikationen Studien über aus Konkatomeren bestehenden $GABA_A$ -Rezeptoren dokumentiert. Wichtige Ergebnisse sind: (1) $GABA_A$ -Rezeptoren des Subtyps $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ordnen sich in der Sequenz γ - β - α - β - α , gelesen gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus gesehen, an (Baumann et al. 2002). (2) Diese $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren funktionieren nur mit zwei hochaffinen GABA-Bindestellen adäquat (Baumann et al. 2003). (3) Die modulierenden Effekte von Etomidat und Loreclezol wirken additiv in Abhängigkeit der Anzahl der $\beta 2$ -Untereinheiten im Pentamer, die intrinsische Aktivierung erfordert hingegen zwei $\beta 2$ -Untereinheiten (Boulineau et al. 2005). (4) Für δ -enthaltende Rezeptoren sind mehrere Assemblierungen mit der Stöchiometrie 2α -, 2β - und 1δ - Untereinheit(en) möglich (Baur et al. 2010).

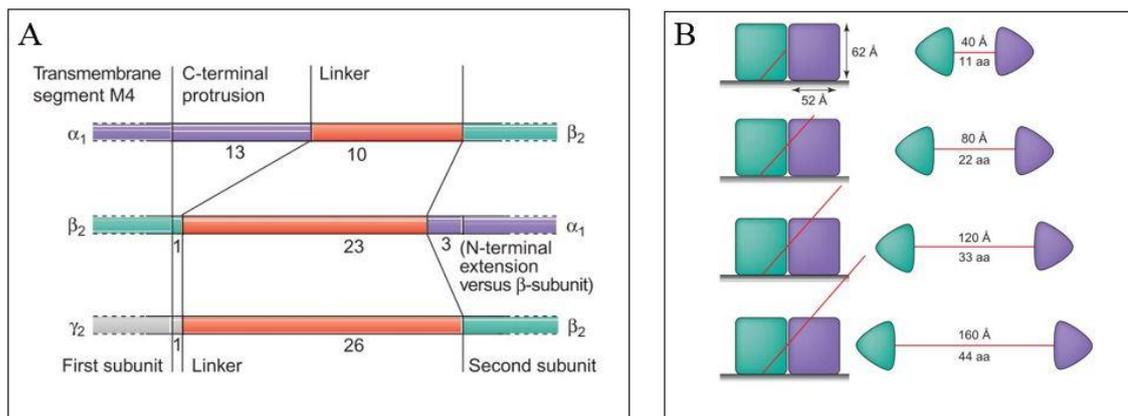


Abbildung 9: Linkerkonstruktion A: Für alle Untereinheitenkombinationen sind variable Aminosäurelinker (rot) so konstruiert, dass die Summe aus extrazellulären N-Terminus, C-Terminus und Linker gleich ist. **B:** Darstellung der Linkerlängen relativ zu den Untereinheiten, bei der Annahme von $3,6 \text{ \AA}$ pro Aminosäure. Im gestreckten Zustand reicht ein Linker mit 22 Aminosäuren hypothetisch von der Mitte einer Untereinheit auf Höhe der Membranoberfläche (C-Terminus) bis zur Mitte der oberen Seite einer benachbarten Untereinheit (N-Terminus). (nach Minier und Siegel 2004)

Weiterhin wurden einige Grundregeln zur Assemblierung und Konstruktion von Konkameren aus den Ergebnissen abgeleitet: (1) Die Fusionsproteine lagern sich im Pentamer vom N- zum C-Terminus gegen den Uhrzeigersinn, vom synaptischen Spalt aus betrachtet, an (im Folgenden als Uhrzeigersinnregel bezeichnet) (Baumann et al. 2002). (2) Eine zunehmende Größe der Proteine verringert die Expressionsstärke an Rezeptoren, was besonders in Experimenten mit HEK293-Zellen zu Problemen führen kann (Baur et al. 2006). (3) Ein Überladen des Expressionssystems mit genetischen Material kann zu Assemblierungsartefakten führen (Sigel et al. 2009). (4) Die Länge der Linker muss in Abhängigkeit der zu verknüpfenden Untereinheiten gestaltet werden. Der letzte Punkt wurde in einer initialen Publikation von Baumann et al. 2001 genauer beschrieben, dabei wurde die Länge der Linker in ($\alpha 1\beta 2$)- und ($\beta 2\alpha 1$)-Konstrukten soweit vergrößert, bis die Expressionsstärke, sowie die EC_{50} -Werte für GABA nicht mehr weiter den Messwerten für $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Wildtyprezeptoren angenähert werden konnten. Dieser Prozess ergab für die Verknüpfung der $\alpha 1$ - mit der $\beta 2$ -Untereinheit eine Länge von 10 Aminosäuren und für die Verknüpfung der $\beta 2$ - mit der $\alpha 1$ -Untereinheit 23 Aminosäuren lange Linker. Für die weiteren Verknüpfungen wurden die Längen insoweit angepasst, dass die variable Länge zwischen den Untereinheiten immer gleich ist, es wurden also die Linker länger gestaltet, wenn am N- oder C-Terminus weniger Aminosäuren wie bei den beschriebenen Verknüpfungen vorhanden waren (Abb. 9A). Die Problematik der richtigen Länge ist in Abb. 9B illustriert. Sind die Linker zu kurz (kleiner als eine Untereinheit), so kann die Expression und Funktion beeinträchtigt sein. Sind sie hingegen zu lang (größer als zwei Untereinheiten), so könnten theoretisch Untereinheiten zwischen die verknüpften Untereinheiten inkorporiert werden. Insgesamt wurden für die $GABA_A$ -Rezeptoren sehr viele Studien mit Hilfe von Konkameren durchgeführt, wobei sehr wenige Artefakte, wie zum Beispiel Proteolyse der Fusionsproteine oder das Bilden von Rezeptormultimeren, beschrieben worden sind.

1.4.2 Konkamere weiterer Ionenkanäle

Als erstes wurde die Konkamerstrategie bei Studien über spannungsabhängige Kaliumkanäle angewendet, dabei konnte in Tetrameren die Stöchiometrie an Bindestellen für Tetraethylammonium charakterisiert werden (Liman et al. 1992; Hurst et al. 1992). Es folgten Untersuchungen an zyklisch nukleotidgesteuerten Kanälen (CNG-Kanal) (Zagotta et al. 1996), am epithelialen Natriumkanal (ENaC) (Firnov et al. 1998), am mechanosensitiven Kanal MscL aus *E. coli* (Blount et al. 1996), am Cystic Fibrosis Transmembran Conductance Channel (CFTR) (Zerhusen et al. 1999) und weiteren Transportproteinen.

Besonders zu erwähnen sind auch Untersuchungen zu nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren und P2X-Rezeptoren, bei denen auftretende Artefakte sehr genau beschrieben worden sind. Bei ersteren wurden am Beispiel von $\alpha 2\beta 4$ -Rezeptoren robuste Expressionen

von intakten dualen Konstrukten und heterogene Rezeptorpopulationen erhalten (Groot-Kormelink et al. 2004). Es wurden dabei Reporter Mutationen, welche die Acetylcholin-sensitivität erhöhen, in der $\beta 4$ -Untereinheit eingefügt, so dass die Anzahl inkorporierter $\beta 4$ -Untereinheiten ausgezählt werden konnte. Als Ursachen für die heterogenen Rezeptorpopulationen ausgehend von dualen Konstrukten wurden Rezeptoren diskutiert, bei denen die Untereinheiten unvollständig in die Pentamere eingebaut wurden. Tatsächlich konnten mit biochemischen Versuchen zur Größenbestimmung nativer Proteinkomplexe anhand von $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren höhermolekulare Rezeptoren wie Dipentamere oder Rezeptoren mit einer außerhalb des Pentamers befindlichen Untereinheit identifiziert werden. (Zhou et al. 2003). Durch die Koexpression dualer Konstrukte und einer einzelnen Untereinheit konnten hingegen nur noch Monopentamere detektiert werden. Ähnliches wurde auch bei den trimeren P2X1-Rezeptoren beobachtet, bei denen ausgehend von intakten membranständigen Konstrukten aus zwei bis sechs Untereinheiten robuste Ströme gemessen werden konnten. (Nicke et al. 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konkatamerstrategie anfällig für Artefakte ist und dass sorgfältige Kontrollen geplant werden müssen, um Fehlinterpretationen weitestgehend zu vermeiden.

2 Ziele

Ausgehend von meiner Diplomarbeit zum Thema Ethanol sensitivität δ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren und deren kontroverser Diskussion in der Literatur (Korpi et al. 2007 und Meera et al. 2010), hatten sich Fragen über die Assemblierung und Stöchiometrie dieser Rezeptoren herausgebildet. Ein sehr enthusiastisches Ziel war daher zu Beginn der Arbeit die Konstruktion definierter δ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren mit Hilfe der Konkatamerstrategie und deren Testung auf Ethanol, so dass die ethanol sensitive Isoform gefunden werden kann. Es wurden dabei im Laufe der Arbeit folgende Ziele erarbeitet:

- Erstellen eines Sets von Konkatameren zur Assemblierung definierter GABA_A-Rezeptoren sowie deren biochemischer und pharmakologischer Charakterisierung.
- Aufgrund der schweren Expressierbarkeit sich aus Konkatameren assemblierenden δ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren wurden zunächst $\gamma 2$ -enthaltende Rezeptoren zur Etablierung der Strategien charakterisiert mit dem Ziel später die $\gamma 2$ - durch die δ -Untereinheit zu substituieren.
- Eine grundsätzliche Frage ist die Ligandenstöchiometrie, also beispielsweise wieviele GABA-Moleküle an den Rezeptor binden müssen, um den Kanal zu öffnen. Dazu sollten GABA_A-Rezeptoren mit nur einer GABA-Bindestelle durch Einfügen einer Punktmutation oder Anordnung der UE, so dass nur eine putative GABA-Bindestelle vorliegt, charakterisiert werden.
- Weiterhin sollten Parameter oder Liganden gefunden werden, welche die An- oder Abwesenheit von Untereinheiten (UE) oder UE-Nachbarschaftsbeziehungen in pentameren GABA_A-Rezeptoren kennzeichnen.
- Es sollten suptypspezifische Liganden für δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren gefunden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
GABA _A α1	1:1000	Chemicon
GABA _A Rβ3 (D-12) sc-376252 Maus IgG ₁	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
GABA _A R β2/3 62-3G1	1:10000	Upstate (Millipore)
GABA _A R BD28	1:250 – 1:1000	Gabe Hanns Möhler
GABA _A R γ2	1:1000	Rockland
Ziege Anti-Maus HRP P0447	1:10000	DAKO
Schwein Anti-Hase HRP P0448	1:10000	DAKO

Tabelle 3: Verwendete Kits

Name	Verwendung	Hersteller
FastPlasmid Mini Kit	Plasmidpreparation reiner DNA für Sequenzierungen	5Prime
Pure Yield Plasmid Miniprep System	Plasmidpreparation transfezierbarer DNA ~ 20 µg	Promega
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Plasmidpreparation transfezierbarer DNA ~ 200 µg	Promega
Pure Yield Plasmid Maxiprep System	Plasmidpreparation transfezierbarer DNA ~ 1000 µg	Promega
Wizard SV Gel und PCR Clean-UP System	Reinigung und Extraktion von DNA	Promega
Plasmid Mini Kit	Plasmidpreparation reiner DNA für Sequenzierungen	Quiagen
Plasmid Midi Kit	Plasmidpreparation transfezierbarer DNA ~ 1000 µg	Quiagen
Plasmid Maxi Kit	Plasmidpreparation transfezierbarer DNA ~ 1000 µg	Quiagen
QIAQuick Gel Extraction Kit	Reinigung und Extraktion von DNA	Quiagen

NucleoSpin Gel and PCR CleanUp	Reinigung und Extraktion von DNA	Macherey-Nagel
SP6 Machine	RNA Synthese	Ambion
Phusion High Fidelity Polymerase	PCR	NEB

Tabelle 4: Stammlösungen der eingesetzten Liganden

Substanz	Hersteller	Konzentration	Lösungsmittel
GABA	Sigma-Aldrich	10 mM und 100 mM	Badlösung
Pentobarbital	Sigma-Aldrich	3 M	Badlösung
Furosemid	Sigma-Aldrich	2 M	2 M NaOH
DS-Derivate	Tocris, AG Schirmeister, AG Rösch	1 mM	DMSO
E033-00233	Biocrea	1 M	DMSO
Diazepam	Laborbestand	100 mM	Ethanol
Bretazenil	Roche	100 mM	Ethanol
Flurazepam	Roche	100 mM	DMSO
Flumazenil	Sigma-Aldrich	100 mM	Ethanol
Etomidat	Tocris	300 mM	DMSO
Loreclezol	Laborbestand	50 mM	Ethanol

Tabelle 5: Chemikalien

Substanz	Hersteller
2-Log DANN Leiter (Quick Load)	NEB
4x Lämmli-puffer (Roti-Load 3)	Roth
Acrylamid (30 % Acrylamid/Bis Solution 29:1)	Bio-Rad
Agar (Difco Agar, Granulated)	BD
Agarose (SeaKem LE agarose)	FMC BioProducts
Ampicillin	GERBU Trading GmbH
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich
ATP	Sigma-Aldrich
Blot-Puffer (ProSieve EX Western Blot-Transfer Buffer)	Lonza
CaCl ₂ *2H ₂ O	Sigma-Aldrich

Carbenicillin Dinatriumsalz	Applichem
CsCl	Sigma-Aldrich
D(+)-Glucose	Merck
DMSO	Roth
dNTPs (10 mM)	NEB
DTT	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
EGTA	Sigma-Aldrich
Entwicklungsreagenz (WesternBright Sirius)	Advansta
Entwicklungsreagenz (WesternSure Premium)	LICOR
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in H ₂ O)	Sigma-Aldrich
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco
Glyzerin	Roth
GTP	Sigma-Aldrich
HCl (37%, rauchend)	Merck
Hefeextrakt (Bacto Yeast Extract)	BD
HEPES	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
K ₂ HPO ₄	Merck
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	Merck
KOH	Merck
Laufpuffer (ProSieve EX Running Buffer)	Lonza
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich
Ligase (T4 DNA Ligase 5 Weiss U/μl)	Fermentas
MEM (Minimum Essential Medium)	Gibco
MgCl ₂ *10H ₂ O	Roth
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck
Milchpulver (Nonfat Dried Milk Powder)	AppliChem
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Roth
NaCl	Roth

NaHCO ₃	Merck
NaOH	Merck
Natriumacetat-Dihydrat	Merck
Neutravidin Agarose Resin (High Capacity)	Thermo Scientific
Ortho-H ₃ PO ₄ , 85%	Merck
PBS	Sigma-Aldrich
Penicillin (10000 units/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)	NEB
ProSieve QuadColor Protein Marker (4,6-300 kDa)	Lonza
Proteaseinhibitor-Cocktail P8340	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor-Tabletten (cOmplete, Mini)	Roche
Restriktionsenzyme	NEB und Fermentas
RNAse (100 mg/ml)	Quiagen
SDS	Roth
Sulfo-NHS(N-Hydroxysuccinimid)-Biotin	Thermo Scientific
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Trypton (Bacto Trypton)	BD
Tween 20	Roth
WesternBright ChemiPen	Advansta

Tabelle 6: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Badlösung für HEK293	2 mM MgSO ₄ , 135 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 10 mM HEPES, pH = 7,35-7,38
CsCl-Lösung	90 g CsCl + 90 ml TE-Puffer
Frosch Ringerlösung	115 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,8 mM CaCl ₂ , 10mM HEPES, pH 7,5 mit NaOH, 1 mM Gentamycin
HBS 2x	8 g Na NaCl, 0,2 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 6,5 g HEPES in 500 ml H ₂ O, pH = 7,0
Intrazelluläre Lösung	10 mM NaCl, 80 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , 50 mM KOH, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3,1 mM ATP, 0,4 mM GTP
Kollagenasepuffer	83 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM HEPES, pH 7,5 mit NaOH
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar, pH = 7,4
Lösung 1	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0

Lösung 2	1% SDS, 0,2 M NaOH
Lösung 3	600 ml 5 M KCl + 115 ml Eisessig + 285 ml H ₂ O
Lysispuffer	1 % SDS in 50 mM Tris/Citrat, pH = 7,4 + Protease Inhibitor Cocktail Mini
Sammelgelpuffer	0,3 M Tris/Phosphat, 0,5% SDS, pH 6,7
SOB-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , pH= 7,0 mit NaOH
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 20 mM Glucose, pH= 7,0 mit NaOH
TAE 50x	2 M TrisCl, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH = 8,0
TB-Medium	12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol in 900 ml H ₂ O + 2,31 g KH ₂ PO ₄ , 12,54 g K ₂ HPO ₄ in 100 ml H ₂ O
TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl
TBST	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween
Trenngelpuffer	60 ml 2,5x Trenngelpuffer (1,875 M Tris/HCl, 0,25 % SDS, pH = 8,9) + 49,3 ml H ₂ O
Tris/Citrat-Puffer	50 mM, pH = 7,4
Tris/HCl-Puffer	10 mM, pH = 7,4

Tabelle 7: Primer

Nr.	Name	Sequenz 5' → 3'
Primer zum Einfügen von Mutationen		
1	a1F64C_forward	GGAATATAACAATAGATGTGT <u>G</u> TTTCCGCCAAAGCTGG
2	a1F64C_backward	CCAGCTTTGGCGGAAA <u>C</u> ACACATCTATTGTATATTCC
3	ra4F64C_for_2	GGAATACACAATGGATGTGT <u>G</u> CTTCAGACAGACATGG
4	ra4F64C_back_2	CCATGTCTGTCTGAAG <u>C</u> ACACATCCATTGTGTATTCC
5	fw alpha6 F63C	GATGTTT <u>G</u> CTTCCGACAGACATGGACTGATGAGAG
6	bw alpha6 F63C	GTCGGAAG <u>C</u> AAACATCCATTGTGTACTCCATCTCC
7	fw_b3ER-TK	CTGGCGTG <u>A</u> CAA <u>A</u> GATCGAGCTCCCAC
8	bw_b3GK-DN	TAACAGCGT <u>T</u> GT <u>C</u> GCCACGCCAG
9	fw_b3_rep_DNTK	CG <u>A</u> CGACA <u>A</u> CGCTGTTACTGGCGTG <u>A</u> CAA <u>A</u> GATC
10	bw_b3_rep_DNTK	GATC <u>T</u> TT <u>G</u> T <u>C</u> ACGCCAGTAACAGCGT <u>T</u> GT <u>C</u> G <u>T</u> CG
11	bw_b3ER-TK	GTGGGAGCTCGATC <u>T</u> TT <u>G</u> T <u>C</u> ACGCCAG
12	fw_b3GK-DN	CTGGCGTGGCG <u>A</u> CGACA <u>A</u> CGCTGTTA
Primer zum Verknüpfen von Untereinheiten		

13	Linker3'fw	<u>CCGCAATTTAAA-</u> <u>TAGCGCTGGCGCGCCAGCTCAGGGCGCCCAGAG</u>
14	Linker5'bw	<u>GCTATTTAAATTGCGGCCGCCACCGG-</u> <u>TAGGTGCCTGGTTTTGATTCTGG</u>
15	a6 fw bxb	<u>GCAATTTAAATCAAGGCAATGCTCAGACCGCTAACCAGC</u> <u>AAGCTCAACTTGAAGATGAAG</u>
16	a6 bw bxb	<u>TGGCGCGCCAGCGCTGTTCTGCTCGACAGTACTGC</u>
17	a1 fw bxb	<u>GCAATTTAAATCAAGCTCAGCAACAGGCTAATGGCC</u> <u>AGCCCTCCCAAGATG</u>
18	a1 bw bxb	<u>TGGCGCGCCAGCGCTGTTCTGTTGATGGGGTGTGG</u>
19	a4 bxb fw	<u>GCAATTTAAATCAAGCTCAGCAACAGGCTAATGGCCAGA</u> <u>ATTCAAAGGACG</u>
20	a4 bxb bw	<u>TGGCGCGCCAGCGCTGTTCTGCATTAGACTTTCTG</u>
21	a_g2 fw	<u>TGGCGCGCCAGCTCAGGCCGGCCAAAAGTCAGATG</u>
22	g2s_ax_bw	<u>ATTGCGGCCGCCACCGGTAGGTGCCTGGTTTTGATTCTG</u> <u>CAGATAAAGATAGGAG</u>
23	3'alpha1 fw	<u>GTCTATTGGGCCACGTATT</u>
24	g2/d_b3 bw	<u>CTGGCGCGCCAGCGCTGTTCTGTTCTGCATTGCGGCCGC</u> <u>CACCG</u>
25	b3_g2 fw	<u>GCAATTTAAATCAAGCTCAGCAACAGGGCCAAGCAG</u> <u>CTAATGGCCAAAAGTCAGATGATG</u>
26	fw_b2_BSSH	<u>ACAGCGCTGGCGCGCCAGCTCAGGGCGCCCAGAGTG</u> <u>TCAATGACCCTAG</u>
27	bw_b2_Mfe	<u>CTTGCAATTGCTTCTCATGGGAG</u>
Primer zum Sequenzieren oder als Hilfsprimer		
28	T3	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGG</u>
29	T7	<u>GTAATACGACTCACTATAGGGC</u>
30	SP6	<u>ACCTTATGTATCATAAC</u>
31	pRK3'seq	<u>AGCTGCAATAAACAAGTTGG</u>
32	pRK5'seq	<u>TCCACTTTGCCTTTCTCTCC</u>
33	pRK3'b	<u>CTCTTTCAGAGGTTATTTTCAGG</u>
34	a4fw	<u>GACAACAGTTAATACGACAGG</u>
35	a4seq	<u>GATGGTCACCAAAGTTTGGACC</u>
36	a4-N-term-seq	<u>AATTGTGCCCGGAAAATTTTACC</u>
37	a4-HindD3	<u>GCGGCCAAGCTTACATTAGACTTTCTGATTTCTCC</u>
38	Ra4-EcoRV	<u>CCAAAAAGAAGATATCAAACCTCC</u>

39	3X6MSCMLU	AACTGTTTGGCCAATCAAATCATACTGG
40	3X1MSCMLU	AACTGTTTGGCCAAGAAGGTCATACTGG
41	5PCRa1	AACAGTTGACTCTGGAATTGT
42	3PCRa1	CACTTTCTTTGGCTTTTCTGG
43	b3a4b3bw	CGTTTGTGTGTGTGTGTGTGTG

neu eingefügte Basen sind unterstrichen

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Hersteller
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Master Cycler Gradient	Eppendorf
SDS-Gel-System Mini-Protea II	Bio-Rad
Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Power Pac 3000	Bio-Rad
C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner	LI-COR
Biofuge 13	Heraeus
Cetnrifuge 5417R	Eppendorf
Megafuge 1.0R	Heraeus
Superspeed Zentrifuge RC 5B	Sorvall
RC 5B Plus-Rotor SS-34	Sorvall
Ultrazentrifuge Optima L-7014	Beckman
Optima L-7014-Rotor VTI 65.2	Beckman
Thermomixer comfort	Eppendorf
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Schüttelinkubator innova 4300	New Brunswick Scientific
Wärmeschrank	Memmert
Brutschrank	Thermo Scientific
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Pequlab
Ultraschallgerät Sonoplus HD2070	Bandelin
UV/VIS Spectrometer Lambda Bio	Perkin Elmer
Wippschüttler 3013	GFL
Mini Rocker-Shaker PMR-30	Grant-Bio

Tabelle 9: Gebrauchsmaterialien

Gegenstand	Hersteller
Extra Thick Western Blotting Filter Paper	Thermo Scientific
Imobilon-P Transfer Membran	EMD Millipore
Kulturflaschen (500 ml)	Greiner Bio-One
Kulturschalen (10 cm)	Greiner Bio-One
6-well-Platten	Sarstedt
Küvetten, Halbmikro PS	Ratiolab
Falcons (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One
Reagiergefäße (0.2, 1.5 und 2 ml)	Eppendorf und Sarstedt
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Eppendorf und Brand

Tabelle 10: Software

Name	Verwendung	Hersteller
Word 2013	Textverarbeitung	Microsoft
Excel 2013	Berechnungen	Microsoft
Powerpoint 2013	Abbildungen	Microsoft
Image Studio Lite 3.1	Western Blots	Li-COR
Clampex 8.1 & 10.1	Datenerfassung Elektrophysiologie	Axon Instruments
Clampfit 10.3	Auswertung Elektrophysiologie	Axon Instruments
ApE	Sequenzalignments	University Utah
Omiga 1.0	In silico Klonierungen	Oxford Molecular Group
Prism6	Statistik	Graph Pad
EggWorks 3.02	Datenerfassung Elektrophysiologie	NPI
Origin 8.5	Statistik	OriginLab Corp.

Tabelle 11: Verwendete Vektoren aus dem Laborbestand

Plasmid	Variationen
pRK5- α 1	
pRK5- α 3	
pRK5- α 4	
pRK5- α 6	pRK5- α 6short

pRK7-r β 1	pRK7-r β 1S265N
pRK5-r β 2	pRK5-r β 2N265S, pRK5-r β 2N265M
pRK5-r β 3	pRK5-r β 3N265S
pRK5-r δ	
pRK5-r γ 2s	pRK5-r γ 2l
pRK5-r β 2 α 1	
pRK5-r γ 2 β 2 α 1	
pRK5-r α 4 β 3 (407)	
pRK5-r β 3 α 4 (707)	
pRK5-r α 6 β 2	
pRK5-r β 2 α 6	
eGFP	

Tabelle 12: Selbst erstellte oder unter Anleitung* erstellte Punktmutanten

Plasmid	Primer
pRK5-r α 1F64C	PCR (1,2)
pRK5-r α 4F64C	PCR (3,4)
pRK5-r β 3 α 4F64C	PCR (3,4)
pRK5-r α 6F63C*	PCR (5,6)
pRK5-r β 3DNTK	1. PCR (7,8) 2. PCR (9,10)

Tabelle 13: Selbst erstellte oder unter Anleitung* erstellte Konkatomere

Plasmid	Vektor	Insert	Enzyme
pRK5-r α 1 β 1	pRK5-r α 1 β 3	pRK5-r α 6 β 1	Not1/Pml1
pRK5-r α 1 β 2	pRK5-r α 1 β 3	PCR(26,27)pRK5-r β 2	Mfe1/BssH2
pRK5-r α 1F64C β 2	pRK5-r α 1 β 2	pRK5-r α 1F64C	Mlu1/EcoR1
pRK5-r α 1 β 3	pRK5-r α 1	pRK5-r β 3 α 1 β 3	Mlu1/Pst1

pRK5- α 1F64C β 3	pRK5- α 1 β 3	pRK5- α 1F64C	Xba1/Bsu36I
pRK5- α 1 β 3DNTK	pRK5- α 1 β 3	pRK5- β 3DNTK	Sal1/Pml1
pRK5- β 3 α 1	pRK5- α 1	pRK5- β 3 α 1 β 3	Mlu1/Xba1
pRK5- β 3 α 1F64C	pRK5- β 3 α 1F64C β 3	pRK5- α 1	Mlu1/Pst1
pRK5- β 3 α 1 β 3	pRK5- β 3 α 4 β 3	PCR(17,18) pRK5- α 1	Swa1/BssH2
pRK5- β 3 α 1F64C β 3	pRK5- β 3 α 4 β 3	PCR(17,18)pRK5- α 1F64C	Swa1/BssH2
pRK5- β 3 β 3	pRK5- β 3 α 4 β 3	PCR(13,14)	Swa1/BssH2
pRK5- α 1 γ 2	pRK5- α 1 β 3	PCR(21,31) pRK5- γ 2	Hind3/BssH2
pRK5- α 1F64C γ 2	pRK5- α 1 γ 2	pRK5- α 1F64C γ 2	Nde1/Mlu1
pRK5- α 1 γ 2 β 1	pRK5- α 1 γ 2 β 3	pRK5- α 6 β 1	Not1/Pml1
pRK5- α 1 γ 2 β 2	pRK5- α 1 γ 2 β 3	pRK5- γ 2 β 2	Kpn1
pRK5- α 1F64C γ 2 β 2	pRK5- α 1 γ 2 β 2	pRK5- α 1F64C	Mlu1/EcoR1
pRK5- α 1 γ 2 β 3	pRK5- β 3 γ 2 β 3	pRK5- α 1 γ 2	EcoR5/Xba1
pRK5- α 1F64C γ 2 β 3	pRK5- α 1 γ 2 β 3	pRK5- α 1F64C β 3	Mlu1/Xba1
pRK5- α 1 γ 2 β 3DNTK	pRK5- α 1 γ 2 β 3	pRK5- β 3DNTK	Sal1/Pml1
pRK5- β 3 α 1 γ 2	pRK5- α 1 γ 2	pRK5- β 3 α 1	Nde1/Mlu1
pRK5- β 3 α 1F64C γ 2	pRK5- α 1 γ 2	pRK5- β 3 α 1F64C	Nde1/Mlu1
pRK5- γ 2 α 1	pRK5- β 3 α 1	PCR(22,32) pRK5- γ 2	Xho1/Not1
pRK5- α 4F64C β 3	pRK5- α 4F64C	pRK5- β 3 α 4 β 3	Stu1/EcoR5
pRK5- β 3 α 4 β 3	pRK5- β 3 α 4	pRK5- α 4 β 3	Stu1/EcoR5
pRK5- β 3 α 4F64C β 3	pRK5- β 3 α 4F64C	pRK5- α 4 β 3	Stu1/EcoR5
pRK5- β 3N265S α 4 β 3	pRK5- β 3 α 4 β 3	pRK5- β 3N265S	Not1/Xba1
pRK5- β 3 α 4 β 3N265S	pRK5- β 3 α 4 β 3	pRK5- β 3 β 3N265S	Afl2/BssH2
pRK5- β 3N265S α 4 β 3N265S	pRK5- β 3 α 4 β 3N265S	pRK5- β 3N265S	Not1/Xba1
pRK5- α 4 γ 2	pRK5- α 1 γ 2	pRK5- α 4 β 3	Nde1/Asc1
pRK5- α 4 γ 2 β 3	pRK5- α 1 γ 2 β 3	pRK5- α 4 γ 2	Nde1/Asc1
pRK5- α 6 β 3	pRK5- α 6	pRK5- β 3 α 6 β 3	Stu1/Bsu36I
pRK5- α 6F63C β 3	pRK5- α 6F63C	pRK5- β 3 α 6 β 3	Stu1/Bsu36I
pRK5- α 6short β 3	pRK5- α 6short	pRK5- β 3 α 6 β 3	Stu1/Bsu36I
pRK5- β 3 α 6	pRK5- β 3 α 6 β 3	pRK5- α 6	Stu1/EcoR5
pRK5- β 3 α 6F63C	pRK5- β 3 α 6 β 3	pRK5- α 6F63C	Stu1/EcoR5

pRK5-rβ3α6short	pRK5-rβ3α6β3	pRK5-rα6short	Stu1/EcoR5
pRK5-rβ3α6β3*	pRK5-rβ3β3	PCR(15,16)pRK5-rα6	Swa1/BssH2
pRK5-rβ3α6F63Cβ3*	pRK5-rβ3α6β3	pRK5-rα6F63C	EcoR5/Bsu36I
pRK5-rβ3α6shortβ3	pRK5-rβ3α6β3	pRK5-rα6short	EcoR5/Bsu36I
pRK5-rα6γ2	pRK5-rα1γ2	pRK5-rα6β3	Nde1/BssH2
pRK5-rα6F63Cγ2	pRK5-rα1γ2	pRK5-rα6F63Cβ3	Nde1/BssH2
pRK5-rα6shortγ2	pRK5-rα1γ2	pRK5-rα6shortβ3	Nde1/BssH2
pRK5-rα6γ2β3	pRK5-rα1γ2β3	pRK5-rα6β3	Nde1/BssH2
pRK5-rα6F63Cγ2β3	pRK5-rα1γ2β3	pRK5-rα6F63Cβ3	Nde1/BssH2
pRK5-rα6shortγ2β3	pRK5-rα1γ2β3	pRK5-rα6shortβ3	Nde1/BssH2
pRK5-rβ3α6γ2	pRK5-rβ3α1γ2	pRK5-rβ3α6β3	Not1/BssH2
pRK5-rβ3α6F63Cγ2	pRK5-rβ3α1γ2	pRK5-rβ3α6F63Cβ3	Not1/BssH2
pRK5-rβ3α6shortγ2	pRK5-rβ3α1γ2	pRK5-rβ3α6shortβ3	Not1/BssH2
pRK5-rβ3γ2β3	pRK5-rβ3α4β3	PCR(22,25)pRK5-rγ2α1	Swa1/BssH2
pRK5-rγ2β2	pRK5-rγ2β2α1	pRK5-rβ2	Hind3
pRK5-rγ2β3	pRK5-rβ3γ2β3	pRK5-rγ2	EcoR5/Nde1
pRK5-rβ3γ2	pRK5-rβ3γ2β3	pRK5-rγ2	EcoR5/Pml1
pRK5-rα1β3α1	pRK5-rβ3α1	pRK5-rα1β3	Xba1/Xho1
pRK5-rα6β3α1	pRK5-rα1β3α1	pRK5-rα6β3	Asc1/SnaB1
pRK5-rα1β3α6	pRK5-rα1β3α1	pRK5-rβ3α6	Not1/Kpn1
pRK5-rα6β3α6	pRK5-rβ3α6	pRK5-rα6β3	Nde1/Sal1

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Restriktion von Nukleinsäuren

Zur Überprüfung von Restriktionsmustern von Plasmid DNA, zum Erstellen von Inserts und Vektoren mit spezifischen Schnittstellen zum Klonieren sowie zum Linearisieren von Plasmiden zur RNA-Synthese wurde die DNA nach Herstellerangaben für die jeweiligen Enzyme (NEB und Fermentas) verdaut.

3.2.2 Dephosphorelierung von Nukleinsäuren

Vektoren mit zwei gleichen Schnittstellen nach der Restriktion wurden mit alkalischer

Phosphatase an den Enden dephosphoreliert, um ein Religieren beim Klonieren zu verhindern. Es wurde dazu nach einstündiger Inkubation der DNA mit dem Restriktionsenzym der Ansatz mit 10x antarktischer Phosphatase Puffer und antarktischer Phosphatase versetzt und noch mindestens 1 h bei 37°C und Schütteln (300-400 rpm) inkubiert. Die Phosphatase wurde durch eine Reinigung der DNA nach der Gelelektrophorese entfernt oder durch eine fünfzehnminütige Inkubation bei 60°C hitzeinaktiviert.

3.2.3 Agarose Gelelektrophorese

Verdaute Plasmid DNA wurde mit 6x Ladepuffer versetzt und es wurden 10-25 µl auf ein 0,8-1 prozentiges Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer in die Taschen aufgetragen. Die DNA wurde je nach zu erwartender Größe bei 70-120 V für 20-90 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit einem Transilluminator bei 254 nm (analytisches Gel) oder 312 nm (präparatives Gel) betrachtet und fotografiert bzw. wurden die erwünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt.

3.2.4 Isolierung von DNA

DNA aus ausgeschnittenen Gelstückchen, aus PCR-Ansätzen oder DNA, welche im kleinen Maßstab gereinigt werden sollte, wurde mit den Kits Wizard SV Gel und PCR CleanUP System (Promega), NucleoSpin Gel and PCR CleanUp (Macherey-Nagel) oder IQIAQuick Gel Extraction Kit (Quiagen) gewonnen. Alle Kits funktionierten nach dem gleichen Prinzip, dass die DNA unter sauren, denaturierenden Bedingungen an eine Silikamembran bindet, gewaschen und schließlich eluiert wird. Die Kits funktionierten sehr gut und wurden ohne Bevorzugung verwendet. Das Protokoll war beispielsweise für den Kit von Promega wie folgt: 10 µl Bindepuffer wurden pro 10 mg Gelstück oder DNA-Lösung eingesetzt und 10 min bei 65°C unter Schütteln (300-400 rpm) inkubiert. Der Ansatz wurde auf eine Säule mit Silikamembran gegeben, 1 min bei 16000 g zentrifugiert, mit 700 µl Waschlösung des Herstellers versetzt und 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit 400 µl Waschlösung wiederholt und die Säule wurde zum Entfernen von Ethanolspuren einmal gegen Luft unter gleichen Bedingungen mit neuen Auffanggefäßen zentrifugiert. Abschließend wurden 25 µl autoklaviertes Wasser auf die Säulen gegeben und nach 1 min Inkubation wurde die DNA durch Zentrifugation in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße eluiert.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde mit dem NanoDrop 1000 Spektrometer durchgeführt. Dazu wurde ein Spektrum von 1-2 µl Lösung aufgenommen und die Absorption bei 260 nm zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Die Ratio OD_{260}/OD_{280} galt als Maß für die Reinheit der Probe, wobei ein Wert von 1,8

reine DNA und ein Wert von 2,0 reine RNA anzeigt. Werte unter 1,8 signalisierten Proteinkontamination und Werte über 1,8 RNA-Kontamination bei DNA-Proben.

3.2.6 PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde genutzt, um Punktmutationen einzufügen und um Fragmente mit neuen Restriktionsstellen oder Linkersequenzen ausgehend von Plasmid DNA zu gewinnen. Es wurde für alle Amplifikationen die Phusion Polymerase von NEB verwendet und nach den Herstellerangaben verfahren. Diese zeichnet sich durch eine hohe Geschwindigkeit, hohe Robustheit und eine geringe Fehlerhäufigkeit (u.a. durch 3' - 5' Exonukleaseaktivität) aus. Die Komponenten wurden dem Schema in Tab.14 nach auf Eis zusammen pipettiert und der PCR-Cycler mit den Parametern aus Tab.15 programmiert.

Tabelle 14: Komponenten PCR

Komponente	50 µl Reaktion	Finale Konzentration
Nukleasefreies Wasser	bis 50 µl auffüllen	
5x Phusion HF oder GC Puffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM
1 µM forward Primer	2,5 µl	0,5 µM
1 µM backward Primer	2,5 µl	0,5 µM
10 ng/µl DNA	1 µl	10 ng
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	1 U

Tabelle 15: Reaktionsbedingungen PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98°C	2 min
20-25 Zyklen	Denaturierung	98°C
	Primer-Anlagerung	TM Primer – 3°C
	Extension	72°C
Finale Extension	72°C	7 min
Halteschritt	4°C	∞

Zur Kontrolle, ob eine Amplifikation stattgefunden hat, wurden 10 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen, mit 2 µl 6x Ladepuffer versetzt und nach 3.2.3. per Gelelektrophorese analysiert. Bei erfolgreicher Amplifikation wurde der Rest des Ansatzes mit 1 µl DPN1 versetzt und 1 h bei 37°C unter Schütteln (300-400 rpm) inkubiert, um die Template-DNA zu verdauen. Wurde das Protokoll zum Einfügen von Punktmutationen verwendet, so wurde nach DPN1-Verdau 1 µl des Ansatzes direkt nach 3.3.2 transformiert. Andernfalls wurde das Amplifikat mit den für die Klonierung geplanten Restriktionsenzymen entweder direkt nach 3.2.1 geschnitten oder bei PCR-Pufferinterferenzen (Herstellerangabe NEB) nach 3.2.4 gereinigt und dann verdaut.

3.2.7 Ligation

Neue Plasmide wurden durch eine Ligation erhalten, indem in 10 µl 50 ng DNA eingesetzt wurden. Dazu wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis von etwa eins zu drei zusammengegeben, mit 10x Ligasepuffer und Ligase von Fermentas versetzt, mit autoklavierten Wasser auf 10 µl aufgefüllt, kurz geschüttelt und zentrifugiert. Der Ansatz wurde für zweimal sticky ends Ligationen bei Raumtemperatur für 10-15 min und bei Ligationen mit blunt ends für 1-2 h inkubiert.

3.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Starseq oder Genterprise durchgeführt. Dazu wurden in 7 µl autoklavierten Wasser etwa 500 ng DNA sowie 10 pmol eines Sequenzierprimers in einen 200 µl PCR Eppendorfgefäßes angesetzt. In der Firma wurden der Probe dann mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleotide, nicht markierte Nukleotide, Polymerasepuffer sowie eine Polymerase zugesetzt. Es folgte eine Sequenzierung nach Sanger und ein Chromatogramm sowie eine Datei mit den ausgelesenen Basen wurden erhalten und mit dem Programm ApE ausgewertet.

3.2.9 DNA Präparationen

Zur Präparation von Plasmid DNA aus E.Coli wurden je nach Anforderung verschiedene Protokolle durchgeführt. Zum Testen von Kolonien beim Klonieren wurde ein einfaches Protokoll angewendet, welches geringe Kosten hat, aber das Testen einer Vielzahl von Klonen parallel ermöglichte. DNA, welche direkt nach der Präparation für eine Sequenzierung eingesetzt wurde und dafür eine sehr hohe Reinheit aufweisen muss, wurde mit dem FastPlasmid Kit (5Prime) gewonnen. Plasmid DNA, welche für Transfektionen von HEK293T-Zellen verwendet wurde, wurde mit verschiedenen Kits oder mit einem Protokoll zur Gewinnung sehr großer DNA-Mengen, erhalten.

3.2.9.1 Plasmid DNA Miniprep zum Austesten von Kolonien

Zum Austesten der Kolonien nach einer Ligation wurden je nach Klonierstrategie 2-18

Klone mit einer gelben Eppendorfpipettenspitze gepickt und in ein Übernachtkulturröhrchen mit ca. 3 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Inkubator geschüttelt. Am folgenden Tag wurden etwa 1,5 ml der trüben Bakteriensuspension in 2 ml Eppendorfgefäße dekantiert und 3 min bei 16000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 150 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden zur alkalischen Lyse 150 µl Lösung 2 zugeetzt, die Röhrchen verschlossen, 6-8 mal invertiert und 1 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl Lösung 3 zur Neutralisation und ein 10-12 maliges Invertieren. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 16000 g wurden jeweils vorsichtig 400 µl Überstand (ohne weiße Flocken!) zu 280 µl Isopropanol in neuen 2 ml Eppendorfgefäßen gegeben und es wurde zum Ausfällen der DNA kräftig geschüttelt. Im Anschluss wurden 10 min mit 16000 g zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das kurz an Luft getrocknete Pellet wurde in 100 µl Wasser mit 100 µg/ml RNase aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln (300-400 rpm) inkubiert. Es folgte eine Testrestriktion gemäß Protokoll 3.2.1. mit 3-5 µl.

3.2.9.2 Plasmid DNA Miniprep zur Gewinnung reiner DNA

Für eine Leseweite über 800 bp in der Sequenzierung wurde sehr reine DNA benötigt. Diese wurde mit dem FastPlasmid Kit von 5Prime gewonnen. Dazu wurden entweder die restlichen 1,5 ml einer Übernachtkultur von einem positiven Klon (3.2.9.1) verwendet oder es wurden 1,5 ml direkt von einer Übernachtkultur genutzt, wenn mit hoher Wahrscheinlichkeit (beim Einfügen von Punktmutanten) ein positiver Klon erwartet wurde. Die Bakteriensuspension wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß dekantiert und 3 min bei 16000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl eiskalten RNase- und lysozymhaltigen Lysepuffer resuspendiert, 30 sec gewortext und 3 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde auf eine Säule dekantiert und es wurde 30 sec mit 16000 g zentrifugiert. Anschließend wurde mit 400 µl Waschpuffer gewaschen und schließlich mit 50 µl autoklavierten Wasser eluiert.

3.2.9.3 Plasmid DNA Midi- und Maxiprep

Zur Gewinnung mittlerer Mengen reiner und endotoxinfreier DNA wurden verschiedene Kits (siehe Materialteil 3.1) verwendet. Alle funktionierten nach dem gleichen Prinzip der alkalischen Lyse, dem Binden und Waschen an einer Silika- oder Anionenaustauschermembran und dem Eluieren. Die DNA-Qualität war bei allen Protokollen sehr gut (Transfizierbarkeit, geringe Zelltoxizität, OD_{260}/OD_{280} 1,8-1,9), es wurden aber die Kits von Promega aus Zeit- und Preisgründen bevorzugt und werden daher im Folgenden kurz am Beispiel einer Midiprep dargestellt.

Es wurde nach einer Retransformation (3.3.2) von einer Kolonie eine Vorkultur in 3 ml

LB-Medium (100 mg/ml Ampicillin) für 6-10 h bei 37°C und 200 rpm im Inkubator angelegt. Mit den 3 ml wurde eine große Kultur in 50 ml LB-Medium (100 mg/ml Ampicillin) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Inkubator geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei RT mit 5000 g 10 min zentrifugiert und das Pellet wurde in 3 ml Resuspensionslösung aufgenommen. Anschließend wurden 3 ml Lysispuffer zugesetzt und es wurde 3-5 mal invertiert. Nach 3 min Inkubation bei RT folgte die Zugabe von 3 ml Neutralisationspuffer. Das Lysat wurde 15 min mit 15000 g bei RT zentrifugiert und der Überstand wurde auf eine Filtersäule gegeben, um SDS-/Membran-/Proteinreste zu entfernen. Das geklärte Lysat wurde durch Unterdruck von einer Vorrichtung von Promega auf eine Silikamembran gezogen. Unter ständig anliegenden Unterdruck wurde die Membran mit 5 ml Waschlösung, welche Endotoxine bindet und mit 20 ml einer weiteren Waschlösung gewaschen. Die Membran wurde 5 min an der Luft getrocknet, um Ethanolreste zu beseitigen. Die Säule wurde danach in ein 50 ml Falcon gesteckt, mit 400 µl nukleasefreiem Wasser versetzt und mit 3000 g bei RT für 10 min zentrifugiert. Im Eluat befanden sich anschließend 150-250 µg gereinigte DNA.

3.2.9.4 Plasmid DNA Maxiprep über einen CsCl-Gradienten

Plasmide, mit denen eine größere Anzahl von Versuchen geplant wurde, wurden nach einem Protokoll (Lüddens und Korpi 1997) über einen CsCl-Gradienten gereinigt.

