

**Charakterisierung δ -enthaltender GABA_A-
Rezeptoren: Abfolge einzelner Untereinheiten im
Pentamer und Untersuchung spezifischer Liganden**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Kirsten Yakoub

geb. am 16.08.1987 in Kassel

Mainz, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2013 bis Dezember 2017 unter der Betreuung von [REDACTED] im Molekularbiologischen Labor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Mainz angefertigt (D77).

Dekan: [REDACTED]

Erster Berichterstatter: [REDACTED]

Zweiter Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

Eine modifizierte Form der Kapitel 4.3.1 - 4.3.10 ist in englischer Sprache in der Fachzeitschrift „Journal of Medicinal Chemistry“ veröffentlicht:

Structure-function evaluation of imidazopyridine derivatives selective for δ subunit containing γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors.

Yakoub, K.; Jung, S.; Sattler, C.; Damerow, H.; Weber, J.; Kretzschmann, A.; Cankaya, A. S.; Piel, M.; Rosch, F.; Haugaard, A. S.; Frolund, B.; Schirmeister, T.; Luddens, H., Structure-Function Evaluation of Imidazopyridine Derivatives Selective for delta-Subunit-Containing gamma-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. *J Med Chem* **2018**, *61* (5), 1951-1968.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Synaptische Übertragung	1
1.2 Ligandengesteuerte Ionenkanäle/Cys-loop Superfamilie.....	1
1.3 GABA Rezeptoren	3
1.4 Pharmakologie der GABA _A Rezeptoren	5
1.4.1 GABA-Bindestelle.....	5
1.4.1.1 Muscimol.....	6
1.4.2 Benzodiazepine.....	7
1.4.3 Z-Substanzen	7
1.4.4 Kanal-Blocker.....	8
1.4.4.1 Picrotoxinin-Bindestelle	9
1.4.4.2 TBPS-Bindestelle	9
1.4.4.3 EBOB-Bindestelle	10
1.4.4.4 Allosterische Interaktion von Liganden mit TBPS/EBOB	10
1.4.5 Weitere Liganden.....	11
1.4.5.1 Furosemid.....	11
1.4.5.2 Anästhetika	11
1.4.5.3 Neurosteroid	12
1.4.6 Spezifische Liganden an δ -enthaltenden GABA _A R.....	12
1.4.6.1 Tetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC)	13
1.4.6.2 Pyrazolpyridine	13
1.4.6.3 Dihydropyrimidone	13
1.4.6.4 Ketamin	14
1.4.6.5 4,5,6,7-Tetrahydroisothiazol-[5,4-c]pyridin-3-ol (THIP, Gaboxadol)	14
1.4.6.6 Delta Selective Compounds 1 und 2 (DS1, DS2).....	14
1.5 Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten mittels Dichtegradient-zentrifugation	15
1.5.1 Sucrosegradientzentrifugation von konkatameren nAChR	17
1.5.2 Sucrosegradientzentrifugation von GABA _A R	17
1.6 Konkatamer-Strategie	18
1.6.1 Konkatamere δ -enthaltender GABA _A R.....	19
2 Ziele.....	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.2 Proteinbiochemie	35
3.2.1 Proteinbestimmung	35
3.2.2 Solubilisierung membranständiger Proteine mittels LDS für SDS-PAGE.....	35
3.2.3 SDS-Gelelektrophorese	36
3.2.4 Western Blot.....	36

3.2.5 Anfärben von Gelen und Blots	37
3.2.6 Solubilisierung membranständiger Proteine für Bindungsassays oder Sucrosegradienten .	37
3.2.7 Bindungsstudien	38
3.2.8 Sucrosegradientenzentrifugation	39
3.2.8.1 Linearität des Gradienten	40
3.2.8.2 Detektion Fluorescein- und Rhodamin-gekoppelter Standards.....	40
3.2.8.3 Detektion von Hämoglobin	40
3.2.8.4 Detektion von Catalase.....	41
3.2.8.5 Detektion von alkalischer Phosphatase	41
3.2.8.6 Detektion von Aldolase	42
3.2.9 Aufarbeitung Cerebellum	43
3.3 Molekularbiologie.....	43
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.3.2 Konstruktion der Chimären zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 6$	43
3.3.3 Konstruktion weiterer $\alpha 1/\alpha 6$ Chimären durch Umklonierung.....	45
3.3.4 Konstruktion der Chimären zwischen $\gamma 2$ und δ	45
3.3.5 Konstruktion der Mehrfach-Punktmutanten	45
3.3.6 Konstruktion der Linker an der δ Untereinheit.....	48
3.3.7 Umklonierung.....	48
3.3.8 Agarose-Gelelektrophorese	48
3.3.9 Gewinnung von DNA aus Gelstücken und PCR-Ansätzen	48
3.3.10 Konzentrationsbestimmung der DNA	49
3.3.11 Mini-Präparationen.....	49
3.3.11.1 Mini-Präparationen mittels Kit.....	49
3.3.11.2 Mini-Präparationen mit selbst hergestellten Lösungen	50
3.3.12 Midi- und Maxi-Präparationen	50
3.3.12.1 Midi- und Maxipräparationen mittels Kit.....	50
3.3.12.2 Midi- und Maxipräparationen mittels Cäsiumchlorid-Gradient.....	51
3.3.13 Ligation.....	52
3.3.14 Restriktionsverdau	52
3.3.15 Dephosphoylierung.....	52
3.3.16 Phosphorylierung.....	53
3.3.17 Sequenzierung.....	53
3.3.18 Partieller Restriktionsverdau.....	53
2.4 Mikrobiologie.....	53
2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	53
2.4.2 Bestimmung der Zellkompetenz.....	54
2.4.3 Transformation von kompetenten Zellen.....	54
2.5 Zellkultur.....	54
2.5.1 Auftauen von HEK 293 Zellen	54

2.5.2 Kultur von HEK 293 Zellen	55
2.5.3 Transfektion.....	55
2.5.4 Ernten von Zellen und crude Membranpräparation.....	55
2.6 Präparative Chemie	56
2.7 Datenanalyse und Statistik	56
4 Ergebnisse	57
4.1 Charakterisierung von konkatameren Rezeptoren	57
4.1.1 Untersuchung $\alpha 6$ -enthaltender 2er und 3er Konkamate	57
4.1.1.1 Untersuchung des dualen Konstrukts $(\beta 3\alpha 6) \pm \delta$	58
4.1.1.2 Untersuchungen des dualen Konstrukts $(\beta 3\alpha 6)$ in Kombination mit $(\beta 3\alpha 6\delta)$	60
4.1.1.3 Untersuchungen des dualen Konstrukts $(\alpha 6\beta 3)$ in Kombination mit $(\alpha 6\delta\beta 3)$	61
4.1.1.4 Untersuchungen des 3er Konkamers $(\beta 3\alpha 6\beta 3)$ in Kombination mit $(\alpha 6\delta)$	62
4.1.2 Untersuchung $\alpha 1$ -enthaltender 2er und 3er Konkamate	63
4.1.2.1 Untersuchung des dualen Konstrukts $(\beta 3\alpha 1) \pm \delta$	65
4.1.2.2 Untersuchung des dualen Konstrukts $(\beta 3\alpha 1)$ in Kombination mit $(\beta 3\alpha 1\delta)$	66
4.1.2.3 Untersuchung des dualen Konstrukts $(\alpha 1\beta 3)$ in Kombination mit $(\alpha 1\delta\beta 3)$	67
4.1.2.4 Untersuchung des 3er Konkamers $(\beta 3\alpha 1\beta 3)$ in Kombination mit $(\alpha 1\delta)$	68
4.1.3 Untersuchung auf Degradation der Linkersequenzen.....	69
4.1.3.1 [^3H]RO15-4513-Bindung an $(\beta 3\alpha x\beta 3)$ -enthaltenden Konkateren.....	70
4.1.3.2 [^3H]EBOB-Bindung und Modulation durch GABA an $(\beta 3\alpha 6)$ Artefakten und $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren.....	71
4.1.4 Auswirkung der transfizierten DNA-Menge auf die Bildung von Artefakten.....	72
4.1.5 Artefakt-Bildung bei $\beta 1/2$ -enthaltenden Konkateren.....	74
4.1.6 Orientierung der Konkamate bei Assemblierung	76
4.1.6.1 [^3H]RO15-4513-Bindung an $(\alpha 6\beta 2/3)\gamma 2$ Rezeptoren.....	76
4.1.6.2 [^3H]EBOB-Bindung und Modulation durch GABA an $(\alpha 6\beta 3)\delta$, $(\beta 3\alpha 6)\delta$ und $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren.....	77
4.1.6.3 [^3H]RO15-4513-Bindung an $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ - und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)$ -enthaltenden Rezeptoren.....	78
4.1.7 Einbau angebotener Untereinheiten.....	79
4.1.7.1 [^3H]EBOB-Bindung und Modulation durch GABA an $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$, $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren.....	79
4.1.8 Untersuchung $\alpha 6$ - und $\alpha 1$ -enthaltender 4er und 5er Konkamate.....	81
4.1.8.1 Untersuchung des $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ Konkamers	82
4.1.8.2 Untersuchung des $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkamers	83
4.1.8.3 Untersuchung der $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)$ Konkamate	85
4.1.8.4. Untersuchung des $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ Konkamers	86
4.1.8.5 Untersuchung des $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ Konkamers	88
4.1.8.6 Untersuchung der $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkamate	90
4.1.8.7 Untersuchung des $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkamers	92
4.1.8.8 Untersuchung des $(\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2)$ Konkamers.....	94
4.1.8.9 Untersuchung der 5er Konkamate $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$	95

4.1.9 Unspezifische Antikörperbindung	96
4.2 Sucrosegradientenzentrifugation.....	98
4.2.1 Interne Standards	98
4.2.2 Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien.....	100
4.2.3 Stabilität der solubilisierten Rezeptoren und Einfluss von Sarkosyl auf die [³ H]Muscimol Bindung	102
4.2.4 Sucrosegradientenzentrifugationen verschiedenener GABA _A R.....	104
4.2.4.1 Sucrosegradientenzentrifugation mit $\alpha 6\beta 3\gamma 2$	104
4.2.4.2 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\beta 3\alpha 6$) Rezeptor-Artefakten	105
4.2.4.3 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\alpha 6\beta 3$) Rezeptor-Artefakten	108
4.2.4.4 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ Rezeptoren	108
4.2.4.5 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ Rezeptoren	109
4.2.4.6 Vergleich der einzelnen Zentrifugationen	110
4.3 Untersuchung der Liganden DS1/DS2 und ihrer Derivate.....	112
4.3.1 Derivate von DS1 und DS2	112
4.3.2 Bindung der Substanzen an rekombinante δ -enthaltende GABA _A R	112
4.3.3 Bindung von DS1 und DS2 an rekombinante $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren.....	114
4.3.4 Bindung der Derivate an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren.....	114
4.3.5 Structure-Activity-Relationship.....	115
4.3.6 Bindung der Leitstruktur DS1 an weitere rekombinante GABA _A R	117
4.3.7 Bindung der aktiven Derivate an weitere rekombinante GABA _A R.....	118
4.3.8 Effekt der Brom-Substituenten auf Potenz und Effizienz.....	120
4.3.9 Effekt von GABA auf die δ -Selektivität der Derivate DS1, 29 und 39.....	121
4.3.10 Selektivität der Substanzen für α Untereinheiten	122
4.3.11 Modulation der [³ H]EBOB-Bindung im Cerebellum von wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Mäusen	122
4.3.12 Untersuchung der Bindestelle.....	125
4.3.12.1 Verdrängung der Derivate 29 und 39 durch DS1 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA _A R.....	125
4.3.12.2 Irreversible Bindung von Derivat 39 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA _A R	127
4.3.12.3 [³ H]EBOB-Bindungsstudie mit DS1 und 10 μ M 39 an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA _A R.....	129
4.3.12.4 Einsatz von Chimären zur Untersuchung der Bindestelle von DS1	129
4.3.12.5 Untersuchung der [³ H]EBOB Bindungsmodulation durch DS1 und 39 an verschiedenen $\alpha 1/\alpha 6$ Punktmutanten.....	136
4.3.12.6 Untersuchung der [³ H]EBOB-Bindungsmodulation durch Derivat 39 an verschiedenen $\gamma 2/\delta$ Chimären	139
5 Diskussion	140
5.1 Untersuchung des Aufbaus δ -enthaltender GABA _A R mithilfe von Konkameren.....	140
5.1.1 Konkamere aus zwei und drei verlinkten Untereinheiten zur Bildung eines Pentamers	140
5.1.2 Orientierung der Konkamere	143
5.1.3 Konkamere aus vier und fünf verlinkten Untereinheiten zur Bildung eines Pentamers .	146
5.1.4 Einbau von angebotenen Untereinheiten	147

