

**Charakterisierung funktioneller Domänen
für GABA und Furosemid auf
GABA_A-Rezeptoren**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaft“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Raymonde Picard
geb. in Wiesbaden

Mainz, 2003

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Ligandenaktivierte Rezeptoren	2
1.2.	GABA _A -Rezeptor	3
1.2.1.	Agonistenbindungsstelle	4
1.2.2.	GABA _A -Rezeptor-bindende Substanzen	5
1.2.3.	Pharmakologie	6
1.2.3.1.	Benzodiazepine	6
1.2.3.2.	TBPS	7
1.2.3.3.	Furosemid	9
1.3.	Ziele der Arbeit	10
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Material	13
2.1.1.	Puffer	13
2.1.2.	Bakterienstamm	15
2.1.3.	Zellen	15
2.1.4.	Molekulargewichtstandards	15
2.1.5.	Radioisotope	15
2.1.6.	Tiere	15
2.1.7.	Klonierungsvektor	16
2.1.8.	Chemikalien	16
2.1.9.	Sonstiges	17
2.1.10.	Geräte	17
2.2.	Methoden	18
2.2.1.	DNA Standardmethoden	18
2.2.1.1.	Midi/Maxi-Präparationen	18
2.2.1.2.	Maxiprep	19
2.2.1.3.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	20
2.2.1.4.	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen	20
2.2.1.5.	Fällung von DNA	20
2.2.1.6.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	21
2.2.1.7.	Restriktionsverdau von DNA	21
2.2.1.8.	Ligation	21
2.2.2.	Zellkultur-Methoden	21
2.2.2.1.	Bestimmung der Zellzahl	21
2.2.2.2.	Subkultivierung von HEK 293-Zellen	21
2.2.2.3.	Transfektion von HEK 293-Zellen	22
2.2.2.4.	Membranpräparation	22
2.2.3.	Herstellen von kompetenten Zellen	23
2.2.4.	Transformation von kompetenten E. coli-Zellen	23
2.2.5.	[³⁵ S]TBPS- und [³ H]Muscimol-Bindungsassays	23
2.2.6.	Proteinbestimmung	26
2.2.7.	Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)	27
2.2.8.	DNA-Sequenzierung	27
2.2.9.	Rattenhirnpräparation	28
2.2.10.	Autoradiographie	29
2.2.10.1.	Beschichtung von Objektträgern	29
2.2.10.2.	Durchführung	29
2.2.10.3.	Statistik	30
2.2.11.	Konstruktion von Chimären	30
2.2.11.1.	Austausch von Teilfragmenten zwischen den Restriktionsschnittstellen Aoc I und Mlu I	30
2.2.11.2.	Austausch der Sequenzabschnitte zwischen den Restriktionsschnittstellen Bsu 361 und Hind III	35
2.2.12.	Konstruktion der Ein- und Mehrfachpunktmutanten	37
2.2.12.1.	Konstruktion von Punktmutanten	40
3.	Ergebnisse	41

3.1.	Pharmakologie von GABA _A -Rezeptoren.....	41
3.1.1.	Autoradiographien von sechs GABA-Agonisten	41
3.1.2.	Autoradiographie mit dem partiellen Agonist 4-PIOL.....	48
3.1.3.	Bindungsstudien an rekombinaten GABA _A -Rezeptoren mit 4-PIOL.....	49
3.2.	Molekularbiologische Charakterisierung von GABA _A - Rezeptoren.....	50
3.2.1.	Unterschiede in der GABA-Sensitivität von α 1- und α 6-enthaltenden Rezeptoren.....	51
3.2.2.	Überprüfung der GABA-Sensitivitäten und GABA-Affinitäten chimärer α -Untereinheiten	53
3.2.2.1.	[³⁵ S]TBPS-Bindungsstudien mit Bsu I/Hind III-Chimären	53
3.2.2.2.	[³⁵ S]TBPS-Bindungsstudien mit den 390 bp-Chimären.....	55
3.2.2.3.	[³⁵ S]TBPS-Bindungsstudien mit Chimären mit 127bp- bzw. 284bp-langen Sequenzaustauschen.....	57
3.2.3.	Einführen von Ein- und Mehrfachpunktmutationen im 127 bp Fragmenten der α 1- und α 6-Untereinheit	60
3.2.3.1.	Ein- und Mehrfachpunktmutanten im Aminosäurenbereich 168 bis 185 der α 6-Untereinheit	66
3.2.3.2.	[³⁵ S]TBPS-Bindungsstudien von Punktmutanten in Kombinationen mit den Bsu I/Hind III-Chimären.....	69
3.2.4.	Eingrenzung der Bindungsstelle für Furosemid auf der α 6-Untereinheit.....	72
4.	Diskussion	74
4.1.	GABA-Mimetika	75
4.2.	GABA-Sensitivität.....	80
4.3.	Einfluss von Furosemid auf rekombinante Rezeptoren.....	92
5.	Zusammenfassung.....	95
6.	Literaturverzeichnis.....	96
7.	Anhang	110
7.1.	Schema aller Chimären.....	110
7.2.	Abbildungsverzeichnis.....	113
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	114
7.4.	Veröffentlichungen.....	115

Definitionen

Alle folgenden Definitionen beziehen sich auf die GABA-Bindungsstelle.

Affinität: wird bestimmt durch die halbmaximale Konzentration von z.B. [³H]Muscimol (hat eine höhere Affinität zur GABA-Bindungsstelle als GABA), das kompetitiv und reversibel an die GABA-Bindungsstelle bindet.

Agonist, inverser: hat alleine GABA-mimetische Wirkung (im Falle der [³⁵S]TBPS-Bindung reduziert er diese). Bei zusätzlicher Verabreichung von GABA wirkt er jedoch bei keiner Konzentration weiterhin agonistisch. Er kann im Falle der [³⁵S]TBPS-Bindung die Wirkung geringer GABA-Konzentrationen antagonisieren.

Agonist, partieller: bindet an die GABA-Bindungsstelle und wirkt ausschließlich agonistisch, erreicht bei keiner Konzentration die von GABA erreichte Maximalwirkung. Die erreichbare maximale Wirkung eines partiellen Agonisten wird durch seine Effizienz beschrieben.

Agonist, voller: bindet an die GABA-Bindungsstelle und wirkt ausschließlich agonistisch. Bei irgendeiner Konzentration erreicht er die GABA-Maximalwirkung. Die benötigte Konzentration spiegelt die Potenz des GABA-Agonisten wider.

Aktivität, intrinsische: beschreibt die GABA-mimetische Wirkung einer Substanz in Abwesenheit von GABA.

Antagonist, inverser: hat allein keine GABA-mimetische Wirkung. Bei zusätzlicher Verabreichung von GABA wirkt er bei keiner Konzentration weiterhin antagonistisch.

Antagonist, partieller: bindet an die GABA-Bindungsstelle. Er besitzt keine intrinsische Aktivität, d.h. er entfaltet seine Wirkung nur über die Verdrängung einer anderen Substanz (z.B. GABA, Muscimol, partieller Agonist) an der GABA-Bindungsstelle. Er kann jedoch auch bei hohen Konzentrationen nie die von GABA erreichte Maximalwirkung vollständig inhibieren. Die erreichbare maximale Wirkung eines partiellen Antagonisten wird durch seine Effizienz beschrieben.

Antagonist, voller: bindet an die GABA-Bindungsstelle. Er besitzt keine intrinsische Aktivität, d.h. er entfaltet seine Wirkung nur über die Verdrängung einer anderen Substanz (z.B. GABA, Muscimol, partieller Agonist) an der GABA-Bindungsstelle. Bei ausreichend hoher Konzentration kann er die von GABA erreichte Maximalwirkung vollständig inhibieren

B_{max}-Wert: gibt an, bei welcher Konzentration einer Substanz deren maximale Bindung an einer Bindungsstelle erreicht ist.

EC₅₀-Wert: gibt die Konzentration von GABA an, bei der die halbmaximale Aktivität erreicht wird.

Effizienz: beschreibt die maximale Wirkung einer agonistischen, antagonistischen oder modulatorischen Substanz im Vergleich zur GABA-Wirkung ohne dabei die benötigte Konzentration zum Erreichen der Maximalwirkung dieser Substanz zu bestimmen.

IC₅₀-Wert: gibt die Konzentration des kalten Liganden an, die benötigt wird um die Hälfte des markierten Liganden zu verdrängen.

K_D-Wert: die Dissoziationskonstante, gibt an, bei welcher Konzentration des freien Liganden (z.B. [³⁵S]TBPS oder [³H]Muscimol) die Hälfte aller Rezeptoren besetzt sind.

K_i-Wert: die Inhibitionskonstante gibt an, durch welche Konzentration einer kalten Substanz

an der Hälfte aller Rezeptoren eine markierte Substanz (z.B. radioaktives [³⁵S]TBPS oder [³H]Muscimol) verdrängt wird.

Modulator, negativer: bindet an eine Bindungsstelle verschieden von der GABA-Bindungsstelle und wirkt der agonistischen Wirkung eines GABA-Mimetikums entgegen.

Modulator, Null-: bindet an eine Bindungsstelle verschieden von der GABA-Bindungsstelle und unterdrückt kompetitiv die Wirkung positiver oder negativer Modulatoren, die ebenfalls an dieser Bindungsstelle binden. Alleine hat er keine modulatorische GABAerge Wirkung.

Modulator, positiver: bindet an eine Bindungsstelle verschieden von der GABA-Bindungsstelle und verstärkt die GABA-Wirkung.

Potenz: wird bestimmt durch die Konzentration, die eine Substanz benötigt um die ihr eigene maximale Wirkung zu erreichen. Die Potenz macht keine Aussage über das Verhältnis der maximalen Wirkung dieser Substanz im Vergleich zur GABA-Wirkung. Sie wird z.B. mit der [³⁵S]TBPS-Bindung gemessen und als EC₅₀-Wert, IC₅₀-Wert, K_i-Werte von [³⁵S]TBPS ausgedrückt.

Sensitivität: wird bestimmt durch die Konzentration einer Substanz, die nötig ist um deren halbmaximale Wirkung zu erreichen.

Abkürzungen

μ	mikro
5HT ₁ /-5HT ₂ -Rezeptoren	5-Hydroxytryptamin ₁ /- ₂ (Serotonin)-Rezeptoren
A	Adenosin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cpm	„counts per minute“
C-terminal	carboxyterminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EthBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanosin
GAT	GABA-Transporter
h	Stunden
HEK 293	Humane Embryonale Nierenzellen 293
M	molar
mAChR	muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren
MEM	Minimal Essential Medium
mGluR	muscarinische Glutamat-Rezeptoren
min	Minuten
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PBS	„phosphate buffered saline“-Puffer
PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBPS	<i>tert</i> -Butylbicyclophosphorothionat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
w/v	Gewichtsprozent

1. Einleitung

Mit zunehmendem phylogenetischen Entwicklungsgrad steigt die funktionelle und strukturelle Komplexität des Zentralnervensystems (ZNS) an, wobei die Gehirne höherer Primaten und des Menschen am weitesten entwickelt sind. Die Gehirne von Vertebraten sind aus zwei Hauptzelltypen aufgebaut, den Neuronen und den Gliazellen. Diese Gliazellen sind einerseits für z.B. die Versorgung der Neurone zuständig und bilden andererseits die elektrisch isolierende Myelinscheide um die Neuriten aus. Neurone sind Zellen, die zur Informationsweiterleitung und -verarbeitung dienen, wie z.B. Sinneswahrnehmung oder der Steuerung der Skelettmuskulatur. Grundsätzlich ist ein Neuron aus Zellkörper, einem Axon und mindestens einem Dendriten aufgebaut. Endogene Reize, wie Sauerstoffgehalt, Temperatur und Druck sowie exogene Reize der Sinnesorgane führen in den Dendriten der Neurone zu Spannungsänderungen. Dadurch werden spannungsabhängige Kationen-Kanäle geöffnet: Durch die einströmenden Kationen wird die Leitfähigkeit dieser Kanäle weiter gesteigert, daraus resultiert ein vermehrter Kationen-Einstrom und eine stärkere Depolarisation des Neurons. Wird ein bestimmter Schwellenwert erreicht, führen diese Spannungsänderungen zu einer lawinenartigen Depolarisation des Membranpotentials. Dies wird als Aktionspotential bezeichnet. Das Aktionspotential wird dann über das Axon an andere Neurone weitergeleitet. Das Axon bildet chemische Synapsen mit dem Axon, dem Soma oder den Dendriten eines nachgeschalteten Neurons aus. Zudem bestehen zwischen den Dendriten eines Neurons und den Axonen einer oder meist mehrerer bis vieler Nervenzellen synaptische Verbindungen. Chemische Präsynapsen sind Nevenzellendigungen, die in Vesikel verpackte Neurotransmitter enthalten, die die Übertragung von Aktionspotentialen von der prä- zur postsynaptischen Nervenzelle sicherstellen bzw. dies im Falle von inhibitorischen Synapsen verhindern.

Neben den chemischen Synapsen gibt es in einigen Bereichen auch elektrische Synapsen. Elektrische Synapsen, auch „Gap Junctions“ genannt, sind Membrankanäle mit besonders geringem elektrischen Widerstand, durch die kleine geladene Moleküle fast ungehindert von einer zur anderen Zelle diffundieren können. Dieser Synapsentyp ist sowohl im ZNS als auch in den meisten anderen Organen zu finden, so z.B. im Herzmuskel, in den Epithelzellen der Leber und in der glatten Muskulatur (Kandel 1991).

Für die vorliegende Arbeit waren die im Aufbau deutlich komplexeren chemischen Synapsen von zentralem Interesse. Bei chemischen Synapsen sind die gegenüberliegenden Membranareale durch den sogenannten „synaptischen Spalt“ voneinander getrennt. Da die Übertragung der Aktionspotentiale durch Neurotransmitter gerichtet ist, spricht man von einer prä- und einer postsynaptischen Membran.

Die Neurotransmitter gehören zu unterschiedlichen Stoffklassen. So findet man neben der Esterverbindung Acetylcholin (ACh) auch Monoamine (z.B. Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin und Serotonin) und Aminosäuren. Zur letzteren Stoffklasse gehören das exzitatorische Glutamat und die am häufigsten im Rückenmark (Young and Snyder 1973;

Langosch et al. 1990) bzw. im ZNS (DeLorey and Olsen 1992; Wisden and Seeburg 1992) vorkommenden inhibitorischen Neurotransmitter Glycin bzw. GABA (γ -Aminobuttersäure). Die exzitatorische oder inhibitorische Wirkung eines Transmitters ist abhängig von der Ionenspezifität der in der postsynaptischen Membran lokalisierten Ionenkanälen (Rezeptoren) und dem jeweiligen Ionengradienten an der Plasmamembran.

Die Transmittermoleküle der unterschiedlichen Stoffklassen sind in verschiedene Vesikel verpackt und können parallel an der selben Synapse auftreten. Neurotransmittern mit geringem Molekulargewicht, wie Glutamat, Glycin und GABA liegen in den Neuronen in spezifischen kleinen (40-50 nm Durchmesser) Vesikeln vor. Ein kleiner Anteil der Vesikel ist direkt an den "aktiven Zonen" der präsynaptischen Membranen lokalisiert, wo die Transmitterausschüttung stattfindet, während der größte Anteil der Vesikel nahe dieser "aktiven Zonen" im Zytoplasma gebunden an Aktinfilamente des Zytoskeletts vorliegt. Die Bindung der Vesikel an die Aktinfilamente wird durch das Protein Synapsin vermittelt. Des Weiteren wird vermutet, dass sowohl die Vesikelmembranen als auch die präsynaptischen Membranen integrale Proteine, wie Synaptophysin oder Synaptotagmin, enthalten, die aneinander binden können und damit eine Verbindung zwischen intravesikulärem und extrazellulärem Raum herstellen (Kandel 1991).

Wird das präsynaptische Neuron stimuliert, so generieren sich über den präsynaptischen Membranen Aktionspotentiale, welche zur Öffnung spannungsabhängiger Na^+ - und K^+ -Kanäle führen. Zeitlich verzögert werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet. Das einströmende Calcium bewirkt zum einen die Ausschüttung der Transmittermoleküle aus den Vesikeln, die bereits an den präsynaptischen Membranen gebunden vorliegen, zum anderen aktiviert das einströmende Calcium eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase, die daraufhin das Synapsin phosphoryliert und somit eine Ablösung der gebundenen Transmittervesikel von den Aktinfilamenten zur Folge hat. Die freien Vesikel werden dann unter Hilfe von leichten G-Proteinen zu den "aktiven Zonen" der präsynaptischen Membran geleitet und können dort mit dieser verschmelzen um ihre Transmittermoleküle freizusetzen. Die Transmitter werden in den synaptischen Spalt entlassen und diffundieren zur gegenüberliegenden postsynaptischen Membran, wo sie an ihre spezifische Rezeptoren binden.

Damit das neuronale System erneut aktivierbar wird, müssen die Neurotransmitter möglichst schnell aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Da Diffusion hierfür zu langsam ist, gibt es für die meisten Neurotransmitter spezifische Transporter. Für GABA sind beispielsweise die GABA-Transporter GAT-1, BGT-1 (Bin/GABA-Transporter), GAT-2, GAT-3 für diese Aufgabe zuständig, die sowohl in der präsynaptischen Membran als auch in den umgebenden Gliazellen lokalisiert sind (Borden 1996). Während sich die Verteilung von GAT-1 ubiquitär über das ZNS erstreckt, ist GAT-3 auf Gehirn und Retina beschränkt (Borden 1992). Dahingegen konnte GAT-2 zusätzlich in Leber, Niere und Herz nachgewiesen werden (Ikegaki et al. 1994). Ungeachtet der Verteilung der GATs, konnten bislang keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Transporterfunktion festgestellt werden. Eine funktionelle Veränderung der GATs resultiert in Veränderungen der Neurotransmission und kann durch drastische Störungen des ZNSs in neuronalen Krankheiten, wie Epilepsie und Parkinson Syndrom resultieren.

1.1. Ligandenaktivierte Rezeptoren

Innerhalb der Gruppe der ligandenaktivierten Rezeptoren wird zwischen den prä- und postsynaptisch lokalisierten metabotropen Rezeptoren, an die G-Proteine gekoppelt sind und den ausschließlich postsynaptisch vorkommenden ionotropen Rezeptoren unterschieden. Nach der Transmitterbindung an einen metabotropen Rezeptor [GABA_B-Rezeptoren, 5HT₁/-5HT₂-Rezeptoren, muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR), einige Glutamat-Rezeptoren (mGluR), β -adrenerge Rezeptoren, Histamin-Rezeptoren, dopaminerge Rezeptoren] kommt es zu einer Änderung der Rezeptor-Konformation. Dies führt seinerseits zur Bindung, Spaltung und Aktivierung des G-Proteins, welches dann direkt auf Ionenkanäle wirken kann oder diese indirekt durch Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden beeinflusst. Dieser Vorgang beansprucht Millisekunden bis zu mehreren Sekunden (Kandel 1991).

Deutlich schneller leiten die ionotropen Rezeptoren neuronale Signale weiter. Bei diesen Rezeptoren bewirkt die Bindung des Transmitters innerhalb von wenigen Millisekunden eine Konformationsänderung und dadurch eine direkte Aktivierung der inhärenten Ionenkanäle (Schofield et al. 1987; Kandel 1991). Sie bilden insgesamt die Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle, zu der u.a. die nicotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR), die 5HT₃-Rezeptoren, die Glycin-Rezeptoren, die glutamatgesteuerten AMPA- und NMDA-Rezeptoren sowie die GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren zählen.

1.2. GABA_A-Rezeptor

Alle Mitglieder der Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle haben einen ähnlichen molekularen Aufbau (Karlin 1993), bei denen jeweils fünf Untereinheiten homomer oder heteromer einen zentralen Ionenkanal bilden. Dementsprechend setzen sich GABA_A-Rezeptoren aus fünf Untereinheiten (Nayeem et al. 1994) eines großen Untereinheiten-Pools zusammen. Es wurden bislang 19 Untereinheiten identifiziert, die jeweils in einem separaten Gen codiert sind. Die Untereinheiten wurden aufgrund ihrer Sequenzidentität in acht Klassen eingeteilt: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , ρ 1-3, θ und π (Schofield et al. 1987; Levitan et al. 1988; Khrestchatsky et al. 1989; Shivers et al. 1989; Malherbe et al. 1990; Malherbe et al. 1990; Pritchett and Seeburg 1990; Cutting et al. 1991; Kandel 1991; Bonnert et al. 1999; Sinkkonen et al. 2000; Cherubini and Conti 2001); (Neelands and Macdonald 1999). Die GABA_C-Rezeptoren bilden aus Subtypen der ρ -Untereinheit Homomere und Heteromere, die bislang nur in der Retina von Vertebraten gefunden wurden (Sieghart 1995; Zhang et al. 1995). Dennoch können sie aufgrund ihrer ionotropen Wirkweise und ihrer Sequenzidentität zu Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors als eine besondere Form des GABA_A-Rezeptors angesehen werden (Sieghart 1995).

Die einzelnen Mitglieder einer Subklasse haben eine Aminosäure-Identität von 70-80%, die Subklassen untereinander eine von 30-40% (Hevers and Lüddens 1998). Alle bisher gefundenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors weisen mit jeweils vier hydrophoben transmembranene Regionen (TM1-4) ein gemeinsames Organisationsmuster auf, wobei sowohl das kurze C-terminale als auch das lange N-terminale Ende extrazellulär liegen. Die verschiedenen Untereinheiten des Heteropentamers sind so angeordnet, dass die jeweiligen hoch konservierte TM 2-Regionen (Unwin 1989) mit ihrer α -helikalen Struktur eine

Kanalpore bilden (Hucho et al. 1986; Giraudat et al. 1987; Imoto et al. 1988; Bertrand et al. 1993), deren Öffnungszustand und Öffnungsdauer den Durchfluss der Cl⁻-Ionen bestimmen (Bormann et al. 1987; Macdonald et al. 1989; Macdonald et al. 1989; Twyman et al. 1990). Durch die einströmenden Cl⁻-Ionen werden die entsprechenden Neurone hyperpolarisiert und sind damit vorübergehend nicht in der Lage Aktionspotentiale zu generieren.

Untersuchungen an nativen und *in vitro* exprimierten GABA_A-Rezeptoren lassen vermuten, dass sich die Untereinheiten der Rezeptoren mindestens aus zwei (Gunther et al. 1995), meist jedoch aus drei verschiedenen Klassen zusammensetzen (Stephenson et al. 1990; Khan et al. 1993; Benke et al. 1994; Chang et al. 1996), vorzugsweise aus den Untereinheiten α -, β - und γ - bzw. δ (Korpi et al. 1992; Laurie et al. 1992; Laurie et al. 1992; Wisden et al. 1992; Korpi and Lüddens 1993; Gutierrez et al. 1994). Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen favorisieren folgende pentamere Kombinationen: $2\alpha/1\beta/2\gamma$ (Backus et al. 1993) oder $2\alpha/2\beta/1\gamma$ (Sieghart 1995; Chang et al. 1996; Tretter et al. 1997). Unter Berücksichtigung, dass verschiedene Isoformen der Untereinheiten-Klassen α (Duggan et al. 1991; Backus et al. 1993; Endo and Olsen 1993; Verdoorn 1994; Araujo et al. 1996; Khan et al. 1996; Sigel and Baur 2000), β (Li and De Blas 1997) oder γ (Khan et al. 1994; Khan et al. 1994; Quirk et al. 1994; Benke et al. 1996) im selben Rezeptor kolokalisiert sein können, ergibt sich eine theoretische Anzahl von mehreren Hundert möglichen GABA_A-Rezeptorsubtypen der Form α_i/β_j in Kombination mit den Untereinheiten γ_k , δ , ϵ , θ , oder π (Hevers and Lüddens 1998). Zur Vielfalt der GABA_A-Rezeptor kommen Splice-Varianten (Whiting et al. 1990; Kofuji et al. 1991; Macdonald and Olsen 1994; Rabow et al. 1995; Davies et al. 1997; Hedblom and Kirkness 1997) und verschiedene Phosphorylierungsstadien einiger Untereinheiten (Browning et al. 1990; Kofuji et al. 1991; Macdonald et al. 1992; Machu et al. 1993; Bureau and Laschet 1995) an Phosphorylierungsstellen in den intrazellulären, variabel langen Abschnitten zwischen TM 3 und TM 4 (Macdonald and Olsen 1994) hinzu.

1.2.1. Agonistenbindungsstelle

Bei allen Mitgliedern der Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle befindet sich im N-terminalen Ende der Untereinheiten eine konservierte Struktur, der Cystein-Loop (Schofield et al. 1987; Cockcroft et al. 1990). Dabei handelt es sich um eine schleifenförmige Struktur von 13 Aminosäuren, die durch Oxidation zweier Cysteine gebildet wird. Die N-terminalen Abschnitte der Untereinheiten scheinen maßgeblich an der Formung einiger Ligandenbindungsstellen beteiligt zu sein (siehe für nAChR: (Galzi et al. 1990; Galzi et al. 1991); für GABA-Rezeptoren: (Pritchett et al. 1988; Sigel et al. 1992; Amin and Weiss 1993); für Glycin-Rezeptoren: (Vandenberg et al. 1992; Schmieden et al. 1993); für Glutamat-Rezeptoren: (Bigge 1999), während andere Bindungsstellen, wie z.B. die von TBPS (*tert*-Butylbicyclophosphorothionat) am GABA_A-Rezeptor in der Kanalpore vermutet werden (Ramanjaneyulu and Ticku 1984; Johnston 1996).

Am ACh-Rezeptor wurde ein weithin akzeptiertes Modell der Agonistenbindung entworfen, das beinhaltet, dass sich die Bindestellen aus zwei benachbarten Untereinheiten im Rezeptor bilden und die an der Bindung des Agonisten beteiligten Aminosäuren aus verschiedenen benachbarten Sequenzabschnitten rekrutiert werden, die willkürlich als "Loops" A-F bezeichnet werden (Changeux and Edelstein 1998). Nach einem Modell für die

Bindung von Glycin bzw. GABA am Glycin- bzw. GABA_A-Rezeptor (Galvez-Ruano et al. 1995; Aprison et al. 1996) besitzen positiv geladene Arginine einen entscheidenden Anteil an der direkten Agonistenbindung.

1.2.2. GABA_A-Rezeptor-bindende Substanzen

Die GABA_A-Rezeptor-bindenden Substanzen lassen sich in Agonisten, Antagonisten, positive Modulatoren und negative Modulatoren gliedern (Krogsgaard Larsen et al. 1994; Johnston 1996). Als volle Agonisten (z.B. GABA, Muscimol, Isoguvacin) werden Substanzen bezeichnet, die GABA kompetitiv von seinen Bindungsstellen verdrängt und es funktionell vollständig ersetzen. Im ZNS von Säugetieren werden sowohl hoch- als auch niedrigaffine Bindungsstellen für den Agonisten GABA am GABA_A-Rezeptor diskutiert (Enna and Snyder 1977; Palacios et al. 1980; Olsen et al. 1981; Palacios et al. 1981; Olsen et al. 1984). Nach Bindung von GABA ändert sich die Rezeptoraffinität zum Liganden. Volle Antagonisten (z.B. Bicucullin; SR95531) konkurrieren ebenfalls kompetitiv mit GABA um dessen Bindungsstellen, haben aber nicht die Fähigkeit, den Ionenkanal zu öffnen, sondern inhibieren die Wirkung von Agonisten zu 100 %. In der Vielfalt der chemischen Substanzen gibt es alle Zwischenformen von vollen Agonisten über partiellen Agonisten, partiellen Antagonisten bis hin zu vollen Antagonisten.

Zusätzlich unterscheidet man zwischen Substanzen, die die GABA-Antwort allosterisch verstärken bzw. abschwächen, d.h. sie binden an Bindungsstellen, die verschieden von den GABA-Bindungsstellen sind und beeinflussen dadurch die GABA-Wirkung. Durch Änderung der Tertiär- oder Quartärstruktur des Rezeptorproteins können sie z.B. die Affinität von GABA zu seinen Bindungsstellen steigern oder verringern oder die Kopplung zwischen Bindungsstellen und Öffnungsmechanismus des inhärenten Ionenkanals verändern (Edgar and Schwartz 1992; Macdonald and Twyman 1992). Diese Substanzen werden als positive bzw. negative Modulatoren (in der älteren Literatur wird der irreführende Begriff "inverser Agonist" verwendet) (Braestrup et al. 1983; Puia et al. 1991) bezeichnet. Allosterisch am GABA_A-Rezeptor wirken z.B. Benzodiazepine (Möhler et al. 1981; Asano et al. 1983; Sigel et al. 1983; Gee et al. 1988; Korpi et al. 1997), Barbiturate, Neurosteroid (Gee 1988; Gee et al. 1988; Im and Blakeman 1991), Konvulsiva wie Picrotoxin und TBPS, das Diuretikum Furosemid, die Ionen Zink und Lanthan sowie Ethanol (Johnston 1996) (Macdonald and Olsen 1994; Sieghart 1995; Korpi et al. 2002).

Für die allosterischen Bindungsstellen sind wiederum Antagonisten bekannt. Beispielsweise bindet Flumazenil (Ro15-1788) (Braestrup et al. 1982; Polc et al. 1982; Cherubini and Conti 2001) an der Benzodiazepin-Bindungsstelle und verdrängt dort die positiven bzw. negativen Modulatoren kompetitiv. Da diese Substanz auf $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren keine intrinsische modulatorische Aktivität hat (Im et al. 1993) wird sie dort als "Null-Modulator" bezeichnet. Des Weiteren sind viele Auswirkungen von Ethanol, wie z.B. motorische Störungen und antikonvulsive Effekte, Anxiolyse, Hypnose und Sedation (Majchrowicz 1975; Frye et al. 1981) sowie Beeinflussung kognitiver Vorgänge (Matthews et al. 1995; Givens and McMahon 1997), vollständig oder teilweise GABA_A-Rezeptor-vermittelt (Korpi et al. 1992; Korpi 1994; Grant and Lovinger 1995; Crews et al. 1996; Chandler et al. 1998; Grobin et al. 1998; Smith 2001).

1.2.3. Pharmakologie

Die Pharmakologie des GABA_A-Rezeptors beschreibt die Wirkungen von GABA_A-Rezeptorbindenden Substanzen auf die Funktion der unterschiedlichen GABA_A-Rezeptorsubtypen. Diese große Breite an Reaktionsmöglichkeiten erhält der GABA_A-Rezeptor durch seine Bindungsstellen für viele verschiedene Liganden. Für die Pharmakologie des Rezeptors spielen die in einem Rezeptorsubtyp zusammen kommenden Untereinheiten eine entscheidende Rolle (Olsen and Tobin 1990; Seeburg et al. 1990; Lüddens and Wisden 1991).

1.2.3.1. Benzodiazepine

Viele Jahre nachdem man in der Praxis verwendete Schlafmittel chemisch als Benzodiazepine einordnen konnte (Sternbach 1978), fand man heraus, dass Benzodiazepine am GABA_A-Rezeptor wirken (Costa et al. 1975; Haefely et al. 1975; Polc and Haefely 1976; Sternbach 1978). Später wurden die sie zur Klasse der positiven Modulatoren des GABA_A-Rezeptors gezählt (Costa 1992). Neben den muskelrelaxierenden und sedativen Benzodiazepinen gehören zu dieser Klasse beispielsweise das Anxiolytikum Diazepam, die Antikonvulsiva Loreclezol und Tiagabin, sowie einige sedative und anästhetische Barbiturate und Steroide. Bindungsstudien, elektrophysiologische Untersuchungen und Verhaltensexperimente zeigten, dass innerhalb der Klasse der positiven Modulatoren die Benzodiazepine von besonderer klinischer und analytischer Bedeutung sind (Macdonald et al. 1992; Hadingham et al. 1993), auch wenn einige ihrer (Neben-) Wirkungen [Abhängigkeit, Verstärkung der Effekte von Ethanol, leichte Ataxie und leichte Amnesie (Gardner et al. 1993)] bei bestimmten Indikationen unerwünscht sind. In diesen Fällen wird versucht die Benzodiazepine durch andere Substanzen dieser Klasse zu ersetzen, die diese Effekte nicht aufweisen. Benzodiazepine erreichen ihre anxiolytischen, antikonvulsiven, sedativen und hypnotischen Effekte ausschließlich durch Steigerung von GABA-induzierten Effekten (Choi et al. 1977; Macdonald and Barker 1978). Benzodiazepine können die GABA-Wirkung steigern, haben jedoch in Abwesenheit von GABA keinen Effekt. Letzteres ist von besonderem praktischen Nutzen, da dadurch Benzodiazepine bei alleiniger Medikation nicht überdosiert werden können, im Gegensatz zu den Barbituraten, die bei hohen Konzentrationen intrinsische Aktivität am GABA_A-Rezeptor zeigten (Macdonald and Barker 1978; Bormann 1988).

Während in Rezeptoren die Zusammensetzung aus α und β -Untereinheiten ausreicht, um GABA-induzierte Ströme hervorzurufen (Sigel et al. 1990), ist von Benzodiazepinen bekannt, dass Rezeptoren der Kombination $\alpha\beta 1/2/3\gamma 2/3$ notwendig sind (Pritchett et al. 1989; Malherbe et al. 1990; Sigel et al. 1990; Knoflach et al. 1991; Pregenzer et al. 1993), um bei niedermolekularen Konzentrationen eine BZ-Sensitivität zu entwickeln, deren Ausmaß wiederum stark von der in den Rezeptoren exprimierten α -Untereinheiten abhängt (Malminiemi and Korpi 1989; Stephenson et al. 1990; Benke et al. 1991; Korpi et al. 1992; Hadingham et al. 1993; Korpi et al. 1995; Knoflach et al. 1996; Wafford et al. 1996; Jones et al. 1997). Die GABA/BZ-Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ wurden auf Grund ihrer Äffinitäten gegenüber bestimmten Agonisten der Benzodiazepin-Bindungsstelle als BZ-Typ I-Rezeptoren bezeichnet, während $\alpha 2/3/5\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren zu den BZ-Typ II-Rezeptoren gehören (Pritchett et al. 1989; Pritchett and Seeburg 1990). Es gibt Hinweise darauf, dass sich

bis zu 50 % aller benzodiazepin-sensitiven GABA_A-Rezeptoren des adulten Gehirns aus den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 2$ zusammensetzen (Laurie et al. 1992; Benke et al. 1994; Macdonald and Olsen 1994; Rabow et al. 1995). Dem gegenüber sind die Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ nahezu insensitive gegenüber klassischen Benzodiazepinen (Malminiemi and Korpi 1989; Lüddens et al. 1990; Korpi et al. 1992; Wieland et al. 1992; Korpi et al. 1995; Knoflach et al. 1996; Wafford et al. 1996; Jones et al. 1997). Für $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure [$\alpha 1(\text{Arg}101) \rightarrow \alpha 6(\text{His}100)$] zur Diazepam-Insensitivität führt (Wieland et al. 1992)

Im Gegensatz zu den positiven Modulatoren sind die meisten klinischen Effekte von negativen Modulatoren unerwünscht. Zu dieser chemisch sehr inhomogenen Gruppe zählen z.B. proangiogene Substanzen, wie Ro 5-4864 (Pellow and File 1984) und Ro 19-4603 (Belzung et al. 1990) sowie konvulsive Substanzen, wie z.B. TBPS (Squires et al. 1983; Casida and Lawrence 1985) und Picrotoxin (Lawrence and Casida 1983). Darüber hinaus sind einige dieser Substanzen potente Insektizide (Lawrence and Casida 1984).

Insgesamt bietet der GABA_A-Rezeptor viele Angriffspunkte für Medikamente (Bergman et al. 2000) und damit auch zur Behandlung psychiatrisch und neurologisch relevanter Erkrankungen wie z.B. von Epilepsien (Doring et al. 1995; Suzdak and Jansen 1995; Smith 2001; Heckers and Konradi 2002), Angstzuständen (Anagnostaras et al. 1999; Scott et al. 1999; Engel and Grant 2001; Scuvee-Moreau and Seutin 2001; Smith 2001), Schlafstörungen (Shirakawa 2002), Muskelspasmen (Gardner et al. 1987; Lader 1994), Depressionen und Manien (Petty 1995).

1.2.3.2. TBPS

Von besonderer analytischer Bedeutung ist [³⁵S]TBPS. Alle natürlich vorkommenden GABA_A-Rezeptorsubtypen scheinen diese allosterisch, antagonistisch wirkende Substanz zu binden (Karobath et al. 1981; Olsen 1982; Olsen et al. 1990; Im and Blakeman 1991; Korpi and Lüddens 1993). [³⁵S]TBPS inhibiert nicht nur konzentrationsabhängig die Bindung von GABA-Agonisten und positiven Modulatoren, es unterstützt außerdem auch die Auswirkungen von negativen Modulatoren (Squires and Saederup 1987; Korpi et al. 1992; Korpi and Lüddens 1993). Andererseits wird die [³⁵S]TBPS-Bindung von bisher allen getesteten Substanzen moduliert, die an den GABA_A-Rezeptor binden (Lüddens et al. 1994). Physiologisch relevante Konzentrationen von GABA, GABA-Mimetika und GABAerg wirkende Substanzen inhibieren die TBPS-Bindung allosterisch (Squires et al. 1983; Lawrence et al. 1984; Ramanjaneyulu and Ticku 1984), indem sie die Affinität von TBPS zum Rezeptor reduzieren (Gee et al. 1988), während GABA-Antagonisten konzentrationsabhängig die GABA-induzierte Reduktion der TBPS-Bindung blockieren (Ticku and Ramanjaneyulu 1984; Squires and Saederup 1987; Korpi et al. 1992; Korpi and Lüddens 1993).

TBPS verdrängt das als partiellen negativen Modulator wirkende Konvulsivum Picrotoxin (Skerritt and Johnston 1983) kompetitiv vom GABA_A-Rezeptor (Lawrence and Casida 1983;

Maksay and Ticku 1985; Holland et al. 1990; Pomes et al. 1993). Aufgrund der Tatsache, dass die Wirkung von TBPS und Picrotoxin GABA-abhängig ist, wird vermutet, dass die TBPS/Picrotoxin-Bindungsstelle nahe oder innerhalb der Rezeptor-Pore gelegen ist (Inoue and Akaike 1988; Newland and Cull 1992; Gurley et al. 1995). Strittig ist gegenwärtig noch der Rezeptorzustand, unter dem diese Substanzen binden: In einigen Wirkschemata wird angenommen, dass die TBPS/Picrotoxin-Bindungsstelle nur bei geöffnetem Kanal besetzt werden kann und somit zu einer Stabilisierung des desensitivierten Rezeptorzustandes führt (Newland and Cull 1992). Andere Arbeitsgruppen halten es für möglich, dass die Liganden an eine teilweise geschlossene Konformation des Rezeptors binden oder durch ihre Bindung einen geschlossenen Rezeptorzustand stabilisieren (Van Renterghem et al. 1987; Inoue and Akaike 1988; Hamann et al. 1990; Hawkinson and Casida 1992). Untersuchungen zur Lokalisierung der Picrotoxin/TBPS-Bindungsstelle (French Constant et al. 1993; Jursky et al. 2000) deuten darauf hin, dass die Aminosäuren 4-6 der TM 2-Region eine entscheidende Rolle spielen (Abb. 3).

Experimentell interessant ist, dass [³⁵S]TBPS entsprechend den Versuchsbedingungen eine bis mehrere Stunden benötigt, um im Bindungsgleichgewichtszustand zu sein (Lawrence et al. 1985; Maksay and Simonyi 1986; Edgar and Schwartz 1990; McIntyre and Skolnick 1991; Giorgi et al. 1996). Die Interaktionen zwischen den GABA_A-Rezeptor-Liganden und den TBPS-Bindungsstellen werden daher im Nicht-Equilibrium gemessen (Maksay and Simonyi 1988), so dass sowohl positive wie negative Modulationen gemessen werden können. In Anwesenheit von GABA spiegelt das Maß der [³⁵S]TBPS-Bindung die Funktionalität des Cl⁻-Kanals des GABA_A-Rezeptors wider und wird daher zur Charakterisierung allosterischer Interaktionen am Rezeptor und zur Differenzierung rekombinanter GABA_A-Rezeptorsubtypen herangezogen (Im and Blakeman 1991; Korpi and Lüddens 1993; Giorgi et al. 1996; Korpi et al. 1996). Aus experimentellen Gründen wurde [³⁵S]TBPS bei diesen Bindungsstudien [³H]Picrotoxin vorgezogen: Einerseits würde die deutlich höhere unspezifische Bindung von ³H-markiertem Picrotoxin die Auswertung der Bindungsstudien erschweren. Andererseits ist die Ausbeute an meßbaren radioaktiven Zerfällen bei ³⁵Schwefel-markierten Substanzen deutlich größer (ca. 90 %) als bei Tritium-markierten (ca. 40 %). Dies ist wichtig, da die verwendete Konzentration an [³⁵S]TBPS weit unter dem des K_D-Werts liegt. Ein weiterer ausschlaggebender Aspekt zur Verwendung von [³⁵S]TBPS ist, dass Picrotoxin im Gegensatz zu TBPS, nur einige Millisekunden braucht um seinen Gleichgewichtszustand zu erreichen (Yoon et al. 1993).

Es gibt schon seit langem Hinweise darauf, dass es innerhalb des N-Terminus zusätzlich zu den Sequenzen, die direkt an den Ligandenbindungen beteiligt sind und damit die GABA-Affinität bestimmen, Sequenzbereiche gibt, die die Ligandenwirkungen auf andere Art und Weise beeinflussen. So wurde bereits 1988 von Levitan et al. (Levitan et al. 1988) verschieden ausgeprägte GABA-Sensitivitäten bei verschiedenen GABA_A-Rezeptorkombinationen untersucht. Er konnte anhand von Expressionsstudien zeigen, dass Rezeptoren, bestehend aus der β1-Untereinheit in Kombination mit verschiedenen α-Untereinheiten, unterschiedliche GABA-Sensitivität haben. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die α-Untereinheit für die GABA-Sensitivität entscheidend ist. In weiteren Arbeiten,

unter zusätzlicher Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit bzw. unterschiedlicher β -Varianten, wurden diese Ergebnisse bestätigt (Sigel et al. 1990; Verdoorn et al. 1990; Puia et al. 1992).

Bei Koexpression der $\alpha 1$ -Untereinheit mit der $\beta 1$ -, $\beta 2$ - bzw. $\beta 3$ -Untereinheit in *Xenopus* Oozyten konnte für $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptoren in elektrophysiologischen Untersuchungen deutlich höhere Cl^- -Ströme nach Gabe von $1 \mu\text{M}$ GABA und $3 \mu\text{M}$ GABA gemessen werden als bei $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren (Ymer et al. 1989). Weiterführend konnte gezeigt werden, dass der Austausch des positiv geladenen Lysins an Position 274 der $\beta 3$ -Untereinheit gegen ein ungeladenes Threonin zu einer deutlichen Steigerung der GABA-Sensitivität führte (Fisher 2002).

Dies könnte darauf hin deuten, dass zusätzlich zur Expression der unterschiedlichen α -Untereinheiten, die Expression unterschiedlicher β -Untereinheiten einen Einfluss auf die GABA-Sensitivität hat. Neben elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit Hilfe von radioaktiven Bindungsstudien mit der ^{35}S -markierten Substanz TBPS unterschiedliche GABA-Sensitivitäten bei verschiedenen GABA_A -Rezeptorkombinationen bzw. in unterschiedlichen Hirnregionen festgestellt. Dementsprechend erhöhen in $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren geringe Konzentrationen von GABA die [^{35}S]TBPS-Bindung bzw. reduzieren die [^{35}S]TBPS-Bindung bei höheren GABA-Konzentrationen (Korpi and Lüddens 1993; Lüddens and Korpi 1995). Zusätzlich konnten Korpi et al. (Korpi et al. 1992) zeigen, dass GABA die [^{35}S]TBPS-Bindung in den Granulazellen des Cerebellums besonders stark inhibiert. Diese Zellen sind fast ausschließlicher Expressionsort $\alpha 6$ -enthaltender Rezeptoren (Wisden et al. 1992; Wisden et al. 1996). In den Granulazellen der Ratte werden neben den Untereinheiten $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$ und δ lediglich zwei α -Untereinheiten in größerem Umfang exprimiert: $\alpha 1$ und $\alpha 6$. Untersuchungen weisen darauf hin, dass beide α -Untereinheiten in der Hälfte aller der Granulazellen vorkommen (Caruncho et al. 1995). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die von Korpi et al. (Korpi et al. 1992) gezeigte höhere GABA-Sensitivität auf die $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren zurückzuführen ist.

1.2.3.3. Furosemid

Besonders hilfreich zum Verständnis subtypspezifischer Vorgänge der GABA_A -Rezeptoren sind Mediatoren, die selektiv an bestimmten Rezeptorsubtypen Effekte hervorrufen. Das Diuretikum Furosemid ist bei gegenwärtigem Kenntnisstand die spezifischste Substanz des GABA_A -Rezeptors (Korpi et al. 1995; Korpi and Lüddens 1997). Bezüglich des Cl^- -Transports in Neuronen lieferten die von Ballanyi et al. (Ballanyi et al. 1984) ermittelten Membranpotentiale und intrazellulären Ionenkonzentrationen an symphatischen Neuronen Hinweise, dass ein K^+/Cl^- -Kotransport stattfindet, der durch Furosemid inhibierbar ist. Heute weiß man, dass Furosemid in der Niere den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transport blockiert, indem es die NaCl -Aufnahme in das dicke, aufsteigende Segment der Henleschen Schleife verringert und so zu einer reduzierten Wasseraufnahme führt (Greger and Wangemann 1987). Da Furosemid den Cl^- -Transport aus Neuronen hemmt, wurde es benutzt, um in elektrophysiologischen Experimenten separat die durch GABA_A -Rezeptoren hervorgerufenen Cl^- -Ströme zu messen (Misgeld et al. 1986; Thompson et al. 1988).

Neben den Wirkungen von Furosemid auf den Cl^- -Transport wurde schon früh eine weitere pharmakologische Seite dieser Substanz vermutet. Nicoll (Nicoll 1978) testete

bekannte Substanzen aus, die in unterschiedlichen Systemen den Cl⁻-Transport von Zellen blockierten. Aus diesen Versuchen schloss er, dass Furosemid die Leitfähigkeit der durch GABA hervorgerufenen Antwort in Neuronen blockiert und dass an der Depolarisation der Zellen durch GABA möglicherweise Cl⁻-Ionen beteiligt sind. Bereits 1983 (Gallagher et al. 1983) wurde angenommen, dass Furosemid eine Auswirkung auf den GABA-Rezeptor-Komplex hat. Pearce konnte 1993 diese Vermutung anhand von elektrophysiologischen Studien an hippocampalen Rattenhirnschnitten belegen (Pearce 1993). Zu Beginn stellte er eine große Variabilität einer Bicucullin-hemmbarer GABA-Antwort fest, die sich in eine schnelle und eine langsame Komponente zerlegen ließ. Die schnelle und die langsame Reaktionskomponente konnte entsprechend des Stimulationsortes im Hippocampus separat hervorgerufen werden. Lediglich die schnelle Reaktionskomponente war durch Furosemid hemmbar. Er konnte zeigen, dass diese Wirkung von Furosemid nicht auf einen Einfluss auf das Cl⁻-Transport-System zurückzuführen war, da sich das Gleichgewichtsverhältnis von Chlorid (innen zu außen, also das Umkehrpotential von Chlorid) auch nach lang anhaltender Furosemid-Applikation (11 min) nicht veränderte. Einige Jahre später lieferten Korpi et al. (Korpi et al. 1995; Korpi and Lüddens 1997) eine Erklärung für die ortsabhängige Inhibition durch Furosemid: Furosemid wirkt subtypspezifisch auf $\alpha 4\beta 2/3$ - und $\alpha 6\beta 2/3$ -enthaltende Rezeptoren. Erste befinden sich hauptsächlich im Thalamus und Hippocampus, zweitgenannte kommen nahezu ausschließlich in den Granulazellen des Cerebellums vor (Wisden et al. 1996).

Sowohl in $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren als auch in den Granulazellen des Cerebellums ($\alpha 6$ -reich) erhöht Furosemid die Basalbindung von [³⁵S]TBPS und hemmt die GABA-induzierte Reduktion der TBPS-Bindung, während es in anderen Gehirnregionen (appliziert in höheren mikromolaren Konzentrationen) die GABA-induzierte Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung verstärkt (Korpi et al. 1995; Knoflach et al. 1996; Wafford et al. 1996). Korpi et al. (Korpi et al. 1995) zeigten, dass Furosemid die Bindungsaffinität von [³⁵S]TBPS an cerebellären GABA_A-Rezeptoren erhöht, was sie durch Konformationsänderungen des Rezeptors erklärten. Die antagonistische Wirkung von Furosemid auf die GABA-induzierte Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung ist unabhängig von der γ bzw. δ -Untereinheit, jedoch konnte in Abwesenheit von exogenem GABA ein Anstieg der [³⁵S]TBPS-Basalbindung nur in $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ -Rezeptoren nachgewiesen werden (Korpi and Lüddens 1997). Der $\alpha 6$ -spezifische Effekt von Furosemid konnte *in vitro* durch [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren bestätigt werden (Korpi et al. 1995). Verdrängungsstudien mit Furosemid und [³H]Muscimol zeigten, dass Furosemid nicht kompetitiv auf die GABA-Bindungsstelle wirkt.

1.3. Ziele der Arbeit

Aus der Kombination der zentralen Bedeutung des extrazellulären N-Terminus und den unterschiedlichen GABA-Sensitivitäten von $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren entwickelte sich ein Leitgedanke der vorliegenden Arbeit: Der N-terminale Bereich in den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ des GABA_A-Rezeptors wurde mit Hilfe von Chimären und Punktmutanten intensiv untersucht. Um den für die GABA-Sensitivität verantwortlichen Bereich zu identifizieren wurde an transient transfizierten HEK 293-Zellen Änderungen in der GABA-Sensitivität und

GABA-Affinität der Rezeptoren durch [³⁵S]TBPS- und [³H]Muscimol-Bindungsstudien analysiert. Aufgrund der Eigenschaften von TBPS (Squires et al. 1983; Casida and Lawrence 1985) und Muscimol (Brehm et al. 1972; Osborne 1980; Sarlieve et al. 1980), mit hoher Affinität und nur geringen unspezifischen Bindungsraten am GABA_A-Rezeptor zu binden, eignen sie sich besonders gut für die Ermittlung von GABA-Sensitivität und GABA-Affinität. Ein weiterer Vorteil von [³H]Muscimol hinsichtlich der Bestimmung der GABA-Affinität ist seine konstante Affinität zu vielen nativen (Olsen et al. 1990; Bureau and Olsen 1993) und rekombinanten Rezeptorsubtypen (Korpi and Lüddens 1993; Lüddens et al. 1994).

Anknüpfend an den ersten Leitgedanken dieser Arbeit, war der zweite Leitgedanke, die Pharmakologie von GABA_A-Rezeptorsubtypen *in situ* zu überprüfen. Hierzu wurde der Einfluss einiger GABA-Mimetika auf die [³⁵S]TBPS-Bindung mit Hilfe von Autoradiographien an frontalen Rattenhirnschnitten durchgeführt. Zusätzlich zum prototypischen Agonist Muscimol und dessen Derivat Thiomuscimol wurden die endogenen Aminosäuren β -Alanin und Taurin (die sowohl den GABA_A-Rezeptor als auch den Glycin-Rezeptor modulieren (Horikoshi et al. 1988)) sowie drei synthetische Substanzen (4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol (THIP), Piperidin-4-Sulfonsäure (P4S) und 5-(4-Piperidyl)isoxazol-3-ol (4-PIOL) ausgetestet.

Entsprechend der Ermittlung der verantwortlichen Aminosäuren für die unterschiedlichen GABA-Sensitivitäten von α 1- und α 6-enthaltenden Rezeptoren stellte sich die Frage nach dem Wirkungsort von Furosemid und führte damit zum dritten Leitgedanken dieser Arbeit: Den selektiven Antagonismus von Furosemid auf α 6-enthaltende Rezeptoren im Detail zu untersuchen. Dies geschah mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, wobei die bereits hergestellten Chimären zwischen den Untereinheiten α 1 und α 6 in einem System rekombinanter Rezeptoren auf ihre Furosemid-Sensitivität getestet wurden.