Dazu wurde nach einer Retransformation (3.3.2) von einer Kolonie eine Vorkultur in 3 ml TB-Medium (100 mg/ml Ampicillin) für 6-10 h bei 37°C und 200 rpm im Inkubator angelegt. Mit den 3 ml wurde eine große Kultur in 250 ml TB-Medium (100 mg/ml Ampicillin) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Inkubator geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde am folgenden Tag in 250 ml Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 4°C mit 3000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 60 ml Lösung 2, 4-6 maliges Invertieren und eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von eiskalter Lösung 3 wurde 10-12 mal invertiert und noch einmal 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 4°C mit 27000 g zentrifugiert und der Überstand wurde abfiltriert. Zum geklärten Überstand wurden 100 ml Isopropanol gegeben, es wurde kräftig geschüttelt und nochmals 20 min bei 4°C mit 27000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und in 28 ml TE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 28 g CsCl und 0,2 ml (10mg/ml) Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Die Lösung wurde in 50 ml Falcons 15 min bei RT mit 3000 g zentrifugiert und der geklärte Überstand in 28 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation mit 200000 g bei 25°C für 22-24 h. Die Röhrchen wurden geöffnet und die untere rote Bande (des Plasmids) wurde mit einer Kanüle abgezogen und in ein neues 4,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation mit 400000 g bei 25°C

für 4 h. Wiederum wurden die Röhrchen geöffnet und die untere rote Bande (meist nur eine Bande) wurde mit einer Kanüle abgezogen und in ein 15 ml Falcon überführt. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde 3-4 mal mit NaCl-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt. Die Lösung wurde im Anschluss 1 h und danach 24h gegen 5 l TE-Puffer dialysiert. Es konnten mit dem Protokoll 5-8 mg reine Plasmid DNA gewonnen werden.

3.2.10 RNA-Synthese

Die RNA wurde zum Injizieren in *Xenopus* Oozyten für die Expression von GABA_A-Rezeptoren benötigt. Dazu wurde zunächst 1 µg Plasmid DNA linearisiert, indem mit einem Enzym hinter dem PolyA-Schwanz geschnitten wurde (3.2.1).

Die Reaktion wurde mit dem SP6 MachineKit von Ambion durchgeführt. Die Komponenten aus Tab. 16 wurden dazu in einen 1,5 ml Eppendorfgefäß zusammengegeben und der Ansatz wurde 2 h bei 37°C und 300-400 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde 1 µl DNase zugegeben und 15 min bei 37°C und 300-400 rpm geschüttelt.

Tabelle 16: Komponenten RNA-Synthese.

Komponente	20 µl Reaktion
Nukleasefreies Wasser	bis 20 µl auffüllen
10x Reaktionspuffer	2 µl
2x NTPs/CAP	10 µl
1 µg linearisierte DNA	x
Enzymmix	2 µl

Die Reaktion wurde gestoppt, indem 30 µl nukleasefreies Wasser und 30 µl LiCl-Lösung zugesetzt wurden. Nach starken Schütteln und 30 minütiger Inkubation bei -20°C wurde bei 4°C und 16000 g für 15 min zentrifugiert. Zum Waschen des Pellets wurde zweimal mit 70% Ethanol das Pellet resuspendiert und nochmals bei 4°C und 16000 g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und nach Konzentrationsbestimmung bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Mit dem Protokoll wurden 10-20 µg RNA erhalten.

3.3 Mikrobiologische Arbeiten

3.3.1 Kompetente Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) hergestellt. Besonders an diesem Protokoll ist das langsame Wachstum der Bakterien bei 18-22°C für 24-48 h, welches zu einer höheren Kompetenz, d.h. Aufnahmefähigkeit von DNA, führt. Es wurden 10-50 µl einer DH5α oder DH10B Suspension zu 125 ml frisch autoklavierten SOB-Medium mit Magnesium und ohne Anitbiotikum in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane gegeben und bei 18-22 °C unter Schütteln (200-300 rpm) inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm Wellenlänge nach 24 h und dann alle 1-2 h gemessen und das Wachstum wurde bei einer OD von 0,3-0,6 gestoppt, indem die Kultur auf Eis gelagert wurde. Die gekühlte Suspension wurde für 10 min bei 4°C mit 5000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskalten 40 ml TB2 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Folgend wurde noch einmal für 10 min bei 4°C mit 5000 g zentrifugiert und das Pellet in eiskalten 10 ml TB2 resuspendiert, mit 800 µl DMSO versetzt und zu 100 µl und 500 µl in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und sofort bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Kompetenz wurden am folgenden Tag 100 µl Zellsuspension mit 0,1 pg pUC18 nach dem Protokoll 3.3.2 transformiert und die Kolonien ausgezählt. Es wurde regelmäßig eine Kompetenz von 10^7 - 10^8 Kolonien pro µg – DNA erreicht.

3.3.2 Transformation

100-200 µl chemisch kompetente E.Coli DH5α oder DH10 wurden langsam aufgetaut mit etwa 50 ng DNA versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 60 sec bei 42°C. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis folgte nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium eine Inkubation bei 37°C unter Schütteln (300-400 rpm) für 20-40 min. Von diesem Ansatz wurden 50-200 µl auf vorgewärmte Agarplatten mit 100 µg/ml Carbenecilin ausgestrichen und im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4 Zellkultur

3.4.1 HEK293T

Hek293T-Zellen wurden zur transienten Expression von GABA_A-Rezeptoren und deren Charakterisierung via Patch-Clamp-Messungen verwendet. Außerdem wurden die biochemischen Tests auf Integrität der Fusionsproteine mit Membranpräparationen von HEK293T-Zellen durchgeführt.

3.4.1.1 Auftauen von HEK293T-Zellen

Eine neue Charge an Zellen wurde gestartet, indem 1 ml einer in flüssigen Stickstoff gelagerten DMSO-haltigen Kultur bei 37°C aufgetaut und mit 19 ml vorgewärmten Medium versetzt wurde. 1-2 Tage später wurde das Medium getauscht, um das DMSO zu verdünnen. Bei ausreichender Zelldichte (50-70% Konfluenz) wurden die Zellen wie unter 3.4.1.2 weiter kultiviert.

3.4.1.2 Kultivieren von HEK293T-Zellen

Die Zellen wurden in 550 cm² Kulturflaschen in 20 ml Modified Eagles Medium (MEM, Invitrogen) unter Zusatz von 10% FCS (hitzeinaktiviert), 2 mM L-Glutamin sowie 100 µg/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin im 5% begasten Brutschrank bei 37°C kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen in 6 Well-Platten (10 cm Schalen) mit 2 ml (10 ml) Medium gehalten. In die Schalen für elektrophysiologische Versuche wurden außerdem 3-6 runde Deckgläschen gelegt, so dass die daran angewachsenen Zellen in die Messkammer des Mikroskops eingebracht werden konnten. Die Kultur wurde einmal wöchentlich verjüngt, indem die Zellen mit 3 M NaCl (pH 7,4) vom Boden abgelöst und mit Medium 1:5 verdünnt wurden. Für die 20 ml Vorratsflasche wurden die Zellen noch einmal 1:4 verdünnt und für die Transfektionen etwa 1:2, 1:3, 1:5 oder 1:8 in Abhängigkeit des Transfektionstages (1, 2, 3 oder 4 Tage nach dem Ausplattieren) verdünnt. Die Zellen wurden bis zu den Passagen 20-25 verwendet.

3.4.1.3 Transfektion von HEK293T-Zellen

Die Zellen wurden in 6 Well-Platten (10 cm Schalen) mit 2 ml (10 ml) Medium kultiviert. Die Transfektion der Zellen wurde bei 30-40% Konfluenz mit reiner Plasmid-DNA nach der modifizierten (HBS statt BBS) Calciumphosphatmethode (Lüddens und Korpi 1997) durchgeführt. Dabei lagen die codierenden Gene in eukaryotischen Expressionsvektoren vor. Es wurden für die zu exprimierenden Proteine die Mengen aus Tab. 17 an DNA eingesetzt.

Tabelle 17: cDNA-Mengen für die Transfektionen

Protein	Menge 6 Well-Platte [µg]	Menge 10 cm Schale [µg]
α1	0,2	1
α4	1	5
α6	0,2	1
β1	0,15	0,6
β2	1	5

$\beta 3$	0,04	0,2
δ	0,3	1,5
$\gamma 2$	0,08	0,4
eGFP	0,1	0,5
Konkatamere	1	5

Die Transfektionsansätze wurden gemäß Tab.18 in der angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert. Nach der Zugabe von dem HBS-Puffer wurde der Ansatz zweimal mit der Pipette aufzogen, durchmischt und direkt auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden folgend nach 20-28 h mit frischem Medium versetzt und am nächsten Tag für die Experimente eingesetzt.

Tabelle 18: Komponenten Transfektionsansatz

Komponente	6-Well Platte	10 cm Schale
Wasser	bis 200 μ l auffüllen	bis 1 ml auffüllen
Plasmid DNA	Tab. 17	Tab. 17
2,5 M CaCl_2	12,6 μ l	63 μ l
2x HBS-Puffer	100 μ l	500 μ l

3.4.2 Oozyten aus *Xenopus laevis*

3.4.2.1 Haltung und Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten

Die weiblichen südafrikanischen Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) wurden nach den Regeln der Versuchstierordnung Helsinki bei 18 °C gehalten. Für die Präparation der Oozyten wurden die Frösche in einem 1 l Becherglas mit 0,2% Tricainlösung anästhesiert und im unteren Abdomen aufgeschnitten, um 3-5 Loben mit Oozyten zu entfernen. Es wurden die Zellen grob vereinzelt und mit Kollagenase Typ 1A (0,3 U/ml) 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 96 Well-Platten vereinzelt und bei 18 °C in Frosch-Ringerlösung einen Tag bis zur RNA-Injektion gehalten.

3.4.2.2 Injektion der RNA zur Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Injektion der RNA-Lösungen wurden Glaskapillaren ausgezogen und abgebrochen, so dass eine scharfe Öffnung von etwa 20-40 µm entstand. Die Kapillaren wurden mit Öl gefüllt und es wurde die RNA-Lösung mit Hilfe des Nanoject Injektor (Drummond Scientific) aufgezogen und anschließend wurden je ~42 nl (5-20 ng DNA) in die Zellen injiziert. Die Zellen wurden zurück in die 96 Well-Platten überführt und 3-9 Tage bis zu den Experimenten aufbewahrt.

3.5 Proteinbiochemie

3.5.1 Membranproteine solubilisieren

Es wurde ein Protokoll zur Membranpreparation von HEK293T-Zellen im kleinen Maßstab in Anlehnung an die Publikation (Lüddens und Korpi 1997) entwickelt, um für Western Blots 6-18 Proben parallel zu bearbeiten. Es wurden im Wesentlichen 6-well Platten mit einer Fläche von je ~ 9 cm² verwendet.

Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml eiskalten hypotonen Puffer von der Oberfläche abgelöst und in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis auf dem Kippschüttler wurde 20 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 100 µl SDS-Lysispuffer aufgenommen und mit 3-4 Ultraschallpulsen (50% Power) resuspendiert, wobei die genomische DNA durch die Scherkräfte in kleinere Fragmente zerlegt wurde. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis auf dem Kippschüttler wurden die Proben 30 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert. Es wurden folgend vorsichtig 52 µl Überstand abgenommen und mit 20 µl 4x RotiLoad3 und 8 µl 1M DTT versetzt, 10 min bei 70°C gekocht und die Proben wurden bei -20°C eingefroren.

3.5.2 Aufreinigung von membranständigen Proteinen mittels Biotinylierung

Um nur die plasmamembranständigen Proteine zu untersuchen, wurde ein Protokoll entwickelt, bei dem auf die intakten Zellen eine Lösung mit einem nicht membrangängigen Sulfo-NHS-Biotin, welches mit Lysinen reagiert, gegeben wurde.

Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden noch einmal mit 1 ml PBS versetzt, von der Oberfläche abgelöst und 10 min bei 4°C und 600 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl PBS + 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin versetzt und 30 min auf Eis auf dem Kippschüttler

inkubiert. Die Zellen wurden erneut bei 10 min bei 4°C und 600 g zentrifugiert und dreimal mit 500 µl PBS + 50 mM Tris zum Quenchen der Reaktion gewaschen. Folgend wurde das Pellet in 500 µl hypotonen Puffer resuspendiert und die Probe wurde wie unter Punkt 3.5.1 bis zum SDS-Lysespufferüberstand behandelt. 100 µl des Überstandes wurden mit 800 µl hypotonen Puffer versetzt, um die SDS-Konzentration auf 0,1% in der Neutravidin-Biotinreaktion zu verringern. Es wurden 100 µl Neutravidinagarosesuspension zugegeben und der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler geschüttelt. Die Agarosebeads wurden am nächsten Tag 5 min bei 4°C und 2500 g zentrifugiert und zweimal mit 500 µl hypotonen Puffer gewaschen. Danach wurden zu den Beads 25 µl 4x RotiLoad3 sowie 10 µl 1 M DTT gegeben und es wurde 10 min bei 70°C eluiert. Anschließend wurden die Proben 10 min mit 13000 g zentrifugiert und die Überstände bei -20°C eingefroren.

3.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben aus 3.5.2 und 3.5.3 aufgetaut, nochmals 5 min bei 70°C erhitzt und 10 min mit 13000 g zentrifugiert. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab.19 dargestellt.

Tabelle 19: Komponenten SDS-Gel

Komponente	Trenngel 8%	Sammelgel 4%
Acrylamid (30%)	3,95 ml	0,65 ml
Puffer	10, 91 ml Trenngelpuffer	4,2 Sammelgelpuffer
TEMED	12,7 µl	6,2 µl
APS (10%)	136 µl	45 µl

Das Trenngel wurde gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten wurde das Isopropanol abgegossen und es wurden das Sammelgel sowie der Kamm eingeführt. Der Kamm wurde entfernt und es wurden 5-20 µl der Proben in die Taschen eines 1 mm oder 0,75 mm Gels mit einer Hamiltonspritze aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit 5 µl ProSieveQuadColor Proteinmarker oder NEB BroadRange beladen. Der Gellauf fand in einem ProSieve EX Running Puffer statt, wobei erst 20 min 50 V und dann 90 min 100 V angelegt wurden. Als Apparatur wurde das BioRad MiniProtean II System, welches in einem Eisbad stand, verwendet.

3.5.4 Western Blot

Das Polyacrylamidgel wurde aus den Glasplatten entfernt, 5 min mit Wasser gewaschen und 5 min mit ProSieve EX WesternBlot Transferpuffer equilibriert. Parallel wurden PVDF-Membranen 60 sec in Ethanol, 60 sec in Wasser und 5 min mit ProSieve EX WesternBlot Transferpuffer equilibriert. In dem Puffer wurde das Gel blasenfrei auf die Membran gelegt und auf ein in Blotpuffer getränktes Filterpapier auf der SemiDry-Apparatur aufgebracht, oben wurde nochmals ein in Blotpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Die Apparatur wurde zusammgebaut und der Transfer fand für 20 min bei 15 V statt.

Die Membran wurde danach kurz in Wasser getaucht und kurz an der Luft getrocknet, bis die Proteinspuren erkennbar wurden. Die Membran wurde zurecht geschnitten und die Markerbanden wurden mit dem WesternBright ChemiPen nachgezeichnet. Es folgte zum Blocken unspezifischer Bindungen eine Inkubation in TBST mit 0,5% Milchpulver auf dem Kippschüttler bei RT. Anschließend wurden je nach Größe der Membran und des Gefäßes 5-10 ml Primärantikörperlösung (Verdünnung siehe Tab.2) in TBST mit 0,5% Milchpulver zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde einmal kurz und dreimal 10 min mit TBST gewaschen und es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung siehe Tab.2) in TBST mit 0,5% Milchpulver 1 h bei RT auf dem Kippschüttler. Es wurde die Membran wie zuvor mit TBST und noch einmal 5 min mit TBS gewaschen. Folgend wurde eine Mischung zu gleichen Teilen aus WesternBright Chemilumineszenz Substrat 1 und 2 gleichmäßig auf die Membran verteilt. Es wurde 1 min gewartet, das überschüssige Substrat abgegossen und abschließend der Blot mit dem C-Digid-Scanner eingescannt.

3.6 Elektrophysiologie

3.6.1 Patch-Clamp-Messungen an in HEK293T-Zellen exprimierten GABA_A-Rezeptoren

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden wurden Einzelzellexperimente mit der Patch-Clamp-Methode im Ganzzellmodus durchgeführt. Die Methode basiert auf Entwicklungen von E. Neher und B. Sakmann (Hamill et al 1981). Dabei wird der Zelle ein definiertes Membranpotential nach den Prinzipien der Spannungsklemme aufgezwungen. Die Zelle ist dabei in einer mit Elektrolytlösung (externe Lösung) gefüllten Badkammer in einem inversen Mikroskop. Mit Hilfe einer Patch-Clamp-Elektrode, in der sich ebenfalls eine Elektrolytlösung (interne Lösung) befindet, verschafft man sich einen nach außen isolierten Zugang zum Zellinneren. In dieser Konfiguration bildet die Zelle ein sogenanntes RC-Glied (Abb. 10).

A

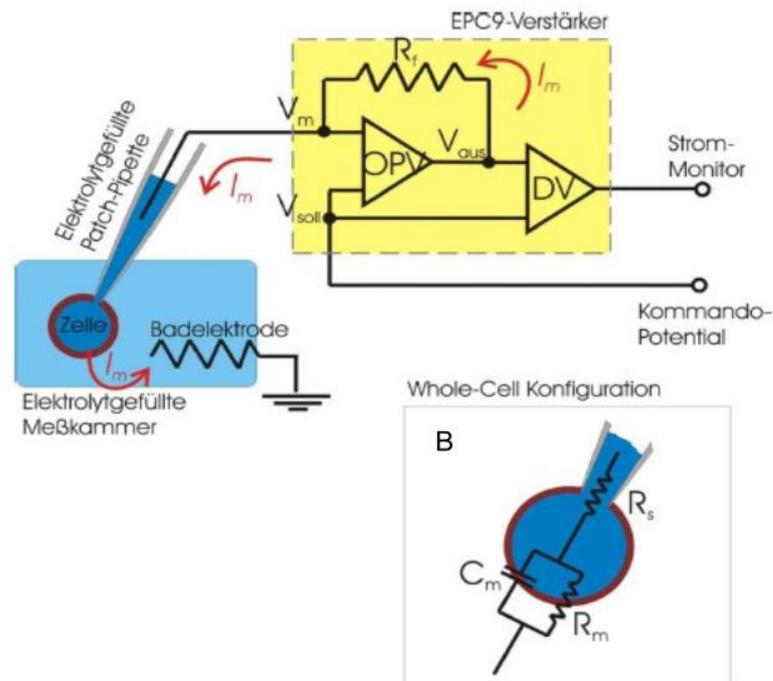


Abbildung 10: Ersatzschaltbild Patch-Clamp A: Vereinfachtes Schaltbild, I_m ist der über die Membran fließende Strom, V_m das Membranpotential, R_f bezeichnet den Rückkopplungswiderstand, OPV und DV den Operations- bzw. Differenzverstärker. **B:** Zelle im Ganz-Zell-Modus, C_m ist die Membrankapazität, R_m und R_s sind der Membranwiderstand bzw. an der Pipettenöffnung auftretende Widerstand. (nach Skript Biophysikalisches Institut Göttingen, 2007)

Die Zelle wird während der Messung bei einem Potential von -40 mV gehalten. Treten Änderungen der Membranleitfähigkeit z.B. infolge von Ionenkanalöffnungen auf, so wird dies registriert, indem ein Operationsverstärker solange aufgrund der Rückkopplung nachregelt, bis $V_m = V_{soll}$ ist. Der über den Rückkopplungswiderstand fließende Strom I_m ist identisch mit dem Strom durch die Membran, welcher zur Aufrechterhaltung der Membranspannung erforderlich ist.

Ein Differentialverstärker greift die abfallende Spannung am Widerstand ab, und dieses Signal wird am Strom-Monitor-Ausgang zur Verfügung gestellt. Das Programm Pulse (Heka) steuert mit Hilfe des im EPC8-Verstärkers implementierten Analog-Digital-Wandlers den Verstärker und berechnet den Strom.

Der Messstand ist in Abb. 11 dargestellt. Dabei ist ein Inversmikroskop (Olympus IX70 mit Fluoreszenzeinrichtung (U-RFL-T) und Phasenkontrastoptik; Objektive: 10x, 40x) auf einem schwingungsgedämpften Tisch (IsoStation Vibration Isolated Workstation) aufgebaut. Seitlich sind ein Manipulator (Narishige NHW-3, Narishige Scientific Lab.) zur Führung der Ableitelektrode und ein Manipulator (Narishige MX-2) mit dem Applikationssystem (SF77B, Warner Instruments), welches einen Lösungswechsel < 20 ms ermöglicht, angebracht. Dem Applikationssystem sind Spritzen (Braun) zur Befüllung von

Lösungen über ein 26-fach Rotationsventil (VICI Valco Instruments) angeschlossen. Die Ableitelektrode besteht aus einer mit dem Puller (P-97 Flaming Brown, Sutter Instruments) in 4 Zyklen ausgezogenen Borosilikatglas-Patchpipette (GB 150F-10 0.5-1.5-100 mm) und einem chlorierten Silberdraht (AG-5T, Science Products, Hofheim). Sie ist an einem Elektrodenhalter (HEKA) fixiert und so mit einem Schlauch zur Druckmanipulation verbunden.

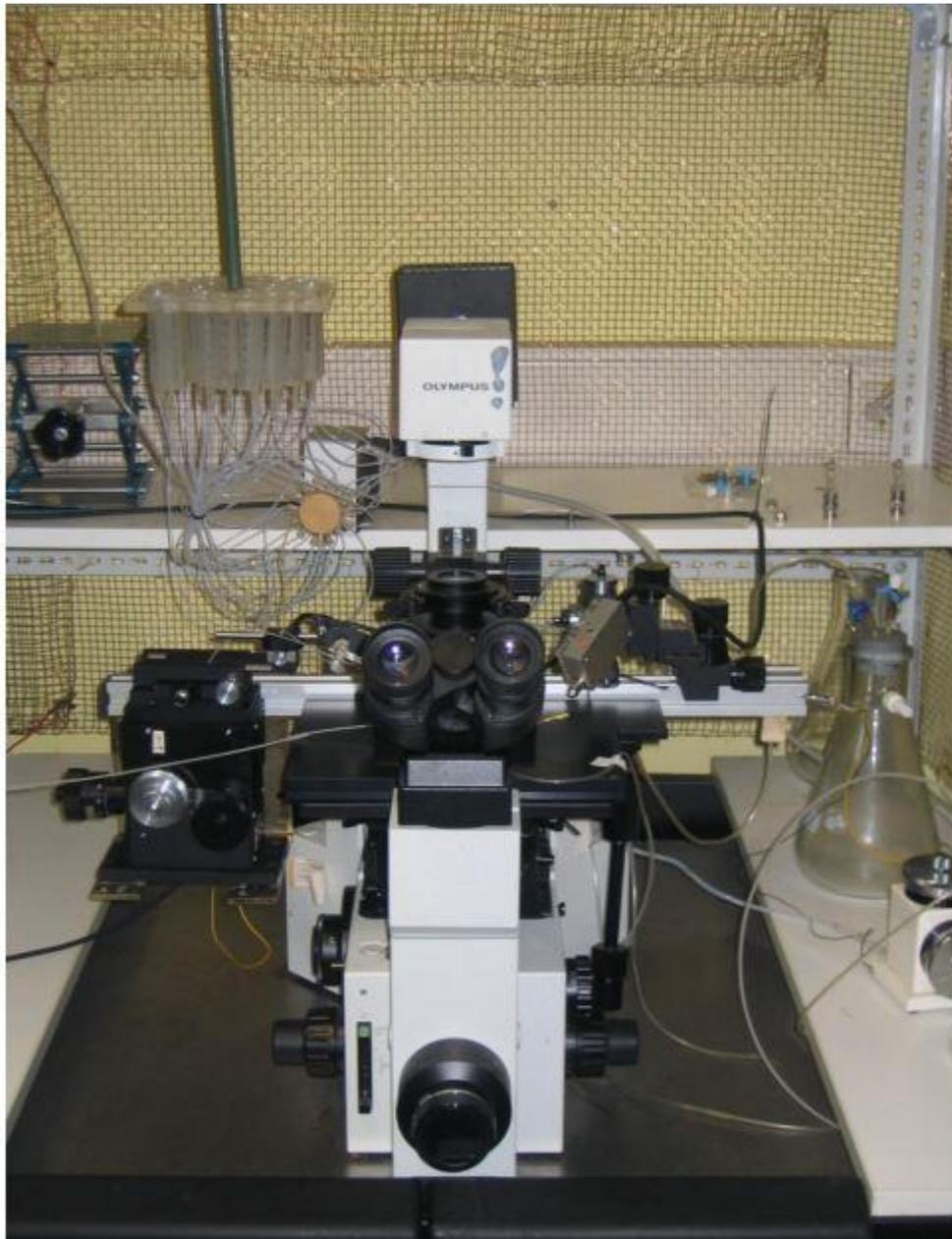


Abbildung 11: Messstand Patch-Clamp-Setup (Im Text erläutert)

Die Badkammer ist mit zwei Glaskapillaren bestückt, wobei eine der Zuführung von Badlösung dient und die andere mit Hilfe einer Vakuumpumpe das Volumen konstant und die Badoberfläche sauber hält. Dadurch wurde die Badlösung alle 30-40 sec ausgetauscht.

Zur Abschirmung von elektrischen Störungen war der gesamte Messstand in einem Faradayschen Käfig aufgebaut.

Für die Messungen wurden die auf runden Deckgläschen gewachsenen Zellen zwei Tage nach der Transfektion in die Messkammer eingebracht. Die intrazelluläre Lösung wurde mit einer 1 ml Spritze mit Sterilfilter (Puradisc 4 mm syringe filter, 0,2 μm PES Membran, Whatman International) und Glaskapillare (MikroFil, CMF34G mit 100 μm OD, WPI) in die ausgezogenen Pipetten gefüllt. Durch kurze Testpulse wurde der Widerstand der Pipetten gemessen, welcher zwischen 2,5 und 10 M Ω liegen sollte.

Im Anschluss wurde eine einzelne grünfluoreszierende Zelle, welche eine erfolgreiche Transfektion anzeigte, ausgewählt. Die Patchpipette wurde mit Hilfe des Mikromanipulators über die Zelle gesteuert, auf die Pipette wurde leichter Überdruck ausgeübt und sie wurde unter Kontrolle des Widerstandes auf die Zelloberfläche gesetzt. Es wurde sofort Unterdruck ausgeübt und eine Haltespannung von -40 mV angelegt, so dass sich die Zellmembran an die Glasöffnung bindet. Nach Erreichen des Gigaseals befand sich die Zelle im Cell-Attached-Modus und es wurde zum Öffnen der Zelle starker Unterdruck angelegt oder ein Spannungssprung von 200-300 mV durchgeführt. Nachdem sich die Zelle im Ganzzellmodus befand, wurde diese vorsichtig vom Boden abgelöst und mit dem Manipulator vor das Applikationssystem befördert. Die transienten Stromspitzen wurden kompensiert, indem die Kapazitäten C_{fast} für die Pipette, C_{slow} für die Membran und der Serienwiderstand R_s am Verstärker eingestellt wurden.

Es folgten Applikationen von täglich frisch angesetzter in Badlösung gelöster Liganden für 4 sec. Zwischen den Applikationen wurde für 30-60 sec mit Badlösung gewaschen.

3.6.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme zur Charakterisierung von in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten GABA_A-Rezeptoren

Für die Messungen wurden Glaskapillaren mit Widerständen von etwa 1-2 M Ω aus Borosilikatglas mit dem Puller Sutter P-1000 gezogen und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Die Zellen wurden 3-9 Tage nach der RNA-Injektion mit einer abgeschmolzenen Pasteurpipette in die Badkammer, welche über ein Ventilsystem (VC3-8xG, Ala Scientific Instruments) mit Badlösung oder in ihr gelösten Liganden mit einer Austauschrate von 1 ml/min gespeist wird, eingebracht. Unter dem Binokular wurden unter akustischer Kontrolle die Ableit- und Strominjektionselektroden mit Hilfe von Mikromanipulatoren in die Zelle eingeführt. Bei einem stabilen Ruhemembranpotential von mindestens -35 mV wurden die Zellen für die Messungen verwendet. Es wurde über den Verstärker Turbo TEC 03 (NPI) eine Haltespannung von -50 mV angelegt und die Liganden wurden für eine Zeit von 30 Sekunden für GABA und bis zu 90 Sekunden für Koapplikationen von GABA mit DS2 appliziert. Zwischen den Applikationen wurde bis zu 5 Minuten gewartet, bis

die Liganden wieder vollständig aus der Badkammer ausgewaschen waren. Die Ströme wurden mit der Software EggWorks 3.02 aufgenommen und mit Clampfit 10.3 analysiert.

3.7 Präparative Chemie

Für die Doktorarbeit wurden in Kooperationen mit der AG Prof. T. Schirmeister (Medizinische Chemie, Universität Mainz) und der AG Prof. F. Rösch (Kernchemie, Universität Mainz) Derivate der Leitstrukturen DS1/2 synthetisiert. Die genauen Synthesen sind in den Diplomarbeiten von Sascha Jung (AG Schirmeister) und von Judith Weber (AG Rösch) dokumentiert.

3.8 Datenanalyse und Statistik

Für die Elektrophysiologie wurden die Stromantworten mit Clampex 8.1 oder 10.3 aufgezeichnet und mit Clampfit 10.3 ausgewertet. Dazu wurden zunächst eine Verstärkungs- und Basiswertkorrektur durchgeführt. Es wurden die Stromamplituden ausgelesen. Zur Berechnung der Modulationsstärken wurden die Amplituden bei positiven Modulatoren bzw. negativen Modulatoren auf den suptypspezifischen EC₂₀- bzw. EC₅₀-Wert normiert. Zur Erstellung von Konzentrations-Effekt-Kurven und Berechnung von EC₅₀-Werten wurden die Stromamplituden auf die Maxima normiert, wobei bei biphasischen Kurven für einen besseren Fit auch Werte bis zu ca. 95% des Maximums toleriert wurden. Außerdem wurden Konzentrations-Effekt-Kurven bei Modulationsstudien an nicht normierten Werten erstellt, um die Modulationsstärke zu berechnen. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die Effekte [I] halblogarithmisch gegen die Konzentrationen [L] aufgetragen. Die Parameter EC₅₀, power p (Äquivalent zum Hillkoeffizienten) und bei nicht normierten Werten die Modulationssärke [A₂] wurden durch einen logistischen Fit nach der Gleichung $I_0/I_{\max} = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (L/EC_{50})^p)$ erhalten. Dieser Fit wurde mit Origin 8.5 durchgeführt, wobei die Fehlergewichtung, wenn nicht anders gekennzeichnet, deaktiviert wurde.

Bei dem Vergleich von Werten auf statistische Signifikanz wurde der Student`s t-test mit Prism 6 durchgeführt, wobei als Signifikanzkriterium $p \leq 0,05$ galt.

4 Ergebnisse

4.1 GABA- und Pentobarbitalsensitivitäten der GABA_A-Rezeptoren

Zu Beginn der Arbeit wurden GABA_A-Rezeptoren, exprimiert aus individuellen Untereinheiten in HEK293T-Zellen, anhand von Dosiswirkungskurven für GABA und Pentobarbital charakterisiert. Diese wurden zum einen gemessen, um EC₂₀- und EC₅₀-Referenzwerte für Modulationstudien von neuen Liganden zu erhalten und zum anderen um Referenzwerte zum Vergleich von aus Konkatanen assemblierenden Rezeptoren zu bekommen. Dabei wurde für alle Assemblierungen das Modell, dass sich die Untereinheiten in der Sequenz X-β-α-β-α, gelesen gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet, angenommen, so dass zwei Bindestellen für GABA enthalten sind (Abb. 12). Die variable Untereinheit X wird dabei von der β-, δ-, oder γ₂-Untereinheit besetzt, was sich aber nur im letzteren Fall durch eine Modulierbarkeit durch Benzodiazepine zeigen lassen sollte.

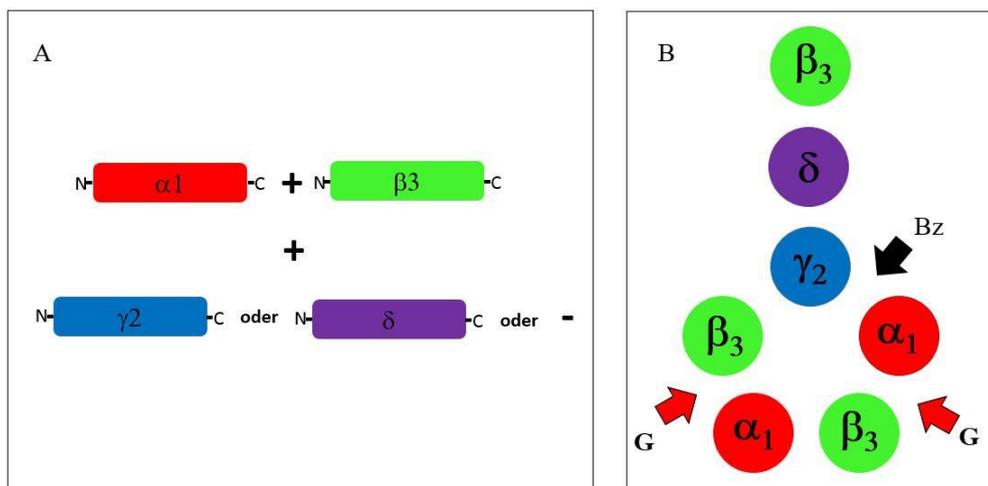


Abbildung 12: Rezeptorasssemblierungen aus individuellen Untereinheiten A: Darstellung der exprimierten Proteine am Beispiel von α₁β₃X-Rezeptoren: Es wurden α₁- und β₃-UE zusammen (-) oder in Kombination mit einer γ₂- oder δ-UE exprimiert. **B:** Anordnung der Untereinheiten im Pentamer nach dem Modell, dass zwei GABA-Bindestellen (G) zwischen den α- und β-UE, sowie im Fall von αβγ₂-Rezeptoren eine Bindestelle für Benzodiazepine (Bz) entstehen. Für αβδ- und αβ-Rezeptoren wird eine δ- bzw. β-UE in der Position der γ₂-UE angenommen.

4.1.1 GABA-Dosiswirkungskurven

Die Sensitivitäten der GABA_A-Rezeptorsubtypen schwankten über drei Größenordnungen. Die extrasynaptisch vorkommenden α₄- und α₆-enthaltenden Rezeptoren zusammen mit der β₃- oder der β₃- und δ-UE waren die sensitivsten Subtypen (Tab. 20). Die synaptisch Lokalisiertes hatten die geringste Sensitivität der hier getesteten Subtypen.

Charakteristisch für die extrasynaptisch vorkommenden Rezeptoren sind ein Hillkoeffizient von etwa 1, eine langsamere Desensibilisierung während der GABA-Applikation (Abb. 13), sowie geringere durch GABA induzierte Maximalströme im Vergleich zu den analogen $\alpha\beta\gamma 2$ -Subtypen. Eine Besonderheit stellen die $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren dar, da sie im Gegensatz zu $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Kombinationen mit der δ -UE die geringste Sensitivität der $\alpha 1$ -Rezeptoren aufwiesen. $\gamma 2$ -enthaltende Rezeptoren hatten dagegen einen Hillkoeffizienten größer 1,5, was als 2 gewertet wird und eine Anwesenheit von Bindestellen indiziert. Außerdem zeigten sie eine schnellere Desensibilisierung.

Tabelle 20: Übersicht GABA-Pharmakologie GABA_A-Rezeptoren exprimiert aus individuellen UE

Subtyp	EC ₅₀ [μM]	p	Stromdichte [pA]	n
$\alpha 1\beta 3$	4,6 + 0,2	1,3 + 0,1	1063 + 695	9(9)
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	5,0 + 0,2	1,5 + 0,2	2476 + 2145	3(6)
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	3,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2680 ± 1737	10(10)
$\alpha 1\beta 3\text{DNTK}\gamma 2$	2,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2000 ± 610	3(3)
$\alpha 1\text{F}64\text{C}\beta 3\gamma 2$	3420 ± 554	1,3 ± 0,2	232 ± 158	9(9)
$\alpha 1\beta 3\delta$	10,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1	566 ± 221	4(4)
$\alpha 4\beta 3^1$	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,3	177 ± 163	6(6)
$\alpha 4\beta 3\gamma 2^1$	6,6 ± 0,6	1,6 ± 0,2	1744 ± 1173	11(16)
$\alpha 4\text{F}64\text{C}\beta 3\gamma 2$	4866 ± 720	0,8 ± 0,1	162 ± 169	8(8)
$\alpha 4\beta 3\delta^1$	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	731 ± 561	3(11)
$\alpha 4\text{F}64\text{C}\beta 3\delta$	519 ± 200	0,9 ± 0,3	48,0 + 25,8	4(8)
$\alpha 6\beta 3$	0,6 + 0,1	1,0 + 0,2	328 + 241	3(10)
$\alpha 6\beta 2\gamma 2$	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1263 ± 677	3(9)
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2137 ± 1250	4(4)
$\alpha 6\text{F}64\text{C}\beta 3\gamma 2$	2131 ± 218	0,9 ± 0,1	320 ± 314	5(5)
$\alpha 6\text{short}\beta 3\gamma 2$	nicht bestimmbar		105 ± 81,3	(3)
$\alpha 6\beta 3\delta$	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	354 ± 178	3(12)
$\alpha 6\text{short}\beta 3\delta$	nicht bestimmbar		kein Strom	(7)

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte ± SD der Maximalströme bei 300-10000 μM GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven und (Stromdichten).¹ Messwerte entstammen meiner Diplomarbeit (2010)

Die Mutation der Aminosäure F64C in den Subtypen $\alpha 1$ und $\alpha 4$ (F63C bei $\alpha 6$) verringerte die GABA-Sensitivität etwa um den Faktor 1000 und die GABA-induzierten Maximalströme um den Faktor 10. Weiterhin desensitisierten die Ströme kaum (Abb. 13). Die $\alpha 6$ short-Variante, bei der 10 Aminosäuren im Loop D der GABA-Bindestelle fehlen (Korpi et al. 1994), zeigte GABA-induzierte Ströme, die aber aufgrund der geringen Amplitude und fehlenden Sättigung nicht auswertbar waren.

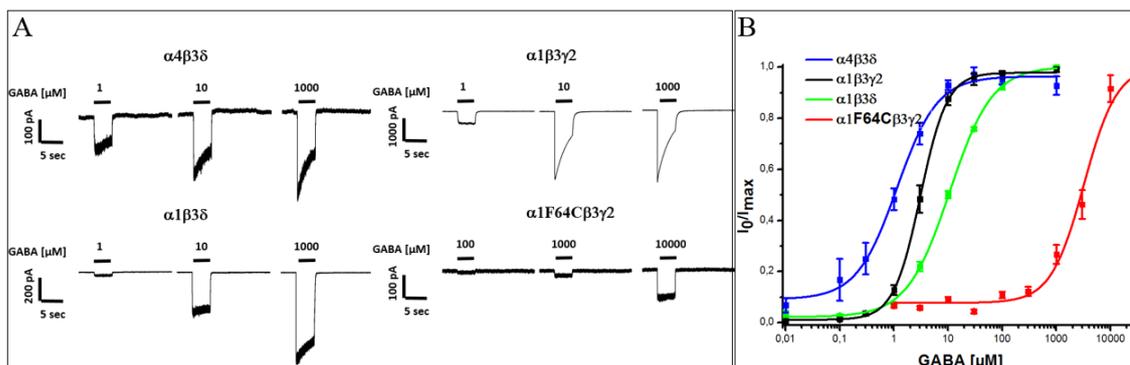


Abbildung 13: GABA-Sensitivitäten ausgewählter Subtypen A: Strombilder; die schwarzen Balken repräsentieren GABA-Applikationen, die Subtypen sind über den Elektrogrammen angegeben. **B:** Dosiswirkungskurven typischer extrasynaptisch vorkommender $\alpha 4\beta 3\delta$ - und $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren, sowie von synaptisch vorkommenden wt- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ - und mit mutierter GABA-Bindestelle $\alpha 1F64C\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die Maximalströme normierten Ströme bei den jeweiligen Konzentrationen (n= 3-10).

4.1.2 Pentobarbital-Dosiswirkungskurven

Pentobarbital aktiviert $GABA_A$ -Rezeptoren über einen anderen Mechanismus als GABA und wurde somit als Kontrolle für die Expressionstärke für in der GABA-Bindestelle mutierter Rezeptoren verwendet. Außerdem kann man das Maß der Effizienz den Kanal zu öffnen für die jeweiligen Liganden abschätzen, wenn man ihre Maximalantworten ins Verhältnis setzt.

Tabelle 21: Pentobarbital-Pharmakologie $GABA_A$ -Rezeptoren exprimiert aus individuellen UE

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	I _{GABA} /I _{PB}	n
$\alpha 1\beta 3$	330 \pm 16	3,6 \pm 0,3	907 + 1003	3,5 + 1,1	10(10)
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	262 \pm 28	2,2 \pm 0,2	1737 + 1102	1,7 + 0,4	4(5)
$\alpha 1F64C\beta 3\gamma 2$	nicht bestimmt		2231 + 1263	0,1 + 0,1	(9)
$\alpha 1\beta 3\delta$	1592 \pm 138	3,1 \pm 0,5	537 + 205	1,1 + 0,4	8(8)
$\alpha 4\beta 3$	309 \pm 68	3,4 \pm 0,5	223 + 195	0,7 + 0,5	5(10)

$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	175 ± 15	$2,1 \pm 0,2$	$2576 + 778$	$1,3 + 0,5$	7(9)
$\alpha 4F64C\beta 3\gamma 2$	175 ± 1	$2,5 \pm 0,1$	$1135 + 437$	$0,2 + 0,3$	9(9)
$\alpha 4\beta 3\delta$	51 ± 6	$1,9 \pm 0,2$	$809 + 536$	$3,3 + 3,4$	10(10)
$\alpha 4F64C\beta 3\delta$	nicht bestimmt		$262 + 147$	nicht bestimmt	(7)
$\alpha 6\beta 3$	344 ± 72	$3,6 \pm 0,3$	$633 + 178$	$0,2 + 0,1$	3(3)
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	80 ± 6	$2,4 \pm 0,4$	$1413 + 881$	$1,5 + 0,8$	6(7)
$\alpha 6F63C\beta 3\gamma 2$	nicht bestimmt		$1154 + 1570$	$0,5 + 0,1$	(5)
$\alpha 6\text{short}\beta 3\gamma 2$	187 ± 25	$2,1 \pm 0,5$	$1325 + 1483$	$0,1 + 0,1$	3(7)
$\alpha 6\beta 3\delta$	115 ± 14	$1,8 \pm 0,3$	$1173 + 785$	$1,1 + 0,7$	5(5)
$\alpha 6\text{short}\beta 3\delta$	nicht bestimmt		$283 + 196$	$0,1 + 0,1$	(7)
$\beta 3$	nicht bestimmbar		$25 + 26$	nicht bestimmbar	(9)
$\beta 3\gamma 2$	nicht bestimmt		$203 + 233$	nicht bestimmbar	(8)
$\beta 3\delta$	nicht bestimmt		$157 + 141$	nicht bestimmbar	(11)

Die EC_{50} - und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Ratio I_{GABA}/I_{PB} wurde durch Maximalantworten der Liganden errechnet und ist ein Maß für deren Effizienz und sind als Mittelwerte \pm SD ausgegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 500-3000 μ M Pentobarbital. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

Die berechneten Werte sind in Tab. 21 dargestellt und es ist ersichtlich, dass sich die binären $\alpha\beta$ -Kombinationen in den EC_{50} -Werten und Hillkoeffizienten kaum unterscheiden. Fügt man die $\gamma 2$ -UE hinzu, so steigen die Sensitivitäten etwas, wobei die Verschiebung bei $\alpha 6$ mit dem Faktor ~ 4 am stärksten ist. Außerdem unterscheiden sich die Strombilder deutlich. Die $\gamma 2$ -enthaltenden Kombinationen (exemplarisch für $\alpha 1$ in Abb. 14 dargestellt) zeigten eine schnellere Aktivierung als die analogen $\alpha\beta$ -Rezeptoren. Weiterhin zeigten die binären Rezeptoren einen größeren Stromanstieg beim Auswaschen des Liganden, was auf eine stärkere Inhibition während der Applikation hinweist. Fügt man eine δ -UE hinzu, so stiegen die Sensitivitäten für $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -Rezeptoren ebenfalls an, wobei der $\alpha 4\beta 3\delta$ -Subtyp in dieser Messreihe der Sensitivste war. Ähnlich wie bei der GABA-Sensitivität zeigten die $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren die geringste Sensitivität $\alpha 1$ -enthaltender Rezeptoren.

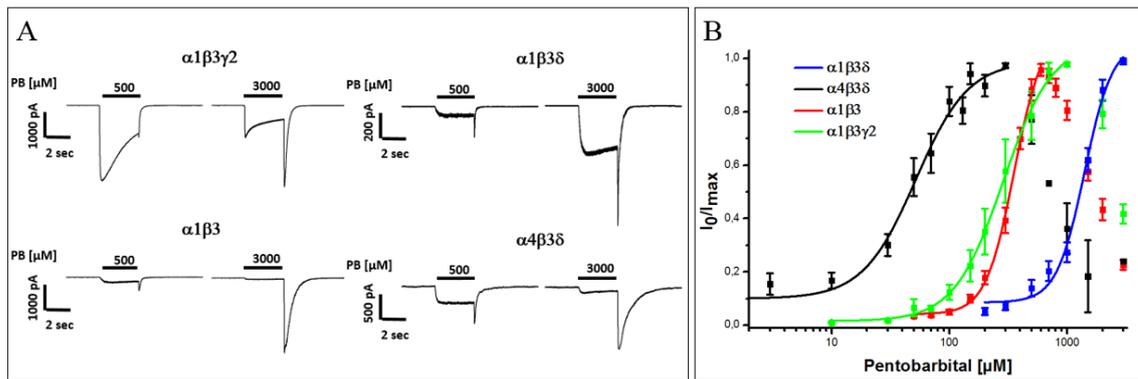


Abbildung 14: Pentobarbital-Sensitivitäten ausgewählter Subtypen **A:** Strombilder; die schwarzen Balken repräsentieren Pentobarbital-Applikationen (PB), die Subtypen sind über den Elektrogrammen angegeben. **B:** Dosiswirkungskurven $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren, sowie des hoch sensitiven $\alpha 4\beta 3\delta$ -Subtyps. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die Maximalströme normierten Ströme bei den jeweiligen Konzentrationen ($n= 5-10$).