5.1.5 Sucrosegradientzentrifugation zur Unterscheidung von Artefakten und Pentameren	147
5.2 DS-Derivate	150
5.2.1 Structure-Activity Relationship	150
5.2.2 Die Leitstrukturen DS1 und DS2.....	150
5.2.3 Effekt von GABA auf die [³ H]EBOB-Modulation der Liganden DS1, 29 und 39.....	151
5.2.4 Bindestelle und Bindeeigenschaften der Liganden.....	152
5.2.5 [³ H]EBOB-Modulation an nativen GABA _A R.....	155
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	157
6.1 Konkatomere	157
6.2 DS-Derivate	158
7 Literaturverzeichnis.....	160
7.1 Internetquellen	169
8 Anhang	170
8.1 Schnittstellen in der Proteinsequenz von Chimären.....	170
8.2 Schnittstellen in der Proteinsequenz von Punktmutanten	171
8.5 Strukturen.....	172
8.6 Abkürzungsverzeichnis	178
8.7 Lebenslauf.....	179
8.8 Publikationen	180
8.9 Danksagung.....	181
8.10 Eidesstattliche Versicherung.....	182

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wichtige ligandengesteuerte Ionenkanäle.....	2
Tab. 2: Chemikalien	23
Tab. 3: Lösungen.....	25
Tab. 4: Geräte.....	26
Tab. 5: Rotoren.....	28
Tab. 6: Verbrauchsmittel.....	28
Tab. 7: Verwendete primäre Antikörper	29
Tab. 8: Verwendete sekundäre Antikörper.....	29
Tab. 9: Verwendete Kits.....	29
Tab. 10: Substanzen für Bindungsstudien	30
Tab. 11: Radioaktive Liganden für Bindungsstudien.....	30
Tab. 12: Verwendete Polymerase.....	30
Tab. 13: Primer.....	30
Tab. 14: Erstellte Konkamere	31
Tab. 15: Erstellte Chimären.....	32
Tab. 16: Durch Umklonierung erstellte Chimären	33
Tab. 17: Erstellte Mehrfach-Punktmutanten	33
Tab. 18: Verwendete Vektoren aus dem Laborbestand.....	33
Tab. 19: Verwendete Konkamere aus dem Laborbestand	34
Tab. 20: Software	34
Tab. 21: Komponenten bei der Herstellung von SDS-Gelen	36
Tab. 22: Komponenten einer PCR.....	43
Tab. 23: Transfektionsansatz.....	55
Tab. 24: Bindung verschiedener Radioliganden an $\alpha 6$ -enthaltende konkamere Rezeptoren	57
Tab. 25: Bindung verschiedener Radioliganden an $\alpha 1$ -enthaltende konkamere Rezeptoren	63
Tab. 26: Bindung verschiedener Radioliganden an 4er Konkamere	81
Tab. 27: Bindung verschiedener Radioliganden an 5er Konkamere	95
Tab. 28: Verteilung der internen Standards in einem 5-20%igen Sucrosegradienten nach 48 h Zentrifugation.....	99
Tab. 29: Ermittelte Sedimentationskoeffizienten verschiedener Rezeptoren.....	111
Tab. 30: [^3H]EBOB Modulation der aktiven Derivate an verschiedenen rekombinanten GABA _A R..	114
Tab. 31: [^3H]EBOB-Modulation der Verbindungen DS1, 29 und 39 in Anwesenheit von GABA ...	121
Tab. 32: Statistischer Vergleich der [^3H]EBOB-Modulation durch DS1 und [^3H]EBOB-Modulation durch DS1 nach Präinkubation mit 10 μM 39 und nachfolgenden Waschschritten an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren.....	128
Tab. 33: Molekülstrukturen aller getesteten Substanzen.....	172

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau einer GABA _A R Untereinheit.....	3
Abb. 2: Strukturformeln von γ -Aminobuttersäure (GABA) und Muscimol.	6
Abb. 3: Strukturformeln der Kanalblocker EBOB, TBPS, Picrotoxinin und Dieldrin.....	9
Abb. 4: Linearität der Gradienten.....	40
Abb. 5: Peroxidase-Aktivität von Hämoglobin.....	41
Abb. 6: Aldolase-Aktivität.....	42
Abb. 7: Schematische Darstellung der Konstruktion von Chimären.....	47
Abb. 8: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha 6$) δ Rezeptoren.....	58
Abb. 9: Western Blots von ($\beta 3\alpha 6$) Konkameren.....	59
Abb. 10: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha 6$)($\beta 3\alpha 6\delta$) Rezeptoren.....	60
Abb. 11: Western Blots von ($\beta 3\alpha 6$) und ($\beta 3\alpha 6\delta$) Konkameren.....	61
Abb. 12: Schematischer Aufbau von ($\alpha 6\beta 3$)($\alpha 6\delta\beta 3$) Rezeptoren.....	61
Abb. 13: Western Blots von ($\alpha 6\beta 3$) und ($\alpha 6\delta\beta 3$) Konkameren.....	62
Abb. 14: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha 6\beta 3$)($\alpha 6\delta$) Rezeptoren.....	62

Abb. 15: Western Blots von $(\beta 3\alpha 6\beta 3)$ und $(\alpha 6\delta)$ Konkatameren.	63
Abb. 16: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 1)\delta$ Rezeptoren.	65
Abb. 17: Western Blots von $(\beta 3\alpha 1)$ Konkatameren.	65
Abb. 18: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 1)(\beta 3\alpha 1\delta)$ Rezeptoren.	66
Abb. 19: Western Blots von $(\beta 3\alpha 1)$ und $(\beta 3\alpha 1\delta)$ Konkatameren.	66
Abb. 20: Schematischer Aufbau von $(\alpha 1\beta 3)(\alpha 1\delta\beta 3)$ Rezeptoren.	67
Abb. 21: Western Blots von $(\alpha 1\beta 3)$ und $(\alpha 1\delta\beta 3)$ Konkatameren.	68
Abb. 22: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 1\beta 3)(\alpha 1\delta)$ Rezeptoren.	68
Abb. 23: Western Blots von $(\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkatameren.	69
Abb. 24: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha x\beta 3)\alpha x\gamma 2$	69
Abb. 25: Überprüfung der Degradation von Linkern in der $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung.	71
Abb. 26: Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA auf die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung an $\alpha 6\beta 3$ und $(\beta 3\alpha 6)$ Rezeptoren.	72
Abb. 27: Verringerung der transfizierten DNA-Menge bei Konkatameren.	73
Abb. 28: Kontrolle der Artefakt-Bildung von $\beta 1$ - und $\beta 2$ -enthaltenden Konkatameren.	75
Abb. 29: Dosis-Wirkungs-Kurven von $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ an verschiedenen Rezeptoren.	77
Abb. 30: Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA auf die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$, $(\beta 3\alpha 6)\delta$ und $(\alpha 6\beta 3)\delta$ Rezeptoren.	78
Abb. 31: Orientierung von $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)$ Konkatameren.	79
Abb. 32: Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA auf die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$, $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ Rezeptoren.	80
Abb. 33: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\beta 3$ Rezeptoren.	82
Abb. 34: Western Blots von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ Konkatameren.	83
Abb. 35: Schematischer Aufbau von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ Artefakten und $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)\beta 3$ Rezeptoren.	83
Abb. 36: Western Blots von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkatameren.	84
Abb. 37: Schematischer Aufbau von $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)\beta 3$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)\beta 3$ Rezeptoren.	85
Abb. 38: Western Blot von $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)$ Konkatameren.	86
Abb. 39: Schematischer Aufbau von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)\beta 3$ Rezeptoren.	86
Abb. 40: Bindung verschiedener $[^3\text{H}]\text{Liganden}$ an $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ -enthaltenden Rezeptoren und Artefakte.	87
Abb. 41: Western Blot von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ Konkatameren.	88
Abb. 42: Schematischer Aufbau von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)\beta 3$ Rezeptoren.	88
Abb. 43: Bindung verschiedener $[^3\text{H}]\text{Liganden}$ an $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ -enthaltende Rezeptoren und Artefakte.	89
Abb. 44: Western Blot von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ Konkatameren.	89
Abb. 45: Schematischer Aufbau von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\alpha 6$ und $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3$ Artefakten sowie $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 6$ Rezeptoren.	90
Abb. 46: Bindung verschiedener $[^3\text{H}]\text{Liganden}$ an $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ -enthaltende Rezeptoren und Artefakte.	91
Abb. 47: Western Blot von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkatameren.	92
Abb. 48: Schematischer Aufbau von $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6$ Rezeptoren.	92
Abb. 49: Bindung verschiedener $[^3\text{H}]\text{Liganden}$ an $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)$ -enthaltende Rezeptoren und Artefakte.	93
Abb. 50: Western Blot von $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkatameren.	93
Abb. 51: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2)\alpha 6$ Artefakten.	94
Abb. 52: Western Blot von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2)$ Konkatameren.	95
Abb. 53: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ Rezeptoren.	95
Abb. 54: Western Blot von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ Konkatameren.	96
Abb. 55: Unspezifische Bindung des $\beta 3$ -Antikörpers.	97
Abb. 56: Verteilung der internen Standards im 5-20%igen Sucrosegradienten nach 48 h Zentrifugation.	99
Abb. 57: Solubilisierungseffizienz verschiedener Detergenzien an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA _A R.	100
Abb. 58: Solubilisierungseffizienz verschiedener Detergenzien an konkatameren Rezeptoren.	101
Abb. 59: Solubilisierungseffizienz von Sarkosyl an $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren.	102
Abb. 60: Einfluss von Sarkosyl auf die $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung.	103
Abb. 61: Einfluss von Zeit und Konzentration auf die Degradation von solubilisierten Rezeptoren.	104

Abb. 62: Sucrosegradientzentrifugation von solubilisierten $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren.	105
Abb. 63: Sucrosegradientzentrifugation von solubilisierten ($\beta 3\alpha 6$) Rezeptor-Artefakten.	107
Abb. 64: Sucrosegradientzentrifugation von solubilisierten ($\alpha 6\beta 3$) Rezeptor-Artefakten.	108
Abb. 65: Sucrosegradientzentrifugation von solubilisierten ($\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ Rezeptoren.	109
Abb. 66: Sucrosegradientzentrifugation von solubilisierten ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ Rezeptoren.	110
Abb. 67: Struktur der Verbindung DS1.	112
Abb. 68: Dosis-Wirkungs-Kurven von DS1 an verschiedenen Rezeptoren.	113
Abb. 69: Dosis-Wirkungs-Kurven der Derivate 29 und 39 an verschiedenen Rezeptoren.	120
Abb. 70: Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindungen DS1, 29 und 39 an wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Cerebella.	123
Abb. 71: Dosis-Wirkungs-Kurven von DS1 in An- und Abwesenheit von 10 μM 29 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA _A R.	126
Abb. 72: [³ H]EBOB-Modulation von DS1 und Verdrängung von gebundenem Derivat 39 an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren.	127
Abb. 73: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 alleine und in Kombination mit Derivat 39 an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren.	129
Abb. 74: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 an chimären Rezeptoren.	131
Abb. 75 Schemata aller verwendeten Chimären.	133
Abb. 76 Schemata aller verwendeten Punktmutanten.	136
Abb. 77: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 an punktmutierten $\alpha 1/\alpha 6$ Rezeptoren.	137
Abb. 78: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 an punktmutierten Rezeptoren.	138
Abb. 79: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Verbindung 39 an punktmutierten $\alpha 1/\alpha 6$ Rezeptoren.	138
Abb. 80: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verbindung 39 an chimären $\gamma 2/\delta$ Rezeptoren.	139
Abb. 81: Mögliche Zusammensetzung von Artefakten aus ($\beta 3\alpha 6$) Konkameren.	142
Abb. 82: Mögliche Orientierung eines ($\beta 3\alpha 6$) Konkamers.	144
Abb. 83: Mögliche Zusammensetzung von Artefakten aus ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) Konkameren.	146
Abb. 84: Darstellung der Aminosäuresequenz der GABA _A R $\alpha 1/\alpha 6$ Chimären.	170
Abb. 85: Darstellung der Aminosäuresequenz der GABA _A R $\gamma 2/\delta$ Chimären.	170
Abb. 86: Darstellung der Aminosäuresequenz der GABA _A R $\alpha 1/\alpha 6$ Mehrfach-Punktmutanten.	171