Zusammenfassend kann man die Grundlagen dieser Arbeit wie folgt formulieren:

Der inhibitorische Transmitter GABA greift durch die Bindung an seinen Rezeptor entscheidend in regulatorische Prozesse von Neuronen ein. Sind diese Vorgänge gestört, können daraus schwere neuronale und psychische Störungen resultieren. Für die Entwicklung krankheitsspezifischer Medikamente und für das Verständnis komplexer erregender und hemmender Vorgänge im Gehirn ist es von großer Bedeutung, neben dem genauen Bindungsort von GABA am Rezeptor, auch alle weiteren Wirkmechanismen des Transmitters zu kennen. Das Diuretikum Furosemid ist der erste bekannte GABA_A-Rezeptor-Antagonist, der subtypspezifisch auf α 6-Untereinheiten enthaltende Rezeptoren wirkt, die sich fast ausschließlich in der Granulazellschicht des Cerebellums befinden. Aus diesen Voraussetzungen ergab sich folgende Vorgehensweise:

Als Erstes wurden mit Hilfe von α 1/ α 6-Chimären durch [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien in rekombinanten Rezeptoren Aminosäuren lokalisiert, die für die Ausprägung unterschiedlicher GABA-Sensitivitäten verantwortlich sind und somit den Kopplungsmechanismus zwischen Agonist-Bindung und Kanalöffnung beeinflussen. Des Weiteren wurde dabei untersucht, ob Isoformen der β -Untereinheiten-Klasse unterschiedliche Auswirkung auf die TBPS-Bindung haben.

Zum Zweiten wurden verschiedene GABA-Mimetika anhand von Rattenhirnschnitten mit

[³⁵S]TBPS-Bindung in Autoradiographien auf ihre Wirkungskapazität und ihre Wirkungsorte untersucht. Ziel war es, eine Substanz zu finden, die exklusiv in bestimmten Hirnregionen bindet. Dies würde dann Rückschlüsse auf eine mögliche Rezeptorsubtyp-Spezifität zulassen. Drittens sollten mit Hilfe der oben genannten $\alpha 1/\alpha 6$ -Chimären der Sequenzabschnitt in der $\alpha 6$ -Untereinheit, der für den selektiven Antagonismus von Furosemid verantwortlich ist, eingegrenzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Puffer

100x TE-Puffer 1 M Tris
 0,1 M Na₂-EDTA
 pH 7,5 (mit konz. HCl), autoklavieren
 mit H₂O verdünnen

TBB (Terrific Broth)-Medium A: 12 g Bacto-Tryptone
 24 g Bacto-Yeast Extrakt
 4 ml Glycerin
 mit H₂O ad 900 ml, autoklavieren
 B: 0,17 M KH₂PO₄
 0,72 M K₂HPO₄ ,autoklavieren
 100 ml B + 900 ml A,
 Antibiotikum kurz vor Gebrauch zugeben

Lösung I (Resuspensionspuffer) 50 mM Glucose (1 % w/v)
 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA aus 0,5 M EDTA Stock, pH 8,0

Lösung II (Lysispuffer) 200 mM NaOH
 1% Sodiumdodecylsulfat (SDS),
 immer frisch ansetzen

Lösung III (Neutralisationspuffer) 600 ml 5 M Kalium-Acetat
 115 ml Eisessigsäure
 285 ml H₂O

CsCl-Lösung 90g CsCl
 90 ml 1x TE-Puffer

Salzwasser gesättigtes Isopropanol in einer 0,5 l Schraubverschlussflasch zu ~100 ml
 H₂O solange NaCl zugeben bis eine große Menge
 Salz sichtbar ist
 ~300 ml Isopropanol zugeben, mischen
 ~1/2 h warten bis deutlich 3 Phasen

(Salz, Wasser, Isopropanol) sichtbar sind

- 0,5 M EDTA 84,06 g Na₂-EDTA
~400 ml H₂O
pH 8,0 (mit 1 M NaOH)
mit H₂O ad 500 ml, autoklavieren
- 20x TBE 1080 g Trizma Base (Tris)
550 g Borsäure
400 ml 0,5 M EDTA*Na, pH 8,0
mit H₂O ad 5 l, pH 8,3
- 10x PBS 80 g NaCl
2 g KCl
14,4 g Na₂HPO₄*2H₂O
2 g KH₂PO₄
mit H₂O ad 1 l, pH 7,4, bei RT lagern
Verdünnen zu 1x PBS mit autoklaviertem H₂O
- 293 MEM-Medium MEM minimal essentials media,
(Gibco cat #041-01090M)
10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS),
(Gibco #011-06290M)
2 mM Penicillin/Streptomycin;
(Gibco #043-05140H)
2 mM Glutamin; (Gibco #043-05030H),
bei 4 °C lagern
- 2 M CaCl₂ 14,7 g CaCl₂ mit H₂O ad 50 ml, steril filtrieren,
bei 4 °C lagern
- 2x BBS 1,07 g BES (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-
aminoethansulfonicacid),
Sigma, Taufkirchen, (50 mM Endkonz.)
1,63 g NaCl (280 mM Endkonz.)
0,0267 g Na₂HPO₄*2H₂O, (1,5 mM Endkonz.)
mit H₂O ad 100 ml, 15 min rühren
pH 6,95 (mit ~500 µl 2 M NaOH, 15 min warten)
bei 4 °C lagern
- TCP (Tris-Citrat Puffer) 1 M Tris (Sigma, München) mit Citrat (Sigma,
München) auf pH 7,4 einstellen, mit autoklaviertem
H₂O auf 50 mM verdünnen

SOC-Medium 10 g Bacto-Tryptone
 2,5 g Bacto-Yeast Extrakt
 0,25 g NaCl
 mit H₂O ad 500 ml, autoklavieren
 1 ml 20 % Glucoselösung zusetzen

2.1.2. Bakterienstamm

Für alle Transformationen wurden kompetente E. coli-Zellen des Stammes DH5 α verwendet.

2.1.3. Zellen

Für alle Transfektionen wurden Humane Embryonale Nierenzellen (HEK 293) verwendet.

2.1.4. Molekulargewichtstandards

λ [Bst E II] New England Biolabs; Fragmentlängen: 8453, 7242, 6369,
5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224,
117
100 bp Marker Peqlab, Erlangen; Fragmentlängen: 3000, 2000, 1500, 1200,
1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
pRK7[Hinf I] Fragmentlängen: 1380, 1138, 635, 517, 396, 272, 178, 75,
65, 38, 22

2.1.5. Radioisotope

[³⁵S]TBPS Amersham, Buckinghamshire, U.K. oder
NEN Life Science Produkt, Boston, USA
[³H]Muscimol NEN Life Science Produkt, Boston, USA

2.1.6. Tiere

Alle verwendeten Ratten waren Männchen vom Stamm Wistar (gestellt vom Department of Laboratory Animals, University of Helsinki; Gewicht ca. 350 g). Sie wurden in Gruppen von 3-5 Tieren in rostfreien Maschendrahtkäfigen aus Stahl gehalten und mit R3 Rattenfutter (Ewos AB, Södertälje, Sweden) und Leitungswasser ad libitum versorgt.

2.1.7. Klonierungsvektor

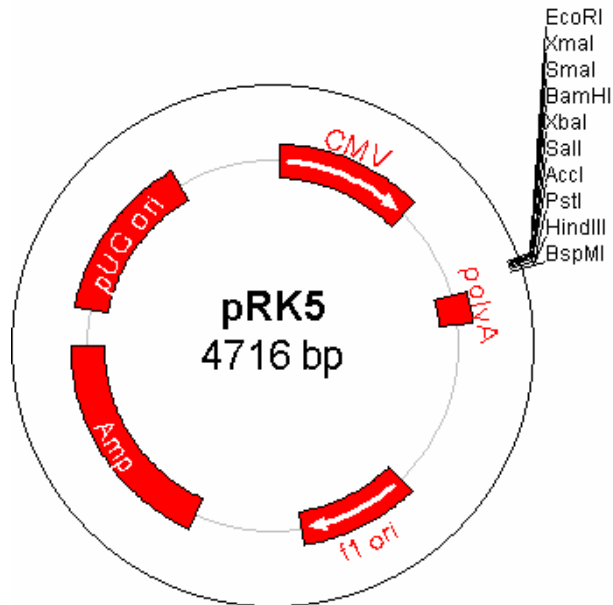


Abb. 1: Karte von pRK5, ein pUC 18 basierender Vektor zur Expression in eukariontischen Zellen unter Kontrolle des Promotors und Enhancers des Cytomegalie Virus (CMV). Der Vektor ist zur Selektion mit einer Ampicillinresistenz ausgestattet.

2.1.8. Chemikalien

Agar-Agar	Difco (Augsburg)
Agarose	Biozym (Hilden)
Ampicilin	Gerbu (Gaiberg)
BSA	Sigma (München)
CaCl ₂	Roth (Karlsruhe)
Citrat	Sigma (München)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (München)
FCS	PAA (Österreich)
GABA	Sigma (München)
MEM	Gibco (Karlsruhe)

Penicilin	Gibco (Karlsruhe)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Picrotoxinin	Sigma (München)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ffm)
	Roche (Mannheim)
SDS	Sigma (München)
Streptomycin	Gibco (Karlsruhe)
Tris	Sigma (München)
Trypanblau	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Difco (Augsburg)
Yeast Extrakt	Difco (Augsburg)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien (Reinheitsgrad "p. a." oder reinst) wurden von folgenden Firmen bezogen:

Merck (Darmstadt)
 Carl Roth (Karlsruhe)
 Sigma (München)

2.1.9. Sonstiges

Filterpapier	Whatman Papier (Nr.7)
Glasfaserfilter #52	Schleicher & Schüll (Dassel)
Plastikwaren der Zellkultur	Greiner (Frickenhausen)
Röntgenfilme (Hyperfilm Bio Max MR)	Kodak (Stuttgart)
Szintillisationsflüssigkeit	Zinsser Analytic (Frankfurt)

2.1.10. Geräte

Autoradiographieanalysesystem	AIS Bildanalyse Gerät Software: Imaging Research (Canada)
DNA-Sequenziergerät ABI Prism 310 Sequencer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Gel-Imaging-System	Polaroid DVS System "Store"
Microm-Kryostat (HM 500 OM)	Walldorf (Germany)
PCR-Geräte	Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400; Perkin Elmer 9600 (USA), Applied Biosystems (Darmstadt)
Photometer	DNA/RNA-Spektrometer, Gene Quant, Pharmacia (Freiberg)
Szintillationszähler	Beckmann (USA)
Zentrifugen	Biofuge 13, Heraeus (Hanau)

Optima L-70K, Beckmann (USA)
Centrikon T-10/65, Kontron Instruments (UK)
Megafuge 1.0 R, Heraeus (Hanau)
Sorvall RC5B, Du Pont

2.2. Methoden

2.2.1. DNA Standardmethoden

Zur Kontrolle und Analyse transformierter DNA wurden kleine Mengen Plasmids nach der von He et al. (He et al. 1989) beschriebenen Methode isoliert. Dabei wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml TBB-Medium (siehe 2.2.1.2) (Ampicilinkonzentration: 200 µg/ml) in ein Wassermannröhrchen überimpft und ü.N. bei 37°C und 240 rpm geschüttelt. 2 ml des Ansatzes wurden in ein Reaktionsgefäß gefüllt und die Bakterien 30 Sekunden (sec) abzentrifugiert (13000 rpm, RT, Heraeus Biofuge13). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lösung I (siehe 2.2.1.2) plus 1 µl RNase (10 mg/ml) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl Lösung II (siehe 2.2.1.2) pro Ansatz dazu pipettiert, vorsichtig gemischt und erneut 5 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 150 µl Lösung III (siehe 2.2.1.2) zugegeben, vorsichtig gemischt und die Zelltrümmer 5 min abzentrifugiert (13000 rpm, RT). Nach Zugabe von 200 µl eines Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) wurde 15 sec gevortext und eine Phasentrennung durch zweiminütige Zentrifugation (13000 rpm, RT) herbeigeführt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml eisgekühltem Ethanol wurde die DNA gefällt und durch 10 min Zentrifugation (13000 rpm, RT) pelletiert. Der Überstand wurde abgehoben, das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.1. Midi/Maxi-Präparationen

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde mit dem NUCLEOBOND AX Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach der Vorschrift und mit den Lösungen des Herstellers durchgeführt.

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml TBB-Medium überimpft und die Vorkultur 2-5 Stunden (h) bei 37°C und 240 rpm geschüttelt. Die Vorkultur wurde dann in eine 50 ml Kultur umgegossen und diese unter gleichen Bedingungen ü.N. geschüttelt. Dem Medium war zur Selektion 200 µg/ml des Antibiotikums Ampicilin zugesetzt worden.

Am nächsten Tag wurden die Bakterien 5 Minuten (min) bei 4° C mit 5000 rpm (ca. 5000 g) abzentrifugiert, das Pellet in S1-Puffer (Menge siehe Vorschrift NUCLEOBOND AX Kit) resuspendiert, das gleiche Volumen S2 (enthält SDS) zugegeben und vorsichtig gemischt. In der folgenden Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden die Bakterien lysiert und deren genomische DNA denaturiert. Danach wurde das in der Lösung enthaltene SDS mit dem kaliumacetathaltigen Puffer S3 neutralisiert. Nach mehrfachem Invertieren des Röhrchens schloss sich eine 5-minütige Inkubation auf Eis an, dabei fiel neben geringeren Mengen

denaturierter Proteine und chromosomaler DNA hauptsächlich Kalium-Dodecylsulfat aus. Die Wirts-DNA wurde 30 Min bei 4°C und 15000 rpm (Sorvall RC5B, Rotor Model SLA-1500 SUPER-LITE™ GSA) abzentrifugiert. Während des Zentrifugierens wurde die NUCLEOBOND-Säule equilibriert, indem sie mit Puffer N2 beladen wurde. Der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wurde auf die Anionenaustauscher-Säule gegeben und diese nach Abtropfen 2 x mit Puffer N3 gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Puffer N5 in 35 ml Sorvall-Röhrchen eluiert und zur Fällung mit 0,7 Volumen ungekühltem Isopropanol vermischt. Das Gemisch wurde unmittelbar abzentrifugiert (30 Min, 4°C, 15000 x g, Sorvall SS-34) um die DNA, aber möglichst wenig Salze, kopräzipitieren. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 300-500 µl H₂O gelöst und bei 4° C aufbewahrt.

2.2.1.2. Maxiprep

Diese Präparationsmethode wurde verwendet, wenn große Mengen sehr reiner Plasmid-DNA benötigt wurden. Zunächst wurde eine 3 ml Vorkultur der gewünschten Bakterienkolonie in TBB-Medium ca. 3-6 h bei 37 °C und 240 rpm geschüttelt. Die Vorkultur wurde dann zusammen mit 200-250 ml TBB-Medium in einen 2 l-Erlenmeyerkolben überführt und ü.N. geschüttelt. Als Selektionsmarker wurde Ampicilin (200 µg/ml) verwendet.

Am nächsten Tag wurden die Bakterien 10 Min mit 5000 rpm (Sorvall RC5B, Rotor Model SLA-1500 SUPER-LITE™ GSA) abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, in 6 ml Lösung I durch mehrmaliges Aufziehen in eine Pipette resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde in ein 35 ml Sorvall-Röhrchen überführt, mit 12 ml Lösung II versetzt, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml eiskalter Lösung III wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer sowie die genomische DNA wurden in einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 15000 rpm (Sorvall RC5B, Rotor SS-34) sedimentiert. Der Überstand wurde durch Zellstoff gefiltert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 20 ml Isopropanol (RT) und 20-minütiger Zenrifugation (13000 rpm, Sorvall RC5B, Rotor SS-34) gefällt. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 25 ml 1 x TE-Puffer gelöst. Der Ansatz wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt, mit 25 g CsCl-Lösung aufgefüllt und mit 2 ml Ethidiumbromid (EthBr, 10 mg/ml H₂O) (Sigma, München) versetzt. Grobe Protein-EthBr-Komplexe wurden durch 10-minütige Zentrifugation (3000 rpm, Heraeus, Megafuge 1.0 R, Schwingrotor 2704) abgetrennt. Danach wurden die Überstände in UZ-Röhrchen umgefüllt und diese mit CsCl₂-Lösung (1 mg + 1 ml TE-Puffer) aufgefüllt und austariert. Es schloss sich eine 24-stündige Zentrifugation (48.000 rpm, Centrikon T-10/65, Kontron Instruments oder Beckman Optima L-70K, Rotor VTI 50) an. Das Zentrifugenröhrchen wurde vorsichtig in ein Stativ gespannt. Die Positionen der DNA-Banden waren entweder bei Tageslicht sichtbar oder wurden unter UV-Licht bestimmt. Nach Entfernen der Verschlusskappe wurde mit einer Kanüle ½ cm unterhalb der unteren Bande eingestochen (10 ml-Spritze, Sterican-Einmal-Kanülen 0,9 x 0,4 mM, BRAUN), die superhelikale Plasmid-DNA abgesogen und in kleine UZ-Röhrchen überführt. Die obere Bande enthielt Reste der genomischen DNA. Zur Gewinnung besonders reiner Plasmid-DNA wurde eine weitere Gradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit 0,5 ml

EthBr versetzt, mit CsCl-Lösung (1 mg + 1 ml TE-Puffer) tariert und 4 h bei 60.000 rpm (Centrikon T-10/65, Kontron Instruments oder oder Beckman Optima L-70K, Rotor VTI 65.2) zentrifugiert. Die untere Bande wurde abgezogen (siehe oben) und in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen gefüllt. Um das EthBr zu entfernen, wurde salzgesättigtes Isopropanol zugegeben und kräftig geschüttelt. Die obere isopropanol-haltige Phase wurde verworfen und diese Schritte wurden so lange wiederholt, bis auch die obere Phase frei von EthBr war. Zum Entfernen des CsCl wurde die DNA-Lösung gegen ca. 500-fachen Überschuss 1 x Tris-EDTA (TE)-Puffer dialysiert und einmal der Puffer gewechselt. Die DNA-Lösung wurde dann vom Dialyseschlauch in Reaktionsgefäße überführt und ihre Konzentration photometrisch bei OD₂₆₀ bestimmt.

2.2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

PCR-Produkte und DNA-Fragmente wurden entsprechend ihrer Größe in horizontalen 0,8-2 % Agarosegelen (Biozym, Hilden) mit 1 µg/ml EthBr bei max. 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Puffersystem wurde 1 x TBE verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und durch ein angeschlossenes digitales Kamerasystem (Polaroid DVS System "Store") dokumentiert. Als Molekulargewichtsstandard dienten mit λ[Bst E II] (New England Biolabs), pRK7[Hinf I] oder ein 100 bp Marker (Peqlab, Erlangen).

2.2.1.4. Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurden die EthBr-gefärbten DNA-Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Wiedergewinnung der DNA erfolgte mit den Reagentien und nach Angaben des JETsorb Gel Extraction Kit/600 (GENOMED). Dabei wird die DNA durch Adsorption an Glaskügelchen von Gelbestandteilen und Salzen getrennt.

Die Gelstücke wurden gewogen, pro 100 mg mit 300 µl Puffer A1 und 10 µl JETsorb Suspension versetzt, kräftig gemischt und 3 Min im 50° C Wasserbad gelöst. Die Glaskügelchen mit anhängender DNA wurden durch Zentrifugation (30 sec, 13000 rpm, Biofuge 13, Heraeus) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 300 µl Puffer A1 resuspendiert. Der Schritt wurde mit 2 x 300 µl Puffer A2 wiederholt. Das Pellet wurde abschließend getrocknet, zur Elution in 20 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert und 5 Min bei 50° C inkubiert. Danach wurden die Glaskügelchen wieder abzentrifugiert und der DNA-enhaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.1.5. Fällung von DNA

DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 2,5-fache Volumen EtOH gefällt. Die Ansätze wurden 10 min auf Eis inkubiert. Die DNA wurde durch 10 minütige Zentrifugation pelletiert und einmal mit 70 % EtOH gewaschen.

2.2.1.6. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Konzentrationen von Plasmid-DNA wurde in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke photometrisch (DNA/RNA-Spektrometer, Gene Quant, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer OD_{260} von 1,0 kann bei doppelsträngiger DNA von einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ ausgegangen werden (Sambrook J 1989). Eine reine DNA sollte einen Quotienten OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,85-1,95 haben.

2.2.1.7. Restriktionsverdau von DNA

Das Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller und unter Benutzung der mitgelieferten Restriktionspuffer. Es wurden Enzyme von New England, Biolabs und Roche verwendet. Die eingesetzte Enzymmenge variierte je nach Aktivität des entsprechenden Enzyms und der Qualität und Menge der zu schneidenden DNA. Die Reaktionen wurden bei 37° C (für das Enzym Bsa WI bei 60° C) durchgeführt und die Enzyme danach - wenn nötig und möglich - hitzeinaktiviert. Die vollständige Spaltung der DNA wurde mittels Elektrophorese überprüft.

2.2.1.8. Ligation

Die Ligationsreaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt. Die DNA wurde mit 1U T4-DNA-Ligase und 3 μl 10 x Ligasepuffer in einem 30 μl Ansatz ü.N. bei 14° C inkubiert.

2.2.2. Zellkultur-Methoden

Alle für die Zellkultur verwendeten Plastikwaren wurden steril bezogen (Greiner, Frickenhausen). Die Zellen wurden in Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco) mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Penicilin/Streptomycin (Gibco), 2 mM Glutamin (Gibco) und 10% hitzeinaktiviertem FCS (PAA, Österreich) kultiviert.

2.2.2.1. Bestimmung der Zellzahl

Der Vitalfarbstoff Trypanblau wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl verwendet. Die Stammlösung aus 0,1 % (w/v) Trypanblau (Roth, Karlsruhe) und 0,01 % Natriumazid (NaN_3) in aqua dest. wurde mit 10 x PBS im Verhältnis 9:1 gemischt und bei 4° C aufbewahrt. Die Zellen wurden 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau färbt tote Zellen blau an; ausgezählt wurden nur die ungefärbten Zellen.

2.2.2.2. Subkultivierung von HEK 293-Zellen

Um die Zellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu halten, mussten sie regelmäßig passagiert werden. Die adhärent wachsenden Humanen Embryonalen Nierenzellen (HEK) 293-Zellen wurden in 600-ml Kulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden 20 Mal ausgedünnt und danach verworfen. Zum Verdünnen wurde das MEM-Medium abgesaugt, die Zellen einmal vorsichtig mit 1x PBS gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (Gibco (Invitrogen), Karlsruhe) benetzt. Nach einer kurzen (ca. 2 min) Inkubation bei 37° C

lösten sich die Zellen vom Boden ab, worauf frisches MEM-Medium hinzugegeben wurde. Entsprechend der Tage bis zur Transfektion wurde die Zelldichte auf 3×10^6 (3 Tage), 6×10^6 (2 Tage) oder 12×10^6 (1 Tag) eingestellt.

2.2.2.3. Transfektion von HEK 293-Zellen

Für alle Bindungsstudien wurden HEK 293-Zellen, die in 15 cm-Durchmesser (2 cm hoch) Petrischalen wuchsen, transfiziert. Hierfür sollten die Platten zu ca. $\frac{3}{4}$ konfluent bewachsen sein.

Die transiente Transfektion erfolgte mit der Methode der Kalzium-Phosphat-Präzipitation nach Chen & Okayama (Chen and Okayama 1987). Die Gene der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten lagen einkloniert im eukaryontischen Expressionsvektor pRK5 vor (siehe 2.1.7) und (Pritchett and Seeburg 1990). Sie wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tab. 1) zusammen mit 125 µl/15 cm Platte CaCl₂ (Roth, Karlsruhe) und 1 ml/Platte 2x BBS zu den Zellen gegeben. Die Konzentrationen der Plasmide für die optimale Transfektionseffizienz wurde vorher experimentell ermittelt (für α1, β1, β3 und γ2 (Lüddens and Korpi 1995); für α6 (Lüddens and Korpi 1997).

Tab. 1:
Plasmidkonzentrationen der verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

Untereinheit	Plasmidkonzentration [µg/Platte]
α1	5
α6	5
β1	3
β3	1
γ2	0,5

Alle GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten waren im eukaryontischen Expressionsvektor pRK5 (siehe 2.1.7) und (Pritchett and Seeburg 1990) einkloniert und wurden für [³H]Muscimol- und [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien (siehe 2.2.5) in HEK 293-Zellen transfiziert. Die Transfektionen mit den angegebenen Mengen µg Vektor-DNA erfolgten in 15 cm Gewebekulturschalen. Alle chimären oder punktmutierten α-Untereinheiten wurden in gleichen Vektor-DNA-Konzentrationen transfiziert wie ihre jeweilige Wildtyp-α-Untereinheit.

Bei der Transfektion ist die Reihenfolge der zu pipettierenden Agentien zu beachten: Zuerst wurde H₂O ad 2 ml/Platte mit den Plasmiden zusammen pipettiert, dann das CaCl₂ zugegeben und zum Schluss mit BBS die Kristallbildung gestartet. Die dabei entstehenden DNA-Kalziumphosphat-Kristalle bilden sich während einer 90-sekündigen Inkubation bei RT. Danach wurde auf jede Kulturschale (16 ml Medium/Platte) vorsichtig 2 ml der Lösung pipettiert. Die transfizierten Zellen wurden ü.N. im Brutschrank (37 °C) bei einem CO₂-Gehalt von 3% inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt (15 ml/Platte) und die Zellen weitere 20-30 h bei 37 °C und 5% CO₂ wachsen gelassen.

2.2.2.4. Membranpräparation

Zum Abernten der Zellen wurden diese vorsichtig einmal mit 1x PBS (siehe 2.2.2.2) gewaschen, danach wurden je ca. 8,3 ml 1x PBS/Platten verteilt, die Zellen abgelöst und in

ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation (1200 rpm, Megafuge 1.0 R, Heraeus, Schwingrotor 2704) bei 4° C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml TCP (50 mM) aufgenommen. Die Zellen wurden im ULTRA-TURRAX T25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Stauffen) 10 sec homogenisiert und die Membranfragmente pelletiert (20 min, 14000 rpm, Sorvall RC5B, Rotor SS-34). Wurde die Membran direkt weiterverwendet, so wurde sie mit dem für den Versuch benötigten Volumen TCP aufgefüllt und der Ansatz erneut mit dem ULTRA-TURRAX homogenisiert. Für eine spätere Verwendung wurde das Membranpellet bei -20° C eingefroren und vor der Verwendung noch einmal auf diese Weise mit TCP gewaschen.

2.2.3. Herstellen von kompetenten Zellen

Bei der Herstellung von kompetenten DH5 α -Zellen wurde nach einer Methode von Chung et al. (Chung et al. 1989) vorgegangen. Bakterien sind nur während ihrer exponentiellen Wachstumsphase fähig fremde, unverhüllte DNA aufzunehmen. Die Bakterien wurden aus einer Glycerinkultur auf einer LB-Platte (ohne Ampicilin) ausgestrichen, ü.N. bei 37° C inkubiert und dann eine ü.N.-Kultur einer Kolonie in 5 ml LB-Medium hochgezogen. Vorgewärmtes LB-Medium wurde 1:100 mit der ü.N.-Kultur angeimpft und die Bakterien bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 wachsen gelassen. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm, Megafuge 1.0 R, Heraeus, Schwingrotor 2704, 4° C) und das Pellet in 2,5 ml LB-Medium und 2,5 ml 2x TSS (kalt) resuspendiert. Die Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Röhrchen aliquotiert und sofort bei -70° C eingefroren.

2.2.4. Transformation von kompetenten E. coli-Zellen

Die Transformation wurde nach der Methode Inoue et al. (Inoue et al. 1990) durchgeführt. Hierzu wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 200 μ l (bei Retransformationen nur 50 μ l) in gekühlte, sterile 15 ml Röhrchen umgefüllt. Zu 200 μ l Bakteriensuspension wurden 3,4 μ l frisch mit H₂O 1:10 verdünntes Mercaptoethanol zugegeben, 10 min auf Eis inkubiert und ab und zu gemischt. Dann wurden 3-5 μ l (bei Retransformationen nur Pipettenspitze eintauchen) Ligationsansatz (siehe 2.2.1.8) zu dem Ansatz pipettiert und ohne zu mischen eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Während dessen wurde 800 μ l SOC-Medium im Wasserbad (42° C) vorgewärmt. Nach der Inkubation (30 min) erhielten die Zellen einen Hitzeschock für 40 sec bei 42° C, wurden nochmals 2 min auf Eis inkubiert und dann mit 800 μ l SOC-Medium gemischt. Anschließend wurden die Zellen bei 37° C und 240 rpm eine Stunde lang geschüttelt (Innova 4300 incubator shaker, New Brunswick Scientific). Die Selektion der Klone erfolgte mit Hilfe von Antibiotika: 100 μ l des Ansatzes wurden auf eine LB-Platte mit geeignetem Antibiotika ausgestrichen und ü.N. bei 37° C im Brutschrank belassen.

2.2.5. [³⁵S]TBPS- und [³H]Muscimol-Bindungsassays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden radioaktive Liganden-Bindungsstudien rekombinanter GABA_A-Rezeptoren - wie detailliert von Korpi et al (Korpi and Lüddens 1993; Korpi et al.

1995) beschrieben - durchgeführt. Als Kontrolle diente die jeweilige spezifische [³⁵S]TBPS-Bindung der Membran, die sich aus $\text{Bindung}_{\text{total}} - \text{Bindung}_{\text{unspezifisch}}$ errechnet, und auf 100 % festgelegt wird. Als $\text{Bindung}_{\text{total}}$ wurde die gemessene Bindung der Membranen von [³⁵S]TBPS ohne Zusatz weiterer Liganden festgesetzt, als $\text{Bindung}_{\text{unspezifisch}}$ wird die Menge gebundenen [³⁵S]TBPS bezeichnet, die trotz eines Überschusses an Picrotoxinin (20 µM) verbleibt.

Aufgrund der sehr langsamen Bindungsrate (Hinreaktion) von TBPS wäre zum Erreichen einer Gleichgewichtsbindung eine Inkubationszeit von vielen Stunden erforderlich. Da bei einer längeren Inkubationszeit proteolytische Aktivitäten das Ergebnis verfälschen würden, ist eine Bestimmung von maximaler Bindungsrate (B_{max} -Wert) und der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D -Wert) nicht möglich. Bei den TBPS-Bindungsassays wurde die gewaschene Membran (ca. 200 µg Protein/ml) in der Anwesenheit von 6 nM [³⁵S]TBPS (NEN Life Science Produkt, Boston, USA) in 50 mM Tris-Citrat Puffer (pH 7,4) + 200 mM NaCl in einem Endvolumen von 500 µl inkubiert. Danach wurde ungebundener Ligand durch schnelle Filtration über angefeuchtete Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll #52) von gebundenem Liganden getrennt. Die Proben (jeweils in doppelter Ausführung) wurden zwei Mal mit 5 ml kaltem 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 gewaschen. Der Filter wurde auf ein Ausstanzgerät überführt, die Filtersegmente mit 4 ml Szintillisationsflüssigkeit (Zinsser Analytic, Aquasafe 300 Plus, Frankfurt) überschichtet, die Proben mehrmals invertiert und in einem Beckmann Szintillisationszähler gemessen. Die Sensitivität der Rezeptoren gegenüber GABA wurde unter Zugabe steigender GABA-Konzentrationen gemessen, der Reverenzansatz blieb ohne GABA.

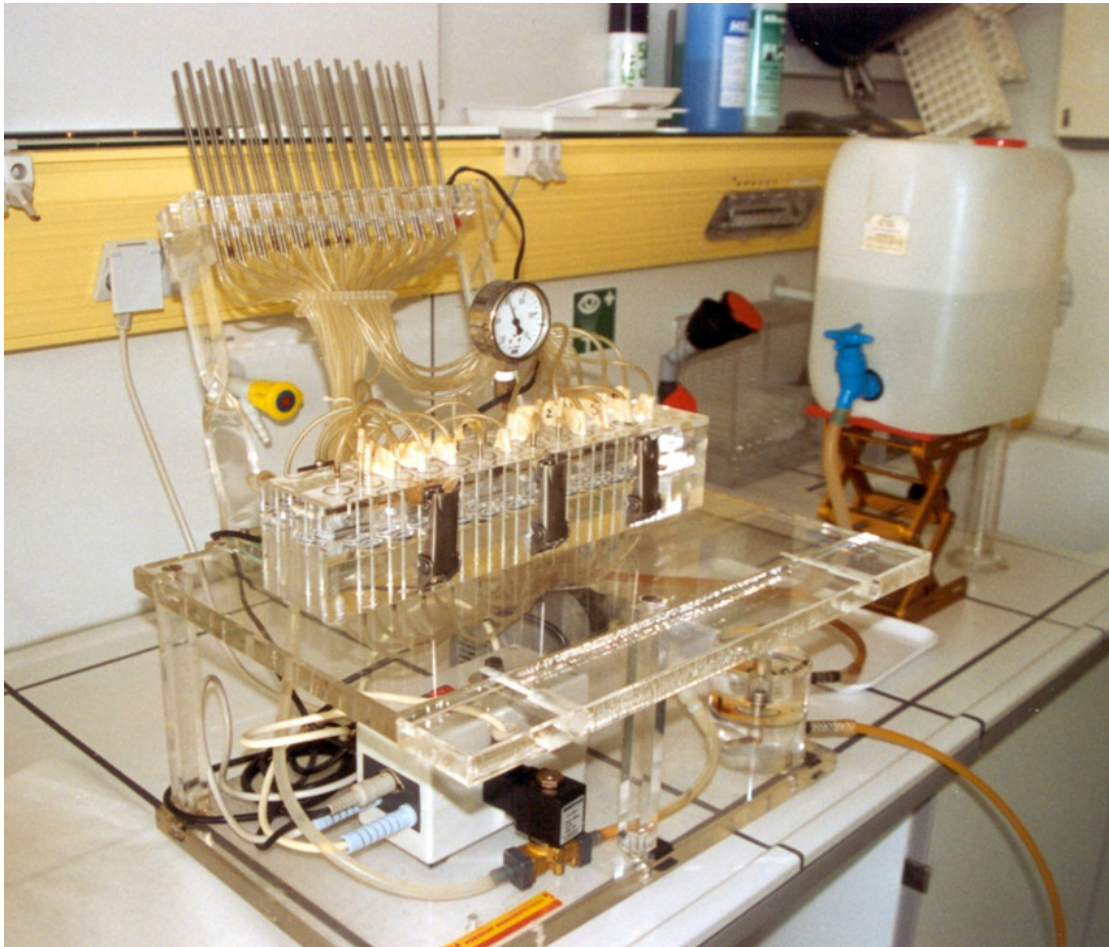


Abb. 2: Die Apparatur ermöglicht das Absaugen und Waschen von 24 Proben gleichzeitig. Durch starken Unterdruck in der Apparatur, der durch eine Pumpe generiert wird, und durch den Andruck von O-Ringen auf den Glasfaserfilter wird das Zusammenfließen der Waschpuffer verschiedener Proben verhindert und die zu verwerfenden Inkubationsflüssigkeiten und Waschpuffer werden in eine Abfallflasche geleitet. Eine gleichbleibende Menge an Waschpuffer wird durch eine Zeitschaltuhr gewährleistet.

Die verwendeten GABA-Konzentrationen waren: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 1 mM (teilweise wurden folgende Konzentrationen zusätzlich ausgetestet: 33,33 nM, 333,33 nM und 3,33 μ M). Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden 20 μ M Picrotoxinin (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, U.S.A.) eingesetzt. Die α -Untereinheiten wurden stets mit der β 1- oder β 3-Untereinheit und der γ 2-Untereinheit in HEK 293-Zellen kotransfiziert.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichend zu den α -Wildtyp-Untereinheiten alle sequenziell veränderten α -Untereinheiten im Rezeptor im Verbund mit der β 1- oder β 3-Untereinheit und der γ 2-Untereinheit auf ihre GABA-Affinitäten getestet. Hierfür wurde an gleicher Apparatur ein Bindungsassay ("Scatchard") mit steigenden Konzentrationen von [3 H]Muscimol (NEN Life Science Produkt, Boston, USA), einem GABA-Agonisten, durchgeführt.

Steigende Konzentrationen des radioaktiven Liganden führen zur Sättigung der Bindung

an den Bindungsstellen, wodurch es möglich wird, anhand der Messung der gebundenen Radioaktivität die Bindungsaffinitäten der Rezeptoren zu bestimmen. Muscimol unterliegt einer sehr viel schnelleren Bindungsrate als TBPS, daher können nach 60-minütiger Inkubation bei 0°C Gleichgewichtszustände erzielt werden. Aus diesem Grund ist eine Bestimmung der B_{\max} - und K_D -Werte möglich. Jeweils in Doppelwerten wurden die Bindungen der Membrane mit steigenden Konzentrationen von [^3H]Muscimol in nM (0,5, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24 und 30) ermittelt. Der Agonist wurde in 50 mM Tris-Citrat Puffer (pH 7,4) verdünnt und in 500 μl -Ansätzen eingesetzt. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde ein Überschuss an GABA (10 μM) hinzugegeben (siehe oben).

Zeigte sich in Vorversuchen, dass die Bindung an der Membran sehr niedrig war und damit die für eine ausreichende Bindung erforderliche Menge Membran pro Ansatz aufgrund der zwangsläufig hohen DNA-Konzentration aus den Zellkernen der HEK 293-Zellen gegebenenfalls beim Absaugen den Filter verstopfen könnte, wurde jedem Ansatz vor der Inkubation 1 μl DNase (10 mg/ml) zugegeben.

2.2.6. Proteinbestimmung

Zur Überprüfung der in den Bindungsstudien verwendeten Proteinmenge je Ansatz wurden von jeder Membranpräparation 50 μl entnommen und mit 750 μl H_2O und 200 μl Bio-Rad (protein assay, Hercules, CA, U.S.A.) gemischt. Nach 5 bis 30-minütiger Inkubationszeit wurde die Proteinmenge in einem Photometer (Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda Bio) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und mit einer Eichkurve mit 1 μg , 2 μg , 4 μg , 6 μg , 8 μg , 12 μg , 16 μg und 20 μg BSA-Protein verglichen.

2.2.7. Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR, beschrieben von Saiki et al. (Saiki et al. 1988), wurde mit der Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l), dem 10 x PCR + Mg-Puffer (Boehringer Mannheim) und dem Ultrapure dNTP Set (Pharmacia Biotech, Lot 7052035011) in 100 μ l Ansätzen durchgeführt.

Alle PCR-Reaktionen wurden in den Perkin Elmer-Geräten 2400 oder 9600 in einer 100 mM Tris/HCl-Lösung (pH 8.3) mit 15 mM MgCl₂ und 500 mM KCl durchgeführt. Die Reaktionstemperatur der Taq Polymerase blieb konstant bei 72°C, während die Annealing-Temperatur den Eigenschaften der Primer (Oligonukleotide zum Starten der PCR-Reaktionen) angepasst wurde. Beim Auswählen der Primer wurde darauf geachtet, dass sich an ihrem 3'-Ende möglichst mindestens zwei Nukleotide befanden, die zueinander drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (G, C). Die Annealingtemperatur berechnete sich nach folgender Formel:

$$[(\text{Anzahl der im Primer enthaltenden G und C}) \times 4 + (\text{Anzahl der im Primer enthaltenden T und A}) \times 2] - 5 = \text{Annealingtemperatur } [^{\circ}\text{C}]$$

1-20 μ l DNA (Matrize)
 10 μ l 10 x PCR-Puffer
 10 μ M dNTP mix
 1 μ M primer 1
 1 μ M primer 2
 1 μ l Taq DNA Polymerase [5 U/ μ l]

 ad 100 μ l Volumen (mit ddH₂O)

Zur Herstellung der Chimären α 1-16MA, α 1-61MA, α 6-16MA und α 6-61MA wurden pRK5-Plasmide verwendet, in denen die Gene für die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α 1 und α 6 mit den durch gezielte Mutation der DNA ohne Änderung der Proteinsequenz eingeführten Restriktionsschnittstellen für Mlu I und Aoc I einkloniert worden waren (siehe Abb. 4). In diesen Fällen wurde die jeweilige optimale Matrizen-Konzentration in einer Verdünnungsreihe mit 1, 10, 100 und 200 ng Plasmid bestimmt.

Die Amplifikation der zur Herstellung der Chimären notwendigen 102 bzw. 258 bp-langen Teilfragmente bzw. im Anschluss daran die Amplifikation des kompletten chimären Bereiches zwischen Mlu I und Aoc I erfolgte nach unterschiedlichen PCR-Protokollen, die unter 2.2.11 aufgelistet sind.

2.2.8. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem von Sanger et al. (Sanger et al. 1977) entwickelten Desoxyribonukleotid-Prinzip, das 1992 von Lee et al. (Lee et al. 1992) durch eine Markierung mit fluoreszierenden Didesoxynukleotiden am 3'-Ende modifiziert wurde. PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 4,6 und dem 2-fachen Volumen

EtOH_{abs} (RT) versetzt und die DNA durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm (Biofuge 13, Kendro Laboratory Produkts) von den PCR-Primern getrennt. Danach wurde das Präzipitat einmal mit 70% EtOH gewaschen und 3 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Entsprechend des Ausgangsproduktes wurden 250-500 ng Plasmid-DNA oder 60-360 ng PCR-Produkt eingesetzt. Es wurde das „PRISM DNA Sequencing Kit“ der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet.

x µl DNA
3,2 pmol Primer
8 µl Premix
x µl H₂O ad 20 µl

Die Sequenzierreaktion erfolgte in einer „Cycle Sequencing“-PCR im Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 oder im Perkin Elmer 470 (ABI 310) sequencer.

Folgendes Programm wurde verwendet:

96° C	5'	}	25 Zyklen
96° C	10''		
55° C	5''		
60° C	4'		
60° C	10'		

2.2.9. Rattenhirnpräparation

Erwachsene männliche Wistar-Ratten wurden für die Autoradiographien dekapitiert, die Gehirne vorsichtig vollständig entnommen und auf einer auf Trockeneis liegenden Stahl-Platte gefroren. Danach wurden die Gehirne in Parafilm und Alufolie eingewickelt und bis zum Schneiden im Kryostat bei -80° C aufbewahrt.

2.2.10. Autoradiographie

2.2.10.1. Beschichtung von Objektträgern

Zur Beschichtung der Objektträger wurden 6 g Gelatine in 600 ml warmem (60° C) Wasser unter Verwendung eines Magnetrührers gelöst, danach 0,3 g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben und ebenfalls gelöst. Zur Entfernung von Verschmutzungen und Partikeln wurde die Lösung durch ein Whatman Papier (Nr.7) filtriert. Die gesäuberten, in Stahlständer einsortierten und im Brutschrank vorgewärmten Objektträger wurden für mindestens 15 sec in die heiße Gelatinlösung getaucht und auf saugfähigem Papier kurz senkrecht aufgesetzt, um gegebenenfalls entstandene Luftblasen zu entfernen. Danach wurden die Objektträger in Ständern im Ofen bei 30-40° C für mindestens 3 h oder ü.N. getrocknet. Nicht direkt verwendete Objektträger wurden in luftdicht verschlossenen Plastikboxen bei -20° C aufbewahrt.

2.2.10.2. Durchführung

Vorgegangen wurde nach der modifizierten Methode von Olsen et al. (Olsen et al. 1990) und Edgar and Schwartz (Edgar and Schwartz 1990). Zu Beginn wurden 14-µm dicke, frontale Hirnschnitte mit einem Microm-Kryostat (HM 500 OM, Walldorf, Germany) angefertigt. Schnitte [Rattenhirn-Atlas (Paxinos 1986)] der Schnittebenen (in mm): 6,7, 3,2, 1,7, -0,8, -1,8, -3,3, -5,3, -6,3, -8,72 und -10,52 wurden auf die beschichteten (siehe 2.2.10.1) Objektträger platiert. Fanden die Schnitte erst zu einem späteren Zeitpunkt Verwendung, wurden sie in abgedichteten Plastikboxen bei -20° C eingefroren. Fortlaufende Schnitte wurden drei Mal für 10 min in eisgekühltem Puffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] versetzt mit 1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany) präinkubiert. Die Inkubation mit [^{35}S]TBPS (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) [200 cpm/ml, auf 6 nM mit unmarkiertem TBPS (DuPont de Nemours, NEN Division, Dreieich, Germany) eingestellt] fand bei RT für 90 min in einer feuchten Kammer statt. Als Puffer wurde 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) mit 120 mM NaCl verwendet, dem die auszutestenden Substanzen zugesetzt wurden. Die Konzentrationen der Agonisten waren in Vorversuchen so ermittelt worden, dass sie im Durchschnitt 50 % der [^{35}S]TBPS-Bindung aller Gehirnregionen inhibierten. Die Hirnschnitte wurden mit einem PAP-Pen vorsichtig umrundet, ohne die Schnitte zu berühren um ein Wegschwimmen des Inkubationspuffers zu verhindern. Die Inkubationsflüssigkeiten (800 µl) wurden vorsichtig auf die Schnitte pipettiert. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von 20 µM Picrotoxinin (Sigma) definiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte drei Mal für je 15 sec in eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen, kurz in destilliertes Wasser getaucht und mit einem kalten Fön getrocknet. Danach wurden die Schnitte für 7-10 Tage auf Hyperfilm Bio Max MR (Kodak) exponiert.

Die Intensitätsunterschiede der Hirnregionen auf dem Röntgenfilm wurden mit dem AIS Bildanalyse Gerät und der zugehörigen Software (Imaging Research, St. Catharines, Canada) quantifiziert. Die Lokalisation der verschiedenen Gehirnregionen auf dem Film wurden mit

Hilfe einer Thionin-Färbung der gleichen Schnitte durchgeführt. Die Intensität der Bindung für jede Hirnregion wurde aus 1-2 Messungen gemittelt. Plastik- ^{14}C -Standards (Amersham) wurden gleichzeitig mit den Schnitten auf dem Film exponiert und als Reverenz zu der Basalbindung, d.h. zur gemessenen radioaktiven Bindung der grauen Substanz (nCi/g), verwendet.

2.2.10.3. Statistik

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle, der durchschnittlichen Bindung aller Hirnregionen (um die unterschiedliche Aktivität der getesteten Substanzen in den verschiedenen Hirnregionen aufzuzeigen) und zwischen dem Durchschnitt zweier Messungen wurde unter Verwendung des Zwei-Stichproben *t*-Testes (Students *t*-Tests) mit Hilfe des InStat Programm (GraphPad Software, San Diego, CA) errechnet. Um die regionalen Unterschiede in der Aktivität der Agonisten zu vergleichen wurde mit dem gleichen statistischen Programm der Spearman Korrelationskoeffizient zwischen der prozentualen [^{35}S]TBPS-Bindung von GABA und der anderer Liganden ermittelt.

2.2.11. Konstruktion von Chimären

2.2.11.1. Austausch von Teilfragmenten zwischen den Restriktionsschnittstellen Aoc I und Mlu I

Als Ausgangsplasmide für die im Folgenden beschriebenen Chimären dienten die von Wieland et al. (Wieland et al. 1992) hergestellten $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Konstrukte. Sie fügten in die Wildtyp $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten des GABA_A -Rezeptors der Ratte zwei zusätzliche Restriktionsschnittstellen ein, die einen 117-Aminosäuren langen Genabschnitt flankieren. Die Mlu I-Schnittstelle ist 7 Aminosäuren 3' des Cystein-Loops gelegen, die Aoc I-Schnittstelle ist 4 Aminosäuren 3' der putativen TM2-Region lokalisiert. Die GABA_A -Rezeptor-Untereinheiten waren in pRK5-Vektoren inkloniert. Diese Plasmide werden im Folgenden als $\alpha 1\text{MA}$ bzw. $\alpha 6\text{MA}$ bezeichnet. Zum leichteren Verständnis der folgenden Vorgehensweisen ist in Abb. 3 die Aminosäureihenfolge von $\alpha 1\text{MA}$ bzw. $\alpha 6\text{MA}$ vergleichend dargestellt.

Die Konstruktion der ersten vier Chimären ist in Abb.4 schematisch dargestellt. Stellvertretend für $\alpha 1$ MA und $\alpha 6$ MA ist eine GABA_A-Rezeptor-Untereinheit mit den amino- und carboxyterminalen Enden (NH₂ und COOH), dem Cysteinloop und den vier Transmembranregionen dargestellt. Die Positionen für die Restriktionsschnittstellen für Mlu I und Aoc I ist angedeutet.



Abb. 3: Vergleich der Aminosäuresequenz der GABA_A-Rezeptor-Wildtypuntereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ der Ratte im Einbuchstaben-Code. 70 % der Aminosäuren in beiden Untereinheiten sind identisch, nicht-identische Aminosäuren sind rot dargestellt. Die vier Transmembranregionen (TM 1-4) sind dunkelgrün, der Cystein-Loop hellgrün unterlegt. Die Schnittstellen von Mlu I und Aoc I sind angezeigt. Bei der Konstruktion der meisten Chimären wurde der Genbereich zwischen den beiden Restriktionsschnittstellen mehrfach unterteilt und somit nur kurze Sequenzpassagen oder einzelne Aminosäuren ausgetauscht.

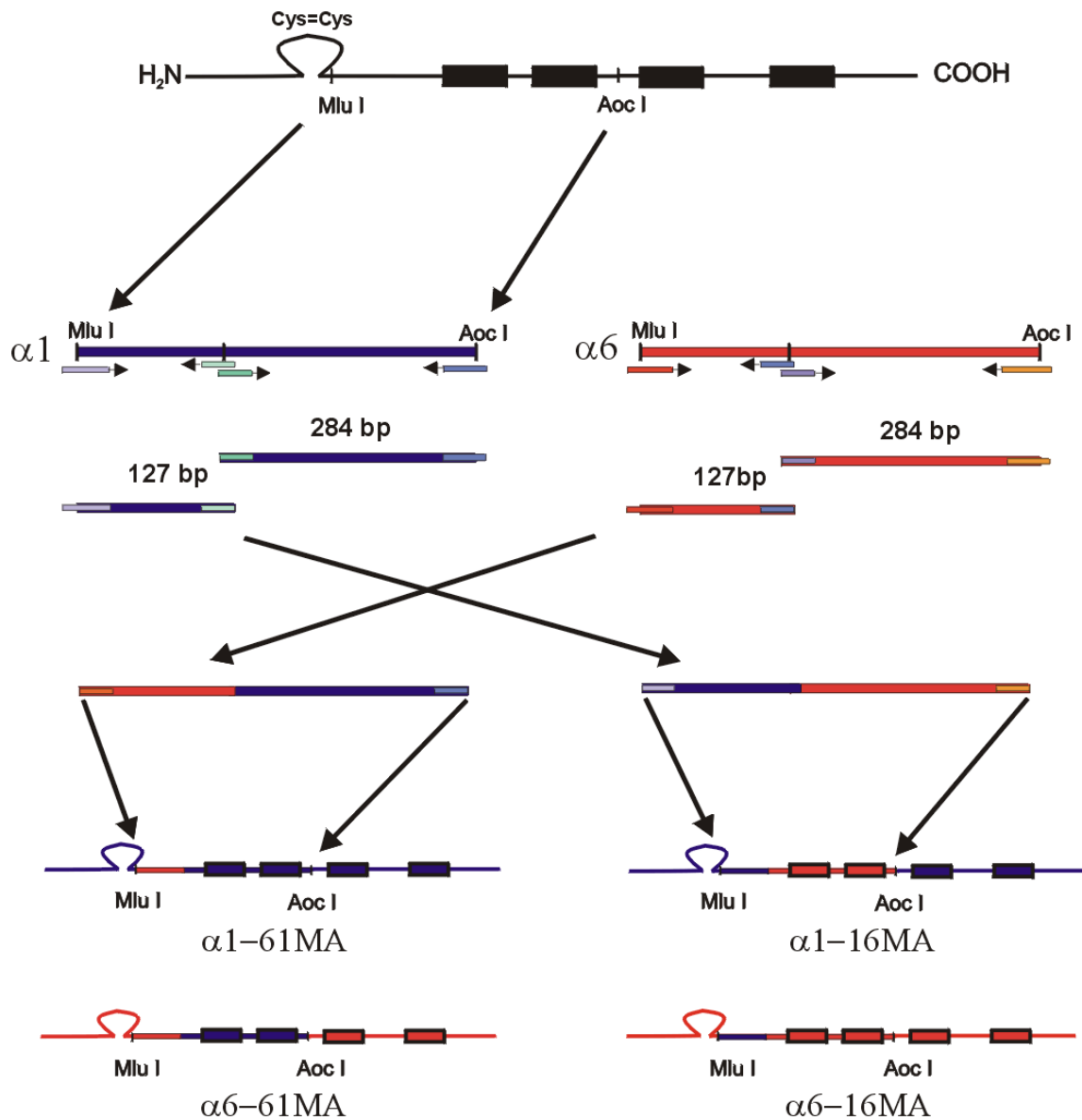


Abb. 4: Schematische Darstellung der Konstruktion der Chimären $\alpha 1$ -61MA, $\alpha 1$ -16MA, $\alpha 6$ -61MA und $\alpha 6$ -16. Blaue Balken stellen $\alpha 1$ -Sequenzen dar, rote Balken $\alpha 6$ -Sequenzen. Mit Hilfe der PCR wurden zwei ungleich lange Teilfragmente (das 127 bp- und das 284 bp-Fragment) amplifiziert, die den zwischen Mlu I und Aoc I gelegenen Sequenzabschnitt (354bp-Fragment) unterteilen. Jeweils eines dieser Fragmente wurde durch sein analoges Gegenstück ersetzt und die resultierenden Hybridfragmente in Mlu I- und Aoc I-restringierte Plasmide inkliniert, die aus Vektor und den an diesen beidseitig angrenzenden Sequenzabschnitten des $\alpha 1$ - bzw. $\alpha 6$ -Gens bestanden.