Die in der GABA-Bindestelle mutierten Rezeptoren und die $\alpha 6$ short-enthaltende Kombinationen unterschieden sich in ihrer Pentobarbitalpharmakologie nicht von den Wildtyprezeptoren.

Deutliche Unterschiede zwischen den Subtypen treten auf, wenn man die Verhältnisse der Maximalströme zwischen GABA und Pentobarbital darstellt (Abb. 15). Ein Wert von 1 gibt dabei an, dass beide Liganden den Kanal mit gleicher Effizienz öffnen. Werte kleiner 1 zeigen hingegen an, dass GABA eine geringere Effizienz hat. Deutlich erkennbar ist, dass die Effizienz für GABA bei allen Mutanten, sowie den $\alpha 6$ short-Kombinationen deutlich abnahm. Außerdem hatten die $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren eine Ratio von etwa 1 oder größer. Bei den binären $\alpha\beta$ -Kombinationen fällt auf, dass für $\alpha 1$ eine Ratio von über 3 bestimmt wurde und für $\alpha 4$ sowie $\alpha 6$ von deutlich unter 1 erhalten wurden. Besonders $\alpha 6\beta 3$ -Rezeptoren zeigten mit einem Wert von $\sim 0,2$, dass GABA eine sehr geringe Effizienz hat, den Kanal zu öffnen. Die $\alpha 4\beta 3\delta$ -Rezeptoren fallen durch die sehr große Streuung der Ratio auf. Weiterhin ist Tab. 21 zu entnehmen, dass sich bei $\gamma 2$ - $\beta 3$ - oder δ - $\beta 3$ -Kombinationen pentobarbitalsensitive Rezeptoren assemblierten, die eine höhere Stromdichte als $\beta 3$ -Homomere, jedoch eine deutlich geringere Stromdichte als bei Zugabe einer α -UE hatten.

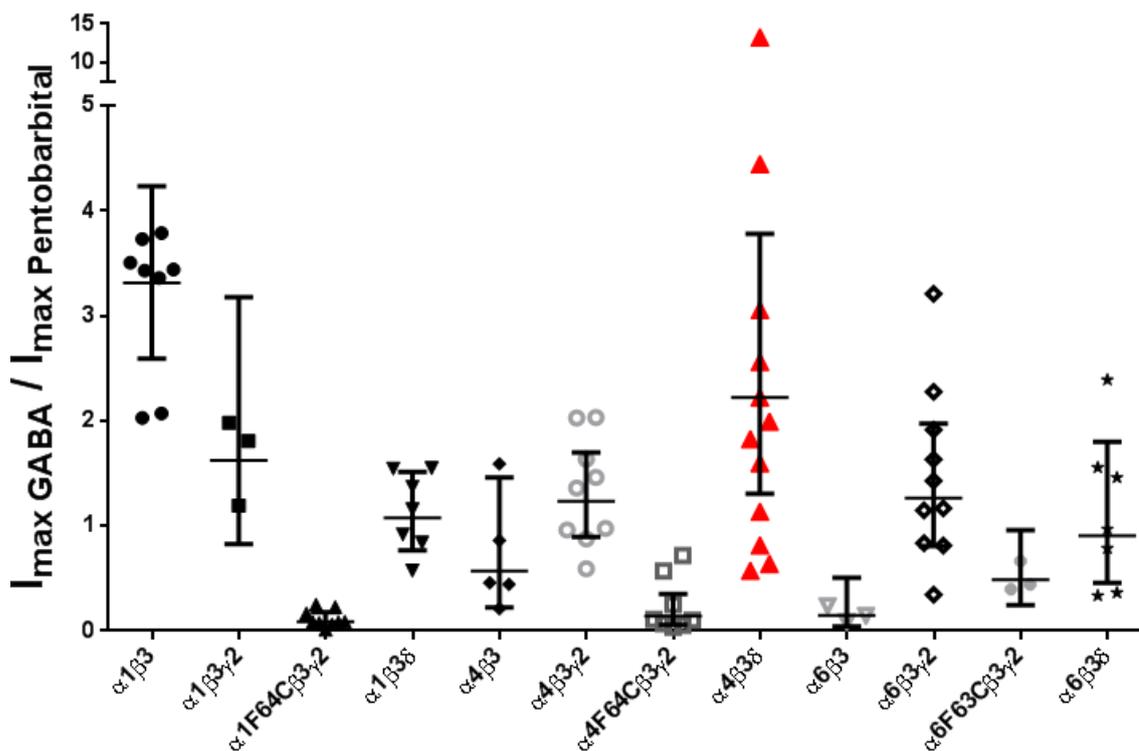


Abbildung 15: GABA-Effizienz diverser Subtypen. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte \pm 95% CI auf Pentobarbital normierter Maximalantworten durch GABA. Ein Messpunkt steht für die gemessene Ratio einer Zelle.

4.2 Auf DS1/2 basierende Liganden als potentielle δ -selektive Modulatoren

4.2.1 Screening von DS1/2 Derivaten mithilfe von $\alpha 6\beta 3\delta$ als Target

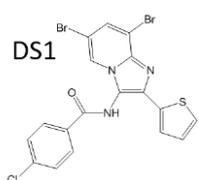
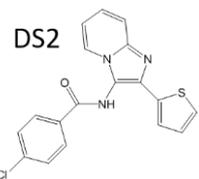
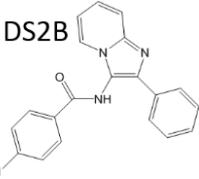
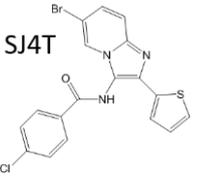
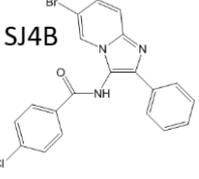
Ausgehend von einer Publikation (Wafford et al. 2009) wurde von Kooperationspartnern ein Set an Liganden erstellt, um eine Orientierung zu erlangen, welche Seiten der Leitstruktur modifiziert werden können, ohne die Affinität und Selektivität wesentlich zu beeinflussen. Als Target wurden in HEK-Zellen exprimierte $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren verwendet, da diese einen Prototyp für extrasynaptisch vorkommende Rezeptoren darstellen und im Labor in elektrophysiologischen sowie proteinbiochemischen Versuchen sehr gut interpretierbare Ergebnisse liefern.

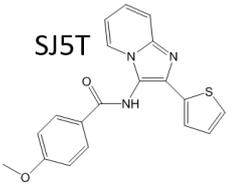
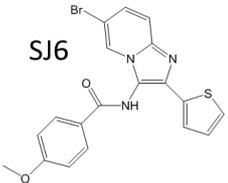
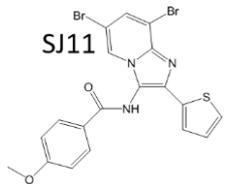
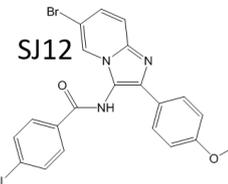
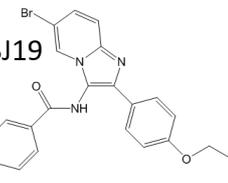
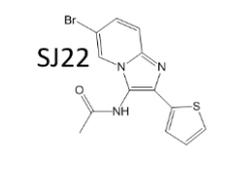
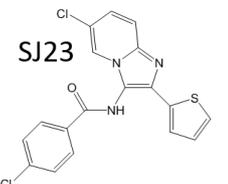
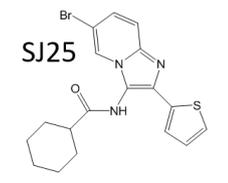
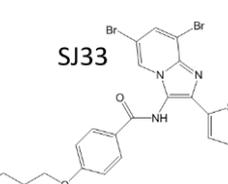
Die Liganden und die bestimmten Parameter sind in Tab. 22 aufgeführt. Daraus ist ersichtlich, dass die Bromierungen am Imidazopyridin-System einen deutlichen Einfluss auf die Sensitivität hatten. So zeigten Derivate mit zweifacher Bromierung in der 6- und 8-Position wie zum Beispiel DS1 etwa 10-fach höhere Sensitivitäten als nicht bromierte Derivate, z.B. DS2. Erfolgte eine Bromierung in der 6-Position, so erhielt man nur etwas geringere Sensitivitäten als bei einer Zweifachbromierung, z.B. SJ4T. Eine Chlorierung in dieser Position hat zu einer höheren Effizienz bei ähnlicher Potenz geführt (SJ23).

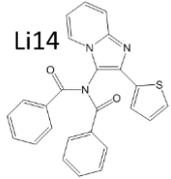
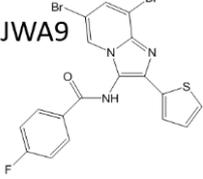
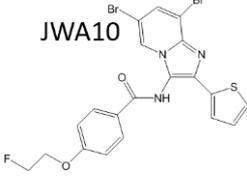
Modifikationen am p-Chlorsubstituenten des Benzamidensystems von DS1 bzw. DS2 hatten zum Teil Liganden mit höheren Sensitivitäten zur Folge. Eine Methoxygruppe in der para-Position veränderte die Potenz kaum (SJ11), eine Butoxygruppe führte zu den Liganden mit der höchsten Sensitivität (SJ33). Als potentiell [^{18}F]-markierbare Substanzen wurden JW9 mit einer Fluorethoxygruppe und JW10 mit einem Fluor in para-Stellung synthetisiert, wobei JW10 mit einer Sensitivität von ~ 40 nM eine ähnliche Wirkung wie SJ33 hatte.

Der bioisostere Austausch des Thiophenrings gegen einen Benzolring hatte keinen Effekt auf die Potenz oder Effizienz, was beispielsweise beim Vergleich von DS2 und DS2B auffällt. Eine Modifikation dieses Benzolrings in para-Stellung durch eine Methoxygruppe verringerte die Effizienz deutlich, wobei die Potenz wenig verändert wurde (SJ12). Ein längerer Rest (SJ19) führte jedoch zum Verlust der modulierenden Wirkung.

Tabelle 22: Screening Modulation DS-Derivate an $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren

Ligand	EC ₅₀ [μM]	p	Modulation [%]	n
DS1 	127 \pm 26	1,5 \pm 0,4	802 \pm 68	7
DS2 	2286 \pm 674	0,9 \pm 0,1	994 \pm 520	5
DS2B 	8494 \pm 6884	0,9 \pm 0,2	336 \pm 137	7
SJ4T 	223 \pm 32	1,5 \pm 0,3	363 \pm 19	4
SJ4B 	115 \pm 78	1,3 \pm 1,0	325 \pm 87	6

<p>SJ5T</p> 	5216 ± 1127	1,5 ± 0,3	504 ± 104	5
<p>SJ6</p> 	486 ± 192	1,1 ± 0,2	485 ± 81	6
<p>SJ11</p> 	119 ± 39	1,5 ± 0,3	435 ± 83	4
<p>SJ12</p> 	263 ± 84	1,4 ± 0,3	109 ± 11	4
<p>SJ19</p> 	10 µM: 9,2 ± 3,4 % → kein Effekt ≤ 1µM			5
<p>SJ22</p> 	10 µM: -3,2 ± 2,5 % → kein Effekt ≤ 1µM			3
<p>SJ23</p> 	375 ± 67	2,8 ± 1,2	1469 ± 638	3
<p>SJ25</p> 	596 ± 171	1,2 ± 0,2	714 ± 95	7
<p>SJ33</p> 	38 ± 8	1,0 ± 0,2	208 ± 10	7

<p>Li14</p> 	10 μ M: 54 ± 17 % \rightarrow kein Effekt $\leq 1 \mu$ M			4
<p>JWA9</p> 	44 ± 5	$1,6 \pm 0,2$	271 ± 25	6
<p>JWA10</p> 	322 ± 97	$0,8 \pm 0,1$	212 ± 24	6

Die EC_{50} -, p-Werte und Modulationsstärken wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf den EC_{20} für GABA normierten Strömen bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven.

Die Substanzen SJ19 und SJ22 zeigten keinen positiv modulierenden Effekt, daraus kann aber nicht geschlossen werden, dass keine Bindung stattfindet. Um zu überprüfen, ob diese Liganden Nullmodulatoren sind, wurden Koapplikationen mit GABA und SJ4T durchgeführt. Bei einer Kompetition des strukturell ähnlichen SJ4Ts würde dessen Potentierung vermindert werden, was im Falle von SJ12 gezeigt werden konnte, da dieser Ligand im Vergleich zu SJ4T eine geringere Modulationsstärke aufweist (Abb.16).

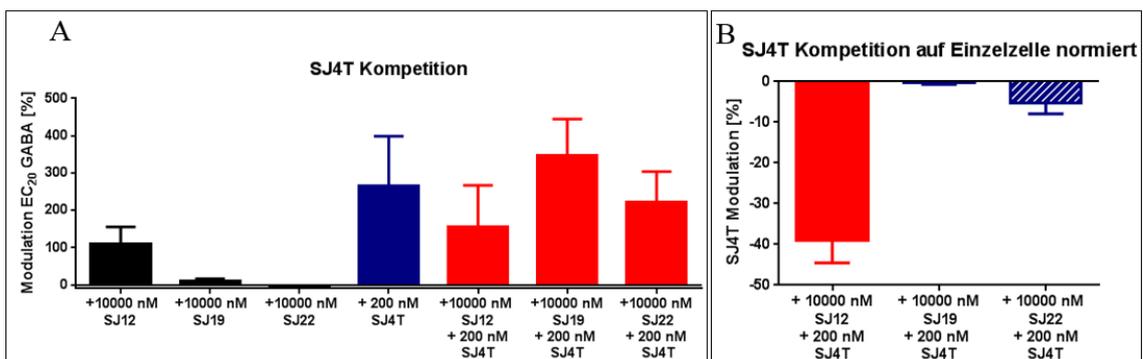


Abbildung 16: Kompetition SJ4T A: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Modulationen des EC_{20} für GABA von SJ12, SJ19, SJ22 und SJ4, sowie der Test auf Kompetition von SJ4T mit SJ12, SJ19 und SJ22. (n= 3-5) B: SJ4T-Kompetition mit den jeweiligen Liganden, wobei für jede Zelle auf die SJ4T-Werte normiert und die Mittelwerte \pm SEM berechnet wurden (n=3).

Im Folgenden wurden die Liganden DS1, DS2, SJ4T und SJ33 genauer analysiert. Die

ersten beiden Liganden wurden ausgewählt, da sie als Referenz in der Literatur erwähnt sind und käuflich zu erwerben sind. SJ4T wurde in die Analyse mit eingeschlossen, da es in Bezug auf die Bromierung am Imidazopyridin-System strukturell zwischen DS1 und DS2 liegt. Weiterhin zeigte sich in einem von Prof. Dr. U. Schmitt durchgeführten Vorversuch im Tiermodell mit Pgp-KO-Mäusen eine sedierende Wirkung, was als Hinweis auf eine Hirngängigkeit gedeutet wurde. Zudem wurde SJ33 als der Ligand mit der höchsten Sensitivität und aufgrund der potentiellen Modifizierbarkeit zur Ligandenimmobilisierung an dem Butoxyrest ausgewählt.

Als Rezeptoren wurden aufgrund der physiologischen Relevanz δ -enthaltende Rezeptoren jeweils mit der $\alpha 1$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -Untereinheit zusammen mit einer $\beta 3$ -Untereinheit ausgewählt. Es wurden als Kontrollen die dazugehörigen binären Kombinationen aus $\alpha\beta$ -Rezeptoren sowie die $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren durchgeführt.

4.2.2 Evaluierung von DS1 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

Die Messwerte für DS1 sind in Tabelle 23 dargestellt. Dabei fällt auf, dass zwischen den δ -enthaltenden Subtypen keine Unterschiede in der Sensitivität liegen, $\alpha 4$ -enthaltende Rezeptoren jedoch etwas geringer moduliert werden. Binäre $\alpha\beta$ -Kombinationen hatten ähnliche EC_{50} -Werte wie analoge Rezeptoren mit der δ -UE, wobei $\alpha 6\beta 3$ -Rezeptoren am stärksten moduliert wurden (Abb. 17). $\gamma 2$ -enthaltende Rezeptoren hatten etwa 7-10-fach höhere EC_{50} -Werte und zeigten eine deutlich geringere Modulierbarkeit als die entsprechenden $\alpha\beta$ - bzw. $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptoren, wobei bei $\alpha 4$ gar kein Effekt gemessen werden konnte.

Tabelle 23: Evaluierung von DS1 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

Subtyp	EC_{50} [μM]	p	Modulation [%]	n
$\alpha 1\beta 3$	100 ± 9	$1,9 \pm 0,3$	35 ± 2	4
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	1001 ± 518	$0,6 \pm 0,2$	194 ± 205	3
$\alpha 1\beta 3\delta$	104 ± 24	$1,0 \pm 0,1$	761 ± 54	6
$\alpha 4\beta 3$	60 ± 22	$1,7 \pm 0,7$	168 ± 29	4
$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	10 μM : $-6,5 \pm 6,8$ % \rightarrow kein Effekt $\leq 1 \mu M$			4
$\alpha 4\beta 3\delta$	148 ± 79	$0,8 \pm 0,2$	297 ± 14	3
$\alpha 6\beta 3$	166 ± 16	$1,2 \pm 0,1$	1144 ± 29	7
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	874 ± 154	$1,3 \pm 0,3$	157 ± 10	7

$\alpha 6\beta 3\delta$ ohne GABA	479 ± 55	$2,6 \pm 0,5$		4
$\alpha 6\beta 3\delta$ EC_{20}	127 ± 26	$1,5 \pm 0,4$	802 ± 68	7
$\alpha 6\beta 3\delta$ EC_{50}	$37,2 \pm 2,9$	$1,5 \pm 0,1$	146 ± 6	5

Die EC_{50} -, p-Werte und Modulationsstärken wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf den EC_{20} für GABA normierten Strömen bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. n= Anzahl der gemessenen Zellen. Bei $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren wurden zusätzlich die Parameter in Abwesenheit von GABA und mit GABA beim EC_{50} bestimmt.

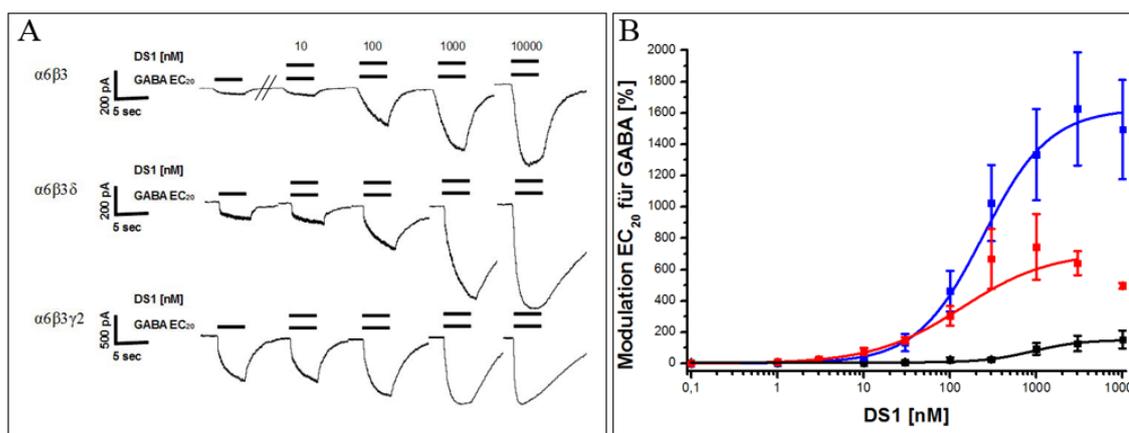


Abbildung 17: DS1-Modulation an $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren **A:** Stromantworten der einzelnen Subtypen. Schwarze Balken kennzeichnen die Ligandenapplikationen. Zwischen den Applikationen wurden die Auswaschzeiten (60-90 sec) entfernt (durch zwei Striche dargestellt) **B:** Dosiswirkungskurven $\alpha 6$ -enthaltender Rezeptoren. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die EC_{20} -Werte für GABA normierten Ströme bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen (n= 4-7). $\alpha 6\beta 3$ (blau)-Rezeptoren werden dabei gefolgt von $\alpha 6\beta 3\delta$ (rot)- und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ (schwarz)-Rezeptoren am stärksten moduliert. Aufgrund der Inhibition bei 10 μM ($\alpha 6\beta 3\delta$) wurde der Wert für einen besseren Fit ausgeschlossen.

Alle Rezeptoren konnten durch DS1 direkt aktiviert werden, wobei nur $\alpha 6\beta 3$ -, $\alpha 4\beta 3\delta$ - und $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren Effekte größer als 20 % des durch GABA induzierten Maximalstroms aufwiesen (Abb 18). Bei $\alpha 4\beta 3\delta$ - und $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren erreichten die durch DS1 induzierten Ströme größere Werte als die durch GABA. Für $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren betrug der EC_{50} -Wert der direkten Aktivierung $477 \pm 55 \mu M$ und ist damit etwa um den Faktor 5 im Vergleich zur Modulation des EC_{20} für GABA höher. Der Hillkoeffizient mit $2,6 \pm 0,5$ deutet einen kooperativen Prozess unter Beteiligung von mindestens zwei eher aber drei Bindestellen an.

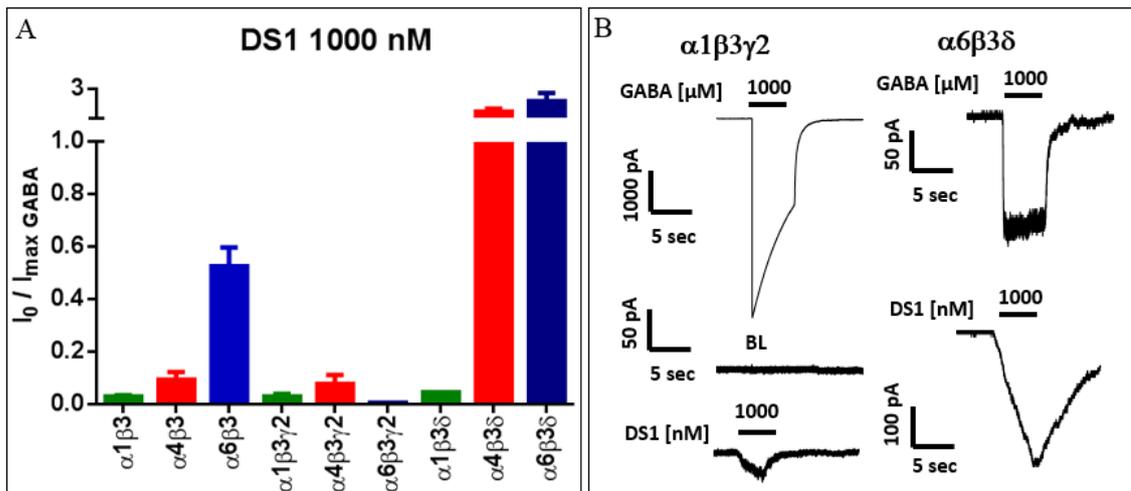


Abbildung 18: Direkte Aktivierung durch DS1 **A:** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Antworten durch 1000 μ M DS1 normiert auf 1000 μ M GABA. **B:** Repräsentative Strombilder. Die schwarzen Balken stellen die Ligandenapplikationen dar. BL steht für Badlösung ($n=3-6$).

4.2.3 Evaluierung von DS2 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

DS2 wurde als weiterer Ligand an verschiedenen Subtypen getestet, da diese Substanz in der Literatur als selektiv für δ -enthaltende Rezeptoren beschrieben worden ist (Wafford et al. 2009 und Jensen et al. 2013). Diese Ergebnisse konnten in Modulationsstudien von GABA induzierten Strömen für die $\alpha 1$ und $\alpha 4$ bestätigt werden (Abb. 19), für die $\alpha 6$ hingegen nicht. $\alpha 6\beta 3$ -Rezeptoren wiesen dabei eine ähnliche Sensitivität wie $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren auf (Tab. 24). $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren zeigten dagegen keine Modulierbarkeit.

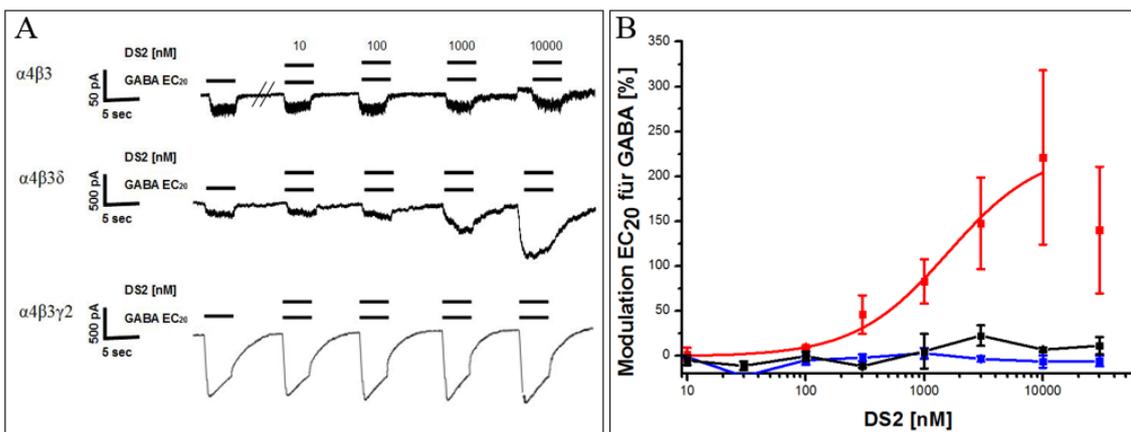


Abbildung 19: DS2-Modulation an $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren **A:** Stromantworten der einzelnen Subtypen. Schwarze Balken kennzeichnen die Ligandenapplikationen. Zwischen den Applikationen wurden die Auswaschzeiten (60-90 sec) entfernt (durch zwei Striche dargestellt) **B:** Dosis-Wirkungs-Kurven $\alpha 4$ -enthaltender Rezeptoren. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die EC_{20} -Werte für GABA normierten Ströme bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen ($n=4-7$). Deutliche Modulierbarkeit zeigen nur $\alpha 4\beta 3\delta$ (rot)-Rezeptoren. $\alpha 4\beta 3$ (blau)- und $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ (schwarz)-Rezeptoren zeigen keine dosisabhängigen Effekte. Aufgrund der Inhibition bei 30 μ M ($\alpha 4\beta 3\delta$) wurde der Wert für einen besseren Fit ausgeschlossen.

Tabelle 24: Evaluierung von DS2 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Modulation [%]	n
$\alpha 1\beta 3$	10 μ M: $8,5 \pm 10,9$ % \rightarrow kein Effekt $\leq 1\mu$ M			3
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	10 μ M: $-4,0 \pm 15,9$ % \rightarrow kein Effekt $\leq 1\mu$ M			3
$\alpha 1\beta 3\delta$	859 ± 97	$1,0 \pm 0,1$	213 ± 8	3
$\alpha 4\beta 3$	10 μ M: $6,8 \pm 2,6$ % \rightarrow kein Effekt $\leq 10 \mu$ M			3
$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	10 μ M: $-2,9 \pm 4,4$ % \rightarrow kein Effekt $\leq 1\mu$ M			3
$\alpha 4\beta 3\delta$	965 ± 353	$1,2 \pm 0,4$	231 ± 76	3
$\alpha 6\beta 3$	2439 ± 820	$3,1 \pm 3,3$	588 ± 254	3
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	kein Effekt $\leq 1\mu$ M			5
$\alpha 6\beta 3\delta$	2286 ± 674	$0,9 \pm 0,1$	993 ± 519	5

Die EC₅₀-, p-Werte und Modulationsstärken wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf den EC₂₀ für GABA normierten Strömen bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. n= Anzahl der gemessenen Zellen.

In Abb. 20 sind die auf GABA normierten durch DS2 (1 μ M) induzierten Ströme dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass alle Subtypen geringe (unter 20% der GABA-Antwort) Ströme zeigten. Es wird daher deutlich, dass DS2 an alle hier getesteten Subtypen bindet, aber zum Teil nur mit sehr geringer Effizienz den Kanal öffnet.

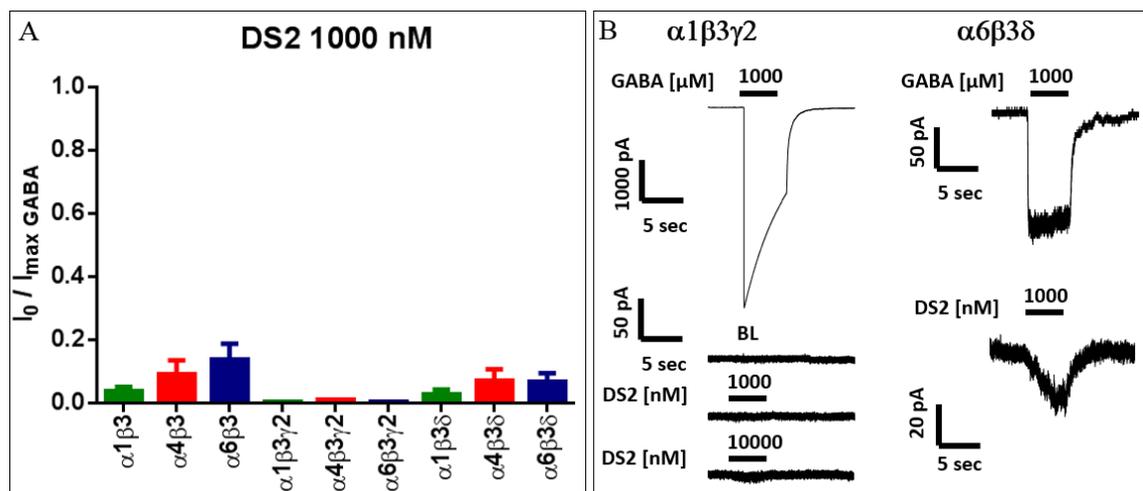


Abbildung 20: Direkte Aktivierung durch DS2 **A:** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Antworten durch 1000 μ M DS2 normiert auf 1000 μ M GABA. **B:** Repräsentative Strombilder. Die schwarzen Balken stellen die Ligandenapplikationen dar. BL steht für Badlösung (n= 3-5).

4.2.4 Evaluierung von SJ4T an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

SJ4T zeigte in Bezug auf die Selektivität ähnliche Ergebnisse wie DS1 in 4.2.2, aber insgesamt eine etwas geringere Modulationsstärke (Tab. 25).

Tabelle 25: Evaluierung von SJ4T an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Modulation [%]	n
$\alpha 1\beta 3$	234 \pm 11	2,2 \pm 0,2	177 \pm 3	4
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	kein Effekt $\leq 1\mu$ M			4
$\alpha 1\beta 3\delta$	183 \pm 34	1,5 \pm 0,4	698 \pm 44	4
$\alpha 4\beta 3$	420 \pm 293	1,0 \pm 0,2	85,6 \pm 8,4	4
$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	10 μ M: -1,8 \pm 3,4 % \rightarrow kein Effekt $\leq 1\mu$ M			3
$\alpha 4\beta 3\delta$	187 \pm 51	1,1 \pm 0,1	328 \pm 17	3
$\alpha 6\beta 3$	508 \pm 117	3,1 \pm 1,2	489 \pm 43	4
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	453 \pm 80	0,9 \pm 0,1	68,5 \pm 3,6	8
$\alpha 6\beta 3\delta$	223 \pm 32	1,5 \pm 0,3	363 \pm 19	4

Die EC₅₀-, p-Werte und Modulationsstärken wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf den EC₂₀ für GABA normierten Strömen bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven.

Wie DS1 und DS2 zeigte SJ4T bei allen Subtypen eine Aktivierung in Abwesenheit von GABA, aber nur bei $\alpha 4\beta 3\delta$ und $\alpha 6\beta 3\delta$ sind deutliche Ströme über 40% des GABA induzierten Maximalstromes mit 1000 nM gemessen worden (Abb. 21).

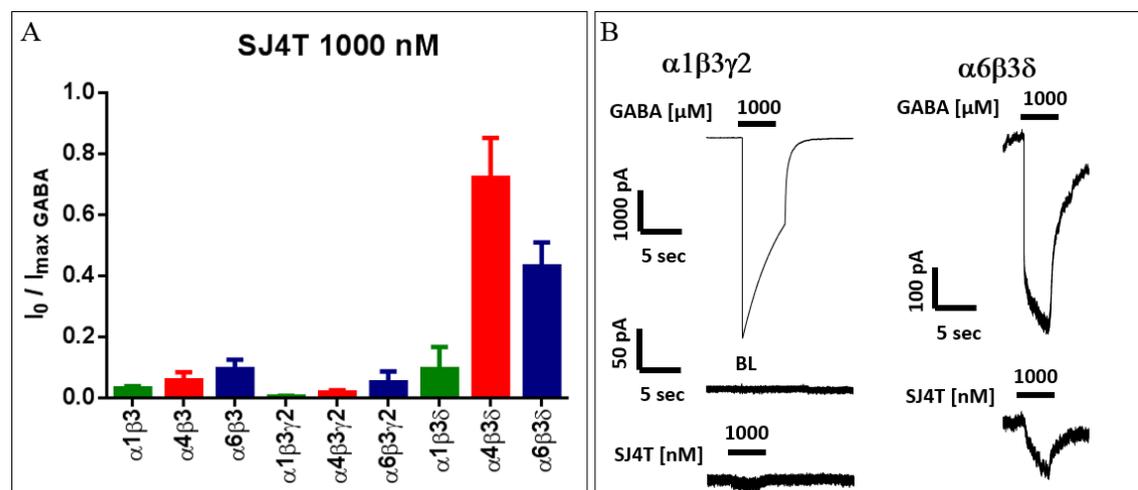


Abbildung 21: Direkte Aktivierung durch SJ4T **A:** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Antworten durch 1000 μ M SJ4T normiert auf 1000 μ M GABA. **B:** Repräsentative Strombilder. Die schwarzen Balken stellen die Ligandenapplikationen dar. BL steht für Badlösung (n= 3-5).

4.2.5 Evaluierung von SJ33 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

Als vierter Ligand wurde SJ33 getestet, wobei ein ähnliches Selektivitätsprofil wie bei den zuvor beschriebenen Liganden aufgetreten ist. Durch die insgesamt geringere Effizienz von SJ33 konnten nicht für alle Subtypen EC_{50} -Werte ermittelt werden (Tab. 26).

Tabelle 26: Evaluierung von SJ33 an $\alpha 1,4,6\beta 3x$ -Rezeptoren

Subtyp	EC_{50} [μM]	p	Modulation [%]	n
$\alpha 1\beta 3$	100 μM : $4,4 \pm 1,6$ %, 1000 μM : $8,4 \pm 4,3$ % ¹			3
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	100 μM : $23,5 \pm 4,9$ %, 1000 μM : $44,4 \pm 9,1$ % ¹			4
$\alpha 1\beta 3\delta$	$44,4 \pm 8,1$	$1,1 \pm 0,2$	497 ± 36	5
$\alpha 4\beta 3$	100 μM : $27,5 \pm 9,3$ %, 1000 μM : $5,6 \pm 8,3$ % ¹			4
$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	100 μM : $1,5 \pm 7,1$ %, 1000 μM : $-3,5 \pm 2,4$ % ²			4
$\alpha 4\beta 3\delta$	$31,9 \pm 4,0$	$3,0 \pm 1,8$	$69,6 \pm 3,4$	3
$\alpha 6\beta 3$	$43,6 \pm 1,3$	$1,8 \pm 0,1$	$81,8 \pm 1,0$	7
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	100 μM : $5,0 \pm 5,5$ %, 1000 μM : $-8,6 \pm 9,7$ % ²			3
$\alpha 6\beta 3\delta$	$38,4 \pm 8,0$	$1,0 \pm 0,2$	208 ± 10	7

Die EC_{50} -, p-Werte und Modulationsstärken wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf den EC_{20} für GABA normierten Strömen bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. n= Anzahl der gemessenen Zellen. ¹signifikanter Effekt bei mindestens einer Konzentration (100 μM), aber kein Fit möglich. ²kein signifikanter Effekt

Wie Abb. 22 zu entnehmen ist, bindete auch SJ33 an alle hier getesteten Subtypen. Die Effizienz den Kanal zu öffnen war dabei aber deutlich geringer als für GABA. Am stärksten wurden auch hier $\alpha 4\beta 3\delta$ - und $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren mit 10-20% der GABA-Maximalantwort aktiviert.

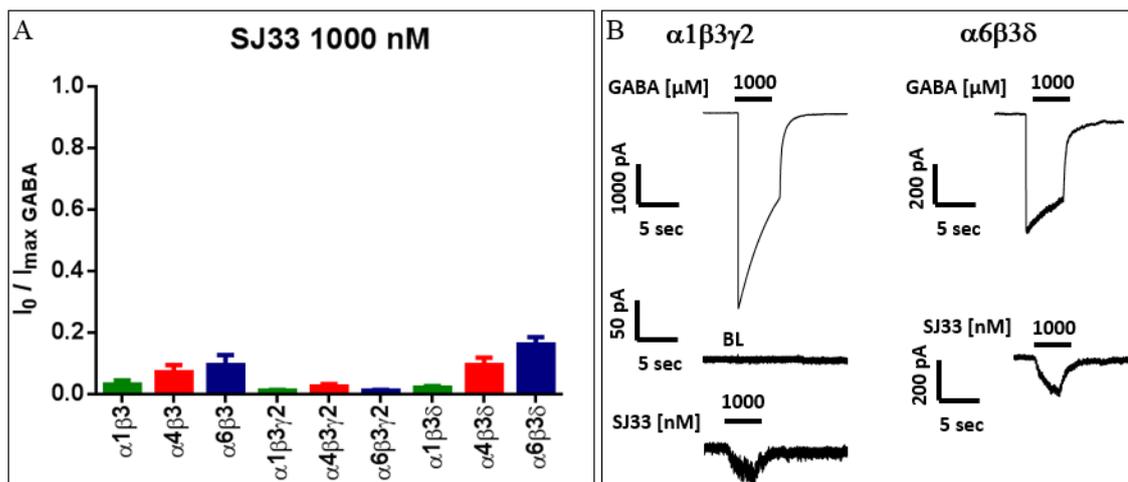


Abbildung 22: Direkte Aktivierung durch SJ33 **A:** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Antworten durch 1000 μM SJ33 normiert auf 1000 μM GABA. **B:** Repräsentative Strombilder. Die schwarzen Balken stellen die Ligandenapplikationen dar. BL steht für Badlösung (n= 3-5).

4.3 E033-00233 als $\beta 2$ -selektiven Liganden

Die Substanz E033-00233 wurde in einer Vorstudie (Rabe H.) als selektiv für Rezeptoren mit der $\beta 2$ -Untereinheit charakterisiert, darüber hinaus zeigte sich eine höhere Effizienz bei Rezeptoren mit der $\alpha 1,2$ und 6-Untereinheit in $\alpha x \beta 2 \gamma 2$ Rezeptoren gegenüber $\alpha x \beta 2$ - und $\alpha 3,4,5 \beta 2 \gamma 2$ -Rezeptoren. Im Folgenden wurde die Substanz auf ihre δ -Selektivität untersucht und auf eine ähnliche α -Abhängigkeit wie bei Pentobarbital. Weiterhin wurden β -Punktmutanten, welche bei der Wirkung von Anästhetika eine Rolle spielen, untersucht.

4.3.1 Testung von E033-00233 an δ -enthaltenden Rezeptoren

E033-00233 modulierte bei δ -enthaltenden GABA_A -Rezeptoren deutlich die GABA induzierten Ströme (EC_{20}). Die durch logistische Fits erhaltenen Parameter sind in Tab. 27 angegeben. Dabei zeigte E033-00233 eine leichte Präferenz in Bezug auf die Sensitivität für $\alpha 6 \beta 2 \delta$ -Rezeptoren gegenüber den analogen $\alpha 4$ - und $\alpha 1$ -Subtypen. Am stärksten moduliert wurden $\alpha 4 \beta 2 \delta$ -Rezeptoren. Eine Besonderheit stellt die inhibierende Wirkung bei höheren Konzentrationen dar. Diese beeinträchtigt zwar präzise Berechnungen der Parameter der Dosiswirkungskurven, ermöglicht aber die Unterscheidung von $\alpha 1 \beta 2 \delta$ -Rezeptoren und den analogen $\alpha 4$ - bzw. $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren (Abb.23).

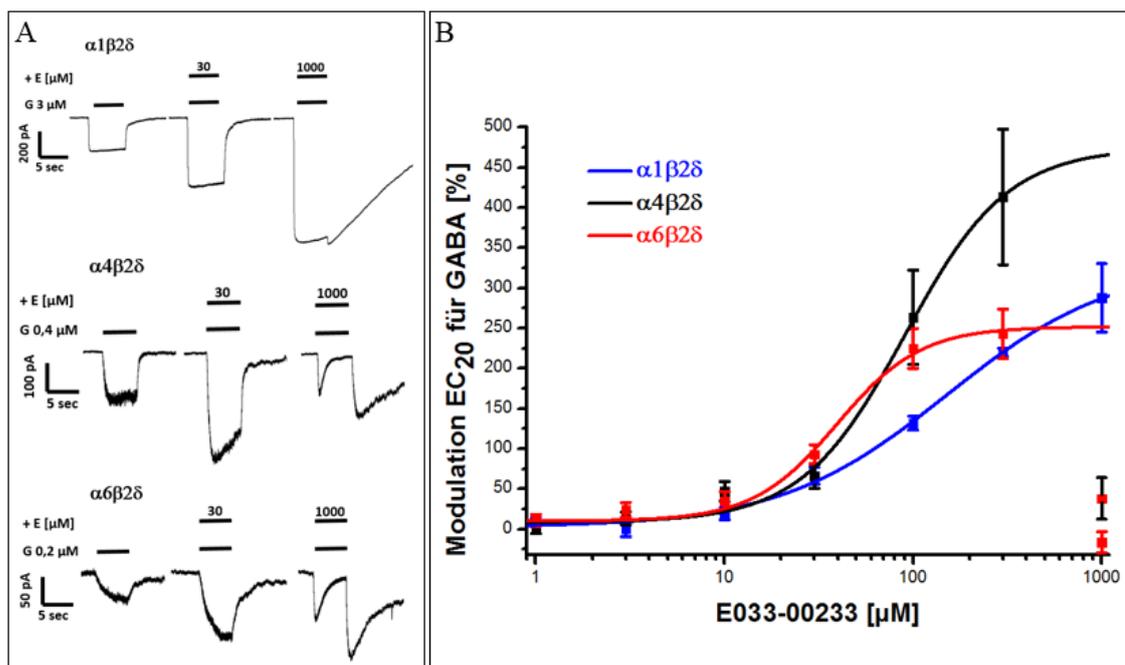


Abbildung 23: Modulation δ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren durch E033-00233 **A:** Repräsentative Strombilder. Die schwarzen Balken stellen die Ligandenapplikationen dar. **B:** Dosiswirkungskurven δ -enthaltender Rezeptoren. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die EC₂₀-Werte für GABA normierten Ströme bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen (n= 3-5). Werte bei 1000 μ M, die eine deutliche Inhibition anzeigen, wurden vom Fit ausgeschlossen.

Tabelle 27 Modulation δ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren durch E033-00233

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Modulation [%]	n
$\alpha 1\beta 3\delta$	152 \pm 22	1,0 + 0,1	152 + 22	3
$\alpha 4\beta 3\delta$	90,5 \pm 12,6	1,6 + 0,2	475 + 36	5
$\alpha 6\beta 3\delta$	39,5 \pm 11,0	1,9 + 0,3	252 + 11	4

Die EC₅₀-, p-Werte und Modulationsstärken wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf den EC₂₀ für GABA normierten Strömen bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. n= Anzahl der gemessenen Zellen

E033-00233 aktivierte alle hier getesteten δ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren in Abwesenheit von GABA. Die induzierten Ströme betragen im Vergleich zu GABA 10-20% (Abb. 24), wobei die Berechnung von Dosiswirkungskurven aufgrund der fehlenden Sättigung bei der höchsten möglichen Ligandenkonzentration nicht durchgeführt werden konnte.

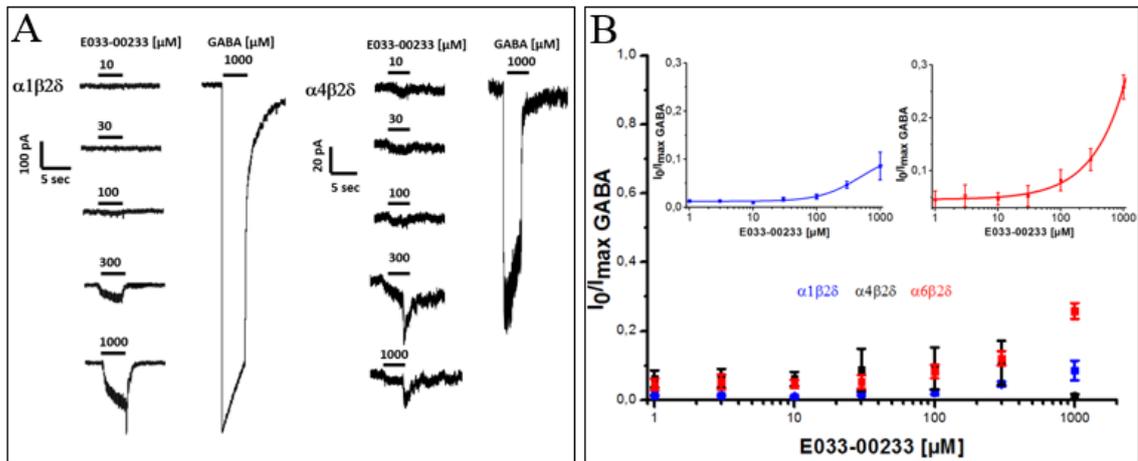


Abbildung 24: Direkte Aktivierung δ -enthaltender GABAA-Rezeptoren durch E033-00233 **A:** Exemplarische Strombilder. Die schwarzen Balken stellen die Ligandenapplikationen dar. **B:** Dosiswirkungskurven δ -enthaltender Rezeptoren. Die oberen Ausschnitte zeigen Vergrößerungen für $\alpha 1\beta 2\delta$ - und $\alpha 6\beta 2\delta$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der auf Maximalströme für GABA normierten Ströme. (n= 3-4)

4.3.2 Untersuchung von Punktmutanten zum Mechanismus der β -Selektivität von E033-00233

Zur eingangs erwähnten $\beta 2$ -Selektivität von E033-00233 wurden die Mutanten der β -UE in der Position 265, welche die Wirkungen von Etomidat und Loreclezol determinieren, eingesetzt, um Parallelen der Mechanismen zu überprüfen.