1 Einleitung

1.1 Synaptische Übertragung

Entlang der Axone von Nervenzellen werden Informationen in Form von elektrischen Aktionspotentialen weitergeleitet. An den Kontaktpunkten zwischen Nervenzellen, den Synapsen, muss das Signal jedoch in anderer Form weitergegeben werden. Je nach Synapsentyp unterscheidet man zwischen chemischen und elektrischen Synapsen. Auf elektrische Synapsen wird hier nicht weiter eingegangen, da sie für diese Arbeit keine Rolle spielen.²

An chemischen Synapsen wird das Signal in Form von Transmittern von der prä- zur postsynaptischen Membran weitergeleitet. Transmitter sind niedermolekulare Botenstoffe, die in der Präsynapse in Vesikeln gespeichert vorliegen und an der postsynaptischen Membran eine Aktion durch Aktivierung spezifischer Rezeptoren auslösen. Bei Einlaufen eines Aktionspotentials in das Synapsenendknöpfchen werden Calcium-Ionen freigesetzt, die wiederum das Verschmelzen von mit Transmittern gefüllten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran einleiten. Die in den synaptischen Spalt freigesetzten Transmitter durchwandern diesen mittels Diffusion und belegen an der postsynaptischen Membran spezifische Bindestellen an Rezeptoren. Wenn es sich dabei um eine erregende Postsynapse handelt, werden folgend Natrium-Kanäle in der Nervenzelle geöffnet und durch einströmende Natrium-Ionen wird das Membranpotential erhöht. Diesen Vorgang bezeichnet man als EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potential). Mehrere sich aufbauende EPSP können die Membran soweit depolarisieren, dass ein neues Aktionspotential entsteht und entlang der Axone weitergeleitet wird. Handelt es sich bei der Postsynapse jedoch um eine inhibitorische, dann werden folgend zur Rezeptoraktivierung Chlorid- und Kalium-Kanäle geöffnet und die Membran wird hyperpolarisiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als IPSP (inhibitorisches postsynaptisches Potential) und die Depolarisation der Nervenzellmembran und das Fortleiten eines neuen Aktionspotentials an der Nervenzelle wird verhindert.¹⁻²

Die wichtigsten synaptischen Transmitter sind die beiden inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin, der erregende Neurotransmitter Glutamat, die sowohl inhibitorisch, als auch erregend wirkenden Transmitter Adrenalin, Noradrenalin, Acetylcholin, Serotonin, Histamin und Dopamin. Transmitter werden im synaptischen Spalt entweder abgebaut oder aktiv entfernt durch Transporter.¹

1.2 Ligandengesteuerte Ionenkanäle/Cys-loop Superfamilie

Rezeptoren an der postsynaptischen Membran unterteilen sich in ligandengesteuerte, ionotrope Rezeptoren und metabotrope, G-Protein gekoppelte Rezeptoren. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind heptahelikale Rezeptoren, die an der Innenseite der Plasmamembran an GTP-hydrolysierende Proteine (kurz G-Proteine) koppeln. Bei Aktivierung des Rezeptors durch einen Transmitter führt die

Hydrolyse der G-Proteine zu einer Signalkaskade in der postsynaptischen Nervenzelle und damit indirekt zur De- oder Hyperpolarisation. Da GABA_A Rezeptoren (γ -Aminobuttersäure Typ A Rezeptoren) zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen gehören, werden die metabotropen Rezeptoren hier nicht weiter erläutert. Wichtige ionotrope Rezeptoren mit ihren Liganden sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Wichtige ligandengesteuerte Ionenkanäle

Rezeptor	Ligand	Ionenspezifität
5-HT ₃ Rezeptoren	Serotonin	Natrium-Einstrom, Kalium-Ausstrom
AMPA Rezeptoren	Glutamat	Natrium-Einstrom, Kalium-Ausstrom
GABA _A Rezeptoren	GABA	Chlorid-Einstrom
Glycin Rezeptoren	Glycin	Chlorid-Einstrom
Kainat Rezeptoren	Glutamat	Natrium-Einstrom, Kalium-Ausstrom, Calcium-Einstrom
nikotinische Acetylcholin Rezeptoren	Acetylcholin	Natrium-Einstrom, Kalium-Ausstrom
NMDA Rezeptoren	Glutamat/Glycin	Natrium-Einstrom, Kalium-Ausstrom, Calcium-Einstrom
P2X Rezeptoren	ATP	Natrium-Einstrom, Calcium-Einstrom

Aufgelistet sind die wichtigsten ligandengesteuerten Ionenkanäle, ihre endogenen Liganden und ihre Ionenspezifität.¹

Ionotrope Rezeptoren bestehen aus mehreren Untereinheiten, welche die Membran durchspannen und in ihrer Mitte die Kanalpore ausbilden. Im Ruhezustand ist der Rezeptor geschlossen, nach Bindung eines endogenen oder exogenen Agonisten öffnet sich die Kanalpore und lässt je nach Spezifität bestimmte Ionen passieren und löst so, wie im Fall der nikotinischen Acetylcholin Rezeptoren eine Signalkaskade aus oder führt wie bei GABA_A oder Glycin Rezeptoren zum Einstrom von Chlorid-Ionen und dadurch direkt zur Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran. Generell ruft die Aktivierung ligandengesteuerter Ionenkanäle eine schnelle Reaktion hervor.¹

Strukturell ähneln sich GABA_A, 5-HT₃, nACh und Glycin Rezeptoren. Sie bilden ihre Kanäle jeweils aus 5 heteromeren Untereinheiten, wobei jede Untereinheit die Membran viermal durchspannt und die zweiten Transmembranbereiche der Untereinheiten die Wand des Ionenkanals bilden.³ N- und C-Terminus liegen extrazellulär. Der N-Terminus ist recht groß und bildet Spielraum für die Ausbildung von Bindetaschen. Zusätzlich befindet sich dort der für diese auch als Cys-Loop Superfamilie bekannten Rezeptoren charakteristische Cystein Loop. Weite Bereiche wie z.B. der Cystein Loop und die Transmembrandomänen sind bei den Untereinheiten dieser Rezeptoren konserviert.

Vergleicht man die α Untereinheit des GABA_AR mit denen des nAChR wird die Ähnlichkeit besonders deutlich in der Transmembrandomäne 1 (TM1) und in einigen Bereichen des N-Terminus. Hier beträgt die Sequenz-Identität 34% und die Homologie (konservativer Austausch) 62%.⁴ Für die β Untereinheit ergibt sich eine ähnliche Homologie für die Bereiche TM1-TM3.⁴

Anhand der GABA-Bindestelle am GABA_AR wird die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den verwandten Rezeptoren deutlich. Die Bindestelle von GABA an α 1- und β 2-enthaltenden Rezeptoren ergibt sich aus den Aminosäuren Phe64 der α 1 Untereinheit und den Aminosäuresequenzen Tyr157-Gly158-Tyr159-Thr160 und Thr202-Gly203-Ser204-Tyr205 der β 2 Untereinheit.⁵ Bei nAChR sind ebenfalls drei Bereiche wichtig für die Bindung des Agonisten Acetylcholin. Dies sind Tyr93, Trp149 und Tyr190/Cys192/Tyr197.⁶ Bei den GlyR scheinen die Aminosäuren Tyr161 und Tyr202,⁷ sowie Phe159 und Tyr161⁸ eine bedeutende Rolle bei der Bindung des Agonisten Glycin zu spielen. Homolog zu der Aminosäuresequenz 157-160 der β 2 Untereinheit des GABA_AR sind das Trp149 des nAChR und Phe159 sowie Tyr161 des GlyR. Tyr197 des nAChR und Tyr202 des GlyR lehnen sich an die Aminosäuren 202-205 der β 2 Untereinheit des GABA_AR an.

1.3 GABA Rezeptoren

GABA Rezeptoren teilen sich in GABA_A und GABA_B Rezeptoren auf. GABA_BR sind G_i-Protein gekoppelte Rezeptoren und werden hier nicht weiter diskutiert. GABA_AR sind, wie bereits erwähnt, Liganden-gesteuerte Chlorid-Kanäle. Mit GlyR gehören GABA Rezeptoren zu den inhibitorischen Ionenkanälen im ZNS. Wie andere Rezeptoren der Cys-Loop Superfamilie bestehen GABA_AR aus fünf Untereinheiten. Soweit bekannt, existieren sechs α Untereinheiten, drei β Untereinheiten, drei γ Untereinheiten und jeweils nur eine δ , θ , π und ϵ Untereinheit. Innerhalb einer Untereinheiten-Familie besteht eine Sequenz-Identität von 60-80%, zwischen den Familien eine Sequenz-Identität von 20% und eine Sequenz-Ähnlichkeit von 50%.⁹ Natürlich vorkommende Untereinheiten haben eine Länge von etwa 450 Aminosäuren und teilen sich eine topologische Organisation. Ungefähr die Hälfte der Untereinheit besteht aus dem extrazellulären N-Terminus, die auch den Cystein Loop enthält, gefolgt von vier Transmembrandomänen (Abb. 1).

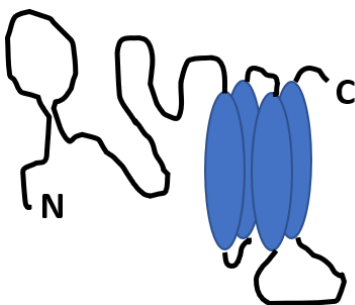


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer GABA_AR Untereinheit. Die Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen, einem langen extrazellulären N-Terminus, einem größeren interzellulären Loop zwischen TM3 und TM4 und einem kurzen extrazellulären C-Terminus. Die Abbildung dient der schematischen Darstellung und ist nicht maßstabsgetreu.

Die zweiten Transmembrandomänen jeder der fünf Untereinheiten eines Rezeptors bilden den Ionenkanal.³ Zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne liegt ein großer intrazellulärer Loop, der z.B. in Modulationen durch Phosphorylierung involviert ist. Rezeptoren, die aus α , β und γ Untereinheiten aufgebaut sind, scheinen einem definierten Aufbau zu folgen.¹⁰⁻¹² Zu diesen GABA_AR gehören auch die am häufigsten auftretenden Rezeptoren aus $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 2$. Die Abfolge ist hierbei $\gamma 2 \beta 2 \alpha 1 \beta 2 \alpha 1$ gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet.¹⁰⁻¹² Anders verhält es sich mit Rezeptoren, die eine δ oder ε Untereinheit beherbergen. Dort scheint der Aufbau komplexer zu sein¹³⁻¹⁵ und ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Die Anzahl an Untereinheiten macht eine große Zahl an möglichen heteropentameren Isoformen möglich. Vermutlich kommen 12-24 davon natürlicherweise vor. Die Diversität scheint einer Reihe von biologischen Funktionen zu dienen, darunter gewebe- und altersabhängige Transkriptionskontrolle oder gewebeabhängige funktionale Kontrolle auf Proteinebene.^{9, 16} Die Verteilung mancher Untereinheiten ist breit gefächert, während andere auf bestimmte Bereiche eingegrenzt sind. Extreme Beispiele hierfür sind die $\alpha 6$ Untereinheit, die nur in den Granula-Zellen des Cerebellums exprimiert wird¹⁷⁻¹⁸ und die ρ Untereinheiten, die in der Retina exprimiert werden.¹⁹ Außerhalb des ZNS finden sich GABA_AR noch in der Leber,²⁰ der glatten Bronchialmuskulatur,²¹ in verschiedenen Immunzellen²²⁻²³ und im Falle der π Untereinheit in Plazenta, Uterus, Ovarium und Prostata, sowie einigen degestiven Geweben.²⁴⁻²⁵ GABA_AR sind zum einen postsynaptisch lokalisiert und führen bei Aktivierung durch einen schnellen, kurzen Einstrom von Chlorid-Ionen zur Hyperpolarisation und Inhibition der Nervenzelle. Dies wird als phasische Inhibition bezeichnet. Zusätzlich sind GABA_AR auch extrasynaptisch lokalisiert und führen dort zur tonischen Inhibition. Diese Rezeptoren besitzen eine hohe Sensitivität für GABA²⁶⁻²⁷ und eine geringere Desensitivierung.²⁸ Es sind vor allem die δ -enthaltenden Rezeptoren, die extrasynaptisch vorkommen, gepaart mit der $\alpha 6$ Untereinheit im Cerebellum,^{18, 29} mit der $\alpha 4$ Untereinheit im Thalamus³⁰⁻³¹ und mit der $\alpha 1$ Untereinheit in hippocampalen Interneuronen.³² Der größte Anteil nicht δ -enthaltender GABA_AR, die extrasynaptisch vorkommen, sind vom Typ $\alpha 5 \beta 2$ im Hippocampus.³³ GABA_AR vermitteln einen Anionen-Einstrom selektiv für Chlorid-Ionen, aber eine gewisse Durchlässigkeit für Bicarbonat-Ionen wurde ebenfalls gezeigt.³⁴ Ist der Chlorid-Gradient an der Membran reduziert, z.B. durch eine Herunterregulation von Chlorid-Transportern, führt die Öffnung der GABA_AR zu einem Ausstrom von Chlorid-Ionen und damit zur Depolarisation der Nervenzelle. Dieses Phänomen wurde in Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen beobachtet.³⁵ Während der pränatalen Entwicklung und in neuronalen Subkompartimenten wurde ein ähnlicher exzitatorischer Mechanismus entdeckt.³⁶⁻³⁷