Die Herstellung jeder Chimäre erfolgte in drei Sets von PCRs. Die hierbei verwendeten Primer-Paare sind in Tab. 2 aufgelistet. Als 5' („upstream“)-Primer, die an Sequenzen über der Mlu I-Schnittstellen von $\alpha 1$ bzw. $\alpha 6$ hybridisieren, wurden (1) $\alpha 1$ Mlu I und (2) $\alpha 6$ Mlu I eingesetzt. Die entsprechenden 3' („downstream“)-Primer sind über den Aoc I-Schnittstellen lokalisiert und wurden als (3) $\alpha 1$ Aoc I und (4) $\alpha 6$ Aoc I bezeichnet. Des Weiteren wurden zwei „innere“ Primer-Paare verwendet (für $\alpha 1$ und $\alpha 6$ jeweils ein „upstream“-Primer und sein reverses, komplementäres Gegenstück), die zwischen den beiden Restriktionsschnittstellen liegen. Sie unterteilten den zwischen Mlu I und Aoc I gelegenen Genabschnitt in eine 5'-gelegenen ca. 100 bp-große Domäne und eine 3'-gelegenen ca. 260 bp-große Domäne. Der „innere“ Primer für $\alpha 1$ ((5) 5' $\alpha 1$ - $\alpha 6$) ist in der ersten Hälfte komplementär zu $\alpha 1$ und in der zweiten komplementär zu $\alpha 6$. Dementsprechend ist der „innere“ Primer für $\alpha 6$ ((6) 5' $\alpha 6$ - $\alpha 1$) in der ersten Hälfte komplementär zu $\alpha 6$ und in der zweiten komplementär zu $\alpha 1$. Ihre reversen, komplementären Gegenstücke wurden als (5a) 3' $\alpha 1$ - $\alpha 6$ bzw. (6a) 3' $\alpha 6$ - $\alpha 1$ bezeichnet.

Tab. 2
Primersequenzen zur Herstellung von Chimären

Nummer des Primers	Name des Primers	Primersequenz
(1)	$\alpha 1$ MluI	GGGAGCTACGCGTATCCAAAATCAGAAATT
(2)	$\alpha 6$ MluI	GGGAGCTACGCGTATACGAGAGCCGAAGT C
(3)	$\alpha 1$ AocI	CATAAGACACCTTAGGGAGGGAATGTC
(4)	$\alpha 6$ AocI	CATAGGCCACCTTAGGTAGAGAGTTCC
(5)	5' $\alpha 1$ - $\alpha 6$ *	<u>CCAGTATGACCTTCTTGGGCAAACAGTTTC</u> TAG
(6)	5' $\alpha 6$ - $\alpha 1$ *	CCAGTATGATTTGATT <u>GGGCAAACAGTTGA</u> <u>CTC</u>
(5a)	3' $\alpha 1$ - $\alpha 6$ *	CTAGAAACTGTTTGCCCA <u>AAGAAGGTCATAC</u> <u>TGG</u>
(6a)	3' $\alpha 6$ - $\alpha 1$ *	GAGTCAACTGTTTGCCCAATCAAATCATAC TGG

Auflistung der Primer, die für die Herstellung der Mlu I/Aoc I-Chimären verwendet wurden. Primernamen mit Sternchen (*) markieren mittige Primer. Unterstrichene Nukleotide der mittigen Primer sind mit der $\alpha 1$ -Sequenz identisch, nichtunterstrichene mit der $\alpha 6$ -Sequenz. Die mittigen Primer unterteilten die Mlu I/Aoc I-Fragmente der $\alpha 1$ - bzw $\alpha 6$ -Sequenz in zwei unterschiedlich große Teilfragmente von 42 bzw. 94 Aminosäuren.

In dem ersten Set PCRs wurde das $\alpha 1$ MA-Plasmid als Matrize zusammen mit den Primern (1) und (5a) bzw. (3) und (6) eingesetzt. Entsprechend wurden in einem zweiten PCR Set das

$\alpha 6$ MA-Plasmid als Matrize mit (2) und (6a) bzw. (4) und (5) zusammen eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Fragmente der Längen 127 bp und 284 bp wurden $\alpha 1$ -127bp- und $\alpha 1$ -284bp-Fragment bzw. $\alpha 6$ -127bp- und $\alpha 6$ -284bp-Fragment genannt. Die $\alpha 1$ -127bp- bzw. $\alpha 1$ -284bp- Fragmente enthielten 3' bzw. 5' eine 15 bp-lange Sequenz komplementär zu $\alpha 6$. Entsprechend enthielten die beiden $\alpha 6$ -Fragmente eine 15 bp-lange Sequenz komplementär zu $\alpha 1$. Diese 15 bp langen Bereiche waren so gewählt, dass sie nur geringe Unterschiede auf der Nucleinsäureebene zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 6$ aufwiesen und auf Proteinebene identisch waren. Zusätzlich waren alle DNA-Fragmente durch die Primer (1)-(4) 5' vor den Mlu I-Restriktionsschnittstellen und 3' nach den Aoc I-Restriktionsschnittstellen um einige Basenpaare verlängert.

Zur Amplifikation der vier Teilfragmente wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet:

5'	94° C	}	20 Zyklen
30''	94° C		
30''	55° C oder 60° C oder 65° C		
30''	72° C		
5'	72° C		

Verdünnte PCR-Produkte aus den vorangegangenen PCRs wurden in den folgenden PCRs als Matrizen verwendet. Die Fragmente $\alpha 1$ -127bp und $\alpha 6$ -284bp wurden zusammen mit den Primern (1) $\alpha 1$ Mlu I und (4) $\alpha 6$ Aoc I eingesetzt. Entsprechend wurden in einem zweiten Ansatz das $\alpha 1$ -284bp- und das $\alpha 6$ -127bp- Fragment mit den Primern (2) $\alpha 6$ MluI und (3) $\alpha 1$ AocI eingesetzt. Die jeweiligen Teilfragmente hybridisierten nach der Denaturierung aufgrund ihrer komplementären Überlappungen und stellten dadurch im ersten Amplifikationsschritt gegenseitig die Angriffspunkte für die Taq-Polymerase dar. Nach einer erneuten Denaturierung amplifizierten die außen liegenden Primer die chimären DNA-Fragmente.

Zur Amplifikation der hybriden Bereiche zwischen Mlu I und Aoc I aus jeweils zwei Teilfragmenten wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet:

5'	94° C	}	8 Zyklen
15''	94° C		
30''	45° C		
30''	72° C		
30''	94° C	}	20 Zyklen
30''	55° C		
30''	72° C		
5'	72° C		

Die entstandenen Hybridfragmente ($\alpha 16$ - und $\alpha 61$ -Fragment) wurden in die Vektoren mit angrenzenden $\alpha 1$ - bzw. $\alpha 6$ -Genbereichen ($\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Gerüstfragmente) (siehe unten) einkloniert. Die vier entstandenen Chimären, $\alpha 1$ -16MA, $\alpha 1$ -61MA, $\alpha 6$ -16MA und $\alpha 6$ -61MA

wurden durch Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer inserierten Fragmente überprüft.

Die ersten Aminosäuren der ausgetauschten Fragmente in $\alpha 1$ und $\alpha 6$ hatten für die Mlu I-Schnittstelle die Positionen 159 bzw. 158, für die Aoc I-Schnittstelle die Positionen 277 bzw. 276 und für die interne Überlappung die Positionen 192 bzw. 191.

Die als $\alpha 16$ -Fragment und $\alpha 61$ -Fragment bezeichneten Hybridfragmente wurden mit einer clonotech 100-Säule von Salz und ungebundenen Primern getrennt. Danach wurden sie mit Aoc I und Mlu I doppelverdaut. Nach Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel wurden die Banden der Länge 354 bp unter UV-Licht ausgeschnitten und mit einem kommerziellen Kit (Jet Sorb, Genomed Research, Triangle Park, USA) aus dem Gel isoliert. Die Ausgangs-Plasmide $\alpha 1MA$ und $\alpha 6MA$ wurden ebenfalls mit Aoc I und Mlu I doppelverdaut und in einem 0,6%igen Agarosegel die originalen 354bp-Fragmente vom restlichen Vektor abgetrennt. Die großen Vektorfragmente, $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Gerüstfragment genannt, wurden wie oben beschrieben isoliert.

Die vier neu entstandenen Chimären sind zusammen mit den Chimären $\alpha 1-6MA$ und $\alpha 6-1MA$ und allen im Folgenden konstruierten sequenziell veränderten α -Untereinheiten vergleichend in Abb. 17 (Anhang) dargestellt.

2.2.11.2. Austausch der Sequenzabschnitte zwischen den Restriktionsschnittstellen Bsu 36I und Hind III

Zwei weitere Chimären wurden mittels Restriktionsverdau und Umklonierungen hergestellt. Die Schnittstelle für Hind III ist Teil der MCS ("multiple cloning site", multiple Klonierungsstelle) des Ausgangsvektors und befindet sich 3' des Carboxyendes des α -Gens. Das Restriktionsenzym Aoc I wurde durch sein Isoschizomer Bsu 36I ersetzt. Die Entstehung der neuen Chimären ist schematisch in Abb. 5 gezeigt.

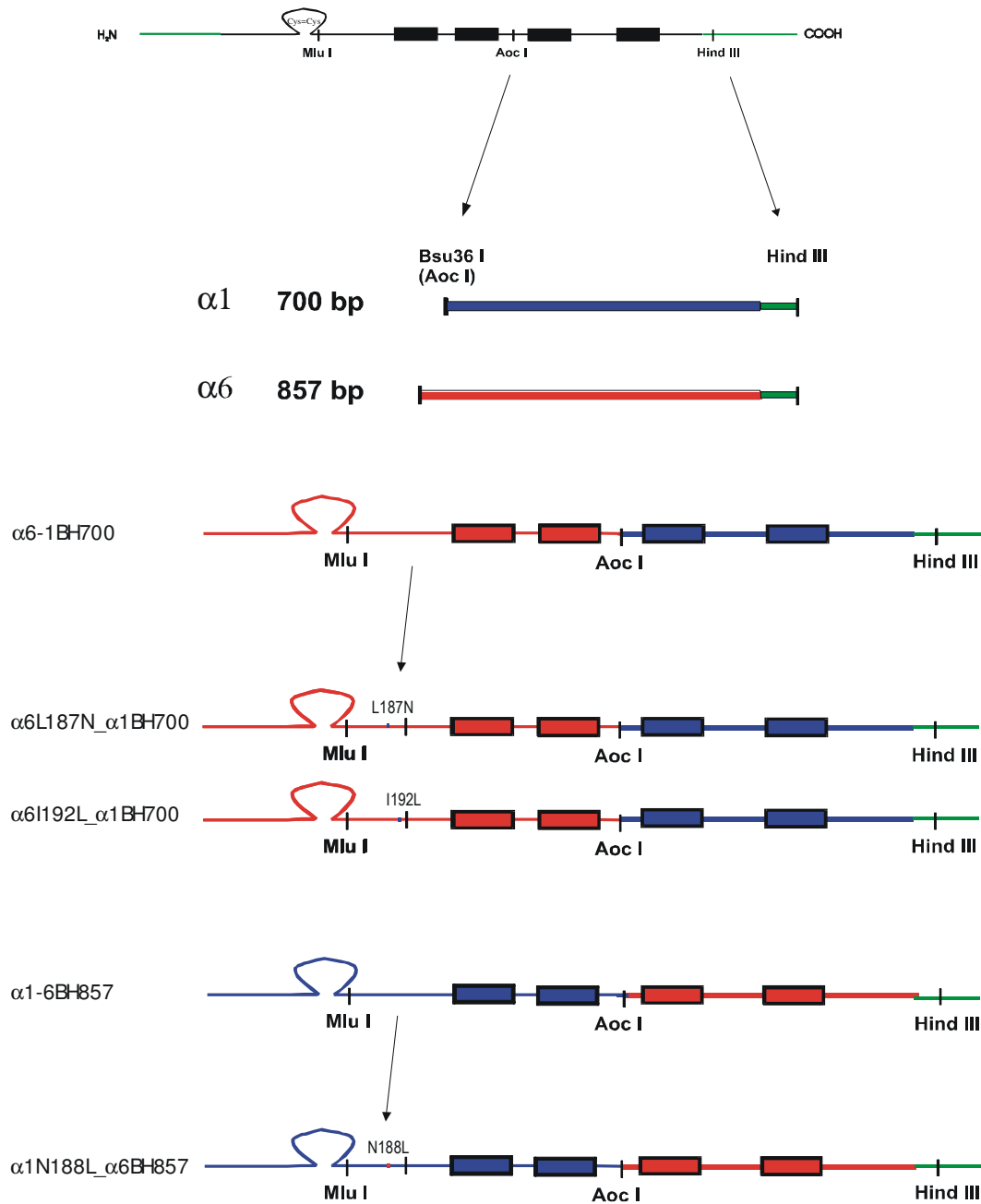


Abb. 5: Schematische Darstellung der Herstellung der Chimären $\alpha 1\alpha 6$ BH857 und $\alpha 6\alpha 1$ BH700. Blaue Balken stellen $\alpha 1$ -Sequenzen, rote Balken $\alpha 6$ -Sequenzen dar. Vektoranteile sind grün gezeichnet. Durch Restriktionsverdau mit den Enzymen Bsu 36I (Isoschizomer von Aoc I) und Hind III wurden aus der $\alpha 1$ -Untereinheit ein 700 bp-langes ($\alpha 1$ Bsu36IHindIII_700) und aus der $\alpha 6$ -Untereinheit ein 857 bp-langes Fragment ($\alpha 6$ Bsu36IHindIII_857) isoliert. Das $\alpha 1$ Bsu36IHindIII_700 wurde in das verbleibende $\alpha 6$ - und entsprechend das $\alpha 6$ Bsu36IHindIII_857 in das verbleibende $\alpha 1$ -Plasmidfragment inkloniert. Im Anschluss wurde durch gezielte Mutagenese (schwarze Pfeile) in die entstandene Chimäre $\alpha 1\alpha 6$ BH857 ein Aminosäureaustausch N \rightarrow L an der Position 188 eingeführt sowie in die Chimäre $\alpha 6\alpha 1$ BH700 separate Aminosäureaustausche an den Positionen 187 (L \rightarrow N) bzw. 192 (I \rightarrow L). Die daraus resultierenden Chimären wurden als $\alpha 1$ N188L_ $\alpha 6$ BH857, $\alpha 6$ L187N_ $\alpha 1$ BH700 und $\alpha 6$ I192L_ $\alpha 1$ BH700 bezeichnet.

Die Plasmide $\alpha 1$ MA und $\alpha 6$ MA wurden in getrennten Ansätzen mit Bsu 36I und Hind III verdaut. Aus dem $\alpha 1$ -Sequenz wurde ein 700 bp-Fragment ($\alpha 1$ Bsu36IHindIII_700) vom restlichen Plasmid ($\alpha 1$ MluBsu_pRK5\Bsu36IHindIII) isoliert, entsprechend aus der $\alpha 6$ -Sequenz ein 858 bp-Fragment ($\alpha 6$ Bsu36IHindIII_857) vom $\alpha 6$ MluBsu_pRK5\Bsu36IHindIII-Fragment getrennt. Die gereinigten Fragmente wurde über Kreuz in die jeweils anderen Vektorfragmente inkloniert. Die Chimären wurden als $\alpha 1$ -6B4H857 bzw. $\alpha 6$ -1BH700 bezeichnet und durch Sequenzierung überprüft. Im mittleren Teil der Abb. 5 sind die beiden Chimären im Vergleich zu den Wildtypen $\alpha 1$ und $\alpha 6$ zu sehen.

2.2.12. Konstruktion der Ein- und Mehrfachpunktmutanten

Alle weiteren Veränderungen in den α -Sequenzen waren ein bis vier Aminosäureaustausche zwischen der $\alpha 1$ - und der $\alpha 6$ -Untereinheit. Die Austausche wurden mittels gezielter Mutagenese nach Angaben und mit den Substanzen des „QuikChange Site-Direkted Mutagenesis Kit“ (STRATAGENE) eingeführt. Die verwendete, stabile Pfu-DNA-Polymerase ermöglichte die Amplifikation des vollständigen Plasmids. Ansatzpunkt der Polymerase sind Oligonukleotide eines Primer-Paars, das revers komplementär zueinander ist. Die für die verschiedenen Mutanten verwendeten 5'-Oligonukleotide der Primer-Paare sind in Tab. 3 aufgelistet. Für jedes Plasmid wurden drei Ansätze mit unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen durchgeführt.

10 μ l Plasmid (20 ng, 10 ng und 5 ng)
 5 μ l Reaktions-Puffer
 1 μ M dNTP mix
 10 μ M primer 1 (125 ng)
 10 μ M primer 2 (125 ng)
 14 μ l ddH₂O

 50 μ l Volumen + 1 μ l Pfu-DNA-Polymerase

Die Mutagenese wurde im Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet:

95° C	30'	} 18 Zyklen
95° C	30''	
55° C	1'	
68° C	10'	

Nach der PCR enthielten die Reaktionsansätze ein Gemisch aus parentalen Plasmiden, Hybrid-Plasmiden (ein Strang parental und eine Strang mutiert) und Plasmide, bei denen beide Stränge die eingeführten Mutationen trugen. Mittels Dpn I-Verdau wurden die neuen Stränge von den parentalen und hybriden Plasmiden unterschieden; Dpn I erkennt nur methylierte Schnittsequenzen und kann so die parentalen und hybriden Stränge restringieren,

während die nicht-methylierten, neuen Stränge nicht verdaut werden. Nach Abschätzung der Menge auf einem 0,8 %igen Agarosegel wurde jeweils 2 µl der Ansätze mit 65 µl Epicurian coli XL1 Blue superkompetente Zellen für die Transformation verwendet, die Ansätze mit 280 µl SOC-Medium 1 h bei 37° C geschüttelt, auf LB+Amp-Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37° C wachsen gelassen. Jeweils sechs Kolonien eines Plasmids wurden in 3 ml TBB+Amp-Kulturen überimpft, bei 37° C wachsen gelassen und am nächsten Tag Miniprep-Plasmidaufreinigungen durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde in 100 µl H₂O aufgenommen. Zusätzlich zu den sequenzverändernden Nukleotidaustauschen enthielten die Primer in den meisten Fällen zur schnellen Überprüfung eine "silent mutation". Hierbei entsteht ohne Veränderung der Proteinsequenz durch Austausch eines Nukleotides eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle bzw. eine Erkennungssequenz wird eliminiert wie im Falle des Mlu I (siehe Tab. 3). "Silent mutations" ermöglichen eine schnelle Identifizierung mutierter Plasmide aufgrund unterschiedlicher Bandenmuster in einem Restriktionsverdau. Alle Mutanten wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Tab. 3
Primersequenzen zur Herstellung von Mehrfach- und Einfachpunktmutanten

Nr. des Primers	Name des Primers	AA-Austausche	Primersequenz
(7)	5a1LQYDLI	2	GGGTCACGTTTA <u>CT</u> CCAGTATGACC TT <u>A</u> TTGGGCAAAC
(9)	5a1PKS_Acc I	4	GGGAGCTACGCGTAT <u>C</u> CAA <u>AA</u> TCAG AA <u>A</u> TTGTCTAC <u>G</u> GAGTGG
(11)	5a1VSS_BsaW I	1	CCTTCTTGGGCAAACAGTT <u>TC</u> CT <u>CG</u> GAATTGTTCAAGTCC
(13)	5a6NQY_Msc I	2	CTTCAAGCCTC <u>AA</u> CCAGTATGATTT G <u>CT</u> TGG <u>C</u> CAAACAG
(15)	5a6VDS_Hind II	1	GATTGGGCAAACAGTT <u>GAC</u> AGTGAG ACTATTAATCGAACACAGG
(17)	5Mlu Ia6TRA	4	GGGAGCTA <u>T</u> GCGTAT <u>A</u> CGA <u>GAG</u> CCG AA <u>G</u> TCATATATACATGG
(19)	5a1_LQYDLL_Msc I	1	GGGTCACGTTTA <u>CT</u> CCAGTATGACC TTCTTGG <u>C</u> CAAAC
(23)	5a1_NQYDLI_Msc I	1	GGGTCACGTTTAAACCAGTATGACC TT <u>A</u> TTGG <u>C</u> CAAAC
(21)	5a6_NQYDLI_Msc I	1	CTTCAAGCCTC <u>AA</u> CCAGTATGATTT GATTGG <u>C</u> CAAACAG
(25)	5a6_LQYDLL_Msc I	1	CTTCAAGCCTCCTCCAGTATGATTTG <u>C</u> TTGG <u>C</u> CAAACAG
(27)	5a6_170K_T	1	CATATATACATGG <u>AA</u> AGGACCG CTTTATTCAGTAGAGGTCCC
(29)	5a6_175Y_R	1	AGGACCGCTT <u>CG</u> TTCAGTAGAGGTC CCAGAAGAATCTCAAGC
(31)	5a6_178-180EVP-VVA	2	CCGCTTTATTCAGTAG <u>TGGT</u> <u>CG</u> CAG AAGAATCTTCAAGCCTCC
(33)	5a6_182-185ESSS-DGSR	3	CAGTAGAGGTCCCAGAAGA <u>CGG</u> TTC AAG <u>G</u> CTCCTCCAGTATG
(35)	5a6_168-172TWKKG_EWKRE	3	GCGAAATCATATAT <u>GA</u> ATGGAAAAG AG <u>AG</u> CCGCTTTATTCAGTAGAGG

Sequenzverändernde Basen innerhalb der Primersequenz sind rot markiert und fett unterstrichen, „silent mutation“-
 einführende Basen sind grün dargestellt und einfach unterstrichen. Die Enzymnamen der durch "silent mutation"
 entstandenen oder eliminierten (Mlu I) Restriktionsschnittstellen sind in der Bezeichnung des Primers fett gedruckt.

2.2.12.1. Konstruktion von Punktmutanten

Um die in den Chimären $\alpha 1$ -61MA und $\alpha 6$ -16MA ausgetauschten 127bp-Fragmente (siehe 2.2.11.1) genauer zu untersuchen, wurden die sich unterscheidenden Aminosäuren jeweils auf drei (Mehrfach-)Punktmutanten verteilt. Verfahren wurde nach der in 2.2.12 beschriebenen Methode. Ausgangsplasmide für die Mutagenese-PCR waren $\alpha 1$ MA bzw. $\alpha 6$ MA. Zu $\alpha 1$ MA wurde jeweils einer der folgenden 5'-Primer zusammen mit seinem revers komplementären 3'-Primer pipettiert, (7) 5a1LQY, (9) 5a1PKS-Acc I oder (11) 5a1VSS-BsaW I, entsprechend zu $\alpha 6$ MA jeweils einer der 5'-Primer (13) 5a6NQY-Msc I, (15) 5a6TVS-Hind II oder (17) 5\Mlu Ia6TRA. Die mutierten α -Untereinheiten wurden entsprechend der Positionen der ausgetauschten Aminosäuren als $\alpha 1$ N188L,L193I, $\alpha 1$ _162-166PKSEI, $\alpha 1$ D198S, $\alpha 6$ L187N,I192L, $\alpha 6$ S197D und $\alpha 6$ _161-165TRAEV bezeichnet. Mit der Herstellung dieser sechs Ein- bzw. Mehrfachpunktmutanten wurden alle unterschiedlichen Aminosäuren in den Sequenzbereichen 162-166 und 188-193 in $\alpha 1$ bzw. 161-165 und 187-192 in $\alpha 6$ erfasst.

Zur genaueren Untersuchung der Mutante $\alpha 1$ N188L,L193I wurden ihre beiden Aminosäurenaustausche getrennt untersucht. Zusätzlich zu diesen beiden Punktmutanten wurden deren reverse Gegenstücke in der $\alpha 6$ -Untereinheit hergestellt. Alle diese Mutagenese-Primer enthielten eine „silent mutation“ für das Restriktionsenzym Msc I. Die Primer entsprachen der Sequenz um die Mlu I-Restriktionsschnittstelle. Die Matrize $\alpha 1$ MA wurden in die Mutagenese-PCR mit dem 5'-Primer (19) $\alpha 1$ _LQYDLL_Msc I und seinem revers komplementären Gegenstück bzw. (23) 5a1_NQYDLI_Msc I und seinem revers komplementären Gegenstück eingesetzt. Entsprechend wurde mit $\alpha 6$ MA und den 5'-Primern (21) 5a6_NQYDLI_Msc I bzw. (25) 5a6_LQYDLL_Msc I verfahren. Die Chimären wurden $\alpha 1$ N188L, $\alpha 6$ L187N, $\alpha 1$ L193I und $\alpha 6$ I192L genannt.

Zur Abdeckung der Aminosäurenunterschiede im Sequenzbereich 168-185 der $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten wurden fünf weitere Mutanten hergestellt. Als Matrize wurde das Plasmid $\alpha 6$ MA verwendet. Jeweils einer der nachfolgenden 5'-Primer wurde zusammen mit seinem revers komplementären 3'-Primer in der Mutagenese-PCR verwendet: (27) 5a6_170K_T, (29) 5a6_175Y_R, (31) 5a6_178-180EVP-VVA, (33) 5a6_182-185ESSS-DGSR oder (35) 5a6_168-172TWKKG_EWKRE. Die Chimären wurden entsprechend $\alpha 6$ K170T, $\alpha 6$ Y175R, $\alpha 6$ _178-180VVA, $\alpha 6$ _182-185DGSR bzw. $\alpha 6$ _168-172EWKRE genannt.

Wie in Abb. 5 (2.2.11.2) schematisch gezeigt, wurden ausgehend von den Chimären $\alpha 1$ -6BH857 bzw. $\alpha 6$ -1BH700 mittels gezielter Mutagenese (siehe 2.2.12) drei weitere Chimären mit zusätzlichen Punktmutationen hergestellt. In die Mutagenese-PCR wurde das $\alpha 1$ -6BH857-enthaltene Plasmid mit dem 5'-Primer (19) $\alpha 1$ _LQYDLL_Msc I plus entsprechendem 3'-Primer eingesetzt, die an der Position 188 das ursprüngliche Asparagin gegen ein Leucin ersetzten. Entsprechend wurde bei dem $\alpha 6$ -1BH700-enthaltene Plasmid mit den Primern (25) 5a6_LQYDLL_Msc I bzw. (21) 5a6_NQYDLI_Msc I mutiert, dabei wurde an den Positionen 187 ein Leucin durch ein Asparagin bzw. an der Position 192 ein Isoleucin durch ein Leucin ersetzt. Die mutierten α -Untereinheiten wurden als $\alpha 1$ N188L_ $\alpha 6$ BH858, $\alpha 6$ L187N_ $\alpha 1$ BH700 und $\alpha 6$ I192L_ $\alpha 1$ BH700 bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Pharmakologie von GABA_A-Rezeptoren

Im Rahmen dieses Teils der Arbeit wurde die Pharmakologie der GABA_A-Rezeptoren anhand der Verteilung von sieben GABA-Mimetika im Rattenhirn mit einer autoradiographischen Methode untersucht, um im Vergleich Rückschlüsse auf die Beteiligung unterschiedlicher GABA_A-Rezeptorsubtypen zu ziehen. In weiterführenden Experimenten wurde die Substanz 5-(4-Piperidyl)isoxazol-3-ol (4-PIOL) (Kristiansen et al. 1991; Krogsgaard Larsen et al. 1994), deren Bindungsmuster nicht mit dem von GABA in allen Hirnregionen übereinstimmte, an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren überprüft, um die unterschiedliche Wirkung dieser Substanz auf bestimmte Rezeptorsubtypen genauer zu untersuchen.

3.1.1. Autoradiographien von sechs GABA-Agonisten

In Vorversuchen wurden die Konzentrationen von GABA, den GABA-Agonisten Muscimol, Thiomuscimol (Nielsen et al. 1995), β -Alanin (Wu et al. 1993), Taurin (Bureau and Olsen 1991; Quinn and Miller 1992; Quinn and Harris 1995) und die in der Literatur als partielle Agonisten beschriebenen THIP und P4S (Falch et al. 1985), (Krogsgaard Larsen et al. 1994) ermittelt, die ungefähr eine halbmaximale Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung an nativen GABA_A-Rezeptoren im gesamten Rattenhirn bewirken. Dabei zeigte sich, dass 3 μ M GABA, 1 μ M Muscimol, 10 μ M Thiomuscimol, 1 mM β -Alanin, 5 mM, Taurin, 30 μ M THIP und 10 μ M P4S die [³⁵S]TBPS-Bindung entsprechend reduzierten.

In Tab. 4 (für GABA, Muscimol, Thiomuscimol, β -Alanin, Taurin und THIP) und Tab. 5 (für P4S) sind die Effekte der GABA-Agonisten auf die [³⁵S]TBPS-Bindung in den verschiedenen Hirnarealen zusammengestellt, die mit den in den Vorversuchen ermittelten Substanzkonzentrationen erzielt wurden.

Tab. 4: Gehirntareal-spezifische Effekte verschiedener GABA_A-Antagonisten auf picrotoxininsensitive [³⁵S]TBPS-Bindung in Rattenhirnschnitten

	Basal	GABA	Muscimol	Thiomusc.	THIP	Taurin	β-Alanin
<i>Areale des Riechhirns</i>							
Bulbus olfactorius, externe plexiforme Schicht	165 ± 60	<u>16 ± 7</u> **	<u>14 ± 2</u> ***	<u>11 ± 2</u> ***	<u>21 ± 4</u> ***	<u>11 ± 3</u> ***	<u>13 ± 4</u> **
Inseln des Calleja	331 ± 88*	49 ± 13	32 ± 8	27 ± 3	78 ± 20	48 ± 12	33 ± 8
Tuberculum olfactorium	<u>55 ± 23</u> **	39 ± 10	46 ± 10	43 ± 11	55 ± 8	56 ± 25	44 ± 11
<i>Cerebraler Cortex</i>							
Parietaler Cortex	182 ± 35	47 ± 7	30 ± 6	23 ± 5	68 ± 13	54 ± 8	33 ± 9
<i>Limbisches System</i>							
Anteriorer cingulärer Cortex	138 ± 42	31 ± 13	<u>16 ± 8</u> *	<u>12 ± 1</u> ***	<u>23 ± 5</u> ***	<u>18 ± 8</u> **	<u>16 ± 4</u> **
Medialer prefrontaler Cortex	105 ± 32	<u>21 ± 3</u> ***	<u>14 ± 3</u> **	<u>15 ± 1</u> ***	25 ± 3	<u>16 ± 3</u> ***	21 ± 6
Subiculum	137 ± 28	52 ± 6	34 ± 4	31 ± 8	98 ± 26	54 ± 14	47 ± 11
Hippocampus	<u>82 ± 21</u> *	45 ± 15	32 ± 1	24 ± 5	<u>48 ± 6</u> *	43 ± 7	36 ± 8
Diagonales Band von Broca	392 ± 114*	46 ± 4	<u>24 ± 3</u> **	<u>24 ± 3</u> *	96 ± 3***	47 ± 6	34 ± 4
Amygdala	100 ± 25	43 ± 9	31 ± 6	<u>20 ± 4</u> *	<u>40 ± 5</u> **	<u>38 ± 3</u> **	<u>27 ± 4</u> *
Piriformer Cortex	115 ± 36	<u>37 ± 4</u> *	29 ± 4	33 ± 4	64 ± 4	<u>29 ± 7</u> **	39 ± 2*

Fortsetzung Tabelle ...

Basalganglien

Caudatus/Putamen	<u>81 ± 12</u> **	52 ± 1**	51 ± 7*	43 ± 5*	81 ± 6*	78 ± 10*	58 ± 3***
Nucleus accumbens	<u>61 ± 21</u> **	<u>33 ± 1</u> ***	45 ± 17	29 ± 3	<u>40 ± 8</u> **	31 ± 17	32 ± 6
Globus pallidus	181 ± 24*	71 ± 2***	48 ± 5**	50 ± 5**	112 ± 12**	78 ± 10*	51 ± 4**

Thalamus

Thalamus	114 ± 15	43 ± 8	37 ± 4	33 ± 5	<u>52 ± 6</u> *	47 ± 5	31 ± 3
Corpus geniculatum mediale	150 ± 26	61 ± 5**	29 ± 3	26 ± 5	71 ± 32	68 ± 7*	32 ± 8

Hypothalamus

Nucleus praeopticus medialis	<u>61 ± 19</u> **	40 ± 8	25 ± 12	31 ± 15	<u>45 ± 5</u> **	51 ± 21	<u>28 ± 1</u> **
Nucleus paraventricularis hypothalami	<u>58 ± 23</u> **	33 ± 11	34 ± 14	31 ± 7	49 ± 9	<u>35 ± 8</u> *	37 ± 7
Nuclei medialis hypothalami	<u>73 ± 19</u> **	54 ± 13	39 ± 12	27 ± 13	<u>46 ± 8</u> *	62 ± 22	22 ± 8

Mittelhirn

Colliculus superior, striatum griseum superficiale	168 ± 35	58 ± 9	43 ± 10	27 ± 4	93 ± 20*	81 ± 10*	39 ± 12
Zentrales Grau	133 ± 26	55 ± 9	36 ± 5	28 ± 4	46 ± 12	57 ± 22	27 ± 5
Substantia nigra reticulata	208 ± 54	56 ± 9	31 ± 7	33 ± 6	89 ± 17	79 ± 2***	35 ± 4
Nucleus ruber	128 ± 30	76 ± 12*	54 ± 8*	53 ± 15*	119 ± 23*	160 ± 8***	64 ± 26
Colliculus inferior	240 ± 69	56 ± 5*	31 ± 5	32 ± 3	104 ± 13**	54 ± 6	48 ± 4**

Fortsetzung Tabelle ...

Cerebellum

Cortex cerebelli, Granulazellschicht	130 ± 29	<u>27 ± 6**</u>	29 ± 2	30 ± 4	<u>25 ± 5***</u>	<u>40 ± 3**</u>	<u>16 ± 2***</u>
Cortex cerebelli, Molekularzellschicht	<u>83 ± 29*</u>	<u>18 ± 1***</u>	<u>27 ± 1**</u>	27 ± 1	<u>31 ± 14*</u>	<u>22 ± 2***</u>	<u>21 ± 7*</u>
Durchschnitt	141	45	33	29	62	52	34

Verwendete Agonist-Konzentrationen: (in µM) GABA, 3; Muscimol, 1; Thiomuscimol, 10; THIP, 30, and (in mM) Taurin, 5 ; β-Alanin, 1. Die Daten (Durchschnitt ± SD, n=4-5) der Basalbindung sind dargestellt in nCi/g Nassgewicht oder als Prozent der Basalbindung aller Agonisten.

Der "Student's *t*-test" wurde verwendet, um die Signifikanzen zwischen den Messwerten zum entsprechenden Durchschnitt zu ermitteln:

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Werte, die signifikant unter den Durchschnittswerten liegen, sind unterstrichen.

Tab. 5: Effekte von P4S und 4-PIOL auf die regionale Bindung von [³⁵S]TBPS an GABA_A-Rezeptoren

	Basal	GABA, 2	GABA, 5	P4S, 10	G2 + P4S	G5 + P4S	4-PIOL, 300	G2 + 4-PIOL
<i>Areale des Riechhirns</i>								
Bulbus olfactorius, ext. plexiforme Schicht	178 ± 99	<u>23 ± 7</u> **	<u>11 ± 4</u> **	<u>16 ± 4</u> ***	<u>8 ± 3</u> **	<u>5 ± 2</u> **	<u>45 ± 20</u> *	<u>39 ± 16</u> **
Inseln des Calleja	211 ± 43*	64 ± 4	25 ± 4	68 ± 3**	25 ± 4	14 ± 3	105 ± 8*	96 ± 4
Tuberculum olfactorium	<u>67 ± 14</u> **	56 ± 8	19 ± 9	<u>37 ± 3</u> **	<u>16 ± 3</u> *	10 ± 3	77 ± 20	79 ± 48
<i>Cerebraler Cortex</i>								
Parietaler Cortex	138 ± 20	76 ± 2**	26 ± 4	59 ± 3	24 ± 2	15 ± 2	127 ± 22*	113 ± 37
<i>Limbisches System</i>								
Anteriorer cingulärer Cortex	121 ± 24	57 ± 7	<u>14 ± 4</u> **	<u>34 ± 8</u> *	<u>10 ± 5</u> *	<u>6 ± 1</u> ***	<u>44 ± 5</u> **	<u>36 ± 2</u> ***
Medialer prefrontaler Cortex	130 ± 13	<u>40 ± 3</u> ***	<u>13 ± 3</u> **	<u>22 ± 6</u> **	<u>10 ± 5</u> *	<u>7 ± 3</u> **	<u>45 ± 4</u> ***	<u>39 ± 10</u> **
Subiculum	121 ± 5	68 ± 17	35 ± 7	62 ± 3*	28 ± 1*	15 ± 2	139 ± 35	167 ± 42*
Hippocampus	122 ± 20	<u>49 ± 6</u> *	21 ± 6	<u>40 ± 4</u> **	<u>20 ± 1</u> *	13 ± 3	<u>75 ± 4</u> **	79 ± 8
Diagonales Band von Broca	251 ± 16***	70 ± 1***	28 ± 6	70 ± 6*	29 ± 5	17 ± 3	103 ± 8	102 ± 5
Amygdala	133 ± 17	48 ± 11	28 ± 5	<u>42 ± 1</u> ***	<u>18 ± 1</u> **	10 ± 3	<u>62 ± 6</u> **	<u>64 ± 4</u> **

Fortsetzung Tabelle ...

Piriformer Cortex	<u>115 ± 5*</u>	59 ± 7	21 ± 4	53 ± 10	18 ± 4	<u>11 ± 1**</u>	81 ± 13	82 ± 7
<i>Basalganglien</i>								
Caudatus/Putamen	<u>77 ± 2***</u>	80 ± 4**	29 ± 6	63 ± 4*	28 ± 6	17 ± 2	89 ± 4	88 ± 8
Nucleus accumbens	<u>87 ± 9**</u>	57 ± 7	<u>18 ± 3**</u>	<u>35 ± 4**</u>	<u>10 ± 4*</u>	<u>8 ± 2**</u>	<u>47 ± 9**</u>	<u>47 ± 11**</u>
Globus pallidus	131 ± 6	103 ± 11**	42 ± 9*	90 ± 11**	45 ± 10*	27 ± 6*	134 ± 11**	130 ± 9**
<i>Thalamus</i>								
Thalamus	122 ± 15	61 ± 4	22 ± 5	53 ± 2	27 ± 4	17 ± 4	129 ± 10**	120 ± 14*
Corpus geniculatum mediale	115 ± 12	70 ± 15	42 ± 6*	72 ± 6**	35 ± 2**	21 ± 4*	120 ± 10*	122 ± 22
<i>Hypothalamus</i>								
Nucleus preopticus medialis	<u>90 ± 4***</u>	71 ± 12	24 ± 4	40 ± 11	<u>12 ± 2**</u>	<u>7 ± 2**</u>	<u>59 ± 8**</u>	<u>56 ± 16*</u>
Nucleus paraventricularis hypothalami	<u>68 ± 4***</u>	<u>56 ± 4*</u>	<u>16 ± 3**</u>	<u>33 ± 3***</u>	<u>15 ± 1***</u>	<u>9 ± 1**</u>	74 ± 23	78 ± 28
Nuclei medialis hypothalami	93 ± 26	65 ± 23	37 ± 5*	48 ± 11	15 ± 10	13 ± 6	<u>56 ± 14*</u>	<u>64 ± 4**</u>
<i>Mittelhirn</i>								
Coll. superior, st. griseum superficiale	132 ± 11	77 ± 16	40 ± 3**	75 ± 8*	38 ± 2***	21 ± 3*	121 ± 21	128 ± 28
Zentrales Grau	124 ± 13	76 ± 17	35 ± 7	72 ± 11*	33 ± 6*	17 ± 3	76 ± 19	85 ± 33
Substantia nigra reticulata	159 ± 27	69 ± 11	37 ± 6	72 ± 11*	36 ± 4**	21 ± 3*	118 ± 14*	121 ± 17*
Nucleus ruber	<u>102 ± 17*</u>	92 ± 12*	49 ± 14	101 ± 16**	54 ± 5**	29 ± 7*	150 ± 10**	167 ± 39*

Fortsetzung Tabelle ...

Colliculus inferior	150 ± 21	79 ± 15	34 ± 9	77 ± 7**	36 ± 6*	19 ± 4	134 ± 18*	140 ± 16**
<i>Cerebellum</i>								
Cortex cerebelli, Granulazellschicht	209 ± 28*	<u>42 ± 9*</u>	20 ± 9	<u>37 ± 6*</u>	<u>10 ± 1***</u>	10 ± 3	119 ± 27	<u>54 ± 10**</u>
Cortex cerebelli, Molekularzellschicht	<u>110 ± 3**</u>	<u>39 ± 6**</u>	<u>16 ± 5*</u>	<u>28 ± 4**</u>	<u>7 ± 4**</u>	<u>5 ± 1***</u>	77 ± 26	<u>50 ± 13**</u>
Durchschnitt	129	63	27	54	23	14	92	90

Verabreichte Konzentratione der Substanzen in μM . Die Daten (Durchschnitt \pm SD, n=4-5) für die Spalte der Basalbindung ist in nCi/g Nassgewicht dargestellt, alle anderen Spalten stellen Prozenste der Basalbindungen dar. Der "Student's *t*-test" wurde verwendet, um die Signifikanzen zwischen den Messwerten zum entsprechenden Durchschnitt zu ermitteln: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Werte, die signifikant unter den Durchschnittswerten liegen, sind unterstrichen.

Alle 26 überprüften Hirnareale waren sensitiv gegenüber den Agonisten. Im Ausmaß der allosterischen Bindungsreduktion von [³⁵S]TBPS zwischen den verschiedenen Hirnregionen konnte zwischen einerseits Muscimol, Thiomuscimol, Taurin und P4S und andererseits THIP und β -Alanin eine Varianz festgestellt werden. Dabei reduzierten Muscimol, Thiomuscimol, Taurin und P4S die [³⁵S]TBPS-Bindung im gleichen Ausmaß und in allen Hirnarealen vergleichbar mit 3 μ M GABA.

In den Arbeiten von Braestrup (Braestrup et al. 1979) und Karobath (Karobath and Lippitsch 1979) wurde P4S als partieller Agonist oder Antagonist beschrieben. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen korrelierte die Höhe der Wirkung von P4S in den meisten Hirnarealen mit der Wirkung von GABA ($r > 0,8$; $P < 0,0001$). Zudem unterstützte es konzentrationsabhängig die GABA-induzierte Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung und wirkte in keiner Gehirnregion antagonistisch zur Wirkung von GABA (Tab. 5), wie es für einen (partiellen) Agonisten zu erwarten wäre.

Im Gegensatz dazu zeigten THIP und β -Alanin eine stärkere Variabilität zwischen den Hirnregionen. In einigen Arealen mit hoher Konzentration der $\alpha 1$ -Untereinheit (z.B. Globus pallidus, Substantia nigra, Nucleus ruber und Colliculus inferior) bewirkte THIP keine oder nur eine sehr geringe Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung, während es im Bulbus olfactorius und im Cerebellum eine überdurchschnittlich hohe Reduktion hervorrief. β -Alanin wies im N. geniculatus mediale, N. opticus mediale, N. hypothalamus mediale und im zentralen Grau eine deutlich stärkere Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindungen als GABA auf.

Trotz der Ausnahmen stimmten die Effekte aller sechs GABA-Agonisten in hohem Maße mit denen von GABA überein (Spearman Korrelations-Koeffizient $r > 0,48$; $P < 0,04$) und könnten folglich an den gleichen Sequenzbereichen des GABA_A-Rezeptors angreifen.

3.1.2. Autoradiographie mit dem partiellen Agonist 4-PIOL

4-PIOL wurde bis zu einer maximalen Konzentration von 300 μ M eingesetzt, dabei wurde die [³⁵S]TBPS-Bindung um ca. 10 % reduziert (siehe Tab. 5). Um mögliche Unterschiede dieses mutmaßlichen partiellen Agonisten in den [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien sensitiver detektieren zu können, wurden zunächst in parallelen Ansätzen 2 μ M und 5 μ M GABA ausgetestet. Es stellte sich jedoch heraus, dass weder 2 μ M noch 5 μ M GABA in den einzelnen Hirnregionen wesentliche Unterschiede zu 3 μ M GABA hervorriefen (siehe Tab. 4 und Tab. 5).

Die alleinige Wirkung von 4-PIOL sowie die gemeinsame mit GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung in verschiedenen Hirnarealen kann Abb. 6 entnommen werden. Sie ist für einzelne Rattenhirnregionen in Tab. 5 zusammengefasst. 4-PIOL alleine reduziert die [³⁵S]TBPS-Bindung in wenigen Hirnarealen, wie z.B. im Bulbus olfactorius, in den Inseln von Calleja und im medialen prefrontalen Cortex. In diesen Hirnbereichen kann es jedoch die Wirkung von 2 μ M GABA nicht verstärken. 4-PIOL allein bewirkte keine Bindungsreduktion in den untersuchten Strukturen des Thalamus, des cerebralen Cortex und in wenigen Strukturen des Diencephalons. Wurde 4-PIOL dagegen gleichzeitig mit GABA verabreicht, hob 4-PIOL in diesen Regionen die reduzierende Wirkung von GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung teilweise wieder auf.

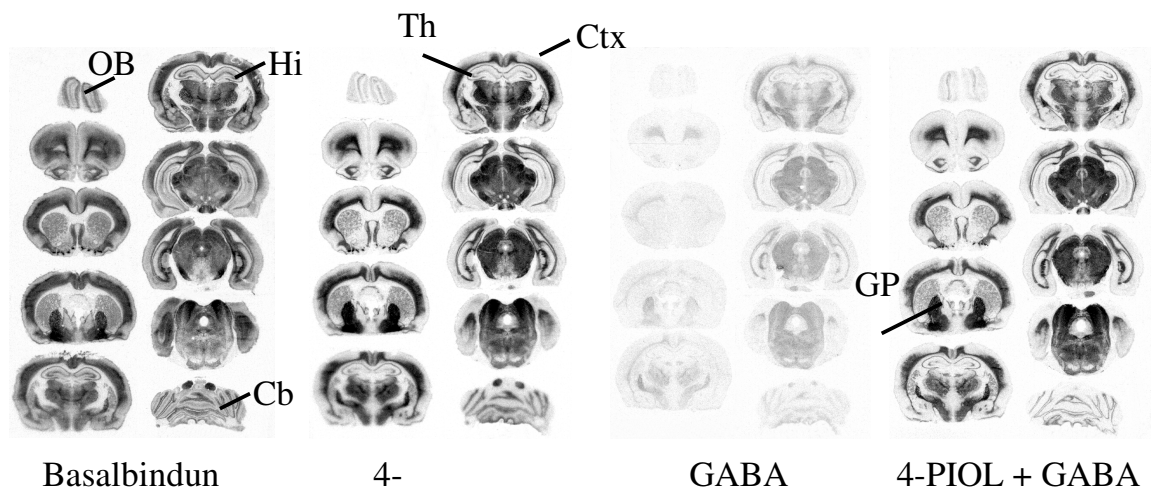


Abb. 6: Representative Autoradiographie der [^{35}S]TBPS-Bindung unter verschiedenen Bedingungen: Basalbindung, mit $300\ \mu\text{M}$ 4-PIOL, mit $2\ \mu\text{M}$ GABA und mit $300\ \mu\text{M}$ 4-PIOL + $2\ \mu\text{M}$ GABA. Die Konzentration von [^{35}S]TBPS war $6\ \text{nM}$. In den Schnitten sind Potenzierung und Reduktion der [^{35}S]TBPS-Bindung durch 4-PIOL in den verschiedenen Hirnarealen im Vergleich zur Basalbindung zu sehen. Durch GABA wird die Bindung stark inhibiert. Die Inhibition durch GABA wird in fast allen Regionen durch 4-PIOL antagonisiert, einzige Ausnahme ist die Granulazellschicht des Cerebellums, OB, Riechhirn; Hi, Hippokampus; Th, Thalamus; Ctx, cerebraler Cortex; Cb, Cerebellum, GP, Globus Pallidus.

Im Cerebellum, besonders in der Granulazellschicht, zeigte 4-PIOL nur eine geringe Auswirkung auf die Basalbindung und keine Veränderungen des GABA-Effektes ($2\ \mu\text{M}$ GABA versus $2\ \mu\text{M}$ GABA + 4-PIOL). Entsprechend war die Granulazellschicht die einzige Hirnregion, in der GABA trotz der Anwesenheit von 4-PIOL eine signifikante Reduktion der [^{35}S]TBPS-Bindung ($P < 0,01$) bewirkte. Trotz der Ergebnisse in der Granulazellschicht konnte eine hohe Korrelation der regionalen Aktivitäten zwischen GABA und 4-PIOL gezeigt werden ($r = 0,8$; $P < 0,0001$), die durch die Korrelation bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen bestätigt wurde ($r = 0,94$).

3.1.3. Bindungsstudien an rekombinanten GABAA-Rezeptoren mit 4-PIOL

Ergänzend zu den Ergebnissen der Autoradiographien wurden [^{35}S]TBPS-Bindungsstudien mit 4-PIOL an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren durchgeführt. In den Bindungsstudien wurden $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren, die nahezu ausschließlich in der Granulazellschicht vorkommenden, mit $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren verglichen, die ubiquitär im ZNS vorkommenden. Die α -Untereinheiten wurden in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 2$ und $\gamma 2$ geprüft.

Abb. 7 zeigt die Wirkung von 4-PIOL mit und ohne GABA auf $\alpha 1$ - (A) bzw. auf $\alpha 6$ -enthaltenden (B) Rezeptoren. Während 4-PIOL in $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren sowohl allein als auch in Anwesenheit von GABA die [^{35}S]TBPS-Bindung erhöht, hat 4-PIOL auf $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren keinen Effekt. Nach Koapplikation mit GABA zeigte sich jedoch, dass 4-PIOL bei einer Konzentration von $300\ \mu\text{M}$ eine schwache antagonistische Wirkung auf die GABA-induzierte Modulation der [^{35}S]TBPS-Bindung hatte.

Alle Daten für 4-PIOL weisen darauf hin, dass es als partieller Agonist auf $\alpha 1$ -enthaltende $GABA_A$ -Rezeptoren und als Antagonist auf $\alpha 6$ -enthaltende $GABA_A$ -Rezeptoren wirkt.