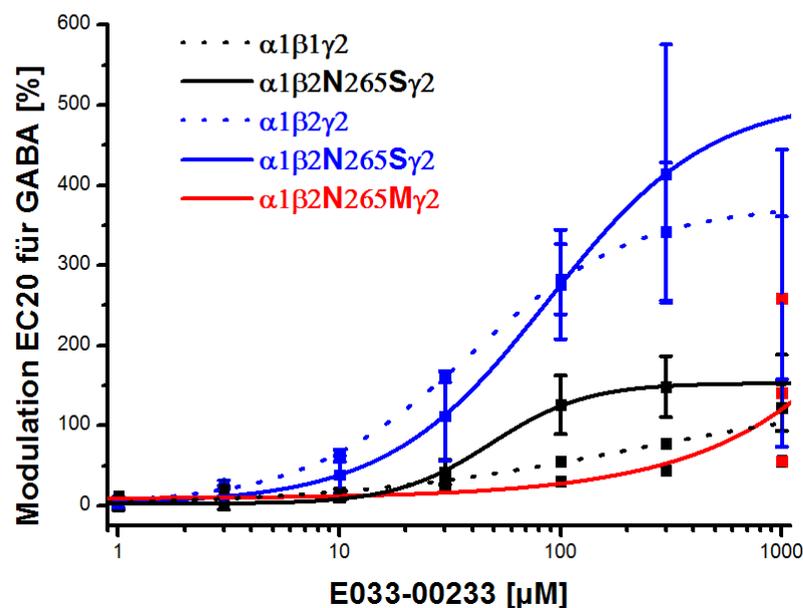


Abbildung 25: Dosiswirkungskurven Modulation E033-00233. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die EC_{20} -Werte für GABA normierten Ströme bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen (n= 3-7). Werte bei 1000 μM , die eine deutliche Inhibition anzeigen, wurden vom Fit ausgeschlossen.

Wie Abb. 25 und Tab. 28 zu entnehmen ist, führte ein Austausch in der $\beta 1$ -UE mit dem analogen Asparagin²⁶⁵ der $\beta 2$ -UE zu einer $\beta 2$ -ähnlichen Sensitivität, wobei die Effizienz nicht stark beeinflusst wurde. Der analoge Austausch in der $\beta 2$ -UE verringerte die Sensitivität etwas, wobei auch hier die Effizienz wenig beeinflusst wurde. Die Mutation zu einem Methionin verschob die Sensitivität deutlich, so dass die Modulationsstärke durch einen Fit nicht mehr bestimmt werden konnte. Insgesamt lässt sich feststellen, dass E033-00233 nicht über den gleichen Mechanismus wie die Anästhetika Etomidat und Loreclezol wirkt, obwohl einige Parallelen erkennbar sind.

Tabelle 28 Modulation $\gamma 2$ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren durch E033-00233

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Modulation [%]	n
$\alpha 1\beta 1\gamma 2^*$	228 + 151	0,6 + 0,1	145 + 31	4
$\alpha 1\beta 1S265N\gamma 2$	48,5 + 2,5	2,0 + 0,2	48,5 + 2,6	7
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	38,8 + 2,2	1,2 + 0,1	376 + 8	6
$\alpha 1\beta 2N265S\gamma 2$	88,0 + 2,4	1,2 + 0,1	510 + 6	6
$\alpha 1\beta 2N265M\gamma 2$	1000 μ M: 122,6 \pm 27,7 μ M, kein Fit möglich			3

Die EC₅₀-, p-Werte und Modulationsstärken wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf den EC₂₀ für GABA normierten Strömen bei den jeweiligen Ligandenkonzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. n= Anzahl der gemessenen Zellen.
*Daten von H.Rabe

4.4 Charakterisierung von ($\beta\alpha$)-Dimeren

Zu Beginn der Arbeit wurden schon bestehende Plasmide in den Anordnungen ($\beta 3\alpha 4$) und ($\beta 2\alpha 6$) verwendet, da diese durch Zugabe einer dritten Untereinheit ($\gamma 2$, δ , β) die sogenannte Standardkonfiguration liefern sollten (exemplarisch für ($\beta 3\alpha 1$) in Abb.26 B). Die im Folgenden verwendete Schreibweise der UE in Klammern bedeutet, dass diese in der Abfolge N- zu C-terminal durch einen Aminosäurelinker verknüpft sind. Die Schreibweise ohne Klammern bedeutet lediglich, dass diese UE vorkommen. Eine β - α -Verlinkung ist mit $\alpha 1$ - und $\alpha 4$ -UE immer mit 23 Aminosäuren durchgeführt wurden. Bei der $\alpha 6$ -UE wurden in Anlehnung an die Literatur (Minier und Sigel 2004, Minier und Sigel 2006) 26 Aminosäuren verwendet. Diese Strategie wurde im Verlauf der Arbeit für weitere Konstrukte angewendet.

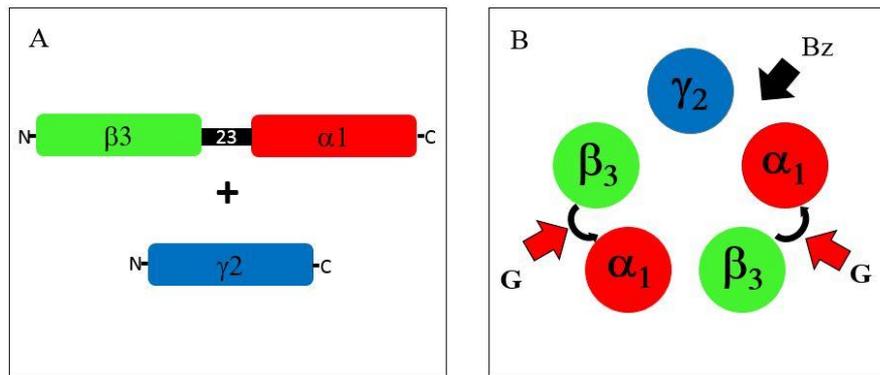


Abbildung 26: Rezeptoren mit einem ($\beta_3\alpha_1$)–Konkatamer **A:** Schematische Darstellung der Proteinsequenz. Die β_3 -UE ist dabei C-terminal mit der α_1 -UE über 23 AS verbunden. **B:** Erwartete Anordnung der Untereinheiten bei Kotransfektion mit einer γ_2 -UE, so dass sich zwei Bindestellen für GABA (G) und eine für Benzodiazepine (Bz) bilden sollten.

4.4.1 Western Blot

Um zu überprüfen, ob die Fusionsproteine intakt sind, wurden Western-Blots durchgeführt. Wie aus Abb. 27 deutlich wird, ist bei allen Konstrukten eine Bande zwischen 80 und 100 kDa erkennbar, was als intaktes Dimer gewertet wurde. Die Proben in Abb. 27 A zeigten schwache Banden bei ca. 42 kDa, d.h. unterhalb einer evtl. durch Proteolyse entstandenen β_3 -UE. In hier nicht dargestellten Proben nicht transfizierter HEK-Zellen konnte mit diesem Protokoll zum Teil ebenfalls eine Bande in dem Bereich detektiert werden, was eher auf einen unspezifischen Hintergrund als auf Proteolyse hindeutet. Im Laufe der Arbeit wurde das Protokoll zum Beispiel durch ein kurzes Waschen und Trocknen der Blotmembran direkt nach dem Blot oder durch den Einsatz von neuem Milchpulver zum Blockieren so verbessert, dass diese Bande und der gesamte Hintergrund verschwunden sind (Abb. 26 B).

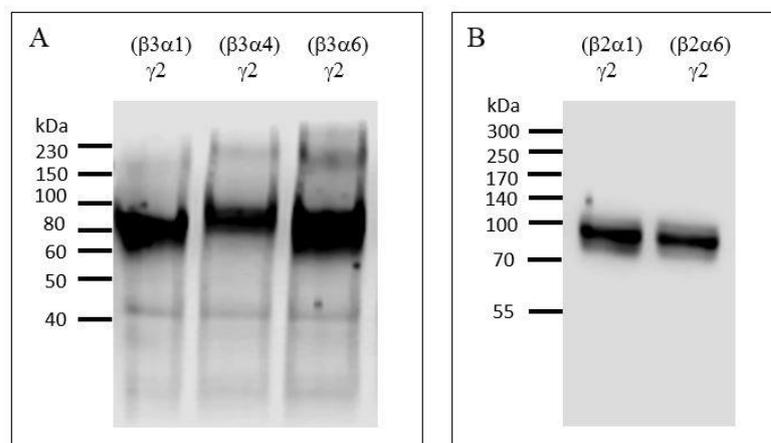


Abbildung 27: Western Blots ($\beta\alpha$)–Dimer. Detektion verschiedener ($\beta\alpha$)–Konstrukte bei Kotransfektionen mit einer γ_2 -UE. Als Antikörper wurde anti- $\beta_2/3$ 1:1000 verwendet.

4.4.2 GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren

Wie Tab. 29 zu entnehmen ist, zeigten die $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren eine ähnliche Expressionsrate wie analoge Rezeptoren aus individuellen Untereinheiten (Kapitel 4.1), was aus der Stromdichte nach GABA-Applikation ableitbar ist. Die δ -enthaltenden Rezeptoren wurden dagegen etwas schlechter exprimiert. Ein Versuch, diese Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten zu exprimieren, ergab für $(\beta 3\alpha 4)\delta$ sehr gute Expressionsraten mit einem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis und ähnlicher Pharmakologie wie in HEK-Zellexpressionen. Die Dimere zeigten bei alleiniger Transfektion minimale Ströme, welche im Vergleich zu vollständig assemblierten Pentameren vernachlässigbar sind.

Auffällig ist bei allen Rezeptoren, außer denen mit der $\alpha 6$ -UE, dass die GABA-Sensitivitäten um den Faktor 10-20 geringer waren als bei analogen Rezeptoren aus individuellen Untereinheiten.

Tabelle 29: GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
($\beta 3\alpha 1$)	nicht bestimmbar		61,2 \pm 77,3	(5)
($\beta 3\alpha 1$) $\gamma 2$	65,8 \pm 3,5	1,2 \pm 0,1	1513 \pm 1591	13(13)
($\beta 3\alpha 4$)	nicht bestimmbar		14,8 \pm 5,7	(4)
($\beta 3\alpha 4$) $\gamma 2$	71,1 \pm 10,2	1,4 \pm 0,1	2472 \pm 1560	5(8)
($\beta 3\alpha 4$) δ HEK	23,4 \pm 4,0	1,1 \pm 0,2	150 \pm 162	3(9)
($\beta 3\alpha 4$) δ Oo	16,1 \pm 1,0	0,8 \pm 0,1	8,3 \pm 10,4 *10 ⁶	6(8)
($\beta 2\alpha 6$)	nicht bestimmbar		kein Strom	(4)
($\beta 2\alpha 6$) $\gamma 2$	4,0 \pm 0,2*	1,0 \pm 0,1*	979 + 846	7*(7)
($\beta 2\alpha 6$) δ	3,3 \pm 0,2*	1,1 \pm 0,1*	107 + 118	12*(6)

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-10000 μ M GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten). *Daten sind von H.Rabe

4.4.3 Modulation ($\beta\alpha$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine

Zur Überprüfung der Assemblierungen der Untereinheiten wurden Koapplikationen von für die α -Untereinheit spezifischen Benzodiazepinen mit GABA (EC_{20}) durchgeführt. Im Fall von $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren unterschied sich die Modulierbarkeit durch 1 μM Diazepam nicht vom Wildtyp und aus Konkatameren gebildeten Rezeptoren. Gleiches konnte mit 10 μM Bretazenil bei $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren gezeigt werden. Für $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren zeigte sich hingegen eine statistisch signifikant höhere Modulation mit 10 μM Bretazenil bei aus Konkatameren assemblierenden Rezeptoren, obwohl sich die Fehlergrenzen auch hier überschneiden.

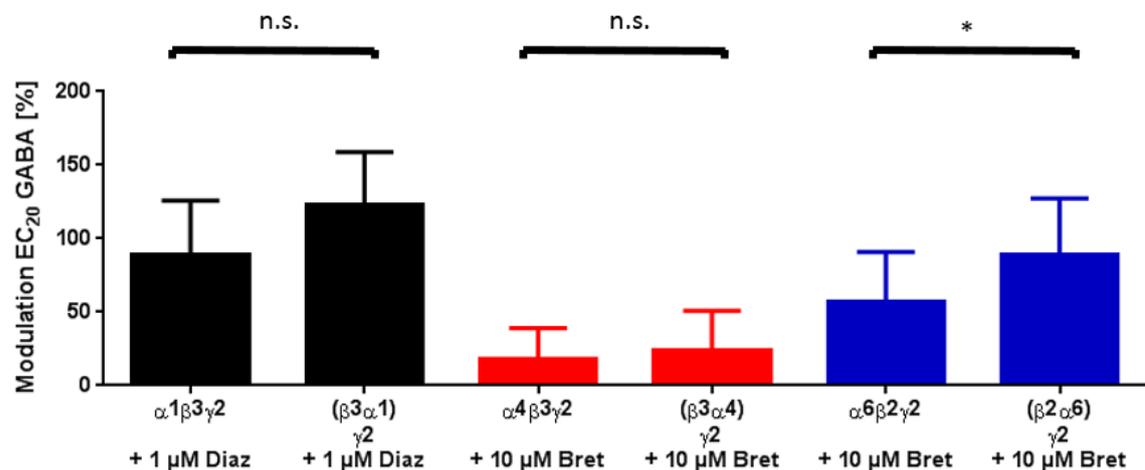


Abbildung 28: Modulation Benzodiazepine von ($\beta\alpha$) $\gamma 2$ -Rezeptoren. Diazepam ($\alpha 1$) und Bretazenil ($\alpha 4$ und $\alpha 6$) wurden zur Modulation GABA-induzierter Ströme eingesetzt. Nur bei $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren werden die Rezeptoren mit Konkatamer stärker moduliert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n= 4-13). (* $p \leq 0,05$)

4.5 Charakterisierung von ($\alpha\beta$)-Dimeren

Plasmide in den Anordnungen ($\alpha 4 \beta 3$) und ($\alpha 6 \beta 2$) lagen ebenfalls zu Beginn der Arbeit schon vor und dienten zur Assemblierung von Rezeptoren welche nach Befolgung der oben genannten Regeln zu Rezeptoren in einer atypischen Anordnung (Abb. 29 B) führen sollten. Am Beispiel von $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren wurden diese Assemblierungsregeln anhand der Pharmakologie für Benzodiazepine genauer überprüft. Eine α - β -Verlinkung ist für alle Subtypen gemäß der Literaturangaben mit 11 Aminosäuren durchgeführt worden.

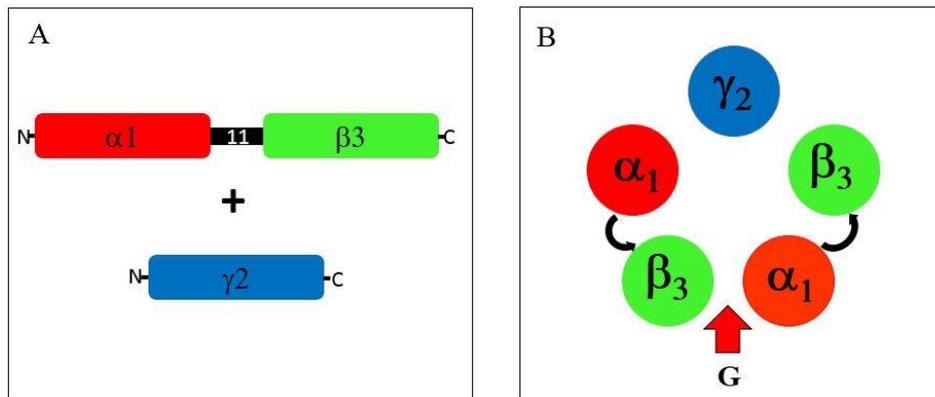


Abbildung 29: Rezeptoren mit einem ($\alpha_1\beta_3$)-Konkatamer **A:** Schematische Darstellung der Proteinesequenz. Die α_1 -UE ist dabei C-terminal mit der β_3 -UE über 11 AS verbunden. **B:** Erwartete Anordnung der Untereinheiten bei Kotransfektion mit einer γ_2 -UE, so dass eine Bindestelle für GABA (G) und keine für Benzodiazepine vorhanden sein sollten.

4.5.1 Western-Blot

Im Rahmen der Diplomarbeit von Raphael Haase (FB 10 Biologie, Uni Mainz 2013) wurde gezeigt, dass die hier verwendeten α_4 - und α_6 -enthaltende Dimere nicht proteolytisch sind. In einem unter 4.7 aufgeführten Ansatz kamen α_1 - und α_6 -enthaltende ($\alpha\beta$)-Dimere zum Einsatz, wobei keine Proteolyse festgestellt wurde.

4.5.2 GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta$)-enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren

Aus ($\alpha\beta$)-Dimeren gebildeten Rezeptoren zeigten für γ_2 -enthaltende Rezeptoren ähnliche Expressionen wie Wildtyp-Rezeptoren, wobei die Rezeptoren mit der α_6 -UE etwas kleinere Ströme zuließen (Tab. 30). Mit der δ -UE konnten für die α_4 -UE wie bei den ($\beta_3\alpha_4$)-Konstrukt (4.4.2) geringe Ströme in HEK293-Transfektionen und sehr gute Expressionen in *Xenopus* Oozyten gemessen werden. Das analoge ($\alpha_6\beta_2$)-Dimer zeigte in einer von H. Rabe durchgeführten Studie mit GABA als Liganden weder in HEK293-Zellen, noch in *Xenopus* Oozyten in Kombination mit der δ -UE funktionelle Rezeptoren. Das Ergebnis konnte hier mit Pentobarbital bestätigt werden. Weiterhin zeigten im Mittel die ($\alpha\beta$)-Dimere bei alleiniger Transfektion vernachlässigbar kleine Ströme.

Im Gegensatz zu den in Kapitel 4.4 aufgeführten ($\beta\alpha$)-Dimeren, bei denen der N-Terminus der α -UE verlinkt ist, zeigten die ($\alpha\beta$)-Dimere mit einem sogenannten freien N-Terminus der α -UE eine höhere GABA-Sensitivität und unterschieden sich nur um den Faktor 2-5 von den entsprechenden Wildtyprezeptoren.

Tabelle 30: GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
($\alpha 1\beta 3$)	nicht bestimmbar		71,0 \pm 104	(13)
($\alpha 1\beta 3$) $\gamma 2$	15,5 \pm 0,8	1,6 \pm 0,1	1675 \pm 654	(8)
($\alpha 4\beta 3$)	nicht bestimmbar		14,6 \pm 9,7	(6)
($\alpha 4\beta 3$) $\gamma 2$	15,9 \pm 0,6	2,0 \pm 0,4	1715 \pm 673	3(10)
($\alpha 4\beta 3$) δ HEK	6,3 \pm 0,6	1,2 \pm 0,1	98,1 \pm 77,6	3(6)
($\alpha 4\beta 3$) δ Oo	4,6 \pm 0,5	1,2 \pm 0,1	7,5 \pm 7,3 *10 ⁶	6(8)
($\alpha 6\beta 2$)	nicht bestimmbar		kein Strom	(6)
($\alpha 6\beta 2$) $\gamma 2$	3,3 \pm 0,2*	1,1 \pm 0,1*	330 \pm 334	(12)
($\alpha 6\beta 2$) δ *	keine Expression in HEK und Xenopus Oozyten			

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-10000 μ M GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten). *Daten sind von H.Rabe

4.5.3 Modulation ($\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine

Wie in der Abb. 30 dargestellt, sollten nach der von Baumann et al. (2002) postulierten Uhrzeigersinnregel aus ($\alpha\beta$)-Dimeren in Kombination mit einer $\gamma 2$ -UE Rezeptoren entstehen, welche keine klassische Bindestelle für Benzodiazepine haben. Es wurden also analog Kapitel 4.4.3 Koapplikationen von GABA und Diazepam bei $\alpha 1$ -enthaltenden und Bretazenil bei $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren durchgeführt. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Subtypen waren ähnlich dem entsprechenden Wildtyp durch Benzodiazepine modulierbar (Abb. 30). Bei Rezeptoren mit der $\alpha 4$ -UE konnte kein Effekt von Bretazenil gemessen werden.

Bei der Annahme, dass Benzodiazepine nur dann am Rezeptor binden und Effekte ausüben können, wenn eine α - $\gamma 2$ -Nachbarschaft, wie in Abb. 26 vorliegt, widersprechen die aufgeführten Ergebnisse, dass sich die ($\alpha\beta$)-Dimere entsprechend der Abb. 29 im Pentamer anordnen.

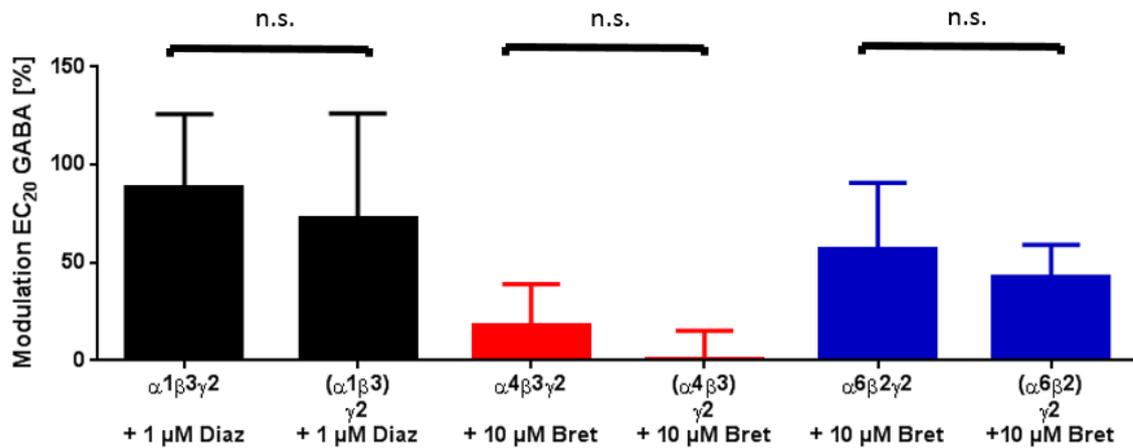


Abbildung 30: Modulation Benzodiazepine von $(\alpha\beta)\gamma 2$ -Rezeptoren. Diazepam ($\alpha 1$) und Bretazenil ($\alpha 4$ und $\alpha 6$) wurden zur Modulation GABA-induzierter Ströme eingesetzt. Bei keinem Subtyp unterscheiden sich Rezeptoren aus individuellen UE oder $(\alpha\beta)$ -enthaltenden Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n= 4-13).

4.6 Charakterisierung von $(\beta\alpha\beta)$ -Trimeren

Durch Bildung von $(\beta\alpha\beta)$ -Konstrukten konnte eine große Anzahl an Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Untereinheiten oder Rezeptoren mit einer mutierten Bindestelle für GABA exprimiert werden. In Abb. 31 ist die Strategie am Beispiel von $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren dargestellt, die α - und die $\gamma 2$ -UE wurden als einzelne Untereinheiten zu einem $(\beta\alpha\beta)$ -Trimer kotransfiziert. Die Anordnung der UE gemäß Abb. 31 B wurde mit Hilfe von Benzodiazepinen überprüft. Weiterhin wurden zur Kontrolle duale $\alpha\gamma$ -Konstrukte eingesetzt.

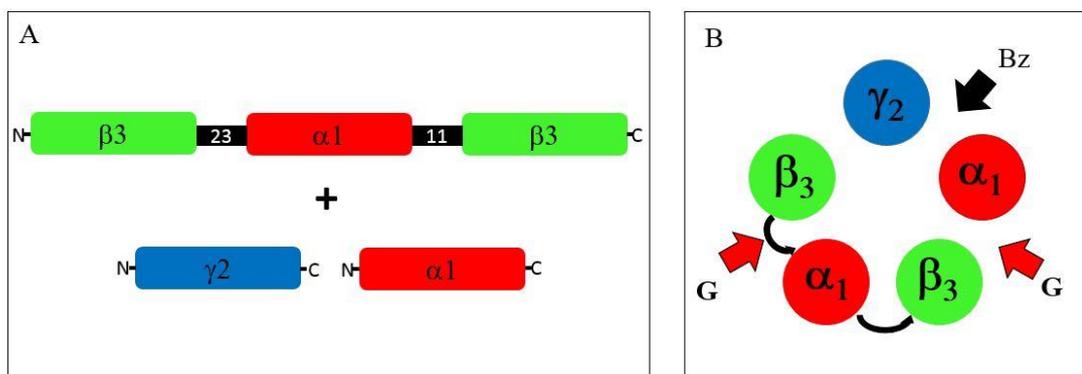


Abbildung 31: Rezeptoren mit einem $(\beta 3 \alpha 1 \beta 3)$ -Konkatamer **A:** Schematische Darstellung der Proteinsequenz. Die $\alpha 1$ -UE ist dabei C-terminal mit der $\beta 3$ -UE über 11 AS und N-terminal über 23 AS mit einer weiteren $\beta 3$ -UE verbunden. **B:** Erwartete Anordnung der Untereinheiten bei Kotransfektion mit einer $\gamma 2$ -UE und einer $\alpha 1$ -UE, so dass zwei Bindestellen für GABA (G) und eine für Benzodiazepine (Bz) vorhanden sein sollten.

4.6.1 Western Blot

Wie Abb. 32 zu entnehmen ist, zeigten alle trimeren ($\beta\alpha\beta$)-Konstrukte im Western Blot die erwartete Größe von über 150 kDa. Es gab auch keine wesentlichen Unterschiede im Expressionslevel zwischen mutierten und Wild-Typ-Konstrukten bzw. der Spliceform short der $\alpha 6$ -UE in HEK-Zelllysat. In Abb. 32 A&B konnten zum Teil schwache Banden auf der Höhe der $\beta 2/3$ -UE einer Cortexmembranpreparation detektiert werden. Wie unter 4.4.1 dargestellt, ist dies aber vermutlich eine unspezifische Bande aus dem HEK-Zelllysat. Zur Kontrolle, ob es sich dabei um eine β -UE handelt, die plasmamembranständig ist und in funktionellen Rezeptoren vorkommen kann, wurden plasmamembranständige Proteine aufgereinigt (Abb. 32 C). Diese Proben zeigten nur noch die trimeren Konstrukte.

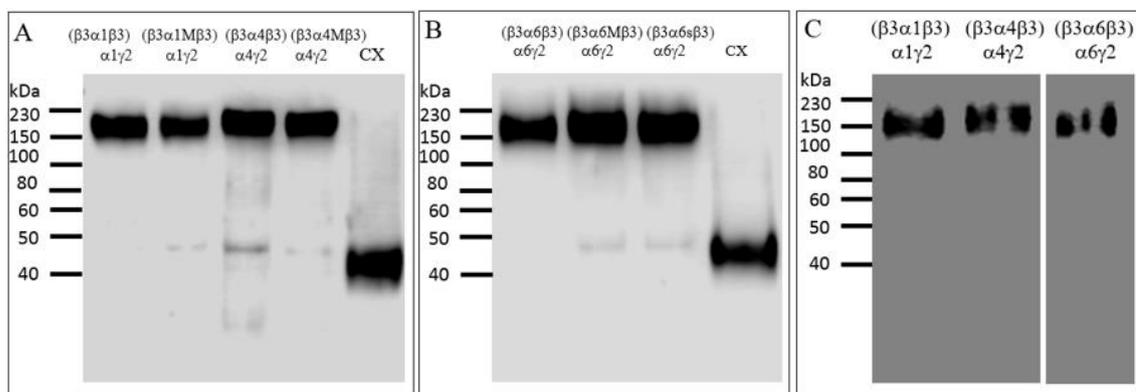


Abbildung 32: Western Blot ($\beta\alpha\beta$)-Trimer A&B: Detektion verschiedener ($\beta\alpha\beta$)-Konstrukte bei Kotransfektionen mit einer $\gamma 2$ -UE und α -UE. CX ist eine Probe einer Rattenhirnmembranpreparation. M und s kennzeichnen UE mit der Mutation F64C/F63C bzw. die Spliceform short **C:** Detektion verschiedener plasmamembranständiger ($\beta\alpha\beta$)-Konstrukte bei Kotransfektionen mit einer $\gamma 2$ -UE und α -UE nach Biotinylierung und Aufreinigung der Membranproteine. Als Antikörper wurde anti- $\beta 2/3$ 1:1000 verwendet.

Weiterhin wurden ($\alpha\gamma 2$)-Konstrukte auf Proteolyse überprüft. Intakte Dimere sollten bei etwa 100 -110 kDa auftreten, wie Abb. 33 A zu entnehmen ist, sind aber alle Banden deutlich tiefer bei etwa 60-80 kDa aufgetreten. Gegen eine Proteolyse, die zu funktionellen Untereinheiten führt, spricht zum einen, dass die Banden größer sind, als für eine $\gamma 2$ -UE erwartet 54 kDa und zum anderen, dass die $\gamma 2$ -UE als individuelle UE ein atypisches Laufverhalten hat und bisher immer bei kleineren Molekulargewichten detektiert wurde (43 kDa, Benke et al 1990). Außerdem müssten bei einer spezifischen Proteolyse der $\gamma 2$ -UE bei den ($\alpha 1\gamma 2$)- und ($\gamma 2\alpha 1$)-Konstrukten unterschiedlich große

Banden auftreten, was aber nicht beobachtet wurde (Abb. 33 B).

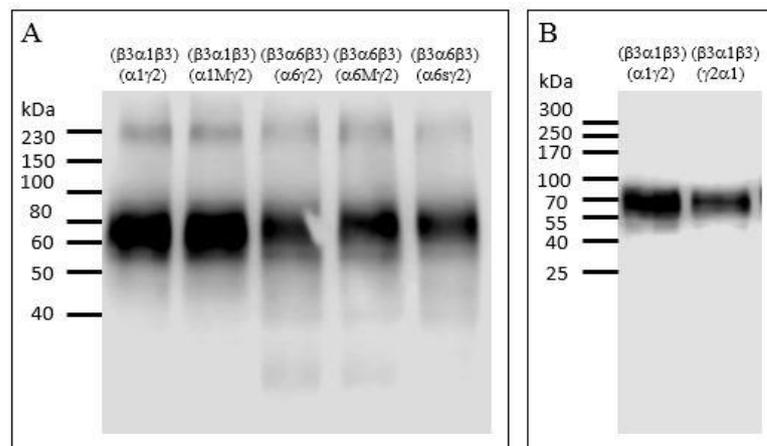


Abbildung 33: Western Blots dualer $\gamma 2$ -Konkatamere und $(\beta\alpha\beta)$ -Trimer. A&B: Detektion verschiedener $\gamma 2$ -Konstrukte in Kotransfektionen mit einem $(\beta\alpha\beta)$ -Trimer. Als Antikörper wurde anti- $\gamma 2$ 1:1000 verwendet.

4.6.2 GABA-Pharmakologie $(\beta\alpha\beta)$ -enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren

4.6.2.1 GABA-Pharmakologie $(\beta\alpha\beta)$ -enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen

Mit einem $(\beta\alpha\beta)$ -Trimer zeigten nur Koexpressionen mit einer α - und einer $\gamma 2$ -UE oder mit dualen $\alpha\gamma 2$ -Konstrukten hohe mit Wild-Typ-Rezeptoren vergleichbare Stromantworten durch GABA (Tab. 31). Die GABA-Sensitivitäten unterschieden sich für $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren um den Faktor 8-10 im Vergleich zu $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren aus individuellen Untereinheiten. Bei der $\alpha 4$ -UE war der Unterschied mit dem Faktor zwei gering und bei der $\alpha 6$ -UE sogar vernachlässigbar. In allen $(\beta 3\alpha\beta 3) + \alpha + \gamma 2$ -Assemblierungen hatte die unter Kapitel 4.1 beschriebene Mutation der GABA-Bindestelle im Trimer keinen wesentlichen Einfluss auf die GABA-Pharmakologie. Bei $\alpha 1$ - und $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren stieg die Sensitivität sogar leicht. Bei den $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Subtypen war durch die Mutation eine etwas geringere Stromdichte infolge GABA-Applikationen zu beobachten. Deutlicher fielen die Effekte aus, wenn die einzelne α -UE mutiert war. So verringerten sich die Sensitivitäten bei $\alpha 1$ - und $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren um den Faktor 50-100 und die Stromdichte war im Fall der $\alpha 4$ -UE 8-10-fach verringert im Vergleich zum analogen Rezeptor mit zwei Bindestellen. In $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren war zwar die Stromdichte ebenfalls niedriger, wenn in der einzelnen Untereinheit die GABA-Bindestelle mutiert ist, die Sensitivität verringerte sich aber nur leicht um den Faktor 3-4. Durch eine Verlinkung der α - mit der $\gamma 2$ -UE zu $(\alpha\gamma 2)$ - bzw. $(\gamma 2\alpha)$ -Dimeren verringerten sich die Sensitivitäten im Fall der $\alpha 1$ -UE leicht und bei der

$\alpha 6$ -UE nicht. Die Effekte der Mutationen in den jeweiligen α -UE unterschieden sich auch nicht von $(\beta 3\alpha\beta 3) + \alpha + \gamma 2$ -Assemblierungen. Weiterhin wurde die in Kapitel 4.1 beschriebene Splicevariante $\alpha 6$ -short als Mittel, um die GABA-Bindestelle auszuschalten in die Konkatomere inkloniert. Es konnte aber kein Unterschied zu den Rezeptoren mit der $\alpha 6F63C$ -UE in dem Trimer festgestellt werden. Rezeptoren in den Konfigurationen $(\beta 3\alpha 6\beta 3)$ ($\alpha 6s\gamma 2$) und $(\beta 3\alpha 6\beta 3) + \alpha 6s + \gamma 2$ zeigten hingegen keine auswertbaren Ströme.

Kombinationen mit der δ -UE wurden in der $(\beta 3\alpha 4\beta 3) + \alpha + \delta$ -Konfiguration gemessen. Dabei wurde die gleiche GABA-Sensitivität wie bei der analogen Assemblierung mit der $\gamma 2$ -UE erhalten. Im Gegensatz zu den entsprechenden $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren ist ein deutlicher Unterschied (Faktor 15) zum Wildtyp aus individuellen UE auffällig. Wurde die im Trimer enthaltene GABA-Bindestelle hingegen mutiert, so wurde eine dem Wildtyp entsprechende Sensitivität erreicht. Aufgrund der wie auch in Kapitel 4.4 und Kapitel 4.5 dargestellten sehr geringen Ströme δ -enthaltende aus Konkatomeren assemblierenden Rezeptoren in HEK-Zellen wurden im Folgenden nur noch $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren charakterisiert.

Tabelle 31: GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)$	nicht bestimmbar		kein Strom	(3)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 1$	nicht bestimmbar		kein Strom	(5)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\gamma 2$	nicht bestimmbar		$28,7 \pm 24,0$	(5)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\beta 3$	nicht bestimmbar		$15,1 \pm 9,7$	(5)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$24,7 \pm 3,4$	$1,4 \pm 0,1$	731 ± 529	6(7)
$(\beta 3\alpha 1M\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$15,8 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1$	939 ± 507	(11)
$(\beta 3\alpha 1M\beta 3)\alpha 1\gamma 2I$	$27,7 \pm 1,5$	$1,6 \pm 0,1$	725 ± 517	3(3)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 1M\gamma 2$	$1114,1 \pm 70,2$	$0,9 \pm 0,1$	952 ± 1011	5(5)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)(\alpha 1\gamma 2)$	$45,6 \pm 2,8$	$1,3 \pm 0,1$	1510 ± 1357	9(10)
$(\beta 3\alpha 1M\beta 3)(\alpha 1\gamma 2)$	$19,5 \pm 2,2$	$1,2 \pm 0,1$	939 ± 507	11(11)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)(\alpha 1M\gamma 2)$	$2317,3 \pm 223,7$	$1,0 \pm 0,1$	407 ± 346	3(4)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)(\gamma 2\alpha 1)$	$64,1 \pm 7,7$	$1,0 \pm 0,1$	571 ± 616	6(9)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)$	nicht bestimmbar		kein Strom	(3)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 4$	nicht bestimmbar		$20,6 + 22,3$	(6)

$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\gamma 2$	nicht bestimmbar		109 +75	(5)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\beta 3$	nicht bestimmbar		5,7 + 3,2	(3)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 4\gamma 2$	14,0 ± 1,2	1,5 ± 0,2	1151 ± 631	11(7)
$(\beta 3\alpha 4M\beta 3)\alpha 4\gamma 2$	7,6 ± 0,6	1,4 ± 0,2	428 ± 246	7(7)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 4M\gamma 2$	2140 ± 871	0,7 ± 0,1	152 ± 55	5(6)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\beta 3\gamma 2$	nicht bestimmbar (PB: 119 ± 5 µM)		795 + 1227 (PB: 2967)	(8)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 4\delta$	14,6 ± 1,0	0,8 ± 0,1	137 ± 134	11(11)
$(\beta 3\alpha 4M\beta 3)\alpha 4\delta$	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,1	61,2 ± 38,5	2(2)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)$	nicht bestimmbar		66,4 ± 64,6	(8)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,3	4819 ± 2163	3(3)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)(\alpha 6\gamma 2)$	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2	826 ± 524	6(6)
$(\beta 3\alpha 6M\beta 3)\alpha 6\gamma 2$	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	922 ± 774	3(3)
$(\beta 3\alpha 6M\beta 3)(\alpha 6\gamma 2)$	1,4 ± 0,4	0,7 ± 0,1	1143 + 900	5(5)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6M\gamma 2$	6,0 ± 0,8	0,8 ± 0,1	674 ± 546	10(10)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)(\alpha 6M\gamma 2)$	3,2 ± 0,5	0,7 ± 0,1	283 ± 212	3(3)
$(\beta 3\alpha 6s\beta 3)\alpha 6\gamma 2$	1,7 ± 0,5	1,2 ± 0,4	329 ± 349	6(6)
$(\beta 3\alpha 6s\beta 3)(\alpha 6\gamma 2)$	3,4 ± 0,9	0,9 ± 0,2	324 ± 324	4(4)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6s\gamma 2$	nicht bestimmbar		19,2 ± 7,8	(3)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)(\alpha 6s\gamma 2)$	nicht bestimmbar		17,8 ± 10,7	(7)

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte ± SD der Maximalströme bei 300-10000 µM GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

4.6.2.2 GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)–enthaltender GABA_A-Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen

Im weiteren Verlauf wurden GABA_A-Rezeptoren charakterisiert, bei denen unterschiedliche α -Subtypen im Pentamer vorliegen. Zusätzlich wurden selektiv einzelne GABA-Bindestellen mutiert, so dass die Rolle einer einzelnen α -UE im pentameren Komplex untersucht werden konnte. Wie in Tab. 32 dargestellt, zeigten alle Kombinationen mit einer einzelnen α -UE eine ähnliche Sensitivität, wie die analogen Rezeptoren mit zwei UE dieses Subtyps. Eine Ausnahme bildeten $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 1\gamma 2$ -Rezeptoren, welche einen EC₅₀-Wert ähnlich wie $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ -Rezeptoren hatten. Die Mutationen in den Trimeren hatten nur geringe Effekte. In $(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 3\gamma 2$ -Rezeptoren beispielsweise verringerte sich die Sensitivität, wenn die $\alpha 4$ -UE mutiert war, so dass die Eigenschaften näher an den

$\alpha 3$ -Rezeptoren, d.h. an denen mit der geringsten Sensitivität, lagen. In $(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ -Rezeptoren stieg hingegen die Sensitivität, wenn die $\alpha 4$ -UE mutiert war und näherte sich den Eigenschaften der sensitiveren $\alpha 6$ -Rezeptoren an. Die einzige Kombination, bei der die Mutation in der einzelnen Untereinheit die Sensitivität nicht beeinflusste war $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 1M\gamma 2$, wobei die Rezeptoren deutlich geringere GABA-induzierte Ströme als $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 1\gamma 2$ -Rezeptoren hatten.

Insgesamt lässt sich aber mit Ausnahme einiger $\alpha 6$ -enthaltender Rezeptoren feststellen, dass in den $(\beta 3\alpha\beta 3)\alpha\gamma 2$ -Assemblierungen die Eigenschaften in Bezug auf GABA durch die einzelne α -UE zwischen der $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -UE bestimmt wurden, folgt man der Uhrzeigersinnregel. Die N-terminal verlinkte α -UE zwischen den $\beta 3$ -UE hatte hingegen wenig Einfluss.

Tabelle 32 : GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\beta$)-enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 6\gamma 2$	$5,2 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1$	1484 ± 529	3(3)
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 6M\gamma 2$	300 ± 95	$0,6 \pm 0,1$	1178 ± 442	3(3)
$(\beta 3\alpha 1M\beta 3)\alpha 6\gamma 2$	$1,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	172 ± 129	1(2)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$18,8 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,1$	1816 ± 1490	13(13)
$(\beta 3\alpha 4M\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$45,2 \pm 1,5$	$1,5 \pm 0,1$	991 ± 556	12(12)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 3\gamma 2$	$43,6 \pm 1,7$	$1,4 \pm 0,1$	1804 ± 1180	8(8)
$(\beta 3\alpha 4M\beta 3)\alpha 3\gamma 2$	$69,9 \pm 9,0$	$1,0 \pm 0,1$	874 ± 766	9(9)
$(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 6\gamma 2$	$6,1 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,1$	1078 ± 1110	23(23)
$(\beta 3\alpha 4M\beta 3)\alpha 6\gamma 2$	$1,8 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	305 ± 225	14(12)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$1,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	2263 ± 1816	7(7)
$(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 1M\gamma 2$	$0,9 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$	$67,7 \pm 107$	2(7)
$(\beta 3\alpha 6M\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$22,3 \pm 2,4$	$0,8 \pm 0,1$	1569 ± 2298	5(5)
$(\beta 3\alpha 6s\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$26,1 \pm 2,1$	$1,2 \pm 0,1$	1621 ± 1646	4(4)

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-10000 μ M GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

4.6.3 Modulatoren

Zur Überprüfung, ob die Untereinheiten gemäß der Abb. 31 B im Pentamer angeordnet sind, wurden Modulatoren eingesetzt, die als selektiv für bestimmte Untereinheiten oder Nachbarschaften von Untereinheiten beschrieben worden sind.

4.6.3.1 Modulation ($\beta 3\alpha\beta 3$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine

Zum einen wurden Diazepam und Bretazenil aus der Klasse der Benzodiazepine eingesetzt. Es konnte, wie Abb. 34 zu entnehmen ist, gezeigt werden, dass nur die einzelne α -UE die Benzodiazepinpharmakologie determiniert und somit vermutlich neben der $\gamma 2$ -UE sitzt. So zeigte z. B. die Kombination ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) + $\alpha 4 + \gamma 2$ keine $\alpha 1$ -typische Diazepammodulation. Die Kombination ($\beta 3\alpha 4\beta 3$) + $\alpha 1 + \gamma 2$ zeigte diese hingegen. Weiterhin zeigte ein Verknüpfen der $\alpha 1$ - mit der $\gamma 2$ -UE, dass ($\alpha 1\gamma 2$)- und ($\gamma 2\alpha 1$)-Dimere eine Bindestelle für Diazepam ausbildeten, gemäß der Uhrzeigersinnregel war das aber nur für das ($\alpha 1\gamma 2$)-Konstrukt zu erwarten. Das ($\gamma 2\alpha 1$)-Konstrukt, bei dem die $\alpha 1$ -UE N-terminal verknüpft ist, zeigte zwar eine schwächere Modulierbarkeit, es ist aber nach Kapitel 4.4 und 4.5 ein weiteres Beispiel, dass die N-terminale Verlinkung der α -UE die Funktion beeinflusst und dass sich durch die Verlinkung die Anordnung nicht mit Sicherheit definieren lässt.