GABA_AR unterscheiden sich von anderen Mitgliedern der Cys-Loop Superfamilie durch ihre weitreichende Pharmakologie.³⁸ GABA_AR werden zwar nur durch wenige endogene Substanzen moduliert,³⁹⁻⁴⁰ aber durch eine enorme Vielzahl an exogenen Liganden.⁴¹ Im Folgenden werden verschiedene endogene und exogene Liganden und ihre Bindestellen vorgestellt.

1.4 Pharmakologie der GABA_A Rezeptoren

1.4.1 GABA-Bindestelle

Die GABA-Bindestelle ist eine der beiden identifizierten hochaffinen Bindestellen am GABA_AR. GABA ist der natürliche endogene Agonist an dieser Bindestelle. Als exogener Agonist ist Muscimol bekannt, als exogene Antagonisten Gabazin und Bicucullin. GABA_AR besitzen zwei GABA-Bindestellen, die im Zwischenraum zwischen β und α Untereinheit liegen, wobei beide Bindestellen eine unterschiedliche Affinität zeigen.⁴² Aufgrund der bislang fehlenden Röntgenstrukturanalyse des GABA_AR, bleiben Bindungs- und Öffnungsmechanismen spekulativ. Einige Näherungen wurden publiziert, die auf Strukturanalysen verwandter Cys-Loop Rezeptoren, wie des nAChR oder GlyR basieren. Durch Mutation einzelner Aminosäuren kann immerhin bestimmt werden, welche Aminosäuren essentiell für die Bindung von GABA am Rezeptor sind. Früh wurde so herausgefunden, dass sich die Bindetasche für GABA im extrazellulären Bereich benachbarter Untereinheiten befindet. Geformt wird diese Bindestelle von sechs Aminosäureschleifen. Die ersten drei dieser Schleifen liegen auf der Plus-Seite der β Untereinheit und drei weitere Schleifen liegen auf der Minus-Seite der α Untereinheit.^{6, 43} 2013 veröffentlichten Bergmann et al. ein Modell basierend auf der Strukturanalyse des GluCl (Glutamat gated chloride channel) und des $\alpha 1$ nAChR von *Erwinia chrysanthemii* (ELIC).⁴⁴ Erst kürzlich wurde die Röntgenstrukturanalyse des GluCl publiziert, mit der Besonderheit, dass dieser mit dem gebundenen Liganden Glutamat erfasst werden konnte und so im aktivierten Zustand eingefangen wurde.⁴⁵ Die Struktur des GluCl besitzt dabei eine hohe Sequenzidentität verglichen mit dem GABA_AR. Die Identität zu den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 2$ sind jeweils 30%, 36% und 31% und die Identität der beiden Agonisten-Bindetaschen soll sogar noch höher sein. Viele der durch dieses Modell gefundenen Bindestellen können anhand bereits publizierter Daten bestätigt werden. So soll GABA ionische Bindungen mit $\alpha 1R66$ und $\beta 2E155$, sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit $\alpha 1T129$, $\beta 2T202$ und $\beta 2S156$ eingehen und eine π -Kationeninteraktion mit $\beta 2Y205$. Weitere wichtige Aminosäuren scheinen $\beta 2F200$ und $\alpha 1F64$ zu sein. Diese könnten die positive Ladung in der Bindetasche abschirmen. Interaktionen soll es auch zwischen der Alkylkette des GABA-Moleküls und dem Carbonyl der Aminosäure $\beta Y157$ geben. Neben der Ionenbindung von GABA zu $\beta 2E155$ bietet die positive Ladung noch die Möglichkeit, umgeben vom aromatischen Ring des $\beta 2Y205$ eine Wasserstoffbrücke zur Aminosäure $\beta 2S156$ aufzubauen. Die Aminosäure $\beta 2Y205$ wurde bereits als essentielle Aminosäure für die Bindung von Gabazin und die Kanalöffnung identifiziert.^{5, 46-47} Die Carboxyl-Gruppe des GABA-Moleküls könnte durch Interaktion mit $\alpha 1R66$ zum einen und durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren $\beta 2T202$ und $\alpha T129$ zum anderen zwischen β und α Untereinheit fixiert werden. Mutationen von $\beta 2T202$ haben einen starken Einfluss auf die Aktivierung des GABA_AR durch GABA gezeigt, einige Mutationen führten sogar zur Inaktivierung des Kanals.^{5, 46} Mutationen an $\alpha 1R66$ führten zu einer erniedrigten Affinität. Schon vorher wurde diese Aminosäure durch die „substituted cysteine accessibility method“ (SCAM) als Teil der Bindetasche identifiziert.⁴⁸⁻⁴⁹

Die GABA-Bindestelle unterteilt sich in eine hoch- und eine niederaffine Bindestelle. Wahrscheinlich handelt es sich hier nicht um zwei separate Bindestellen, sondern um eine strukturelle Änderung in der Konformation der niederaffinen Bindestelle. GABA bindet in elektrophysiologischen Versuchen an die niederaffine Bindestelle von $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ Rezeptoren mit einem EC_{50} von 20-40 μM und beschreibt damit die funktionale Kanalöffnung.⁵⁰ Die hochaffine Bindestelle wird dagegen in Bindungsstudien mit dem radioaktiven Liganden [3H]Muscimol mit einer Affinität im nanomolaren Bereich gemessen und beschreibt den Gleichgewichtszustand des geschlossenen, desensitisierten Kanals.⁵⁰⁻⁵¹

1.4.1.1 Muscimol

Muscimol ist ein psychoaktiver Bestandteil des Pilzes *Amanita muscaria*. Das 3-Hydroxy-Isoxazol-Derivat besitzt eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit GABA. Es bindet daher ebenfalls an die GABA-Bindestelle des $GABA_A R$. Die Affinität von Muscimol ist dabei sogar höher als die von GABA selbst. Muscimol wird als der prototypische exogene Agonist für $GABA_A R$ angesehen, der in der Lage ist, alle Subtypen des Rezeptors zu aktivieren.⁵² Muscimol bindet wie GABA sowohl an die hoch- als auch die niederaffine GABA-Bindestelle, wobei sich zeigte, dass die Verteilung der hochaffinen Muscimol-Bindung nicht gleichmäßig im ZNS ist. In Experimenten mit [3H]Muscimol im nanomolaren Bereich konnte gezeigt werden, dass die Bindung vor allem im Cerebellum und Thalamus auftritt. Dies könnte im Zusammenhang stehen mit dem beobachteten Einfluss der $\alpha 6$ und δ Untereinheit in den Granulazellen des Cerebellums und der δ Untereinheit im Thalamus auf die hochaffine Muscimol-Bindung.⁵³⁻⁵⁵

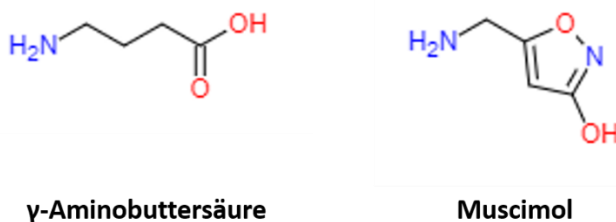


Abb. 2: Strukturformeln von γ -Aminobuttersäure (GABA) und Muscimol.

Eine Annäherung an die detaillierte Bindung von Muscimol in der Bindetasche wurde ebenfalls von Bergmann et al publiziert.⁴⁴ Da im Gegensatz zu GABA die geladene Amino-Gruppe leicht versetzt ist, gab die genaue Bindung von Muscimol zunächst Rätsel auf. Gleich bleiben wohl die Ionenbindung zur Aminosäure $\beta 2E155$, ebenso die Interaktionen der Carboxyl-Gruppe des Liganden. Der einzige Unterschied zur GABA-Bindung am Rezeptor ist eine π -Kationeninteraktion mit der Aminosäure $\beta 2F200$ statt $\beta 2Y205$. Scheinbar kann aber auch dort eine Interaktion stattfinden, wenn zusammen mit Muscimol noch ein Wasser-Molekül in der Bindetasche bindet. Dabei würde Muscimol sogar noch besser binden als GABA.

1.4.2 Benzodiazepine

Benzodiazepine werden seit Jahrzehnten im klinischen Bereich der Insomnie, Sedierung, Anxiolyse und als Antikonvulsant und Muskelrelaxans eingesetzt. Diese Liganden belegen eine weitere hochaffine Bindestelle am GABA_AR, die Benzodiazepin-Bindestelle.⁵⁶ Unterschieden wird zwischen positiven Modulatoren, negativen Modulatoren und Antagonisten. Positive Modulatoren erniedrigen die GABA Konzentration, die für einen halbmaximalen Effekt am GABA_AR benötigt wird;⁵⁷ negative Modulatoren erhöhen diese Konzentration. Antagonisten,⁵⁸⁻⁵⁹ als klassische Null-Modulatoren, vermögen den Effekt von GABA auf GABA_AR nicht zu beeinflussen.⁶⁰ Keines der Benzodiazepine ist in der Lage, den GABA_AR in Abwesenheit von GABA zu öffnen. Eine Benzodiazepin-Bindestelle wird nur in GABA_AR gefunden, die eine $\gamma 2/3$ Untereinheit enthalten.⁶¹⁻⁶³ Zusätzlich konnte eine GABA-abhängige Modulation von $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ Rezeptoren durch Flunitrazepam nachgewiesen werden.⁶³ Die α Untereinheit spielt bei der Bindung von verschiedenen Benzodiazepin-Derivaten eine enorme Rolle. So binden die klassischen Benzodiazepine nur an Rezeptoren des Typs $\alpha 1,2,3,5\beta\gamma 2/3$. Rezeptoren des Typs $\alpha 4,6\beta\gamma 2/3$ werden vor allem von negativen Modulatoren und Antagonisten gebunden. Der Austausch einer einzigen Aminosäure im Bereich der $\alpha 6$ Untereinheit in Position 100 von Arginin zu Histidin, welches die $\alpha 1$ Untereinheit an homologer Position 101 trägt, führt zur Fähigkeit Diazepam zu binden.⁶⁴ Neben $\alpha 1H101$ wurden noch weitere wichtige Aminosäuren gefunden, die die Benzodiazepin Binding beeinflussen und somit direkt oder indirekt die Bindetasche beeinflussen. Dazu gehören $\alpha 1F99$,⁶⁵⁻⁶⁶ $\alpha 1Y159$,⁶⁷⁻⁶⁸ $\alpha 1G200$,^{65, 69-71} $\alpha 1V202$,^{65, 69} $\alpha 1T206$,^{67, 70, 72-74} $\alpha 1G207$,⁶⁷ $\alpha 1Y209$,^{65, 68, 73} $\gamma 2F77$,⁷⁴⁻⁷⁶ und $\gamma 2M130$.^{65, 74} Interessant ist auch die Homologie zwischen Aminosäuren, die wichtig sind um die Benzodiazepin-Bindestelle zu formen und denen, die die GABA-Bindestelle bilden. So sind etwa $\gamma 2F77/\alpha F64$, $\alpha 1Y159/\beta 2Y157$, $\alpha 1T206/\beta 2T202$, $\alpha 1Y209/\beta 2Y205$ direkt homolog zueinander.⁷⁷ $\alpha 200$, $\alpha 211$ sind in homologen Regionen zu $\beta 205$ lokalisiert und $\gamma 130$ zu $\alpha 120$.⁷⁷ Da GABA im Zwischenraum zwischen β und α Untereinheit bindet und die beiden Bindestellen eine gewisse Homologie aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass auch Benzodiazepine im Zwischenraum der α und γ Untereinheit binden.