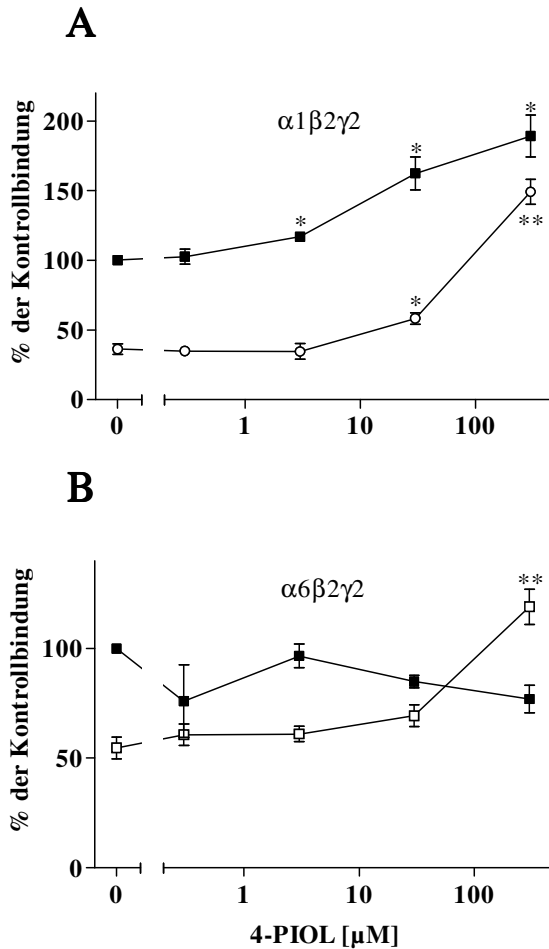


Abb. 7: Effekte steigender Konzentrationen von 4-PIOL auf die [35 S]TBPS-Bindung rekombinanter $GABA_A$ -Rezeptoren, (A) $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und (B) $\alpha 6\beta 2\gamma 2$. Die Konzentration von [35 S]TBPS war 6 nM. Ergebnisse sind als Prozent der Basalbindung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM, n = 3). Die verschiedenen GABA-Konzentrationen sind durch folgende Symbole dargestellt: (∇) kein GABA, (\square) 3 μ M bzw. 2 μ M in (A) bzw. (B). Der Kontrollbindungswert für $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ bzw. $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren lag bei 544 ± 342 bzw. 50 ± 18 fmol/mg Protein. Signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Werten ohne 4-PIOL sind markiert (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$), [Zwei-Stichproben-Test (Students t -Test)].

3.2. Molekularbiologische Charakterisierung von $GABA_A$ -Rezeptoren

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welche Sequenzbereiche für die von Korpi & Lüddens (Korpi et al. 1992; Korpi and Lüddens 1993) beschriebene Unterschiede in der GABA-Sensitivität der [35 S]TBPS-Bindung von $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren verantwortlich sind. Die Charakterisierung dieser GABA-Sensitivitätsunterschiede wurde mit [35 S]TBPS-Bindungsstudien an rekombinant exprimierten $GABA_A$ -Rezeptoren durchgeführt. In allen folgenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde die Auswirkung steigender GABA-Konzentrationen auf die spezifische [35 S]TBPS-Bindung rekombinanter $GABA_A$ -Rezeptoren dargestellt (siehe 2.2.5).

Zur Bestimmung der GABA-Affinitäten wurden Sättigungsstudien (siehe 2.2.5) mit dem [3 H]-markierten GABA-Agonisten Muscimol durchgeführt. Die Affinität eines Rezeptors zu GABA wird hierbei durch eine Gleichgewichtsbindungskonstante, den K_D -Wert, dargestellt. Als biologisch relevante Differenzen wurden signifikant (t -Test) unterschiedliche K_D -Werte

eingestuft, die sich um mehr als den Faktor fünf unterscheiden.

3.2.1. Unterschiede in der GABA-Sensitivität von $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren

Die $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten wurden mit der $\beta 1$ bzw. der $\beta 3$ sowie mit der $\gamma 2$ -Untereinheit koexprimiert, um eventuelle Unterschiede in den Interaktionen der α -Untereinheiten mit den β -Untereinheiten detektieren zu können.

Alle im Folgenden aufgeführten Konzentrationen halbmaximaler Reduktion der [35 S]TBPS-Bindungen (IC_{50} -Werte) wurden graphisch ermittelt, weil diese Art der Ermittlung für den gewünschten Zweck als ausreichend und eine rechnerische Ermittlung ein Vielfaches der Messwerte erfordert hätte. Die Zahlen werden in Tab. 8 (S.58) zusammen mit den höchsten und niedrigsten [35 S]TBPS-Bindungswerten der verschiedenen Rezeptorkombinationen aufgelistet. Abweichungen in den IC_{50} -Werten wurden als biologisch relevant eingestuft, wenn sie sich um mindestens den Faktor fünf unterscheiden. Im Gegensatz zur IC_{50} -Wert-Bestimmung bei der Autoradiographie, bei der ein System mit vielen GABA_A-Rezeptorsubtypen getestet wird, sind unterschiedliche IC_{50} -Werte bei rekombinanten Rezeptoren eindeutiger, da jeweils nur ein Rezeptorsubtyp untersucht wird.

Abb. 8 bestätigt, dass die von Korpi & Lüddens für Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ gemessen Unterschiede bei der [35 S]TBPS-Bindung von $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren (Korpi et al. 1992; Korpi and Lüddens 1993) ebenfalls in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1\gamma 2$ sowie $\beta 3\gamma 2$ festgestellt werden konnten: In $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren sind die IC_{50} -Werte um mehr als eine Zehner-Potenz kleiner als bei $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren. Dies bedeutet, dass $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren im Vergleich zu $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren eine mehr als zehnfach höhere Konzentration an GABA benötigen, um ihre maximale [35 S]TBPS-Bindung auf die Hälfte zu reduzieren.

Des Weiteren zeigt Abb. 8 deutlich die unterschiedlichen Kurvenverläufe $\alpha 1$ - bzw. $\alpha 6$ -enthaltender Rezeptoren: In $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren führen steigende GABA-Konzentrationen zu einer kontinuierlichen Reduktion der [35 S]TBPS-Bindung bis diese im Bereich von 1-10 μ M GABA minimal wird und bei weiterer Erhöhung der GABA-Konzentration sich nicht mehr verändert. Dahingegen zeigen $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren bei Konzentrationen größer als 0,01 μ M einen steilen Anstieg der [35 S]TBPS-Bindung. Bei keiner der gemessenen GABA-Konzentrationen unterschieden sich die Werte der Kontrollbindung statistisch signifikant voneinander. Der $\alpha 1$ -charakteristische Anstieg der [35 S]TBPS-Bindung bei geringen Dosen von GABA gilt im Folgenden als eines der Hauptkriterien, um das [35 S]TBPS-Bindungsverhalten von Rezeptoren mit sequenzveränderten α -Untereinheiten zu beurteilen.

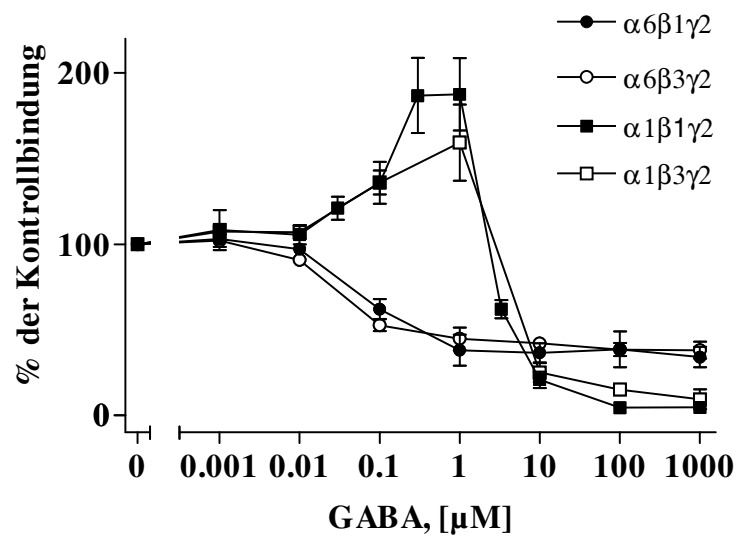


Abb. 8: Effekte von GABA auf die [35 S]TBPS-Bindung in rekombinanten Wildtyp-GABA_A-Rezeptoren. Der Austausch der β 1- gegen die β 3-Untereinheit verursachte weder in α 1-enthaltenden Rezeptoren [α 1 β 1 γ 2 (■) und α 1 β 3 γ 2 (□)] noch in α 6-enthaltenden Rezeptoren [α 6 β 1 γ 2 (●) und α 6 β 3 γ 2 (○)] einen Unterschied in der [35 S]TBPS-Bindung. Dagegen zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Kurvenverlauf der α 1- und α 6-enthaltenden Rezeptoren: Während α 1-enthaltende Rezeptoren den charakteristischen Bindungsanstieg bei 0,1-1 μ M GABA zeigen und danach kontinuierlich auf Null zurückgehen, weisen α 6-enthaltende Rezeptoren keinen solchen Anstieg auf und die Bindung lässt sich auch bei hohen GABA-Konzentrationen auf maximal 30 % reduzieren. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. bei n=3-4.

Zusätzlich kann man erkennen, dass sich die [35 S]TBPS-Bindung in α 1-enthaltenden Rezeptoren durch GABA fast vollständig blockieren lässt. In α 6-enthaltenden Rezeptoren hingegen wird selbst bei 1 mM GABA die [35 S]TBPS-Bindung nur auf 25-50 % der Kontrolle verringert.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die K_D -Werte für [3 H]Muscimol der Wildtyp- α -Untereinheiten in Kombination mit β 1 oder β 3 nicht unterscheiden, während die K_D -Werte von Rezeptoren der Zusammensetzung α 1 β 1 γ 2 bzw. α 1 β 3 γ 2 dreifach so hoch waren wie die der α 6 β 1 γ 2- bzw. α 6 β 3 γ 2-Rezeptoren. Die Abweichungen der K_D -Werte erreichten nicht den oben festgelegten Faktor 5, was darauf hindeutet, dass die beobachteten GABA-modulatorischen Unterschiede in der [35 S]TBPS-Bindung (Korpi and Lüddens 1993) zwischen α 1- und α 6-enthaltenden Rezeptoren auf unterschiedliche GABA-Sensitivitäten basieren und nicht auf einer Verschiebung der GABA-Affinität.

Tab. 6
K_D-Werte rekombinanter Wildtyp-GABA_A-Rezeptoren für [³H]Muscimol

Rezeptor-kombination	K _D -Wert [nM]
α1β1γ2	15,6 ± 2,1
α1β3γ2	19,3 ± 4,8
α6β1γ2	5,9 ± 0,9
α6β3γ2	6,2 ± 0,9

Die K_D-Werte wurden mit dem in 2.2.5 erwähnten [³H]Muscimol-Bindungsassay ermittelt (n=3). Angegeben ist der Mittelwert ± S.E.M.

3.2.2. Überprüfung der GABA-Sensitivitäten und GABA-Affinitäten chimärer α-Untereinheiten

Nach Etablierung der Ausgangswerte wurde der Einfluss ausgetauschter Sequenzabschnitte bzw. einzelner Aminosäuren zwischen den Untereinheiten α1 und α6 auf die GABA-Affinität und -Sensitivität mit den oben beschriebenen radioaktiven Bindungsassays untersucht. Wie auch für die Analyse der Wildtyprezeptoren wurden die Chimären bzw. Punktmutanten der α-Untereinheiten zusammen mit der γ2-Untereinheit sowie der β1- oder der β3-Untereinheit bzw. der β1- und der β3-Untereinheit im heterologen Expressionssystem der HEK 293-Zellen transfiziert.

Ausgehend von den in Wieland et al. (1992) beschriebenen Plasmiden α1MA und α6MA, die jeweils eine zusätzliche Mlu I- und Aoc I-Restriktionsschnittstelle enthielten, wurden im Rahmen dieser Arbeit 24 Chimären und Punktmutanten mittels PCR oder gezielter Mutagenese hergestellt, in denen von einer bis 258 Aminosäure(n) zwischen den beiden Untereinheiten ausgetauscht wurden. Alle in der Sequenz veränderten α-Untereinheiten sind vergleichend in Abb. 17 (siehe Anhang) dargestellt.

3.2.2.1. [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien mit Bsu I/Hind III-Chimären

Als Erstes wurden die C-terminalen Genabschnitte der Untereinheiten α1 und α6 mittig bis in den Bereich zwischen den TM-Regionen 2 und 3 ausgetauscht (siehe Abb. 3 und Abb. 5). Die Chimären wurden in Kombination mit den Untereinheiten β1 und γ2 in [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien (siehe 2.2.5) ausgetestet.

Die in Abb. 9A gezeigte [³⁵S]TBPS-Bindungskurve der Rezeptoren α1-6BH857β1γ2 verläuft bis zu einer Konzentration von 1 μM GABA identisch zur α1-Wildtyp-Kurve. Bei Gabe höherer GABA-Konzentrationen unterscheiden sich die [³⁵S]TBPS-Bindungswerte der Chimäre zwar signifikant von denen des Wildtyps, diese Unterschiede sind jedoch nicht biologisch relevant, da die Kurvenform eher der des α1-Wildtyps entspricht, als dem des α6-Wildtyps.

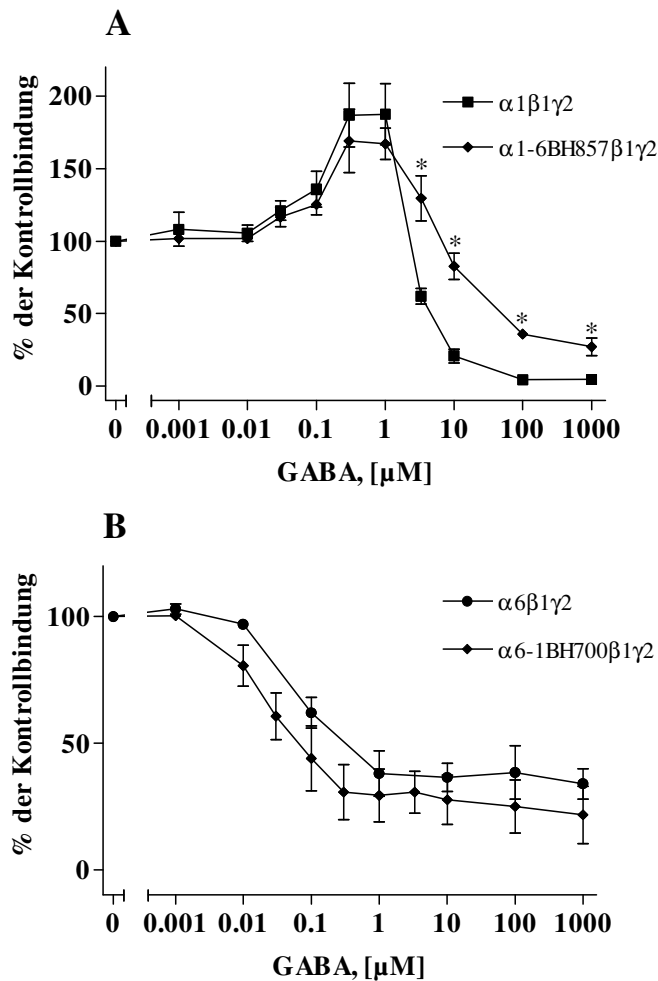


Abb. 9: Effekte von GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mit chimären α-Untereinheiten im Vergleich zu Wildtyprezeptoren. (A) Bis zu einer Konzentration von 1 μM GABA verläuft die [³⁵S]TBPS-Bindungskurve der Chimäre α1-6BH857β1γ2 (◆) zu seinem entsprechenden Wildtyp α1β1γ2 (◻) identisch, bei höheren GABA-Konzentrationen zeigte die Chimäre signifikant (* P<0,05) höhere [³⁵S]TBPS-Bindung. (B) Die Chimäre α6-1BH700β1γ2 (◆) lässt zu ihrem entsprechenden Wildtyprezeptor α6β1γ2 (λ) keinen Unterschied der [³⁵S]TBPS-Bindung in den ausgetesteten GABA-Konzentrationen erkennen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± S.E.M. bei n=3-5.

Aus

Abb. 9B wird deutlich, dass keine signifikanten Unterschiede in den [³⁵S]TBPS-Bindungen zwischen der Chimäre α6-1BH700 und dem α6-Wildtyp zu detektieren waren.

Auch in den K_D-Werten (Tab. 7) für [³H]Muscimol (siehe 2.2.5) waren keine Unterschiede zwischen den Chimären und den korrespondierenden Wildtyprezeptoren zu erkennen.

Tab. 7

K_D-Werte von GABA_A-Rezeptoren mit chimären α-Untereinheiten im Vergleich zu ihren Wildtyprezeptoren

Rezeptor-kombination	K _D -Wert [nM]
α1β1γ2	15,6 ± 2,1
α1-6BH857β1γ2	12,1 ± 2,6
α6β1γ2	5,9 ± 0,9
α6-1BH700β1γ2	6,2 ± 0,9

Die K_D-Werte wurden mit dem in 2.2.5 erwähnten [³H]Muscimol-Bindungsassay ermittelt (n=3). Die

Standardabweichungen der K_D -Werte sind als S.E.M. angegeben. Diese chimären α -Untereinheiten in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1\gamma 2$ unterschieden sich in ihren K_D -Werten nicht signifikant von ihren entsprechenden Wildtyprezeptoren.

Daraus lässt sich schließen, dass die ausgetauschten Sequenzbereiche weder einen Einfluss auf die GABA-Sensitivität noch auf die GABA-Affinität haben.

3.2.2.2. [^{35}S]TBPS-Bindungsstudien mit den 390 bp-Chimären

In den Chimären $\alpha 1$ -6MA und $\alpha 6$ -1MA (Wieland et al. 1992) waren die Sequenzbereiche der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ zwischen den Restriktionsschnittstellen Mlu I und Aoc I ausgetauscht worden. Der ausgetauschte Sequenzabschnitt beinhaltet 351 bp. Die [^{35}S]TBPS-Bindungsdaten (siehe 2.2.5) dieser veränderten Untereinheiten in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1\gamma 2$ bzw. $\beta 3\gamma 2$ sind in Abb. 10 dargestellt.

Die GABA_A -Rezeptoren der Kombinationen $\alpha 1$ -6MA $\beta 1\gamma 2$ bzw. $\alpha 1$ -6MA $\beta 3\gamma 2$ zeigen nicht mehr die typischen Merkmale der Wildtyprezeptoren $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ bzw. $\alpha 1\beta 3\gamma 2$: Der für $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren charakteristische Anstieg der [^{35}S]TBPS-Bindung zwischen 0,1-1 μM GABA fehlt in beiden Rezeptorkombinationen und die Sensitivität gegenüber GABA ist in beiden Fällen erhöht. Die IC_{50} -Werte liegen jeweils bei ca. 1 μM GABA, während $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ - bzw. $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren IC_{50} -Werte von ca. 10 μM aufweisen.

Vergleicht man hingegen das [^{35}S]TBPS-Bindungsverhalten der Rezeptoren $\alpha 1$ -6MA $\beta 1\gamma 2$ mit dem der Wildtyprezeptoren $\alpha 6\beta 1\gamma 2$, so sind diese bis auf die beiden höchsten GABA-Konzentrationen identisch. Dieselbe $\alpha 1$ -6MA-Chimäre zeigt in Kombination mit $\beta 3\gamma 2$ statt $\beta 1\gamma 2$ ein ähnliches Bindungsverhalten wie die Wildtyprezeptoren der Kombination $\alpha 6\beta 3\gamma 2$. Allerdings zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei 0,1 μM GABA, denn dort entspricht die Bindung eher der $\alpha 1$ -Kombination.

In Abb. 10C ist das [^{35}S]TBPS-Bindungsverhalten der inversen Chimäre $\alpha 6$ -1MA zur $\alpha 1$ -6MA-Chimäre gezeigt. $\alpha 6$ -1MA-enthaltende Rezeptoren lassen eine biphasische Bindungskurve erkennen, die weder dem Kurvenverlauf der Wildtyprezeptoren $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ noch dem der $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ gleicht. Bei niedrigen GABA-Konzentrationen (1 und 10 nM) liegt die [^{35}S]TBPS-Bindung der $\alpha 6$ -1MA-enthaltenden Rezeptoren deutlich unterhalb derer der Wildtypen $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ bzw. $\alpha 1\beta 1\gamma 2$, sie sinkt bei 10 nM bereits auf 50 %, während die Bindungswerte der Wildtyprezeptoren bei dieser Konzentrationen noch unverändert bei 100 % sind. Bei höheren GABA-Konzentrationen ähnelt der Kurvenverlauf der $\alpha 6$ -1MA-Chimäre eher dem des Wildtyps $\alpha 6\beta 1\gamma 2$. Die halb- maximale Reduktion der [^{35}S]TBPS-Bindung dieser Chimäre ist bei 1 μM GABA erreicht.

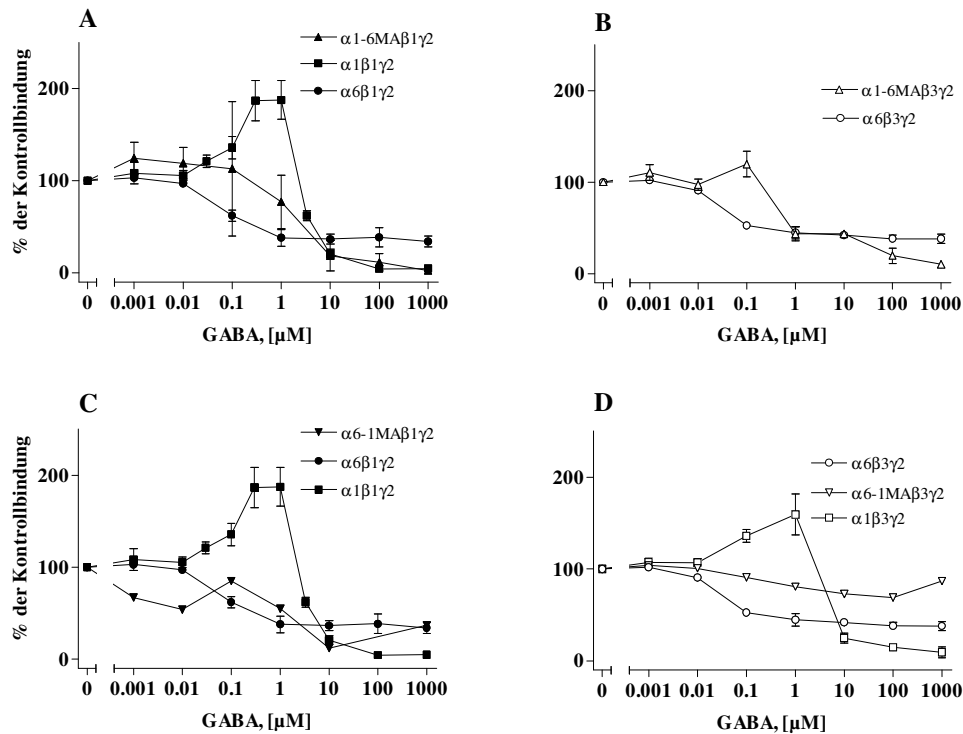


Abb. 10: Effekte von GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA_A-Rezeptoren bestehend aus den Untereinheiten α1-6MAβ1γ2 (σ), α1-6MAβ3γ2 (Δ), α6-1MAβ1γ2 (τ) und α6-1MAβ3γ2 (∇) im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren α1β1γ2 (v) und α6β1γ2 (λ) bzw. α1β3γ2 (□) und α6β3γ2 (O). (A, B) Die α1-6MA-Chimäre weist sowohl in Kombination mit β1γ2 sowie mit β3γ2 deutlich niedrigere Bindungen bei 1 µM GABA auf als die entsprechenden α1-Wildtyprezeptoren. (C, D) Die α6-1MA-Chimäre zeigt in beiden Fällen abweichende Bindungswerte von den α6-Wildtypen, n=3-4, ausser für α6-1MAβ1γ2 und α6-1MAβ3γ2 (n=1) und α1-6MAβ1γ2 (n=2), bei denen aufgrund der schlechten Bindungsraten (B_{max}-Werten) der Chimären nur 1 oder 2 Messungen durchgeführt wurden.

In Abb. 10D sind vergleichend die [³⁵S]TBPS-Bindungskurven der Chimäre α6-1MA in Kombination mit den Untereinheiten β3 und γ2 und den Wildtypkombinationen dargestellt. Der Kurvenverlauf der Chimäre verläuft deutlich flacher als die Wildtyp-Kurve von α6β3γ2. Während bei α6 enthaltenden Rezeptoren die maximale Reduktion ca. 25-50 % beträgt, ist die [³⁵S]TBPS-Bindung der Chimäre ab GABA-Konzentrationen >100 µM GABA nur um maximal 30 % verringert.

Die Daten der Chimären α1-6MA und α6-1MA liefern zwei Ergebnisse: Erstens hat der Genbereich zwischen den Restriktionsschnittstellen Mlu I und Aoc I sowohl bei der α1-Untereinheit als auch bei der α6-Untereinheit einen wesentlichen Anteil an der Ausbildung der GABA-Sensitivität. Zweitens lässt sich nach Vergleich der Chimären in Kombination mit β1 bzw. β3 nicht ausschließen, dass die Interaktionen zwischen α- und β-Untereinheiten bei der Ausbildung der GABA-Sensitivität von Bedeutung ist. Zur genaueren Untersuchung der Genabschnitte zwischen den Restriktionsschnittstellen Mlu I und Aoc I wurden die ausgetauschten Anteile sukzessiv verkürzt.

3.2.2.3. [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien mit Chimären mit 127bp- bzw. 284bp-langen Sequenzaustauschen

Die zu diesem Zweck hergestellten (siehe Abschnitt 2.2.11) Untereinheiten $\alpha 1$ -16MA, $\alpha 1$ -61MA, $\alpha 6$ -16MA und $\alpha 6$ -61MA wurden mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ in HEK 293-Zellen kotransfiziert, die Chimären $\alpha 6$ -16MA und $\alpha 6$ -61MA zusätzlich mit den Untereinheiten $\beta 3$ und $\gamma 2$. Alle sechs Rezeptoren wurden mit Hilfe der [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien analysiert (Abb. 11).

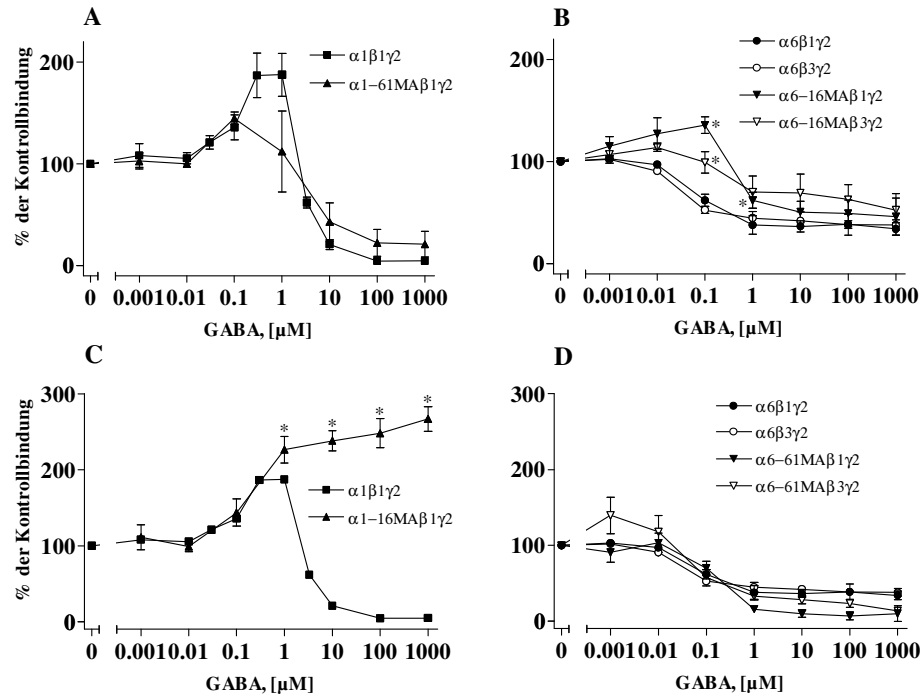


Abb. 11: Effekt von GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mit mutierten α -Untereinheiten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ (ν), $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ (λ) und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ (\circ), $n=3-6$. In den in A und B dargestellten Chimären sind 3'-angrenzend an die Mlu I-Schnittstelle 102 bp-große Sequenzpassagen ausgetauscht ($\alpha 1$ -61MA, $\alpha 6$ -16MA), bei den in C und D dargestellten Chimären sind 5'-angrenzend an die Aoc I-Schnittstelle 258 bp-große Sequenzpassagen ($\alpha 1$ -16MA, $\alpha 6$ -61MA) ausgetauscht. Die [³⁵S]TBPS-Bindung der Chimären $\alpha 1$ -61MA (A) und $\alpha 1$ -16MA (C) wurden in Kombination mit $\beta 1$ und $\gamma 2$ gemessen (σ), die Chimären $\alpha 6$ -16MA (B) und $\alpha 6$ -61MA (D) sowohl mit $\beta 1\gamma 2$ (τ) als auch mit $\beta 3\gamma 2$ (ν). Während die $\alpha 1$ -61-Chimäre eine vergleichbare GABA-Sensitivität wie der $\alpha 1$ -Wildtyp zeigt (A), weichen die Bindungswerte der Chimären $\alpha 6$ -16 $\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 6$ -16 $\beta 3\gamma 2$ von denen der $\alpha 6$ -Wildtypen ab. Sie zeigen bei 0,1 μ M GABA signifikante Unterschiede (* $P<0,05$) zu $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren (B). Dieser Anstieg der [³⁵S]TBPS-Bindung beschreibt eher ein Kurvenverhalten, wie es für $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren bekannt ist.

Die Chimäre $\alpha 1$ -61MA (A) zeigt eine nahezu identische GABA-Sensitivität wie die Wildtyprezeptoren $\alpha 1\beta 1\gamma 2$, in beiden Fällen lag der IC₅₀-Wert um 10 μ M GABA. Allerdings erreichte der $\alpha 1$ -typische Anstieg der [³⁵S]TBPS-Bindung bei der Chimäre nur ca. 150 % anstatt ca. 190 % der Bindung (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Charakteristika aller Chimären und Wildtyp-GABA_A-Rezeptoren

Rezeptorkombinationen	IC50-Wert [μ M]	maximaler Anstieg der [³⁵ S]TBPS- Bindung [%]	maximale Reduktion der [³⁵ S]TBPS- Bindung [%]
α 6-61MA β 3 γ 2	0,03	140	10
α 6I192L β 3 γ 2	0,03	100	20
α 6_182-185DGSR β 3 γ 2	0,03	100	30
α 6-1BH700 β 1 γ 2	0,03	100	20
α 6L187N,I192L β 1 γ 2	0,03	100	10
α6β3γ2	0,04	100	30
α 6_182-185DGSR β 1 γ 2	0,05	100	20
α 6Y175R β 3 γ 2	0,06	100	50
α6β1γ2	0,10	100	30
α 6S197D β 1 γ 2	0,10	110	35
α 6Y175R β 1 γ 2	0,10	100	30
α 6_168-172EWKRE β 3 γ 2	0,10	100	55
α 6I192L_ α 1BH700 β 1 γ 2	0,10	100	60
α 6_168-172EWKRE β 1 γ 2	0,15	100	40
α 6L187N_ α 1BH700 β 1 γ 2	0,15	100	50
α 6-1MA β 3 γ 2	0,16	100	70
α 6-61MA β 1 γ 2	0,20	100	10
α 6_178-180VVA β 3 γ 2	0,20	110	40
α 6I192L β 1 γ 2	0,23	100	20
α 6_161-165TRAEV β 3 γ 2	0,30	120	70
α6L187Nβ1γ2	0,32	140	20
α6-16MAβ3γ2	0,40	110	50
α 1N188L,L193I β 1 γ 2	0,40	120	0
α 6K170T β 1 γ 2	0,40	100	30
α6L187Nβ3γ2	0,44	110	30
α6-16MAβ1γ2	0,45	140	50
α 6_161-165TRAEV β 1 γ 2	0,50	185	140
α 6K170T β 3 γ 2	0,50	100	30
α 6_178-180VVA β 1 γ 2	0,50	120	50
α 1-6MA β 3 γ 2	0,60	120	10
α 1N188L β 3 γ 2	0,70	100	0
α 1N188L_ α 6BH857 β 1 γ 2	1,00	120	20
α 6-1MA β 1 γ 2	1,60	85	70
α 1 β 1 γ 2	3,00	190	0
α 1N188L β 1 γ 2	3,00	125	0
α 1-6MA β 1 γ 2	3,30	120	0
α 1D198S β 1 γ 2	3,70	350	10
α 1D198S β 3 γ 2	3,70	190	0
α 1-61MA β 1 γ 2	3,80	130	25
α 1 β 3 γ 2	4,00	160	0
α 1_162-166PKSEI β 1 γ 2	4,00	350	60
α 1_162-166PKSEI β 3 γ 2	4,00	180	30
α 1L193I β 3 γ 2	4,60	140	0
α 1L193I β 1 γ 2	6,30	220	0
α 1-6BH857 β 1 γ 2	6,80	170	30
α 1-16MA β 1 γ 2	/	260	/

Wurde in der $\alpha 6$ -Wildtypkombination die $\beta 1$ -Untereinheit durch $\beta 3$ ersetzt, so zeigt dieser Austausch keine Auswirkung auf das [^{35}S]TBPS-Bindungsverhalten. Dahingegen verursachte die $\beta 3$ -Untereinheit in Kombination mit der Chimäre $\alpha 6$ -16MA eine signifikant geringere [^{35}S]TBPS-Bindung bei 0,1 μM GABA als bei Rezeptoren der Kombination $\alpha 6$ -16MA $\beta 1\gamma 2$; bei höheren GABA-Konzentrationen war die Bindung unverändert.

Die Chimäre $\alpha 1$ -16MA $\beta 1\gamma 2$ (C) zeigt in der [^{35}S]TBPS-Bindung einen für $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren untypischen Kurvenverlauf. Die Bindung wurde durch GABA-Konzentrationen bis 0,33 μM in gleicher Weise erhöht wie es für die Wildtyprezeptoren $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ beschrieben wurde. Bei weiterem Anstieg der GABA-Konzentration erreicht die [^{35}S]TBPS-Bindung Werte von 223-265 % der Kontrolle und verbleibt auf diesem hohen Niveau. Sie erreicht damit einen deutlich höheren Wert als der Wildtyprezeptor (ca 190 %).

Ein sehr heterogenes Bild zeigte sich bei der Chimäre $\alpha 6$ -61MA, dem inversen Gegenstück zu $\alpha 1$ -16MA. Während die Chimäre in Kombination mit $\beta 3\gamma 2$ bei 1 nM GABA eine signifikant höhere Bindung von ca. 140 % zeigte, war dieser frühe Anstieg in Kombination mit $\beta 1\gamma 2$ nicht zu beobachten. Weiterhin war die maximale Reduktion der [^{35}S]TBPS-Bindung durch GABA bei $\beta 3$ -enthaltenden Chimären sowohl bei $\beta 1$ als auch bei $\beta 3$ -enthaltenden Wildtyprezeptoren mit ca. 50 % vergleichbar. Dahingegen ließ sich die [^{35}S]TBPS-Bindung der Chimäre in Kombination mit $\beta 1$ auf ca. 10-20 % reduzieren, was eher den Verhältnissen bei $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren glich (siehe Tab. 8, S.58).

In Tab. 9 ist der K_D -Wert (siehe 2.2.5) von Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1$ -16MA $\beta 1\gamma 2$ im Vergleich zu seinem Wildtyprezeptor dargestellt. Die Unterschiede der beiden ermittelten K_D -Werte sind nach der eingangs gegebenen Definition nicht biologisch relevant.

Tab. 9 K_D -Werte der Chimäre $\alpha 1$ -16MA im Vergleich zum Wildtyp

Rezeptor- kombination	K_D -Wert [nM]
$\alpha 1\beta 1\gamma 2$	15,6 \pm 2,1
$\alpha 1$ -16MA $\beta 1\gamma 2$	6,4 \pm 1,2

Die K_D -Werte wurden mit dem in 2.2.5 erwähnten [^3H]Muscimol-Bindungsassay ermittelt (n=3). Angegeben sind die K_D -Werte \pm S.E.M. Der K_D -Wert der $\alpha 1$ -16MA-Chimäre unterscheidet sich rechnerisch signifikant von dem des entsprechenden Wildtyps (P = 0,019). Der Unterschied ist jedoch nicht biologisch relevant.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass das 127bp-Fragment ($\alpha 6$ Aminosäureposition 159-192) eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der GABA-Sensitivität (siehe Abb. 11B), aber nicht bei der GABA-Affinität spielt.

3.2.3. Einführen von Ein- und Mehrfachpunktmutationen im 127 bp Fragmenten der α 1- und α 6-Untereinheit

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die für die geringere GABA-Sensitivität verantwortliche Sequenz auf die 127bp-Fragmente eingegrenzt werden. Zur Analyse dieser Fragmente wurden eine Mutanten mit wenigen Aminosäureaustauschen hergestellt. Für sechs Punktmutanten wurden die „inneren“ Primer sowie die Mlu-Primer verändert (siehe 2.2.12 und Abb. 4). In vier Fällen waren die Nukleotidaustausche innerhalb der Sequenz der inneren Primer-Paare (siehe oben) lokalisiert, die verbleibenden zwei Nukleotidaustausche waren innerhalb der Mlu-Primer platziert. Die zu α 1 komplementären Primer enthielten 1-4 Austausche mit entsprechenden Nukleotiden der α 6-Sequenz bzw. mit entsprechenden Nukleotiden der α 1-Sequenz in den zu α 6 komplementären Primern.

Die α -Untereinheiten α 1N188L,L193I, α 6L187N,I192L und α 6S197D wurden in Kombination mit den Untereinheiten β 1 γ 2 in HEK 293-Zellen kotransfiziert; die α -Untereinheiten α 1D198S, α 6_161-165TRAEV und α 1_162-166PKSEI wurden in parallelen Ansätzen zusätzlich mit β 3 γ 2 kotransfiziert. Die Ergebnisse der [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien sind in Abb. 12 (A-F) zusammengefasst.

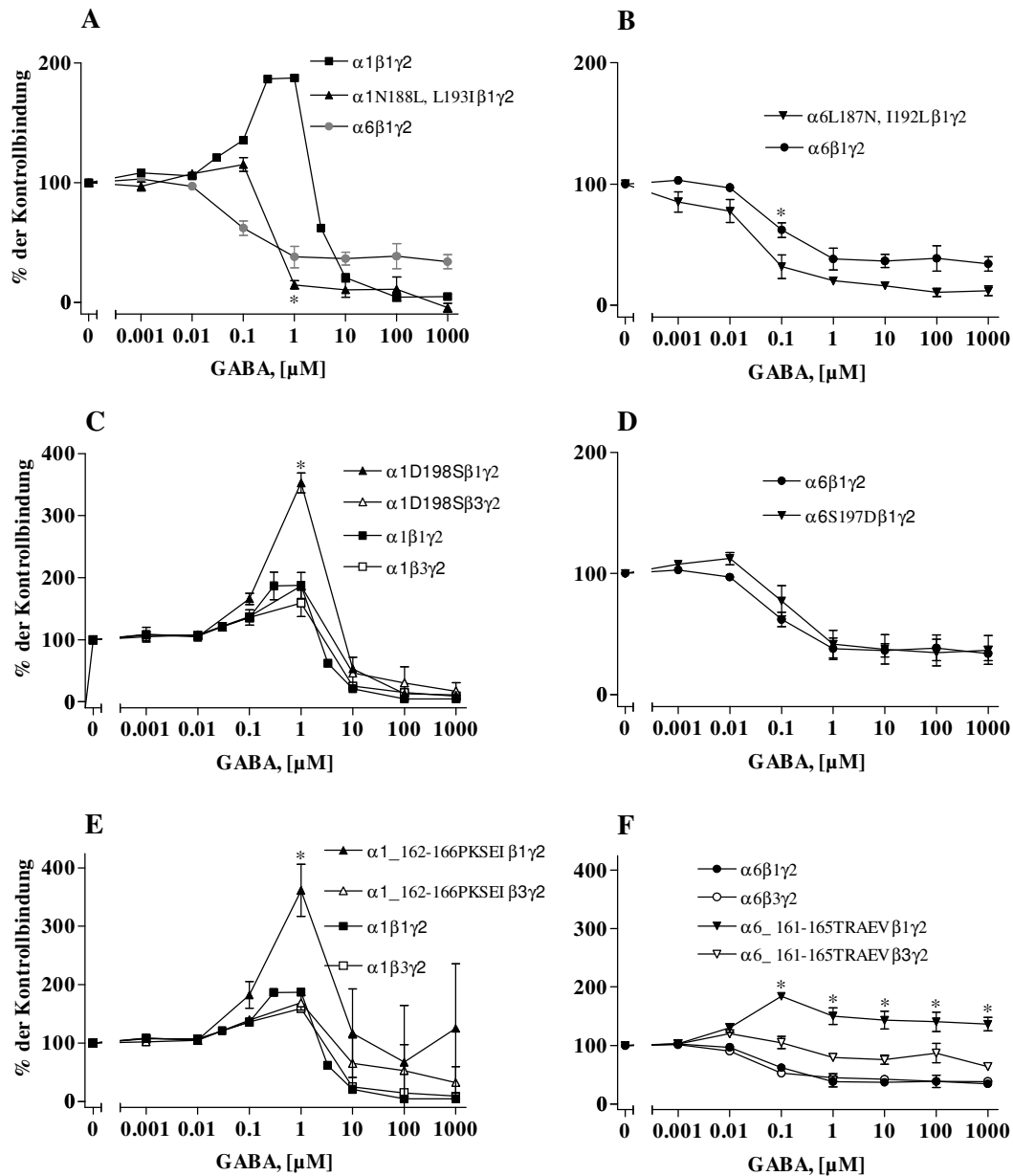


Abb. 12: Effekte von GABA auf die [35 S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA $_A$ -Rezeptoren mit punktmutierten α -Untereinheiten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ (ν) und $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ (λ) bzw. $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (\square) und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ (\circ). Sequenzveränderte α -Untereinheiten, deren Ausgangssequenz $\alpha 1$ war, wurden in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ als schwarze aufrechtstehende Dreiecke (σ) dargestellt bzw. in Kombination mit $\beta 3\gamma 2$ als offene aufrechte Dreiecke (Δ). Dementsprechend wurden Chimären, deren Ausgangssequenz $\alpha 6$ war, als umgedrehte Dreiecke [$\beta 1\gamma 2$ (τ) bzw. $\beta 3\gamma 2$ (∇)] dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. bei $n=3$ bzw. $n=4$ für $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Ist im Graphen der nicht-entsprechende Wildtyp mitaufgeführt, so sind dessen Meßpunkte grau dargestellt. Die Chimäre $\alpha 1N188L,L193I$ (A) zeigt bei GABA-Konzentrationen zwischen $0,1$ und $10 \mu\text{M}$ eine deutliche Abweichung des Bindungsverhaltens zum $\alpha 1$ -Wildtyp sowie eine um eine 10er Potenz höhere GABA-Sensitivität als der $\alpha 1$ -Wildtyp. Ihr reverses Gegenstück (B) zeigt keine Umkehr dieser Ergebnisse.

Die [³⁵S]TBPS-Bindungskurve der Chimäre $\alpha 1N188L,L193I$ entspricht bei niedrigen GABA-Konzentrationen bis 30 nM und bei hohen GABA-Konzentrationen ab 1 μ M der von $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren (Abb. 12A). Interessanterweise bleibt die [³⁵S]TBPS-Bindungsrate der Chimäre bei 0,1 μ M GABA unverändert, während sie bei dieser Konzentration beim $\alpha 6$ -Wildtyp um ca. 40 % verringert und beim $\alpha 1$ -Wildtyp um ca. 25 % erhöht ist. Bei 1 μ M GABA fällt die Kurve der Chimäre auf ca. 10% ab und verbleibt bei steigenden GABA-Konzentrationen wie die Kurve des $\alpha 1$ -Wildtyps auf diesem niedrigen Niveau. Somit zeigt die Doppelpunktmutante $\alpha 1N188L,L193I$ eine 10-fach höhere GABA-Sensitivität als der $\alpha 1$ -Wildtyp. Die Chimäre $\alpha 6L187N,I192L$ (Abb. 12B) zeigt hinsichtlich der Bindungskurve den gleichen Verlauf wie der Wildtyp $\alpha 6\beta 1\gamma 2$.

Betrachtet man die Punktmutante $\alpha 1D198S$ in Kombination mit $\beta 3\gamma 2$, so ist der Graph deckungsgleich mit dem der $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -Wildtyprezeptoren (Abb. 12C). Ein anders Bild zeigte sich, wenn die Mutante mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ kotransfiziert worden war. In diesem Fall ist der Anstieg der [³⁵S]TBPS-Bindung bei 0,1 μ M GABA um ca. 20 % größer als bei den beiden Wildtypkombinationen und der Mutante in Kombination mit der $\beta 3$ -Untereinheit: Bei 1 μ M GABA ist der $\alpha 1$ -typische Anstieg der [³⁵S]TBPS-Bindung in der $\alpha 1D198S\beta 1\gamma 2$ -Mutante mit einer Maximalbindung von ca. 350 % deutlich höher als bei den anderen GABA_A-Rezeptorkombinationen (Abb. 12C). Dabei liegen die vier IC₅₀-Werte einheitlich im Bereich von 10 μ M GABA (siehe Tab. 8, S.58)].

Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante $\alpha 6S197D$, die den entsprechenden Aminosäureaustausch in der $\alpha 6$ -Untereinheit aufweist, in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ exakt den gleiche Kurvenverlauf wie die Wildtyprezeptoren $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ (Abb. 12D). Die Mutanten $\alpha 1_{162-166}PKSEI$ und $\alpha 6_{161-165}TRAEV$ haben Sequenzveränderungen, die im Bereich der Mlu-Primer liegen. Die $\alpha 1$ -Mutante (Abb. 12E) zeigt in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 3$ und $\gamma 2$ den gleichen Kurvenverlauf wie die entsprechenden Wildtyprezeptoren. Wurde die $\beta 3$ - gegen die $\beta 1$ -Untereinheit ausgetauscht, reagierte sie analog der Chimäre $\alpha 1D198S$ (Abb. 12C), bei 0,1 μ M GABA zeigte sie eine erhöhte [³⁵S]TBPS-Bindung und bei 1 μ M GABA ein Maximum von ca. 350 %. Auch in diesem Fall lagen die IC₅₀-Werte von Mutanten und entsprechenden Wildtypen im Bereich von 10 μ M GABA (siehe Tab. 8, S.58).

Im Gegensatz dazu zeigt die Mutante $\alpha 6_{161-165}TRAEV\beta 3\gamma 2$ (Abb. 12F) einen flachen Anstieg der [³⁵S]TBPS-Bindung bei 10 nM GABA, wobei sich die Bindung bei hohen GABA-Konzentrationen nur auf 70 % reduzieren lässt. Dieser Kurvenverlauf gleicht dem in Abb. 1 dargestellten Graphen für $\alpha 6-16MA\beta 3\gamma 2$. Auch in dieser Chimäre konnte die [³⁵S]TBPS-Bindung nach moderatem Anstieg nur geringfügig reduzieren werden. In Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ zeigte die mutierte $\alpha 6$ -Untereinheit einen $\alpha 1$ -typischen Anstieg der [³⁵S]TBPS-Bindung auf ca. 180 %. Die Messwerte blieben jedoch auch bei hohen GABA-Konzentrationen mit 140 % deutlich über dem Ausgangswert.

In Tab. 10 sind die K_D-Werte einiger Mutanten der Abb. 12 aufgelistet: Die K_D-Werte der Mutante $\alpha 1N188L,L193I$ und $\alpha 6L187N,I192L$ wurden in Kombination mit $\beta 3$ bestimmt, dazu wurden die K_D-Werte der jeweiligen Punktmutanten (siehe

Tab. 11) noch mit $\beta 3$ und zusätzlich mit $\beta 1$ bestimmt. Die K_D -Werte der Mutanten $\alpha 1D198S\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 1_{162-166}PKSEI\beta 3\gamma 2$ wurden nicht bestimmt, da sich diese Rezeptorkombinationen in den [^{35}S]TBPS-Bindungen nicht von den Wildtyprezeptoren unterscheiden.

Tab. 10: K_D -Werte für [3H]Muscimol von Rezeptoren mit Ein- und Mehrfachpunktmutanten in der α -Untereinheit im Vergleich zu Wildtyprezeptoren

Rezeptorkombination	K_D -Wert [nM]
$\alpha 1\beta 1\gamma 2$	$15,6 \pm 2,1$
$\alpha 1D198S\beta 1\gamma 2$	$23,7 \pm 9,8$
$\alpha 1_{162-166}PKSEI\beta 1\gamma 2$	$8,0 \pm 0,9$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$19,3 \pm 1,8$
$\alpha 1N188L,L193I\beta 3\gamma 2$	$12,6 \pm 1,1$
$\alpha 6\beta 1\gamma 2$	$5,9 \pm 0,9$
$\alpha 6_{161-165}TRAEV\beta 1\gamma 2$	$5,3 \pm 0,5$
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	$6,2 \pm 0,9$
$\alpha 6L187N,L192L\beta 3\gamma 2$	$8,6 \pm 0,5$
$\alpha 6_{161-165}TRAEV\beta 3\gamma 2$	$2,6 \pm 0,7$
$\alpha 6S197D\beta 3\gamma 2$	$11,2 \pm 1,3$

Die K_D -Werte wurden mit dem in 2.2.5 erwähnten [3H]Muscimol-Bindungsassay ermittelt (n=3). Angegeben sind die K_D -Werte \pm S.E.M. Einige der K_D -Werte der Ein- und Mehrfachpunktmutanten-enthaltenden Rezeptoren unterscheiden sich rechnerisch signifikant von denen der entsprechenden Wildtyprezeptoren ($\alpha 1_{162-166}PKSEI\beta 1\gamma 2$, $P = 0,037$; $\alpha 6_{161-165}TRAEV\beta 3\gamma 2$, $P = 0,031$; $\alpha 6S197D\beta 3\gamma 2$, $P = 0,017$). Die Unterschiede sind jedoch nicht biologisch relevant.

Keiner der in Tab. 10 aufgelisteten K_D -Werte für die Ein- und Mehrfachpunktmutanten unterscheidet sich signifikant von denen der entsprechenden Wildtyprezeptoren.

Zwei Folgerungen wurden aus diesen Ergebnissen gezogen: Erstens zeigte die Punktmutante $\alpha 6_{161-165}TRAEV$ sowohl in Ko-Transfektion mit $\beta 1$ als auch mit $\beta 3$ grundsätzlich einen ähnlichen Anstieg der [^{35}S]TBPS-Bindung, wie er für $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren üblich ist. Dabei war bei den beiden Mutanten das Ausmaß des Anstiegs unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Mutanten verhielten sich jedoch nicht wie $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren, da die gebundene Menge [^{35}S]TBPS, besonders in Kombination mit der Untereinheit $\beta 1$, auf ein Niveau weit über den Kontrollwerten anstieg. Zweitens veränderten die Aminosäurenaustausche der Punktmutante $\alpha 1N188L,L193I$ die GABA-Sensitivität der Rezeptoren so stark, dass eine maßgebliche Beteiligung dieser Aminosäuren an der Ausbildung der GABA-Sensitivität sehr wahrscheinlich ist.

Zur genaueren Untersuchung dieser Ergebnisse wurden die beiden Aminosäurenaustausche der Doppelpunktmutanten $\alpha 1N188L,L193I$ getrennt untersucht. Zusätzlich zu diesen beiden Punktmutanten wurden deren reverse Gegenstücke in der $\alpha 6$ -Untereinheit hergestellt. Die in Abb. 13 dargestellten Kurven beschreiben die GABA-Sensitivität der Punktmutanten im Vergleich zu ihren entsprechenden Wildtyprezeptoren.