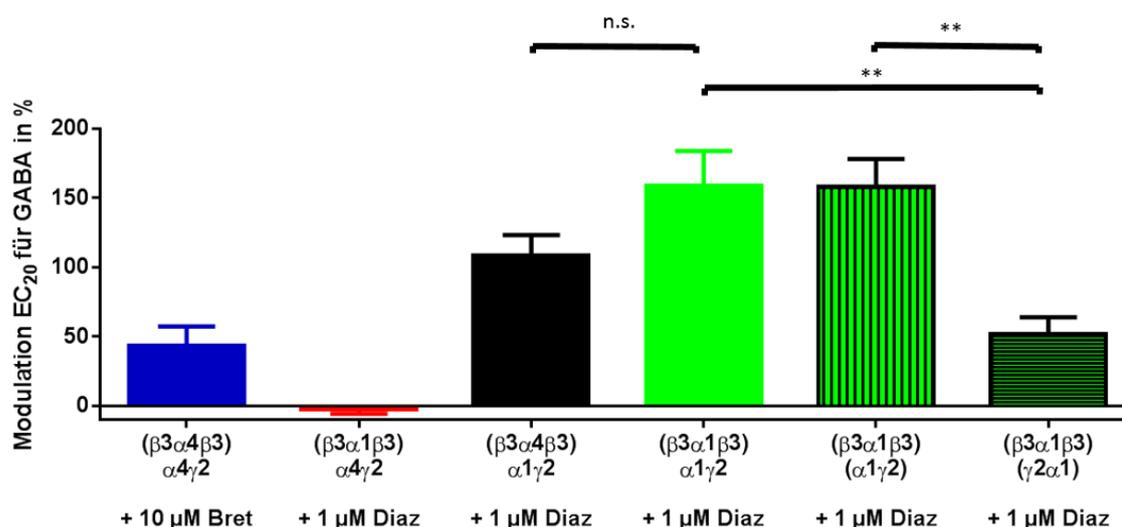


Abbildung 34: Modulation durch Benzodiazepine ($\beta 3\alpha\beta 3$)-enthaltender Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n= 4-13). Bret= Bretazenil; Diaz= Diazepam. (** p \leq 0,01)

4.6.3.2 Inhibition ($\beta 3\alpha\beta 3$)-enthaltender Rezeptoren durch Furosemid

Furosemid ist eine weitere Substanz, deren Selektivität durch die α -UE determiniert wird. Den in Abb. 35 dargestellten $\alpha 4$ -enthaltenden Assemblierungen ist zu entnehmen, dass eine $\alpha 4$ -UE im Pentamer ausreichte, um die Inhibition durch Furosemid zu

vermitteln. Das Experiment stellt somit auch ein Kontrolle dar, ob die $\alpha 4$ -UE aus einem $(\beta 3\alpha 4\beta 3)$ -Konstrukt im Pentamer integriert ist. Selbst wenn die GABA-Bindestelle dieser $\alpha 4$ -UE mutiert war, zeigte sich in der Kombination $(\beta 3\alpha 4M\beta 3) + \alpha 1 + \gamma 2$ die gleiche Inhibition wie in $(\beta 3\alpha 4\beta 3) + \alpha 1 + \gamma 2$ -Rezeptoren.

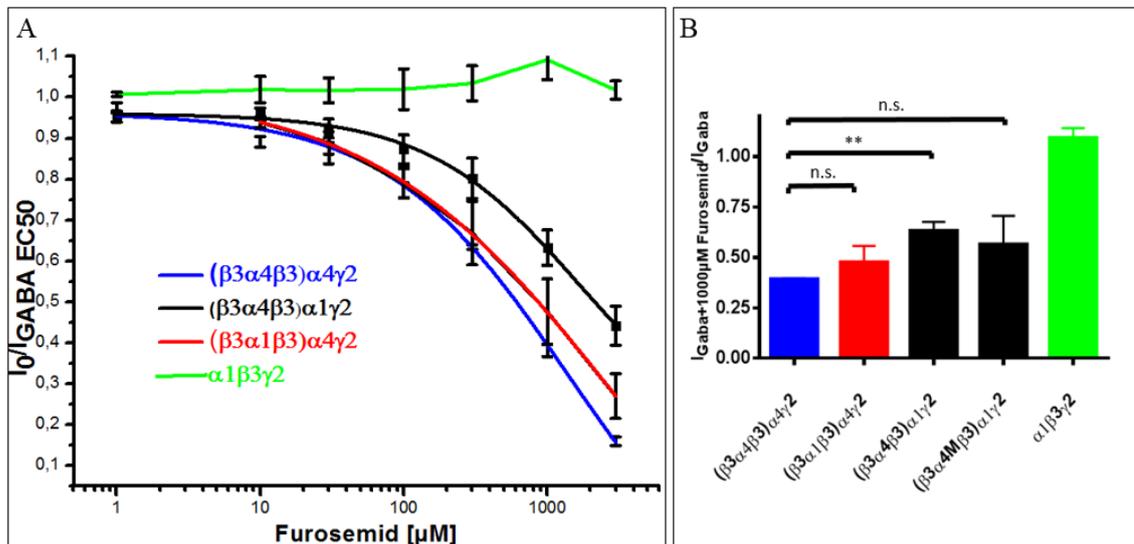


Abbildung 35 Furosemidinhibition benötigt nur eine $\alpha 4$ -Untereinheit im Pentamer. **A:** Dargestellt ist die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition durch Furosemid der angegebenen Subtypen. **B:** Vergleich der einzelnen Kombinationen bei 1000 μM Furosemid. Angegeben sind Mittelwerte + SEM ($n = 3-8$). (** $p \leq 0,01$)

4.6.3.3 Modulation und Aktivierung $(\beta 3\alpha 4\beta 3)$ -enthaltender Rezeptoren durch Etomidat

Wie oben (Kapitel 4.3.2) beschrieben, lässt sich durch die Mutation N265S in der $\beta 3$ -UE die Sensitivität und Effizienz für Etomidat verringern. Diese Mutation wurde am Beispiel des $(\beta 3\alpha 4\beta 3)$ -Trimers jeweils in eine oder beide $\beta 3$ -UE eingebracht, um zum einen deren Funktion zu charakterisieren und zum anderen deren Anwesenheit im Pentamer nachzuweisen. In Abb. 36 A ist die Modulation durch 10 μM Etomidat dargestellt. Es ist zu erkennen, dass zwei wt- $\beta 3$ -UE vorhanden sein mussten, um die Eigenschaften von $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren, exprimiert aus individuellen UE, zu zeigen. Weiterhin war die Wirkung von Etomidat von der Position der $\beta 3$ -UE unabhängig und additiv in Abhängigkeit ihrer Anzahl. Abb. 36 B zeigt anhand der Aktivierung durch 300 μM Etomidat in Abwesenheit von GABA noch deutlicher, dass zwei $\beta 3$ -UE für die Eigenschaften von wildtypischen $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren notwendig waren.

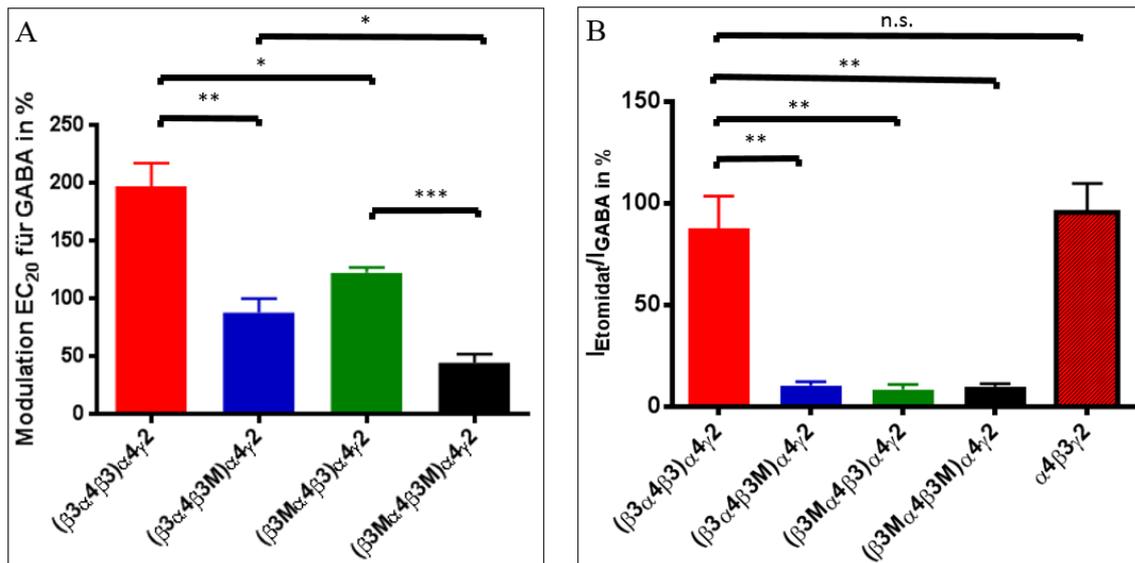


Abbildung 36 Etomidat zum Nachweis der $\beta 3$ -UE im Pentamer A: Modulation durch 10 μM Etomidat in Abhängigkeit der Anzahl der wt- $\beta 3$ -UE. **B:** Aktivierung durch 300 μM Etomidat benötigt zwei wt- $\beta 3$ -UE. M kennzeichnet die Mutation N265S. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (n= 4-6). (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$)

4.6.3.4 Modulation ($\beta 3\alpha 4\beta 3$)-enthaltender Rezeptoren durch Loreclezol

Analog zu Etomidat wurde das Antikonvulsivum Loreclezol an den in Kapitel 4.6.3.3 beschriebenen ($\beta 3\alpha 4\beta 3$)-Trimeren eingesetzt. Dabei wurden analoge Ergebnisse erzielt, in dem Sinn, dass die Potentierung GABA-induzierter Ströme durch Loreclezol abhängig von der Anzahl der funktionalen $\beta 3$ -UE war (Abb. 37). Es zeigte sich auch, dass beide $\beta 3$ -UE des Trimers im Pentamer integriert waren.

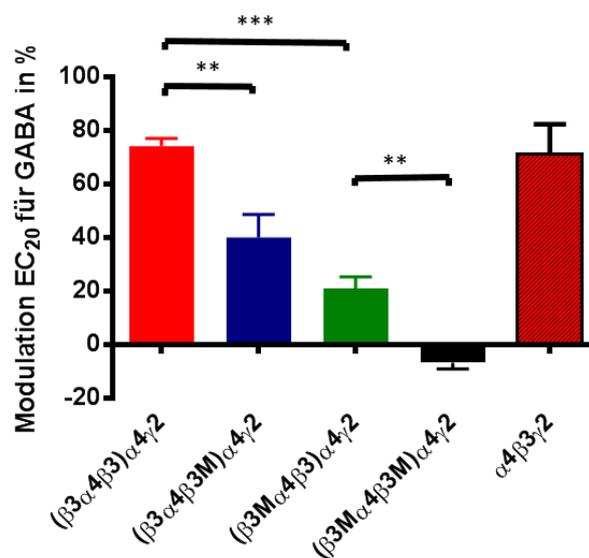


Abbildung 37 Modulation durch 2 μM Loreclezol. M kennzeichnet die Mutation N265S. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (n= 4-6). (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$)

4.7 Charakterisierung von ($\alpha\gamma\beta$)-Trimeren

Aus der These, dass eine Verknüpfung N-terminal an der α -Untereinheit die Funktion in Bezug auf GABA beeinflusst, ergab sich die Konstruktion der Konkatomere zur Assemblierung aus ($\alpha\gamma\beta$) und ($\alpha\beta$) Konstrukten (Abb. 38). Bei diesem Ansatz wurde angenommen, dass im Gegensatz zu der unter 4.6. dargestellten Strategie bei der eine α -UE frei und die andere C- und N-terminal verknüpft ist, beide N-Termini der α -UE die gleiche Flexibilität haben. Die Funktion der α -UE im Pentamer sollte also von der Position des Linkers unabhängig sein, so dass die Rolle der α -UE in Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen besser untersucht werden kann.

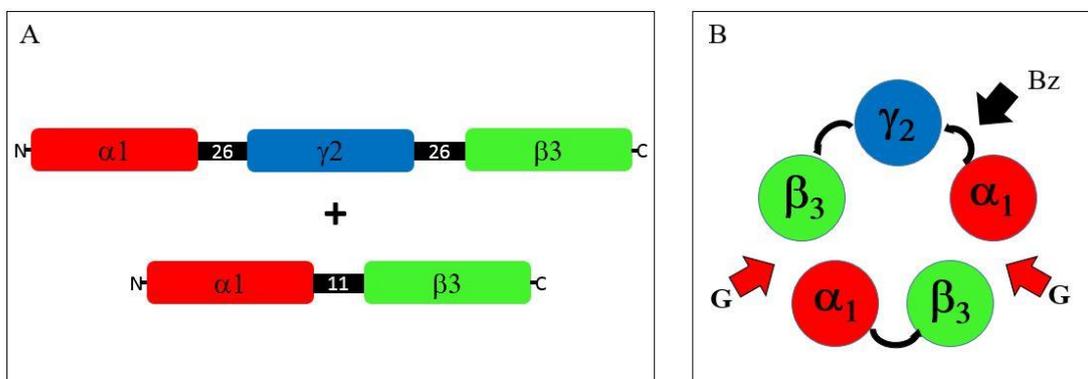


Abbildung 38: Rezeptoren mit einem ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)- und ($\alpha 1\beta 3$)-Konkatamer **A:** Schematische Darstellung der Proteinsequenzen. Für das ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)-Trimer ist die $\alpha 1$ -UE C-terminal mit der $\gamma 2$ -UE über 26 AS verknüpft und diese ist über 26 AS C-terminal mit einer $\beta 3$ -UE verbunden. Das ($\alpha 1\beta 3$)-Dimer besteht aus einer über 11 AS C-terminal mit einer $\beta 3$ -UE verknüpften $\alpha 1$ -UE **B:** Erwartete Anordnung der Untereinheiten bei Kotretransfektion dieser beiden Konstrukte, so dass zwei Bindestellen für GABA (G) und eine für Benzodiazepine (Bz) vorhanden sein sollten.

4.7.1 Western Blot

Abb. 39 zeigt, dass die trimeren Konstrukte in verschiedenen Variationen mit der $\alpha 1$ -, $\alpha 6$ -, $\beta 2$ - und $\beta 3$ -UE zusammen mit der $\gamma 2$ -UE mit einem anti $\gamma 2$ -Antikörper detektiert werden konnten und die Größe von etwa 150 kDa hatten. Das jeweilige ($\alpha\beta$)-Dimer, welches kotretransfiziert wurde, ließ sich nicht so leicht nachweisen, da der unter Kapitel 4.4.1 und 4.5.1 eingesetzte anti $\beta 2/3$ -Antikörper durch eine N-terminale Verlinkung der β -UE das N-terminale Epitop nicht mehr binden konnte. Ein getesteter anti- $\beta 3$ Antikörper, welcher im cytoplasmatischen Loop bindet, zeigte eine sehr starke unspezifische Bande auf Höhe der $\beta 3$ -UE und konnte daher zu Fragen bzgl. der Proteolyse nicht verwendet werden (Abb. 39 C). Der Antikörper BD28 detektiert alle $GABA_A$ -Rezeptoruntereinheiten bis auf die $\alpha 4$ und konnte wie in Abb. 39 D genutzt werden, um Dimere zu detektieren. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die eingesetzten Fusionsproteine nicht proteolysieren.

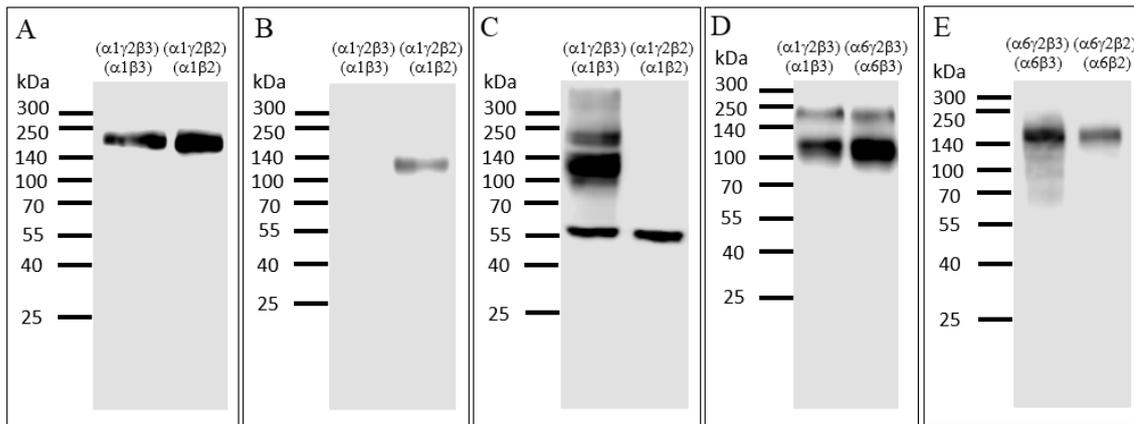


Abbildung 39: Western Blots ($\alpha\gamma2\beta$)–Trimer und ($\alpha\beta$)–Dimer. Detektion $\alpha\gamma2\beta$ –Konstrukte bei Ko-transfektionen mit einem ($\alpha\beta$)–Dimer. **A:** anti- $\gamma2$ 1:1000 **B:** anti- $\alpha1$ 1:1000 **C:** anti- $\beta3$ 1:10000 **D:** BD 28 gegen alle UE 1:1000 **E:** anti- $\gamma2$ 1:1000. Für A, B und C wurden dieselben Proben verwendet.

4.7.2 GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta\gamma2$)- und ($\alpha\beta$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren

4.7.2.1 GABA_A-Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen in der Konfiguration ($\alpha\beta\gamma2$)($\alpha\beta$)

Bei der Strategie, Rezeptoren mit Hilfe eines ($\alpha1\beta3\gamma2$)–Trimers zu assemblieren ist aufgefallen, dass im Gegensatz zu den bisherigen $\alpha\beta$ –enthaltenden Konstrukten zum Teil ähnlich hohe Ströme bei alleiniger Expression des Trimers wie bei einer Koexpression von Trimer und Dimer auftraten (Abb. 40). Weiterhin unterschied sich der EC_{50} -Wert für GABA von ($\alpha1\gamma2\beta3$)–Assemblierungen mit $49,2 \pm 6,3 \mu\text{M}$ nur unwesentlich von ($\alpha1\gamma2\beta3$)($\alpha1\beta3$)–Rezeptoren mit $30,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$. Dieser Umstand macht Interpretationen schwierig, insbesondere wenn GABA-Bindestellen ausgeschaltet werden und infolgedessen die messbaren Ströme kleiner werden, da nicht genau bestimmt werden kann, welche Assemblierungen vorliegen. Es wurde also versucht ($\alpha\gamma2\beta$)–Konstrukte zu finden, welche bei alleiniger Expression keine oder sehr kleine Ströme liefern. Wie Tab. 33 zu entnehmen ist, konnte durch ein Tausch mit der $\alpha6$ – oder $\alpha4$ –UE kein Vorteil gegenüber der $\alpha1$ erreicht werden. Es wurde von Sigel et. al. 2009 berichtet, dass $\beta3$ –enthaltende Konstrukte mit steigender RNA-Menge in *Xenopus*-Oozyten als Expressionssystem steigende Ströme bei alleiniger Expression von Dimeren und Timern zeigen. Es wurden infolgedessen analoge Konstrukte mit der $\beta1$ – und $\beta2$ –UE hergestellt und das Ergebnis in Tab. 33 zeigt, dass nur unter Einsatz der $\beta2$ –UE sehr geringe Ströme in ($\alpha\gamma\beta$)–Trimern messbar waren. Da aber die Expressionen mit der $\beta2$ –UE deutlich schlechter sind und zum Beispiel für Kombinationen mit mutierter GABA-Bindestelle, wie ($\alpha1\gamma2\beta2$)($\alpha1\beta2$), keine Ströme gemessen werden konnten, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die $\beta3$ –UE so zu modifizieren, dass sie in den ($\alpha\gamma2\beta$)–Konstrukten nicht

mehr Ströme bei alleiniger Expression zeigt. Die Eigenschaft, dass β 1- und β 3-UE im Gegensatz zur β 2-UE Homopentamere (Krishek et al. 1996 und Wooltorton et al. 1997) bilden können, wurde als mögliche Ursache für die Artefakte angenommen. Mit Mutation des Vierermotivs (DNTK) der β 2 in der β 3-UE bilden letztere keine Homopentamere mehr aus (Taylor et al. 1999). Es wurde also diese Variante der β 3-UE (DNTK) in die Konkatamere eingebaut, was aber zu keiner wesentlichen Veränderung führte (Abb. 40). Als weiterer Ansatz wurden Rezeptoren exprimiert, welche eine β 2-UE sowie eine β 3-UE haben und die Mutation für die GABA-Bindestelle in dem β 3-enthaltenden Konstrukt tragen. Da so ggf. auftretende Assemblierungen nur aus dem β 3-enthaltenden Konkatamer bestehen und eine GABA-Sensitivität im millimolaren Bereich haben, sollten sie im typischen EC_{50} -Bereich der meisten Assemblierungen (2-100 μ M) keinen wesentlichen Einfluss haben.

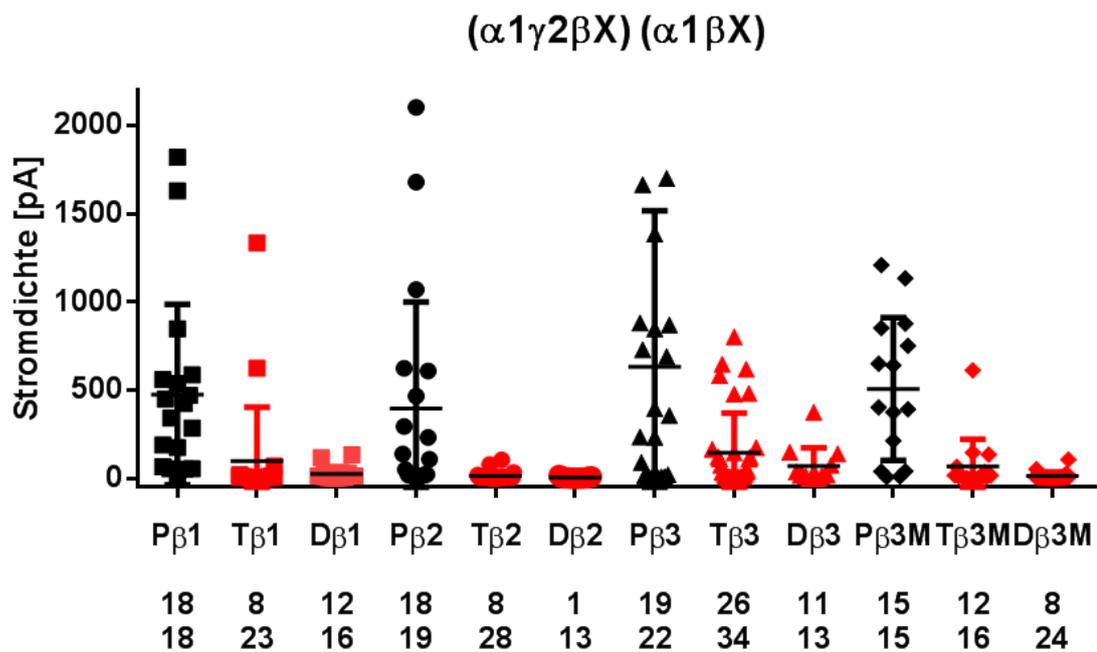


Abbildung 40: Stromdichten α 1-enthaltender Rezeptoren. Die Messpunkte sind Stromantworten einzelner Zellen auf 1000 μ M GABA. Schwarz dargestellt und mit P gekennzeichnet sind Ströme eines vollständigen Pentamers aus (α 1 γ 2 β)– und (α 1 β)–Konstrukten. Rot dargestellt und mit T und D gekennzeichnet sind die jeweiligen trimeren (α 1 γ 2 β)– und dimeren (α 1 β)–Konstrukte bei alleiniger Expression. Die unterste Reihe gibt die Anzahl der insgesamt gemessenen Zellen an und die Reihe darüber stellt die Anzahl der Zellen mit Strom dar. Die Messergebnisse stammen von mindestens drei Transfektionstagen je Ansatz. β 3M ist eine Variante der β 3–UE mit vier Punktmutationen, welche die Assemblierung zu Homopentameren beeinflussen sollen.

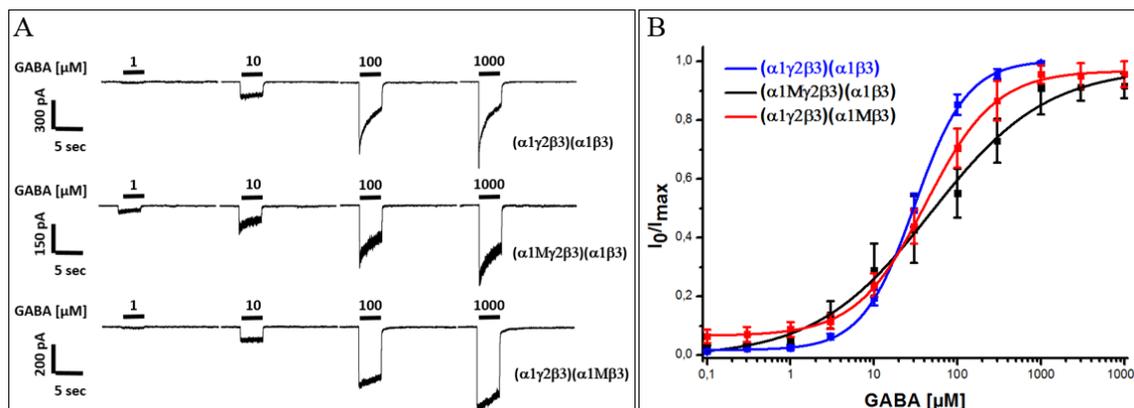


Abbildung 41: GABA-Pharmakologie ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)– und ($\alpha 1\beta 3$)–enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren mit selektiv mutierten GABA-Bindestellen. **A:** Exemplarische Strombilder, M kennzeichnet die Mutation F64C in den jeweiligen Konstrukt zum Ausschalten der Bindestelle. Die schwarzen Balken über den Stromspuren stellen die Ligandenapplikationen (4 sec) dar. **B:** Dosiswirkungskurven $\alpha 1$ -enthaltender Rezeptoren. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die Maximalströme normierten Ströme bei den jeweiligen Konzentrationen (n= 4-10).

Die GABA-Sensitivitäten der $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren sind Tab. 33 zu entnehmen und zeigten eine Verringerung etwa um den Faktor 10 im Vergleich zu Wild-typ-Rezeptoren. Bei $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren war der Unterschied hingegen vernachlässigbar. In allen hier getesteten Kombinationen hatten Rezeptoren mit einer GABA-Bindestelle unabhängig der Position eine ähnliche Sensitivität wie analoge Rezeptoren mit zwei GABA-Bindestellen. Die Rezeptoren mit einer GABA-Bindestelle zeigten eine langsamere Desensitisierung (Abb. 41 A) und hatten geringere Stromdichten (Tab. 33).

Kombinationen $\beta 2$ - und $\beta 3$ -enthaltender Konkatomere zeigten ähnliche Eigenschaften wie $\beta 3$ -Rezeptoren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das oben dargestellte Problem der funktionellen Assemblierung beispielsweise aus ($\alpha 1\beta 3\gamma 2$)-Trimeren bei alleiniger Expression die Messergebnisse bei Rezeptoren mit einer GABA-Bindestelle nicht wesentlich beeinflussen.

Tabelle 33: GABA-Pharmakologie ($\alpha\gamma 2\beta$)– und ($\alpha\beta$)–enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
($\alpha 1\beta 1\gamma 2$)	nicht bestimmbar		99 \pm 306	(23)
($\alpha 1\beta 1$)	nicht bestimmbar		26,5 \pm 40,1	(16)
($\alpha 1\beta 1\gamma 2$)($\alpha 1\beta 1$)	nicht bestimmt		476 \pm 512	(18)
($\alpha 1\beta 2\gamma 2$)	nicht bestimmbar		14,7 \pm 23,5	(28)
($\alpha 1\beta 2$)	nicht bestimmbar		kein Strom	(13)

($\alpha 1\beta 2\gamma 2$)($\alpha 1\beta 2$)	$45,8 \pm 1,6$	$1,2 \pm 0,1$	397 ± 605	5(19)
($\alpha 1\beta 3\gamma 2$)	$49,2 \pm 6,3$	$1,5 \pm 0,2$	146 ± 226	5(34)
($\alpha 1\beta 3$)	nicht bestimmbar		$71,0 \pm 104$	(13)
($\alpha 1\beta 3\gamma 2$)($\alpha 1\beta 3$)	$30,7 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,1$	633 ± 886	7(22)
($\alpha 1\beta 3\text{DNTK}\gamma 2$)	nicht bestimmbar		$69,4 \pm 153$	(16)
($\alpha 1\beta 3\text{DNTK}$)	nicht bestimmbar		$14,2 \pm 23,0$	(24)
($\alpha 1\beta 3\text{DNTK}\gamma 2$)($\alpha 1\beta 3\text{DNTK}$)	$24,0 \pm 3,0$	$1,7 \pm 0,3$	508 ± 405	4(15)
($\alpha 1\beta 2\gamma 2$)($\alpha 1\beta 3$)	$52,3 \pm 5,0$	$1,0 \pm 0,1$	754 ± 580	5(5)
($\alpha 1\beta 3\gamma 2$)($\alpha 1\beta 2$)	$27,9 \pm 1,4$	$1,4 \pm 0,1$	1493 ± 160	5(5)
($\alpha 1\text{M}\beta 3\gamma 2$)($\alpha 1\beta 3$)	$48,4 \pm 10,3$	$0,6 \pm 0,1$	291 ± 355	4(10)
($\alpha 1\beta 3\gamma 2$)($\alpha 1\text{M}\beta 3$)	$41,8 \pm 1,6$	$1,0 \pm 0,1$	$98,4 \pm 134$	4(10)
($\alpha 1\text{M}\beta 2\gamma 2$)($\alpha 1\beta 2$)	124 ± 9	$0,9 \pm 0,1$	$89,5 \pm 127$	4(11)
($\alpha 1\beta 2\gamma 2$)($\alpha 1\text{M}\beta 2$)	nicht bestimmbar		kein Strom	(11)
($\alpha 1\beta 2\gamma 2$)($\alpha 1\text{M}\beta 3$)	102 ± 19	$1,0 \pm 0,2$	275 ± 259	3(5)
($\alpha 1\text{M}\beta 3\gamma 2$)($\alpha 1\beta 2$)	$58,7 \pm 11,3$	$0,8 \pm 0,1$	309 ± 310	4(7)
($\alpha 4\beta 3\gamma 2$)	nicht bestimmt		110 ± 216	(8)
($\alpha 6\beta 2\gamma 2$)	nicht bestimmbar		kein Strom	(4)
($\alpha 6\beta 2$)	nicht bestimmbar		kein Strom	(6)
($\alpha 6\beta 2\gamma 2$)($\alpha 6\beta 2$)	$2,4 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	137 ± 85	6(6)
($\alpha 6\beta 3\gamma 2$)	$2,1 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	186 ± 281	6(10)
($\alpha 6\beta 3$)	nicht bestimmbar		$17,2 \pm 12,3$	(8)
($\alpha 6\beta 3\gamma 2$)($\alpha 6\beta 3$)	$2,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	250 ± 312	4(14)
($\alpha 6\beta 3\gamma 2$)($\alpha 6\text{M}\beta 3$)	$2,7 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$	$48,7 \pm 25,0$	3(10)
($\alpha 6\text{M}\beta 3\gamma 2$)($\alpha 6\beta 3$)	nicht bestimmbar		$12,2 \pm 5,3$	(9)

Die EC_{50} - und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-10000 μM GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

4.7.2.2 GABA_A-Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen in der Konfiguration $(\alpha\beta\gamma_2)(\alpha\beta)$

Wie in 4.7.2.1 dargestellt, hatten $(\alpha 1\beta 3\gamma_2)(\alpha 1\beta 3)$ -Rezeptoren eine etwa 15-fach niedrigere Sensitivität als analoge $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren. Im Folgenden sind Ergebnisse sogenannter Mischrezeptoren dargestellt, bei denen $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -UE teilweise mit mutierten GABA-Bindestellen in den Rezeptoren vorlagen. Wie in Tab. 32 dargestellt, haben Rezeptoren mit je einer $\alpha 1$ -UE und einer $\alpha 6$ -UE im Fall von $\beta 2$ -enthaltenden Rezeptoren eine GABA-Sensitivität ähnlich analoger Rezeptoren mit zwei $\alpha 1$ -UE (Tab. 31). Bei $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren liegt deren Sensitivität hingegen zwischen den Sensitivitäten analoger Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen. Ist in diesen Mischrezeptoren nun eine GABA-Bindestelle mutiert, so nähern sich die Sensitivitäten bei $(\alpha 1M\beta 3\gamma_2)(\alpha 6\beta 3)$ -, $(\alpha 1\gamma 2\beta 3)(\alpha 6M\beta 3)$ - und $(\alpha 6\beta 3\gamma_2)(\alpha 1M\beta 3)$ -Rezeptoren den Sensitivitäten der entsprechenden Rezeptoren mit der jeweils nicht mutierten UE an. Bei $(\alpha 6M\beta 3\gamma_2)(\alpha 1\beta 3)$ -Rezeptoren ist dies dagegen nicht der Fall, sie zeigen einen ähnlichen EC₅₀-Wert, wie $(\alpha 6\beta 3\gamma_2)(\alpha 1\beta 3)$ -Rezeptoren.

Tabelle 34 : GABA-Pharmakologie $(\alpha\gamma_2\beta)$ - und $(\alpha\beta)$ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Subtypen

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
$(\alpha 1\beta 2\gamma_2)(\alpha 6\beta 2)$	$37,9 \pm 2,0$	$0,9 \pm 0,1$	304 ± 268	5(5)
$(\alpha 6\beta 2\gamma_2)(\alpha 1\beta 2)$	$33,8 \pm 1,3$	$1,2 \pm 0,1$	187 ± 181	5(5)
$(\alpha 1\beta 3\gamma_2)(\alpha 6\beta 3)$	$9,4 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,1$	892 ± 637	4(7)
$(\alpha 1M\beta 3\gamma_2)(\alpha 6\beta 3)$	$3,9 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,1$	197 ± 217	8(8)
$(\alpha 1\beta 3\gamma_2)(\alpha 6M\beta 3)$	$28,3 \pm 1,9$	$1,2 \pm 0,1$	$78,2 \pm 54,5$	4(8)
$(\alpha 6\beta 3\gamma_2)(\alpha 1\beta 3)$	$16,6 \pm 1,7$	$0,8 \pm 0,1$	741 ± 779	8(8)
$(\alpha 6M\beta 3\gamma_2)(\alpha 1\beta 3)$	$11,4 \pm 1,1$	$0,9 \pm 0,1$	274 ± 285	6(6)
$(\alpha 6\beta 3\gamma_2)(\alpha 1M\beta 3)$	$1,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$58,2 \pm 63,3$	5(14)

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-10000 μ M GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

4.7.3 Modulatoren

Zum Überprüfen der Anwesenheit der einzelnen Untereinheiten und deren Rolle im Pentamer wurden folgende UE-selektive Modulatoren analog Kapitel 4.6.3 eingesetzt.

4.7.3.1 Modulation ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$)–enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine

Wie in Abb. 42 zu erkennen ist, zeigte die Modulierbarkeit mit Diazepam in allen Fällen bis auf ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)($\alpha 6M\beta 3$)–Rezeptoren die $\alpha 1\gamma 2$ –Nachbarschaft in ($\alpha 1\gamma 2\beta$)–enthaltenden Rezeptoren an. In ($\alpha 6\gamma 2\beta$)–enthaltenden Rezeptoren blieb die Modulation wie erwartet in allen Assemblierungen aus. Diese konnte gemäß Abb. 43 hingegen mit den auch an $\alpha 6$ –enthaltenden bindenden Bretazenil gezeigt werden. Die Rezeptoren mit einem ($\alpha 1\gamma 2\beta$)–Trimer zeigten ebenfalls eine unterschiedlich starke Modulierbarkeit mit Bretazenil, unabhängig davon, ob noch zusätzlich eine $\alpha 6$ –UE in den Konstrukten enthalten ist.

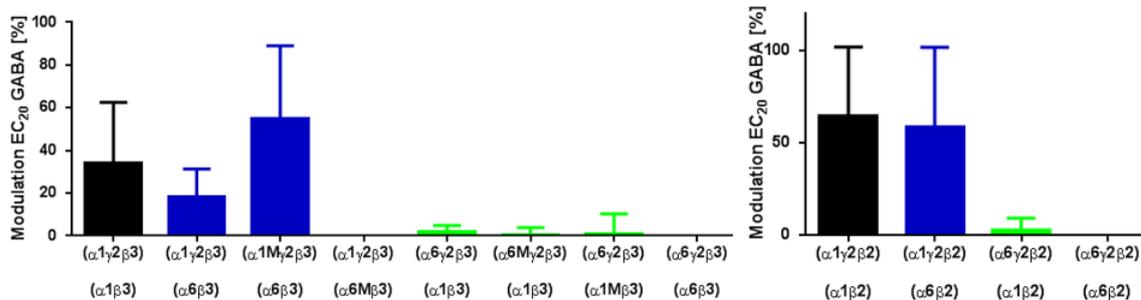


Abbildung 42: Modulation durch Diazepam zum Nachweis der $\alpha 1$ –UE in direkter Nachbarschaft zu der $\gamma 2$ –UE. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD Modulation des EC₂₀ für GABA durch 1 μ M Diazepam (n= 3-6).

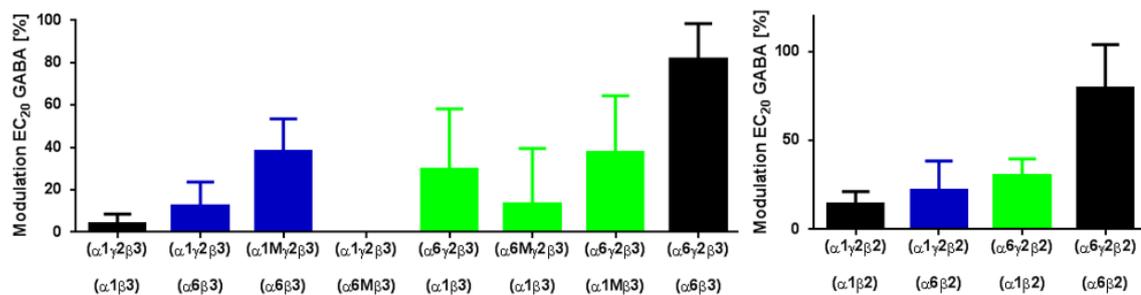


Abbildung 43: Modulation durch Bretazenil zum Nachweis der $\alpha 6$ –UE in direkter Nachbarschaft zu der $\gamma 2$ –UE. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD Modulation des EC₂₀ für GABA durch 10 μ M Bretazenil (n= 3-6).

4.7.3.2 Modulation ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$)–enthaltender Rezeptoren durch E033-00233

Wie bereits in Kapitel 4.3 erwähnt wurde, besitzt E033-00233 eine Selektivität für $\beta 2$ –enthaltende Rezeptoren und einige Parallelen zu den Anästhetika Etomidat und Lorazepam. Im Folgenden sind Rezeptoren mit einer $\beta 2$ – und einer $\beta 3$ –UE bzw. einer $\alpha 1$ – und einer $\alpha 6$ –UE in unterschiedlichen Positionen dargestellt. Wie Abb. 44 zu entnehmen

ist, war die Wirkung von E033-00233 additiv in Abhängigkeit der Anzahl der β 2-UE und unabhängig von deren Position. Weiterhin zeigten Rezeptoren mit zwei α 6-UE größere Effekte als Rezeptoren mit einer oder zwei α 1-UE. Im Fall der α - ist die Wirkung daher nicht additiv.

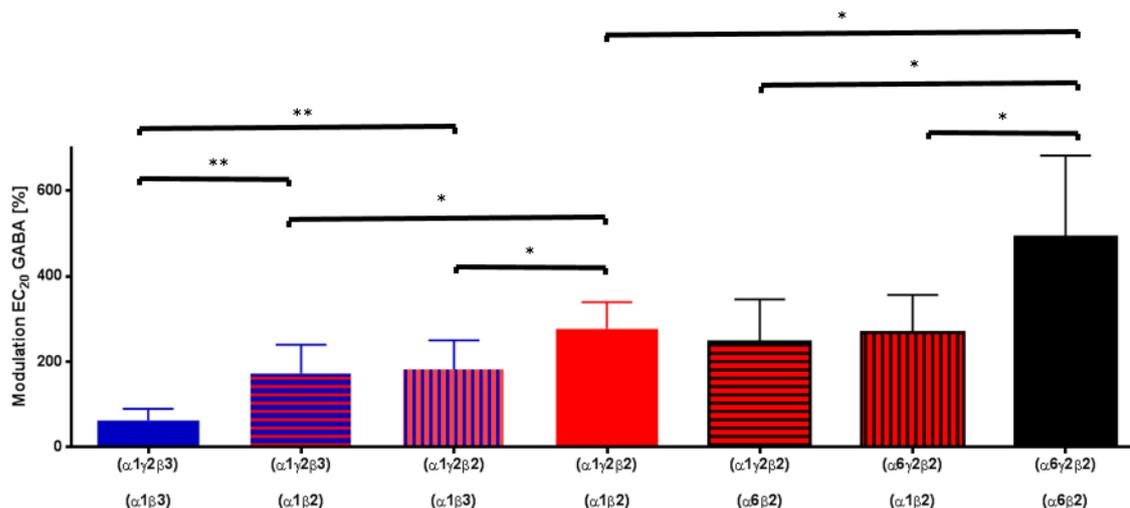


Abbildung 44 Modulation E033-00233. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD Modulation des EC₂₀ für GABA durch 30 μ M E033-00233 (n= 3-6). (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

4.7.3.3 Inhibition ($\alpha\beta\gamma$)($\alpha\beta$)-enthaltender Rezeptoren durch Furosemid

Die Ergebnisse der Inhibition mit dem α 6-selektiven Furosemid sind in Abb. 45 dargestellt und zeigen eine nahezu hundertprozentige Inhibition der GABA-induzierten Ströme mit 500 μ M Furosemid, wenn zwei α 6-UE enthalten waren. Waren eine α 6- und eine α 1-UE enthalten, so zeigten die meisten Rezeptoren eine Inhibition von etwa 75%. Eine Ausnahme stellten wiederum die (α 1 γ 2 β 3)(α 6M β 3)-Rezeptoren dar, welche nicht durch Benzodiazepine moduliert werden konnten und auch nahezu insensitive gegenüber Furosemid bei 500 μ M waren. Die andere Variante mit der mutierten α 6-UE in (α 6M γ 2 β 3)(α 1 β 3)-Rezeptoren zeigte ebenfalls eine geringere Inhibition als die entsprechende Wild-Typ-Kombination.

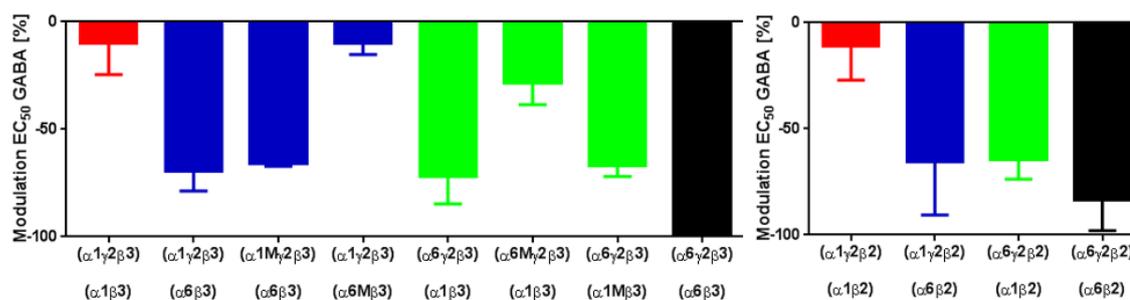


Abbildung 45: Furosemidinhibition zum Nachweis der α 6-UE. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Modulation des EC₅₀ für GABA durch 500 μ M Furosemid (n= 3-7).

4.8 Charakterisierung von ($\beta\alpha\gamma$)-Trimeren

Als Gegenstück zu dem Verfahren aus Kapitel 4.7, wonach die α -Untereinheit N-terminal frei sein sollte, ergab sich der Ansatz, Rezeptoren zu assemblieren, bei denen beide α -Untereinheiten N-terminal verknüpft wurden (Abb. 46).

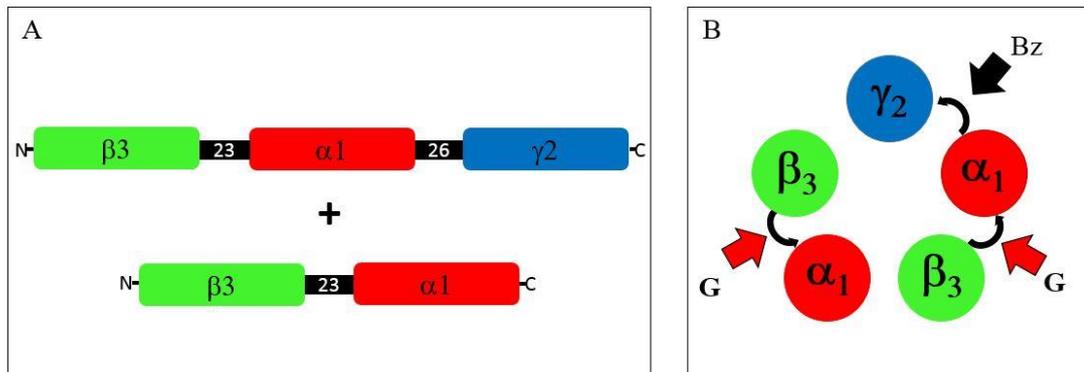


Abbildung 46: Rezeptoren mit einem ($\beta3\alpha1\gamma2$)- und ($\beta3\alpha1$)-Konkatamer **A:** Schematische Darstellung der Proteinsequenzen. Für das ($\beta3\alpha1\gamma2$)-Trimer ist die $\beta3$ -UE C-terminal mit der $\alpha1$ -UE über 23 AS verknüpft und diese ist über 26 AS C-terminal mit einer $\gamma2$ -UE verbunden. Das ($\beta3\alpha1$)-Dimer besteht aus einer über 23 AS C-terminal mit einer $\alpha1$ -UE verknüpften $\alpha1$ -UE **B:** Erwartete Anordnung der Untereinheiten bei Kotransfektion dieser beiden Konstrukte, so dass zwei Bindestellen für GABA (G) und eine für Benzodiazepine (Bz) vorhanden sein sollten.