1.4.3 Z-Substanzen

Da Benzodiazepine bei Schlafstörungen neben den erwünschten Effekten auch zahlreiche Nebenwirkungen wie Angstlösung, Muskelrelaxation, aber auch eine Änderung in der Schlafarchitektur⁷⁸ und Abhängigkeit verursachen, werden mittlerweile zur Behandlung der Insomnie vor allem die Z-Substanzen eingesetzt. Ihr Name leitet sich dabei vom Anfangsbuchstaben der meisten Wirkstoffe dieser Klasse ab. Sie agieren dabei über dieselben neuronalen Mechanismen wie Benzodiazepine, binden an dieselbe Bindestelle.⁷⁹ Ihre hohe Selektivität für $\alpha 1$ -enthaltende GABA_AR verleiht ihnen dabei allerdings ein unterschiedliches neuropharmakologisches Profil, denn die sedierenden Eigenschaften der Benzodiazepine werden auf die $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren zurückgeführt, während die genannten anderen Effekte durch andere α Untereinheiten vermittelt

werden.⁸⁰ So haben die Z-Substanzen im Gegensatz zu Benzodiazepinen nur einen geringen Einfluss auf kognitive Fähigkeiten und Muskelrelaxation, während sie zu einem verbesserten Schlafprofil führen.⁸¹⁻⁸³ Zusätzlich zur hohen Affinität für $\alpha 1\beta\gamma 2$ Rezeptoren weist die Z-Substanz Zolpidem auch eine geringere Affinität für $\alpha 2/3$ -enthaltende Rezeptoren auf und eine sehr geringe Affinität für $\alpha 5$ -enthaltende Rezeptoren.⁸⁴⁻⁸⁶ Im Gegensatz dazu besitzt Zopiclon (bzw. das aktive Enantiomer Eszolpidem) eine ähnliche Affinität für $\alpha 1/2/3/5$ -enthaltende Rezeptoren,⁸⁶⁻⁸⁷ führt aber auch bei längerer Anwendung nicht zu den unerwünschten Effekten der Benzodiazepine.⁸⁸ Das erhoffte niedrigere Abhängigkeitspotential der Z-Substanzen gegenüber den Benzodiazepinen konnte jedoch nicht bestätigt werden.⁸⁹

1.4.4 Kanal-Blocker

Die TM2-Regionen der Untereinheiten, die die Kanalpore bilden, sind für Aktivierung, Desensitivierung, Ionenselektion und Bildung der Bindetaschen verschiedener ionophorer Liganden verantwortlich.⁹⁰⁻⁹⁴ PicROTOXIN, Pentylentetrazol (PTZ) und andere Tetrazole, Penicillin und andere β -Lactam-Antibiotika, thio-Butyrolactone, Bicyclophosphate (wie z.B. TBPS, EBOB) und neurotoxische Pestizide (z.B. Dieldrin) sind klassische Kanal-Blocker des GABA_AR (Abb. 3).⁹⁵ Neben der zyklischen Struktur, die allen GABA_AR Kanal-Blockern gemein ist, weisen viele von ihnen auch eine hohe Konformations- und Strukturähnlichkeit auf. Da trotz intensiver Forschung an GABA_AR die Kanalpore noch wenig untersucht ist, kann man über die Bindung der „cage convulsants“ nur spekulieren. Lange dachte man, diese Liganden würden den Kanal durch ihre Bindung sozusagen verstopfen und dadurch konvulsiv wirken. In der Literatur wurde die vermeintlich gemeinsame Bindestelle dann unter anderem als PicROTOXIN-Bindestelle beschrieben. Neuere Studien haben allerdings ergeben, dass es diese gemeinsame Bindestelle wohl nicht gibt. Stattdessen handelt es sich eher um überlappende, aber nicht identische Bereiche im Ionenkanal.⁹⁵ Auch der Bindungsmechanismus scheint aufgrund der unterschiedlichen Assoziations- und Dissoziationskinetiken verschieden zu sein.⁹⁶⁻¹⁰⁰ Einige der Liganden (PicROTOXIN, Bicyclophosphate, Butyrolactone und β -Lactame) scheinen ihre Bindestelle auch im geschlossenen Zustand des GABA_AR erreichen und binden zu können.⁹⁵ Dies scheint ebenfalls zu bestätigen, dass ein einfaches Verstopfen des Kanals nicht der Blockierungsmechanismus ist.

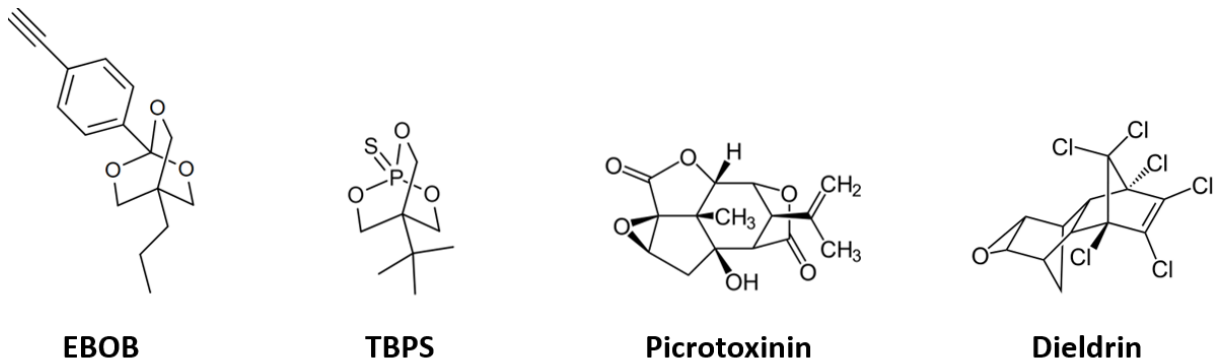


Abb. 3: Strukturformeln der Kanalblocker EBOB, TBPS, Picrotoxinin und Dieldrin.

1.4.4.1 Picrotoxinin-Bindestelle

Die Bindestelle von Picrotoxinin ist noch nicht detailliert erforscht. Da die Bindung empfindlich reagiert auf Mutationen der Aminosäuren 2/3 und 6 der Kanal-bildenden TM2 Region (Nummerierung ausgehend vom N-terminalen Bereich der TM2 nach Miller¹⁰¹), ist es wahrscheinlich, dass die Bindestelle diese Aminosäuren involviert.^{90, 95} Vermutet wird, dass Picrotoxinin tief im Ionenkanal bindet und dabei mit seinem hydrophoben Rest mit der Aminosäure 2 interagiert und mit der Aminosäure 6 in der Mitte der TM2. Die Aminosäure 6 ist hoch konserviert und unterstützt damit die Annahme, dass hier das Epizentrum der Picrotoxinin-Bindung liegt.¹⁰² Aminosäure 15 scheint wichtig für das Zusammenspiel zwischen GABA- und Picrotoxinin-Bindestelle zu sein¹⁰³ und auch Aminosäure 17 soll wichtig für die Modulation des GABA_AR sein.⁹¹ Dies deutet auf eine weitere Bindestelle innerhalb der Kanalpore für Picrotoxinin hin.¹⁰⁴ Interessant ist, dass eine einzelne Mutation (271Arg/Leu oder 271Arg/Gln) in der $\alpha 1$ -Untereinheit des humanen Glycin-Rezeptors Picrotoxinin vom Antagonist zum allosterischen Modulator werden lässt.¹⁰⁵ Untersuchungen an Rezeptoren, die die Insektizidresistenz-vermittelnde *Drosophila* GABA_AR Untereinheit Rdl zusammen mit einer β Untereinheit enthielten, zeigten Picrotoxinin-Insensitivität.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ In GABA Rezeptoren, die teilweise oder vollständig aus $\rho 1$ -Untereinheiten aufgebaut sind (auch GABA_C Rezeptoren genannt), zeigt sich Picrotoxinin sowohl als kompetitiver, wie auch als nicht-kompetitiver Antagonist. Die kompetitive Seite des Antagonismus kann dabei durch eine Punktmutation in der TM2 Region vollständig eliminiert werden. Zusätzlich wird durch besagte Mutation die Sensitivität für Picrotoxinin gesteigert.¹⁰⁸

1.4.4.2 TBPS-Bindestelle

Tert-Butylbicyclophosphorothionate (TBPS) ist ein nicht-kompetitiver Kanal-Blocker, von dem angenommen wird, dass er über die Picrotoxinin-Bindestelle wirkt. Mutationen an Aminosäure 2 sind auch für die TBPS-Bindung kritisch, was für eine gemeinsame Bindestelle mit Picrotoxin spricht.¹⁰⁹ Auch die Tatsache, dass die [³⁵S]TBPS-Bindung sich vollständig durch Picrotoxin verdrängen lässt¹¹⁰ spricht für eine gemeinsame, sich aber mindestens überlappende Bindestelle. Aminosäuren 1, 2 und 3

der TM-2 der β Untereinheit waren in Versuchen mit chimären Untereinheiten wichtig, um eine TBPS-Bindung zu ermöglichen, was bedeuten würde, dass diese Aminosäuren an der Bildung der Bindetasche beteiligt sind.¹⁰⁹

1.4.4.3 EBOB-Bindestelle

Da sich die [³H]EBOB-Bindung, wie schon die des [³⁵S]TBPS durch Picrotoxin verdrängen lässt, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass es sich um dieselbe oder eine überlappende Bindestelle handelt. Versuche mit Punktmutationen in der Kanal-bildenden Region der TM-2 der β 3 Untereinheit zeigten, dass wie bei anderen Kanal-Blockern die Aminosäuren 2 und 6 der TM-2 eine bedeutende Rolle für die EBOB-Bindung spielen.¹¹¹ Eine Mutation der Aminosäure in Position 1 von Alanin zu Serin konnte dagegen keine Beeinträchtigung der Bindung hervorrufen. Eine Mutation an Aminosäure 2 führte dagegen zu einer verminderten Affinität der EBOB-Bindung an den Rezeptor.¹¹¹ Im Gegensatz zum Insektizid Dieldrin konnte die Mutation eine Bindung aber nicht verhindern,¹¹¹⁻¹¹² was wiederum für eine Variation der Bindestellen unter den Kanalblockern spricht. Eine komplette Bindungshemmung ergab jedoch die Threonin zu Valin Mutation an Position 6. Die EBOB-Bindestelle umfasst damit höchstwahrscheinlich die Aminosäuren 2 und 6 der Kanal-bildenden Region der TM-2.

1.4.4.4 Allosterische Interaktion von Liganden mit TBPS/EBOB

Die beiden Kanalblocker EBOB und TBPS haben sich zur Untersuchung von bekannten und neu entwickelten, nicht-radioaktiv markierten Liganden am GABA_A Rezeptor bewährt. Die Bindung der radioaktiv markierten Kanalblocker [³H]EBOB und [³⁵S]TBPS kann allosterisch moduliert werden. Diese Modulation erfolgt über eine Konformationsänderung des Rezeptors durch Bindung des Liganden. Der Effekt von GABA-Agonisten¹¹³⁻¹¹⁵ und Liganden der Benzodiazepin-Bindestelle¹¹⁶⁻¹¹⁹ auf die TBPS-Bindung ist offensichtlich allosterisch, aber auch die Wirkung von Barbituraten, Etazolol und Etomidat scheint allosterisch zu sein.¹²⁰⁻¹²² Negativmodulatoren des GABA_AR verlangsamten die Dissoziation von TBPS von seiner Bindestelle signifikant, wogegen Muscimol und andere Positivmodulatoren die Dissoziation stark beschleunigen.¹²³ Benzodiazepine zeigen in Abwesenheit von GABA nur geringste Effekte auf die TBPS Bindungskinetik,¹²⁴ was zu ihrem pharmakologischen Profil der Erhöhung der Affinität für GABA passt. Eine GABA-unabhängige Modulation der Bindung weist auf einen Liganden hin, der den Kanal direkt aktivieren kann.^{116, 123} Zahlreiche Studien zeigen, dass es für viele Substanzen eine gute Korrelation zwischen Aktivierung des Ionenkanals und Bindungsmodulation von [³⁵S]TBPS^{123, 125-127} und [³H]EBOB¹²⁸ gibt. Die Kinetik der TBPS- und EBOB-Bindung kann man somit als *in vitro* Modell für die ionophore Funktion des GABA_AR ansehen. Trotzdem dient die Modulation des Kanalblockers nur als Beweis für die Bindung eines Liganden am GABA_AR und dessen Fähigkeit die Bindung des Kanalblockers zu beeinflussen, kann jedoch nicht die genaue Affinität und Aktivität des Liganden am GABA_AR selbst bestimmen.