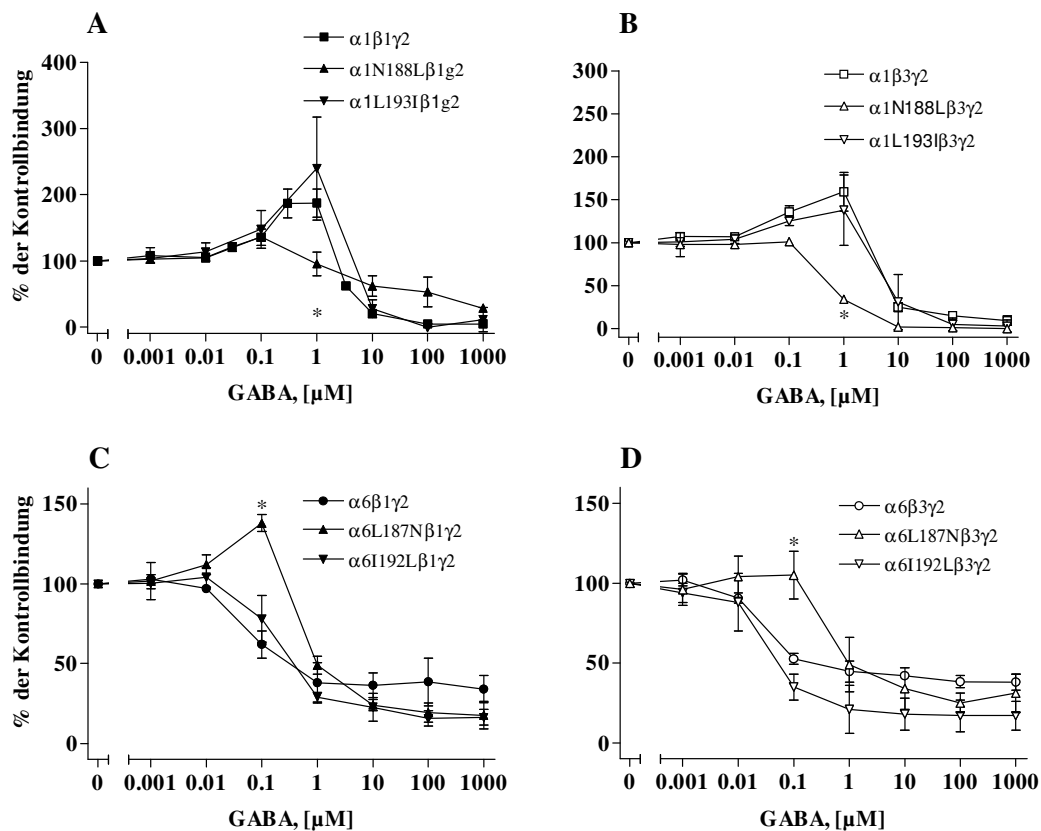


Abb. 13: Effekte von GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mit punktmutierten α -Untereinheiten im Vergleich zu Wildtyprezeptoren $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ (ν) und $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ (λ) bzw. $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (\square) und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ (\circ). Die Punktmutante $\alpha 1N188L$ und ihr analoges Gegenstück $\alpha 6L187N$ sind als aufrechte Dreiecke [geschlossen (σ), $\beta 1\gamma 2$ bzw. offen (Δ), $\beta 3\gamma 2$] dargestellt, entsprechend sind $\alpha 1L193I$ bzw. $\alpha 6I192L$ als auf dem Kopf stehende Dreiecke (geschlossen (τ), $\beta 1\gamma 2$ bzw. offen (∇), $\beta 3\gamma 2$) abgebildet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. bei $n=3$ bzw. $n=4$ bei $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Die $\alpha 1N188L$ -Chimären (A,B) unterscheiden sich bei GABA-Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ signifikant vom jeweiligen Wildtyp. Ihre analogen Chimären $\alpha 6L187N\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 6L187N\beta 3\gamma 2$ (C,D) zeigen deutliche Abweichungen des Bindungsverhaltens von denen des Wildtyps bei $0,1 \mu\text{M}$ GABA.

Im Vergleich zur Wildtyp $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ -Kombination fällt bei $\alpha 1N188L$ -enthaltenden Rezeptoren auf, dass der $\alpha 1$ -typische Anstieg fehlt und die halbmaximale Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung bei ca. $1 \mu\text{M}$ GABA liegt Abb. 13A. Damit weist die Kurve der Punktmutante Charakteristika der Wildtypkurve $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ auf. Im Gegensatz dazu verhält sich die Chimäre $\alpha 1L193I\beta 1\gamma 2$ gleich dem Wildtyp $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Im direkten Vergleich der Bindungskurven dieser beiden Punktmutanten mit der Kurve der Chimäre $\alpha 1N188L,L193I$ (Abb. 12A) ist erkennbar, dass die Bindungswerte der Doppelmutante $\alpha 1N188L,L193I$ und der Einzelmutterante $\alpha 1N188L$ nahezu identisch sind.

Der Austausch der $\beta 1$ - gegen die $\beta 3$ -Untereinheit hatte bei beiden Punktmutanten keinen wesentlichen Einfluss auf die [^{35}S]TBPS-Bindung (Abb. 13B). Mit der $\beta 3$ -Untereinheit weichen die Bindungswerte der Punktmutante $\alpha 1\text{L}193\text{I}$ auch hier nur unwesentlich (siehe GABA-Konzentration $0,1 \mu\text{M}$) von denen der entsprechenden $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ -Wildtyprezeptoren ab. Dahingegen fehlt in $\alpha 1\text{N}188\text{L}$ -enthaltenden Rezeptoren der $\alpha 1$ -typische Bindungsanstieg bei niedrigen GABA-Konzentrationen und der IC_{50} -Wert der [^{35}S]TBPS-Bindung ist um eine 10er Potenz geringer (siehe Tab. 8, S.58).

Die [^{35}S]TBPS-Bindungsdaten des inversen Gegenstücks zur $\alpha 1\text{N}188\text{L}$ -Mutante, die $\alpha 6\text{L}187\text{N}$ -Mutante, sind ein weiterer Beleg für die Annahme, dass die Aminosäure an Position 188 ($\alpha 1$) bzw. 187 ($\alpha 6$) eine wichtige Rolle bei der GABA-Sensitivität spielt. In Kombination mit der $\beta 1$ - oder $\beta 3$ -Untereinheit zeigte die Mutante reziproke Bindungsdaten zu ihrem Gegenstück. Der Aminosäureaustausch in der α -Untereinheit verschiebt das Bindungsverhalten dieser GABA_A -Rezeptoren in Richtung Wildtyp $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ (Abb. 13C) bzw. $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (Abb. 13D). Dabei zeigen $\alpha 6\text{L}187\text{N}$ -enthaltende Rezeptoren den $\alpha 1$ -typischen Anstieg der [^{35}S]TBPS-Bindung auf ca. 140% bei einer GABA-Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$; der IC_{50} -Wert dieser Rezeptoren liegt um eine 10er Potenz höher ($< 1 \mu\text{M}$) als die des Wildtyps $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ ($< 0,1 \mu\text{M}$). In Kombination mit den Untereinheiten $\beta 3$ und $\gamma 2$ (Abb. 13D) ist die Punktmutante ebenfalls insensitiver gegenüber GABA als der Wildtyp $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ ($< 1 \mu\text{M}$ versus $< 0,1 \mu\text{M}$).

Im Gegensatz dazu zeigt die Punktmutante $\alpha 6\text{I}192\text{L}$, das inverse Gegenstück zur $\alpha 1\text{L}193\text{I}$ -Mutante, lediglich bei einer GABA-Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Abweichungen von den entsprechenden Bindungswerten der $\alpha 6$ -Wildtyprezeptoren. Während bei der Punktmutante in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ (Abb. 13C) die Reduktion der [^{35}S]TBPS-Bindung bei dieser GABA-Konzentration deutlich geringer ist als im $\alpha 6$ -Wildtyp, fällt die Bindung bei Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6\text{I}192\text{L}\beta 3\gamma 2$ (Abb. 13D) etwas stärker aus als die des Wildtyps.

Die in Tab. 11 aufgelisteten K_D -Werte für [^3H]Muscimol (siehe 2.2.5) lassen erkennen, dass sich die oben gezeigten Unterschiede in der [^{35}S]TBPS-Bindung zwischen Punktmutanten und ihren Wildtyprezeptoren nicht mit einer GABA-Affinitätsänderung erklären lassen.

Tab. 11: K_D -Werte für [^3H]Muscimol von Rezeptoren mit Einfachpunktmutanten in der α -Untereinheit im Vergleich zu Wildtyprezeptoren

Rezeptorkombination	K_D -Wert [nM]
$\alpha 1\beta 1\gamma 2$	$15,6 \pm 2,1$
$\alpha 1\text{N}188\text{L}\beta 1\gamma 2$	$23,6 \pm 11,3$
$\alpha 1\text{L}193\text{I}\beta 1\gamma 2$	$12,4 \pm 0,9$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$19,3 \pm 4,8$
$\alpha 1\text{N}188\text{L}\beta 3\gamma 2$	8,9
$\alpha 1\text{L}193\text{I}\beta 3\gamma 2$	3,4
$\alpha 6\beta 1\gamma 2$	$5,9 \pm 0,9$
$\alpha 6\text{L}187\text{N}\beta 1\gamma 2$	$11,2 \pm 1,7$
$\alpha 6\text{I}192\text{L}\beta 1\gamma 2$	$3,4 \pm 1,3$
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	$6,2 \pm 0,9$
$\alpha 6\text{L}187\text{N}\beta 3\gamma 2$	6,8
$\alpha 6\text{I}192\text{L}\beta 3\gamma 2$	9,7

Die K_D -Werte wurden mit dem in 2.2.5 erwähnten [^3H]Muscimol-Bindungsassay ermittelt ($n=3$). Angegeben sind die K_D -Werte \pm S.E.M.. Die K_D -Werte der Punktmutanten-enthaltenden Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha\beta 1\gamma 2$ unterschieden sich nicht signifikant von denen der entsprechenden Wildtyprezeptoren. K_D -Werte, deren Fehler nicht angegeben sind, wurden nur einmal bestimmt, da sie sich weder von ihrem $\beta 1$ -enthaltenden Partner, noch von den K_D -Werten der Doppelpunktmutanten-enthaltenden Rezeptoren (siehe Tab. 10) wesentlich unterscheiden.

Insgesamt lässt sich über die vier Punktmutanten sagen, dass die $\alpha 1\text{L}193\text{I}$ - und $\alpha 6\text{I}192\text{L}$ -enthaltenden Rezeptoren grundsätzlich vergleichbare [^{35}S]TBPS-Bindungskurven bei steigenden GABA-Konzentrationen wie die jeweiligen Wildtypen aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen GABA_A-Rezeptoren mit der $\alpha 1\text{N}188\text{L}$ -Punktmutante [^{35}S]TBPS-Bindungskurven, die vergleichbar mit denen der $\alpha 6$ -Wildtypuntereinheiten-enthaltenden Rezeptoren sind. Umgekehrt sind auch die Bindungskurven $\alpha 6\text{L}187\text{N}$ -enthaltender Rezeptoren vergleichbar mit denen der $\alpha 1$ -Wildtyprezeptoren. Dies zeigt, dass die Aminosäuren der Position 188 bzw. 187 in der $\alpha 1$ - bzw. $\alpha 6$ -Untereinheit eine Schlüsselrolle in der Ausprägung der GABA-Sensitivität spielen.

3.2.3.1. Ein- und Mehrfachpunktmutanten im Aminosäurenbereich 168 bis 185 der $\alpha 6$ -Untereinheit

Die Konstruktionen der Punktmutanten $\alpha 1\text{N}188\text{L}, \alpha 1\text{L}193\text{I}, \alpha 1_{162-166}\text{PKSEI}, \alpha 1\text{D}198\text{S}, \alpha 6\text{L}187\text{N}, \alpha 6\text{I}192\text{L}, \alpha 6\text{S}197\text{D}$ und $\alpha 6_{161-165}\text{TRAEV}$ (2.2.12.1) beinhalteten nicht alle Sequenzunterschiede zwischen den Fragmenten $\alpha 1$ -127bp und $\alpha 6$ -127bp (Abb. 4 und Abb. 3). Die verbleibenden Sequenzunterschiede zwischen den $\alpha 6$ -Positionen 168-185 wurden bei der Konstruktion weiterer Punktmutanten berücksichtigt. Exemplarisch wurden die Punktmutationen in die $\alpha 6$ -Untereinheit eingeführt.

Die Punktmutanten $\alpha 6\text{K}170\text{T}, \alpha 6\text{Y}175\text{R}, \alpha 6_{178-180}\text{VVA}, \alpha 6_{182-185}\text{DGSR}$ und $\alpha 6_{168-172}\text{EWKRE}$ wurden zum einen mit der Untereinheit $\gamma 2$ und der $\beta 1$ oder $\beta 3$ -Untereinheit transient in HEK 293-Zellen transfiziert und in [^{35}S]TBPS-Bindungsstudien (siehe 2.2.5) auf ihre GABA-Sensitivität überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 14 (A-E) im Überblick dargestellt.

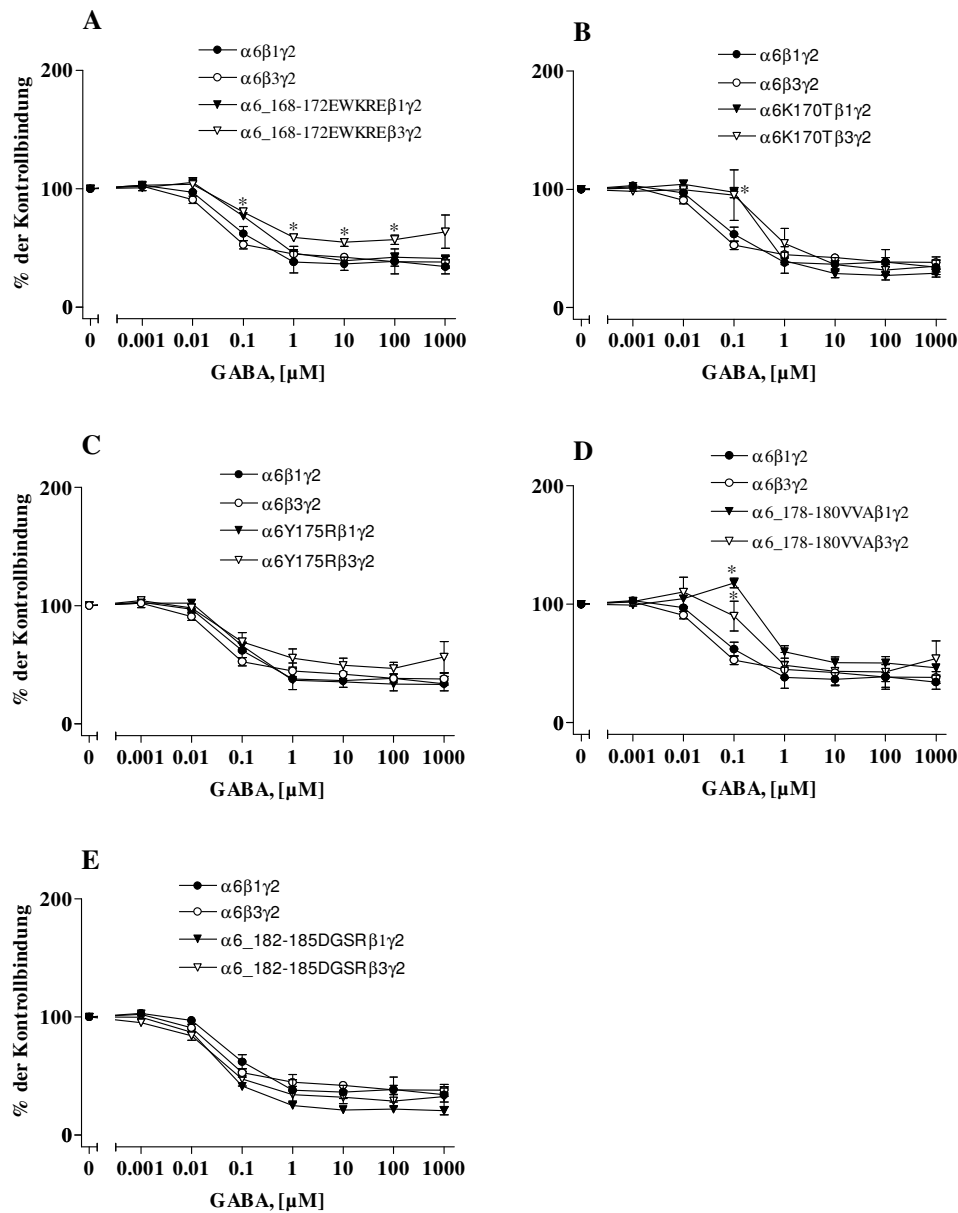


Abb. 14: Effekte von GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mit punktmutierten α -Untereinheiten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ (λ) bzw. $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ (O). Alle Punktmutanten in Kombination mit $\beta 1\gamma 2$ sind als auf dem Kopf stehende geschlossene Dreiecke (\blacktriangle), alle Punktmutanten in Kombination mit $\beta 3\gamma 2$ als offene auf dem Kopf stehende Dreiecke (∇) dargestellt. Bei drei der fünf Punktmutanten ($\alpha 6_{168-172}\text{EWKRE}$, A, $\alpha 6\text{K170T}$, B und $\alpha 6_{178-180}\text{VVA}$, C) wurden sowohl in Kombination mit $\beta 1$ als auch mit $\beta 3$ bei GABA-Konzentrationen von 0,1 μM um 20-50 % mehr gebundenes [³⁵S]TBPS gemessen als bei den Wildtyprezeptoren. Bei den Punktmutanten $\alpha 6\text{Y175R}$ und $\alpha 6_{182-185}\text{DGSR}$ wurden keine Unterschiede zu den Wildtyprezeptoren festgestellt.

Aus Abb. 14A wird deutlich, dass die Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindungen bei der Mutante $\alpha 6_{168-172}$ EWKRE, bei einer GABA-Konzentration von 0,1 μ M mit beiden β Untereinheiten, um ca. 20 % geringer war als bei den entsprechenden Wildtyp- $\alpha 6$ -Rezeptoren. Bei höheren GABA-Konzentrationen glich sich die Bindungskurve der Mutante $\alpha 6_{168-172}$ EWKRE $\beta 1\gamma 2$ der des entsprechenden Wildtyps an. Dahingegen verblieben $\alpha 6_{168-172}$ EWKRE $\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren im weiteren Verlauf der Kurve auf einem geringfügig höheren Niveau als $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren.

Ein ähnliches Bild zeigten die Mutante $\alpha 6$ K170T $\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 6$ K170T $\beta 3\gamma 2$ (Abb. 14B). Während die Wildtyprezeptoren bei einer GABA-Konzentration von 0,1 μ M bereits ihre [³⁵S]TBPS-Bindung um ca. 40 % verringerten, verblieben die Bindungen der Mutanten noch auf dem Ausgangswert. Bei weiter steigender GABA-Konzentration verliefen die Bindungskurven der punktmutierten GABA_A-Rezeptoren und der Wildtyprezeptoren gleich. Vergleichbare Kurvenverläufe kann man bei den Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6_{178-180}$ VVA $\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 6_{178-180}$ VVA $\beta 3\gamma 2$ (Abb. 14D) erkennen. Bei einer GABA-Konzentration von 0,1 μ M unterschieden sich die Bindungswerte der Mutanten deutlich von denen der Wildtyprezeptoren. Im Falle der $\beta 1\gamma 2$ -Kombination wurde bei dieser GABA-Konzentration anstelle der für $\alpha 6$ -Wildtyp erwarteten Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung eine Steigerung um ca. 20 % gemessen. Dies entspricht den Verhältnissen in $\alpha 1$ -enthaltenen Rezeptoren. Bei steigenden GABA-Konzentrationen waren die Messwerte jedoch $\alpha 6$ -typisch. Die [³⁵S]TBPS-Bindungswerte der Mutante in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 3$ und $\gamma 2$ unterscheiden sich bei 100 nM sowohl vom $\alpha 6$ -Wildtyp als auch von den $\alpha 6_{178-180}$ VVA $\beta 1\gamma 2$ -Rezeptoren.

Die in den Abb. 14C und Abb. 14E dargestellten Bindungskurven der Mutanten $\alpha 6$ Y175R und $\alpha 6_{182-185}$ DGSR zeigten sowohl in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ sowie in Kombination mit $\beta 3$ und $\gamma 2$ keine Abweichungen zu den [³⁵S]TBPS-Bindung der entsprechenden Wildtyprezeptoren.

Zusammengefasst zeigten drei ($\alpha 6_{168-172}$ EWKRE, $\alpha 6$ K170T und $\alpha 6_{178-180}$ VVA) der fünf $\alpha 6$ -Punktmutanten eine geringere Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung bei 0,1 μ M GABA als die entsprechenden $\alpha 6$ -Wildtyprezeptoren, dennoch ist in allen Kombinationen die halbmaximale Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung durch GABA (IC_{50} -Werte) in allen Punktmutanten $\leq 1 \mu$ M und entspricht daher der von $\alpha 6$ -enthaltenden Wildtyprezeptoren. Eine Bestimmung der K_D -Werte für [³H]Muscimol wurde bei den Mutanten $\alpha 6_{168-172}$ EWKRE und $\alpha 6$ K170T nicht durchgeführt, da sie sich in der biochemischen Überprüfung ([³⁵S]TBPS-Bindung) nur unwesentlich von den Wildtyprezeptoren unterschieden. Die K_D -Werte von $\alpha 6_{178-180}$ VVA $\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 6_{178-180}$ VVA $\beta 3\gamma 2$ sind in Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12: K_D -Werte für [^3H]Muscimol von Rezeptoren mit der 178-180VVA-Mutante in der $\alpha 6$ -Untereinheit im Vergleich zu entsprechenden Wildtyprezeptoren

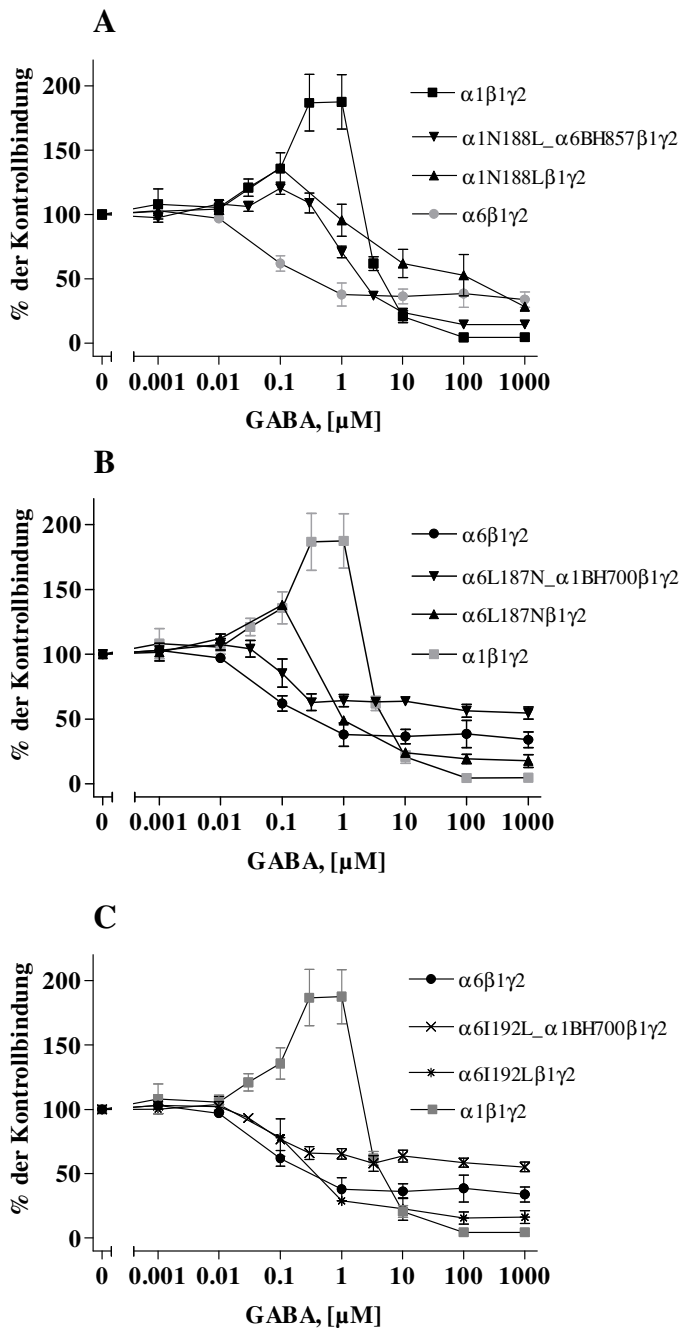
Rezeptorkombination	K_D -Wert [nM]
$\alpha 6\beta 1\gamma 2$	$5,9 \pm 0,9$
$\alpha 6_{178-180VVA}\beta 1\gamma 2$	$23,6 \pm 11,3$
$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	$6,2 \pm 0,9$
$\alpha 6_{178-180VVA}\beta 3\gamma 2$	$3,2 \pm 0,6$

Die K_D -Werte wurden mit dem in 2.2.5 erwähnten [^3H]Muscimol-Bindungsassay ermittelt (n=3). Angegeben sind die K_D -Werte \pm S.E.M. Der K_D -Wert der $\alpha 6_{178-180VVA}\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren unterschieden sich nicht signifikant von denen der entsprechenden Wildtyprezeptoren. Der K_D -Wert der $\alpha 6_{178-180VVA}\beta 1\gamma 2$ -Rezeptoren unterscheidet sich rechnerisch signifikant von dem des entsprechenden Wildtyps (P = 0,011). Der Unterschied ist jedoch nicht biologisch relevant.

3.2.3.2. [^{35}S]TBPS-Bindungsstudien von Punktmutanten in Kombinationen mit den Bsu I/Hind III-Chimären

Zur Überprüfung, ob die carboxyterminalen Molekülabschnitte der Untereinheiten $\alpha 1$ bzw. $\alpha 6$ ebenfalls einen Einfluss auf die GABA-Sensitivität oder GABA-Affinität haben, wurden die Punktmutanten N188L ($\alpha 1$), L187N ($\alpha 6$) und I192L ($\alpha 6$) in die Bsu I/Hind III-Chimären eingeführt (siehe Anhang: Abb. 17, Abb. 13 und 2.2.11.2).

Die resultierenden punktmutierten Chimären $\alpha 1\text{N188L}_{\alpha 6\text{BH858}}$, $\alpha 6\text{L187N}_{\alpha 1\text{BH700}}$ und $\alpha 6\text{I192L}_{\alpha 1\text{BH700}}$ wurden zusammen mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ kotransfiziert und in [^{35}S]TBPS-Bindungsstudien (siehe 2.2.5) auf ihre GABA-Sensitivität überprüft. Zur besseren Übersicht sind die Punktmutanten $\alpha 6\text{L187N}_{\alpha 1\text{BH700}}$ und $\alpha 6\text{I192L}_{\alpha 1\text{BH700}}$ in getrennten Graphen im direkten Vergleich zu den entsprechenden Punktmutanten in Abb. 15B und Abb. 15C dargestellt.

Abb. 15: Effekte von GABA auf die [³⁵S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mit

$\alpha 6L187N_ \alpha 1BH700$ -enthaltender Rezeptoren (siehe B) und weist damit keinen Unterschied zu $\alpha 6$ -Wildtyprezeptoren auf.

Beim Vergleich der Chimären $\alpha 1N188L_ \alpha 6BH858$ und $\alpha 1N188L$ mit den $\alpha 1$ -enthaltenden Wildtyprezeptoren (Abb. 15A) war zu erkennen, dass beide Chimären den $\alpha 1$ -typischen Anstieg der [³⁵S]TBPS-Bindung bei 0,1 μM GABA sehr abgeschwächt aufwiesen. Bei höheren GABA-Konzentrationen waren keine signifikanten Unterschiede der Mutanten im

mutierten α -Untereinheiten. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. bei n=3 bzw. n=4 bei $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Ist im Graphen der nicht-entsprechende Wildtyp mitaufgeführt, so sind dessen Meßpunkte grau dargestellt. In (A) ist die Bsu/Hind-Chimäre $\alpha 1-6BH857$ und deren Punktmutante $\alpha 1N188L_ \alpha 6BH858$ im Vergleich zum Wildtyp $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ (v) dargestellt. $\alpha 1-6BH857$ (◆) weicht trotz der zum Wildtyp unterschiedlichen [³⁵S]TBPS-Bindung bei höheren GABA-Konzentrationen nicht von dem für $\alpha 1$ -typischen IC₅₀-Wert ab. Die Punktmutanten $\alpha 1N188L_ \alpha 6BH858$ (τ) und $\alpha 1N188L\beta 1\gamma 2$ (σ) (siehe auch Abb. 13) zeigen gleiche Bindungsverhalten, die tendenziell in Richtung $\alpha 6$ -enthaltender Rezeptoren (λ) verschoben sind. In (B) wurden die $\alpha 6$ -analogen Gegenstücke mit dem Wildtyp $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ (λ) verglichen, wobei die [³⁵S]TBPS-Bindung der Chimäre $\alpha 6-1BH700$ (◆) deutlich einen $\alpha 6$ -Wildtyp-Charakter zeigt. Des Weiteren stimmen die Bindungswerte der Punktmutanten $\alpha 6L187N_ \alpha 1BH700$ (τ) nicht mit denen der $\alpha 6L187N$ -enthaltenden Rezeptoren (σ) (siehe auch Abb. 13) überein. Der Kurvenverlauf $\alpha 6L187N_ \alpha 1BH700$ -enthaltender Rezeptoren ähnelt eher dem $\alpha 6$ -Wildtyp, wobei jedoch die Bindungsreduktion um ca. 35 % geringer ausfällt. Die in (C) dargestellte Punktmutante $\alpha 6I192L_ \alpha 1BH700$ (×) zeigt einen identischen Kurvenverlauf zu

Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Die IC_{50} -Werte beider Chimären liegen zwischen $2 \mu\text{M}$ und $4 \mu\text{M}$ GABA. Somit konnte in beiden Fällen eine Verschiebung im Bindungsverhalten zum $\alpha 6$ -Wildtyp hin beobachtet werden.

Die komplementären Chimären $\alpha 6\text{L187N}_{\alpha 1\text{BH700}}$ und $\alpha 6\text{L187N}$ (Abb. 15B) zeigten nicht durchgehend das entsprechend reziproke Ergebnis zu Abb. 15A. Wie in Abb. 13 dargestellt, verhielten sich $\alpha 6\text{L187N}$ -enthaltende Rezeptoren ähnlich wie der $\alpha 1$ -Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigte die Chimäre $\alpha 6\text{L187N}_{\alpha 1\text{BH700}}$ eine Bindungskurve parallel zu dem des $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ -Wildtyprezeptors. Allerdings fiel die Bindung bei der Chimäre $\alpha 6\text{L187N}_{\alpha 1\text{BH700}}$ bei allen GABA-Konzentration um ca. 35 % geringer aus als beim $\alpha 6$ -Wildtyp. Dennoch waren die halbmaximalen Reduktionen der [^{35}S]TBPS-Bindungen der Mutante und des Wildtyps $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ vergleichbar (ca. $0,1 \mu\text{M}$).

In $\alpha 6\text{I192L}_{\alpha 1\text{BH700}}$ -enthaltenden Rezeptoren (Abb. 15C) waren keine wesentlichen Unterschiede zu $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ -Wildtyprezeptoren zu erkennen, wobei die maximale Abweichung vom Wildtyp 15-30 % der [^{35}S]TBPS-Bindung nicht überschreitet. Die [^{35}S]TBPS-Bindungskurven der beiden $\alpha 6$ -Chimären $\alpha 6\text{L187N}_{\alpha 1\text{BH700}}$ und $\alpha 6\text{I192L}_{\alpha 1\text{BH700}}$ verlaufen identisch.

Die in Tab. 13 aufgelisteten K_D -Werte der [^3H]Muscimol Gleichgewichtsbindungen dieser Chimären unterscheiden sich von den entsprechenden Wildtyprezeptoren um weniger als den Faktor 2, so dass ausgeschlossen werden kann, dass diesen Unterschieden eine Änderung der GABA-Affinität zugrunde liegen.

Nach den gesetzten Kriterien gibt es keinen biologisch relevanten Unterschied in den K_D -Werten für [^3H]Muscimol zwischen den Punktmutanten und den $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Chimären, die zusätzlich zu diesen Punktmutationen das Bsu/Hind-Fragment ausgetauscht haben.

Tab. 13: K_D -Werte für [^3H]Muscimol von Rezeptoren mit Punktmutanten plus ausgetauschtem Bsu/Hind-Fragment in den $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten im Vergleich zu Wildtyprezeptoren und Rezeptoren, die lediglich die entsprechende Punktmutation tragen.

Rezeptorkombination	K_D -Wert [nM]
$\alpha 1\beta 1\gamma 2$	$15,6 \pm 2,1$
$\alpha 1\text{N188L}\beta 1\gamma 2$	$23,6 \pm 17,6$
$\alpha 1\text{N188L}_{\alpha 6\text{BH857}}\beta 1\gamma 2$	$9,6 \pm 1,3$
$\alpha 6\beta 1\gamma 2$	$5,9 \pm 0,9$
$\alpha 6\text{L187N}\beta 1\gamma 2$	$11,2 \pm 1,7$
$\alpha 6\text{L187N}_{\alpha 1\text{BH700}}\beta 1\gamma 2$	$8,3 \pm 1,9$
$\alpha 6\text{I192L}\beta 1\gamma 2$	$3,4 \pm 1,3$
$\alpha 6\text{I192L}_{\alpha 1\text{BH700}}\beta 1\gamma 2$	$4,3 \pm 0,2$

Die K_D -Werte wurden mit dem in 2.2.5 erwähnten [^3H]Muscimol-Bindungsassay ermittelt (n=3). Angegeben sind die K_D -Werte \pm S.E.M. Weder in Rezeptoren mit der $\alpha 1$ - noch mit der $\alpha 6$ -Untereinheit als Grundgerüst konnten signifikante Unterschiede in den K_D -Werten der verschiedenen mutierten α -Untereinheiten untereinander oder zum Wildtyp festgestellt werden.

Zusammenfassend können aus den in Abb. 15 gezeigten Daten drei wesentliche Schlussfolgerungen gezogen werden: Erstens bleibt der Aminosäureaustausch $\alpha 6\text{I192L}$ ohne Auswirkung auf die GABA-Sensitivität. Zweitens werden die durch die Punktmutante

α 6L187N hervorgerufenen Veränderungen der [35 S]TBPS-Bindung durch den zusätzlichen Austausch des α 1Bsu36I/HindIII-700bp-Fragments rückgängig gemacht oder überdeckt. Drittens bewirkt die Chimäre α 1N188L_ α 6BH858 eine Änderung der α 1-typischen [35 S]TBPS-Bindung und eine Verschiebung des IC₅₀-Werts in einen Bereich, der für α 6-enthaltende Rezeptoren beschrieben wurde.

3.2.4. Eingrenzung der Bindungsstelle für Furosemid auf der α 6-Untereinheit

Wie eingangs beschrieben ist das Diuretikum Furosemid ein hoch subtypspezifischer Ligand des GABA_A-Rezeptors. In einem weiteren Ansatz dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Furosemid auf die Bindung von [35 S]TBPS untersucht. Es wurde überprüft, ob die ausgetauschten Sequenzabschnitte der α -Untereinheiten der in Absatz 2.2.11 und 3.2.2.3 beschriebenen Chimären eine Rolle für die Furosemid-Sensitivität spielen. Da Furosemid ausschließlich auf α 6- und α 4-enthaltenden GABA_A-Rezeptoren zusammen mit der β 2- oder β 3-Untereinheit einen agonistischen Einfluss hat (Korpi et al., 1995; Wafford et al., 1996; Knoflach et al., 1996), wurde die Wirkung von Furosemid in An- und Abwesenheit von 5 μ M GABA auf die α 6-Chimären-Rezeptoren α 6-1MA β 3 γ 2 (siehe 3.2.2.2), α 6-16MA β 3 γ 2 und α 6-61MA β 3 γ 2 sowie auf den Wildtyprezeptoren α 6 β 3 γ 2 getestet.

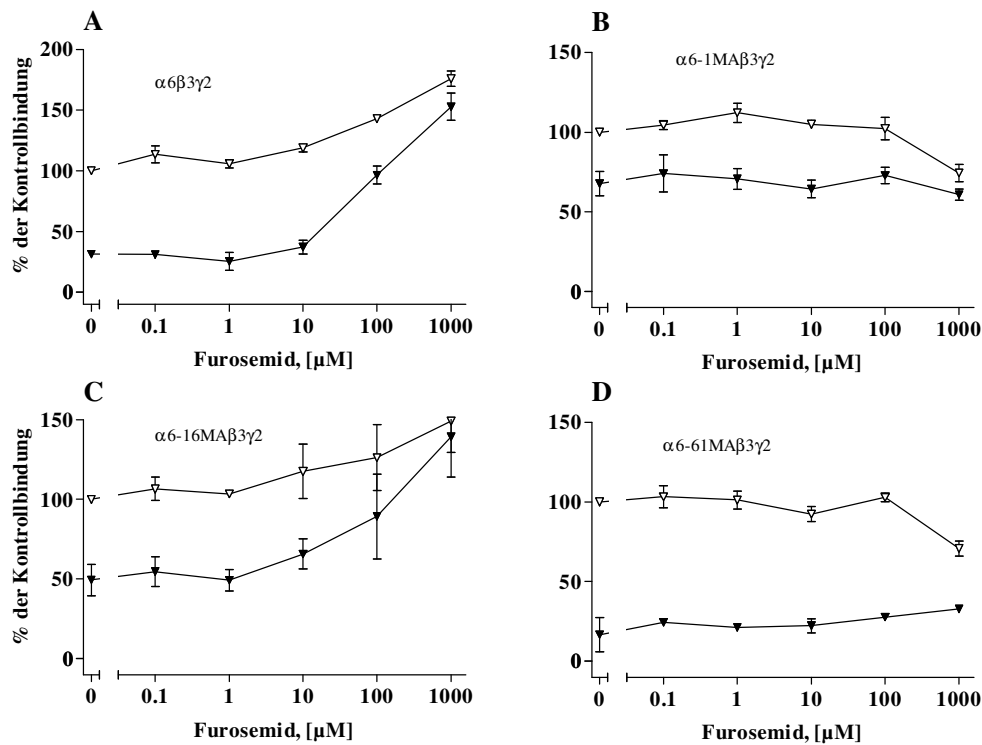


Abb. 16: Effekte von Furosemid \pm 5 μM GABA auf die [^{35}S]TBPS-Bindung in $\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren zusammen mit den Chimären $\alpha 6-1\text{MA}$, $\alpha 6-16\text{MA}$ und $\alpha 6-61\text{MA}$ im Vergleich zum $\alpha 6$ -Wildtyp. (∇) Offene Symbole stellen die alleinige Applikation von Furosemid dar, geschlossene Symbole (τ) die zusätzliche Gabe von 5 μM GABA. $\alpha 6$ - und die Chimäre $\alpha 6-16\text{MA}$ -enthaltenden Rezeptoren (A, C) zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der [^{35}S]TBPS-Bindung durch Furosemid. Dieser Effekt wird durch die zusätzliche Gabe von GABA um ca. 70 bzw. 50 % reduziert. Bei den Chimären $\alpha 6-1\text{MA}$ und $\alpha 6-61\text{MA}$ (B, D) zeigt lediglich die höchste Furosemid-Konzentration einen leicht antagonistischen Effekt. Im Falle der Chimäre $\alpha 6-1\text{MA}$ bleibt dieser Effekt auch nach zusätzlicher Applikation von GABA erhalten.

Bei $\alpha 6$ -Wildtyprezeptoren (Abb. 16A) führt Furosemid ab 10 μM zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der [^{35}S]TBPS-Bindung. Zusätzlich appliziertes GABA führt zu einer Reduktion der Bindung ohne den maximalen Effekt von Furosemid zu reduzieren. Ein vergleichbares Bild zeigt sich bei der Chimäre $\alpha 6-16\text{MA}$ (Abb. 16C), allerdings ist hier der maximale Effekt von Furosemid reduziert und die GABA-induzierte Verringerung der [^{35}S]TBPS-Bindung fällt mit ca. 50 % geringer aus als bei den $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren.

Ein völlig anderes Bild ergibt sich bei den Chimären $\alpha 6-1\text{MA}$ und $\alpha 6-61\text{M}$ (Abb. 16B, D). In beiden Fällen hat Furosemid keine Auswirkung auf die [^{35}S]TBPS-Bindung, lediglich bei der höchsten Konzentration von 1 mM reduziert Furosemid die [^{35}S]TBPS-Bindung auf ca. 70 %. Auch konnte Furosemid den Effekt von GABA auf die [^{35}S]TBPS-Bindung nicht antagonisieren.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das $\alpha 6-284\text{bp}$ -Fragment ($\alpha 6$ aa-Position 191-276) eine Schlüsselrolle bei der Furosemid-Sensitivität spielt.

4. Diskussion

In den letzten Jahren haben die Ergebnisse von Verhaltensexperimenten und molekularbiologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen dazu geführt, detailliertere Einblicke in die Pharmakologie von GABA_A-Rezeptoren zu erhalten. Dies ist von großem klinischen Interesse, da die medikamentöse Behandlung bei einigen psychiatrischen Erkrankungen am GABA_A-Rezeptor angreift. Ein Ziel ist es, Medikamente zu entwickeln, die auf bestimmte psychiatrische Erkrankungen angepasst sind und so spezifisch sind, dass störende Nebenwirkungen minimiert oder gar vermieden werden. Zusätzlich zu GABA binden auch Benzodiazepine, Neurosteroiden, Barbiturate, einige Anesthetika, Ethanol, Konvulsiva wie Picrotoxin und TBPS, das Diuretikum Furosemid, die Ionen Zink und Lanthan u.a. an den GABA_A-Rezeptor (Sieghart 1995; Korpi et al. 2002). In der klinischen Anwendung sollte eine den GABA_A-Rezeptor modulierende Substanz nicht die maximale Wirkung von GABA übersteigen, da sie damit nicht überdosierbar ist.

Einige der GABA_A-Rezeptor bindenden Substanzen haben ihre Bindungsstellen, bzw. wesentliche Teile ihrer Bindungsstellen auf dem N-terminalen extrazellulären Rezeptorabschnitt, wie z.B. GABA (Pritchett et al. 1989; Sigel et al. 1990; Sigel et al. 1992; Amin and Weiss 1993; Smith and Olsen 1994), während andere Bindungsstellen, beispielsweise die von TBPS, in der Kanalpore vermutet werden (Ramanjaneyulu and Ticku 1984);(Johnston 1996).

Obwohl es bisher noch nicht gelungen ist, die Zusammensetzung eines einzigen nativen GABA_A-Rezeptors zu bestimmen, ist die gewebespezifische Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im Gehirn durch *in situ*-Hybridisierungs-Experimente (Laurie et al. 1992; Laurie et al. 1992; Wisden et al. 1992) sowie immunohistochemische Daten (Hartig et al. 1995; Dunn et al. 1996; Nusser et al. 1996; Somogyi et al. 1996; Fritschy et al. 1998; Loup et al. 1998) bekannt. Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit war die Verteilung der α -Untereinheiten, da diese essentiell für die Ausbildung der GABA-Bindungsstellen sind. Die α 1-Untereinheit ist im Gehirn ubiquitär verteilt, wohingegen andere α -Untereinheiten bevorzugt in bestimmten Hirnregionen oder nur in einigen Entwicklungsstadien des ZNS vorkommen (Laurie et al. 1992; Macdonald and Olsen 1994; Rabow et al. 1995). α 2-enthaltende Rezeptoren beschränken sich auf nur wenige Strukturen des ZNS wie u.a. den zentralen Nucleus der Amygdala, Hippocampus, olfaktorischen Tuberkel, einige Bestandteile der Basalganglia sowie die Hauptbestandteile des Hypothalamus. α 3-enthaltende Rezeptoren befinden sich bevorzugt im Claustrum der Basalganglia und in einigen Strukturen des Septums und des Neocortexes. Die α 4-Untereinheit ist in allen Strukturen des Hippocampus, in fast allen Teilen des Thalamus und in einigen Basalnuclei zu finden. Untereinheiten mit sehr eingeschränkter Verteilung sind α 5 und α 6, wobei die erst genannte hauptsächlich im Hippocampus und α 6-enthaltende Rezeptoren nur postnatal und nahezu ausschließlich in den Granulazellen des Cerebellums vorkommen (Wisden et al. 1992).

4.1. GABA-Mimetika

Die Kenntnis über die Verteilung der verschiedenen α -Untereinheiten im Vertebratengehirn lässt sich nutzen, um eine mögliche Untereinheitenspezifität von GABA-Mimetika zu detektieren. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Autoradiographien an Rattenhirnschnitten durchgeführt, in denen die [^{35}S]TBPS-Bindung als funktioneller Marker verwendet wurde (Gee et al. 1988; Peris et al. 1991; Korpi et al. 1992; Sapp et al. 1992; Liljequist and Tabakoff 1993).

Die GABA-Mimetika Taurin, β -Alanin, Muscimol, Thiomuscimol, THIP und P4S ließen nur geringe Unterschiede in den verschiedenen Hirnregionen erkennen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Bureau & Olsen (Bureau and Olsen 1991) überein, die zeigten, dass sich die IC_{50} -Werte in den unterschiedlichen Hirnregionen für verschiedene GABA-Mimetika lediglich um einer 10er Potenz unterschieden. In den Autoradiographien haben die endogenen Substanzen β -Alanin und Taurin in den verschiedenen Hirnregionen ein ähnliches [^{35}S]TBPS-Bindungsprofil wie GABA (siehe Tab. 4), was auf gleiche Bindungsmechanismen am Rezeptor hindeutet.

Ein um den Faktor 2 oder 3 verschobener IC_{50} -Wert ist wahrscheinlich nicht biologisch relevant, weil die verwendeten GABA-Konzentration weit unterhalb der angenommenen möglichen synaptischen GABA-Konzentrationen (ca. 300-1000 μM) liegen.

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob es sich bei den synthetischen Substanzen THIP und P4S um partielle oder volle Agonisten handelt. Wong & Iversen (Wong and Iversen 1985) zeigten an corticalen Membranen mit Hilfe der [^3H]Diazepam-Bindung, dass sowohl THIP als auch P4S bei 23° C teilweise die Effekte von Muscimol antagonisierten, was nach der Beschreibung des Bindungsverhaltens (Goldstein 1974, S.99ff) mit dem eines partiellen Agonisten übereinstimmt. Wurden die Versuche bei 37° C durchgeführt, zeigte THIP Bindungseigenschaften eines vollen Agonisten, während P4S weiterhin partiell agonistische Aktivität aufwies. Karobath & Lippitsch (Karobath and Lippitsch 1979) stuften THIP ebenfalls als einen partiellen Agonisten ein, da seine Stimulierung auf die Benzodiazepin-Bindung auf Membranen des cerebralen Cortex deutlich geringer war als die von GABA. Maksay (Maksay 1994) maß die Verdrängung des radioaktiv markierten GABA-Antagonisten [^3H]SR 95531 von der niedrig affinen GABA_A -Rezeptor-Agonistenbindungsstelle an Membranen ganzer Rattenhirne u.a. unter Einfluss verschiedener Agonisten und Antagonisten und bestimmte die Änderungen in den thermodynamischen Parametern. Er stufte THIP als partiellen Agonisten ein, da die Enthalpie seiner Bindungsinteraktionen unverändert blieb, während Antagonisten charakteristischerweise eine positive und Agonisten eine negative Enthalpieänderung zeigten. Falch et al. (Falch et al. 1985) zeigten, dass sich P4S als partieller Agonist nur in Bezug auf die Benzodiazepin-Bindung darstellte. Gleichermaßen zeigten dies andere Arbeitsgruppen für THIP (Supavilai and Karobath 1980; Skerritt and Johnston 1983). Allerdings räumten Krogsgaard-Larsen et al. (Krogsgaard-Larsen et al. 1977; Byberg et al. 1987) für THIP die Möglichkeit ein, dass es - ungeachtet seiner Charakterisierung als partieller Agonist *in vitro* - im ZNS von Säugern *in vivo* ein voller Agonist sein könnte. THIP zeigte bei Versuchen an Interneuronen des dorsalen Horns im Rückenmark und an Renshaw-Zellen von Katzen gleiche inhibitorische Wirkung zur Verhinderung von Aktionspotentialen wie GABA.

Zusätzlich zu Bindungsstudien wurden viele elektrophysiologische Untersuchungen mit THIP und P4S durchgeführt. Nach Ableitungen an *Xenopus laevis* Oozyten, die parallel GABA_A-Rezeptoren der Ratte und homomere $\rho 1$ -GABA_B-Rezeptor exprimierten, wurden THIP und P4S als partielle Agonisten eingestuft, da die durch diese beiden Substanzen hervorgerufenen maximalen Cl⁻-Ströme geringer waren als die durch GABA erzeugten (Woodward et al. 1993). Die Arbeitsgruppen um Wafford (Wafford et al. 1996) wendeten die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode bei *Xenopus laevis* Oozyten an, die rekombinante humane GABA_A-Rezeptoren exprimierten. Die zum Erreichen der EC₅₀-Werte (Konzentration zur halbmaximalen Induktion der Cl⁻-Ströme) benötigten THIP-Konzentrationen war bei den Rezeptorkombinationen $\alpha 1\beta 1\gamma 2$, $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 4\beta 1\gamma 2$ deutlich höher als für GABA. Dies traf insbesondere bei $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren zu, in denen die 25-fache THIP-Konzentration benötigt wurde. Anhand des gleichen Zellsystems demonstrierten Ebert et al. (Ebert et al. 1994), dass die EC₅₀-Werte und die relative Effizienz von GABA-Agonisten stark mit der Untereinheitenzusammensetzung der rekombinanten Rezeptoren einhergeht. P4S zeigte beispielsweise geringe partielle agonistische Aktivität in Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1\beta 1/2/3\gamma 2$ (zwischen 28 und 38 %), während es sich am Rezeptorsubtyp $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ mit einer maximalen Effizienz von 99 % und einem EC₅₀-Wert, der um einen Faktor 3 größer war als der von GABA als voller Agonist darstellt. THIP generierte in diesen Versuchen in Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1\beta 1/2/3\gamma 2$ ebenfalls partielle agonistische Wirkung (zwischen 70 und 78 %), im Gegensatz dazu war die partielle agonistische Wirkung im $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ -Subtyp mit 44 % geringer als in $\alpha 1\beta 1/2/3\gamma 2$ -Rezeptoren. Um festzustellen, ob die funktionellen Unterschiede von THIP und P4S durch unterschiedliche Affinitäten der Substanzen verursacht werden, haben die Autoren [³H]Muscimol Bindungsstudien durchgeführt (Ebert et al. 1997). Sie fanden heraus, dass sich die K_i-Werte gegen [³H]Muscimol für die untersuchten Agonisten in verschiedenen Rezeptorkombinationen maximal um einen Faktor 10 unterscheiden, während sich in der Elektrophysiologie in den verschiedenen Rezeptorkombinationen die Potenzen dieser Substanzen bis zu einem Faktor 50 variieren können. Beispielsweise zeigten $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren im Vergleich mit den anderen α -Untereinheiten sowohl die größte Affinität als auch die höchste Potenz. In diesem Fall zeigte THIP bei vergleichbaren K_i-Werten zu GABA fast volle agonistische Aktivität, während P4S nur schwach agonistisch wirkte. Insgesamt folgerten die Autoren, dass die Kopplungsmechanismen zwischen Agonistenbindung und Kanalöffnung im hohen Maß von der Rezeptorkombination abhängig ist, während die Rezeptorkombination bei der Interaktion der Agonisten mit ihrer Bindungsstelle eine untergeordnete Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit zeigten THIP und P4S in den mit Hilfe der [³⁵S]TBPS-Autoradiographien durchgeführten *in situ*-Experimenten volle agonistische Aktivität. P4S inhibierte einerseits bei alleiniger Gabe die [³⁵S]TBPS-Bindung durchschnittlich in allen Hirnregionen vergleichbar zu GABA (54 % im Vergleich zu 27 % bzw 63 % bei 5 μ M bzw. 2 μ M GABA, siehe Tab. 5). Bereits bei einer Konzentrationen von 100 μ M inhibierte es die [³⁵S]TBPS-Bindung um ca. 80 %. Zudem verstärkte P4S sowohl bei niedriger als auch bei hoher GABA-Konzentrationen die Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung (Tab. 5).

Auch im Falle von THIP konnten die *in situ*-Experimente die *in vitro* durchgeführten

elektrophysiologischen Untersuchungen von Ebert et al. (Ebert et al. 1997) nicht bestätigten. Obwohl die Autoren bei $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -enthaltenden Rezeptoren für THIP und P4S eine partielle agonistische Wirkung gemessen haben (70-78 % bzw. 21-32 %), wurde in den [35 S]TBPS-Autoradiographien in allen Hirnregionen eine volle agonistische Wirkung der beiden Substanzen festgestellt. Dies lässt den Schluss zu, dass *in situ* andere bzw. zusätzliche Kopplungsmechanismen als *in vitro* eine Rolle spielen. Anderenfalls müßte sich die *in vitro* beobachtete partielle Aktivität von THIP und P4S in den Autoradiographien widerspiegeln, da in allen Hirnregionen mindestens die Hälfte aller GABA_A-Rezeptoren die $\alpha 1$ -Untereinheit enthalten. Allerdings muss man bei der Interpretation der Autoradiographien berücksichtigen, dass der Prozentsatz der $\alpha 3$ -enthaltenden Rezeptoren nicht ausreicht, um Unterschiede mit dieser Methode zu detektieren. Weiterhin könnte die Verteilung von $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren zu ubiquitär sein, um hirnrregionen-spezifische Variationen in der [35 S]TBPS-Bindung zu erkennen.