4.8.1 Western Blot

Die hier eingesetzten ($\beta3\alpha1\gamma2$)- und ($\beta3\alpha6\gamma2$)-Konstrukte zeigten mit dem anti $\gamma2$ -Antikörper im Western Blot nur eine Bande im Bereich von etwa 150 kDa und wurden somit nicht proteolysiert (Abb. 47). Die koexprimierten ($\beta\alpha$)-Dimere wurden als intakte Dimere bereits in 4.4.1 aufgeführt und sind somit hier nicht noch einmal dargestellt.

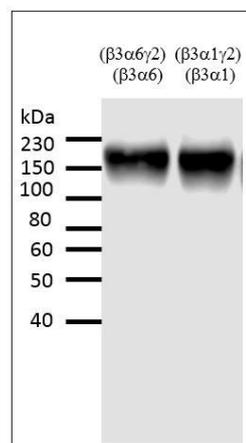


Abbildung 47 : Western Blot ($\beta3\alpha\gamma2$)-Konkatamere. Detektion verschiedener ($\beta\alpha\gamma$)-Konstrukte bei Kotransfektionen mit einem ($\beta\alpha$)-Dimer. Als Antikörper wurde anti- $\gamma2$ 1:1000 verwendet.

4.8.2 GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\gamma 2$)- und ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren

Wie unter 4.6.2 aufgeführt, zeigten $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren in der Konfiguration ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) + $\alpha 1 + \gamma 2$, dass die N-terminale Verlinkung der $\alpha 1$ -UE einen wesentlichen Einfluss auf die GABA-Sensitivität hatte. In der Konfiguration ($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)($\beta 3\alpha 1$) wurde dies bestätigt, da die Sensitivität mehr als um den Faktor 25 geringer war als in wildtypischen $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren (Tab. 35). Weiterhin zeigten in dieser Konfiguration Rezeptoren mit nur einer Bindestelle unabhängig der Position eine mehr als 10-fache Verringerung der Sensitivität im Vergleich zu den analogen Rezeptoren mit zwei Bindestellen. Interessanterweise stieg die Sensitivität in der Konfiguration ($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)($\alpha 1\beta 3$), wenn die Bindestelle in dem Trimer mutiert war.

Tabelle 35: GABA-Pharmakologie ($\beta\alpha\gamma 2$)- und ($\beta\alpha$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren mit gleichen α -Subtypen

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)	149 \pm 21	1,0 \pm 0,1	290 \pm 272	3(13)
($\beta 3\alpha 1$)	nicht bestimmbar		61,2 \pm 77,3	(5)
($\alpha 1\beta 3$)	nicht bestimmbar		71,0 \pm 104	(13)
($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)($\beta 3\alpha 1$)	85,8 \pm 14,3	1,6 \pm 0,2	1148 \pm 637	5(10)
($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)($\alpha 1\beta 3$)	83,1 \pm 10,4	1,0 \pm 0,1	1390 \pm 1755	4(7)
($\beta 3\alpha 1M\gamma 2$)($\beta 3\alpha 1$)	1141 \pm 147	0,7 \pm 0,1	279 \pm 20	3(3)
($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)($\beta 3\alpha 1M$)	1345 \pm 159	0,7 \pm 0,1	514 \pm 376	6(11)
($\beta 3\alpha 1M\gamma 2$)($\alpha 1\beta 3$)	25,0 \pm 1,9	1,1 \pm 0,1	190 \pm 54	5(5)
($\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	nicht bestimmbar		48,5 \pm 45,1	(5)
($\beta 3\alpha 6$)	nicht bestimmbar		14,9 \pm 6,1	(5)
($\beta 3\alpha 6\gamma 2$)($\beta 3\alpha 6$)	1,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	498 \pm 265	5(5)
($\beta 3\alpha 6M\gamma 2$)($\beta 3\alpha 6$)	2,1 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3	159 \pm 95	9(9)
($\beta 3\alpha 6\gamma 2$)($\beta 3\alpha 6M$)	2,7 \pm 0,3	0,8 \pm 0,1	221 \pm 114	7(7)
($\beta 3\alpha 6s\gamma 2$)($\beta 3\alpha 6$)	2,5 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	199 \pm 224	6(6)
($\beta 3\alpha 6\gamma 2$)($\beta 3\alpha 6s$)	3,3 \pm 0,6	0,9 \pm 0,1	122 \pm 148	7(12)

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-10000 μ M GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

Für $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren konnte in der Konfiguration $(\beta 3\alpha 6\gamma 2)(\beta 3\alpha 6)$ bei Rezeptoren mit einer Bindestelle unabhängig der Position eine Sensitivität ähnlich den analogen Rezeptoren mit zwei Bindestellen gefunden werden (Tab. 35). Weiterhin zeigten die Rezeptoren mit einer GABA-Bindestelle geringere Ströme und eine langsamere Desensibilisierung (Abb. 48).

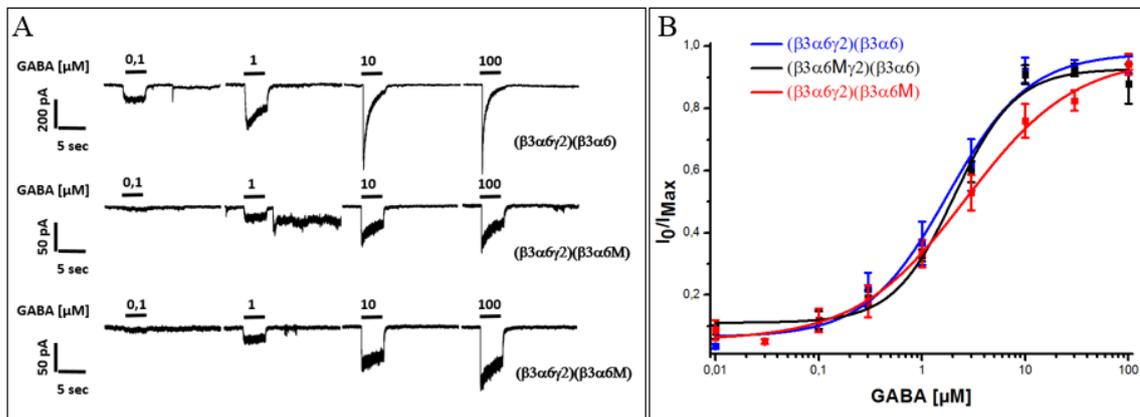


Abbildung 48: GABA-Pharmakologie $(\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ - und $(\beta 3\alpha 6)$ -enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren mit selektiv mutierten GABA-Bindestellen. A: Exemplarische Strombilder, M kennzeichnet die Mutation F63C in den jeweiligen Konstrukt zum Ausschalten der Bindestelle. Die schwarzen Balken über den Stromspuren stellen die Ligandenapplikationen (4 sec) dar. **B:** Dosiswirkungskurven $\alpha 6$ -enthaltender Rezeptoren. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM von auf die Maximalströme normierten Ströme bei den jeweiligen Konzentrationen (n= 5-9).

4.9 Charakterisierung von $(\alpha\beta\alpha)$ -Trimeren

Konstrukte in der pseudosymmetrischen Anordnung $(\alpha\beta\alpha)$ wurden erstellt, um anhand der unterschiedlichen Pharmakologie der $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheit für Benzodiazepine die sogenannte Uhrzeigersinnregel zu überprüfen. Diese Regel besagt, dass sich die Konkatamere im Pentamer vom N- zum C-Terminus gegen den Uhrzeigersinn assemblieren, wenn man den Rezeptor vom Zelläußeren betrachtet. Die Proteine und die erwarteten Assemblierungen sind in Abb. 49 gezeigt.

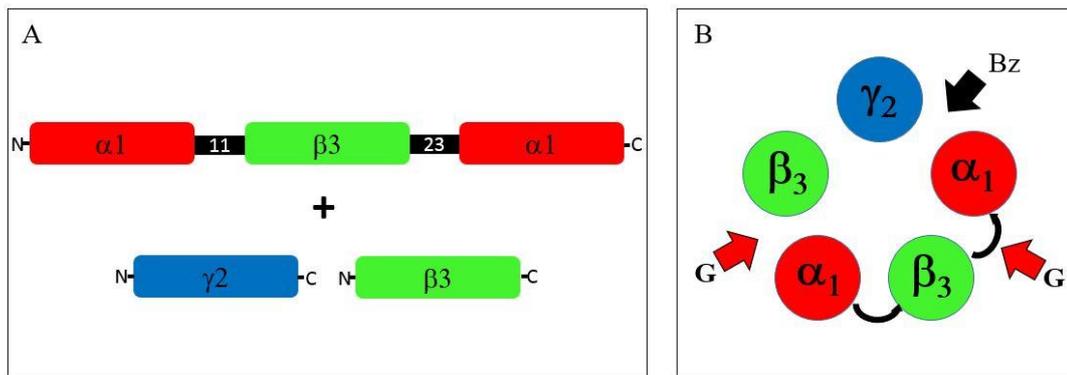


Abbildung 49: Rezeptoren mit einem (α1β3α1)-Konkatamer. **A:** Schematische Darstellung der Proteinsequenzen. Für das (α1β3α1)-Trimer ist die β3-UE N-terminal mit einer α1-UE über 11 AS und C-terminal über 23 AS mit einer α1-UE verknüpft. **B:** Erwartete Anordnung der Untereinheiten bei Koexpression des (α1β3α1)-Konstruktes mit einer γ2- und einer β3-UE, so dass zwei Bindestellen für GABA (G) und eine für Benzodiazepine (Bz) vorhanden sein sollten.

4.9.1 Western Blot

Die (αβα)-Trimere zeigten bei alleiniger Expression in keiner Kombination Proteolyseprodukte (Abb. 50 A). Die Konstrukte wurden ohne weitere Untereinheiten transfiziert, da nur mit dem BD 28 Antikörper alle Proben gut detektiert werden konnten. Bei Koexpressionen mit weiteren Untereinheiten hätte dieser Antikörper eben diese auch markiert, was die Unterscheidung von Proteolyseprodukten erschwert hätte. Die zur Koexpression eingesetzten dualen β3γ2-Konstrukte zeigten mit dem anti-γ2 Antikörper ebenfalls nur eine Bande der erwarteten Größe (Abb. 50 B).

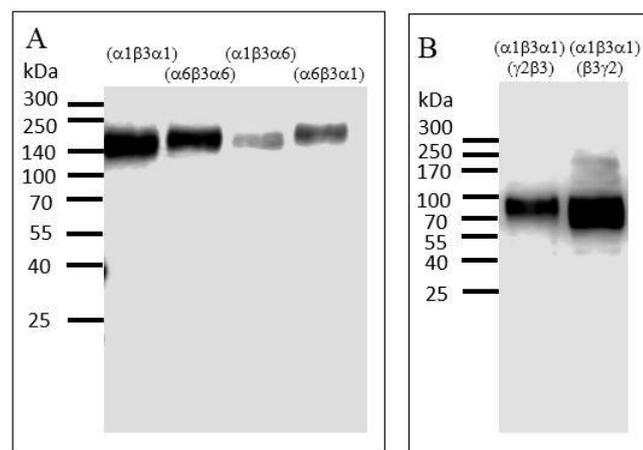


Abbildung 50 : Western Blots (αβ3α)-Trimere und dualer γ2-Konstrukte. **A:** Detektion verschiedener (αβ3α)-Konstrukte. Als Antikörper wurde BD28 (gerichtet gegen alle UE) 1:1000 verwendet. **B:** Nachweis dualer γ2-Konstrukte bei Koexpression mit einem (α1β3α1)-Trimer. Als Antikörper wurde anti-γ2 1:1000 verwendet.

4.9.2 GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren

($\alpha\beta\alpha$)-Trimere zeigten nur in Kombinationen mit einer $\beta 3$ - und einer $\gamma 2$ -UE bzw. eines dualen $\beta 3\gamma 2$ -Konstruktes sehr gute Ströme im Bereich von ca. 1 nA (Tab. 36). Die Sensitivitäten lagen für $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren etwa 6-8-fach niedriger als die entsprechenden Rezeptoren aus individuellen Untereinheiten. Für die $\alpha 6$ gab es dabei wie bei den oben aufgeführten Konfigurationen keinen relevanten Unterschied zu den $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren. Die Rezeptoren mit einer $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -UE zeigten einen geringen Positionseffekt, wobei die Assemblierung mit der $\alpha 6$ -UE neben der $\gamma 2$ -UE die Sensitivität von Rezeptoren mit zwei $\alpha 6$ -UE zeigten. Eine Verlinkung der $\gamma 2$ -UE mit der $\beta 3$ -UE zu ($\gamma 2\beta 3$)- bzw. ($\beta 3\gamma 2$)-Dimeren führte zu einer Verringerung der Sensitivitäten um den Faktor 2-10, gegenüber einer Kombinationen aus ($\alpha\beta\alpha$)-Trimer + $\beta 3$ + $\gamma 2$.

Tabelle 36: GABA-Pharmakologie ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender GABA_A-Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ [μ M]	p	Stromdichte [pA]	n
($\alpha 1\beta 3\alpha 1$) $\beta 3\gamma 2$	19,3 \pm 2,7	1,1 \pm 0,2	961 \pm 236	4(4)
($\alpha 1\beta 3\alpha 1$)($\beta 3\gamma 2$)	42,5 \pm 1,5	1,6 \pm 0,1	1053 \pm 803	4(4)
($\alpha 1\beta 3\alpha 1$)($\gamma 2\beta 3$)	37,5 \pm 2,9	1,6 \pm 0,1	976 \pm 847	5(5)
($\alpha 6\beta 3\alpha 6$) $\beta 3\gamma 2$	2,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1127 \pm 1622	7(7)
($\alpha 1\beta 3\alpha 6$) $\beta 3\gamma 2$	2,3 \pm 0,3	1,1 \pm 0,1	1144 \pm 847	6(6)
($\alpha 1\beta 3\alpha 6$)($\beta 3\gamma 2$)	9,4 \pm 1,4	0,7 \pm 0,1	1580 \pm 1260	7(7)
($\alpha 1\beta 3\alpha 6$)($\gamma 2\beta 3$)	7,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,1	1528 \pm 1076	6(6)
($\alpha 6\beta 3\alpha 1$) $\beta 3\gamma 2$	10,3 \pm 1,3	1,1 \pm 0,1	664 \pm 517	7(7)
($\alpha 6\beta 3\alpha 1$)($\beta 3\gamma 2$)	57,5 \pm 13,6	1,0 \pm 0,1	815 \pm 397	3(3)
($\alpha 6\beta 3\alpha 1$)($\gamma 2\beta 3$)	104 \pm 15	0,7 \pm 0,1	715 \pm 250	3(3)
($\alpha 1\beta 3\alpha 1$)	nicht bestimmbar		34,9 \pm 39,3	(7)
($\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	nicht bestimmbar		11,9 \pm 12,7	(5)
($\alpha 1\beta 3\alpha 6$)	nicht bestimmbar		69,5 \pm 74,5	(5)
($\alpha 6\beta 3\alpha 1$)	nicht bestimmbar		17,6 \pm 5,6	(5)
($\alpha 1\beta 3\alpha 1$) $\gamma 2$	nicht bestimmbar		37,0 \pm 42,8	(6)

Die EC₅₀- und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-10000 μ M GABA. n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

4.9.3 Modulatoren

4.9.3.1 Modulation ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender Rezeptoren durch Benzodiazepine

Wie Abb. 51 zu entnehmen ist, modulierte Diazepam GABA-induzierte Ströme nur, wenn eine $\alpha 1$ -UE C-terminal in einem ($\alpha\beta\alpha$)-Trimer vorlag. Sie muss also immer neben einer $\gamma 2$ -UE vorliegen. Die Trimere assemblierten gemäß der Uhrzeigersinnregel. Durch die positive $\alpha 6$ -selektive Modulation durch Flumazenil (Ro-1788) und Bretazenil konnte ebenfalls beobachtet werden, dass diese UE nur neben einer $\gamma 2$ -UE liegen kann, wenn sie in den Trimeren in C-terminaler Position war.

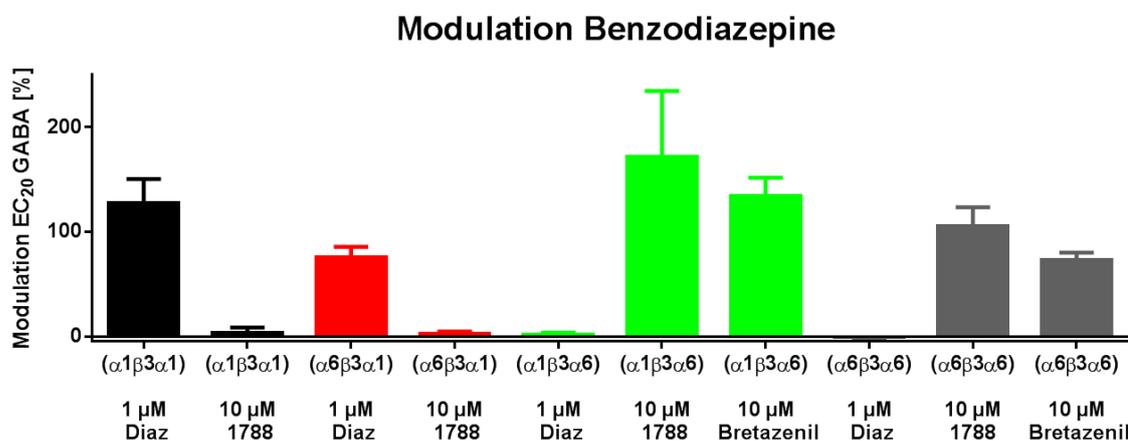


Abbildung 51: Modulation von ($\alpha\beta\alpha$) + $\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren durch Benzodiazepine. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (n = 3-8). 1788= Ro15-1788; Diaz= Diazepam

Für Flurazepam sind weitere Wirkungen unabhängig der klassischen Bindestelle für Benzodiazepine zwischen einer α - und $\gamma 2$ -UE beschrieben. Im mikromolaren Bereich konnte eine allosterische Inhibition der nanomolaren positiven Modulation vermittelt durch die klassische Benzodiazepinbindestelle, beobachtet werden (Walters et al. 2000). Baur et. al (2008) konnten zeigen, dass die α -Selektivität an beiden Stellen gleich ist. Bei der $\alpha 1$ -UE konnten also positive und negative Modulation festgestellt werden. Liegt hingegen eine für die Positivmodulation flurazepaminsensitive $\alpha 6$ -UE zwischen den $\beta 3$ -UE, so blieb auch eine negative Modulation der Positivmodulation über die klassische $\alpha 1\gamma 2$ -Benzodiazepinbindestelle aus.

Im Folgenden wurde entsprechendes mit den ($\alpha\beta 3\alpha$)-Trimeren überprüft, wobei zusätzlich Bretazenil eingesetzt wurde, um Rezeptoren mit der $\alpha 6$ -UE neben der $\gamma 2$ -UE positiv zu modulieren. Wie Abb. 52 zu entnehmen ist, wurde eine Inhibition durch Flurazepam mit 100 μ M beobachtet, wenn eine $\alpha 1$ -UE zwischen den $\beta 3$ -UE vorlag und

über die klassischen Benzodiazepinbindestelle entweder mit geringen Flurazepamkonzentrationen ($\alpha 1$) oder 10 μM Bretazenil ($\alpha 6$) positiv moduliert wurde. Es wurde aber weiterhin beobachtet, dass 100 μM Flurazepam negativ modulieren kann, wenn eine $\alpha 6$ -UE zwischen den $\beta 3$ -UE vorlag und positiv über die klassischen Benzodiazepinbindestelle moduliert wurde.

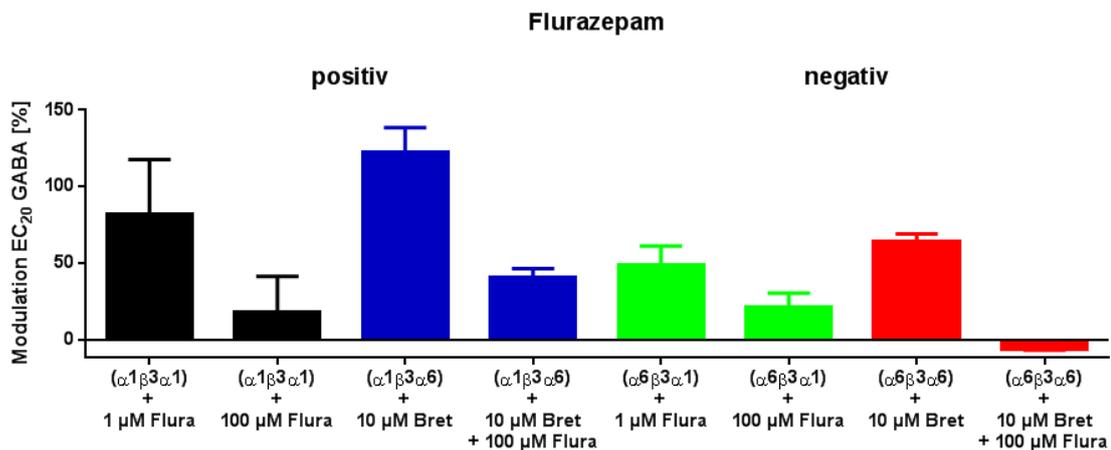


Abbildung 52: Modulation von ($\alpha\beta\alpha$) + $\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren durch Flurazepam. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (n= 3-8). Flura= Flurazepam; Bret= Bretazenil

Den Darstellungen oben zufolge richtete sich ein ($\alpha\beta 3\alpha$)-Trimer im Pentamer gemäß der Uhrzeigersinnregel aus. Im Folgenden wurde dies nochmals mit ($\gamma 2\beta 3$)- bzw. ($\beta 3\gamma 2$)-Dimeren überprüft. In Abb. 53 ist dargestellt, dass bei Kotransfektionen mit einem ($\gamma 2\beta 3$)- bzw. ($\beta 3\gamma 2$)-Konstrukt analoge Ergebnisse wie bei ($\alpha\beta 3\alpha$) + $\beta 3$ + $\gamma 2$ -Expressionen erhalten wurden. Es bildete sich also immer die gleiche α - $\gamma 2$ -Nachbarschaft aus, unabhängig der Orientierung in den $\beta 3\gamma 2$ -Konkatameren. Das ($\beta 3\gamma 2$)-Dimer gehorchte der Uhrzeigersinnregel also nicht.

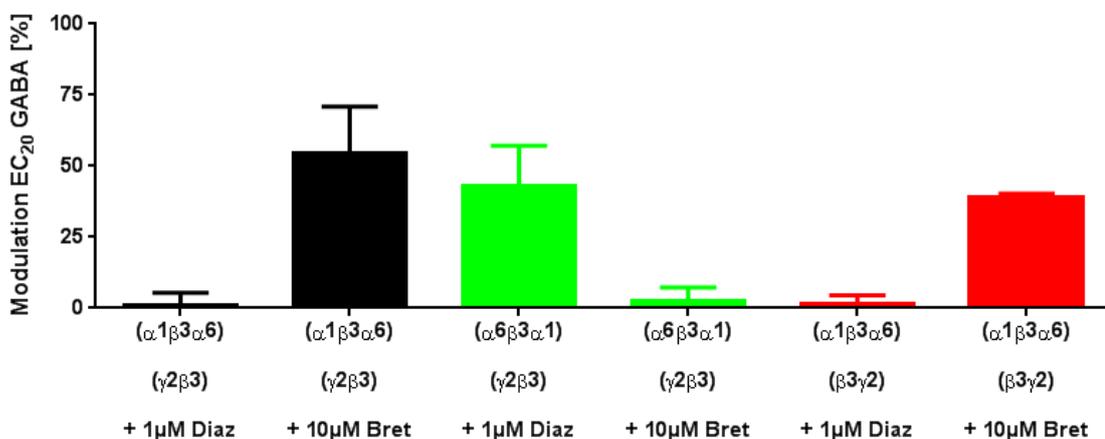


Abbildung 53: Modulation von ($\alpha\beta\alpha$) + ($\gamma 2\beta 3$)/($\beta 3\gamma 2$): Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (n= 3-4). Diaz= Diazepam; Bret= Bretazenil

4.9.3.2 Inhibition ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender Rezeptoren durch Furosemid

Zum Nachweis, dass die α -UE des ($\alpha\beta\alpha$)-Trimers funktionell im Pentamer eingebaut wurden, wurde auch die Anwesenheit der α_6 -UE im Pentamer überprüft. Wie Abb. 54 zu entnehmen ist, zeigten alle Konstrukte mit einer α_6 -UE eine Inhibition durch Furosemid. Die Rezeptoren mit nur einer α_1 -UE im Trimer hatten eine minimal geringere Sensitivität, es bildete sich aber kein furosemidinsensitives Plateau in den Dosiswirkungskurven aus, was darauf hindeutet, dass keine Subpopulationen mit nur α_1 -enthaltenden Rezeptoren vorlagen.

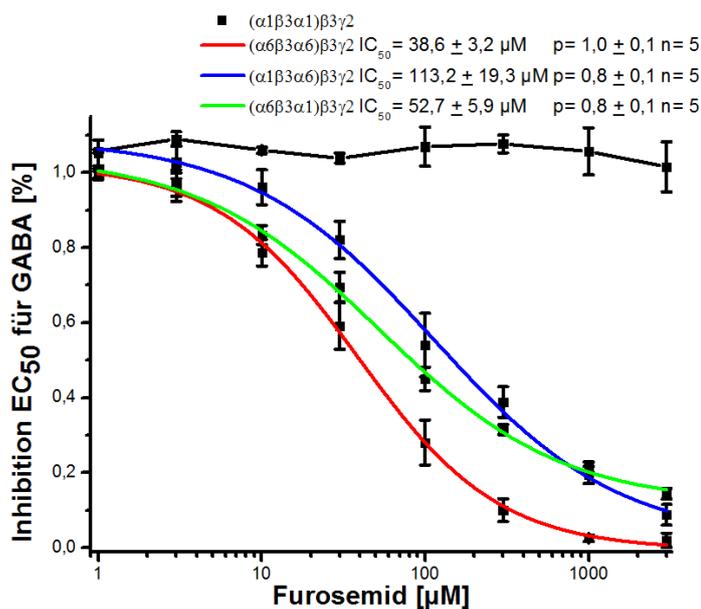


Abbildung 54: Furosemidinhibition ($\alpha\beta\alpha$)-enthaltender Rezeptoren. Dargestellt sind logistische Fits durch die Mittelwerte \pm SEM ($n = 3-5$)

4.10 Rezeptorassamblierungen aus γ_2 -enthaltenden Dimeren mit ($\alpha_1\beta_2$)-Dimeren

Zusätzlich zu den unerwarteten Ergebnissen bei der Modulation von Diazepam in ($\alpha_1\beta$) γ_2 -Rezeptoren oder das Bilden von Rezeptoren aus Dimeren oder Trimeren bei deren alleiniger Expression gab es weitere Ergebnisse, bei denen γ_2 -enthaltende Dimere bei Koexpressionen mit einem ($\alpha_1\beta_2$)-Dimer funktionelle Rezeptoren bildeten.

4.10.1 Western Blots

Die $\gamma 2$ -Dimere zeigten bei Kotransfektionen mit einem $(\alpha 1\beta 2)$ -Dimer ebenso wie bei den oben erwähnten Kotransfektionen mit einem Trimer keine Proteolyse (Abb. 55).

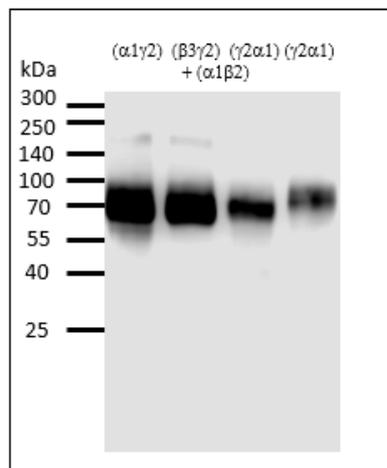


Abbildung 55: Western Blots dualer $\gamma 2$ -Konstrukte. Detektion verschiedener $\gamma 2$ -Dimere kotransfiziert jeweils mit einem $(\alpha 1\beta 2)$ -Dimer. Als Antikörper wurde anti- $\gamma 2$ 1:1000 verwendet.

4.10.2 GABA-Pharmakologie $\gamma 2$ -enthaltender Dimere koexprimiert mit $(\alpha 1\beta 2)$ -Dimeren

Die $(\alpha 1\beta 2)$ -Dimere zeigten in Kombination mit einer $\gamma 2$ - oder einer $\alpha 1$ -UE deutliche Ströme mit GABA und Pentobarbital. Bei alleiniger Expression zeigten sie wie alle $\gamma 2$ -enthaltenden Dimere keinen durch die beiden Liganden erzeugten relevanten Strom. Exprimierte man sie jedoch zusammen, so ließen sich bei allen Kombinationen Ströme messen und EC_{50} -Werte bestimmen (Tab. 37). Die $\alpha 1\gamma 2$ -Konstrukte zeigten ähnliche Sensitivitäten wie $(\alpha 1\beta 2)\gamma 2$ -Rezeptoren und zeigten mit GABA größere Ströme als mit Pentobarbital. Bei den $\beta 3\gamma 2$ -Konstrukten waren die Sensitivitäten um den Faktor 3-6 geringer als bei $(\alpha 1\beta 2)\gamma 2$ -Rezeptoren. Es fällt besonders auf, dass die GABA-induzierten Ströme kleiner als die durch Pentobarbital verursachten Maximalströme waren.

Tabelle 37: GABA-Pharmakologie $\gamma 2$ -enthaltender Dimeren mit $(\alpha 1\beta 2)$ -Dimeren

Subtyp	EC_{50} [μM]	p	Stromdichte [pA]	Stromdichte [pA]	n
			1000 μM GABA	500 μM PB	
$(\alpha 1\beta 2)$	$19,3 \pm 2,7$	$1,1 \pm 0,2$	$6,0 \pm 4,5$	$7,2 \pm 4,4$	(13)
$(\alpha 1\beta 2)\alpha 1$	$9,2 \pm 1,1$	$1,1 \pm 0,1$	1320 ± 345	341 ± 78	3(4)
$(\alpha 1\beta 2)\beta 2$	nicht bestimmbar		$14,7 \pm 14,7$	$15,3 \pm 14,7$	(7)

$(\alpha_1\beta_2)\beta_3$	nicht bestimmbar		$27,7 \pm 13,3$	$38,3 \pm 21,3$	(4)
$(\alpha_1\beta_2)\gamma_2$	$21,2 \pm 1,3$	$1,3 \pm 0,1$	507 ± 360	453 ± 388	8(10)
$(\alpha_1\beta_2)(\alpha_1\gamma_2)$	$26,6 \pm 1,8$	$1,4 \pm 0,1$	188 ± 496	$39,2 \pm 63,4$	4(11)
$(\alpha_1\beta_2)(\gamma_2\alpha_1)$	$38,6 \pm 3,3$	$1,4 \pm 0,1$	281 ± 352	106 ± 133	5(10)
$(\alpha_1\beta_2)(\beta_3\gamma_2)$	$69,1 \pm 6,6$	$1,0 \pm 0,1$	$40,6 \pm 61,7$	163 ± 286	3(12)
$(\alpha_1\beta_2)(\gamma_2\beta_3)$	$118 \pm 4,3$	$0,8 \pm 0,1$	263 ± 480	418 ± 784	5(9)

Die EC_{50} - und p-Werte wurden durch einen vierparametrischen logistischen Fit durch die Mittelwerte von auf Maximalströmen normierten Strömen bei den jeweiligen Konzentrationen errechnet und sind mit dem entsprechenden Fehler angegeben. Die Stromdichten sind Mittelwerte \pm SD der Maximalströme bei 300-1000 μ M GABA bzw. 500 μ M Pentobarbital (PB). n= Anzahl der gemessenen Zellen für die Dosiswirkungskurven (Stromdichten).

5 Diskussion

Durch die Vielfalt an Untereinheiten können sich sehr viele Kombinationen von GABA_A-Rezeptoren assemblieren. Tatsächlich wurden bislang 11 Subtypen als sicher vorkommend und 8 weitere als sehr wahrscheinlich im ZNS existierend beschrieben (Olsen und Sieghart 2008). Die größte Gruppe mit 75-80% (Whiting et al. 2000; Sieghart und Ernst 2005) nehmen die meist synaptisch lokalisierten $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren, welche vor allem phasische Inhibition vermitteln, ein. Diese kommen wiederum mit allen α -UE in den Kombinationen $\alpha\beta\gamma 2$ vor, wobei die $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -enthaltenden Rezeptoren mit je 20-30 % wieder die größten Fraktionen stellen. Die selteneren Subtypen mit der $\alpha 4$ - $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -UE haben die Besonderheit, dass sie in bestimmten Hirnregionen angereichert sind. So kommen die $\alpha 4$ -UE im Wesentlichen im Thalamus, die $\alpha 5$ -UE im Hippocampus und die $\alpha 6$ -UE ausschließlich im Cerebellum vor (Sieghart und Sperk 2002). Allen diesen Rezeptoren ist gemein, dass sie vermutlich die UE-Stöchiometrie $2:\alpha 2:\beta 1:\gamma$ haben, das aber nur für den Subtyp $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ in immunochemischen (Tretter et al. 1997), elektrophysiologischen (Backus et al. 1993; Chang et al. 1995) fluoreszenzspektroskopischen (Farrar et al. 1999) oder rasterkraftmikroskopischen (Neish et al. 2003) Versuchen gezeigt werden konnte. Anhand der Pharmakologie für Benzodiazepine, welche zwischen der α - und $\gamma 2$ -UE binden und GABA, das zwischen der β - und der α -UE bindet und unter Zuhilfenahme von sogenannten Konkatalameren, d.h. kovalent verknüpften UE, leiteten Baumann et al. 2002 die Anordnung der UE in der Sequenz $\gamma\beta\alpha\beta\alpha$, gelesen gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet, ab. Vereinfachend wird bis heute davon ausgegangen, dass in nicht $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren dessen Position durch eine δ -UE, β -UE oder eine andere sogenannte fünfte UE neben den 2α - und 2β -UE in den jeweiligen Assemblierungen ersetzt wird.

Obwohl δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren im Vergleich zu den oben genannten Subtypen nur in geringer Menge im ZNS vorkommen, haben sie die Besonderheit, dass sie ausschließlich extrasynaptisch lokalisiert sind und tonische Inhibition vermitteln (Brickley und Mody 2012). Es wird angenommen, dass der Ladungstransfer, vermittelt durch tonische Inhibition, in einer ähnlichen Größenordnung wie die phasischen Ströme durch die zahlreicheren synaptischen Rezeptoren liegt. In Körnerzellen des Kleinhirns wurde bei Ratten eine Zunahme tonischer Inhibition von 5% (P7) auf 99% (P21) des gesamten Ladungstransfers im Laufe der Entwicklung beobachtet (Brickley et al. 1996). Weiterhin konnte in Neuronen des Rückenmarkes bei adulten Mäusen ein 6-fach größerer Ladungstransfer vermittelt durch tonische Inhibition als durch phasische Ströme gemessen werden (Ataka und Gu 2006). Mit der δ -UE sind Assemblierungen zusammen mit der $\alpha 1$ - (Dentate Gyrus im Hippocampus), $\alpha 4$ - (Interneurone im Thalamus) und der $\alpha 6$ -UE in den Körnerzellen des Cerebellums beschrieben (Farrant und Nusser 2005). Aufgrund dieser

Datenlage wurden in dieser Arbeit diese drei α -UE ausgewählt und in den Kombinationen $\alpha\beta$, $\alpha\beta\gamma 2$ und $\alpha\beta\delta$ charakterisiert. Dabei wurden Unterschiede in Bezug auf die etablierten Liganden GABA und Pentobarbital herausgearbeitet, sowie neue Liganden ausgehend von der Leitstruktur DS1/2 und der $\beta 2$ -selektiven Substanz E0233-0033 an diesen Subtypen charakterisiert. Weiterhin wurden mit diesen α -UE Konkatomere erstellt, wobei insbesondere die Fragestellung bearbeitet wurde, inwieweit GABA_A -Rezeptoren in Abhängigkeit der α -UE mit nur einer Bindestelle funktionieren.

5.1 GABA- und Pentobarbitalpharmakologie transient transfizierter GABA_A -Rezeptoren in HEK293T-Zellen

Die Ergebnisse der GABA- und Pentobarbitalpharmakologie der hier verwendeten Subtypen sind in den Tabellen 20 und 21 zusammengefasst. Bei den GABA-Sensitivitäten konnten vergleichbare Werte wie in anderen Studien an in HEK293-Zellen exprimierten GABA_A -Rezeptoren gemessen werden (Böhme et al. 2004, Mortensen et al. 2012). Besonders zu erwähnen sind die $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren: diese haben im Vergleich zu den entsprechenden Subtypen mit der $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -UE eine für extrasynaptisch vorkommende Rezeptoren niedrige Sensitivität (EC_{50} : $10,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ($\alpha 1$) $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($\alpha 4$), $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($\alpha 6$)). Da die extrazelluläre GABA-Konzentration auf 20-500 nM geschätzt wird (Mortensen und Smart 2006; Lee et al. 2010), würden diese Rezeptoren nur sehr wenig aktiviert werden. Andererseits haben diese Rezeptoren dann das Potential, stark durch Modulatoren wie endogen vorkommende Neurosteroiden oder Anästhetika moduliert zu werden, da bei niedrigen relativen GABA-Konzentrationen deren Effizienz deutlich höher ist (Walters et al. 2000). So würde bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ GABA, was dem EC_{50} bei $\alpha 6\beta 3\delta$ und $\sim \text{EC}_5$ bei $\alpha 1\beta 3\delta$ entspricht die Wirkung im Wesentlichen über $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren vermittelt werden, sofern keine deutliche Subtypselektivität angenommen wird. Unterstützt wird die Hypothese durch die Modulation mit DS1 (Tab. 23). So konnten $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren bei $0,5 \mu\text{M}$ GABA nur noch etwa 150% potentiert werden. Bei $0,2 \mu\text{M}$ GABA wurde hingegen eine Potentierung von ca. 800% beobachtet. Dazu kommt, dass insbesondere $\alpha 1\beta 2\delta$ -Rezeptoren durch GABA nur mit sehr geringer Effizienz aktiviert werden und erst durch das endogen vorkommende Neurosteroid THODC (Tetrahydrodeoxycorticosteron) deutliche Ströme zeigen (Zheleznova et al. 2008).

Die $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren haben in allen getesteten Wildtyp-Rezeptoren einen Hillkoeffizienten größer 1,5, was auf zwei GABA-Bindestellen, die kooperativ wechselwirken, hindeutet. Durch diesen Parameter und die in Kapitel 4.4.2 gezeigte Benzodiazepinsensitivität wird also unterstützt, dass $\alpha 1,4,6\beta\gamma 2$ -Rezeptoren in der Konfiguration

$\gamma 2\beta\alpha\beta\alpha$, gelesen gegen den Uhrzeigersinn, vom synaptischen Spalt aus betrachtet, assemblieren. Bei den δ -enthaltenden Rezeptoren ist hingegen in den Kombinationen $\alpha 1,4,6\beta\delta$ ein Wert von ~ 1 erhalten worden, dies kann mindestens drei Ursachen haben: 1. Es liegen zwei Bindestellen vor, die aber nicht kooperativ wirken; 2. Es liegt nur eine Bindestelle vor und die Rezeptoren assemblieren demzufolge anders als die oben genannten Subtypen; 3. Es existiert eine Mischung an Rezeptoren, so dass verschiedene Dosiswirkungskurven überlagert sind. Zwischen den ersten beiden Punkten kann man nicht leicht differenzieren. Ein Ansatz zur Lösung ist, Rezeptoren mit Hilfe von Konkatameren in einer definierten Anordnung zu exprimieren und deren Ligandenstöchiometrie zu charakterisieren. Der letzte Punkt scheint aber plausibel, da insbesondere die δ -UE als schwer zu exprimieren gilt (Meera et al. 2010, Wang et al. 2010), was auch von den Autoren um P. Meera und R. Olsen als Ursache angenommen wird, dass z.B. andere Arbeitsgruppen (Korpi et al. 2007, Borghese und Harris 2007) die δ -selektiven potentierenden Effekte von Ethanol im niedrigen millimolaren Bereich nicht beobachten konnten. Anhand der GABA-Pharmakologie konnte im Rahmen meiner Diplomarbeit 2010 gezeigt werden, dass bei $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren die Stromdichten sowie der EC_{50} -Wert bei $\alpha 4\beta 3$ -Rezeptoren signifikant kleiner sind als bei $\alpha 4\beta 3\delta$ -Rezeptoren. In den Fällen der $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -UE konnte mit Hilfe der in Kapitel 4.1.2 aufgeführten Pentobarbitalpharmakologie deutlich gezeigt werden, dass die δ -UE exprimiert ist. So ist bei der $\alpha 1$ -UE der EC_{50} -Wert etwa um den Faktor fünf größer als bei den entsprechenden $\alpha\beta$ -Rezeptoren. Zudem zeigt ein Hillkoeffizient von $3,1 \pm 0,5$ eine hohe Kooperativität an und schließt den oben genannten Punkt, dass sich Dosiswirkungskurven von $\alpha 1\beta 3$ - und $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren überlagern, nahezu aus. Weiterhin zeigt die Ratio der induzierten Ströme durch die maximalen GABA- und Pentobarbitalkonzentrationen bei $\alpha 1\beta 3$ - und $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren an, dass bei dem erstgenannten die Effizienz für GABA deutlich größer ist ($3,5 \pm 0,4$ vs. $1,1 \pm 0,2$; $p < 0,0001$). Der letzte Parameter ist neben der höheren Pentobarbitalsensitivität von $\alpha 6\beta 3\delta$ - gegenüber $\alpha 6\beta 3$ -Rezeptoren (115 ± 14 vs. $344 \pm 72 \mu M$) zur Differenzierung nutzbar. So ist in diesem Fall im Gegensatz zu den $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren die Effizienz für GABA bei der binären Kombination deutlicher kleiner ($0,15 \pm 0,1$ vs. $1,0 \pm 0,3$; $p \leq 0,01$) als bei $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren. Insgesamt kann man anhand der GABA- und Pentobarbitalpharmakologie eindeutig zeigen, dass die δ -UE funktionell in die Rezeptoren integriert wird und es kann auch festgehalten werden, dass dies effizient geschieht, da $\alpha\beta$ -Rezeptoren keinen wesentlichen Anteil in $\alpha\beta\delta$ -Tranfektionen haben. Der letzte Punkt wird durch die in Kapitel 4.2 eingesetzten Modulatoren unterstützt, die in Kapitel 5.2 diskutiert werden.

Offen bleibt, ob sich alle Subtypen nach demselben Bauplan wie die $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren assemblieren, so dass immer zwei GABA-Bindestellen an β - α -Nachbarschaften existieren. Unter der Annahme, dass die GABA-Sensitivität im Wesentlichen

durch die α -UE determiniert wird (Böhme et al. 2004), würde man in erster Näherung erwarten, dass die Abfolge der EC_{50} -Werte von $\alpha_6 < \alpha_1 < \alpha_4$ bei $\alpha\beta\gamma_2$ -Rezeptoren auf die binären Kombinationen bzw. δ -enthaltenden Rezeptoren übertragen werden kann. Tatsächlich erhält man $\alpha_6 < \alpha_4 < \alpha_1$ für $\alpha\beta$ - und $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren mit noch größeren Abstufungen zwischen der α_6 - und α_1 -UE. Ähnliches fällt auch bei Pentobarbital auf. So zeigt sich in binären Kombinationen keine α -Abhängigkeit der Potenz und in $\alpha\beta\gamma_2$ - und $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren eine deutliche Aufspaltung in $\alpha_6 < \alpha_4 < \alpha_1$ bzw. $\alpha_4 < \alpha_6 < \alpha_1$. Erklären könnte man diese Inhomogenität damit, dass die Sensitivitäten nicht durch eine einzelne Untereinheitenklasse determiniert werden, sondern durch ein Zusammenspiel der Untereinheiten. Zum anderen könnte es ein Hinweis sein, dass eben nicht alle Subtypen demselben Bauplan folgen. Es wäre daher von Interesse, die Experimente zu wiederholen und die Ratios der Untereinheiten dabei zu ändern, um schließlich die Ergebnisse mit den vorliegenden Daten abzugleichen. Sollten verschiedene Assemblierungen, wie bei $\alpha\beta\delta$ (Hadley und Amin 2007, Kaur et al. 2009; Baur et al. 2010; Wagoner und Czajkowski 2010), aber auch bei $\alpha\beta$ -Rezeptoren (Im et al. 1995; Baumann et al. 2001; Boileau et al. 2005) diskutiert werden vorkommen, so könnten sich in Abhängigkeit der UE-Ratios die bestimmten Parameter ändern.