Zusätzlich kann man durch die Erhöhung oder Erniedrigung der Bindung des Kanalblockers an den GABA_AR auf einen Positiv- bzw. Negativmodulator des Rezeptors schließen.¹²³

Die Phase der schnellen Dissoziation, die durch GABA-Agonisten und andere Agenzien verursacht wird, könnte den geöffneten Zustand des Ionenkanals repräsentieren, wobei es zu einer Freilegung der TBPS-Bindestelle oder auch zu einem vereinfachten Transport des Kanalblockers kommen könnte.¹²³ Andererseits könnte die Phase der langsamen Dissoziation den geschlossenen Zustand des Kanals repräsentieren und so eine Transportbarriere für TBPS darstellen.¹²³ Die pharmakologische Wirkung der Liganden spricht für diese Hypothese, da Muscimol und andere GABA-Agonisten und Barbiturate die größte Verschiebung in Richtung schnelle Dissoziation verursachen und auch ihr pharmakologischer Effekt eine Öffnung des GABA_AR ist,¹²⁹⁻¹³⁰ während Inhibitoren des GABA_AR eine Rezeptorblockade verursachen.¹²⁹

1.4.5 Weitere Liganden

1.4.5.1 Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid ist ebenfalls als Antagonist des GABA_AR bekannt. Neben der Fähigkeit den Na⁺/2Cl⁻/K⁺ Co-Transporter zu blockieren, ist es auch in der Lage selektiv, reversibel, schnell und nicht-kompetitiv den Chlorid-Einstrom durch den GABA_AR der Granulazellen des Cerebellums zu unterbinden.¹³¹ Die Interaktion mit GABA_AR ist dabei abhängig von der Anwesenheit der Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 2/3$ und daher auf die Granulazellen des Cerebellums beschränkt.¹³² Da die GABA-unabhängige Erhöhung der [³⁵S]TBPS-Bindung durch Furosemid nur an $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ Rezeptoren beobachtet werden konnte, die GABA-abhängige jedoch an allen $\alpha 6$ - und $\beta 2/3$ -enthaltenden Rezeptoren, geht man von mindestens zwei unterschiedlichen Veränderungen in der Konformation des GABA_AR aus, hervorgerufen durch Furosemid.¹³²

1.4.5.2 Anästhetika

Barbiturate sind wichtige Vertreter dieser Indikationsgruppe. Neben ihrem, mittlerweile eher obsoleten Einsatz als Narkotika oder Antiepileptika, wurden sie auch als Schlafmittel verwendet, doch ihr Risikopotenzial hat sie weitestgehend durch Benzodiazepine und Z-Substanzen ersetzt werden lassen. Bei der Einschläferung von Tieren oder Hinrichtungen kommen Barbiturate aber weiterhin zum Einsatz. Barbiturate benötigen weder eine bestimmte Anordnung noch Anwesenheit von α , γ oder δ Untereinheiten in einem GABA_AR Pentamer.¹³³⁻¹³⁵ In geringer Dosierung führen sie zu einer Potenzierung der GABA-Modulation,¹³⁶⁻¹³⁷ können den GABA_AR aber bei hohen Dosen direkt aktivieren¹³⁸⁻¹³⁹ oder in noch höheren Konzentrationen den Rezeptor blockieren.¹³⁹⁻¹⁴¹ Für die Potenzierung der GABA-Modulation ist eine Verlängerung der Offen-Phase des Kanals verantwortlich.^{137, 142-143} Dieser Mechanismus unterscheidet sich von dem der Benzodiazepine, die die Frequenz der Kanalöffnungen erhöhen.¹⁴⁴

Weitere wichtige Anästhetika, die am GABA_AR wirken, sind Etomidat, Loreclezol und Propofol. Diese besitzen das typische Wirkprofil der Barbiturate, zeigen aber eine β 2/3 Selektivität.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Die Bindestelle von Etomidat und Propofol wurde auf die TM2 Region der β 2/3 Untereinheit eingegrenzt.¹⁴⁵ Eine Punktmutation an der Position 265 von Asparagin zu Methionin führte zum Verlust der GABA-modulatorischen Fähigkeiten der Anästhetika an γ 2-enthaltenden GABA_AR.^{145, 148}

1.4.5.3 Neurosteroide

Neurosteroide sind Steroide oder Metaboliten von Steroiden, die die neuronale Aktivität modulieren können. Mittlerweile ist eine Vielzahl dieser Neurosteroide identifiziert, die mit dem GABA_AR interagieren.⁴ Für die reduzierten Metaboliten von Progesteron und Deoxycorticosteron, 5 α -Pregan-3 α -ol-20-on (5 α ,3 α) und 3 α ,5 α -Tetrahydrodeoxycorticosteron (3 α 5 α -THDOC) wurde zuerst gezeigt, dass sie die neuronale Erregbarkeit als Positiv-Modulatoren des GABA_AR beeinflussen.¹⁴⁹ Vereinbar mit der Erhöhung der GABA_AR Funktion dieser Steroide ist auch ihre Wirkung auf das Verhalten von Nagetieren im Tierversuch. Dort führten sie zu Sedierung, Anxiolyse, Analgesie, Antikonvulsion und in höherer Dosierung zur Anästhesie.¹⁵⁰⁻¹⁵¹ Auf der anderen Seite wurden auch Neurosteroide gefunden, die am GABA_AR als Antagonisten fungieren, wie zum Beispiel 3 β -OH Pregnasteroide und Pregnanolonsulfat.¹⁵²⁻¹⁵³ 5 α -Pregan-3 α -ol-20-on zeigte sich als potentester Vertreter der Neurosteroide am GABA_AR,¹⁵⁴ der zudem sowohl selektiv für den GABA_AR als auch enantioselektiv ist.¹⁵⁵ Versuche von 5 α -Pregan-3 α -ol-20-on an verschiedenen rekombinanten GABA_AR zeigte, dass die β Untereinheit keinen Einfluss auf die Aktivität hat.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ Die Wahl der α Untereinheit zeigte zwar Unterschiede, aber nur in sehr geringem Maß.^{156, 158} Trotzdem zeigte 5 α -Pregan-3 α -ol-20-on an α 1/ α 3 β 1 γ 2 Rezeptoren eine höhere Affinität als an anderen α Untereinheiten, was bei physiologischen Konzentrationen bereits eine Selektivität bedeuten könnte.¹⁵⁶ Die Anwesenheit einer γ Untereinheit scheint nicht von Bedeutung zu sein. Binäre (α 1 β 1) Rezeptoren zeigten sogar eine höhere Aktivität als ternäre (α 1 β 1 γ 2).¹⁵⁶ Die Wahl der γ Untereinheit vermochte jedoch die Potenz von 5 α -Pregan-3 α -ol-20-on am GABA_AR signifikant zu beeinflussen, wobei γ 2 die höchste und γ 1 die niedrigste Potenz zeigte.¹⁵⁶ In Kombination mit β 3 und α 4 vermochte auch die δ Untereinheit einen sehr sensitiven Rezeptor für 5 α -Pregan-3 α -ol-20-on zu bilden.¹⁵⁶ Ein Teil der Bindestelle liegt auf der α Untereinheit, denn die Punktmutationen T235W und Q240W der α 4 Untereinheit lassen den GABA_AR insensitiv für das Neurosteroid 5 α -Pregan-3 α -ol-20-on werden.¹⁵⁹

1.4.6 Spezifische Liganden an δ -enthaltenden GABA_AR

Wie Eingangs beschrieben, unterscheiden sich GABA_AR, die eine δ Untereinheit enthalten, in ihrer Funktion von anderen GABA_AR. Sie kommen ausschließlich extra- und perisynaptisch vor,¹⁶⁰ sind hochsensitiv für den Agonisten GABA²⁶⁻²⁷ und zeigen eine geringe Desensitivierung²⁸. Diese besonderen Bedingungen machen δ -enthaltende Rezeptoren zu den idealen extrasynaptischen Rezeptoren, die auf die dort vorliegenden geringen GABA-Konzentrationen reagieren.¹⁶⁰ Sie spielen eine wichtige physiologische Rolle durch Beeinflussung der neuronalen Erregbarkeit und daher auch

der neuronalen Netzwerk-Aktivität.¹⁶⁰⁻¹⁶¹ Es wurde beobachtet, dass Mutationen der δ Untereinheit mit Epilepsie und generell Neigung zu Krämpfen einhergehen.¹⁶²⁻¹⁶³

Die Bedeutung der δ -enthaltenden GABA_AR macht deutlich, wie wichtig es ist, diese Rezeptoren in ihrem Aufbau und ihrer Funktion genauer zu verstehen und potentielle Arzneimittel zu entwickeln. Leider fehlen derzeit noch Liganden, die selektiv an δ -enthaltende GABA_AR binden. Gerade um den noch nicht geklärten Aufbau dieses Rezeptors zu untersuchen, sind solche selektiven Liganden sehr wertvoll. Dennoch wurden bereits verschiedene Liganden entdeckt oder entwickelt, die für bestimmte δ -enthaltende GABA_AR selektiv sind oder diese zumindest stark präferieren.

1.4.6.1 Tetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC)

Mihalek zeigte 1999 in δ -KO Mäusen eine drastisch reduzierte Sensitivität von Neurosteroiden.⁵⁴ Dies führte zu der Vermutung, dass δ -enthaltende GABA_AR eine wichtige Rolle bei der Wirkung von Neurosteroiden spielen. Tatsächlich konnte Wohlfarth 2002 in elektrophysiologischen Versuchen mit verschiedenen rekombinanten GABA_AR zeigen, dass die δ Untereinheit zu einer erhöhten Sensitivität der Neurosteroid-Modulation führt und sich die Desensitivierung von $\alpha 1\beta 3\delta$ Rezeptoren durch das Neurosteroid THDOC ändert.¹⁶⁴ Allerdings zeigte er auch, dass THDOC nicht δ -enthaltende Rezeptoren ebenfalls bindet und diese entweder direkt aktiviert oder die GABA-Aktivität moduliert.¹⁶⁴ Publikationen von Hosie aus den Jahren 2006 und 2009 lassen dagegen auf eine Bindung der Neurosteroiden an der α Untereinheit schließen.^{159, 165}

1.4.6.2 Pyrazolpyridine

Die Pyrazolpyridine Tracazolat und Etazolol, die ihre anxiolytische und antikonvulsive Wirkung über den GABA_AR entfalten, zeigen eine enorme Potenzierung der GABA-Modulation an δ -enthaltenden Rezeptoren.¹⁶⁶ Die Bindestelle liegt allerdings auch bei diesen Substanzen höchstwahrscheinlich nicht oder nicht ausschließlich auf der δ Untereinheit, denn andere rekombinante Rezeptoren konnten ebenfalls durch Tracazolol moduliert werden.¹⁶⁶

1.4.6.3 Dihydropyrimidone

Im Jahr 2010 veröffentlichte Lewis seine Ergebnisse zu der Substanzklasse der Dihydropyrimidone, zu denen auch das im Handel erhältliche Monastrol zählt. Die Substanzen ähneln in ihrer Struktur den Barbituraten Phenobarbital und Pentobarbital und wurden daher auf ihre Aktivität an GABA_AR geprüft. Tatsächlich konnte im Gegensatz zu Barbituraten eine Selektivität für δ -enthaltende Rezeptoren gefunden werden. Zusätzlich wurden jedoch auch $\alpha 4\beta 3$ Rezeptoren moduliert, was auch hier gegen eine direkte Bindestelle an der δ Untereinheit spricht.¹⁶⁷ Dennoch scheinen diese Substanzen im Gegensatz zu anderen selektiven Liganden gleich die ganze Unterklasse der δ -enthaltenden Rezeptoren zu modulieren ($\alpha 1/2/4/5/6\beta 2/3\delta$), wobei gerade die α Untereinheiten, die auch am häufigsten im Gehirn mit der δ Untereinheit koppeln ($\alpha 4/6$), die geringste Modulierbarkeit durch Dihydropyrimidone aufweisen.¹⁶⁷ Die Substanzen haben so eventuell keine Bedeutung als

potentielle Arzneistoffe, könnten aber weiter zur Strukturaufklärung der δ -enthaltenden GABA_AR dienen.