Ein weiterer putativer partieller Agonist, 4-PIOL (5-(4-Piperidyl)isoxazol-3-ol), wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl in [35 S]TBPS-Bindungsstudien als auch in [35 S]TBPS-Autoradiographien analysiert. Diese beiden Assays zur Bestimmung der GABA_A-Rezeptor-Sensitivität ergänzen sich: Bei der Autoradiographie werden unter *in situ*-Bedingungen unterschiedliche GABA_A-Rezeptorsubtypen in einer Hirnregion erkannt, während in rekombinanten Systemen unter *in vitro*-Bedingungen ausschließlich definierte Subtypen betrachtet werden können, so dass die verschiedenen Subtypen auffälliger Hirnregionen separat betrachtet werden können.

4-PIOL reduzierte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten [35 S]TBPS-Autoradiographien die Basalbindung in einem deutlich geringeren Ausmaß als 2 μ M GABA (92 % versus 63 %) (Tab. 5). Mit diesen Daten konnte 4-PIOL nicht eindeutig als partieller Agonist oder voller Agonist mit geringer Potenz charakterisiert werden. Korpi & Lüddens (Korpi and Lüddens 1993) konnten in rekombinanten $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren zeigen, dass durch partielle Agonisten die [35 S]TBPS-Bindung über das Maß der Basalbindung hinaus erhöht wird, wenn das Verhältnis GABA : partiellem Agonist zu wirksamen GABA-Konzentrationen führt, die im Peak-Bereich der [35 S]TBPS-Bindung liegen.

Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen unterstützen die Annahme, dass es sich bei 4-PIOL um einen partiellen Agonisten handelt. An Gesamthirnpräparationen der Ratte bestätigte Maksay (Maksay 1994) diese Einstufung mit Hilfe von Bindungsstudien, in denen die Verdrängung des radioaktiv markierten Antagonisten [3 H]SR 95531 und die Änderungen thermodynamischer Parameter dieser Bindungsvorgänge gemessen wurden. Des Weiteren erwies sich 4-PIOL in elektrophysiologischen Untersuchungen *in vivo* an spinalen Neuronen und Renshaw-Zellen von Katzen als partieller GABA_A-Rezeptor-Agonist (Byberg et al. 1987). Dem entgegen konnten die Autoren *in vitro* keine Stimulierung der [3 H]Diazepam-Bindung durch 4-PIOL feststellen (Byberg et al. 1987). Kristiansen et al. (Kristiansen et al. 1991) erstellten ein Agonisten/Antagonisten-Profil für 4-PIOL mit Hilfe der "whole-cell patch clamp"-Technik (Ganzzellvariante der Spannungsklemmen-Technik) an kultivierten Neuronen des Hippocampus von Ratten. 4-PIOL war 200-fach weniger potent, eine GABA_A-

Rezeptor-Antwort hervorzurufen, als der volle Agonist Isoguvacin. Passend dazu antagonisierten steigende Konzentrationen von 4-PIOL die Rezeptor-Antwort auf 20 μM Isoguvacin. In Anlehnung an die Versuche von Byberg et al. (Byberg et al. 1987) führten die Autoren zusätzlich zwei Versuche an spinalen Neuronen der Maus durch und fanden die Ergebnisse der an Neuronen des Hippocampus durchgeführten Experimente bestätigt. Frølund et al. (Frolund et al. 1995) unterstützten mit elektrophysiologischen Untersuchungen ("whole-cell patch clamp"-Ableitungen) an kultivierten Neuronen des cerebralen Cortex, dass 4-PIOL ein partieller Agonist ist. Es zeigte im Gegensatz zum vollen GABA_A-Rezeptor-Agonisten Isoguvacin nur 30-35 % relative Effizienz bei einem EC₅₀-Wert von ca. 10 μM .

Die Hinweise darauf, dass 4-PIOL GABA-mimetisch wirkt, wurden in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten [³⁵S]TBPS-Autoradiographien weiterführend durch Versuchsreihen mit der zusätzliche Gabe von GABA bestätigt: bei 2 μM GABA plus 300 μM 4-PIOL änderte sich die Reduktion der [³⁵S]TBPS-Bindung nicht gegenüber den Bindungsraten von 4-PIOL alleine (Tab. 5, Abb. 6). Die einzige Ausnahme zeigte sich in der Granulazellschicht des Cerebellums, die reich an $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren ist. Hier reduzierte zusätzlich appliziertes GABA die [³⁵S]TBPS-Bindung auf ca. 50 % des Wertes von 4-PIOL alleine.

Hinweise auf einen partiellen Agonisten ließen sich in den [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien *in vitro* finden. In Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ konnte erst ab 30 μM 4-PIOL (Abb. 7A) die Wirkung von 3 μM GABA signifikant reduziert werden. In Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ zeigte 4-PIOL nur bei der höchsten Konzentration (300 μM) eine antagonistische Wirkung gegenüber 1 μM GABA (Abb. 7B).

Das Zusammenwirken von mehreren verstärkenden Faktoren auf $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren bzw. das Zusammenwirken von mehreren abschwächenden Faktoren auf $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren könnte zu einem vollständigen Ausgleich der positiven und negativen Effekte auf die [³⁵S]TBPS-Bindung führen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse an rekombinanten Rezeptoren gestützt, die zeigten, dass Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ erheblich mehr [³⁵S]TBPS in Anwesenheit als in Abwesenheit von 4-PIOL banden, während unter gleichen Bedingungen bei $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren keine Erhöhung der [³⁵S]TBPS-Bindung beobachtet werden konnte. Des Weiteren werden diese Ergebnisse durch elektrophysiologische Untersuchungen (Rabe et al. 2001) unterstützt. In Abwesenheit von GABA wirkt 4-PIOL als schwacher Agonist auf $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren, weil es maximal 5 % der GABA-induzierten Antwort hervorrief.

Hingegen ließen die Versuchsergebnisse in $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren keinen eindeutigen Schluss über die Lokalisation der Bindungsstelle und den Wirkmechanismus von 4-PIOL zu. In den [³⁵S]TBPS-Autoradiographien konnte bei der alleinigen Wirkung von 4-PIOL nicht festgelegt werden, ob es ein agonistisch wirkender Modulator oder ein schwacher Agonist ist. Auch die Daten mit 4-PIOL und GABA konnten keine weitere Präzision erzielen, da im Falle eines Modulators GABA entweder die Modulation der [³⁵S]TBPS-Bindung durch 4-PIOL unterdrückt oder die Auswirkung der Modulation so schwach ist, dass sie von der GABA-Wirkung vollständig überdeckt wird. Im Falle eines schwachen Agonisten könnte auch hier die Auswirkung von 4-PIOL von der sehr viel stärkeren GABA-Wirkung überdeckt werden.

Die [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien an $\alpha 6$ -enthaltenden rekombinanten Rezeptoren konnte ebenfalls keinen eindeutigen Hinweis liefern, ob die GABA-Bindungsstelle mit der 4-PIOL-Bindungsstelle identisch ist: 4-PIOL alleine zeigt keine Auswirkung auf die [³⁵S]TBPS-Bindung, was entweder auf eine zu geringe Konzentration des Modulators 4-PIOL zurückzuführen ist oder ein Hinweis darauf ist, dass 4-PIOL ein Antagonist ist, der alleine keine intrinsische Wirkung zeigt, jedoch in Kombination mit GABA dessen Wirkung abschwächt.

Dagegen lieferten die von H. Rabe (Rabe et al. 2001) durchgeführten elektrophysiologischen Experimente mit der "whole-cell patch clamp"-Technik an rekombinanten $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren der Ratte deutliche Hinweise auf eine allosterische Bindungsstelle für 4-PIOL. Wie ein negativer Modulator reduziert 4-PIOL hier bei allen getesteten GABA-Konzentrationen, die kleiner waren als der putative GABA EC₁₀₀, die Amplituden der Cl⁻-Ströme bei der jeweiligen 4-PIOL-Konzentration in gleichem Maße. Desweiteren zeigten diese Daten eindeutig, dass 4-PIOL nicht GABA-mimetisch wirkt, was im Widerspruch zu den [³⁵S]TBPS-Autoradiographien steht.

Die Hypothese, dass 4-PIOL ein negativer Modulator ist, wird unterstützt durch die Befunde von Kristiansen et al. (Kristiansen et al. 1995) an embryonalen Neuronen des Bulbus olfactorius. In diesem Zellsystem war 4-PIOL nicht in der Lage, wiederholende, lang anhaltende Kanalöffnungen des GABA_A-Rezeptors zu induzieren, was darauf hindeutet, dass 4-PIOL unfähig ist, einen stabil geöffneten Kanalzustand hervorzurufen.

Eine zweite Fragestellung, die im Rahmen der Untersuchungen der GABA-Mimetika geklärt werden sollte, war die nach einer möglichen Korrelation der Aktivität der verschiedenen GABA-Agonisten und gehirn-areal spezifisch exprimierten GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Die Effekte aller GABA-Mimetika zeigten gleich starke Varianz sowohl in bevorzugt $\alpha 1$ -exprimierenden Hirnregionen als auch in solchen Hirnarealen, in denen auch andere α -Untereinheiten stark exprimiert werden. Daraus muss geschlossen werden, dass es keine unmittelbare Korrelation zwischen den verschiedenen α -Untereinheiten und den Effekten der Agonisten gibt. Eine Verdeutlichung hierfür liefert die Granulazellschicht des Cerebellums mit seiner einzigartigen Population an $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren, welche eine 30-fach höhere GABA-Sensitivität im Vergleich zu $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren hervorruft (Korpi and Lüddens 1993). Selbst unter Verwendung eines verbesserten Präinkubationsschrittes, um endogenes GABA und andere endogene Agonisten auszuwaschen, konnte keine erhöhte [³⁵S]TBPS-Bindung im Cerebellum gemessen werden (Makela et al. 1997). Die Effekte der exogenen Agonisten waren in der Granulazellschicht nur geringfügig höher als beim Durchschnitt der anderen Hirnregionen, obwohl hier aufgrund der hohen Dichte $\alpha 6$ -enthaltender Rezeptoren und ihrer höheren Sensitivität gegenüber GABA-Agonisten eine erhöhte [³⁵S]TBPS-Bindung zu erwarten gewesen wäre. Des Weiteren zeigte sich GABA in den beiden $\alpha 1$ -reichen und $\alpha 6$ -freien Gehirnstrukturen, Bulbus olfactorius und Molekularzellschicht des Cerebellums genauso effizient wie in der Granulazellschicht. Zusammenfassend lassen die gesamten Daten den Schluss zu, dass die Effekte von 4-PIOL auf die GABA-Bindungsstelle oder/und auf den Kopplungsmechanismus des Ionenkanales vielschichtig ist. Zum einen scheint 4-PIOL über die GABA-Bindungsstelle als schwacher partieller Agonist, zum anderen über eine allosterisch, modulierende Bindungsstelle als

negativer Modulator zu wirken. Hervorstechend an 4-PIOL ist, dass seine partiell agonistische bzw. modulatorische Wirkung subtypspezifisch ist und damit möglicherweise einerseits ein nützliches Werkzeug zum Studium der Verhältnisse von Hirnstrukturen und ihren Funktionen bietet und andererseits zum Verständniss der Kopplung zwischen GABA und Bindungsstellen innerhalb oder nahe der Kanalpore bei verschiedenen nativen, rekombinanten und mutierten GABA_A-Rezeptoren beitragen kann.

4.2. GABA-Sensitivität

Bei Untersuchungen der Effekte von GABA auf den GABA_A-Rezeptor muss zwischen Änderungen der GABA-Affinität und der GABA-Sensitivität (Potenz) unterschieden werden. Die GABA-Affinität beschreibt die initiale Bindung und die Dissoziation des Agonisten an den inaktiven Rezeptor, die GABA-Sensitivität beschreibt alle auf die initiale Bindung folgenden transduzierten Effekte, wie z.B die Stabilität des geöffneten Zustandes des Ionenkanals, der durch Bindung des Agonisten an das Rezeptorprotein durch Konformationsänderung hervorgerufen wird. Diese beiden Parameter des Rezeptors stehen immer in einer Wechselbeziehung zueinander und lassen sich mit funktionellen Assays experimentell nur schwer voneinander separieren (Colquhoun 1998). Bereits 1956 postulierte Stephenson (zitiert in Colquhoun 1998), dass ein Agonist nicht nur durch eine Affinitätskonstante beschrieben werden kann, sondern zusätzliche Informationen seiner aktivierenden Wirkung auf den Rezeptor notwendig sind.

Neben bekannten Punktmutanten (Y157, Y205, T160 T202 bzw Y97, L99) in der β 2-Untereinheit der Ratte, die die Agonisten-Bindung beeinflussen (Amin and Weiss 1993; Boileau et al. 2002) zeigten Sigel et al. (Sigel et al. 1992), dass in der α 1-Untereinheit die Substitution des Phenylalanins durch Leucin an der Position 64 die GABA-Affinität drastisch beeinflusst. Die Zugehörigkeit der Aminosäure F64 der α -Untereinheit zur GABA-Bindungsstelle wurde von Smith & Olsen (Smith and Olsen 1994) direkt durch photoaffine Markierungen bestätigt. Zusätzlich identifizierten Boileau et al. (Boileau et al. 1999) die Aminosäuren Arginin und Serin (R66 bzw. S68) als Elemente der GABA-Bindungsstelle. Gleichgerichtet waren die Ergebnisse von Westh-Hansen et al. (Westh-Hansen et al. 1997): Sie fanden mit "whole-cell patch clamp"-Ableitungen rekombinanter humaner GABA_A-Rezeptoren eine Verschiebung der GABA-Affinität um eine 10er Potenz, wenn die Aminosäuren Isoleucin an der Position 121 der α 1-Untereinheit durch ein Valin ausgetauscht wurde. Weiterhin zeigten die Autoren, dass nach Substitution des Arginins an Position 120 gegen ein Lysin (R120K) keine spezifische Bindung von [³H]Muscimol oder [³H]SR 95531 bis zu einer Konzentration von 40 nM in α 1R120K β 2 γ 2s-Rezeptoren festgestellt werden konnte. Zusätzlich konnten sie bei einem zum Wildtyp vergleichbaren K_D-Wert für die Benzodiazepinbindung in diesen Rezeptoren keine Verstärkung der Benzodiazepinbindung detektieren. Die Dosis-Antwortkurve GABA-induzierter Cl⁻-Ströme war in der Mutante um den Faktor 180 weniger sensitiv als beim Wildtyp (Westh-Hansen et al. 1999).

Im Gegensatz dazu konnten Korpi & Lüddens zeigen, dass weitere untereinheitenspezifische Unterschiede in der GABA-Antwort auftraten, die nicht auf Veränderungen der GABA-Affinität beruhen (Korpi and Lüddens 1993), sondern auf Unterschiede in der GABA-Sensitivität. Sie stellten fest, dass ein deutlicher Unterschied in

der Modulation der [³⁵S]TBPS-Bindung zwischen der Granulazellschicht des Cerebellums und anderen Hirnregionen auftrat, wenn die GABA-Bindungsstellen mit dem GABA-Antagonisten Bicucullin besetzt wurden (Korpi et al. 1992). Die basale [³⁵S]TBPS-Bindung in der Granulazellschicht war geringer als die in anderen Hirnregionen. Diese Verhältnisse drehten sich jedoch um, wenn Bicucullin zugegeben wurde. Aufgrund dieser Sonderstellung der Granulazellschicht folgerten Korpi & Lüddens (Korpi and Lüddens 1993), dass die GABA_A-Rezeptoren der Granulazellschicht des Cerebellums besonders sensitiv gegenüber GABA seien. In [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien mit rekombinanten Rezeptoren wurde daraufhin versucht, die Subtypspezifitäten (Lüddens et al. 1990; Laurie et al. 1992; Wisden et al. 1992) der verschiedenen Hirnregionen nachzuempfinden. Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ wurden repräsentativ für den ubiquitär vorkommenden Rezeptorsubtyp verwendet und dem nahezu ausschließlich in der Granulazellschicht vorkommenden $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -Subtyp gegenüber gestellt. In der [³⁵S]TBPS-Bindung zeigte sich, dass die $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren gegenüber GABA mindestens 10 mal sensitiver sind als $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren.

In diesem Zusammenhang sind der K_D -Wert, die Dissoziationskonstante bzw. der K_i -Wert, die Inhibitionskonstante, wichtige Größen. Sie geben an, bei welcher Konzentration die Hälfte aller Rezeptoren besetzt sind. Vergleichbare K_D -Werte für [³⁵S]TBPS und [³H]Muscimol bzw. vergleichbare K_i -Werte für die Verdrängung von GABA durch [³H]Muscimol für die Rezeptorkombinationen $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ ließen die Autoren vermuten, dass der Sensitivitätsunterschied gegenüber GABA nicht mit den Bindungseigenschaften an der GABA- oder der TBPS-Bindungsstelle zusammenhängt, sondern durch eine Beeinflussung allosterischer Kopplungsmechanismen zustande kommt.

Aufgrund der genannten Befunde und bekannten Unterschiede zwischen $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren in den IC_{50} -Werten von GABA (Ducic et al. 1995) wurde in der vorliegenden Arbeit nach der molekularen Grundlage dieser Unterschiede gesucht. Dies geschah mit Hilfe von Chimären zwischen den $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten, deren Ausgangskonstrukte von H. Wieland et al. (Wieland et al. 1992) in Zusammenhang mit der Benzodiazepin-Sensitivität hergestellt worden waren. Ausgehend von der Beobachtung, dass in Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha x\beta 2\gamma 2$ $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren, im Gegensatz zu den $\alpha 6$ -enthaltenden, eine hohe Sensitivität gegenüber Diazepam aufweisen, konstruierten sie Chimären zwischen der $\alpha 1$ - und der $\alpha 6$ -Untereinheit, in denen Sequenzabschnitte beginnend nach dem Cystein-Loop bis zur TM3-Region ausgetauscht wurden.

Zeigten sich in den [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien signifikante Unterschiede zwischen Rezeptoren mit einer sequenzveränderten α -Untereinheit und den Wildtyprezeptoren, so wurde anhand der K_D -Werte für [³H]Muscimol überprüft, ob den Veränderungen der TBPS-Bindungswerten eine Verschiebung der GABA-Affinität zugrunde lag. Wiesen Rezeptoren mit sequenzveränderter α -Untereinheit einen signifikant verschiedenen und für diese Experimente festgelegten biologisch relevanten K_D -Wert auf, so beschreibt dieser eine Verschiebung der Bindungsaffinität von GABA zum Rezeptor und damit eine Änderung der Aminosäure-Sequenz, die die Bindungsstelle(n) von GABA beeinflusst. Unterscheiden sich die K_D -Werte zweier α -Untereinheiten (in gleicher $\beta\gamma$ -Kombination) nicht signifikant voneinander, so ist von einer gleichen GABA-Affinität auszugehen. Findet man α -Untereinheiten, die bei gleichen K_D -Werten unterschiedliches [³⁵S]TBPS-Bindungsverhalten

aufweisen, so liegt deshalb eine Verschiebung der GABA-Sensitivität vor. Einschränkend muß allerdings erwähnt werden, dass die K_D -Werte im Bindungsgleichgewicht ermittelt werden und nicht unter dynamischen Bedingungen wie die [^{35}S]TBPS-Bindung.

Zur Charakterisierung der GABA-Sensitivität aller Rezeptoren, deren α -Untereinheit sequenziell verändert worden war, wurde die [^{35}S]TBPS-Bindung verwendet, die als funktioneller Marker rekombinanter GABA_A-Rezeptoren gut beschrieben ist (Korpi and Lüddens 1993; Im et al. 1994; Lüddens et al. 1994; Wafford et al. 1994; Korpi et al. 1995). Dabei wurde nach drei Kriterien bewertet: das Auftreten oder Fehlen des $\alpha 1$ -typischen Anstiegs der Bindungsrate im Bereich zwischen 0,1 und 1 μM GABA, der graphisch ermittelte IC_{50} -Wert und der Vergleich der Bindungsraten unter Verwendung der $\beta 1$ - und der $\beta 3$ -Untereinheiten. D.h., gesucht wurde nach unterschiedlichen Sequenzabschnitten/Aminosäuren zwischen den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$, die sich in einem oder mehreren dieser drei Kriterien unterscheiden, aber keine biologisch relevante Veränderung der GABA-Affinität hervorriefen.

In [^{35}S]TBPS-Bindungsstudien zeigten die Chimären $\alpha 1$ -6MA und $\alpha 6$ -1MA (Abb. 10 und Abb. 17) unterschiedliche Antworten auf steigende GABA-Konzentrationen. Es existieren deutliche Hinweise darauf, dass die Bindungsstelle für GABA N-terminal des Cystein-Loops gelegen ist (Sigel et al. 1992; Amin and Weiss 1993). Weiterführend kann aufgrund der unterschiedlichen GABA-Antworten von Rezeptoren, in denen Genabschnitte zwischen den Restriktionsschnittstellen Mlu I und Aoc I in den α -Untereinheiten ausgetauscht worden waren (Abb. 17), angenommen werden, dass zusätzlich zur GABA-Bindungsstelle weitere Bereiche der $\alpha 1$ -Untereinheit an der Rezeptorreaktion auf GABA beteiligt sind. Diese Bereiche nehmen Einfluss auf die GABA-Sensitivität, während Verschiebungen in der GABA-Affinität Sequenzveränderungen in der GABA-Bindungsstelle darstellen. Da der ausgetauschte Genbereich zwischen Mlu I und Aoc I außerhalb der mutmaßlichen GABA-Bindungsstelle liegt, ist es unwahrscheinlich, dass eine Änderung der GABA-Affinität den veränderten Rezeptor-Reaktionen zugrunde liegt, und wahrscheinlicher, dass eine Beeinflussung der Kopplungsmechanismen zwischen der GABA-Bindung und der Kanalöffnung vorliegt.

Die Ligandenbindungsstelle des ACh-Rezeptors konnten anhand photoaffinitiver Markierung des kompetitiven Acetylcholin-Antagonisten [^3H]Tubocurarin lokalisiert werden. Sie wird durch die Untereinheiten-Kombinationen α und δ oder α und γ determiniert (Pedersen and Cohen 1990; Chiara and Cohen 1997; Chiara et al. 1999; Xie and Cohen 2001). Entsprechend ist im GABA_A-Rezeptor ein Zusammenschluss der Untereinheiten α und β nötig, um einen funktionellen Cl^- -Kanal zu generieren (Schofield et al. 1987; Korpi et al. 2002). Um zusätzlich die Interaktionen von α - und β -Untereinheiten im funktionellen biochemischen Assay zu untersuchen, wurden die α -Untereinheiten mit unterschiedlichen β -Untereinheiten ausgetestet. In mRNA-Verteilungsstudien der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (Laurie et al. 1992; Wisden et al. 1992) wurde gezeigt, dass im adulten Cerebellum von Ratten $\beta 3$ und $\beta 2$ stark exprimiert werden und von den γ -Untereinheiten dort fast ausschließlich $\gamma 2$ zu finden ist. Aufgrund des exklusiven Vorkommens von $\gamma 2$ wurde in allen Rezeptoren $\gamma 2$ kotransfiziert. Die Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 3$ sind in ihrer Verteilung und Pharmakologie sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in diesen Parametern von der $\beta 1$ -

Untereinheit. Aufgrund der geringer benötigten DNA-Menge für die Transfektion von $\beta 3$ im Vergleich zu $\beta 2$ (Lüddens et al. 1994) und der deutlich höheren Transfektionseffizienz von $\beta 3$ wurden die α -Untereinheiten mit der $\beta 3$ -Untereinheit und $\gamma 2$ koexprimiert. Für die unterschiedlichen Pharmakologieprofile zwischen $\beta 2/\beta 3$ und $\beta 1$ wurde in parallelen Versuchsreihen $\beta 1$ bzw. $\beta 3$ kotransfiziert.

Bei der Herstellung der Chimären zwischen den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ wurde zuerst eine mögliche Interaktion der Genbereiche 3' der Aoc I-Schnittstelle mit den in Abschnitt 3.2.2.1 beschriebenen Chimären (

Abb. 9) überprüft. Die Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6-1BH700\beta 1\gamma 2$ zeigte keine Unterschiede zum $\alpha 6$ -Wildtyp. Ihr reverses Gegenstück, $\alpha 1-6BH857\beta 1\gamma 2$, wies bei den vier höchsten untersuchten GABA-Konzentrationen statistisch signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zum $\alpha 1$ -Wildtyp auf. $\alpha 1-6BH857$ -enthaltende Rezeptoren reduzierten die [^{35}S]TBPS-Bindung ab einer GABA-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ weniger als ihr entsprechender Wildtyp. Wahrscheinlich sind diese Unterschiede nicht biologisch relevant, da sich dadurch weder der IC_{50} -Wert im Vergleich zum Wildtyp verschiebt, noch der $\alpha 1$ -charakteristische Anstieg der Bindungskurven verändert wird. Aus der Annahme, dass der 3'-gelegene Genbereich der Aoc I-Restriktionsschnittstelle keinen Einfluss auf die GABA-Sensitivität hat und unter Berücksichtigung der Unterschiede in der [^{35}S]TBPS-Bindung bei Rezeptoren, in denen der Mlu I- und Aoc I-flankierte Genbereich ausgetauscht worden war ($\alpha 1-6MA\beta 1\gamma 2$ bzw. $\alpha 1-6MA\beta 3\gamma 2$, Abb. 10) muß angenommen werden, dass innerhalb dieses Genbereichs die verantwortlichen Aminosäuren für die GABA-Sensitivität lokalisiert sind. Daher wurde der Genbereich zwischen Aoc I und Mlu I in den $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten sukzessive verkürzt.

Die in Absatz 3.2.2.3 getestete Chimäre $\alpha 1-16MA$ zeigte eine untypische Bindungskurve bei steigenden Konzentrationen von GABA. Sie besitzt Aminosäureaustausche, die an homologen Sequenzen im Glycin-Rezeptor als Ursache einer veränderten Agonisten-Sensitivität in Betracht gezogen werden (Vandenberg et al. 1992). Da sich die K_D -Werte der Rezeptoren $\alpha 1-16MA\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ lediglich um einen Faktor 2 unterscheiden (Tab. 9), ist eine Beeinflussung der GABA-Affinität durch den Austausch dieses Sequenzabschnittes auszuschließen. Möglicherweise verursacht der Austausch einer oder mehrerer dieser Aminosäuren im GABA_A -Rezeptor eine derart drastische Konformationsänderung, dass GABA bei hohen Konzentrationen das Maß der [^{35}S]TBPS-Bindung nicht reduziert, sondern steigert.

Die in Abschnitt 3.2.2.3 beschriebene $\alpha 6$ -Chimäre $\alpha 6-16MA$ (Abb. 11) enthielt zwischen den Aminosäuren 161 und 197 die Sequenz der $\alpha 1$ -Untereinheit. In Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\gamma 2$ zeigt sie eine deutliche Abweichung in den TBPS-Bindungsdaten gegenüber des Wildtyp $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ und weist eher $\alpha 1$ -Charakter auf. Ihr IC_{50} -Wert erhöht sich um den Faktor 4,5. Da der K_D -Wert keine signifikante Änderung zum Wildtyp erkennen ließ, lässt sich schließen, dass der Aminosäurenbereich 161-196 einen Einfluss auf die GABA-Sensitivität, aber nicht auf die GABA-Affinität hat. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit der Chimäre $\alpha 6-16MA$ in Kombination mit $\beta 3\gamma 2$ erzielt, allerdings war die Erhöhung des IC_{50} -Werts (Faktor 10) deutlicher ausgeprägt. Aufgrund der ebenfalls signifikant unterschiedlichen

Messwerte (100 nM GABA) von der β 1- zu der β 3-enthaltenden Rezeptor, kann angenommen werden, dass der ausgetauschte Aminosäure-Bereich der α -Untereinheit zu einer Veränderung der Interaktion zwischen den α - und β -Untereinheiten bzw. im gesamten Heteropentamer des GABA_A-Rezeptors führt.

Mutanten zwischen der α 1 und α 6-Untereinheit anderer Autoren (Im et al. 1997), besaßen u.a. neben der oben erwähnten Punktmutante R100H, die eine entscheidende Rolle bei der Diazepam-Insensitivität spielt (Wieland et al. 1992), einen Sequenzaustausch im Aminosäurenbereich 161-187 der α 6-Untereinheit, der durch die entsprechende α 1-Sequenz ersetzt wurde. Die von Im et al. (Im et al. 1997) gemessenen Dosis-Wirkungs-Kurven für GABA stimmen teilweise nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Kleingoor et al. (Kleingoor et al. 1993) beispielsweise fand keinen GABA-Sensitivitätsunterschied zwischen dem α 6 β 2 γ 2-Wildtyp und α 6R100H β 2 γ 2-Rezeptoren. Auch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten GABA-Sensitivitäten α 6-16MA-enthaltender Rezeptoren widersprechen den Messungen der Mutante 4 von Im et al. Sowohl in Kombination mit β 3 γ 2 als auch mit β 1 γ 2 wurden in α 6-16MA-enthaltender Rezeptoren deutlich geringere GABA-Sensitivitäten gegenüber den α 6-Wildtypen festgestellt. Es ist auszuschließen, dass die gefundenen Unterschiede auf die zusätzlichen neun Aminosäuren am Carboxyterminus der Aminosäuren 161-196 zurückzuführen sind, da es innerhalb dieser neun Aminosäuren lediglich einen Unterschied zwischen α 1 und α 6 gibt. Dieser Austausch von Leucin zu Isoleucin an der Position 193 (α 1) bzw. 192 (α 6) wurde in dieser Arbeit eingehend untersucht und zeigte weder Unterschiede in GABA-Affinität noch -Sensitivität (siehe unten).

Interessanterweise konnten Im et al. (Im et al. 1997) zeigen, dass der Aminosäure-Bereich 161-187 der α 6-Untereinheit für des Benzodiazepin Ro 15-1788 (Flumazenil), eine entscheidende Rolle spielt. Wurde der Aminosäurenbereich 161-187 in der α 6-Untereinheit durch die entsprechende α 1-Sequenz ersetzt, so ging der GABA-agonistische Effekt von Ro 15-1788 auf die Cl⁻-Ströme rekombinanter α 6 β 2 γ 2-Rezeptoren in HEK 293-Zellen verloren. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von Hadingham et al. (Hadingham et al. 1996) (Ro 15-1788 verhält sich in α 6-enthaltenden Rezeptoren als GABA-Agonist) und klären teilweise die Widersprüche in dem Wirkprofil von Ro 15-1788, das von einigen Autoren als antagonistisch zur Benzodiazepin-Bindungsstelle (Chiu and Rosenberg 1983; Korneyev 1983) und von anderen als partiell agonistisch beschrieben wird (Skerritt and Macdonald 1983; Robertson et al. 1984).

Unerwarteterweise änderte sich die GABA-Reaktionen nicht, wenn der analoge Sequenzabschnitt 161-196 in die α 1-Untereinheit inkloniert wurde. Weder die [³⁵S]TBPS-Bindung noch der IC₅₀-Wert der α 1-61MA-enthaltenden Rezeptoren weichen von denen des α 1-Wildtyps ab. Da in späteren Versuchen gezeigt wurde (siehe unten), dass die im Aminosäurenbereich 161-196 gelegene Punktmutante N188L in der α 1-Untereinheit alleine die Sensitivitätsunterschiede von α 6L187N bzw. α 6-16MA umkehrt, wobei die Sensitivitätsänderungen von α 6-16MA- und α 6L187N-enthaltenden Rezeptoren vergleichbar sind, besteht die Möglichkeit, dass es innerhalb des α 6-Bereichs 161-196 eine oder mehrere Aminosäure(n) gibt, die die Auswirkungen von α 1N188L unterdrückt.

Rezeptoren, die die im Genbereich des 127bp-Fragments gelegene Doppelpunktmutante α 6_178-180VVA (siehe 3.2.3.1) enthalten, zeigen grundsätzlich das gleiche

Bindungsverhalten wie die Chimären $\alpha 6$ -16MA $\beta 1\gamma 2$ bzw. $\alpha 6$ -16MA $\beta 3\gamma 2$. Die IC_{50} -Werte der Doppelpunktmutanten erhöhen sich in beiden β -Kombinationen um den Faktor 5 (Tab. 8). Die ausgetauschten Aminosäuren in der $\alpha 6$ _178-180VVA-Untereinheit beeinflussen demnach alleine nicht die Interaktionen der Untereinheiten im Heteropentamer. Da sich die K_D -Werte der Mutanten nicht signifikant von denen der entsprechenden Wildtypen unterscheiden (Tab. 12), kann man davon ausgehen, dass die ausgetauschten Aminosäuren der Doppelpunktmutante $\alpha 6$ _178-180VVA im gleichen Maße wie die $\alpha 6$ -16MA-Chimäre die GABA-Sensitivität beeinflussen.

Die Mehrfachpunktmutante, $\alpha 6$ _182-185DGSR befindet sich ebenfalls innerhalb des 127bp-Fragments. Sie besitzt u.a. an der Position 185 das in den $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 3/\alpha 5$ -Untereinheiten vorkommende Arginin anstatt des Serins der $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten (siehe 3.2.3.1). Dieser Aminosäureaustausch zeigte weder in Kombination mit der $\beta 1$ - noch mit der $\beta 3$ -Untereinheit Unterschiede zum $\alpha 6$ -Wildtyp. Der Austausch dieses Arginins gegen ein Lysin ($\alpha 5R190K$) bewirkte in elektrophysiologischen Untersuchungen eine deutliche Verringerung der GABA-Sensitivität (Hartvig et al. 2000). Die abweichenden Ergebnisse könnten auf die unterschiedlichen Versuchsansätze zurückzuführen sein: Zum einen bestimmten Hartvig et al. mit Hilfe der "whole-cell patch clamp"-Technik an Oozyten des Chinesischen Hamsters die EC_{50} -Werte für GABA, während in dieser Arbeit die IC_{50} -Werte für GABA in einem biochemischen Assay ermittelt. Weiterhin wurden in dieser Arbeit anstatt $\beta 2$ die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 3$ verwendet. Darüberhinaus ersetzten Hartvig et al. das Arginin durch das strukturell sehr ähnliche Lysin und nicht durch eine im molekularen Aufbau völlig verschiedene Aminosäure, wie das Serin.

Im folgenden Abschnitt sollen alle α -Untereinheiten verglichen werden, die die Punktmutante N188L haben. Die Punktmutante $\alpha 1N188L$ zeigt in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1\gamma 2$ bei GABA-Konzentrationen $\geq 1 \mu M$ signifikante Unterschiede zum $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ -Wildtyp und bei 100 nM und 1 μM GABA biologisch relevante Unterschiede zum $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ -Wildtyp. Der $\alpha 1$ -typische Anstieg ist bei dieser Punktmutante deutlich kleiner. Da die [^{35}S]TBPS-Bindungskurve der Punktmutante $\alpha 1N188L$ bei geringeren GABA-Konzentrationen identisch zum $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ -Wildtyp ist und bei höheren Konzentrationen der $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ -Wildtyp-Kurve gleicht, kann man hier von einem intermediären Kurvenverlauf sprechen. Die Punktmutante bewirkt in der $\alpha 1$ -Untereinheit eine Verschiebung der [^{35}S]TBPS-Bindungsraten in Richtung des $\alpha 6$ -Wildtyps, jedoch keine vollständige Umwandlung in $\alpha 6$ -charakteristische [^{35}S]TBPS-Bindungsdaten. Die Veränderung des [^{35}S]TBPS-Bindungsverhaltens $\alpha 1N188L$ -enthaltender Rezeptoren konnte nicht durch Unterschiede der IC_{50} -Werte zum $\alpha 1$ -Wildtyp untermauert werden.

Die $\alpha 1N188L$ -enthaltenden Rezeptoren, die anstatt der $\beta 1$ - die $\beta 3$ -Untereinheit haben, unterscheiden sich hoch signifikant vom entsprechenden $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ -Wildtyp. Jedoch zeigt die Kurve auch hier in mehreren Messpunkten signifikante Unterschiede zum $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ -Wildtyp. Dennoch hat die Kurve der Punktmutante einen deutlicheren $\alpha 6$ -Charakter als ihr $\beta 1$ -enthaltendes Pendant: (siehe Tab. 14).

Die Punktmutante $\alpha 1N188L$ hat also Auswirkungen auf die GABA-Sensitivität und verändert die Interaktion der α - und β -Untereinheiten im Heteropentamer ohne die $\alpha 6$ -Eigenschaften vollständig zu erreichen.

Tab. 14
Signifikanz-Werte (p-Werte) der Unterschiede in der TBPS-Bindung von Wildtyp-GABA_A-Rezeptoren zu α 1N188L-enthaltenden Rezeptoren

	wt α 6 β 3 α 1N188L β 3	wt α 1 β 3 α 1N188L β 3	α 1N188L β 1 α 1N188L β 3	wt α 1 β 1 α 1N188L β 1	wt α 6 β 1 α 1N188L β 1
IC₅₀-Werte	0,04 0,7	4 0,7	3 0,7	3 3	0,1 3
1 mM GABA	0,0330	0,1880	0,0004	0,0003	0,7303
100 μ M GABA	0,0370	0,0020	0,0170	0,0084	0,2959
10 μ M GABA	0,0600	0,0150	0,0030	0,0134	0,0871
1 μ M GABA	0,1800	0,0040	0,1140	0,0146	0,0249
100 nM GABA	0,0004	0,0080	0,0004	0,9700	0,0002
10 nM GABA	0,0040	0,1070	0,0680	0,8707	0,6860
1 nM GABA	0,4970	0,3530	0,5930	0,7034	0,4267

Alle in der Tabelle aufgelisteten GABA_A-Rezeptoren wurden zusammen mit der γ 2-Untereinheit ausgetestet worden. Wildtyprezeptoren sind mit "wt" gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den [³⁵S]TBPS-Bindungsdaten wurden mittels Students *t*-Test errechnet und sind ab $p < 0,05$ fett gedruckt. Die Werte zeigen deutlich, dass sich die TBPS-Bindungsdaten α 1N188L-enthaltender Rezeptoren signifikant sowohl in Kombination mit den Untereinheiten β 1 sowie β 3 von ihren entsprechenden Wildtyprezeptoren unterscheiden. Zudem zeigt die Tabelle, dass sich die Bindungsdaten der Rezeptoren α 1N188L β 1 γ 2 und α 1N188L β 3 γ 2 signifikant unterscheiden. Daraus lässt sich schließen, dass eine zusätzliche Beeinflussung der Interaktionen zwischen α - und β -Untereinheiten im Heteropentamer vorliegt.

Die TBPS-Bindungsdaten der Chimäre α 1N188L_ α 6BH857 β 1 γ 2 sind mit denen der Punktmutante α 1N188L β 1 γ 2 vergleichbar. Bei direktem Vergleich der Punktmutante α 1N188L mit der Chimäre α 1N188L_ α 6BH857 findet man keine Unterschiede, die biologisch relevant sein könnten (zur Definition siehe 3.2.1). Dies deutet darauf hin, dass der Austausch des Bsu/Hind-Fragments (Sequenzabschnitt zwischen den Restriktionsschnittstellen Bsu 36I und Hind III) (siehe Anhang: Abb. 17) in der α 1-Untereinheit weder alleine noch in Kombination mit der Punktmutante eine Auswirkung auf die GABA-Sensitivität hat.

Die Punktmutante α 1L193I zeigte zum α 1-Wildtyp weder signifikante Unterschiede im K_D -Wert noch in den TBPS-Bindungsdaten, während die Punktmutante α 1N188L eine Änderung der GABA-Sensitivität bewirkt. Daher würde man bei der Doppelpunktmutante α 1N188L,L193I gleiche Veränderungen wie bei der Punktmutante α 1N188L in der TBPS-Bindung erwarten. Diese Annahme konnte nur partiell bestätigt werden: Obwohl sich die Doppelpunktmutante lediglich bei einer Konzentration von 1 μ M GABA signifikant vom α 1-Wildtyp unterscheidet, zeigen der Kurvenverlauf und der um eine 10er Potenz geringere IC₅₀-Wert deutlichen α 6-Charakter. Darüberhinaus zeigt die Doppelpunktmutante eine stärkere Annäherung an den α 6-Wildtyp als die Punktmutante α 1N188L. Vergleicht man die GABA-Sensitivitäten der Doppelpunktmutante α 1N188L,L193I (Abschnitt 3.2.3 und Abb. 12A) und der Chimäre α 1N188L_ α 6BH857 (siehe Tab. 15), so weist auch hier die TBPS-Bindungskurve der Doppelpunktmutante deutlich stärkere α 6-Charakteristika auf. Daher scheint die Punktmutante α 1L193I alleine keine Auswirkung auf die Kopplungsmechanismen zwischen GABA-Bindung und Kanalöffnung zu haben, jedoch den Effekt der Mutation N \rightarrow L an der Aminosäureposition 188 der α 1-Untereinheit auf die GABA-Sensitivität zu verstärken.

Parallel zu den oben besprochenen $\alpha 1$ -Konstrukten wurden $\alpha 6$ -Konstrukte hergestellt, die an der Aminosäuren-Position 187 anstatt eines Leucins ein Asparagin haben. In Kombination mit den Untereinheiten $\beta 1\gamma 2$ ergaben sich grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse zu den $\alpha 1$ -Konstrukten: Die Punktmutante $\alpha 6L187N$ unterscheidet sich in der [^{35}S]TBPS-Bindung bei einer GABA-Konzentration von 100 nM signifikant vom $\alpha 6$ -Wildtyp. Zwar verpasst die Erhöhung des IC_{50} -Werts knapp die Kriterien der biologischen Relevanz, der Kurvenverlauf ist aber eindeutig $\alpha 1$ -charakteristisch. Diese Einschätzung wird unterstützt durch den 11-fache höheren IC_{50} -Wert von $\alpha 6L187N\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren gegenüber $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ -Wildtyprezeptoren (Tab. 8).

Da die Chimäre $\alpha 6-1BH700$ keine Unterschiede zum $\alpha 6$ -Wildtyprezeptor in der TBPS-Bindung zeigte (

Abb. 9) würde man für die Chimäre $\alpha 6L187N_{\alpha 1BH700}$ die gleichen Veränderungen wie für die Einfachpunktmutante $\alpha 6L187N$ erwarten. Aber, obwohl ihre IC_{50} -Werte identisch sind, unterscheiden sich die TBPS-Bindungsdaten der Punktmutante $\alpha 6L187N$ bei vielen GABA-Konzentrationen von denen der Chimäre $\alpha 6L187N_{\alpha 1BH700}$. Daraus kann geschlossen werden, dass der Sequenzaustausch zwischen den Restriktionsschnittstellen Bsu 36I und Hind III keine Auswirkung auf die TBPS-Bindung hat, jedoch die Wirkung der Punktmutante $\alpha 6L187N$ auf die GABA-Sensitivität unterdrückt.

Die niedrigere GABA-Sensitivität der $\alpha 6L187N$ -enthaltenden Rezeptoren (Abb. 15, Tab. 8) konnte weder bei der Chimäre $\alpha 6L187N_{\alpha 1BH700}$ noch bei der Doppelpunktmutante $\alpha 6L187N, I192L$ bestätigt werden. Im Kontrast dazu wurde in der Doppelpunktmutante in allen Messpunkten eine stärkere Reduktion der TBPS-Bindung und ein geringerer IC_{50} -Wert als beim $\alpha 6$ -Wildtyp festgestellt (Abb. 15, Tab. 8). Die bei der Chimäre $\alpha 6L187N_{\alpha 1BH700}$ im Vergleich zum $\alpha 6$ -Wildtyp festgestellte signifikant geringere Reduktion der [^{35}S]TBPS-Bindung (Abb. 15) kann nicht als biologisch relevant bewertet werden, da sie weder zu einer Änderung in der TBPS-Kurvenform noch zu einer Verschiebung des IC_{50} -Werts um einen Faktor 5 führen.

Sowohl $\alpha 6-16$ - als auch $\alpha 6L187N$ -enthaltende Rezeptoren unterscheiden sich ihren $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Varianten bei einer Konzentration von 100 nM GABA signifikant in ihren [^{35}S]TBPS-Bindungsdaten. Dies deutet darauf hin, dass bei der Ausbildung der beobachteten Unterschiede zwischen Wildtyp und der $\alpha 6-16MA$ -Chimäre in der TBPS-Bindung sowohl die Aminosäure der Position 187 als auch deren Interaktion mit den β -Untereinheiten eine Rolle spielen.

Tab. 15: Signifikanz-Werte (P-Werte) der Unterschiede in der [³⁵S]TBPS-Bindung von Wildtyp-GABA_A-Rezeptoren α1β1γ2 und α6β1γ2 zu ihren entsprechenden Chimären und Punktmutanten

β1γ2	wtα1 α1N188L	wtα1 α1-6BH857	wtα1 α1N188L_α6BH857	wtα1 α1N188L,L193I	wtα1 α1L193I	α1N188L α1N188L,L193I	α1N188L,L193I α1N188L_α6BH857	α1N188L α1N188L_α6BH857	α1N188L α1L193I
IC₅₀-Werte	3 3	3 6,8	3 1	3 0,4	3 6,3	3 0,4	0,4 1	3 1	3 6,3
1 mM GABA	0,0003	0,0116	0,0007	0,0501	0,4867	0,0044	0,0073	0,7696	0,2947
100 μM GABA	0,0084	0,0001	0,0047	0,5469	0,0939	0,0802	0,7721	0,3596	0,0220
10 μM GABA	0,0134	0,0009	0,5934	0,2395	0,4583	0,0113	0,1339	0,4405	0,0782
1 μM GABA	0,0146	0,4213	0,0058	0,0002	0,3002	0,0009	0,0002	0,8257	0,0298
100 nM GABA	0,9700	0,4573	0,3533	0,1835	0,5783	0,0354	0,5520	0,0437	0,5358
10 nM GABA	0,8707	0,5440	0,6872	0,7390	0,4213	0,1913	0,5868	0,1012	0,3111
1 nM GABA	0,7034	0,5689	0,4893	0,2642	0,7423	0,3799	0,4750	0,2602	0,8617
β1γ2	wtα6 α6L187N	wtα6 α6-1BH700	wtα6 α6L187N_α1BH700	wtα6 α6L187N,I192L	wtα6 α6I192L	α6L187N α6L187N,I192L	α6L187N,I192L α6L187N_α1BH700	α6L187N α6L187N_α1BH700	α6L187N α6I192L
IC₅₀-Werte	0,1 0,3	0,1 0,03	0,1 0,2	0,1 0,03	0,1 0,2	0,3 0,03	0,03 0,2	0,3 0,2	0,3 0,2
1 mM GABA	0,7166	0,9542	0,0650	0,2650	0,6474	0,2319	0,0064	0,0051	0,8571
100 μM GABA	0,5994	0,9105	0,1024	0,1847	0,4584	0,1466	0,0066	0,0036	0,5648
10 μM GABA	0,5467	0,9000	0,0138	0,1208	0,5993	0,0576	0,0004	0,0002	0,8886
1 μM GABA	0,1347	0,9825	0,0331	0,2361	1,0000	0,0230	0,0384	0,0530	0,0085
100 nM GABA	0,0005	0,2004	0,1555	0,0362	0,4303	0,0006	1,0000	0,0108	0,0156
10 nM GABA	0,1816	0,0887	0,4479	0,0875	0,8115	0,0283	0,0468	0,4933	0,3183
1 nM GABA	0,7214	0,1549	0,6183	0,0916	0,3632	0,2043	0,1088	0,8574	0,8690

Alle in der Tabelle aufgelisteten GABA_A-Rezeptoren wurden zusammen mit den β1γ2-Untereinheiten ausgetestet. Wildtyprezeptoren sind mit "wt" gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den [³⁵S]TBPS-Bindungsdaten wurden mittels Student's *t*-Test errechnet und sind ab P<0,05 fett gedruckt. Die Werte zeigen deutlich, dass sich die TBPS-Bindungsdaten α1N188L-enthaltender Rezeptoren signifikant sowohl von ihren entsprechenden Wildtyprezeptoren als auch von α1N188L_α6BH857-enthaltenden Rezeptoren unterscheiden, jedoch nur bei einer Konzentration von α1N188L,L193I-enthaltenden Rezeptoren.

Im detaillierten Vergleich der IC_{50} -Werte zwischen den Einzel- und Doppelpunktmutanten zeigte sich ein homogenes Bild. Bei den Einfachpunktmutanten $\alpha 1N188L$, $\alpha 6L187N$, $\alpha 1L193I$ bzw. $\alpha 6I192L$ waren die IC_{50} -Werte im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp entweder verringert oder unverändert (Faktoren: 1, 3,2, 2,1 bzw. 2,3). Dementgegen zeigten $\alpha 1N188L,L193I$ bzw. $\alpha 6L187N,I192L$ -enthaltender Rezeptoren eine Erhöhung der IC_{50} -Werte um die Faktoren 7,5 bzw. 3,3. Diese Daten nahe, dass bei den Doppelpunktmutanten der Kopplungsmechanismus so verändert wird, dass die GABA-Sensitivität verringert wird, während bei den Einfachpunktmutanten die GABA-Sensitivität erhöht wird oder unverändert bleibt.

Die direkten funktionellen Analysen der Einfachpunktmutanten $\alpha 1N188L$, $\alpha 6L187N$, $\alpha 1L193I$ bzw. $\alpha 6I192L$ zeigten gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der [^{35}S]TBPS-Bindungsstudien. Mit Hilfe der "whole-cell patch clamp"-Technik wurden die Cl^- -Ströme der punktmutierten α -Untereinheiten in Kombination mit $\beta 1\gamma 2$ im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyprezeptoren $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ bzw. $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ an transient transfizierten HEK 293-Zellen gemessen (W. Hevers, persönliche Mitteilung). Es konnte bestätigt werden, dass $\alpha 1N188L$ -enthaltende Rezeptoren eine höhere Sensitivität gegenüber GABA haben als der Wildtyp $\alpha 1\beta 1\gamma 2$. Entsprechend wiesen Rezeptoren der Kombination $\alpha 6L187N\beta 1\gamma 2$ eine geringere GABA-Sensitivität auf als $\alpha 6\beta 1\gamma 2$ -Rezeptoren. Erwartungsgemäß zeigten $\alpha 1L193I$ - bzw. $\alpha 6I192L$ -enthaltende Rezeptoren keine Veränderung in der GABA-Sensitivität.

In der im Folgenden aufgeführten Literatur beinhaltet keine der dort untersuchten Aminosäuren eine Relevanz für die in dieser Arbeit behandelten Unterschiede der GABA-Sensitivität zwischen $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren, da sich die aufgeführten Aminosäuren in den Sequenzen der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ nicht unterscheiden. Dennoch zeigt diese Literatur, mit welchen unterschiedlichen Methoden die GABA-Sensitivität bestimmt werden kann und beschreibt die verschiedenen α -Untereinheiten.

Die Ergebnisse von Im et al (Im et al. 1995) legen die Vermutung nahe, dass die in der TM2-Region gelegene Mutation $\alpha 6T266A$ in Kombination mit $\beta 2\gamma 2$ eine Veränderung der GABA-Affinität hervorruft, da bei gleicher GABA-Sensitivität und unveränderter "recovery time" (benötigte Zeit bis Rezeptor wieder aktivierbar ist) eine schnellere Desensitisierung stattfindet.