5.2 DS1/2-Derivate als neue Liganden für GABA_A-Rezeptoren

Die Bedeutung der δ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren bzw. der tonischen GABAergen Inhibition im Zusammenhang mit Sucht, Epilepsie, Angst, Depression und Gedächtnisbildung ist in der Literatur eingehend beschrieben (Scimemi et al. 2005; Earnheart et al. 2007; Maguire und Mody 2008; Shen et al. 2010; Brickley und Mody 2012). Der bekannteste Ligand, welcher als δ -selektiv bezeichnet wird, ist THIP (Mortensen et al. 2004; Storustovu und Ebert 2006; Saarelainen et al. 2008; Mortensen et al. 2010). Dieser bindet an die GABA-Bindestelle und hat daher ähnlich wie GABA eine höhere Sensitivität für $\alpha_4,6\beta\delta$ -Rezeptoren im Vergleich zu $\alpha_1\beta_4\gamma_2$ -Rezeptoren. Dazu kommt, dass er eine höhere Effizienz als GABA an diesen Rezeptoren aufweist und somit als „Superagonist“ wirkt (Mortensen et al. 2010). Insgesamt führt das dazu, dass im potentiell therapeutisch erreichbaren Bereich von 0,3-2 μ M (Madsen et al. 1983) nahezu ausschließlich extrasynaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren durch THIP aktiviert werden. Die klinische Phase III Studie zur Behandlung von Schlaflosigkeit wurde aber 2007 durch die Firma Lundbeck aufgrund einer zu schwachen Wirksamkeit und dem Auftreten psychiatrischer Nebenwirkungen wie Orientierungslosigkeit und Halluzinationen abgebrochen. Weitere Substanzklassen, welche δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren aktivieren und/oder modulieren sind die Neurosteroiden, Barbiturate und andere Anästhetika wie Etomidat. Sie modulieren zum Teil zwar Rezeptoren mit der δ -UE stärker als die anderen Subtypen, be-

sitzen aber keine ausreichende Selektivität (Belelli et al. 2002; Brown et al. 2002; Wohlfarth et al. 2002; Zheleznova et al. 2008). Neben den Substanzen AA29504 (Hoestgaard-Jensen et al. 2010) und JM-11-43A (Lewis et al. 2010) wurden DS1/2 (Wafford et al. 2009) als neue δ -selektive Verbindungen beschrieben. Letztere wurden aufgrund der hohen Selektivität und Affinität von ~ 14 nM für DS1 und ~ 140 nM für DS2 an $\alpha 4\beta 2\delta$ -Rezeptoren ausgewählt. Die Idee dabei war, dass die Selektivität auf einer Bindestelle an der δ -UE beruht und im besten Fall ein Marker für eine Nachbarschaftsbeziehung sein kann. Weiterhin wurde ein Set von 15 neuen Derivaten mit Hilfe der Kooperationspartner erstellt, um zum einen Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu ermöglichen. Zum anderen wurde aufgrund der hohen beschriebenen Affinität die Absicht verfolgt, Derivate zu erstellen, welche radioaktiv markiert werden können, um zum Beispiel in PET-Studien selektiv δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren zu visualisieren.

Beim Vergleich der in Tab. 22 dargestellten EC₅₀-Werte der Modulationen des EC₂₀ für GABA mit den Daten der initialen Studie von Wafford et al. 2009, fällt auf, dass die hier gemessenen Sensitivitäten für DS1 und DS2 etwa um den Faktor 10 geringer sind. In einer folgenden Studie, bei der auch Autoren der ersten Studie mitwirkten (Jensen et al. 2013), konnten im Fall von DS2 (EC₅₀ ~ 5 μ M) aber die hier gemessenen Sensitivitäten bestätigt werden. Für DS1 konnten auch Dosiswirkungskurven für $\alpha\beta$ - und $\alpha\beta\gamma 2$ -Rezeptoren erstellt werden (Abb.17). Im Vergleich zu den initial getesteten $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren sind die Modulationsstärken an Rezeptoren mit der $\alpha 6$ -UE größer, was auch von Jensen et al. 2013 gezeigt wurde. So ist insbesondere bei $\alpha 6\beta 3$ -Rezeptoren im Vergleich zu $\alpha 1\beta 3$ - oder $\alpha 4\beta 3$ -Kombinationen bei etwa gleicher Potenz (EC₅₀ ~ 100 nM) die Modulation mit 1144 ± 29 % vs. $35 \pm 1,5$ bzw. 168 ± 29 deutlich stärker. Die $\gamma 2$ -enthaltenden Subtypen haben im Vergleich zu den ähnlich sensitiven $\alpha\beta$ - und $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren eine um den Faktor 7-8 geringere Sensitivität und außerdem eine um den Faktor 4-5 geringere Modulationsstärke als die entsprechenden Rezeptoren mit der δ -UE. Dies könnte zum einen ursächlich für die von Wafford et al. 2009 beschriebene fehlende Modulation von $\alpha 1\beta\gamma 2$ - und $\alpha 4\beta\gamma 2$ -Subtypen sein und neben den fehlenden Kontrollen mit binären Kombinationen zu dem Schluss der δ -Selektivität geführt haben. Andererseits unterstützen die hier erhobenen Daten, dass die tonischen Ströme in Interneuronen des Thalamus selektiv durch DS2 (Wafford et al. 2009) moduliert werden, da die relevante physiologische Wirksamkeit sich immer aus einer Kombination von Potenz und Effizienz ergibt.

Die in Tab. 22 aufgeführten Liganden zeigen an, dass die Bromierungen am Imidazopyridin-System ein wichtiger Faktor für die Sensitivität sind. So konnten mit einer Bromierung in der 6- und 8-Position Derivate mit den höchsten Sensitivitäten gewonnen werden (DS1, SJ33 vs. DS2). Außerdem wurde gezeigt, dass Funktionalisierungen in para-Stellung des Benzamid-systems die Sensitivität gegenüber DS1 steigern konnten. So zeigen

SJ33 mit einer Butoxygruppe eine Sensitivität von ~35 nM und JWA9 mit einer Fluorierung in dieser Position mit ~44 nM die Liganden mit der höchsten Sensitivität.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass alle Substanzen die getesteten Rezeptoren auch ohne Anwesenheit von GABA aktivieren können. In dem Parameter zeigen aber neben den $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren nur δ -enthaltende Subtypen deutliche Effekte von ~10-200 % des GABA induzierten Maximalstroms, wobei auch hier die Bromierung am Imidazopyridin-System eine wichtige Rolle zu spielen scheint. So kann DS2 $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren zu ~7% SJ4T zu ~40% und DS1 zu ~200 % der maximalen GABA-Antwort aktivieren. Die intrinsische Aktivität wird aufgrund der Möglichkeit zur Überdosierung oft als Nachteil bei *in vivo* Einsätzen betrachtet, so dass folgende Liganden eher nur in der 6er-Position halogeniert werden sollten, da die etwas geringere Potenz (Faktor 2) in diesem Fall vernachlässigbar ist. Andererseits ist davon auszugehen, dass in der Umgebung extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren immer GABA vorhanden ist und die intrinsische Aktivierung vernachlässigbar ist. Für die Planung von PET-Liganden muss der Fokus auf die Affinität gelegt werden und somit in der 6er- und 8er-Position halogeniert werden. Sehr interessant wären außerdem Substanzen die Nullmodulatoren oder Negativmodulatoren für δ -enthaltende Rezeptoren sind, da Liganden mit diesen Eigenschaften nach jetziger Kenntnis nicht verfügbar sind. Diese Liganden wären eine weitere Möglichkeit, die Rolle tonischer Inhibition zu untersuchen. So wird zum Beispiel diskutiert, ob verstärkte durch δ -enthaltende Rezeptoren vermittelte tonische Inhibition die Lernleistung beeinträchtigt (Shen et al. 2010; Whissell et al. 2013).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die ausgehend von DS1/2 erstellten Derivate zwar nicht die zuvor in der Literatur (Wafford et al. 2009; Jensen et al. 2013) dargestellte Selektivität für δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren aufweisen, aber dennoch eine Basis bilden könnten, um die Rolle der tonischen Inhibition, welche durch $\alpha\beta$ - und $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren vermittelt wird, mit neuen Mitteln zu untersuchen. In der in diesem Projekt zunächst erhofften Anwendung, dass die Substanzen an eine Bindestelle, die nur an der δ -UE vorkommt, binden oder eine UE-Nachbarschaft anzeigen, konnte kein Fortschritt erzielt werden, da mit den beschriebenen Liganden nicht ausreichend zwischen $\alpha\beta$ - und $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren differenziert werden kann. Aufgrund eines Hillkoeffizienten von $2,6 + 0,5$ bei der Beschreibung der intrinsischen Aktivität an $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren kann aber davon ausgegangen werden, dass mindestens zwei, eher aber drei Bindestellen vorliegen, welche aber nicht gleich sein müssen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass bei der Erstellung und Charakterisierung weiterer Liganden Substanzen gefunden werden, die eine Selektivität für δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren haben.

5.3 E033-00233 als β 2–selektiver Ligand

Neben den Ansätzen GABA_A-Rezeptoren über die orthostere Bindestelle oder die Bindestelle für Benzodiazepine positiv zu modulieren, stellen die Anästhetika die dritte Möglichkeit dar. Etablierte Liganden sind neben den Barbituraten und Neurosteroiden vor allem Etomidat, Loreclezol und Propofol. Ihnen gemein ist eine geringe Abhängigkeit von der α -Variante und insbesondere bei den Letzteren eine Präferenz für die β 2- und β 3- gegenüber der β 1-UE. Die Rolle dieser Liganden bei der tonischen Inhibition oder bei δ -enthaltenden Rezeptoren ist Gegenstand aktueller Forschung (Meera et al. 2009; Zecharia et al. 2012; Brickley und Mody 2012; Mesbah-Oskui et al. 2014).

Die Substanz E033-00233 zeigte in einer unpublizierten Studie von H. Rabe eine Selektivität für β 2-enthaltende GABA_A-Rezeptoren, wobei Subtypen in den Kombinationen α 1,2,6 β 2 γ 2 stärker moduliert werden als die entsprechenden binären Rezeptoren oder Rezeptoren mit anderen α -UE. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die Pharmakologie von E033-00233 an δ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren untersucht und zum anderen verschiedene Mutanten der β 2-UE, welche die Wirkung einiger Anästhetika beeinflussen, charakterisiert, um mögliche Parallelen zu den Anästhetika aufzudecken.

Die Ergebnisse der E033-00233-Pharmakologie δ -enthaltender Rezeptoren sind in Kapitel 4.3.1 aufgeführt und zeigen, dass E033-00233 Rezeptoren in den Kombinationen α 1,4,6 β 2 δ in Abwesenheit von GABA zu 10-20% der GABA-induzierten Maximalantwort direkt aktivieren kann. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu den Neurosteroiden (Wohlfarth et al. 2002) und den Barbituraten dar, was in Kapitel 4.1. exemplarisch am Beispiel von Pentobarbital aufgeführt ist. Da diese Liganden in Abwesenheit von GABA Ströme induzieren können, welche größer als die möglichen Maximalantworten durch GABA sind.

In der Modulation gibt es eine geringe α -Abhängigkeit, wobei die Rezeptoren in der Abfolge α 6< α 4< α 1 einen EC₅₀-Wert zwischen ~40 und ~150 μ M haben. In der Modulationsstärke ist die Abfolge α 1< α 6< α 4 mit durch logistische Fits erhaltenen Werten von ~150 bis ~470% des GABA induzierten Stromes beim subtypspezifischen EC₂₀. Aufgrund der Inhibition bei Konzentrationen \geq 100-300 μ M sind die Parameter des logistischen Fits fehlerbehaftet und stellen nur eine Orientierung dar. Es wäre genauso angebracht, bei einer relevanten Konzentration die Werte der einzelnen Subtypen zu vergleichen, da auch dort die Potenz und Effizienz einfließen. Weil nicht bekannt ist, welche Konzentrationen *in vivo* erreicht werden können, ist der Vergleich bei 30 μ M durchgeführt worden, da bei dieser Konzentration bei keinem Subtyp Inhibition erkennbar gewesen war. Für die δ -enthaltenden Rezeptoren ergab dieser Test keinen Unterschied zwischen den Subtypen. Es wurden Potentierungen von 62-67% berechnet. Der Vergleich mit den schon vorher bestimmten Werten zu den γ 2-enthaltenden Rezeptoren (~160-

440%) ergab, dass δ -enthaltende Rezeptoren am schwächsten moduliert werden. Dies ist zusätzlich zu der direkten Aktivierung ein weiterer Unterschied zu den Neurosteroiden (Wohlfarth et al. 2002) und anderen Anästhetika (Brown et al. 2002).

Die zuvor beschriebene β -Selektivität in der Abfolge $\beta_1 < \beta_3 < \beta_2$, was der Vergleich der Modulationen des GABA-induzierten EC_{20} -Wertes bei $\alpha_1\beta\gamma_2$ -Rezeptoren mit ~30%, ~60% und ~160% verdeutlicht, macht E033-00233 pharmakologisch interessant, da die etablierten Anästhetika Etomidat und Loreclezol eine Selektivität der β_2 - und β_3 -UE gegenüber β_1 -enthaltenden Rezeptoren haben (Belelli et al. 1997; Wafford et al. 1994). Die Neurosteroid, Barbiturate und Benzodiazepine differenzieren dagegen nicht zwischen den β -Subtypen (Hadingham et al. 1993; Thompson et al. 1996).

Mit den bereits erwähnten β_2 -Mutanten in der Position 265 konnten aber einige Parallelen zu den beschriebenen Anästhetika herausgearbeitet werden. Wie Abb. 25 und Tab. 28 zu entnehmen ist, zeigt der Aminosäuretausch N265M in der β_2 -UE eine deutliche Reduktion der Modulationsstärke, weiterhin nimmt die Potenz soweit ab, dass keine Effektsättigung mit 1000 μ M erreicht werden konnte. Dieser starke Mutationseffekt ist für Etomidat, Propofol und den Barbituraten ebenfalls beschrieben (Belelli et al. 1999). Der Aminosäuretausch zwischen den homologen Resten zwischen der β_1 - und β_2 -UE ist hingegen nicht so deutlich. So verringert das Serin in der β_2 -UE die Potenz etwa um den Faktor zwei, die Modulationsstärke aber nicht. Analog erhöht das Asparagin in der β_2 -UE die Potenz um den Faktor 2-4 und verringert die Modulationsstärke sogar etwas. Dieser schwache Mutationseffekt unterscheidet sich deutlich von Etomidat und Loreclezol (Belelli et al. 1999). Weiterhin konnte mit den in den weiteren Unterpunkten diskutierten Konkameren gezeigt werden, dass die Modulationsstärke von E033-00233 in Abhängigkeit der β_2 -UE im Pentamer additiv wirkt, was wieder eine Parallele zu den Liganden Etomidat und Loreclezol darstellt (Boulineau et al. 2005).

Insgesamt stellt E033-00233 eine neue Substanz dar, welche infolge der Selektivität für β_2 -enthaltende $GABA_A$ -Rezeptoren ein unterschiedliches Wirkungsprofil wie die etablierten Anästhetika erwarten lässt. Dies ist insbesondere interessant, da die sedierenden Wirkungen der Anästhetika als β_2 -vermittelt diskutiert werden (Reynolds et al. 2003). Die anästhesierenden Wirkungen hingegen werden als β_3 -vermittelt angesehen (Quinlan et al. 1998).

5.4 Konkamere zur Assemblierung definierter $GABA_A$ -Rezeptoren

Neben der Charakterisierung $\alpha_1,4,6$ -enthaltender $GABA_A$ -Rezeptoren mit den beschriebenen etablierten und neuen Liganden wurde mit Hilfe von Konkameren der Ansatz

verfolgt GABA_A-Rezeptoren definierter Anordnung und Nachbarschaftsbeziehungen der Untereinheiten zu charakterisieren. Diese Strategie bietet sich insbesondere bei Heteropentameren wie den GABA_A-Rezeptoren an und wird für diese als etabliert in der Literatur angesehen (Minier und Sigel 2004), wobei noch offene Punkte zur Gestaltung der Linker existieren (Ericksen und Boileau 2007). Zu Beginn der Arbeit war ein enthusiastisches Ziel, die in ihrer Architektur noch nicht geklärten δ -enthaltenden Rezeptoren in verschiedenen Konfigurationen zu assemblieren und auf Ethanol zu testen, so dass evtl. eine Isoform gefunden wird, welche die kontrovers diskutierte Ethanol sensitivität im niedrigen millimolaren Bereich hat (Wallner et al. 2003; Korpi et al. 2007). Diese Idee wurde bereits von Kaur et al. (2009) und Baur et al. (2009) verfolgt, wobei nur ein Teil der möglichen Variationen mit $2\alpha(1 \text{ oder } 6)$ - 2β - und 1δ -UE getestet wurde. Es konnte für keine der Assemblierungen eine Ethanol sensitivität bei 30 mM gemessen werden. Weiterhin bieten Rezeptoren definierter Anordnung das Potential Bindestellen für neue Liganden leichter zu finden, wenn diese durch die Nachbarschaft der Untereinheiten gebildet werden. Die in einer frühen Phase der Arbeit begonnene Charakterisierung von DS2, als δ -selektive Leitstruktur (Wafford et al. 2009) hatte u.a. das Ziel, Assemblierungen zu finden, welche eine unterschiedliche Pharmakologie für diese neue Substanzklasse aufzeigen, so dass molekulare Determinanten identifiziert werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Koexpressionen diverser $\alpha\beta$ -Dimeren mit der δ -UE, nur geringe GABA-induzierte Ströme in HEK293-Zellen gemessen werden konnten, so dass Modulationsstudien mit Ethanol oder DS2 nur sehr schwer möglich gewesen wären. In einem Projekt am Biomedicum I in Helsinki (Labor Esa R. Korpi) wurden ($\alpha 4\beta 3$)- bzw. ($\beta 3\alpha 4$)-Dimere mit der δ -UE erfolgreich mit sehr guten Stromdichten in *Xenopus Oozyten* als Expressionssystem charakterisiert. Dazu wurden auch Vorversuche mit DS2 und Ethanol durchgeführt, wobei mit DS2 nicht zwischen den beiden Assemblierungen differenziert werden konnte und auch keine Ethanol sensitivität unter 100 mM festgestellt werden konnte.

Für den weiteren Fortgang wurde in Mainz, wo die Methode der *Xenopus Oozyten* als Expressionssystem nicht verfügbar war, ein großes Set an Konkatameren erstellt in Kombinationen mit der leichter exprimierbaren und durch die etablierte Benzodiazepinpharmakologie nachweisbare $\gamma 2$ -UE charakterisiert. Weiterhin wurde in Anlehnung an die δ -enthaltenden Rezeptoren, welche als mit einer GABA-Bindestelle funktionierend diskutiert werden (Kapitel 4.1 und 5.1), der Fokus auf Assemblierungen mit nur einer funktionellen Bindestelle für GABA gelegt. Es ergaben sich im weiteren Verlauf Probleme mit der Definierbarkeit der UE-Anordnung im Pentamer, so dass unter Einsatz subtypspezifischer Modulatoren und unterschiedlicher Linkerpositionen im Pentamer Anwendungsmöglichkeiten und Limitierungen der Konkatamerstrategie herausgearbeitet wurden.

5.4.1 Ist die Uhrzeigersinnregel zur Anordnung der Untereinheiten im Pentamer allgemeingültig?

Die Uhrzeigersinnregel gibt an, dass die Untereinheiten sich immer vom N-zum C-Terminus, gelesen gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet, im Pentamer anordnen. Die Regel wurde von Baumann et al. 2002 aus einem Set von $\gamma 2$ -enthaltenden Assemblierungen abgeleitet und in zahlreichen Studien auch anderer Arbeitsgruppen als Basis verwendet (Gallagher et al. 2004; Minier und Sigel 2004; Bracamontes et al. 2011; Feng et al. 2014). So ergaben zum Beispiel die Kombinationen $(\gamma 2\beta 2\alpha 1)(\beta 2\alpha 1)$ und $(\beta 2\alpha 1\gamma 2)(\beta 2\alpha 1)$ in *Xenopus Oozyten* gut exprimierbare benzodiazepinsensitive Rezeptoren. Die Kombinationen $(\gamma 2\beta 2\alpha 1)(\alpha 1\beta 2)$ und $(\beta 2\alpha 1\gamma 2)(\alpha 1\beta 2)$ zeigten dagegen keine GABA-induzierten Ströme. Es wurde daraus geschlossen, dass das $(\alpha 1\beta 2)$ -Dimer sich nicht umlagert und das Pentamer zu einem funktionellen Rezeptor vervollständigen kann. Weiterhin zeigte die Kombination $(\beta 2\alpha 1\beta 2)(\alpha 1\gamma 2)$ deutliche Ströme. Die inverse Konfiguration $(\beta 2\alpha 1\beta 2)(\gamma 2\alpha 1)$ wurde allerdings nicht gezeigt, obwohl das $(\gamma 2\alpha 1)$ -Dimer in der Publikation aufgeführt wurde. Die Uhrzeigersinnregel ist für andere aus Konkatameren assemblierenden Rezeptoren nicht beschrieben und ist auch bei GABA_A -Rezeptoren nicht widerspruchsfrei. So zeigen Ergebnisse von Im et al. (1995), Baumann et al. (2001) und Boileau et al. (2005), dass $(\alpha\beta)$ -Dimere, koexprimiert mit einer $\gamma 2$ -UE, funktionelle benzodiazepinsensitive Rezeptoren bilden, obwohl dies nach der Regel nicht zu erwartet war (Abb. 56).

Eine *in silico*-Analyse ergab für die bis dahin publizierten Linker, dass es keine oder nur geringe Bevorzugung der UE-Anordnung infolge einer Verlinkung gibt (Ericksen und Boileau 2007). Da aber die genaue Kenntnis der Anordnung eine Voraussetzung ist, wenn man mit Hilfe von Konkatameren Aussagen über die Architektur von Rezeptoren unbekannter Konfiguration treffen möchte, wurde eine Reihe an Kontrollexperimenten durchgeführt, bei denen mit Hilfe der Benzodiazepinpharmakologie die Konfigurationen überprüft wurden. Zum einen wurde gezeigt, dass $(\alpha\beta)$ -Dimere, koexprimiert mit einer $\gamma 2$ -UE, analog den oben genannten Publikationen benzodiazepinsensitive Rezeptoren bilden und zwar für die $\alpha 1$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -UE. Zum andern zeigten die in *Xenopus Oozyten* nicht exprimierbaren Kombinationen $(\gamma 2\beta 2\alpha 1)(\alpha 1\beta 2)$ und $(\beta 2\alpha 1\gamma 2)(\alpha 1\beta 2)$ (Baumann et al. 2002) in HEK293-Zellen GABA-induzierte und benzodiazepinsensitive Ströme. Das $(\alpha\beta)$ -Dimer wird also als invertierbar betrachtet, d.h., dass es sich in Pentameren auch wie ein $(\beta\alpha)$ -Dimer einlagern kann. Abb. 56 kann dies etwas verdeutlichen. So lagern sich immer untereinheitenspezifisch sogenannte (+)- und (-)-Seiten zusammen (Ernst et al. 2005). Es gibt also $\beta(+)\alpha(-)$ - und $\beta(-)\alpha(+)$ -Nachbarschaften. Demzufolge könnte es sein, dass eine $\beta(+)\alpha(-)$ -Nachbarschaft gegenüber $\beta(-)\alpha(+)$ bevorzugt ist. Ein $(\alpha\beta)$ -Dimer würde sich somit bevor es in ein Pentamer

integriert wird immer als $\beta(+)\alpha(-)$ -Dimer und nicht als $\alpha(+)\beta(-)$ -Dimer ausrichten. Andererseits ist es auch möglich, dass es erst im Pentamer „ausgerichtet“ wird, da sich evtl. $\beta(-)\gamma_2(+)$ - und $\gamma_2(-)\alpha(+)$ -Nachbarschaften bevorzugt gegenüber $\alpha(-)\gamma_2(+)$ - und $\gamma_2(-)\beta(+)$ -Nachbarschaften assemblieren.

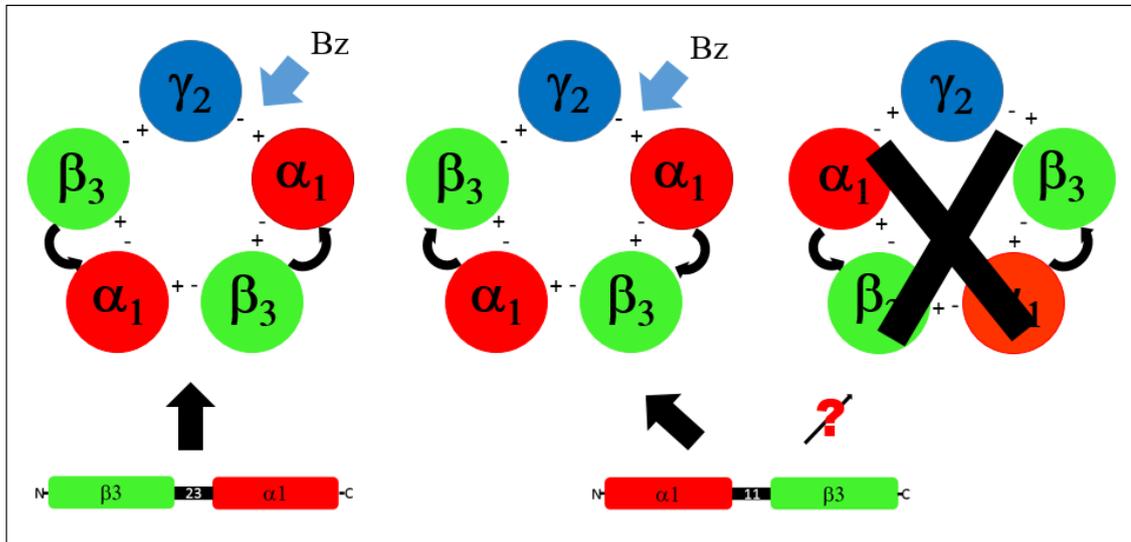


Abbildung 56: Uhrzeigersinnregel. Links ist die erwartete und beobachtete Assemblierung von $(\beta_3\alpha_1)$ -Dimeren mit einer γ_2 -UE dargestellt. Die $(\alpha_1\beta_3)$ -Dimere assemblieren mit einer γ_2 -UE entgegen der Erwartung (rechts) und zeigen entsprechend des Rezeptors in der Mitte eine Bindestelle für Benzodiazepine (Bz). Die schwarzen Pfeile illustrieren die Linker vom N- zum C-Terminus.

Weitere Versuche mit α_1 - und α_6 -enthaltenden $(\alpha\beta_3\alpha)$ -Trimeren (4.9) zeigten anhand der α -spezifischen Benzodiazepinpharmakologie, dass sich die Trimere immer nach der Regel gegen den Uhrzeigersinn im Pentamer assemblierten. Bei Koexpressionen mit einem $(\beta_3\gamma_2)$ -Dimer zeigte sich hingegen eine ähnliche Pharmakologie wie bei Koexpressionen mit einem $(\gamma_2\beta_3)$ -Dimer oder γ_2 - und β_3 -Monomeren, so dass davon auszugehen ist, dass hier die Regel nicht gilt und sich die Untereinheiten entsprechend der oben dargestellten (+)- und (-)-Nachbarschaften ausrichten. Ähnliches wurde auch in Assemblierungen aus $(\beta_3\alpha_1\beta_3) + (\alpha_1\gamma_2)$ bzw. $(\gamma_2\alpha_1)$ -Konstrukten beobachtet.

Es kann also zusammengefasst werden, dass mit den etablierten Linkerkonstruktionen (Minier und Sigel 2004) die Nachbarschaften nicht eindeutig definiert werden können. Die Untereinheiten scheinen sich entgegen der Vorgabe durch den Linker eher nach den Affinitäten zueinander auszurichten. Ein Lösungsansatz für das Problem könnte ein Verkürzen der Linker sein. Diese wurden zwar nach einer Publikation (Baumann et al. 2001) so kurz wie möglich gehalten. Es sind generell auch niedrigere Sensitivitäten bei aus Konkatameren assemblierender Rezeptoren beschrieben, was auf einen Linker bedingten Artefakt hindeutet. Die Linker für $(\alpha\beta)$ -Dimere wurden aber in Koexpressionen mit der γ_2 -UE ausgetestet. In dieser Konfiguration müssen sie sich jedoch umlagern. Verkürzt

man die Linker weiter bis keine Rezeptoren mehr entstehen und testet dann in der Konfiguration $(\alpha\beta\gamma_2)(\alpha\beta)$, in der sie sich nicht umlagern müssen, so könnte man eine Linkerlänge für diese Nachbarschaft gewinnen, die ein Definieren der Anordnung ermöglicht. Ähnliche Strategien ließen sich für weitere Konstrukte durchführen.

5.4.2 Weitere Grenzen der Definierbarkeit der UE-Anordnung im Pentamer mit Hilfe von Konkatomeren

Neben der in 5.4.1 diskutierten Problematik der Ausrichtung der Konkatomere in den Pentameren konnten insbesondere mit γ_2 -enthaltenden Konkatomeren funktionelle Rezeptoren bei alleiniger Expression von Trimeren (4.7.2 und 4.8.2) oder bei der Kombination γ_2 -enthaltender Dimere mit $(\alpha_1\beta_2)$ -Dimeren (4.10.2) erhalten werden. Proteolyse der Fusionsproteine und infolgedessen eine Neukombination der Untereinheiten konnte in umfangreichen Tests mit Hilfe von Western Blots ausgeschlossen werden. Die Ursachen könnten aber Rezeptormultimere oder Rezeptoren mit unvollständig integrierten Konkatomeren sein, obwohl dies für $GABA_A$ -Rezeptoren bislang nicht in der Literatur dokumentiert wurde. Für die trimeren P2X-Rezeptoren, sowie für die zu den Cys-Loop-Rezeptoren gehörenden nikotinischen Acetylcholinrezeptoren konnten jedoch plasmamembranständige Rezeptormultimere beschrieben werden (Nicke et al. 2003; Zhou et al. 2003; Groot-Kormelink et al. 2004). Bei letzteren wurde jedoch am Beispiel von $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptoren gezeigt, dass die Artefakte nur auftreten, wenn Dimere alleine exprimiert werden. Wird hingegen eine einzelne Untereinheit kotransfiziert, so wurden in einem Sucrosegradienten nur noch Monopentamere beobachtet. In der vorliegenden Arbeit kann im Wesentlichen auch davon ausgegangen werden, dass bei einer beabsichtigten Assemblierung von Rezeptoren in der prototypischen sogenannten Standardkonfiguration $\gamma_2\beta\alpha\beta\alpha$ keine Artefakte der oben beschriebenen Form auftreten. So zeigt sich zum Beispiel bei einer Kotransfektion von $(\alpha_1\gamma_2\beta_3)$ - und $(\alpha_6\beta_3)$ -Konstrukten, wobei erstere bei alleiniger Expression deutliche Ströme zeigen und einen EC_{50} von $\sim 50 \mu M$ für GABA aufweisen, eine GABA-Sensitivität von $\sim 10 \mu M$ und eine Furosemidsensitivität. Beides deutet auf eine Anwesenheit des $(\alpha_6\beta_3)$ -Konstruktes im Pentamer hin. Das $(\alpha_1\gamma_2\beta_3)$ -Konstrukt ließ sich über die Sensitivität gegenüber Diazepam nachweisen. Weiterhin zeigen die Versuche mit β_2 -enthaltenden Konkatomeren, die bei alleiniger Expression keine relevanten Ströme zeigen die gleichen Ergebnisse in Bezug auf die Modulatoren, wie analoge Rezeptoren mit der β_3 -UE (Abb. 42, 43 und 45). Ein weiteres Beispiel sind Assemblierungen aus $(\beta_3\alpha_1\gamma_2)$ - und $(\beta_3\alpha_1M)$ -Konstrukten, wobei das erstgenannte bei alleiniger Expression einen EC_{50} von $\sim 150 \mu M$ hat. Ist die GABA-Bindestelle in dem Dimer mutiert, so zeigt sich eine Verringerung der GABA-Sensitivität bei den Koexpressionen um den Faktor 10 bei ähnlicher Stromdichte wie bei den $(\beta_3\alpha_1\gamma_2)$ -Expressionen. Es kann also auch hier von einem vollständigen Pentamer aus

Dimer plus Trimer ausgegangen werden.

Es wurde anhand von ($\alpha\gamma 2\beta$)-Konstrukten überprüft, ob eine Untereinheit ursächlich für die Assemblierung funktioneller Rezeptoren aus diesem Trimer ist. Die α -UE konnte ausgeschlossen werden, da für die $\alpha 1$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -UE ähnliche Ergebnisse gefunden wurden. Die β -UE hat hingegen einen deutlichen Einfluss. So konnten mit der $\beta 1$ - und $\beta 3$ -UE, die im Gegensatz zur $\beta 2$ -UE die Eigenschaft haben Homopentamere zu bilden (Krishek et al. 1996 und Woollorton et al. 1997), bei einzelnen, aber nicht allen Zellen ähnliche Ströme wie bei einem vollständigen Pentamer gemessen werden (Abb. 40). Es wurde mit Hilfe des Assemblierungsmotivs DNTK der $\beta 2$ -UE, welches die Bildung von $\beta 3$ -Homopentameren verhindert, versucht, die $\beta 3$ -enthaltenden Konkatamere so zu modifizieren, dass bei alleiniger Expression sich keine funktionellen Rezeptoren mehr assemblieren. Für ($\alpha 1\beta$)-Dimere kann dieser Ansatz als gelungen aufgefasst werden, da die ($\alpha 1\beta 3$ DNTK)-Dimere weniger GABA-induzierten Strom zeigen als die entsprechenden ($\alpha 1\beta 3$)-Dimere (14 + 5 pA vs. 71 + 29 pA; $p = 0,014$, $n = 24$ bzw. 13). Bei den ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)-Trimeren konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$ DNTK)- und ($\alpha 1\gamma 2\beta 3$)-Konstrukten festgestellt werden (69 + 38 pA vs. 146 + 39 pA, $p = 0,23$, $n = 34$ bzw. 16). Die $\gamma 2$ -UE ist daher vermutlich mit ursächlich für das beschriebene Problem. In dieser Arbeit, wie auch in den Konstrukten der Arbeitsgruppe E. Siegel (Minier und Siegel 2004) wurde ausschließlich die Spliceform $\gamma 2$ short verwendet. Die $\gamma 2$ long-Variante (Whiting et al. 1990) unterscheidet sich durch eine zusätzliche Sequenz von 8 Aminosäuren im cytoplasmatischen Loop zwischen der TM3 und TM4. Wesentliche pharmakologische Unterschiede sind jedoch nicht beschrieben (Horn et al. 1993; Wick et al. 2000). Es konnte aber gezeigt werden, dass die $\gamma 2$ short-UE, entgegen der $\gamma 2$ long-Variante, als eine sogenannte modulatorische Untereinheit an vollständige Pentamere binden kann und somit als einzelne Untereinheit in der Plasmamembran vorkommen kann (Boileau et al. 2010). Demnach wäre es theoretisch möglich, dass die Trimeren so assemblieren, dass eine $\gamma 2$ -UE aus dem Pentamer ausgeschlossen wird. Eine Konstruktion von einem ($\alpha 1\gamma 2$ long $\beta 3$ DNTK)-Konkatamer und der Vergleich mit einem ($\alpha 1\gamma 2$ short $\beta 3$ DNTK)-Konstrukt wäre daher ein Ansatz die beschriebenen Assemblierungsartefakte zu verringern. Die Ursächlichkeit der $\gamma 2$ -UE an diesen Artefakten wird auch dadurch unterstützt, dass die $\gamma 2$ -enthaltenden Dimere koexprimiert mit ($\alpha 1\beta 2$)-Dimeren in allen Varianten funktionelle Rezeptoren liefern. Bei diesen Assemblierungen kann nichts über deren Architektur gesagt werden. Ein interessanter Test wäre jedoch die Überprüfung mit Diazepam, so dass Hinweise erhalten werden könnten, ob die $\gamma 2$ -UE in die Pentamere integriert ist oder ob sie evtl. immer außerhalb des Pentamers ist.

Insgesamt stellt die Assemblierung funktioneller Rezeptoren aus Dimeren, Trimeren und aus der Kombination $\gamma 2$ -enthaltender Dimere mit ($\alpha 1\beta 2$)-Dimeren, neben der in Kapitel

5.4.2 diskutierten nicht immer gültigen Uhrzeigersinnregel die Definierbarkeit der UE-Nachbarschaften durch den Einsatz von Konkameren in Frage. Infolgedessen müssen zu den jeweiligen Fragestellungen sorgfältige Kontrollen und auch andere experimentelle Ansätze geplant werden, um Fehlinterpretationen zu minimieren.

5.4.3 Einschätzung der Anwendbarkeit von Konkameren bei Rezeptoren unbekannter Architektur am Beispiel δ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren

Wie eingangs erwähnt, zielte die Konkamerstrategie zu Beginn des Projektes darauf ab, die in ihrer Architektur und Pharmakologie noch nicht im Detail verstandenen δ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren genauer zu charakterisieren. Infolge deren geringeren Expriemierbarkeit in HEK293-Zellen und der in Kapitel 5.4.1 und 5.4.2 diskutierten Probleme mit der Vorhersagbarkeit der UE-Anordnung wurde das Ziel im Rahmen der Dissertation aufgegeben. Es wurden stattdessen $\gamma 2$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren in der prototypischen Konfiguration $\gamma 2\beta\alpha\beta\alpha$ charakterisiert. Die Literatur zu aus Konkameren assemblierender δ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren wird daher im Kontext der hier gewonnenen Erkenntnisse im Folgenden diskutiert. Auch werden alternative Strategien kurz aufgeführt.

Für $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren postulierten Kaur et al. (2009), dass die δ -UE mindestens drei Positionen im Pentamer einnehmen kann und in $\alpha 1\beta 3\delta$ -Transfektionen verschiedene Rezeptorpopulationen vorkommen können. Zum einen wird die analoge Position der $\gamma 2$ -UE und somit die sogenannte klassische Konfiguration $\delta\beta\alpha\beta\alpha$ diskutiert, zum anderen gehen die Autoren davon aus, dass die Sequenzen $\delta\alpha\beta\alpha$ und $\delta\alpha\beta\beta\alpha$, gelesen gegen den Uhrzeigersinn möglich sind. Die $\delta\beta\alpha\beta\alpha$ - und $\delta\alpha\beta\beta\alpha$ -Assemblierungen wurden u.a. mit den Kombinationen $(\beta 3\alpha 1\delta)(\beta 3\alpha 1)$ und $(\beta 3\alpha 1\delta)(\alpha 1\beta 3)$ hergestellt. Den Ausführungen aus Kapitel 5.4.1 zufolge kann das $(\alpha 1\beta 3)$ -Dimer sich aber auch umlagern und sich im Pentamer wie ein $(\beta 3\alpha 1)$ -Dimer einlagern. Die Daten von Kaur et al. (2009) deuten aber an, dass dies im vorliegenden Fall nicht zutrifft. So zeigt die Kombination $(\beta 3\alpha 1\delta)(\alpha 1\beta 3)$ im Gegensatz zu $(\beta 3\alpha 1\delta)(\beta 3\alpha 1)$ -Assemblierungen eine höhere Sensitivität gegenüber Zn^{2+} , was auf eine $\beta\beta$ -Nachbarschaft hindeutet (Hosie et al. 2003). Zum anderen konnten die Eigenschaften mit dem Pentamer $(\beta 3\alpha 1\delta\alpha 1\beta 3)$ reproduziert werden (Kaur et al. 2009). Ausgehend von den hier erhobenen Daten wäre eine Charakterisierung der genannten Assemblierungen mit DS1 und Pentobarbital sehr interessant, da mit diesen Liganden sehr gut zwischen $\alpha 1\beta 3$ - und $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren differenziert werden kann (Kapitel 4.1; 4.2.2). Weiterhin wäre in Anlehnung an die geringe Inhibition bei hohen Konzentrationen von E033-00233 bei $\alpha 1\beta 2\delta$ -Rezeptoren im Gegensatz zu $\alpha 1\beta 2$ -Rezeptoren dies ein möglicher Parameter zur Differenzierung zwischen den einzelnen Subtypen. Anhand von $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren konnte in 4.6.3.3 gezeigt werden, dass zwei

$\beta 3$ -UE im Pentamer für eine direkte Aktivierung durch Etomidat in Abwesenheit von GABA notwendig sind. Folgt man der Annahme, dass die Bindestelle zwischen der α - und β -UE liegt (Li et al. 2006), so ist naheliegend, dass nicht nur zwei $\beta 2/3$ -UE, sondern zwei $\beta 2/3\alpha$ -Nachbarschaften vorliegen müssen. Kann man im Fall von $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren ausschließen, dass die δ -UE bei der Aktivierung eine wesentliche Rolle spielt, so könnte man mit diesem Parameter die von Kaur et al. (2009) beschriebenen Assemblierungen überprüfen. Tatsächlich wurde kürzlich von Feng et al. (2014) anhand von Modulationsstudien durch Etomidat gezeigt, dass zwei $\beta\alpha$ -Nachbarschaften analog den $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren in $\alpha 1\beta 3\delta$ -Assemblierungen vorliegen. Diese Autoren gehen demnach davon aus, dass in $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren die δ -UE die Position der $\gamma 2$ -UE einnimmt. Für $\alpha 6\beta 3\delta$ -Rezeptoren geht die Gruppe von E. Sigel ebenfalls wie für $\alpha 1\beta 3\delta$ -Rezeptoren davon aus, dass mehrere Assemblierungsvarianten möglich sind (Baur et al. 2010). So beschreiben sie die Kombinationen $(\beta 3\alpha 6\delta)(\alpha 6\beta 3)$, $(\alpha 6\beta 3\alpha 6)(\beta 3\delta)$ und $(\beta 3\delta\beta 3)(\alpha 6\beta 3)$ als funktionelle Assemblierungen. Allen Konfigurationen ist aber gemein, dass, im Gegensatz zu $\alpha 6\beta 3\delta$ -Assemblierungen aus individuellen UE, nur in Gegenwart des Neurosteroids (THDOC) sehr gute GABA-induzierte Ströme gemessen werden konnten. Diese Eigenschaft ist eher analog zu den ebenfalls beschriebenen $\alpha 6\beta 3$ -Rezeptoren. Es ist daher offen, ob überhaupt eine physiologisch relevante $\alpha 6\beta 3\delta$ -Assemblierung mit den aufgeführten Konstrukten erhalten wurde. Auch hier wären die oben aufgeführten Vorschläge mit DS1, Pentobarbital und E033-00233 eine Möglichkeit besser zwischen den einzelnen Assemblierungen zu differenzieren.

Im Fall von $\alpha 4\beta 3\delta$ -Rezeptoren konnte mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie gezeigt werden, dass in vitro zwei Assemblierungen möglich sind (Barrera et al. 2008). Es wurden zu ~80% Rezeptoren in der prototypischen Konfiguration $\delta\beta\alpha\beta\alpha$ gefunden, ~20% assemblierten sich hingegen in der Sequenz $\delta\alpha\beta\alpha\beta$. Shu et al. publizierten 2012, $\alpha 4\beta 2\delta$ -Rezeptoren mit Hilfe von $(\delta\beta 2\alpha 4)(\beta 2\alpha 4)$ -Kotransfektionen. Sie fanden in Bezug auf GABA, DS2, Zn^{2+} und Furosemid ähnliche Eigenschaften wie in $\alpha 4\beta 2\delta$ -Rezeptoren assembliert aus individuellen Untereinheiten. Autoren dieser Studie publizierten 2014 (Eaton et al. 2014), dass die Eigenschaften von $\alpha 4\beta 2\delta$ -Rezeptoren in Bezug auf Neurosteroid am ehesten durch $(\alpha 4\delta)\beta 3$ -Kotransfektionen erreicht werden konnten. Ohne konkrete Vorschläge darzustellen, wie die $\alpha 4\beta 2\delta$ -Rezeptoren assembliert sein könnten, schlossen sie aus ihren Daten, dass mehrere Assemblierungen möglich sind.

Einen anderen Ansatz, um Aussagen über die UE-Stöchiometrie zu treffen, wählte die Gruppe um T. Smart. Sie berichtete mit Hilfe von Punktmutationen einer konservierten Aminosäure in der TM2 (9`S), welche die GABA-Sensitivität stöchiometrisch nach ihrer Anzahl im Pentamer beeinflusst, dass unabhängig der Ratio der cDNAs für die Untereinheiten während der Transfektion immer eine Stöchiometrie von $2\alpha 4:2\beta 3:1\delta$ bei

$\alpha 4\beta 3\delta$ -Assemblierungen erhalten wurde (Patel et al. 2014). Das Einfügen sogenannter Reporter Mutationen stellt somit eine sehr gute Möglichkeit dar, um zum einen die UE-Stöchiometrie zu bestimmen und andererseits die Integration einer Untereinheit eines Konkameres in einem Pentamer nachzuweisen. Eine weitere Option ist es, die δ -UE so zu funktionalisieren, dass sie zum Beispiel benzodiazpinesensitiv wird, wie von Meera et al. 2010 berichtet wurde. So könnte man unter der Annahme, dass die Assemblierung nicht beeinflusst wird evtl. eine An- oder Abwesenheit einer $\alpha\delta$ -Nachbarschaft aufzeigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Frage zur Assemblierung von δ -enthaltenden Rezeptoren noch nicht vollständig geklärt ist und dass die Konkamere nur Puzzlesteine liefern können. Zur Bestimmung der UE-Anordnung ist eine Kombination biochemischer Methoden, wie zum Beispiel selektiven Crosslink-Versuchen zwischen den Untereinheiten oder optischer Methoden, wie etwa FRET-Mikroskopie notwendig.

5.5 GABA_A-Rezeptoren mit einer Bindestelle für GABA

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus Kapitel 4.6.2, 4.7.2 und 4.8.2 zu der Fragestellung, inwieweit GABA_A-Rezeptoren in der sogenannten Standardkonfiguration mit einer Bindestelle funktionieren, zusammengefasst und diskutiert. Dabei wird im Besonderen auf die Position der Linker zwischen den Untereinheiten eingegangen.

Die GABA-Bindestelle wurde im Wesentlichen durch Mutation die F64C im Loop D der $\alpha 1,4$ -UE (F63C in der $\alpha 6$ -UE) ausgeschaltet. Tab. 20 ist zu entnehmen, dass durch diese Mutation die GABA-Sensitivität um den Faktor 1000 verringert wird. Hier nicht dargestellte Radioligandenbindungsassays mit [³H]Muscimol zeigten, dass am Beispiel von $\alpha 4\beta 6\gamma 3\gamma 2$ -Rezeptoren die Affinität soweit verringert ist, dass bei einer Radioligandenkonzentration um den K_D des Wildtyps von etwa 6 nM keine Bindung mehr gemessen werden konnte. Kürzlich wurde in einer mechanistischen Studie von Szczot et al. (2014) berichtet, dass diese Mutation neben der Bindung auch die Offenwahrscheinlichkeit und die Transduktion zu der Kanalöffnung beeinflusst. Als weiterer Ansatz wurde die natürlich vorkommende Spliceform der $\alpha 6$ -UE, bei der 10 AS einschließlich das F63 im Loop D fehlen, eingesetzt (Korpi et al. 1994). Bei dieser Untereinheit sind die GABA-induzierten Ströme nicht mehr zu charakterisieren (Tab. 20). Anhand der Pentobarbitalwirkung konnte aber die Expression in der Kombination $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ gezeigt werden (Tab. 21).