1.4.6.4 Ketamin

Für das Kurznarkotikum Ketamin, welches seine anästhetische Wirkung vor allem über die nicht-kompetitive Inhibition des NMDA Rezeptors vermittelt, wurde schon früh eine Interaktion auch mit dem GABA_AR vermutet.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Hevers et al fanden 2008 nach elektrophysiologischer Analyse von verschiedenen rekombinanten Rezeptoren heraus, dass Ketamin tatsächlich in der Lage ist $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren zu modulieren.¹⁷¹ In Konzentrationen, die anästhetisch relevant sind, erfolgt eine Potenzierung der GABA-Modulation. In höheren Konzentrationen vermag Ketamin die Rezeptoren auch direkt zu öffnen.¹⁷¹

1.4.6.5 4,5,6,7-Tetrahydroisothiazol-[5,4-c]pyridin-3-ol (THIP, Gaboxadol)

Gaboxadol und Piperidin-4-sulfonsäure (P4S) zeigen eine höhere Effizienz und Potenz an $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren als an äquivalenten $\gamma 2$ -enthaltenden Rezeptoren.¹⁷² $\alpha 4$ - und δ -enthaltende GABA_AR kommen im ZNS nur im Thalamus und Hippocampus gemeinsam vor.^{31, 173} Während P4S ein Partialagonist an beiden, $\alpha 4\beta 3\delta$ und $\alpha 4\beta 3\gamma 2$, Rezeptoren ist, zeigte sich Gaboxadol an $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren zwar auch als Partialagonist, an $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren dagegen als Superagonist, dessen Effizienz sogar die von GABA überschreitet.¹⁷² An $\alpha 4\beta 3$ Rezeptoren konnte Gaboxadol aber ebenfalls die maximale Effizienz von GABA zu überschreiten.¹⁷⁴ Gaboxadol wies jedoch eine 5-10x höhere Potenz für $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren auf.¹⁷⁴

1.4.6.6 Delta Selective Compounds 1 und 2 (DS1, DS2)

Im Jahr 2009 stellte Wafford die von Merck entwickelten Substanzen DS1 und DS2 (Delta Selective Compound 1 und 2) als selektive Liganden an δ -enthaltenden GABA_AR vor. In einem fluoreszenz-basierten Experiment wurden beide Substanzen auf ihre Selektivität für $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA_AR untersucht, verglichen wurde dabei der Effekt mit den synaptischen Rezeptoren $\alpha 1/4\beta 3\gamma 2$. DS1 zeigte dabei eine hohe Effizienz und Potenz für $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren, aber auch eine gewisse Modulation der synaptischen Rezeptorvarianten, während DS2 nur die $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren modulierte und bei den synaptischen Rezeptoren sogar eine Negativmodulation auslöste. Da dieser Assay jedoch die Aktivität der Substanzen am Rezeptor nur indirekt über einen spannungsabhängigen Fluoreszenz-Farbstoff und damit die Änderungen des Membranpotentials messen kann, wurden beide Kandidaten auch in elektrophysiologischen Experimenten untersucht. Hier zeigte sich DS1 ebenfalls als hochpotenter Modulator von GABA an $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren, der auch in der Lage war, den Rezeptor in Abwesenheit von GABA zu öffnen. Dies ist nicht weiter ungewöhnlich, da ähnliches bereits für andere modulierende Substanzen in höherer Konzentration festgestellt worden ist.¹⁷⁵ Interessanterweise erfolgten GABA-mimetische und GABA-modulierende Effekte bei derselben DS1-Konzentration. DS1 zeigte sich auch in den elektrophysiologischen Experimenten als selektiver Ligand, der im Gegensatz zum Fluoreszenzassay keinen Effekt auf $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren hatte. Die Autoren

publizierten DS1 demnach als hochpotenten und selektiven Modulator δ -enthaltender GABA_AR. DS2 zeigte sich in der Elektrophysiologie ebenfalls selektiv für $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren im Vergleich zu $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren, war aber um das zehnfache weniger potent als DS1. Dagegen konnte bei DS2 auch in höherer Dosierung kein direkter Agonismus am Rezeptor festgestellt werden. Bei Untersuchungen an ventrobasalen thalamischen Neuronen konnte auch gezeigt werden, dass DS2 keinen Effekt auf $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ Rezeptoren hatte. 2013 folgte eine weitere Veröffentlichung mit elektrophysiologischen Untersuchungen von DS2 an diversen GABA_AR. In Anwesenheit von GABA konnte dabei nur an δ -enthaltenden Rezeptoren eine Modulation festgestellt werden. Dabei zeigte sich ein Einfluss der α -Untereinheit auf die Effizienz. $\alpha 1\beta 2\delta$ Rezeptoren wurden mit geringerer Potenz und Effizienz moduliert als $\alpha 4/6\beta 2\delta$ Rezeptoren. Die β Untereinheit zeigte keinen bedeutenden Einfluss auf die Effizienz von DS2.¹⁷⁴ Auf der Suche nach der Bindestelle von DS2 wurden zunächst die bekannten Bindestellen am GABA_AR ausgeschlossen. DS2 konnte in Versuchen nicht an der GABA-Bindestelle (keine Verdrängung von [³H]Muscimol), Benzodiazepin-Bindestelle (keine Verdrängung von [³H]Flumazenil und [³H]RO 15-4513), Etomidat-Bindestelle (keine Beeinflussung durch Punktmutation $\beta 2/3N265M$), Neurosteroid-Bindestelle (keine Beeinflussung durch Punktmutationen T235W und Q240W der $\alpha 4$ Untereinheit) oder an der Barbiturat-Bindestelle binden.¹⁷⁴ Im Jahr 2016 folgte dann von Ahring die bis dahin aktuellste Publikation, die Untersuchungen zu DS1 und DS2 enthält. Hier wurde die Selektivität der Substanzen in Frage gestellt. Er verwendete in seinen elektrophysiologischen Experimenten an $\alpha 4\beta 2\delta$ und $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ Rezeptoren nicht wie sonst üblich gleich effiziente GABA-Konzentrationen, sondern solche, bei denen die Offen-Wahrscheinlichkeit des Kanals gleich ist. Damit konnte er zeigen, dass DS1 und DS2 neben $\alpha 4\beta 2\delta$ eben auch $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ Rezeptoren modulierten. Die Potenz und Effizienz beider Liganden war aber an dem δ -enthaltenden Rezeptor höher.¹⁷⁶

1.5 Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Polypeptids dient normalerweise eine Gelelektrophorese in Anwesenheit eines ionischen, starken Detergenz wie SDS oder LDS unter reduzierenden Bedingungen. Die Bindung des Detergenz an das Polypeptid ist nur von dessen Länge abhängig und somit richtet sich das Laufverhalten in der folgenden Gelelektrophorese nur nach der Anzahl der durch das Detergenz vermittelten Ladungen und damit dessen Molekulargewicht. Soll jedoch das Molekulargewicht eines aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzten Polypeptids, wie z.B. das eines GABA_AR ermittelt werden, wird es schwierig, denn die harschen Detergenzien zerstören die nicht-kovalenten Bindungen des Oligomers und zersetzen es in seine Monomere. Eine Analyse des Aufbaus der Rezeptoren, gerade wenn es sich um vermeintliche Rezeptor-Artefakte aus Konkatameren handelt, ist so nicht möglich. Die beiden am weitesten verbreiteten Methoden zur Größenbestimmung von Proteinkomplexen sind Größenausschlussfiltration und

Sedimentationsanalysen in Sucroседichtegradienten. Die Größenbestimmung von löslichen Proteinen ist dabei einfacher und genauer, aber auch die Größe von integralen Membranproteinen wie der GABA_AR können abgeschätzt werden, obwohl hier recht starke Einschränkungen gemacht werden müssen. Beide Methoden können nicht das exakte Molekulargewicht bestimmen, liefern aber Parameter, die mit dem Molekulargewicht korrelieren. Die Größenausschlusschromatographie liefert den Stokes-Radius eines Makromoleküls, während die Sedimentationsanalyse den Sedimentationskoeffizienten S liefert, dessen Einheit die Svedberg Unit ist.

Der Sedimentationskoeffizient in einem gegebenen Medium (m) bei einer bestimmten Temperatur (T) lässt sich über die folgende Formel berechnen: $S_{T,m} = (dr/dt)/\omega^2 r$, wobei r die Distanz ist, die das zu bestimmende Protein während der Zentrifugation zurückgelegt hat, ω die Winkelgeschwindigkeit des Rotors und dr/dt die Sedimentationsgeschwindigkeit des gesuchten Proteins. Die Sedimentationsgeschwindigkeit dr/dt ist bei der zonalen Sucrosegradientenzentrifugation, wie sie auch in dieser Arbeit angewandt wurde, nahezu konstant. Das Molekül wandert also mit fast gleicher Geschwindigkeit durch den Gradienten. Der so ermittelte $S_{T,m}$ -Wert ist, wie bereits erwähnt, abhängig vom Medium des Gradienten und der Temperatur während der Zentrifugation. Um S -Werte zu standardisieren wird traditionell in einen $S_{20,w}$ -Wert umgerechnet. Dieser beschreibt das Sedimentationsverhalten des Moleküls in Wasser bei 20°C. Da der Sedimentationskoeffizient sich aus der Größe und Dichte eines Proteins ergibt, ist auch die Dichte und Viskosität des Gradienten von Bedeutung. Dieser Wert errechnet sich aus der folgenden Formel.

$$S_{20,w} = \frac{dr}{dt} * \frac{\eta_{T,m}}{\eta_{20,w}} * \frac{(\frac{1}{v} - \rho_{20,w})}{(\frac{1}{v} - \rho_{T,m})} * \frac{1}{\omega^2 r}$$

Die Komponenten $\rho_{T,m}$ und $\rho_{20,w}$ sind dabei die Dichten des Mediums m bei der Temperatur T bzw. die von Wasser bei 20°C, $\eta_{T,m}$ und $\eta_{20,w}$ bezeichnet die Viskosität. Der Wert v gibt die partielle spezifische Dichte des Moleküls an. Das partielle spezifische Volumen ist bei den meisten globulären, löslichen Proteinen im Bereich 0,72-0,75 ml/mg und es besteht ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Sedimentationskoeffizient und Molekulargewicht, das Molekulargewicht kann hier einfach durch Extrapolieren ermittelt werden. Asymmetrische Proteine wie integrale Membranproteine in Detergenzien haben dagegen einen verminderten Sedimentationskoeffizienten bei gegebener molekularer Masse. Das Wissen um den Sedimentationskoeffizienten reicht in diesem Fall nicht aus, um das Molekulargewicht zu bestimmen. Es müsste durch Größenausschlusschromatographie zusätzlich der Stokes-Radius des Proteins bestimmt werden. Zusätzlich muss noch das Medium berücksichtigt werden, dabei GABA_AR verschiedene Salze und Salz-Konzentrationen die Sedimentation erheblich beeinflussen.¹⁷⁷ Puffer für den Sucrosegradienten sollten einen neutralen pH und annähernd physiologische Salzkonzentrationen aufweisen, denn Interaktionen mit Pufferkomponenten können die Hydratation des Proteins oder intermolekulare Interaktionen beeinflussen und somit die partielle spezifische Dichte verändern. Bei integralen Membranproteinen

muss unbedingt ein Detergenz zugefügt werden, denn diese müssen aus der Membran herausgelöst und in Lösung gehalten werden. Die Migration solcher Protein-Detergenz Komplexe ist im Vergleich zum reinen Protein verändert, denn das Detergenz verändert die partielle spezifische Dichte, da sie selber meist eine sehr hohe partielle spezifische Dichte besitzen. Um exakte Berechnungen zum Sedimentationskoeffizienten durchführen zu können, müsste neben der genauen Bindung des Detergenz auch die Anzahl der Glykosylierungen bekannt sein, da diese ebenfalls die partielle spezifische Dichte beeinflussen. Zu berücksichtigen ist auch, dass zugefügte Protein-Standards ebenfalls Detergenz binden und sich ihre Sedimentation damit verändern kann. Die Bestimmung eines absoluten $S_{20,w}$ muss aber auch nicht unbedingt immer notwendig sein. Der relative Sedimentationskoeffizient, der sich aus der Kalkulation mit den S-Werten der internen Standards ergibt, kann hinzugezogen werden, um z.B. die Oligomerisation eines Proteins zu bestimmen. (zusammengefasst nach Marks¹⁷⁸)