Bei allen Mitgliedern der Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle ist in der TM2-Region mittig ein hoch konserviertes Leucin zu finden, dessen Funktion in der Literatur ausführlich beschrieben ist. Es wird angenommen, dass diese Aminosäure im ACh-R ausschlaggebend ist für die Erhaltung des geschlossenen Rezeptorzustandes (Unwin 1995). Wurde dieses Leucin in der $\alpha 1(L264)$ - und/oder $\beta 1(L259)$ -Untereinheit in humanen $\alpha\beta$ -GABA_A-Rezeptoren durch Phenylalanin, Tyrosin oder Alanin ausgetauscht (*) (Dalziel et al. 2000), zeigte sich in $\alpha*\beta$ -Rezeptoren mit steigendem Raumanspruch und Hydrophobizität der substituierten Aminosäure eine Steigerung der Desensitisierungsgeschwindigkeit. In $\alpha\beta*$ -Mutanten erhöhte sich der EC_{50} -Wert für GABA um das 100-fache, wenn der Substituent eine aromatische Aminosäure (Phe oder Tyr) war, d.h. die GABA-Sensitivität der $\alpha\beta*$ -Mutanten war dann deutlich erniedrigt. Diese Ergebnisse wurden aufgrund unveränderter Parameter der [3H]Muscimolbindung einer Konformationsänderung des Rezeptors zugeschrieben, die die Kanalöffnung beeinflussen. In $\alpha*\beta$ - bzw. $\alpha*\beta*$ -Mutanten zeigten die Substituenten keinen

Einfluss auf den EC_{50} -Wert (Dalziel et al. 2000). Weiterhin stellten die Autoren fest, dass nach Austausch des Leucins gegen ein Alanin in $\alpha\beta^*$ - und $\alpha^*\beta^*$ -Mutanten die spontane Öffnungsrate der Rezeptoren deutlich erhöht war. Dies lässt vermuten, dass die Größe der Seitenkette der Aminosäure an dieser Position ausschlaggebend ist für die intramolekulare Struktur des Rezeptors (Dalziel et al. 2000). Im Gegensatz dazu führt der Austausch dieses Leucins gegen ein Serin in der β_2 -Untereinheit in $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren der Ratte zu einem Anstieg der GABA-Sensitivität (Chang et al. 1996).

Weiterführende Untersuchungen dieses Leucins zeigten, dass die Substitution des hydrophilen Serins an dieser Position in jeder Untereinheit in $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren eine Linksverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve für GABA hervorruft, d.h. die GABA-Sensitivität der Rezeptoren erhöhte sich (Chang and Weiss 1999). Zudem zeigten die Autoren auf, dass der notwendige Haltestrom zur Einstellung des Haltepotentials bei den Mutanten aufgrund der zunehmend spontanen Öffnungen des Kanals erhöht war. Die Autoren erklärten dies anhand des "Monod-Wyman-Changeux-Modells" allosterischer Aktivierungsmechanismen (siehe Changeux and Edelstein 1998), da in den mutierten Rezeptoren der Quotient aus geschlossenem zu offenem, aber keinen Agonist-bindenden Rezeptor, deutlich kleiner ist und somit die agonist-ungebundenen und die nur ein Agonistmolekül-gebundenen Rezeptorzustände eher erreicht werden. Gleichgerichtet waren die Ergebnisse von Scheller et al. (Scheller and Forman 2002): sie konnten mit Hilfe schneller GABA-Applikationen im Submillisekundenbereich die kinetischen Aktivitäten des Kanals sowie die Equilibriumszustände zwischen Rezeptor und Agonist in der "patch clamp"-Technik im Spannungsklemmenmodus von einander trennen. Sie bestätigten, dass die bereits beschriebene Mutante $\alpha_1(L264T)$ (Chang and Weiss 1998; Dalziel et al. 2000) sowohl das Öffnungsverhalten des Kanals als auch die Desensitisierung beeinflussen. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante $\alpha_1(S270I)$ lediglich einen Einfluss auf das Öffnungsverhalten des Kanals, aber keine Veränderung in der Desensitisierung. Beide Mutanten zeigten erhöhte GABA-Sensitivität: die Mutante $\alpha_1(L264T)\beta_2\gamma_{2L}$ generierte einen ca. 80-fach geringeren EC_{50} -Wert und die Mutante $\alpha_1(S270I)\beta_2\gamma_{2L}$ einen ca. 20-fach geringeren EC_{50} -Wert als der Wildtyp $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$. Die Autoren schlossen daraus, dass zwei unterschiedliche aktive Domänen in der TM2-Region existieren: eine, die die Vorgänge der Kanalöffnung und der Desensitisierung koppelt und eine, deren Funktion von den Autoren nicht näher erläutert wird.

Es wäre interessant zu überprüfen, ob die von Chang & Weiß, Dalziel et al. und Scheller & Forman (Chang and Weiss 1998; Dalziel et al. 2000). gezeigten Veränderungen an sequenzveränderten $GABA_A$ -Rezeptoren bei gleichzeitiger Einführung der Punktmutanten α_1N188L bzw. α_6L187N einen additiven Effekt hervorrufen würden.

In der extrazellulären Schleife zwischen TM2 und TM3 konnten in der humanen α_2 -Untereinheit bis zur Aoc I-Schnittstelle zwei Aminosäuren identifiziert werden, die das Ausmaß der GABA-Sensitivität mitbestimmen. Dies wurde mit Hilfe der "alanine-scanning"-Mutagenese und Messungen in der "whole-cell patch clamp"-Technik im Spannungsklemmenmodus an HEK 293-Zellen erreicht (O'Shea and Harrison 2000). Die Autoren konnten nachweisen, dass sich der EC_{50} -Wert der Mutante $\alpha_2(L277A)\beta_1\gamma_{2S}$ um den Faktor 51, der Wert der Mutante $\alpha_2(R274A)\beta_1\gamma_{2S}$ - im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp - um den Faktor 27 erhöhte. Andere Aminosäuren (D,Q) an der Position $\alpha_2(R274)$

fürten zu deutlich geringeren Erhöhungen bzw. zu einer Erniedrigung der EC_{50} -Werte (S,K). Weitere Untersuchungen der extrazellulären Schleife zwischen TM2 und TM3 zeigten, dass $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren eine geringere GABA-Sensitivität aufwiesen, wenn die Aminosäuren L276, P277 oder V279 durch Alanin ersetzt wurden. Bei unveränderter GABA-Affinität zeigte die 3' der Aoc I-Schnittstelle gelegene Aminosäure L276 die größte Verschiebung der Dosis-Antwort-Kurve für GABA (Davies et al. 2001).

Die hier aufgeführte Literatur zeigt zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass der Kopplungsmechanismus zwischen Ligandenbindung und Kanalöffnung und damit die GABA-Sensitivität ein hochkomplexer Vorgang ist. Dabei sind offensichtlich viele Aminosäuren innerhalb von verschiedener Untereinheiten sowie möglicherweise die Interaktion zwischen den Untereinheiten relevant.

4.3. Einfluss von Furosemid auf rekombinante Rezeptoren

Aus der Literatur ist bekannt, dass Furosemid auf die TBPS-Bindung in hohen Konzentrationen als positiver Modulator auf $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren wirkt, während es geringe GABA-Konzentration antagonisiert (Korpi et al. 1995); (Knoflach et al. 1996; Wafford et al. 1996). Um die Sequenzabschnitte zu finden, die auf der α -Untereinheit für die inhibitorische Wirkung von Furosemid verantwortlich sind, wurden die Chimären $\alpha 6$ -1MA (siehe 3.2.2.2), $\alpha 6$ -16MA und $\alpha 6$ -61MA (siehe Abb. 17 und 3.2.2.3) sowie der $\alpha 6$ -Wildtyp zusammen mit den Untereinheiten $\beta 3$ und $\gamma 2$ in [35 S]TBPS-Bindungsstudien ausgetestet. Es bestätigte sich, dass Furosemid bei 5 μ M GABA antagonistisch wirkt (siehe Abb. 16). Die Ergebnisse der Bindungsstudien konnten in elektrophysiologischen Untersuchungen mit "Zwei-Elektroden-Spannungsklemme"-Ableitungen der Chimären $\alpha 1$ -16, $\alpha 1$ -61, $\alpha 6$ -16 und $\alpha 6$ -61 (Jackel et al. 1998) an *Xenopus laevis* Oozyten nachvollzogen werden. Die Chimäre $\alpha 6$ -16MA verhielt sich wie der $\alpha 6$ -Wildtyp, während $\alpha 6$ -1MA- und $\alpha 6$ -61MA-enthaltende Rezeptoren in ihren TBPS-Bindungen vom $\alpha 6$ -Wildtyp abwichen. Hier zeigte Furosemid bei der höchsten gemessenen GABA-Konzentration einen antagonistischen Effekt (siehe Abb. 16). Entsprechend zeigten in den elektrophysiologischen Ableitungen Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6$ -16 $\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 1$ -16 $\beta 3\gamma 2$ wie der Wildtyp $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ eine hohe Sensitivität gegenüber Furosemid mit vergleichbaren IC_{50} -Werten und ähnlichen maximalen Reduktionen der Cl^- -Ströme. Analog zu den TBPS-Bindungsstudien lassen die elektrophysiologischen Ergebnisse den Schluss zu, dass u.a. das $\alpha 6$ -284bp-Fragment für die im $\alpha 6$ -Wildtyp beobachtete Furosemid-Inhibition der GABA-induzierten Cl^- -Ströme verantwortlich ist. Diese Annahme wurde unterstützt durch die Tatsache, dass sich die Cl^- -Ströme der Chimäre $\alpha 1$ -61MA $\beta 3\gamma 2$ nicht durch Furosemid beeinflussen lassen.

Die von Fisher et al. (Fisher et al. 1997) an $GABA_A$ -Rezeptoren der Ratte (Ganzzell-Ableitungen transfizierter L929 Fibroblasten) beschriebene hochaffine Inhibition einer Chimäre durch Furosemid, deren amino-terminales Ende die $\alpha 6$ -Sequenz enthält, führte unter Berücksichtigung der oben genannten Schlussfolgerung zu folgender Einschätzung: Die Furosemid-Sensitivität beruht auf Aminosäuren eines kurzen Sequenzabschnittes von 35 Aminosäuren (in $\alpha 6$ Position 197-231), der sich vom Übergang des 127bp- zum 284bp-Fragment bis zur Mitte der ersten TM-Region erstreckt. Diese Ergebnisse stehen mit den später veröffentlichten Befunden von Thompson et al. (Thompson et al. 1999) mit der "whole-

cell patch clamp"-Technik an transient transfizierten humanen GABA_A-Rezeptoren in HEK 293-Zellen im Einklang. Die Autoren fanden nahezu vollständigen $\alpha 6$ -Charakter bezüglich der Furosemid-Sensitivität, wenn in der $\alpha 1$ -Untereinheit die Sequenzpassage 131-279 gegen die $\alpha 6$ -Sequenz ausgetauscht worden war. Allerdings ließ sich nur eine teilweise höhere Furosemid-Sensitivität feststellen, wenn der Sequenzaustausch auf den Bereich 209-279 verkürzt war. Sie schlossen daraus, dass mindestens zwei Aminosäuren existieren, die für die Furosemid-Sensitivität verantwortlich sind: eine im Bereich 209-279 und eine zwischen den Aminosäuren 131-160. Sie identifizierten im erstgenannten Bereich das Isoleucin an der Position 228 der $\alpha 6$ -Untereinheiten als eine entscheidende Aminosäure für die Furosemid-Sensitivität.

Ihre Vermutung auf zusätzliche entscheidende Aminosäuren für die Furosemid-Sensitivität im Aminosäurebereich 131-160 bestätigten die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen von Jackel et al. (Jackel et al. 1998). Im Gegensatz zur Chimäre $\alpha 1-16$ reagierten Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6-61\beta 3\gamma 2$ mit einem intermediären Furosemid-Effekt. Die maximale Inhibition der Cl⁻-Ströme der Chimäre $\alpha 6-61$ war im Vergleich zum $\alpha 6$ -Wildtyp und der Chimäre $\alpha 6-16\beta 3\gamma 2$ um eine 10er-Potenz geringer. Dies weist auf eine zusätzliche Bindungsstelle für Furosemid hin, die in Gegenwart der hochpotenten Bindungsstelle nicht zu detektieren ist. Eine ähnliche niedrigpotente Inhibition durch Furosemid hatten bereits Fisher et al. (Fisher et al. 1997) in einer $\alpha 1\alpha 6$ -Chimäre beobachtet, deren amino-terminales, extrazelluläres Ende bis zur Mitte der TM1-Region der $\alpha 1$ -Sequenz entsprach. Die Daten lassen die Vermutung zu, dass eine niedrigpotente Bindungsstelle für Furosemid in der $\alpha 6$ -Sequenz 3' der Restriktionsschnittstelle für Aoc I lokalisiert sein könnte. Berücksichtigt man weiterhin, dass Furosemid höchstwahrscheinlich extrazellulär bindet, so verkürzt sich der Aminosäurenabschnitt, in dem eine niedrigaffine Bindungsstelle für Furosemid gelegen sein kann, auf den extrazellulären Sequenzabschnitt zwischen Aoc I-Schnittstelle und Beginn der TM3-Region. In diesem Fall wäre es weiterhin möglich, dass die gesuchte Sequenz Teil einer einzigen Bindungstasche für Furosemid ist, in der sich sowohl die hochaffine Bindungsstelle für Furosemid vor der TM1 befindet als auch die niedrigaffine Bindungsstelle in der Verbindungssequenz zwischen TM2 und TM3.

Zusätzlich zu $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren inhibiert Furosemid $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ - Rezeptoren (Wafford et al. 1996) mit dem von Fisher et al. (Fisher et al. 1997) beschriebenen geringeren Ausmaß. Demnach sind $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren 700x sensitiver als $\alpha 1/2/3/5$ -enthaltenden und 50x sensitiver als $\alpha 4$ -enthaltende Rezeptoren gegenüber Furosemid, d.h. $\alpha 4$ -enthaltende Rezeptoren sind immer noch 14x sensitiver als $\alpha 1/2/3/5$ -enthaltenden Rezeptoren. Sie fanden diese geringere, $\alpha 4$ -typische Steigerung der Furosemid-Sensitivität bei Chimären, deren aminoternales Ende der $\alpha 1$ -Sequenz und deren carboxyterminales Ende der $\alpha 6$ -Sequenz entspricht (siehe oben). Die von Thompson et al. gefundene Aminosäure Isoleucin 228 in der $\alpha 6$ -Untereinheit kann jedoch nicht für die erhöhte Furosemid-Sensitivität in $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren verantwortlich sein (Wafford et al. 1996), da sich an der entsprechenden Position sowohl in der $\alpha 1$ - als auch in der $\alpha 4$ -Untereinheit ein Threonin befindet. Der Austausch dieses Threonins gegen ein Isoleucin in der $\alpha 4$ -Untereinheit verursacht eine Steigerung der Furosemid-Sensitivität mit einem EC₅₀-Wert vergleichbar zum $\alpha 6$ -Wildtyp (Thompson et al.

1999). Möglicherweise besitzen $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren lediglich die niedrigpotente Bindungsstelle für Furosemid. Dies könnte auch bei Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 6-61\beta 3\gamma 2$ der Fall sein, da diese Rezeptoren weniger stark auf Furosemid reagieren als der $\alpha 6$ -Wildtyp. Da aufgrund des $\alpha 1$ -Charakters des 284bp-Fragment in dieser Chimäre die vermutete hochpotente Bindungsstelle für Furosemid fehlt, muss auf die Existenz einer niedrigpotenten Bindungsstelle geschlossen werden. Im Widerspruch zur Vermutung von zwei Furosemidbindungsstellen stehen die Befunde von Knoflach et al. (Knoflach et al. 1996), die zeigen, dass rekombinante $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ - und $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren der Ratte unter den verwendeten Bedingungen in ihrem Verhalten gegenüber Furosemid gleich sind. Möglicherweise sind die Unterschiede in der Furosemidwirkung auf $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren in den unterschiedlichen Versuchsansätzen begründet und von daher nicht exakt übertragbar. Sowohl bei Thompson et al. (Thompson et al. 1999) als auch bei Wafford et al. (Wafford et al. 1996) wurden *Xenopus* Oozyten als Expressionssystem verwendet und die modulatorischen Eigenschaften von Furosemid bei dem EC_{50} -Wert für GABA gemessen. Dem entgegen verwendeten Knoflach et al. (Knoflach et al. 1996) HEK 293-Zellen als Expressionssystem und maßen modulatorische Effekte von Furosemid bei dem EC_{20} -Wert für GABA bei Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ bzw. bei dem EC_{30} -Wert für GABA bei $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren. Da sich die $\alpha 4$ -Aminosäuresequenzen der Ratte und des Menschen in den 284bp-Fragmenten nicht unterscheiden, bleibt auf der Ebene der Aminosäuresequenz nur noch der Austausch der $\beta 3$ gegen die $\beta 2$ Untereinheit um die unterschiedlichen Befunde in der Furosemid-Sensitivität zu erklären. Dies würde heißen, dass die $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren im Gegensatz zu $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren in ihrer Sensitivität gegenüber Furosemid durch unterschiedliche β -Untereinheiten beeinflusst werden.

5. Zusammenfassung

Die schnelle inhibitorische Neurotransmission im ZNS von Säugern ist wesentlich GABA-erg vermittelt. Aufgrund der vielen Bindungsstellen für verschiedene Stoffklassen ist die Pharmakologie des GABA_A-Rezeptors sehr komplex und für die Klinik zur Behandlung neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen von großer Bedeutung.

Die Verteilung, insbesondere der α -Untereinheiten, im Zusammenspiel der pentameren Untereinheitszusammensetzung des GABA_A-Rezeptors spielt bei der gehirnarealspezifischen Auswirkungen verschiedener GABA-Mimetika, der Charakterisierung subtypspezifischer Substanzen und zur Bestimmung verantwortlicher Strukturen für unterschiedlich stark ausgeprägte GABA-Sensitivitäten eine große Rolle.

$\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren sind um eine 10er Potenz sensitiver gegenüber GABA als $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren. Für die Ermittlung der für die GABA-Sensitivität verantwortlichen Aminosäuren wurden Chimären und weiter eingrenzend Mehr- und Einfachpunktmutationen zwischen den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ hergestellt. In dem funktionellen Test der [³⁵S]TBPS-Bindung zeigten GABA_A-Rezeptoren mit den mutierten α -Untereinheiten in Kombination mit den Untereinheiten $\beta 3$ und $\gamma 2$ eine erhöhte GABA-Sensitivität gegenüber dem Wildtyp, wenn das Asparagin an der Aminosäureposition 188 in der $\alpha 1$ -Untereinheit durch das $\alpha 6$ -entsprechende Lysin ersetzt wurde. Dementsprechend wiesen $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren mit der umgekehrten Punktmutation L187N einen deutlich höheren IC₅₀-Wert und damit eine geringere GABA-Sensitivität im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp auf.

Das Diuretikum Furosemid ist gegenwärtig die subtyp-spezifischste Substanz des GABA_A-Rezeptors. Sie wirkt ausschließlich auf $\alpha 6\beta 2/3$ -enthaltende Rezeptoren GABA-antagonistisch. Die in dieser Arbeit durchgeführten [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien mit Furosemid an chimären $\alpha 1/\alpha 6$ -Rezeptoren weisen auf eine niedrigpotente Bindungsstelle für Furosemid im extrazellulären Sequenzabschnitt zwischen der Aoc I-Schnittstelle und dem Beginn der TM3-Region hin.

Die bisher als partielle GABA-Mimetika eingestuften Substanzen THIP und P4S zeigten in [³⁵S]TBPS-Autoradiographien in allen Hirnregionen eine volle agonistische Wirkung ohne Untereinheitenspezifität. Die synthetische Substanz 4-PIOL zeigte dagegen subtypspezifischen Charakter bei allen verwendeten methodischen Ansätzen. Die Ergebnisse der [³⁵S]TBPS-Autoradiographien und der [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien zeigten, dass 4-PIOL, mit Ausnahme auf $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren, als partieller Agonist wirkt. In den [³⁵S]TBPS-Autoradiographien und den Bindungsstudien an Membranen wurde die Wirkung von 4-PIOL auf $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren als schwach GABA-mimetisch bzw. agonistisch eingeordnet, wohingegen die Ergebnisse der [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien an $\alpha 6$ -enthaltenden rekombinanten Rezeptoren es offen ließen, ob 4-PIOL schwach negativ modulatorisch oder antagonistisch an der GABA-Bindungsstelle wirkt. Die erstgenannte Möglichkeit wird durch elektrophysiologische Daten unterstützt. Die mit 4-PIOL erzielten Daten lassen dennoch darauf schließen, dass 4-PIOL als subtyp- und gehirnarealspezifische Substanz zur Differenzierung inhibitorischer Mechanismen im Gehirn nützlich sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Amin, J. and D. S. Weiss (1993). "GABA_A receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital [see comments]." *Nature* **366**(6455): 565-9.
- Anagnostaras, S. G., M. G. Craske and M. S. Fanselow (1999). "Anxiety: at the intersection of genes and experience." *Nat Neurosci* **2**(9): 780-2.
- Aprison, M. H., E. GalvezRuano, D. H. Robertson and K. B. Lipkowitz (1996). "Glycine and GABA receptors: Molecular mechanisms controlling chloride ion flux." *Journal of Neuroscience Research* **43**(3): 372-381.
- Araujo, F., S. Tan, D. Ruano, H. Schoemaker, J. Benavides and J. Vitorica (1996). "Molecular and pharmacological characterization of native cortical γ -aminobutyric acid_A receptors containing both α 1 and α 3 subunits." *Journal of Biological Chemistry* **271**(44): 27902-11.
- Asano, T., J. Sakakibara and N. Ogasawara (1983). "Molecular sizes of photolabeled GABA and benzodiazepine receptor proteins are identical." *FEBS Letters* **151**(2): 277-80.
- Backus, K. H., M. Arigoni, U. Drescher, L. Scheurer, P. Malherbe, H. Möhler and J. A. Benson (1993). "Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor deduced from mutation-induced rectification." *Neuroreport* **5**(3): 285-8.
- Ballanyi, K., P. Grafe, M. M. Reddy and G. ten Bruggencate (1984). "Different types of potassium transport linked to carbachol and γ -aminobutyric acid actions in rat sympathetic neurons." *Neuroscience* **12**(3): 917-27.
- Belzung, C., R. Misslin and E. Vogel (1990). "Anxiogenic effects of a benzodiazepine receptor partial inverse agonist, RO 19-4603, in a light/dark choice situation." *Pharmacol Biochem Behav* **36**(3): 593-6.
- Benke, D., J. M. Fritschy, A. Trzeciak, W. Bannwarth and H. Möhler (1994). "Distribution, prevalence, and drug binding profile of γ -aminobutyric acid type A receptor subtypes differing in the β -subunit variant." *Journal of Biological Chemistry* **269**(43): 27100-7.
- Benke, D., M. Honer, C. Michel and H. Möhler (1996). "GABA_A receptor subtypes differentiated by their γ -subunit variants: prevalence, pharmacology and subunit architecture." *Neuropharmacology* **35**(9-10): 1413-23.
- Benke, D., S. Mertens, A. Trzeciak, D. Gillissen and H. Möhler (1991). "GABA_A receptors display association of γ 2-subunit with α 1- and β 2/3-subunits." *Journal of Biological Chemistry* **266**(7): 4478-4483.
- Bergman, J., C. P. France, S. G. Holtzman, J. L. Katz, W. Koek and D. N. Stephens (2000). "Agonist efficacy, drug dependence, and medications development: preclinical evaluation of opioid, dopaminergic, and GABA_A-ergic ligands." *Psychopharmacology (Berl)* **153**(1): 67-84.
- Bertrand, D., J. L. Galzi, A. Devillers-Thiery, S. Bertrand and J. P. Changeux (1993). "Stratification of the channel domain in neurotransmitter receptors." *Curr Opin Cell Biol* **5**(4): 688-93.
- Bigge, C. F. (1999). "Ionotropic glutamate receptors." *Curr Opin Chem Biol* **3**(4): 441-7.
- Boileau, A. J., A. R. Evers, A. F. Davis and C. Czajkowski (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 and C. Czajkowski (2002). "GABA_A receptor β 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions." *J Biol Chem* **277**(4): 2931-7.
- Bonnert, T. P., R. M. McKernan, S. Farrar, B. le Bourdelles, R. P. Heavens, D. W. Smith, L. Hewson, M. R. Rigby, D. J. Sirinathsinghji, N. Brown, K. A. Wafford and P. J. Whiting (1999). " τ , a novel γ -aminobutyric acid type A receptor subunit." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(17): 9891-6.
- Borden, L. A. (1996). "GABA transporter heterogeneity: Pharmacology and cellular localization." *Neurochemistry International* **29**(4): 335-356.
- Bormann, J. (1988). "Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes." *Trends Neurochem Sci* **11**(3): 112-116.
- Bormann, J., O. P. Hamill and B. Sakmann (1987). "Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones." *Journal of Physiology* **385**: 243-86.
- Braestrup, C., M. Nielsen, T. Honore, L. H. Jensen and E. N. Petersen (1983). "Benzodiazepine

- receptor ligands with positive and negative efficacy." *Neuropharmacology* **22**(12B): 1451-7.
- Braestrup, C., M. Nielsen, P. Krogsgaard-Larsen and E. Falch (1979). "Partial agonists for brain GABA/benzodiazepine receptor complex." *Nature* **280**(5720): 331-3.
- Braestrup, C., R. Schmiechen, G. Neef, M. Nielsen and E. N. Petersen (1982). "Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors." *Science* **216**(4551): 1241-3.
- Brehm, L., H. Hjeds and P. Krogsgaard-Larsen (1972). "The structure of muscimol, a GABA analogue of restricted conformation." *Acta Chem Scand* **26**(3): 1298-9.
- Browning, M. D., M. Bureau, E. M. Dudek and R. W. Olsen (1990). "Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase phosphorylate the β subunit of the purified γ -aminobutyric acid_A receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(4): 1315-8.
- Bureau, M. H. and J. J. Laschet (1995). "Endogenous phosphorylation of distinct γ -aminobutyric acid type A receptor polypeptides by Ser/Thr and Tyr kinase activities associated with the purified receptor." *Journal of Biological Chemistry* **270**(44): 26482-26487.
- Bureau, M. H. and R. W. Olsen (1991). "Taurine acts on a subclass of GABA_A receptors in mammalian brain in vitro." *European Journal of Pharmacology* **207**(1): 9-16.
- Bureau, M. H. and R. W. Olsen (1993). "GABA_A receptor subtypes: ligand binding heterogeneity demonstrated by photoaffinity labeling and autoradiography." *Journal of Neurochemistry* **61**(4): 1479-91.
- Byberg, J. R., I. M. Labouta, E. Falch, H. Hjeds, L. P. Krogsgaard, D. R. Curtis and B. D. Gynther (1987). "Synthesis and biological activity of a GABA_A agonist which has no effect on benzodiazepine binding and of structurally related glycine antagonists." *Drug Des Deliv* **1**(4): 261-74.
- Caruncho, H. J., G. Puia, H. Möhler and E. Costa (1995). "The density and distribution of six GABA_A receptor subunits in primary cultures of rat cerebellar granule cells." *Neuroscience* **67**(3): 583-93.
- Casida, J. E. and L. J. Lawrence (1985). "Structure-activity correlations for interactions of bicyclic phosphorus esters and some polychlorocycloalkane and pyrethroid insecticides with the brain-specific t-butylbicyclic phosphorothionate receptor." *Environ Health Perspect* **61**(123): 123-32.
- Chandler, L. J., R. A. Harris and F. T. Crews (1998). "Ethanol tolerance and synaptic plasticity." *Trends Pharmacol Sci* **19**(12): 491-5.
- Chang, Y., R. Wang, S. Barot and D. S. Weiss (1996). "Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor." *Journal of Neuroscience* **16**(17): 5415-24.
- Chang, Y. and D. S. Weiss (1999). "Allosteric activation mechanism of the $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ γ -aminobutyric acid type A receptor revealed by mutation of the conserved M2 leucine." *Biophys J* **77**(5): 2542-51.
- Chang, Y. C. and D. S. Weiss (1998). "Substitutions of the highly conserved M2 leucine create spontaneously opening rho 1 γ -aminobutyric acid receptors." *Molecular Pharmacology* **53**(3): 511-523.
- Changeux, J. P. and S. J. Edelman (1998). "Allosteric receptors after 30 years." *Neuron* **21**(5): 959-80.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* **7**(8): 2745-52.
- Cherubini, E. and F. Conti (2001). "Generating diversity at GABAergic synapses." *Trends Neurosci* **24**(3): 155-62.
- Chiara, D. C. and J. B. Cohen (1997). "Identification of amino acids contributing to high and low affinity d-tubocurarine sites in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor." *J Biol Chem* **272**(52): 32940-50.
- Chiara, D. C., Y. Xie and J. B. Cohen (1999). "Structure of the agonist-binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: affinity-labeling and mutational analyses identify γ Tyr-111/ δ Arg-113 as antagonist affinity determinants." *Biochemistry* **38**(20): 6689-98.
- Chiu, T. H. and H. C. Rosenberg (1983). "Conformational changes in benzodiazepine receptors induced by the antagonist Ro 15-1788." *Molecular Pharmacology* **23**(2): 289-94.
- Choi, D. W., D. H. Farb and G. D. Fischbach (1977). "Chlordiazepoxide selectively augments GABA action in spinal cord cell cultures." *Nature* **269**(5626): 342-4.
- Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." *Proc Natl Acad Sci U*

- S A **86**(7): 2172-5.
- Cockcroft, V. B., D. J. Osguthorpe, E. A. Barnard and G. G. Lunt (1990). "Modeling of agonist binding to the ligand-gated ion channel superfamily of receptors." Proteins **8**(4): 386-97.
- Colquhoun, D. (1998). "Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors." Br J Pharmacol **125**(5): 924-47.
- Costa, E. (1992). "Building a bridge between neurobiology and mental illness." J Psychiatr Res **26**(4): 449-60.
- Costa, E., A. Guidotti, C. C. Mao and A. Suria (1975). "New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines." Life Sci **17**: 167-186.
- Crews, F. T., A. L. Morrow, H. Criswell and G. Breese (1996). "Effects of ethanol on ion channels." Int Rev Neurobiol **39**: 283-367.
- Cutting, G. R., L. Lu, B. F. Ohara, L. M. Kasch, C. Montrose-Rafizadeh, D. M. Donovan, S. Shimada, S. E. Antonarakis, W. B. Guggino, G. R. Uhl and H. H. Kazazian (1991). "Cloning of the γ -Aminobutyric Acid (GABA) $\rho 1$ cDNA: A GABA Receptor Subunit Highly Expressed in the Retina." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(7): 2673-2677.
- Dalziel, J. E., G. B. Cox, P. W. Gage and B. Birnir (2000). "Mutating the highly conserved second membrane-spanning region 9' leucine residue in the $\alpha(1)$ or $\beta(1)$ subunit produces subunit-specific changes in the function of human $\alpha(1)\beta(1)$ γ -aminobutyric Acid_A receptors." Mol Pharmacol **57**(5): 875-82.
- Davies, M., J. G. Newell and S. M. Dunn (2001). "Mutagenesis of the GABA_A receptor $\alpha 1$ subunit reveals a domain that affects sensitivity to GABA and benzodiazepine-site ligands." J Neurochem **79**(1): 55-62.
- Davies, P. A., M. C. Hanna, T. G. Hales and E. F. Kirkness (1997). "Insensitivity to anesthetic agents conferred by a class of GABA_A receptor subunit." Nature **385**: 820-823.
- DeLorey, T. M. and R. W. Olsen (1992). " Γ -aminobutyric acid_A receptor structure and function." Journal of Biological Chemistry **267**(24): 16747-50.
- Ducic, I., H. J. Caruncho, W. J. Zhu, S. Vicini and E. Costa (1995). " γ -Aminobutyric acid gating of Cl⁻ channels in recombinant GABA_A receptors." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **272**(1): 438-45.
- Duggan, M. J., S. Pollard and F. A. Stephenson (1991). "Immunoaffinity purification of GABA_A receptor α -subunit iso-oligomers. Demonstration of receptor populations containing $\alpha 1 \alpha 2$, $\alpha 1 \alpha 3$, and $\alpha 2 \alpha 3$ subunit pairs." Journal of Biological Chemistry **266**(36): 24778-84.
- Dunn, E., J. M. Fritschy, D. B. Carter and K. M. Merchant (1996). "Differential distribution of γ -aminobutyric acid_A receptor subunit ($\alpha(1)$, $\alpha(2)$, $\alpha(3)$, $\alpha(5)$ and $\beta(2+3)$) immunoreactivity in the medial prefrontal cortex of the rat." Neuroscience Letters **210**(3): 213-217.
- During, M. J., K. M. Ryder and D. D. Spencer (1995). "Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy." Nature **376**(6536): 174-7.
- Ebert, B., S. A. Thompson, K. Saounatsou, R. McKernan, P. Krogsgaard-Larsen and K. A. Wafford (1997). "Differences in agonist/antagonist binding affinity and receptor transduction using recombinant human γ -aminobutyric acid type A receptors." Mol Pharmacol **52**(6): 1150-6.
- Ebert, B., K. A. Wafford, P. J. Whiting, P. Krogsgaard Larsen and J. A. Kemp (1994). "Molecular pharmacology of γ -aminobutyric acid type A receptor agonists and partial agonists in oocytes injected with different α , β , and γ receptor subunit combinations." Molecular Pharmacology **46**(5): 957-63.
- Edgar, P. P. and R. D. Schwartz (1990). "Localization and characterization of ³⁵S-t-butylbicyclophosphorothionate binding in rat brain: an autoradiographic study." J Neurosci **10**(2): 603-12.
- Edgar, P. P. and R. D. Schwartz (1992). "Functionally relevant γ -aminobutyric acid_A receptors: equivalence between receptor affinity (K_d) and potency (EC_{50})?" Molecular Pharmacology **41**(6): 1124-1129.
- Endo, S. and R. W. Olsen (1993). "Antibodies specific for α -subunit subtypes of GABA_A receptors reveal brain regional heterogeneity." Journal of Neurochemistry **60**(4): 1388-98.
- Engel, S. R. and K. A. Grant (2001). "Neurosteroids and behavior." Int Rev Neurobiol **46**: 321-48.
- Enna, S. J. and S. H. Snyder (1977). "Influences ions, enzymes, and detergents on γ -aminobutyric acid-receptor binding in synaptic membranes of rat brain." Mol Pharmacol **13**(3): 442-53.
- Falch, E., P. Jacobsen, P. Krogsgaard-Larsen and D. R. Curtis (1985). "GABA-mimetic activity and

- effects on diazepam binding of aminosulphonic acids structurally related to piperidine-4-sulphonic acid." *J Neurochem* **44**(1): 68-75.
- Ffrench Constant, R. H., T. A. Rocheleau, J. C. Steichen and A. E. Chalmers (1993). "A point mutation in a Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance." *Nature* **363**(6428): 449-51.
- Fisher, J. L. (2002). "A lysine residue in the β 3 subunit contributes to the regulation of GABA_A receptor activity by voltage." *Mol Cell Neurosci* **20**(4): 683-94.
- Fisher, J. L., J. Zhang and R. L. Macdonald (1997). "The role of α 1 and α 6 subtype amino-terminal domains in allosteric regulation of γ -aminobutyric acid_A receptors." *Molecular Pharmacology* **52**(4): 714-24.
- Fritschy, J. M., D. K. Johnson, H. Möhler and U. Rudolph (1998). "Independent assembly and subcellular targeting of GABA_A-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo." *Neuroscience Letters* **249**(2-3): 99-102.
- Frolund, B., U. Kristiansen, L. Brehm, A. B. Hansen, P. Krosgaardlarsen and E. Falch (1995). "Partial GABA_A receptor agonists. synthesis and in vitro pharmacology of a series of nonannulated analogs of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol." *J Med Chem* **38**(17): 3287-3296.
- Frye, G. D., R. E. Chapin, R. A. Vogel, R. B. Mailman, C. D. Kilts, R. A. Mueller and G. R. Breese (1981). "Effects of acute and chronic 1,3-butanediol treatment on central nervous system function: a comparison with ethanol." *J Pharmacol Exp Ther* **216**(2): 306-14.
- Gallagher, J. P., J. Nakamura and P. Shinnick Gallagher (1983). "The effects of temperature, pH and Cl-pump inhibitors on GABA responses recorded from cat dorsal root ganglia." *Brain Res* **267**(2): 249-59.
- Galvez-Ruano, E., M. H. Aprison, D. H. Robertson and K. B. Lipkowitz (1995). "Identifying agonistic and antagonistic mechanisms operative at the GABA receptor." *Journal of Neuroscience Research* **42**(5): 666-673.
- Galzi, J. L., D. Bertrand, A. Devillers-Thiery, F. Revah, S. Bertrand and J. P. Changeux (1991). "Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the α 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis." *FEBS Lett* **294**(3): 198-202.
- Galzi, J. L., F. Revah, D. Black, M. Goeldner, C. Hirth and J. P. Changeux (1990). "Identification of a novel amino acid α -tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites." *J Biol Chem* **265**(18): 10430-7.
- Gardner, C. R., R. Deacon, V. James, F. Parker and P. Budhram (1987). "Agonist and antagonist activities at benzodiazepine receptors of a novel series of quinoline derivatives." *European Journal of Pharmacology* **142**(2): 285-95.
- Gardner, C. R., W. R. Tully and C. J. Hedgecock (1993). "The rapidly expanding range of neuronal benzodiazepine receptor ligands." *Progress in Neurobiology* **40**(1): 1-61.
- Gee, K. W. (1988). "Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore." *Mol Neurobiol* **2**(4): 291-317.
- Gee, K. W., M. B. Bolger, R. E. Brinton, H. Coirini and B. S. McEwen (1988). "Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **246**(2): 803-12.
- Gee, K. W., R. E. Brinton and B. S. McEwen (1988). "Regional distribution of a Ro5 4864 binding site that is functionally coupled to the γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex in rat brain." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **244**(1): 379-83.
- Giorgi, O., M. Orlandi, D. Lecca, G. P. Serra, L. Zhang and M. G. Corda (1996). "Kinetics of tert-[³⁵S]butylbicyclophosphorothionate binding in the cerebral cortex of newborn and adult rats: effects of GABA and receptor desensitization." *J Neurochem* **67**(1): 423-9.
- Giorgi, O., M. Orlandi, D. Lecca, G. P. Serra, L. Zhang and M. G. Corda (1996). "Kinetics of tert-[³⁵S]butylbicyclophosphorothionate binding in the cerebral cortex of newborn and adult rats: Effects of GABA and receptor desensitization." *Journal of Neurochemistry* **67**(1): 423-429.
- Giraudat, J., M. Dennis, T. Heidmann, P. Y. Haumont, F. Lederer and J. P. Changeux (1987). "Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: [³H]chlorpromazine labels homologous residues in the β and δ chains." *Biochemistry* **26**(9): 2410-8.
- Givens, B. and K. McMahon (1997). "Effects of ethanol on nonspatial working memory and attention

- in rats." *Behav Neurosci* **111**(2): 275-82.
- Goldstein (1974). *Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology*. New York, John Wiley.
- Grant, K. A. and D. M. Lovinger (1995). "Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: receptor-mediated neuronal processes." *Clin Neurosci* **3**(3): 155-64.
- Greger, R. and P. Wangemann (1987). "Loop diuretics." *Renal Physiol* **10**(3-4): 174-83.
- Grobin, A. C., D. B. Matthews, L. L. Devaud and A. L. Morrow (1998). "The role of GABA_A receptors in the acute and chronic effects of ethanol." *Psychopharmacology* **139**(1-2): 2-19.
- Gunther, U., J. Benson, D. Benke, J. M. Fritschy, G. Reyes, F. Knoflach, F. Crestani, A. Aguzzi, M. Arigoni, Y. Lang and et al. (1995). "Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the γ 2 subunit gene of γ -aminobutyric acid type A receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(17): 7749-53.
- Gurley, D., J. Amin, P. C. Ross, D. S. Weiss and G. White (1995). "Point Mutations In the M2 Region Of the α , β , or γ Subunit Of the GABA_A Channel That Abolish Block By Picrotoxin." *Rec Channels* **3**(1): 13-20.
- Gutierrez, A., Z. U. Khan and A. L. De Blas (1994). "Immunocytochemical localization of γ 2 short and γ 2 long subunits of the GABA_A receptor in the rat brain." *Journal of Neuroscience* **14**(11 Pt 2): 7168-7179.
- Hadingham, K. L., E. M. Garrett, K. A. Wafford, C. Bain, R. P. Heavens, D. J. Sirinathsinghji and P. J. Whiting (1996). "Cloning of cDNAs encoding the human γ -aminobutyric acid type A receptor α 6 subunit and characterization of the pharmacology of α 6-containing receptors." *Molecular Pharmacology* **49**(2): 253-9.
- Hadingham, K. L., P. Wingrove, B. Le Bourdelles, K. J. Palmer, C. I. Ragan and P. J. Whiting (1993). "Cloning of cDNA sequences encoding human α 2 and α 3 γ -aminobutyric acid_A receptor subunits and characterization of the benzodiazepine pharmacology of recombinant α 1-, α 2-, α 3-, and α 5-containing human γ -aminobutyric acid_A receptors." *Molecular Pharmacology* **43**(6): 970-5.
- Hadingham, K. L., P. B. Wingrove, K. A. Wafford, C. Bain, J. A. Kemp, K. J. Palmer, A. W. Wilson, A. S. Wilcox, J. M. Sikela, C. I. Ragan and et al. (1993). "Role of the β subunit in determining the pharmacology of human γ -aminobutyric acid type A receptors [published erratum appears in *Molecular Pharmacology* 1994 Jul;46(1):211]." *Molecular Pharmacology* **44**(6): 1211-8.
- Haefely, W., A. Kulcsar, H. Möhler, L. Pieri, P. Polc and R. Schaffner (1975). "Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines." *Adv Biochem Psychopharmacol* **14**: 131-51.
- Hamann, M., M. Desarmenien, P. Vanderheyden, P. Piguet and P. Feltz (1990). "Electrophysiological study of tert-butylbicyclophosphorothionate-induced block of spontaneous chloride channels." *Molecular Pharmacology* **37**(4): 578-82.
- Hartig, W., K. Brauer, J. M. Fritschy, G. Bruckner and V. Bigl (1995). "Regional and cellular expression sites of the α 1 subunit of GABA_A receptors in the rat basal forebrain: a cytochemical study with glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase, calcium-binding proteins and nitric oxide synthase as second markers." *Brain Res* **692**(1-2): 215-26.
- Hartvig, L., B. Lukensmejer, T. Liljefors and K. Dekermendjian (2000). "Two conserved arginines in the extracellular N-terminal domain of the GABA_A receptor α (5) subunit are crucial for receptor function." *J Neurochem* **75**(4): 1746-53.
- Hawkinson, J. E. and J. E. Casida (1992). "Binding kinetics of γ -aminobutyric acidA receptor noncompetitive antagonists: trioxabicyclooctane, dithiane, and cyclodiene insecticide-induced slow transition to blocked chloride channel conformation." *Mol Pharmacol* **42**(6): 1069-76.
- He, X. S., X. Y. Wu, R. Q. Shen and Z. J. Sheng (1989). "A low copy number mutant of pUC-derived plasmid." *Yi Chuan Xue Bao* **16**(6): 463-9.
- Heckers, S. and C. Konradi (2002). "Hippocampal neurons in schizophrenia." *J Neural Transm* **109**(5-6): 891-905.
- Hedblom, E. and E. F. Kirkness (1997). "A novel class of GABA_A receptor subunit in tissues of the reproductive system." *J Biol Chem* **272**(24): 15346-50.
- Hevers, W. and H. Lüddens (1998). "The diversity of GABA_A receptors - Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes." *Molecular Neurobiology* **18**(1): 35-86.
- Holland, K. D., A. C. McKeon, D. F. Covey and J. A. Ferrendelli (1990). "Binding interactions of convulsant and anticonvulsant γ -butyrolactones and γ -thiobutyrolactones with the picrotoxin

- receptor." *J Pharmacol Exp Ther* **254**(2): 578-83.
- Horikoshi, T., A. Asanuma, K. Yanagisawa, K. Anzai and S. Goto (1988). "Taurine and β -alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse brain messenger RNA." *Brain Res* **464**(2): 97-105.
- Hucho, F., W. Oberthur and F. Lottspeich (1986). "The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor is formed by the homologous helices M II of the receptor subunits." *FEBS Lett* **205**(1): 137-42.
- Ikegaki, N., N. Saito, M. Hashima and C. Tanaka (1994). "Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT1, GAT2, GAT3) and their application to immunocytochemistry." *Brain Res Mol Brain Res* **26**(1-2): 47-54.
- Im, W. B., J. A. Binder, G. H. Dillon, J. F. Pregoner, H. K. Im and R. A. Altman (1995). "Acceleration of GABA-dependent desensitization by mutating threonine 266 to alanine of the $\alpha 6$ subunit of rat GABA_A receptors." *Neuroscience Letters* **186**(2-3): 203-7.
- Im, W. B. and D. P. Blakeman (1991). "Correlation between γ -aminobutyric acid_A receptor ligand-induced changes in t-butylbicyclophosphorol³⁵S]thionate binding and ³⁶Cl⁻ uptake in rat cerebrocortical membranes." *Molecular Pharmacology* **39**(3): 394-8.
- Im, W. B., H. K. Im, J. F. Pregoner, B. J. Hamilton, D. B. Carter, E. J. Jacobsen, R. E. TenBrink and P. F. VonVoigtlander (1993). "Differential affinity of dihydroimidazoquinoxalines and diimidazoquinazolines to the $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ subtypes of cloned GABA_A receptors." *British Journal of Pharmacology* **110**(2): 677-80.
- Im, W. B., J. F. Pregoner, J. A. Binder, G. L. Alberts and H. K. Im (1997). "Alterations of the benzodiazepine site of rat $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -GABA_A receptor by replacement of several divergent amino-terminal regions with the $\alpha 1$ counterparts." *British Journal of Pharmacology* **120**(4): 559-64.
- Im, W. B., J. F. Pregoner and D. R. Thomsen (1994). "Effects of GABA and various allosteric ligands on TBPS binding to cloned rat GABA_A receptor subtypes." *British Journal of Pharmacology* **112**(4): 1025-30.
- Imoto, K., C. Busch, B. Sakmann, M. Mishina, T. Konno, J. Nakai, H. Bujo, Y. Mori, K. Fukuda and S. Numa (1988). "Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance." *Nature* **335**(6191): 645-8.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Inoue, M. and N. Akaike (1988). "Blockade of γ -aminobutyric acid-gated chloride current in frog sensory neurons by picrotoxin." *Neurosci Res* **5**(5): 380-94.
- Jackel, C., R. Klein, R. Mäkelä, W. Hevers, S. Jezequel, E. R. Korpi and H. Lüddens (1998). "The main determinant of furosemide inhibition on GABA_A receptors is located close to the first transmembrane domain." *European Journal of Pharmacology* **357**(2-3): 251-256.
- Johnston, G. A. (1996). "GABA_A receptor pharmacology." *Pharmacol Ther* **69**(3): 173-98.
- Jones, A., E. R. Korpi, R. M. McKernan, R. Pelz, Z. Nusser, R. Makela, J. R. Mellor, S. Pollard, S. Bahn, F. A. Stephenson, A. D. Randall, W. Sieghart, P. Somogyi, A. J. H. Smith and W. Wisden (1997). "Ligand-gated ion channel subunit partnerships: GABA_A receptor $\alpha 6$ subunit gene inactivation inhibits δ subunit expression." *Journal of Neuroscience* **17**(4): 1350-62.
- Jursky, F., K. Fuchs, A. Buhr, V. Tretter, E. Sigel and W. Sieghart (2000). "Identification of amino acid residues of GABA_A receptor subunits contributing to the formation and affinity of the tert-butylbicyclophosphorothionate binding site." *Journal of Neurochemistry* **74**(3): 1310-1316.
- Kandel, E. R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (1991). *Principles of neural science*. Connecticut, USA, Appleton & Lange.
- Karlin, A. (1993). "Structure of nicotinic acetylcholine receptors." *Curr Opin Neurobiol* **3**(3): 299-309.
- Karobath, M., G. Drexler and P. Supavilai (1981). "Modulation by picrotoxin and IPTBO of ³H-flunitrazepam binding to the GABA/benzodiazepine receptor complex of rat cerebellum." *Life Sci* **28**(3): 307-13.
- Karobath, M. and M. Lippitsch (1979). "THIP and isoguvacine are partial agonists of GABA-stimulated benzodiazepine receptor binding." *European Journal of Pharmacology* **58**(4): 485-8.
- Khan, Z. U., L. P. Fernando, P. Escriba, X. Busquets, J. Mallet, C. P. Miralles, M. Filla and A. L. De Blas (1993). "Antibodies to the human $\gamma 2$ subunit of the γ -aminobutyric acid_A/benzodiazepine

- receptor." Journal of Neurochemistry **60**(3): 961-971.
- Khan, Z. U., A. Gutierrez and A. L. De Blas (1994). "Short and long form $\gamma 2$ subunits of the GABA_A/benzodiazepine receptors." Journal of Neurochemistry **63**(4): 1466-76.
- Khan, Z. U., A. Gutierrez and A. L. De Blas (1994). "The subunit composition of a GABA_A/benzodiazepine receptor from rat cerebellum." Journal of Neurochemistry **63**(1): 371-4.
- Khan, Z. U., A. Gutierrez and A. L. De Blas (1996). "The $\alpha 1$ and $\alpha 6$ subunits can coexist in the same cerebellar GABA_A receptor maintaining their individual benzodiazepine-binding specificities [published erratum appears in Journal of Neurochemistry 1996 May;66(5):2221]." Journal of Neurochemistry **66**(2): 685-91.
- Khrestchatsky, M., A. J. MacLennan, M. Y. Chiang, W. T. Xu, M. B. Jackson, N. Brecha, C. Sternini, R. W. Olsen and A. J. Tobin (1989). "A novel α subunit in rat brain GABA_A receptors." Neuron **3**(6): 745-53.
- Kleingoor, C., H. A. Wieland, E. R. Korpi, P. H. Seeburg and H. Kettenmann (1993). "Current potentiation by diazepam but not GABA sensitivity is determined by a single histidine residue." Neuroreport **4**(2): 187-90.
- Knoflach, F., D. Benke, Y. Wang, L. Scheurer, H. Lüddens, B. J. Hamilton, D. B. Carter, H. Möhler and J. A. Benson (1996). "Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant γ -aminobutyric acid_A receptors $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 6\beta 2\gamma 2$." Molecular Pharmacology **50**(5): 1253-61.
- Knoflach, F., T. Rhyner, M. Villa, S. Kellenberger, U. Drescher, P. Malherbe, E. Sigel and H. Möhler (1991). "The $\gamma 3$ -subunit of the GABA_A-receptor confers sensitivity to benzodiazepine receptor ligands." FEBS Letters **293**(1-2): 191-4.
- Kofuji, P., J. B. Wang, S. J. Moss, R. L. Huganir and D. R. Burt (1991). "Generation of two forms of the γ -aminobutyric acid_A receptor $\gamma 2$ -subunit in mice by alternative splicing." Journal of Neurochemistry **56**(2): 713-5.
- Korneyev, A. (1983). "Benzodiazepines stimulate muscimol receptor binding in an Ro 15-1788 reversible manner." European Journal of Pharmacology **90**(2-3): 227-30.
- Korpi, E. R. (1994). "Role of GABA_A receptors in the actions of alcohol and in alcoholism: recent advances." Alcohol Alcohol **29**(2): 115-29.
- Korpi, E. R., G. Gründer and H. Lüddens (2002). "Drug interactions at GABA_A receptors." Prog Neurobiol **67**(2): 113-59.
- Korpi, E. R., T. Kuner, P. H. Seeburg and H. Lüddens (1995). "Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific γ -aminobutyric acid type A receptor." Molecular Pharmacology **47**(2): 283-9.
- Korpi, E. R. and H. Lüddens (1993). "Regional γ -aminobutyric acid sensitivity of t-butylbicyclophosphoro[³⁵S]thionate binding depends on γ -aminobutyric acid_A receptor α subunit." Mol Pharmacol **44**(1): 87-92.
- Korpi, E. R. and H. Lüddens (1993). "Regional γ -aminobutyric acid sensitivity of t-butylbicyclophosphoro[³⁵S]thionate binding depends on γ -aminobutyric acid_A receptor α subunit." Molecular Pharmacology **44**(1): 87-92.
- Korpi, E. R. and H. Lüddens (1997). "Furosemide interactions with brain GABA_A receptors." British Journal of Pharmacology **120**(5): 741-8.
- Korpi, E. R., H. Lüddens and P. H. Seeburg (1992). "GABA_A antagonists reveal binding sites for [³⁵S]TBPS in cerebellar granular cell layer." European Journal of Pharmacology **211**(3): 427-8.
- Korpi, E. R., M. J. Mattila, W. Wisden and H. Lüddens (1997). "GABA_A-receptor subtypes: clinical efficacy and selectivity of benzodiazepine site ligands." Ann Med **29**(4): 275-82.
- Korpi, E. R., P. H. Seeburg and H. Lüddens (1996). "Modulation of GABA_A receptor tert-[³⁵S] butylbicyclophosphorothionate binding by antagonists: Relationship to patterns of subunit expression." Journal of Neurochemistry **66**(5): 2179-2187.
- Korpi, E. R., M. Uusi Oukari, E. Castren, P. D. Suzdak, T. Seppala, M. Sarviharju and K. Tuominen (1992). "Cerebellar GABA_A receptors in two rat lines selected for high and low sensitivity to moderate alcohol doses: pharmacological and genetic studies." Alcohol **9**(3): 225-231.
- Korpi, E. R., M. Uusi Oukari and K. Wegelius (1992). "Substrate specificity of diazepam-insensitive cerebellar [³H]Ro 15-4513 binding sites." European Journal of Pharmacology **213**(3): 323-9.
- Kristiansen, U., J. L. Barker and R. Serafini (1995). "The low efficacy γ -aminobutyric acid type A agonist 5-(4-piperidyl)isoxazol-3-ol opens brief Cl⁻ channels in embryonic rat olfactory bulb