Die Frage, ob GABA_A-Rezeptoren mit nur einer Bindestelle adäquat funktionieren, ist in der Literatur nicht eindeutig geklärt. In Tabelle 38 sind die bisherigen Literaturdaten und die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten dargestellt. Baumann et al. berichteten 2003 mit Hilfe von $(\gamma 2\beta 2\alpha 1)(\beta 2\alpha 1)$ -Rezeptoren, dass die Mutation F64L in einer α -UE die GABA-Sensitivität etwa um den Faktor 5-6 verringert und sich nur um den Faktor 2

vom doppelmutierten Rezeptor unterscheidet. Weiterhin wurden in $(\alpha 1\beta 2\alpha 1)(\gamma 2\beta 2)$ -Assemblierungen die β -UE selektiv in der Position 205 (Y zu S) mutiert, wobei mit GABA biphasische Dosiswirkungskurven erhalten wurden. Die erste Komponente wurde als monoliganden vermittelte Aktivierung interpretiert, wobei diese nur etwa 2-3 % der Stromamplitude entsprechender Wildtyp-Rezeptoren aufwies. Die Sensitivität war aber bei der Mutation in der β -UE neben der $\gamma 2$ -UE nur um den Faktor 2-3 verschoben. Die Mutation in der β -UE zwischen den α -UE hatte eine etwa 9-10-fache Verringerung der Sensitivität zur Folge. Die Autoren schlossen daraus, dass die zwei GABA-Bindestellen nicht gleichwertig sind. Die Autoren Barcamontes et al. (2011) fügten die gleiche Mutation in $(\beta 2\alpha 1\gamma 2)(\beta 2\alpha 1)$ -Assemblierungen selektiv ein und erhielten auch einen geringen Positionseffekt, wobei die Reihenfolge genau umgekehrt ist. Die Mutation in der β -UE zwischen den α -UE hatte keinen Effekt. Eine mutierte β -UE neben der $\gamma 2$ -UE verringerte die GABA-Sensitivität etwa um das 3-fache. Keinen Positionseffekt und eine deutliche Erhöhung des EC_{50} -Wertes für GABA um den Faktor 100-200 beim selektiven Ausschalten einer GABA-Bindestelle konnte mit Hilfe eines Pentamers $(\beta 2\alpha 1\beta 2\alpha 1\gamma 2)$ beobachtet werden (Gielen et al. 2012). Die Ergebnisse eröffnen zum einen die Frage, ob die Auswahl der Mutation zum Ausschalten der Bindestelle für GABA eine Rolle spielt und die unterschiedlichen Ergebnisse erklärt. Zum anderen deutet aber der Vergleich der Assemblierungsstrategien mit der $\beta 2Y205S$ -UE eine Rolle der Verlinkung an (Tab. 38).

Tabelle 38: Übersicht der GABA-Sensitivitäten von Rezeptoren mit mutierten GABA-Bindestellen

Assemblierung	Mutation	1Wt / 2Wt	1Wt / 2M	1M / 2Wt	1M / 2M
$(\gamma 2\beta 2\alpha 1)(\beta 2\alpha 1)^1$	$\alpha 1F64L$	184	1001	972	2253
$(\alpha 1\beta 2\alpha 1)(\gamma 2\beta 2)^1$	$b2Y205S$	113	382*	921*	
$(\beta 2\alpha 1\gamma 2)(\beta 2\alpha 1)^2$	$b2Y205S$	33	95	32	
$(\beta 2\alpha 1\beta 2\alpha 1\gamma 2)^3$	$b2Y157S$	120	22600	10400	~75000
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 1\gamma 2$	$\alpha 1F64C$	25	16	1114	
$(\beta 3\alpha 1\beta 3)(\alpha 1\gamma 2)$	$\alpha 1F64C$	46	20	2317	
$(\beta 3\alpha 1\gamma 2)(\beta 3\alpha 1)$	$\alpha 1F64C$	86	1345	1140	
$(\alpha 1\gamma 2\beta 3)(\alpha 1\beta 3)$	$\alpha 1F64C$	31	42	49	

Dargestellt sind die EC_{50} -Werte für GABA in μM . Die GABA-Bindestelle, welche von der α -UE neben der $\gamma 2$ -UE gebildet wird, ist als Bindestelle 1 definiert. Die Bindestelle mit der α -UE zwischen den β -UE ist als Bindestelle 2 definiert.¹Baumann et al. 2003, ²Barcamontes et al. 2011, ³Gielen et al. 2012, Die Literaturdaten stammen alle aus Messungen mit *Xenopus* Oozyten als Expressionssystem. *1. Komponente einer Dosiswirkungskurve.

In der vorliegenden Arbeit wurde die $\alpha 1F64C$ -UE über verschiedene Verlinkungen in die Rezeptoren eingebaut und es wurden deutliche Positionseffekte des Linkers gefunden (Tab. 39). Liegt eine N-terminale Verlinkung der $\alpha 1$ -UE vor, so verringert sich zum einen die GABA-Sensitivität in nicht mutierten Assemblierungen. Weiterhin hat eine N-terminale Verlinkung der $\alpha 1$ -UE zur Folge, dass sich die GABA-Sensitivität um den Faktor 10-50 verringert, wenn die andere $\alpha 1$ -UE unabhängig davon mutiert ist. Der Linker am N-Terminus der $\alpha 1$ -UE kann somit als Artefakt verursachend aufgefasst werden. Dieser Effekt konnte auch in einer Assemblierung mit der $\alpha 4$ -UE in $(\beta 3\alpha 4\beta 3)\alpha 4\gamma 2$ -Rezeptoren beobachtet werden (Tab. 31). Bei der $\alpha 6$ -UE konnte dieser Effekt jedoch in keiner Assemblierung festgestellt werden, selbst wenn beide N-Termini durch einen Linker mit einer $\beta 3$ -UE verknüpft wurden (Abb. 48). Eine Ursache könnte die Linkerlänge sein, so wurden für die $\alpha 1$ - und $\alpha 4$ -UE 23 AS eingebaut, für die $\alpha 6$ -UE wurden gemäß der Regeln zur Linkerkonstruktion (Minier und Sigel) ein 26 AS lange Linker verwendet. Der Unterschied könnte aber auch in den Eigenschaften der $\alpha 6$ -UE begründet sein, so wurden für $\alpha 6$ -enthaltende Konkatomere unabhängig der Verlinkung immer GABA-Sensitivitäten gefunden, die nahe an der Sensitivität für Rezeptoren aus individuellen UE assemblierend sind. Für $\alpha 1$ -enthaltende Konkatomere verringerten sich hingegen die GABA-Sensitivitäten, selbst wenn beide N-Termini nicht verlinkt sind um den Faktor 10 gegenüber Wildtyp-Rezeptoren.

Betrachtet man die oben aufgeführten Literaturdaten noch einmal mit der These, dass die $\alpha 1$ -UE N-terminal nicht verlinkt sein darf, so kann das im Fall des Ansatzes mit der $\alpha 1F64L$ -UE als bestätigt angesehen werden. Die Ansätze mit den Mutationen in der β -UE widersprechen hingegen der These. Die Autoren Barcamontes et al. (2011) argumentieren vielmehr damit, dass die N-Termini der β -UE nicht verlinkt sein dürfen. Ihre Ergebnisse mit der $\beta 2Y205S$ -Mutanten bestätigen die Annahme auch.

Es kann also festgehalten werden, dass $GABA_A$ -Rezeptoren grundsätzlich durch die Bindung eines GABA-Moleküls adäquat aktiviert werden können. Für die Nachbildung solcher Zustände mit Hilfe selektiv mutierter Untereinheiten in definierten Konkatomeren müssen aber verschiedene Linkerpositionen und evtl. auch -längen ausgetestet werden. Weiterhin können die Ergebnisse abgesichert werden, wenn verschiedene Mutationen eingefügt werden.

5.6 GABA_A-Rezeptoren mit unterschiedlichen α -Untereinheiten in einem Pentamer

Es wurde schon frühzeitig mit biochemischen Methoden beschrieben, dass neben einer $\alpha 1$ -UE noch eine weitere α -UE in einem pentameren GABA_A-Rezeptorkomplex nativ vorkommen kann (Lüddens et al. 1991). Später wurde bestätigt, dass insbesondere im Cerebellum der Ratte $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -UE zusammen mit der $\gamma 2$ - (37% der $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren) oder δ -UE (15% der $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren) vorkommen (Jechlinger et al. 1998). Auch für die $\alpha 4$ -UE konnte mit immunochemischen Methoden gezeigt werden, dass sie mit allen α -UE, bis auf die $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -UE, in einem Pentamer vorkommen kann (Bencsits et al. 1999). Diese sogenannten Mischrezeptoren in rekombinanten Expressionen genauer zu charakterisieren stellt eine Herausforderung dar. Zum einen konnten die Autoren Sigel und Baur 2000 die Koexistenz der $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -UE in mit beiden cDNAs injizierten *Xenopus* Oozyten pharmakologisch zeigen. Es ist aber zum anderen nahezu unmöglich, nur eine Rezeptorpopulation in solch einem Ansatz zu erhalten. Die Methode der Untereinheitenverknüpfung scheint damit die Methode der Wahl, um dieses Problem zu lösen. Die Autoren Minier und Sigel beschrieben 2004 aus Konkantameren bestehende Rezeptoren in der Konfiguration $(\gamma 2\beta 2\alpha)(\beta\alpha)$ mit $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -UE in den unterschiedlichen Positionen. Dieser Ansatz wurde hier erweitert durch das selektive Ausschalten der GABA-Bindestelle, sowie durch eine Variation der Linkerpositionen (Tab. 39).

Tabelle 39: Vergleich GABA_A-Rezeptoren mit $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten

	selbst erhobene Daten					Minier und Sigel 2004	
	wt	$(\beta\alpha\beta)\alpha\gamma$	$(\alpha\gamma\beta)(\alpha\beta)$	$(\alpha\beta\alpha)\beta\gamma$	$(\alpha\beta\alpha)(\gamma\beta)$	wt	$(\gamma\beta\alpha)(\beta\alpha)$
$\alpha 1/\alpha 1$	2,8	24,7	30,7	19,3	42,5	41	183
$\alpha 6/\alpha 1$		5,2	16,6	2,3	7,0		94
$\alpha 1/\alpha 6$		1,1	9,4	10,3	57,5		42
$\alpha 6/\alpha 6$	0,9	1,5	2,1	2,2	-	0,9	1,2

Dargestellt sind die EC₅₀-Werte für GABA in μM . Die in der ersten Spalte zuerst dargestellte α -UE befindet sich im Pentamer neben der $\gamma 2$ -UE, die Zweite befindet sich entsprechend zwischen den β -UE. Wt kennzeichnet Rezeptoren assembliert aus individuellen Untereinheiten.

Auffallend ist die in Kapitel 5.5 diskutierte Tatsache, dass in Konkantameren mit zwei $\alpha 6$ -UE unabhängig der Verlinkung oder des Expressionssystems eine GABA-Sensitivität ähnlich den Wildtyp-Rezeptoren bestimmt werden konnte. Diese Eigenschaft der

$\alpha 6$ -UE geht aber in einigen Assemblierungen verloren. So wurden insbesondere in Rezeptoren, bei denen beide α -Untereinheiten die gleiche Verlinkung erfahren, Sensitivitäten zwischen $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren erhalten. Ist die Verlinkung der N-Termini der α -UE hingegen nicht gleich, so dominiert zum Teil die $\alpha 6$ -Sensitivität, wie dies bei $(\beta\alpha\beta)\alpha\gamma 2$ -Assemblierungen (Tab. 39) der Fall ist.

Im Fall der $(\alpha\gamma 2\beta)(\alpha\beta)$ -Assemblierungen wurden systematisch Rezeptoren vermessen, welche eine mutierte GABA-Bindestelle haben. Wie den Ergebnissen aus Tab. 34 zu entnehmen ist, nähern sich dann die Sensitivitäten den Rezeptoren an deren Bindestelle nicht mutiert ist. Dies bedeutet, dass die α -Untereinheiten, welche kein GABA binden auch nicht die GABA-Sensitivität beeinflussen. Für andere Untereinheiten kann das nicht sicher gesagt werden, da sich zum Beispiel $\alpha 4\beta 3$ - und $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren in der GABA-Sensitivität um den Faktor 10 unterscheiden. Nach gegenwärtigem Stand besitzt die $\gamma 2$ -UE jedoch keine Bindestelle für GABA, welche den Unterschied verursachen könnte.

Mithilfe der Benzodiazepine Diazepam, Bretazenil und Flumazenil konnte aufgrund der subtypspezifischen Pharmakologie in Abhängigkeit der α -UE gezeigt werden, dass nur die α -UE neben der $\gamma 2$ -UE die Benzodiazepinpharmakologie bestimmt. Die fehlende Beeinflussung der Benzodiazepinpharmakologie durch die α -UE zwischen den β -UE ist außerdem ein Hinweis, dass die Rezeptoren gemäß den jeweiligen Erwartungen assemblieren. Weiterhin konnte anhand der Furosemidpharmakologie gezeigt werden, dass unabhängig der Position eine $\alpha 4$ - oder $\alpha 6$ -UE im Pentamer ausreichend ist, um eine vollständige Inhibition der GABA induzierten Ströme analog der entsprechenden Wild-Typ-Rezeptoren zu erreichen. Die Versuche mit Modulatoren sind insgesamt leichter interpretierbar, da durch die Anwesenheit von UE oder UE-Nachbarschaften im Pentamer erst die für den Modulator notwendige Bindestelle entsteht. Die Ergebnisse zur GABA-Sensitivität zeigen hingegen in Abhängigkeit der Verlinkung ein heterogenes Bild. Dass die N-Termini der α -UE nicht verlinkt sein dürfen, ist naheliegend, da mit Hilfe der Mutanten eine Abhängigkeit der Verlinkung gezeigt werden konnte. Für Fragestellungen, bei denen der Einfluss der α -UE im Pentamer im Vordergrund steht, stellt somit die Konfiguration $(\alpha\gamma 2\beta)(\alpha\beta)$ eine sehr gute Möglichkeit dar.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des Promotionsprojektes wurden $\alpha 1,4,6$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren in den Kombinationen $\alpha\beta 3X$ ($X = \beta 3, \gamma 2, \delta$) anhand ihrer GABA- und Pentobarbitalpharmakologie sowie weiterer Liganden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im Ganzzellmodus charakterisiert. Es wurden DS1 und DS2, welche in der Literatur als δ -selektiv beschrieben sind, sowie 15 davon abgeleiteter neuer Liganden evaluiert. Entgegen der Publikationslage stellten sich diese Liganden, einschließlich der Leitstruktur, als nicht selektiv für die δ -Untereinheit heraus. Es wurden vielmehr sowohl $\alpha\beta$ - als auch $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren, welche extrasynaptisch lokalisiert sind und tonische Inhibition vermitteln mit einer 5-10-fach höheren Effizienz moduliert als entsprechende synaptisch vorkommende $\gamma 2$ -enthaltende Rezeptoren. Diese zeigten weiterhin eine um den Faktor 7-8 geringere Potenz als die zuvor genannten Subtypen. SJ33 und JWA9 stellten die Liganden mit der höchsten Sensitivität (35-45 nM) dar. Durch eine [¹⁸F]-Markierung von JWA9 könnte dieser Ligand, vorausgesetzt er passiert die Blut-Hirn-Schranke, als PET-Tracer zum Visualisieren extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren dienen. Offen ist jedoch, ob die aufgeführte Selektivitätsratio ausreichend ist, da man nur bei einem Verhältnis >100 eine sichere Differenzierung erwarten kann. Dazu wären kompetitive Radioligandenassays hilfreich, um die Affinität zu bestimmen. Für Applikationen, bei denen die Wirkung im Vordergrund steht, können die Liganden als selektiv für tonische Inhibition betrachtet werden. In Verhaltensexperimenten könnten die Liganden daher eine Alternative zu den Neurosteroiden oder THIP zur Untersuchung der tonischen Inhibition darstellen.

Weiterhin wurde ein Set an Plasmiden erstellt, welche es erlauben GABA_A-Rezeptoren definierter Stöchiometrie und Nachbarschaftsbeziehungen der Untereinheiten zu exprimieren. Diese aus sogenannten Konkatomeren bestehenden Rezeptoren wurden genutzt, um zu zeigen, dass $\alpha 1,4,6\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren in Abhängigkeit der Linkerposition mit einer GABA-Bindestelle eine ähnliche Sensitivität wie entsprechende Wild-Typ-Rezeptoren aufweisen. Anhand der Benzodiazepinpharmakologie und eines Hillkoeffizienten >1,5 in Dosiswirkungskurven für GABA kann in wildtypischen Rezeptoren trotzdem eine Anordnung der Untereinheiten in der Sequenz $\gamma 2\beta\alpha\beta\alpha$ angenommen werden. Die zu Beginn dargestellte Fragestellung zur Anordnung der Untereinheiten in δ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren wird weiterhin als offen betrachtet, da diese Rezeptoren einen Hillkoeffizienten von etwa 1 in Dosiswirkungskurven für GABA aufweisen. Es ist also nur eine GABA-Bindestelle und somit nur eine $\alpha\beta$ -Nachbarschaft in den Pentameren für die Funktion Voraussetzung. Der Ansatz mit Konkatomeren zur Untersuchung von Rezeptoren mit unbekannter Untereinheitenanordnung kann nur Puzzlesteine liefern, da sich die Positionen der Untereinheiten nicht beliebig mit Konkatomeren definieren lassen.

In der sogenannten Standardkonfiguration $\gamma 2\beta\alpha\beta\alpha$ konnten mit Hilfe der Konkatomere weitere folgende Ergebnisse gewonnen werden. (1) Assemblierungen, bei denen beide N-

Termini der α -UE nicht verlinkt sind, zeigten, dass beide GABA-Bindestellen gleichwertig sind. (2) Die Benzodiazepinpharmakologie wird im Wesentlichen durch die α -UE neben der γ 2-UE determiniert. (3) Weiterhin wurde gezeigt, dass für eine vollständige Inhibition GABA-induzierter Ströme durch Furosemid eine α 4- oder α 6-UE unabhängig der Position im Pentamer ausreichend ist. (4) Charakterisierungen mit Etomidat und Lorclezol haben für α 4 β 3 γ 2-Rezeptoren ergeben, dass zwei β 3-Untereinheiten im Pentamer vorliegen. (5) Für die β 2-selektive Substanz E033-00233 konnte gezeigt werden, dass deren Wirkung unabhängig der Position der β 2-UE, aber in Abhängigkeit ihrer Anzahl im Pentamer additiv ist. Der letzte Punkt zeigt, dass die Konkatamerstrategie genutzt werden kann, um die Mechanismen von Liganden mit unbekannter Bindestelle einzugrenzen. So kann für E033-00233 ausgeschlossen werden, dass dessen Bindestelle zwischen der β 2- und γ 2-UE liegt, obwohl die Substanz α β 2 γ 2-Rezeptoren am stärksten moduliert.

Insgesamt liefert die Konkatamerstrategie eine Möglichkeit die Rolle von einzelnen Untereinheiten in pentameren GABA_A-Rezeptoren zu studieren. Um Fehlinterpretationen weitestgehend zu vermeiden müssen aber sorgfältige Kontrollen mit unterschiedlichen Linkerpositionen und dem Einsatz von UE-selektiven Modulatoren geplant werden. Weiterhin wären Kombinationen mit biochemischen Crosslinkingversuchen und optischen Methoden wie FRET-Messungen Möglichkeiten, um weitere Einsichten in die Architektur von GABA_A-Rezeptoren und der Assemblierung von Konkatameren zu gewinnen.

Literaturverzeichnis

- Amin, J. and D.S. Weiss (1993). „GABAA receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by Pentobarbital.“ Nature **366** (6455): 565-9.
- Akk, G., J. Bracamontes (2009). „Activation and modulation of concatemeric GABA-A receptors expressed in human embryonic kidney cells.“ Mol Pharmacol **75**(6): 1400-11.
- Ataka, T. and J.G. Gu (2006). „Relationship between tonic inhibitory currents and phasic inhibitory activity in the spinal cord lamina II region of adult mice.“ Mol Pain **2**(36)
- Backus, K.H., M. Arigoni, et al. (1993). „Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor deduced from mutation-induced rectification.“ Neuroreport **13**(3): 285-8.
- Baumann, S.W., R. Baur, et al. (2001). „Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors.“ J Biol Chem **276**(39): 36275-80.
- Baumann, S.W., R. Baur, et al. (2002). „Forced subunit assembly in $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement.“ J Biol Chem **277**(48): 46020-5.
- Baumann, S.W., R. Baur, et al. (2003). „Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors.“ J Neurosci **23**(35): 11158-66.
- Baur, R. and E. Sigel. (2003). „On high- and low-affinity agonist sites in GABAA receptors.“ J Neurochem **87**(2): 325-32.
- Baur, R., F. Minier, et al. (2006). „A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits.“ FEBS Lett **580**(6): 1616-20.
- Baur, R., K.H. Kaur, et al. (2009). „Structure of $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA(A) receptors and their lack of ethanol sensitivity.“ J Neurochem **111**(5): 1172-81.
- Baur, R., K.R. Tan, et al. (2008). „Covalent modification of GABAA receptor isoforms by a diazepam analogue provides evidence for a novel benzodiazepine binding site that prevents modulation by these drugs.“ J Neurochem **106**(6): 2353-63.
- Belelli, D., A. Casula, et al. (2002). „The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors.“ Neuropharmacology **136**(7): 957-9.
- Belelli, D., J.J. Lambert, et al. (1997). „The interactions of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid.“ Proc Natl Acad Sci **94**(20): 11031-6.

- Belelli, D., M. Pistis, et al. (1999). „General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors.“ Trends Pharmacol Sci **20**(12): 496-502.
- Ben-Ari, Y. (2012). „The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders.“ Neuroscientist **18**(5): 467-86.
- Bencsits, E., M.P. Kavanaugh, et al. (1999). „A significant part of native gamma-aminobutyric AcidA receptors containing $\alpha 4$ subunits do not contain γ or δ subunits.“ J BiolChem **274**(28): 19613-6.
- Benke, D., S. Mertens, et al. (1990). „Identification of the $\gamma 2$ -subunit protein in native GABAA receptors in brain.“ Eur J Pharmacol **189**(4-5): 337-40.
- Bergmann, R., K. Kongsbak, et al. (2013). „A unified model of the GABA(A) receptor comprising agonist and benzodiazepine binding sites.“ PLoS **8**(1): e52323.
- Blount, P., S.I. Sukharev, et al. (1996). „Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of Escherichia coli.“ EMBO J **15**(18): 4798-805.
- Böhme, I., H. Rabe, et al. (2004). „Four amino acids in the α subunits determine the gamma-aminobutyric acid sensitivities of GABAA receptor subtypes.“ J Biol Chem **279**(34): 35193-200.
- Böhme, I. und H. Lüddens (2001). „The inhibitory neural circuitry as target of anti-epileptic drugs.“ Curr Med Chem **8**(11): 1257-74.
- Boileau, A.J., A.R. Evers, et al. (1999). „Mapping the agonist binding site of the GABA A receptor: evidence for a β -strand.“ J Neurosci **19**(12): 4847-54.
- Boileau, A.J., J.G. Newell, et al. (2002). „GABA(A) receptor $\beta 2$ Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions.“ J Biol Chem **277**(14): 2931-7.
- Boileau, A.J., R.A. Pearce, et al. (2005). „Tandem subunits effectively constrain GABA(A) receptor stoichiometry and recapitulate receptor kinetics but are insensitive to GABAA receptor-associated protein.“ J Neurosci **25**(49): 11219-30.
- Boileau, A.J., R.A. Pearce, et al. (2010). „The short splice variant of the $\gamma 2$ subunit acts as an external modulator of GABA(A) receptor function.“ J Neurosci **30**(14): 4895-903.
- Boulineau, N., R. Baur, et al. (2005). „Consequences of the presence of two different β subunit isoforms in a GABA(A) receptor.“ J Neurochem **95**(6): 1724-31.
- Bracamontes J., M. McCollum, et al. (2011). „Occupation of either site of the neurosteroid allopregnanolone potentiates the opening of the GABAA receptor induced from either transmitter binding site.“ Mol Pharmacol **80**(1): 79-86.

- Brickley, S.G. and I. Mody (2012). „Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease.“ Neuron **73**(1): 23-34.
- Brickley, S.G., S.T. Cull-Candy, et al. (1996). „Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA_A receptors.“ J. Physiol. **497**(3): 753-759.
- Brown, N., J. Kerby (2002). „Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA(A) receptors.“ Br J Pharmacol **136**(7): 965-74.
- Chang Y.C, E. Ghansah, et al. (2002). „Desensitization Mechanism of GABA Receptors Revealed by Single Oocyte Binding and Receptor Function.“ J Neurosci **22**(18): 7982-90.
- Chang Y.C, R. Wang, et al. (1996). „Stoichiometry of Recombinant GABAA Receptor.“ J Neurosci **16**(17): 5415-24.
- Collingridge, G.L., R.W. Olsen, et al. (2009). „A nomenclature for ligand-gated ion channels.“ Neuropharmacology **56**(1): 2-5.
- Connolly, C.N. and K.A. Wafford (2004). „The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function.“ Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 529-34.
- Earnheart, J.C., C. Schweizer (2007). GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states.“ J Neurosci **27**(6): 3845-54.
- Eaton, M.M., J. Bracamontes (2014). „ γ -aminobutyric acid type A $\alpha 4$, $\beta 2$ and δ subunits assemble to produce more than one functionally distinct receptor type.“ Mol Pharmacol **86**(6): 647-56.
- Ericksen, S.S. and A.J. Boileau (2007). „Tandem couture: Cys-loop receptor concatamer insights and caveats.“ Mol Neurobiol **35**(1): 113-28.
- Ernst, M., D. Brauchart (2003). „Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments.“ Neuroscience **119**(4): 933-43.
- Ewert, M., B.D. Shivers, et al. (1990). „Subunit selectivity and epitope characterisation of mAbs directed against the GABA/benzodiazepine receptor.“ J Cell Biol **110**(6): 2043-8.
- Farrant, M. and Z. Nusser (2005). „Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors.“ Nat Rev Neurosci **6**(3): 215-29.
- Farrar, S.J., P.J. Whiting (1999). „Stoichiometry of ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer.“ J Biol Chem **274**(15): 10100-4.
- Feng, H.J., Y. Jounaidi (2014). „Etomidate produces similar allosteric modulation in

- $\alpha 1\beta 3\delta$ and $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$ GABA(A) receptors.“ Br J Pharmacol **171**(3): 789-98.
- Firsov, D., I. Gautschi, et al. (1998). „The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC).“ EMBO J. **17**(2): 344-52.
- Franks, N.P. and W.R. Lieb (1994). „Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia.“ Nature **367**(6464): 607-14.
- Gielen M.C., M.J. Lumb, et al. (2012). „Benzodiazepines modulate GABAA receptors by regulating the preactivation step after GABA binding.“ J Neurosci **32**(17): 5707-15.
- Gingrich K.J., P.M. Burkat, et al. (2009). „Pentobarbital produces activation and block of $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ GABAA receptors in rapidly perfused whole cells and membrane patches: divergent results can be explained by pharmacokinetics.“ J Gen Physiol **133**(2): 171-88.
- Groot-Kormelink P.J., S.D. Broadbent, et al. (2004). „Incomplete incorporation of tandem subunits in recombinant neuronal nicotinic receptors.“ J Gen Physiol **123**(6): 697-708.
- Gurba K.N. (2010). „Assembly and Heterogeneity of GABAA Receptors.“ Vanderbilt Reviews Neuroscience **2**(-): 8.
- Haase R. (2013). „Untersuchung der Stöchiometrie definierter GABAA-Rezeptor-Subtypen mittels biochemischer Methoden“ Diplomarbeit Fachbereich 08 Universität Mainz
- Hadingham K.L., P.B. Wingrove. (1993). „Role of the β subunit in determining the pharmacology of human gamma-aminobutyric acid type A receptors.“ Mol Pharmacol **44**(6): 1211-8.
- Hadley S.H. and J. Amin. (2007). „Rat $\alpha 6\beta \delta$ GABAA receptors exhibit two distinct and separable agonist affinities.“ J Physiol **518**(Pt3): 1001-18.
- Hamill, O.P., A Marty, et al. (1981). „Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.“ Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Hevers, W. and H. Lüddens (1998). „The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes.“ Mol Neurobiol **18**(1): 35-86.
- Hevers, W., E.R. Korpi, et al. (2000). „Assembly of functional $\alpha 6\beta 3\gamma 2\delta$ GABA(A) receptors in vitro.“ Neuroreport **11**(18): 4103-6.
- Hoestgaard-Jensen, K., N.O. Dalby, et al. (2010). „Pharmacological characterization of a novel positive modulator at $\alpha 4\beta 3\delta$ -containing extrasynaptic

- GABA(A) receptors.“ Neuropharmacology **58**(4-5): 702-11.
- Hörtnagl, H., R.O. Tasan, et al. (2013). „Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain.“ Neuroscience **16**(236): 345-72.
- Horne, A.L., P.C. Harkness et al. (1993). „The influence of the γ 2L subunit on the modulation of responses to GABAA receptor activation.“ Br J Pharmacol **108**(3): 711-6.
- Hosie, A.M., E.L. Dunne et al. (2003). „Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity.“ Nat Neurosci **6**(4): 362-9
- Houston, C.M., T.P. McGee, et al. (2012). „Are extrasynaptic GABAA receptors important targets for sedative/hypnotic drugs?“ J Neurosci **14**(11): 3887-97.
- Hurst, R.S., M.P. Kavanaugh, et al. (1992). „Cooperative interactions among subunits of a voltage-dependent potassium channel. Evidence from expression of concatenated cDNAs.“ J BiolChem **267**(33): 23742-5.
- Im, W.B., J.F. Pregoner, et al.(1995). „Chloride channel expression with tandem construct of α 6 β 2 GABAA receptor subunit requires a monomeric subunit of α 6 or γ 2.“ J Biol Chem **270**(44): 26063-6.
- Inoue, H., H. Nojima (1990). „High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.“ Gene **96**(1): 23-8.
- Jechlinger M., R. Pelz, et al. (1998). „Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing α 6 subunits.“ J Neurosci **18**(7): 2449-57.
- Jensen, M.L. et al. (2013). „A study of subunit selectivity, mechanism and site of action of the δ selective compound 2 (DS2) at human recombinant and rodent native GABA(A) receptors.“ Br J Pharmacol **168**(5): 1118-32.
- Jin, Y., S.V.Korol, et al. (2013). „In intact islets interstitial GABA activates GABA(A) receptors that generate tonic current in α -cells.“ Plos One **8**(6): e67228.
- Jin, Y., S.K. Mendu, et al. (2013). „GABA is an effective immunomodulatory molecule.“ Amino Acids **45**(1): 87-94.
- Kaur, K.H., R. Baur, et al. (2009). „Unanticipated structural and functional properties of δ -subunit-containing GABAA receptors.“ J Biol Chem **284**(12): 7889-96.
- Khrestchatsky, M., A.J. MacLennan, et al. (1989). „A novel α subunit in rat brain GABAA receptors.“ Neuron **3**(6): 745-53.
- Kloda, J.H. and C. Czajkowski (2007). „Agonist-, antagonist-, and benzodiazepine-induced structural changes in the alpha 1 Met113-Leu132 region of GABAA re-

- ceptor.“ Mol Pharmacol **71**(2): 483-93.
- Knoflach, F., D. Benke, et al. (1996). „Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant gamma-aminobutyric acid A receptors $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 6\beta 2\gamma 2$.“ Mol Pharmacol **50**(5): 1253-61.
- Korpi, E.R., F. Debus, et al. (2007). „Does ethanol act preferentially via selected brain GABA(A) receptor subtypes? The current evidence is ambiguous.“ Alcohol **41**(3): 163-76.
- Korpi, E.R., G. Gründer, et al. (2002). „Drug interactions at GABA(A) receptors.“ Prog Neurobiol **67**(2): 113-59.
- Korpi, E.R., T. Kuner, et al. (1994). „Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar $\alpha 6$ subunit abolishes GABA(A) receptor function.“ J Neurochem **63**(3): 1167-70.
- Korpi, E.R., T. Kuner, et al. (1995). „Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gamma-aminobutyric acid type A receptor.“ Mol Pharmacol **47**(2): 163-76.
- Korpi, E.R., M. Uusi-Oukari, et al. (1999). „Furosemide action on cerebellar GABA(A) receptors in alcohol-sensitive ANT rats.“ Alcohol **19**(3): 197-2005.
- Krishek, B.J., S.J. Moss, et al. (1996). „Homomeric $\beta 1$ gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties.“ Mol Pharmacol **49**(3): 494-504.
- Levitan, E.S., P.R. Schofield, et al. (1988). „Structural and functional basis for GABAA receptor heterogeneity.“ Nature **335**(6185): 76-9.
- Lewis, R.W., J. Mabry, et al. (2010). „Dihydropyrimidinone positive modulation of δ -subunit containing gamma-aminobutyric acid type A receptors, including an epilepsy-linked mutant variant.“ Biochemistry **49**(23): 4841-51.
- Lüddens H. and E.R. Korpi (1997). „Methods for transient expression of heterooligomeric ligand-gated ion channels.“ Methods Mol Biol **83**: 55-63.
- Lüddens H., I. Killisch, et al. (1991). „More than one α variant may exist in a GABAA/benzodiazepine receptor complex.“ J Recept Res **11**: 535-51.
- Lee, S., B-E. Yoon, et al. (2010). „Channel-mediated tonic GABA release from glia.“ Science **300**(6005): 790-6.
- Li, G.D., D.C. Chiara, et al. (2006). „Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog.“ J Neurosci **26**(45): 11599-605.

- Liman, E.R., J. Tygat, et al. (1992). „Subunit stoichiometry of mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs.“ Neuron **9**(5): 861-71.
- Madsen, S.M., T. Lindeburg (1983). „Pharmacokinetics of the gamma-aminobutyric acid agonist THIP (Gaboxadol) following intramuscular administration to man, with observations in dog.“ Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) **53**(5): 353-7.
- Maguire, J. and I. Mody (2008). „GABA(A)R plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression.“ Neuron **59**(2): 207-13.
- Meera, P., R.W. Olsen, et al. (2009). „Etomidate, propofol and the neurosteroid THDOC increase the GABA efficacy of recombinant $\alpha 4\beta 3\delta$ and $\alpha 4\beta 3$ GABA A receptors expressed in HEK cells.“ Neuropharmacology **56**(1): 155-60.
- Meera, P., R.W. Olsen, et al. (2010). „Alcohol- and alcohol antagonist-sensitive human GABAA receptor: tracking δ subunit incorporation into functional receptors.“ Mol Pharmacol **78**(5): 918-24.
- Mesbah-Oskui, L., B.A. Orser, et al. (2014). „Thalamic δ -subunit containing GABAA receptors promote electrocortical signatures of deep non-REM sleep but do not mediate the effects of etomidate at the thalamus in vivo.“ J Neurosci **34**(37): 12253-66.
- Minier, F. and E. Sigel. (2004). „Positioning of the α -subunit isoforms confers a functional signature to gamma-aminobutyric acid type A receptors.“ Proc Natl Acad Sci **101**(20): 7769-74.
- Minier, F. and E. Sigel. (2004). „Techniques: Use of concatenated subunits for the study of ligand-gated ion channels.“ Trends Pharmacol **25**(9): 499-503.
- Morlock, E.V. and C. Czajkowski (2011). „Different residues in the GABAA receptor benzodiazepine binding pocket mediate benzodiazepine efficacy and binding.“ Mol Pharmacol **80**(1): 14-22.
- Mortensen M., B.Ebert, et al. (2010). „Distinct activities of GABA agonists at synaptic- and extrasynaptic-type GABAA receptors.“ J Physiol **588**(Pt8): 1251-68.
- Mortensen, M., B. Patel, et al. (2012). „GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones.“ Front Cell Neurosci **6**(1): 10.3389
- Mortensen, M. and T.G. Smart (2006). „Extrasynaptic $\alpha\beta$ subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons.“ J Physiol **557**(Pt3): 841-856.
- Mortensen, M., U. Kristiansen, et al. (2004). „Activation of single heteromeric GABA(A) receptor ion channels by full and partial agonists.“ J Physiol **557**(Pt2): 389-413.
- Neish, C.S., I.L. Martin, et al. (2003). „Atomic force microscopy of GABAA receptors

- bearing subunit-specific tags provides a method for determining receptor architecture.“ Nanotechnology **14**(1-): 864-72.
- Newell, J.G. and C. Czajkowski (2003). „The GABAA receptor α 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating.“ J Biol Chem **278**(15): 13166-72.
- Nichols, W.A., B.J. Henderson, et al. (2014). „Lynx1 shifts α 4 β 2 nicotinic receptor subunit stoichiometry by affecting assembly in the endoplasmic reticulum.“ J Biol Chem **289**(45): 31423-32.
- Nicke, A., J. Rettinger, et al. (2003). „Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X1 concatamers.“ Mol Pharmacol **63**(1): 243-52.
- Olsen, R.W. and G.D. Li (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.
- Olsen, R.W. and W. Sieghart (2008). „International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid A Receptor: Classification in the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update.“ Pharmacological Reviews **60**(3): 243-60.
- Patel, B., M. Mortensen, et al. (2014). „Stoichiometry of δ subunit containing GABA(A) receptors.“ Br J Pharmacol **171**(4): 985-94.
- Pistis, M., D. Belelli, et al. (1999). „Complementary regulation of anaesthetic activation of human (α 6 β 3 γ 2L) and Drosophila (RDL) GABA receptors by a single amino acid residue.“ J Physiol **515**(Pt1): 3-18.
- Pritchett, D.B., H. Lüddens et al. (1989). „Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells.“ Science **245**(4924): 1389-92.
- Pritchett, D.B., H. Sontheimer et al. (1988). „Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology.“ Science **242**(4883): 1306-8.
- Quinlan, J.J., G.E. Hormanics, et al. (1998). „Anesthesia sensitivity in mice that lack the β 3 subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor.“ Anesthesiology **88**(3): 775-80.
- Reynolds, D.S., T.W. Rosahl, et al. (2003). „Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms.“ J Neurosci **23**(24): 8608-17.
- Richter, L., C. de Graaf et al. (2012). „Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands.“ Nat Chem Biol **8**(5): 455-64.
- Saarelainen, K.S., M. Ranna, et al. (2008). „Enhanced behavioral sensitivity to the com-

- petitive GABA agonist, gaboxadol, in transgenic mice over-expressing hippocampal extrasynaptic $\alpha 6\beta$ GABA(A) receptors.“ J Neurochem **105**(2): 338-50.
- Sattler C. (2010). „Einfluss der globalen DNA-Methylierung auf die Ethanol sensitivität von in HEK 293-Zellen transient exprimierten GABA_A-Rezeptoren“ Diplomarbeit Fachbereich 09 Universität Mainz
- Schofield, P.R., M.G. Darlison, et al. (1987). „Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family.“ Nature **328**(6127): 221-7.
- Scimemi, A., A. Semyanov, et al. (2005). „Multiple and plastic receptors mediate tonic GABA_A receptor currents in the hippocampus.“ J Neurosci **25**(43): 10016-24.
- Shen, H., N. Sabaliauskas, et al. (2010). „A critical role for $\alpha 4\beta\delta$ GABA(A) receptors in shaping learning deficits at puberty in mice.“ Science **327**(5972): 1515-8.
- Shen, Q., R. Lal, et al. (2010). „gamma-Aminobutyric acid type A receptor deficits cause hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and antidepressant drug sensitivity reminiscent of melancholic forms of depression.“ Biol Psychiatry **68**(6): 512-520.
- Shivers, B.D., I. Killisch, et al. (1989). „Two novel GABA_A receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations.“ Neuron **3**(3): 327-37.
- Sieghart W. and G. Sperk (2002). „Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes.“ Curr Top Med Chem **2**(8): 795-816.
- Sieghart W. and M. Ernst (2002). „Heterogeneity of GABA_A receptors: revived interest in the development of subtype-selective drugs.“ Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents **5**(8): 217-242.
- Sigel, E., R. Baur, et al. (1992). „Point mutations affecting antagonist affinity and agonist dependent gating of GABA_A receptor.“ EMBO J **11**(6): 2017-23.
- Sigel, E. and R. Baur, et al. (2000). „Electrophysiological evidence for the coexistence of $\alpha 1$ and $\alpha 6$ subunits in a single functional GABA(A) receptor.“ J Neurochem **74**(6): 2590-6.
- Sigel, E., K.H. Kaur, et al. (2009). „Use of concatamers to study GABA_A receptor architecture and function: application to δ subunit-containing receptors and possible pitfalls.“ Biochem Soc Trans **37**(6): 163-76.
- Smith, G.B. and R.W. Olsen. (1994). „Identification of a [³H]muscimol photoaffinity substrate in the bovine gamma-aminobutyric acid A receptor alpha subunit.“ J

- Biol Chem **269**(32): 20380-7.
- Storustovu S.I. and B. Ebert (2006). „Pharmacological characterization of agonists at delta-containing GABAA receptors: Functional selectivity for extrasynaptic receptors is dependent on the absence of $\gamma 2$.“ J Pharmacol Exp Ther **316**(3): 1351-9.
- Sundstrom-Poromaa I., D.H. Smith, et al. (2002). „Hormonally regulated $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA(A) receptors are a target for alcohol.“ Nat Neurosci **5**(8): 721-2.
- Taylor, P.M., P. Thomas, et al. (1999). „Identification of amino acid residues within GABA(A) receptor beta subunits that mediate both homomeric and heteromeric receptor expression.“ J Neurosci **19**(15): 6360-71.
- Thompson, S.A., P.J. Whiting, et al. (1996). „Barbiturate interactions at the human GABA A receptor: dependence on receptor subunit combination.“ Br J Pharmacol **117**(3): 521-527.
- Thompson, S.A., S.A. Arden, et al. (1999). „Residues in transmembrane domains I and II determine gamma-amino acid type A receptor subtype-selective antagonism by furosemide.“ Mol Pharmacol **55**(6): 993-9.
- Tretter, N. Ehya, et al. (1997). „Stoichiometry and assembly of recombinant GABAA receptor subtype.“ J Neurosci **17**(8): 2728-37.
- Tretter, V., J. Mukherjee, et al. (2012). „Gephyrin the enigmatic organizer at GABAergic synapses.“ Front Cell Neurosci **6**(23): e103389.
- Wafford, K.A., C.J. Bain, et al. (1994). „A novel allosteric modulatory site on the GABAA receptor beta subunit.“ Neuron **12**(4): 775-82
- Wafford, K.A., M.B. van Niel, et al. (2009). „Novel compounds selectively enhance delta subunit containing GABA(A) receptors and increase tonic currents in thalamus.“ Neuropharmacology **56**(1): 182-9
- Wagner, D.A. and C. Czajkowski (2001). „Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation.“ J Neurosci **21**(1): 67-74.
- Wagoner, K.R. and C. Czajkowski (2010). „Stoichiometry of expressed $\alpha 4\beta 2\delta$ gamma-aminobutyric acid type A receptors depends on the ratio of subunit cDNA transfected.“ J Biol Chem **285**(19): 14187-94.
- Wallner, W., H.J. Hanchar, et al. (2003). „Ethanol enhances $\alpha 4\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 3\delta$ gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans.“ Proc Natl Acad Sci **100**(25): 15218-23.
- Walters, R.J., S.H. Hadley, et al. (2000). „Benzodiazepines act on GABAA receptors via

- two distinct and separable mechanisms.“ Nat Neurosci **3**(12): 1274-81.
- Wei, W., N. Zhang, et al. (2004). „Low ethanol concentrations selectively augment the tonic inhibition mediated by δ subunit-containing GABA receptors in hippocampal neurons.“ J Neurosci **23**(33): 8379-82.
- Wei, W., N. Zhang, et al. (2003). „Perisynaptic localization of δ subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus.“ J Neurosci **23**(33): 10650-61.
- Wick, M.J., R.A. Radcliffe, et al. (2000). „Behavioural changes produced by transgenic overexpression of $\gamma 2L$ and $\gamma 2S$ subunits of the GABAA receptor.“ Eur J Neurosci **12**(7): 2634-8.
- Wieland, H.A., H. Lüddens, et al. (1992). „A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding.“ J Biol Chem **267**(3): 1426-9.
- Wingrove, P.B., K.A. Wafford, et al. (1994). „The modulatory action 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 **91**(10): 4569-73.
- Whissell, P.D., D. Eng, et al. (2013). „Acutely increasing δ GABA(A) receptor activity impairs memory and inhibits synaptic plasticity in the hippocampus.“ Front Cell Neurosci **17**(7): 10.3389
- Whiting, P., R.M. McKernan, et al. (1990). „Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of $\gamma 2$ phosphorylation site.“ Proc Natl Acad Sci USA **87**(24): 9966-70
- Wohlfarth, K.M, M.T. Bianchi, et al. (2002). „Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the δ subunit.“ J Neurosci **22**(5): 1541-9.
- Ymer, S., P.R. Schofield, et al. (1989). „GABAA receptor β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs.“ EMBO J **8**(6): 1665-70.
- Zerhusen, B., J. Zhao, et al. (1999). „A single conductance pore for chloride ions formed by two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator molecules.“ J Biol Chem **274**(12): 7627-30.
- Zheleznova, N., A. Sedelnikova, et al. (2008). „ $\alpha 1\beta 2\delta$, a silent GABAA receptor: recruitment by tracazolate and neurosteroids.“ Br J Pharmacol **153**(5): 1062-71.
- Zhou, Y., M.E. Nelson, et al. (2003). „Human $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptors formed from linked subunits.“ J Neurosci **23**(27): 9004-15.

Eidesstattliche Versicherung

Name: Sattler

Vorname: Christian

Hiermit versichere ich, Christian Sattler, an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel „Assemblierung und Stöchiometrie von GABA_A-Rezeptoren: Bedeutung einzelner Untereinheiten in einem pentameren Komplex“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen wurden, sind in jedem Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht oder in anderer Form als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Ort, Datum

Unterschrift