- neurons." Molecular Pharmacology **48**(2): 268-79.
- Kristiansen, U., J. D. Lambert, E. Falch and P. Krogsgaard-Larsen (1991). "Electrophysiological studies of the GABA_A receptor ligand, 4-PIOL, on cultured hippocampal neurones." Br J Pharmacol **104**(1): 85-90.
- Krogsgaard Larsen, P., B. Frolund, F. S. Jorgensen and A. Schousboe (1994). "GABA_A receptor agonists, partial agonists, and antagonists. Design and therapeutic prospects." J Med Chem **37**(16): 2489-505.
- Krogsgaard-Larsen, P., G. A. Johnston, D. Lodge and D. R. Curtis (1977). "A new class of GABA agonist." Nature **268**(5615): 53-5.
- Lader, M. (1994). "Biological processes in benzodiazepine dependence." Addiction **89**(11): 1413-8.
- Langosch, D., C. M. Becker and H. Betz (1990). "The inhibitory glycine receptor: a ligand-gated chloride channel of the central nervous system." Eur J Biochem **194**(1): 1-8.
- Laurie, D. J., P. H. Seeburg and W. Wisden (1992). "The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory Bulb and Cerebellum." Journal of Neuroscience **12**(3): 1063-1076.
- Laurie, D. J., W. Wisden and P. H. Seeburg (1992). "The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development." Journal of Neuroscience **12**(11): 4151-72.
- Lawrence, L. J. and J. E. Casida (1983). "Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the γ -aminobutyric acid receptor-ionophore complex." Science **221**(4618): 1399-401.
- Lawrence, L. J. and J. E. Casida (1984). "Interactions of lindane, toxaphene and cyclodienes with brain-specific t-butylbicyclophosphorothionate receptor." Life Sci **35**(2): 171-8.
- Lawrence, L. J., K. W. Gee and H. I. Yamamura (1984). "Benzodiazepine anticonvulsant action: γ -aminobutyric acid-dependent modulation of the chloride ionophore." Biochem Biophys Res Commun **123**(3): 1130-7.
- Lawrence, L. J., C. J. Palmer, K. W. Gee, X. Wang, H. I. Yamamura and J. E. Casida (1985). "t-[³H]butylbicycloorthobenzoate: new radioligand probe for the γ -aminobutyric acid-regulated chloride ionophore." Journal of Neurochemistry **45**(3): 798-804.
- Lee, L. G., C. R. Connell, S. L. Woo, R. D. Cheng, B. F. McArdle, C. W. Fuller, N. D. Halloran and R. K. Wilson (1992). "DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments." Nucleic Acids Res **20**(10): 2471-83.
- Levitan, E. S., P. R. Schofield, D. R. Burt, L. M. Rhee, W. Wisden, M. Köhler, N. Fujita, H. F. Rodriguez, F. A. Stephenson, M. G. Darlison, E. Barnard and P. H. Seeburg (1988). "Structural and functional basis for GABA_A receptor heterogeneity." Nature **335**(6185): 76-79.
- Li, M. and A. L. De Blas (1997). "Coexistence of two β subunit isoforms in the same γ -aminobutyric acid type A receptor." Journal of Biological Chemistry **272**(26): 16564-9.
- Liljequist, S. and B. Tabakoff (1993). "Bicuculline-produced regional differences in the modulation of ³⁵S-TBPS binding by GABA, pentobarbital and diazepam in mouse cerebellum and cortex." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **264**(2): 638-47.
- Loup, F., O. Weinmann, Y. Yonekawa, A. Aguzzi, H. G. Wieser and J. M. Fritschy (1998). "A highly sensitive immunofluorescence procedure for analyzing the subcellular distribution of GABA_A receptor subunits in the human brain." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **46**(10): 1129-1139.
- Lüddens, H. and E. R. Korpi (1995). "GABA antagonists differentiate between recombinant GABA_A/benzodiazepine receptor subtypes." J Neurosci **15**(10): 6957-62.
- Lüddens, H. and E. R. Korpi (1995). "GABA antagonists differentiate between recombinant GABA_A/benzodiazepine receptor subtypes." Journal of Neuroscience **15**(10): 6957-62.
- Lüddens, H. and E. R. Korpi (1997). Methods for transient expression of hetero-oligomeric ligand-gated ion channels. Receptor Signal Transduction Protocols, R. A. J. Challiss. Totowa, New Jersey, Humana Press. **83**: 55-63.
- Lüddens, H., D. B. Pritchett, M. Köhler, I. Killisch, K. Keinänen, H. Monyer, R. Sprengel and P. H. Seeburg (1990). "Cerebellar GABA_A receptor selective for a behavioural alcohol antagonist [see comments]." Nature **346**(6285): 648-51.
- Lüddens, H., P. H. Seeburg and E. R. Korpi (1994). "Impact of β and γ variants on ligand-binding properties of γ -aminobutyric acid type A receptors." Molecular Pharmacology **45**(5): 810-4.
- Lüddens, H. and W. Wisden (1991). "Function and pharmacology of multiple GABA_A receptor

- subunits." *Trends Pharmacol Sci* **12**(2): 49-51.
- Macdonald, R. and J. L. Barker (1978). "Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurones." *Nature* **271**(5645): 563-4.
- Macdonald, R. L. and J. L. Barker (1978). "Different actions of anticonvulsant and anesthetic barbiturates revealed by use of cultured mammalian neurons." *Science* **200**(4343): 775-7.
- Macdonald, R. L. and R. W. Olsen (1994). "GABA_A Receptor Channels." *Annu Rev Neurosci* **17**: 569-602.
- Macdonald, R. L., C. J. Rogers and R. E. Twyman (1989). "Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABA_A receptor channel of mouse spinal neurones in culture." *Journal of Physiology* **417**: 483-500.
- Macdonald, R. L., C. J. Rogers and R. E. Twyman (1989). "Kinetic properties of the GABA_A receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture." *Journal of Physiology* **410**: 479-99.
- Macdonald, R. L. and R. E. Twyman (1992). "Kinetic properties and regulation of GABA_A receptor channels." *Ion Channels* **3**: 315-43.
- Macdonald, R. L., R. E. Twyman, T. Ryan Jastrow and T. P. Angelotti (1992). "Regulation of GABA_A receptor channels by anticonvulsant and convulsant drugs and by phosphorylation." *Epilepsy Res Suppl* **9**: 265-77.
- Machu, T. K., J. A. Firestone and M. D. Browning (1993). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C phosphorylate a synthetic peptide corresponding to a sequence that is specific for the γ 2L subunit of the GABA_A receptor." *Journal of Neurochemistry* **61**(1): 375-7.
- Majchrowicz, E. (1975). "Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats." *Psychopharmacologia* **43**(3): 245-54.
- Makela, R., M. UusiOukari, G. E. Homanics, J. J. Quinlan, L. L. Firestone, W. Wisden and E. R. Korpi (1997). "Cerebellar γ -aminobutyric acid type A receptors: Pharmacological subtypes revealed by mutant mouse lines." *Molecular Pharmacology* **52**(3): 380-388.
- Maksay, G. (1994). "Thermodynamics of γ -aminobutyric acid type A receptor binding differentiate agonists from antagonists." *Molecular Pharmacology* **46**(2): 386-390.
- Maksay, G. and M. Simonyi (1986). "Kinetic regulation of convulsant (TBPS) binding by GABAergic agents." *Molecular Pharmacology* **30**(4): 321-8.
- Maksay, G. and M. Simonyi (1988). "Nonequilibrium modulation of ³⁵S-TBPS binding by benzodiazepine agonists and antagonists." *Biochem Pharmacol* **37**(11): 2195-200.
- Maksay, G. and M. K. Ticku (1985). "Dissociation of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binding differentiates convulsant and depressant drugs that modulate GABAergic transmission." *J Neurochem* **44**(2): 480-6.
- Malherbe, P., A. Draguhn, G. Multhaup, K. Beyreuther and H. Möhler (1990). "GABA_A-receptor expressed from rat brain α - and β -subunit cDNAs displays potentiation by benzodiazepine receptor ligands." *Mol Brain Res* **8**(3): 199-208.
- Malherbe, P., E. Sigel, R. Baur, E. Persohn, J. G. Richards and H. Möhler (1990). "Functional characteristics and sites of gene expression of the α 1, β 1, γ 2-isoform of the rat GABA_A receptor." *Journal of Neuroscience* **10**(7): 2330-7.
- Malherbe, P., E. Sigel, R. Baur, E. Persohn, J. G. Richards and H. Möhler (1990). "Functional expression and sites of gene transcription of a novel α subunit of the GABA_A receptor in rat brain." *FEBS Letters* **260**(2): 261-265.
- Malmiemi, O. and E. R. Korpi (1989). "Diazepam-insensitive [³H]Ro 15-4513 binding in intact cultured cerebellar granule cells." *European Journal of Pharmacology* **169**(1): 53-60.
- Matthews, D. B., P. E. Simson and P. J. Best (1995). "Acute ethanol impairs spatial memory but not stimulus/response memory in the rat." *Alcohol Clin Exp Res* **19**(4): 902-9.
- McIntyre, T. and P. Skolnick (1991). "t-[³⁵S]butylbicyclophosphorothionate binding under equilibrium and nonequilibrium conditions: differential effects of barbiturates and γ -aminobutyric acid in the long-sleep and short-sleep selected mouse lines." *J Neurochem* **56**(1): 287-93.
- Misgeld, U., R. A. Deisz, H. U. Dodt and H. D. Lux (1986). "The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons." *Science* **232**(4756): 1413-5.
- Möhler, H., W. P. Burkard, H. H. Keller, J. G. Richards and W. Haefely (1981). "Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: binding characteristics and interaction with drug-induced changes in dopamine turnover and cerebellar cGMP levels." *Journal of Neurochemistry* **37**(3): 714-22.
- Nayeem, N., T. P. Green, I. L. Martin and E. A. Barnard (1994). "Quaternary structure of the native

- GABA_A receptor determined by electron microscopic image analysis." Journal of Neurochemistry **62**(2): 815-8.
- Neelands, T. R. and R. L. Macdonald (1999). "Incorporation of the pi subunit into functional γ -aminobutyric Acid_A receptors." Molecular Pharmacology **56**(3): 598-610.
- Newland, C. F. and C. S. Cull (1992). "On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat." Journal of Physiology **447**(191): 191-213.
- Nicoll, R. A. (1978). "The blockade of GABA mediated responses in the frog spinal cord by ammonium ions and furosemide." Journal of Physiology **283**: 121-32.
- Nielsen, M., M. R. Witt, B. Ebert and P. Krosggaard-Larsen (1995). "Thiomuscimol, a new photoaffinity label for the GABA_A receptor." Eur J Pharmacol **289**(1): 109-12.
- Nusser, Z., W. Sieghart, D. Benke, J. M. Fritschy and P. Somogyi (1996). "Differential synaptic localization of two major γ -aminobutyric acid type A receptor α subunits on hippocampal pyramidal cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(21): 11939-44.
- Olsen, R. W. (1982). "Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex." Annu Rev Pharmacol Toxicol **22**: 245-77.
- Olsen, R. W., M. O. Bergman, P. C. Van Ness, S. C. Lummis, A. E. Watkins, C. Napias and D. V. Greenlee (1981). " γ -Aminobutyric acid receptor binding in mammalian brain. Heterogeneity of binding sites." Molecular Pharmacology **19**(2): 217-27.
- Olsen, R. W., R. T. McCabe and J. K. Wamsley (1990). "GABA_A receptor subtypes: autoradiographic comparison of GABA, benzodiazepine, and convulsant binding sites in the rat central nervous system." J Chem Neuroanat **3**(1): 59-76.
- Olsen, R. W., E. W. Snowhill and J. K. Wamsley (1984). "Autoradiographic localization of low affinity GABA receptors with [³H]bicuculline methochloride." European Journal of Pharmacology **99**(2-3): 247-8.
- Olsen, R. W. and A. J. Tobin (1990). "Molecular biology of GABA_A receptors." FASEB Journal **4**(5): 1469-80.
- Osborne, N. N. (1980). "Binding of [³H]-muscimol, a potent γ -aminobutyric acid receptor agonist, to membranes of the bovine retina." Br J Pharmacol **71**(1): 259-64.
- O'Shea, S. M. and N. L. Harrison (2000). "Arg-274 and Leu-277 of the γ -aminobutyric acid type A receptor α 2 subunit define agonist efficacy and potency." J Biol Chem **275**(30): 22764-8.
- Palacios, J. M., J. K. Wamsley and M. J. Kuhar (1981). "High affinity GABA receptors- autoradiographic localization." Brain Res **222**(2): 285-307.
- Palacios, J. M., W. S. Young, 3rd and M. J. Kuhar (1980). "Autoradiographic localization of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors in the rat cerebellum." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 670-4.
- Paxinos, G. a. W., Charles (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Californien, Academic Press.
- Pearce, R. A. (1993). "Physiological evidence for two distinct GABA_A responses in rat hippocampus." Neuron **10**(2): 189-200.
- Pedersen, S. E. and J. B. Cohen (1990). "d-Tubocurarine binding sites are located at α - γ and α - δ subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(7): 2785-9.
- Pellow, S. and S. E. File (1984). "Behavioural actions of Ro 5-4864: a peripheral-type benzodiazepine?" Life Sci **35**(3): 229-40.
- Peris, J., A. Shawley, R. Dawson and K. H. Abendschein (1991). "Regulation of ³⁵S-TBPS binding by bicuculline is region specific in rat brain." Life Sci **49**(11): 54.
- Petty, F. (1995). "GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis." J Affective Disord **34**(4): 275-281.
- Polc, P., E. P. Bonetti, R. Schaffner and W. Haefely (1982). "A three-state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquilizers, β -carbolines, and phenobarbitone." Naunyn-Schmied Arch Pharmacol **321**(4): 260-4.
- Polc, P. and W. Haefely (1976). "Effects of two benzodiazepines, phenobarbitone, and baclofen on synaptic transmission in the cat cuneate nucleus." Naunyn-Schmied Arch Pharmacol **294**(2): 121-31.
- Pomes, A., E. Rodriguez-Farre and C. Sunol (1993). "Inhibition of t-

- [³⁵S]butylbicyclophosphorothionate binding by convulsant agents in primary cultures of cerebellar neurons." *Brain Res Dev Brain Res* **73**(1): 85-90.
- Pregenzer, J. F., W. B. Im, D. B. Carter and D. R. Thomsen (1993). "Comparison of interactions of [³H]muscimol, t-butylbicyclophosphoro[³⁵S]thionate, and [³H]flunitrazepam with cloned γ -aminobutyric acid_A receptors of the α 1 β 2 and α 1 β 2 γ 2 subtypes." *Molecular Pharmacology* **43**(5): 801-6.
- Pritchett, D. B., H. Lüddens and P. H. Seeburg (1989). "Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells." *Science* **245**(4924): 1389-1392.
- Pritchett, D. B. and P. H. Seeburg (1990). " γ -aminobutyric acid_A receptor α ₅-subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology." *Journal of Neurochemistry* **54**(5): 1802-1804.
- Pritchett, D. B., H. Sontheimer, C. M. Gorman, H. Kettenmann, P. H. Seeburg and P. R. Schofield (1988). "Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of GABA_A receptor subunits." *Science* **242**(4883): 1306-8.
- Pritchett, D. B., H. Sontheimer, B. D. Shivers, S. Ymer, H. Kettenmann, P. R. Schofield and P. H. Seeburg (1989). "Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology." *Nature* **338**(6216): 582-585.
- Puia, G., I. Ducic, S. Vicini and E. Costa (1992). "Molecular mechanisms of the partial allosteric modulatory effects of bretazenil at γ -aminobutyric acid type A receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(8): 3620-4.
- Puia, G., S. Vicini, P. H. Seeburg and E. Costa (1991). "Influence of recombinant γ -aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of γ -aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents." *Molecular Pharmacology* **39**(6): 691-6.
- Quinn, M. R. and C. L. Harris (1995). "Taurine allosterically inhibits binding of [³⁵S]-t-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) to rat brain synaptic membranes." *Neuropharmacology* **34**(12): 1607-13.
- Quinn, M. R. and C. L. Miller (1992). "Taurine allosterically modulates flunitrazepam binding to synaptic membranes." *J Neurosci Res* **33**(1): 136-41.
- Quirk, K., N. P. Gillard, C. I. Ragan, P. J. Whiting and R. M. McKernan (1994). " γ -Aminobutyric acid type a receptors in the rat brain can contain both γ 2 and γ 3 subunits, but γ 1 does not exist in combination with another γ subunit." *Molecular Pharmacology* **45**(6): 1061-70.
- Rabe, H., R. Picard, M. Uusi-Oukari, W. Hevers, H. Lüddens and E. R. Korpi (2001). "Coupling between agonists and chloride ionophore sites of the GABA_A receptor: agonist/antagonist efficacy of 4-PIOL." *European Journal of Pharmacology* **409**: 233-242.
- Rabow, L. E., S. J. Russek and D. H. Farb (1995). "From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research." *Synapse* **21**(3): 189-274.
- Ramanjaneyulu, R. and M. K. Ticku (1984). "Binding characteristics and interactions of depressant drugs with [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate, a ligand that binds to the picrotoxinin site." *J Neurochem* **42**(1): 221-9.
- Robertson, H. A., M. Riives, D. A. Black and M. R. Peterson (1984). "A partial agonist at the anticonvulsant benzodiazepine receptor: reversal of the anticonvulsant effects of Ro 15-1788 with CGS-8216." *Brain Res* **291**(2): 388-90.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Sambrook J, F. E., Maniatis T (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*. New York 1989, Cold Spring Harbour Press.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Sapp, D. W., U. Witte, D. M. Turner, B. Longoni, N. Kokka and R. W. Olsen (1992). "Regional variation in steroid anesthetic modulation of [³⁵S]TBPS binding to γ -aminobutyric acid_A receptors in rat brain." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **262**(2): 801-8.
- Sarlieve, L. L., F. V. DeFeudis, L. Ossola and P. Mandel (1980). "Binding of [³H]GABA and [³H]muscimol to subcellular particles of a neurone-enriched culture of mouse brain." *Experientia* **36**(5): 597-9.
- Scheller, M. and S. A. Forman (2002). "Coupled and uncoupled gating and desensitization effects by pore domain mutations in GABA_A receptors." *J Neurosci* **22**(19): 8411-21.
- Schmieden, V., J. Kuhse and H. Betz (1993). "Mutation of glycine receptor subunit creates β -alanine

- receptor responsive to GABA." *Science* **262**(5131): 256-8.
- Schofield, P. R., M. G. Darlison, N. Fujita, D. R. Burt, F. A. Stephenson, H. Rodriguez, L. M. Rhee, J. Ramachandran, V. Reale, T. A. Glencorse, V. Reale, P. H. Seeburg and E. A. Barnard (1987). "Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family." *Nature* **328**(6127): 221-227.
- Scott, M. K., D. A. Demeter, S. O. Nortey, B. Dubinsky, R. P. Shank and A. B. Reitz (1999). "New directions in anxiolytic drug research." *Prog Med Chem* **36**: 169-200.
- Scuvee-Moreau, J. and V. Seutin (2001). "[Recent progress in the pharmacology of hypnotics and anxiolytics]." *Rev Med Liege* **56**(3): 159-64.
- Seeburg, P. H., W. Wisden, T. A. Verdoorn, D. B. Pritchett, P. Werner, A. Herb, H. Lüddens, R. Sprengel and B. Sakmann (1990). "The GABA_A receptor family: molecular and functional diversity." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **55**: 29-40.
- Shirakawa, K. (2002). "[Pharmacological profile and clinical effect of zolpidem (Myslee tablets), a hypnotic agent]." *Nippon Yakurigaku Zasshi* **119**(2): 111-8.
- Shivers, B. D., I. Killisch, R. Sprengel, H. Sontheimer, M. Köhler, P. R. Schofield and P. H. Seeburg (1989). "Two novel GABA_A receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations." *Neuron* **3**(3): 327-337.
- Sieghart, W. (1995). "Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acidA receptor subtypes." *Pharmacological Reviews* **47**(2): 181-234.
- Sigel, E. and R. Baur (2000). "Electrophysiological evidence for the coexistence of α 1 and α 6 subunits in a single functional GABA_A receptor." *Journal of Neurochemistry* **74**(6): 2590-6.
- Sigel, E., R. Baur, S. Kellenberger and P. Malherbe (1992). "Point mutations affecting antagonist affinity and agonist dependent gating of GABA_A receptor channels." *EMBO J* **11**(6): 2017-23.
- Sigel, E., R. Baur, G. Trube, H. Möhler and P. Malherbe (1990). "The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function." *Neuron* **5**(5): 703-11.
- Sigel, E., F. A. Stephenson, C. Mamalaki and E. A. Barnard (1983). "A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex." *Journal of Biological Chemistry* **258**(11): 6965-71.
- Sinkkonen, S. T., M. C. Hanna, E. F. Kirkness and E. R. Korpi (2000). "GABA_A receptor epsilon and τ subunits display unusual structural variation between species and are enriched in the rat locus ceruleus." *J Neurosci* **20**(10): 3588-95.
- Skerritt, J. H. and G. A. Johnston (1983). "Diazepam stimulates the binding of GABA and muscimol but not THIP to rat brain membranes." *Neuroscience Letters* **38**(3): 315-20.
- Skerritt, J. H. and G. A. Johnston (1983). "Interactions of some anaesthetic, convulsant, and anticonvulsant drugs at GABA-benzodiazepine receptor-ionophore complexes in rat brain synaptosomal membranes." *Neurochem Res* **8**(10): 1351-62.
- Skerritt, J. H. and R. L. Macdonald (1983). "Benzodiazepine Ro 15-1788: electrophysiological evidence for partial agonist activity." *Neuroscience Letters* **43**(2-3): 321-6.
- Smith, G. B. and R. W. Olsen (1994). "Identification of a [³H]muscimol photoaffinity substrate in the bovine γ -aminobutyric acid_A receptor α subunit." *Journal of Biological Chemistry* **269**(32): 20380-7.
- Smith, T. A. (2001). "Type A γ -aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment." *Br J Biomed Sci* **58**(2): 111-21.
- Somogyi, P., J. M. Fritschy, D. Benke, J. D. B. Roberts and W. Sieghart (1996). "The γ 2 subunit of the GABA_A receptor is concentrated in synaptic junctions containing the α 1 and β 2/3 subunits in hippocampus, cerebellum and globus pallidus." *Neuropharmacology* **35**(9-10): 1425-1444.
- Squires, R. F., J. E. Casida, M. Richardson and E. Saederup (1983). "[³⁵S]-butylbicyclophosphorothionate binds with high affinity to brain-specific sites coupled to γ -aminobutyric acid-A and ion recognition sites." *Molecular Pharmacology* **23**(2): 326-36.
- Squires, R. F. and E. Saederup (1987). "GABA_A receptor blockers reverse the inhibitory effect of GABA on brain-specific [³⁵S]TBPS binding." *Brain Res* **414**(2): 357-64.
- Stephenson, F. A., M. J. Duggan and S. Pollard (1990). "The γ 2 subunit is an integral component of the γ -aminobutyric acid_A receptor but the α 1 polypeptide is the principal site of the agonist benzodiazepine photoaffinity labeling reaction." *Journal of Biological Chemistry* **265**(34): 21160-5.
- Sternbach, L. H. (1978). "The benzodiazepine story." *Prog Drug Res* **22**: 229-66.

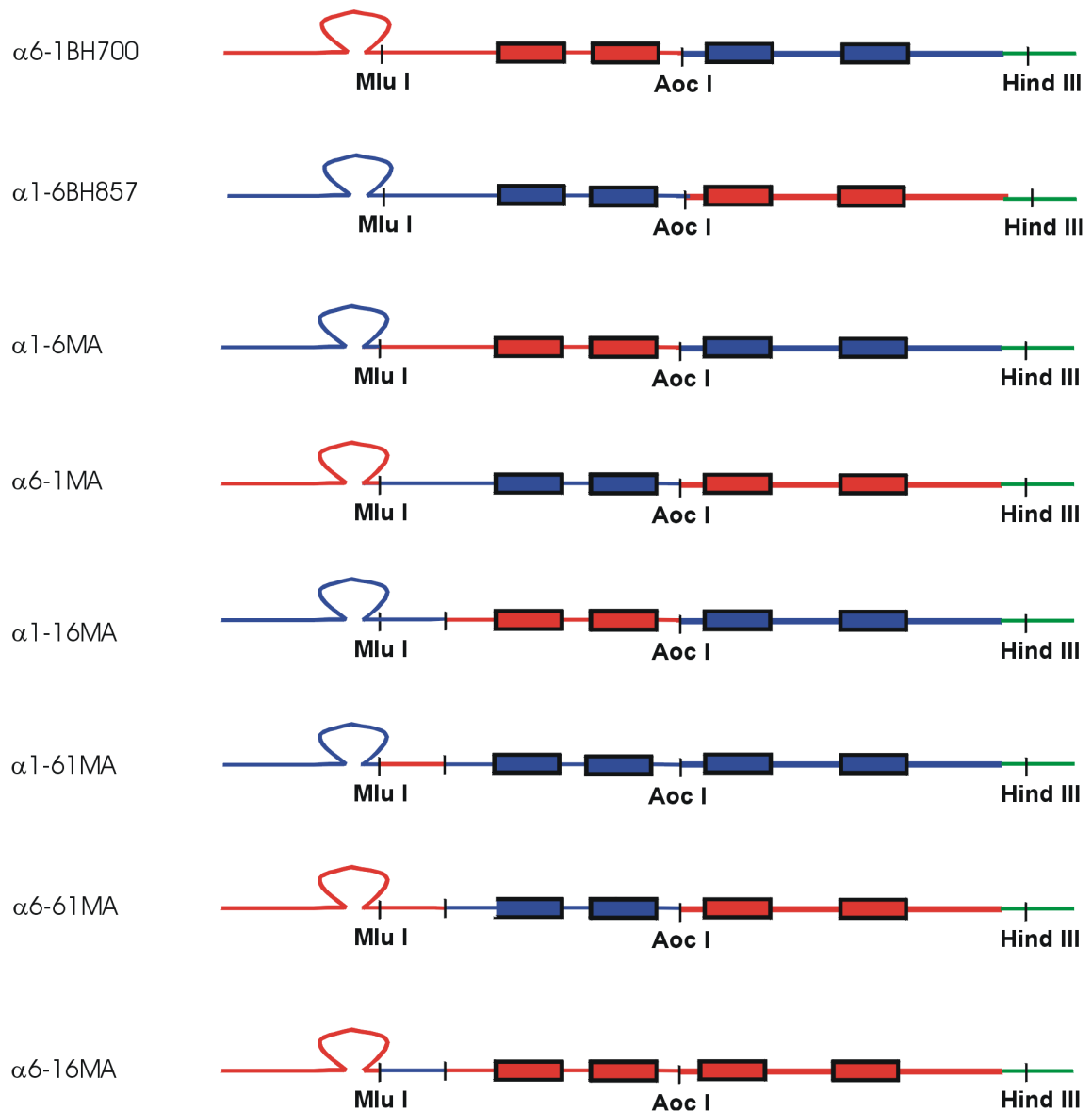
- Supavilai, P. and M. Karobath (1980). "The effect of temperature and chloride ions on the stimulation of [³H]flunitrazepam binding by the muscimol analogues THIP and piperidine-4-sulfonic acid." *Neuroscience Letters* **19**(3): 337-41.
- Suzdak, P. D. and J. A. Jansen (1995). "A review of the preclinical pharmacology of tiagabine: a potent and selective anticonvulsant GABA uptake inhibitor." *Epilepsia* **36**(6): 612-26.
- Thompson, S. A., S. A. Arden, G. Marshall, P. B. Wingrove, P. J. Whiting and K. A. Wafford (1999). "Residues in transmembrane domains I and II determine γ -aminobutyric acid type AA receptor subtype-selective antagonism by furosemide." *Molecular Pharmacology* **55**(6): 993-9.
- Thompson, S. M., R. A. Deisz and D. A. Prince (1988). "Relative contributions of passive equilibrium and active transport to the distribution of chloride in mammalian cortical neurons." *J Neurophysiol* **60**(1): 105-24.
- Ticku, M. K. and R. Ramanjaneyulu (1984). "Differential interactions of GABA agonists, depressant and convulsant drugs with [³⁵S]-t-butylbicyclophosphorothionate binding sites in cortex and cerebellum." *Pharmacol Biochem Behav* **21**(1): 151-8.
- Tretter, V., N. Ehya, K. Fuchs and W. Sieghart (1997). "Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA_A receptor subtype." *Journal of Neuroscience* **17**(8): 2728-37.
- Twyman, R. E., C. J. Rogers and R. L. Macdonald (1990). "Intraburst kinetic properties of the GABA_A receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture." *Journal of Physiology* **423**: 193-220.
- Unwin, N. (1989). "The structure of ion channels in membranes of excitable cells." *Neuron* **3**(6): 665-76.
- Unwin, N. (1995). "Acetylcholine receptor channel imaged in the open state." *Nature* **373**: 37-43.
- Van Renterghem, C., G. Bilbe, S. Moss, T. G. Smart, A. Constanti, D. A. Brown and E. A. Barnard (1987). "GABA receptors induced in *Xenopus* oocytes by chick brain mRNA: evaluation of TBPS as a use-dependent channel-blocker." *Brain Res* **388**(1): 21-31.
- Vandenberg, R. J., C. A. Handford and P. R. Schofield (1992). "Distinct agonist- and antagonist-binding sites on the glycine receptor." *Neuron* **9**(3): 491-6.
- Verdoorn, T. A. (1994). "Formation of heteromeric γ -aminobutyric acid type A receptors containing two different α subunits." *Molecular Pharmacology* **45**(3): 475-80.
- Verdoorn, T. A., A. Draguhn, S. Ymer, P. H. Seeburg and B. Sakmann (1990). "Functional properties of recombinant rat GABA_A receptors depend upon subunit composition." *Neuron* **4**(6): 919-28.
- Wafford, K. A., C. J. Bain, K. Quirk, R. M. McKernan, P. B. Wingrove, P. J. Whiting and J. A. Kemp (1994). "A Novel Allosteric Modulatory Site on the GABA_A Receptor β Subunit." *Neuron* **12**(4): 775-782.
- Wafford, K. A., S. A. Thompson, D. Thomas, J. Sikela, A. S. Wilcox and P. J. Whiting (1996). "Functional characterization of human γ -aminobutyric acid_A receptors containing the α 4 subunit." *Molecular Pharmacology* **50**(3): 670-678.
- Westh-Hansen, S. E., P. B. Rasmussen, S. Hastrup, J. Nabekura, K. Noguchi, N. Akaike, M. R. Witt and M. Nielsen (1997). "Decreased agonist sensitivity of human GABA_A receptors by an amino acid variant, isoleucine to valine, in the α 1 subunit." *Eur J Pharmacol* **329**(2-3): 253-7.
- Westh-Hansen, S. E., M. R. Witt, K. Dekermendjian, T. Liljefors, P. B. Rasmussen and M. Nielsen (1999). "Arginine residue 120 of the human GABA_A receptor α 1, subunit is essential for GABA binding and chloride ion current gating." *Neuroreport* **10**(11): 2417-21.
- Whiting, P., R. M. McKernan and L. L. Iversen (1990). "Another mechanism for creating diversity in γ -aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of γ 2 phosphorylation site." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(24): 9966-70.
- Wieland, H. A., H. Lüddens and P. H. Seeburg (1992). "A single histidine in GABA_A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding." *Journal of Biological Chemistry* **267**(3): 1426-9.
- Wisden, W., E. R. Korpi and S. Bahn (1996). "The cerebellum: a model system for studying GABA_A receptor diversity." *Neuropharmacology* **35**(9-10): 1139-60.
- Wisden, W., D. J. Laurie, H. Monyer and P. H. Seeburg (1992). "The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon." *Journal of Neuroscience* **12**(3): 1040-1062.
- Wisden, W. and P. H. Seeburg (1992). "GABA_A receptor channels: from subunits to functional

- entities." Curr Opin Neurobiol **2**(3): 263-9.
- Wong, E. H. and L. L. Iversen (1985). "Modulation of [³H]diazepam binding in rat cortical membranes by GABA_A agonists." J Neurochem **44**(4): 1162-7.
- Woodward, R. M., L. Polenzani and R. Miledi (1993). "Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of γ -aminobutyric acidA and γ -aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists." Molecular Pharmacology **43**(4): 609-25.
- Wu, F. S., T. T. Gibbs and D. H. Farb (1993). "Dual activation of GABA_A and glycine receptors by β -alanine: inverse modulation by progesterone and 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one." European Journal of Pharmacology **246**(3): 239-46.
- Xie, Y. and J. B. Cohen (2001). "Contributions of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor γ Trp-55 and δ Trp-57 to agonist and competitive antagonist function." J Biol Chem **276**(4): 2417-26.
- Ymer, S., P. R. Schofield, A. Draguhn, P. Werner, M. Kohler and P. H. Seeburg (1989). "GABA_A receptor β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs." Embo J **8**(6): 1665-70.
- Yoon, K. W., D. F. Covey and S. M. Rothman (1993). "Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons." Journal of Physiology **464**(423): 423-39.
- Young, A. B. and S. H. Snyder (1973). "Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(10): 2832-6.
- Zhang, D., Z. H. Pan, X. Zhang, A. D. Brideau and S. A. Lipton (1995). "Cloning of a γ -aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxin channel block." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(25): 11756-60.

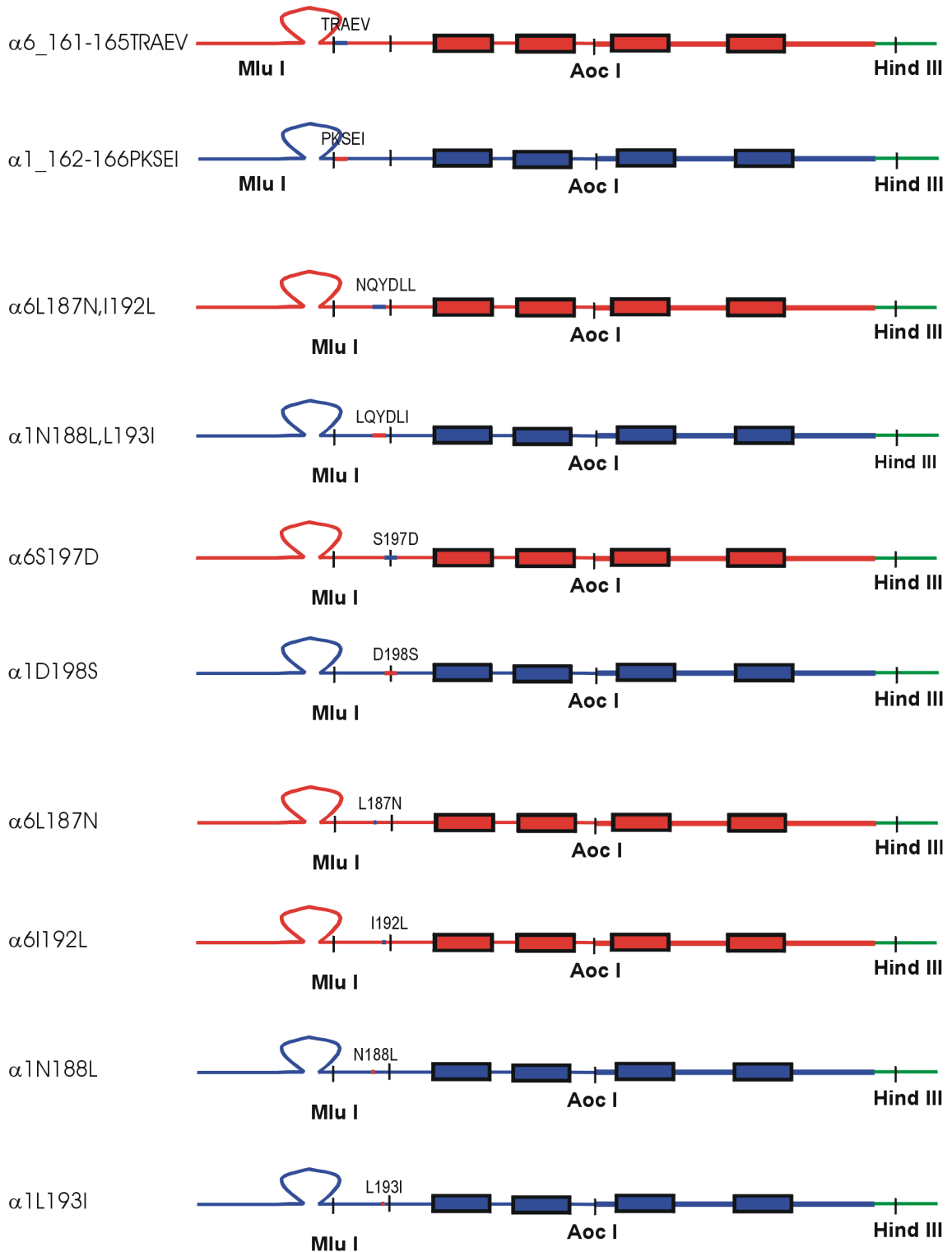
7. Anhang

7.1. Schema aller Chimären

Schema aller Chimären



Schema aller Chimären



Schema aller Chimären

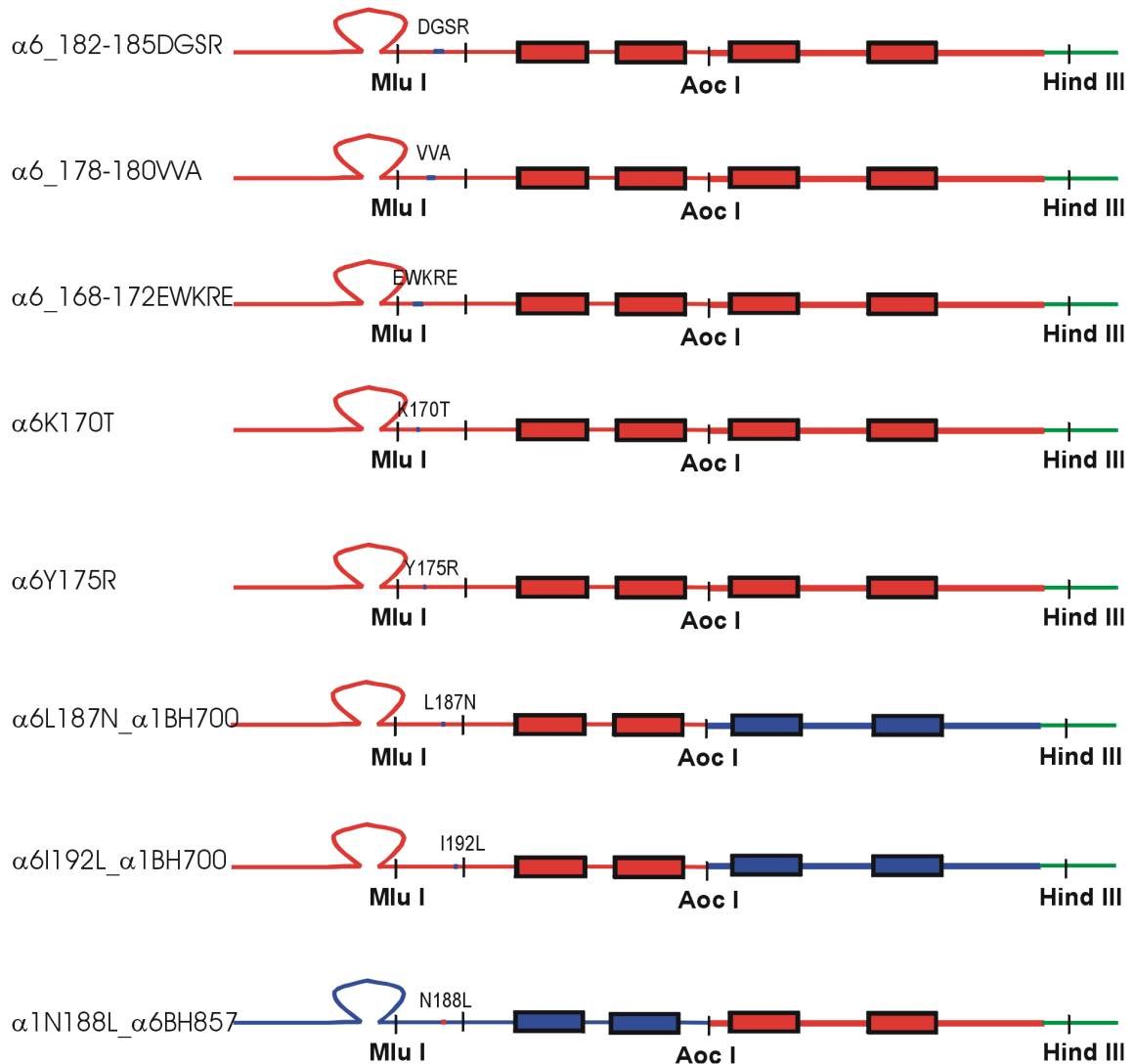


Abb. 17: Schematische Darstellung aller in dieser Arbeit erwähnten α -Chimären ausgehend von den $\alpha 1$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors der Ratte. $\alpha 1$ -Sequenzen sind blau, $\alpha 6$ -Sequenzen rot und Vektoranteile grün dargestellt. Die Kästchen symbolisieren die Transmembranregionen 1-4, die Haarnadelstruktur lokalisiert den Cyctein-Loop. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Mlu I, Aoc I (Bsu 36I) und Hind III sind markiert.

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Karte von pRK5
Abb. 2:	Apparatur zum Absaugen der Inkubationsflüssigkeiten bei den Bindungsassays
Abb. 3:	der Aminosäurevergleich der GABA _A -Rezeptor-Wildtypuntereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ der Ratte
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Konstruktion der Chimären $\alpha 1$ -61MA, $\alpha 1$ -16MA, $\alpha 6$ -61MA und $\alpha 6$ -16
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Herstellung der Chimären $\alpha 1\alpha 6$ BH857 und $\alpha 6\alpha 1$ BH700
Abb. 6:	Autoradiographie der [³⁵ S]TBPS-Bindung unter verschiedenen Bedingungen
Abb. 7:	[³⁵ S]TBPS-Bindungsstudien mit 4-PIOL mit rekombinanten GABA _A -Rezeptoren $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 2\gamma 2$
Abb. 8:	Effekte von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in rekombinanten Wildtyp-GABA _A -Rezeptoren
Abb. 9:	Effekte von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in den rekombinanten GABA _A -Rezeptoren $\alpha 1$ -6BH857 $\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 1$ -6BH700 $\beta 1\gamma 2$
Abb. 10:	Effekte von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in den rekombinanten GABA _A -Rezeptoren $\alpha 1$ -6MA $\beta 1\gamma 2$, $\alpha 1$ -6MA $\beta 3\gamma 2$, $\alpha 6$ -1MA $\beta 1\gamma 2$ und $\alpha 6$ -1MA $\beta 3\gamma 2$
Abb. 11:	Effekt von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA _A -Rezeptoren mit 102 bp bzw. 258 bp langen Sequenzaustauschen in den α -Untereinheiten
Abb. 12:	Effekte von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA _A -Rezeptoren mit den punktmultierten α -Untereinheiten $\alpha 1$ N188L,L193I, $\alpha 1$ D198S, $\alpha 1$ _162-166PKSEI, $\alpha 6$ L187N,I192L, $\alpha 6$ S197D und $\alpha 1$ _162-166PKSEI
Abb. 13:	Effekte von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA _A -Rezeptoren mit den punktmultierten α -Untereinheiten $\alpha 1$ L193I, $\alpha 6$ I192L, $\alpha 6$ L187N und $\alpha 1$ N188L
Abb. 14:	Effekte von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA _A -Rezeptoren mit den punktmultierten α -Untereinheiten $\alpha 6$ K170T, $\alpha 6$ Y175R, $\alpha 6$ _178-180VVA, $\alpha 6$ _182-185DGSR und $\alpha 6$ _168-172EWKRE
Abb. 15:	Effekte von GABA auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA _A -Rezeptoren mit den punktmultierten α -Untereinheiten $\alpha 1$ N188L_ $\alpha 6$ BH858, $\alpha 6$ L187N_ $\alpha 1$ BH700 und $\alpha 6$ I192L_ $\alpha 1$ BH700
Abb. 16:	Effekte von Furosemid auf die [³⁵ S]TBPS-Bindung in rekombinanten GABA _A -Rezeptoren mit den chimären α -Untereinheiten $\alpha 6$ -1MA, $\alpha 6$ -16MA und $\alpha 6$ -61MA
Abb. 17:	Schema aller Chimären

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Plasmidkonzentrationen der verschiedenen GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten
Tab. 2	Primersequenzen zur Herstellung von Chimären
Tab. 3	Primersequenzen zur Herstellung von Mehrfach- und Einfachpunktmutanten
Tab. 4	Gehirnareal-spezifische Effekte verschiedener GABA _A -Antagonisten auf picrotoxininsensitive [³⁵ S]TBPS-Bindung in Rattenhirnschnitten
Tab. 5	Effekte von P4S und 4-PIOL auf die regionale Bindung von [³⁵ S]TBPS an GABA _A -Rezeptoren
Tab. 6	K _D -Werte rekombinanter Wildtyp-GABA _A -Rezeptoren für [³ H]Muscimol
Tab. 7	K _D -Werte von GABA _A -Rezeptoren mit chimären α-Untereinheiten im Vergleich zu ihren Wildtyprezeptoren
Tab. 8	Charakteristika aller Chimären und Wildtyp-GABA _A -Rezeptoren
Tab. 9	K _D -Werte der Chimäre α1-16MA im Vergleich zum Wildtyp
Tab. 10	K _D -Werte für [³ H]Muscimol von Rezeptoren mit Ein- und Mehrfachpunktmutanten in der α-Untereinheit im Vergleich zu Wildtyprezeptoren
Tab. 11	K _D -Werte für [³ H]Muscimol von Rezeptoren mit Einfachpunktmutanten in der α-Untereinheit im Vergleich zu Wildtyprezeptoren
Tab. 12	K _D -Werte für [³ H]Muscimol von Rezeptoren mit der 178-180VVA-Mutante in der α6-Untereinheit im Vergleich zu entsprechenden Wildtyprezeptoren
Tab. 13	K _D -Werte für [³ H]Muscimol von Rezeptoren mit Punktmutanten plus ausgetauschtem Bsu/Hind-Fragment in den α1- und α6-Untereinheiten im Vergleich zu Wildtyprezeptoren und Rezeptoren, die lediglich die entsprechende Punktmutation tragen.
Tab. 14	Signifikanz-Werte (p-Werte) der Unterschiede in der TBPS-Bindung von Wildtyp-GABA _A -Rezeptoren zu α1N188L-enthaltenden Rezeptoren
Tab. 15	Signifikanz-Werte (P-Werte) der Unterschiede in der [³⁵ S]TBPS-Bindung von Wildtyp-GABA _A -Rezeptoren α1β1γ2 und α6β1γ2 zu ihren entsprechenden Chimären und Punktmutanten

7.4. Veröffentlichungen

- Jackel, C., R. Kleinz, R. Mäkelä, W. Hevers, S. Jezequel, E. R. Korpi and H. Lüddens (1998). "The main determinant of furosemide inhibition on GABA_A receptors is located close to the first transmembrane domain." *European Journal of Pharmacology* **357**(2-3): 251-256.
- Korpi, E. R., P. Koikkalainen, O. Y. Vekovischeva, R. Mäkelä, R. Kleinz, M. Uusi Oukari and W. Wisden (1999). "Cerebellar granule-cell-specific GABA_A receptors attenuate benzodiazepine-induced ataxia: evidence from $\alpha 6$ -subunit-deficient mice." *Eur Journal of Neuroscience* **11**(1): 233-40.
- Rabe, H., R. Picard, M. Uusi-Oukari, W. Hevers, H. Lüddens and E. R. Korpi (2001). "Coupling between agonists and chloride ionophore sites of the GABA_A receptor: agonist/antagonist efficacy of 4-PIOL." *European Journal of Pharmacology* **409**: 233-242.
- Uusi-Oukari, M., R. Kleinz, R. Mäkelä, H. Lüddens and E. R. Korpi (2000). "Quantification of GABA_A receptor subunit mRNAs by non-radioisotopic competitive RT-PCR utilizing plate-based EIA methodology." *J Neurosci Methods* **95**(1): 65-73.

Abstracts Tagungen:

- R. Kleinz, R. Mäkelä, K. Dämgen, A. Szegedi, E.R. Korpi and H. Lüddens (1999). "Determinants on the α subunits of GABA_A receptors outside the GABA binding pocket are involved in GABA sensitivity." 27th. Göttinger Neurobiol. Conf., Göttingen, Germany.
- W. Hamkens, M. Piel, R. Schirmacher, U. Schmitt, R. Kleinz, H. Lüddens, G. Gründer, F. Rösch (1999). "Improved Synthesis of 5-(2'-[¹⁸F]fluoroethyl)flumazenil for in vivo Imaging of Benzodiazepine Receptors" XIIIth Int. Symp. Radiopharm.Chem., St.Louis, USA.
- G. Gründer, W. Hamkens, M. Piel, R. Schirmacher, R. Kleinz, U. Schmitt, P. Benz, H. Lüddens, F. Rösch (1999). "Positron emission tomography of benzodiazepine receptors in the human Brain with [¹⁸F]Fluoroethylflumazenil" XI World Congress of Psychiatry, Hamburg, Germany.
- Kleinz, R., Mäkelä, R., Dämgen, K., Szegedi, A., Korpi, E.R., Lüddens, H. (1999) "Determinants on the α subunits of GABA_A receptors outside the GABA binding pocket are involved in GABA sensitivity." Joint Meeting ESN of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the European Society for Neurochemistry (ESN), Berlin, Germany.
- G. Gründer, W. Hamkens, M. Piel, R. Schirmacher, U. Schmitt, R. Kleinz, P. Benz, H. Lüddens, F. Rösch (1999). "Positron Emission Tomography of Benzodiazepine Receptors in the Human Brain with [¹⁸F]fluoroethylflumazenil"; 12th ECNP Congress, London, UK.
- C. Lange-Asschenfeldt, G. Gründer, M. Piel, W. Hamkens, I. Vernaleken, H.-G. Buchholz, P. Benz, H. Lüddens, Ch. Hiemke, R. Kleinz, U. Schmitt, P. Stoeter, P. Bartenstein, F. Rösch (1999). "PET-Imaging von Benzodiazepinrezeptoren im menschlichen Gehirn mit [¹⁸F]Fluorethylflumazenil" 4. Mainzer PET-Symposium, Mainz, Germany.
- Lange-Asschenfeldt Ch, Hamkens W, Piel M, Schirmacher R, Schmitt U, Kleinz R, Benz P, Lüddens H, Rösch F, Gründer G (1999) "Imaging Benzodiazepine Receptors in the Human Brain with [¹⁸F]Fluorethylflumazenil" 21. AGNP-Symposium, Nürnberg, Germany.
- Lüddens H, Szegedi A, Kleinz R, Hevers W (1999) "GABA_A Receptor Ligands: Are Receptor Subtype Selective Compounds Therapeutically Advantageous?" 21. AGNP-Symposium, Nürnberg, Germany.