1.5.1 Sucrosegradientenzentrifugation von konkatameren nAChR

Zhou untersuchte 2003 den Aufbau von konkatameren AChR. Dazu nutzte er verlinkte (β 2- α 4) und (α 4- β 2) Untereinheiten. Transfizierte er die Zweier-Konstrukte mit einer einzelnen Untereinheit, bei beiden Konstrukten war es dabei egal, ob mit einer α 4 oder β 2 Untereinheit, konnte er nach erfolgter Sucrosegradientenzentrifugation einen einzelnen Peak im Bereich von 10S messen. Transfizierte er jedoch die beiden Konstrukte alleine, zeigten sich in der Sucrosegradientenzentrifugation mehrere Peaks, die er mit 13S einem Dipentamer und 9S einem Monopentamer mit heraushängender Untereinheit zuordnete. Er schloss daraus, dass eine Artefakt-Bildung bei der Anwendung von Konkatameren nur erfolgt, wenn sie sich aufgrund fehlender Untereinheiten dazu gezwungen sehen. Er zeigte auch, dass Dipentamere an der Zelloberfläche gefunden werden, während Monopentamere mit einer heraushängenden Untereinheit im Wesentlichen im Zellinneren verbleiben. Beide Artefakt-Formen bilden aber funktionstüchtige AChR. Den reduzierten Sedimentationskoeffizienten von Monopentameren plus heraushängender Untereinheit im Vergleich zu normalen pentameren Rezeptoren erklärte er mit dem erhöhten Widerstand während der Migration durch den Sucrosegradienten. Zhou integrierte in die Gradienten als internen Standard Extrakt von *Torpedo californica*, die als Pentamer einen Sedimentationskoeffizienten von 9S und als Dipentamer einen von 13S besitzen. Da die partielle spezifische Dichte beider AChR im Triton X-100-haltigen Medium gleich sein sollte, kann man die S-Werte der zu untersuchenden Rezeptoren berechnen. Wie die Autoren auf die S-Werte der Standards gekommen sind, ist leider nicht beschrieben.¹⁷⁹

1.5.2 Sucrosegradientenzentrifugation von GABA_AR

Grorrie veröffentlichte 1997 Ergebnisse zum Aufbau von GABA_AR, bei deren Transfektion alternativ die α 1 oder β 2 Untereinheiten benutzt wurden, um die Bildung von Homopentameren zu untersuchen. Dabei stellte er fest, dass einzelne Untereinheiten keine pentameren Strukturen bilden können, sondern bei Analyse der Fraktionen im Western Blot nur Banden im Bereich 5S zu finden waren.¹⁸⁰ Wurde

jedoch $\alpha 1$ und $\beta 2$ Untereinheiten ko-transfiziert, bildete sich ein Pentamer im Bereich von 9S.¹⁸⁰ Als interne Standards verwendete er BSA, Aldolase und Catalase und kalkulierte daraus den S-Wert der gefundenen GABA_AR bzw. Untereinheiten.

1.6 Konkatamer-Strategie

Ligandengesteuerte Ionenkanäle, zu denen auch die Cys-Loop Rezeptoren zählen, sind typischerweise aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. Diese Zusammensetzung kann homomer oder multimer sein. Gerade bei den GABA_AR ergeben sich verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Dies ist für die Diversität der Rezeptoren zwar von Vorteil, erschwert jedoch die Untersuchung ihres Aufbaus. Jedoch scheinen trotz der großen potentiellen Diversität nur einige Anordnungen wirklich gebildet zu werden. In der Zelle liegen also Kontrollmechanismen vor, die die Rezeptoren selektieren und unnatürliche Verbindungen im endoplasmatischen Retikulum zurückhalten.¹⁸¹ Nach Transfektion mehrerer Untereinheiten kann nicht sichergestellt werden, ob und in welcher Stöchiometrie und Abfolge diese in den pentameren Rezeptorkomplex eingebaut werden. Schon früh kam daher die Idee auf, Untereinheiten kovalent zu verbinden und damit eine feste Anordnung und Stöchiometrie zu erzwingen. Verlinkte Untereinheiten werden als Konkatamere bezeichnet.¹⁸¹ Erstmals wurde die Technik durch Isacoff 1990 angewendet und publiziert.¹⁸² Untersucht werden sollte damals der genaue Aufbau von *Shaker* A-Typ K⁺-Kanälen in *Xenopus* Oozyten. Mittlerweile sind Konkatamere für etliche Rezeptoren eingesetzt worden und einige Nachteile dieser Methode entdeckt worden. Konkatamere können z.B. degenerieren, die Linker während oder nach der Translation gekappt werden, eine Untereinheit kann aus dem pentameren Komplex heraushängen oder gar Teil eines zweiten Pentamers werden und so ein Dipentamer bilden.¹⁸¹

Ein wichtiges Thema bei der Kreation von Konkatameren ist die Länge des Linkers. Ein Linker muss so kurz sein, dass die fixe Anordnung eingehalten werden muss und nicht zwischen den verlinkten Untereinheiten noch eine zusätzlich assembliert werden kann.¹⁸¹ Andererseits kann ein zu kurzer Linker auch zu Artefakten führen und den Aufbau des Rezeptors und die Formation von Bindestellen stören. Er sollte also mindestens lang genug sein, dass die Untereinheiten entspannt nebeneinander assemblieren und wie freistehende Untereinheiten agieren zu können.¹⁸¹ Linker unterhalb einer bestimmten Länge werden nicht in Form von funktionstüchtigen Rezeptoren exprimiert.¹⁸³ In früheren Studien wurden vor allem Polyglutamin-Linker verwendet, die den Vorteil von Hydrophilie und dem Fehlen von Sekundärstrukturen besitzen.¹⁸⁴ Neuere Linker des GABA_AR bedienen sich ebenfalls dieses Vorteils, haben aber zusätzlich noch Prolin, Polyalanine und Polyglutamine eingebaut.¹⁸³ Die Länge des Linkers richtet sich nach der Länge der N- und C-terminalen Bereiche der verlinkten Untereinheiten. So fand Baumann für die dualen Konstrukte ($\alpha 1\beta 2$) und ($\beta 2\alpha 1$) heraus, dass ein Linker aus nur 10 Aminosäuren für das Konkatamer ($\alpha 1\beta 2$) ausreicht, ($\beta 2\alpha 1$) aber mindestens 20 bis 23 Aminosäuren im Linker benötigt.¹⁸³

Die Signalsequenzen aller verlinkten Untereinheiten werden mit Ausnahme der ersten C-terminal verlinkten Untereinheit entfernt, denn Signalpeptide werden abgespalten, auch wenn sie im Inneren der Aminosäuresequenz liegen. Die abgetrennten Untereinheiten könnten dann wiederum Artefakte bilden.¹⁸¹

Um die Reihenfolge der Assemblierung von Konkatameren zu untersuchen, wurde sowohl ($\alpha 1\beta 2$) als auch ($\beta 2\alpha 1$) in Anwesenheit einer freien $\gamma 2$ Untereinheit transfiziert und auf eine Benzodiazepin-Bindestelle getestet.¹⁸³ Beide Konkatamere konnten diese bilden, allerdings zeigten Untersuchungen, dass die Expression von ($\alpha 1\beta 2$) $\gamma 2$ mit einer viel geringeren Effizienz erfolgte und entsprechend wird vermutet, dass es für ein duales Konstrukt energetisch günstiger ist sich gegen den Uhrzeigersinn zu assemblieren.¹⁸³ Ericksen fand 2007 in Modellversuchen mit verschiedenen GABA_AR Konkatameren keine signifikante energetische Beeinträchtigung der einen oder anderen Assemblierung (im oder gegen den Uhrzeigersinn).¹⁸¹ Auch Zweier-Konstrukte, die ohne zusätzliche Untereinheit transfiziert werden bilden funktionstüchtige Rezeptoren,¹⁸⁵ was bereits vermuten lässt, dass die Anwendung von Konkatameren und die Interpretation der Ergebnisse schwierig ist. Die Erfahrung, dass einzelne Konstrukte auch ohne Anwesenheit eines weiteren geeigneten Konkatamers oder einzelner Untereinheiten pentamere GABA_AR bilden können, trägt zur Unsicherheit dieser Methode bei. Vermutet wird bei Zweier- und Dreier-Konstrukten die Bildung eines Pentamers, bei dem entweder eine Untereinheit herausragt, oder aber Teil eines Dipentamers ist.¹⁸¹ Bisherige Experimente lassen jedoch vermuten, dass ein Konkatamer, das mit dem entsprechenden Gegenstück transfiziert wird, dieses auch einbaut.¹⁷⁹

1.6.1 Konkatamere δ -enthaltender GABA_AR

Mithilfe konkatamerer Rezeptoren fand die Arbeitsgruppe um Baumann heraus, dass $\gamma 2$ -enthaltende Rezeptoren, jedenfalls in Kombination mit den $\alpha 1$ und $\beta 2$ Untereinheiten, in der Reihenfolge $\gamma 2\beta 2\alpha 1\beta 2\alpha 1$ (gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet) assemblieren.¹¹

Die Zusammensetzung δ -enthaltender GABA_AR scheint dagegen komplexer zu sein. Die Gruppe um Sigel veröffentlichte mehrere Publikationen zum diesem Thema, wobei die Wahl der α -Untereinheit variierte. Die erste Publikation befasste sich mit den $\alpha 1\beta 3\delta$ Rezeptoren. ($\alpha 1\beta 3\alpha 1$)($\beta 3\delta$) und ($\beta 3\alpha 1\delta$)($\alpha 1\beta 3$) Rezeptoren zeigten in elektrophysiologischen Untersuchungen die größte Ähnlichkeit mit $\alpha 1\beta 3\delta$ Rezeptoren, ($\alpha 1\beta 3\alpha 1$)($\beta 3\delta$) Rezeptoren allerdings erst nach zusätzlicher Zugabe des Neurosteroids THDOC.¹⁴ Aber auch ($\beta 3\alpha 1\delta$)($\beta 3\alpha 1$) und ($\beta 3\delta\beta 3$)($\beta 3\alpha 1$) Rezeptoren waren in der Lage, Ströme in Anwesenheit von GABA zu erzeugen.¹⁴ Hierbei zeigte sich nicht nur, dass es überraschenderweise mehr als eine Anordnung für $\alpha 1\beta 3\delta$ Rezeptoren geben kann, sondern auch, dass die Annahme, die δ -Untereinheit würde die $\gamma 2$ Untereinheit in der klassischen Assemblierung ersetzen, eher unwahrscheinlich ist. Noch im selben Jahr untersuchte Baur den Aufbau von $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_AR, wobei ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Wieder ergaben verschiedene Assemblierungen, nämlich ($\beta 3\alpha 6\delta$)($\alpha 6\beta 3$), ($\alpha 6\beta 3\alpha 6$)($\beta 3\delta$), ($\beta 3\delta\beta 3$)($\alpha 6\beta 3$) Ströme in Anwesenheit von GABA und THDOC. Der

konkatamere Rezeptor ($\alpha 6\beta 3\alpha 6$) δ lieferte Ströme auch in Abwesenheit von GABA. Diese Form des Rezeptors müsste dann auch zwei δ -Untereinheiten beinhalten. GABA_AR, die die δ -Untereinheit enthalten, scheinen also nicht nur in der Reihenfolge der Untereinheiten flexibler zu sein, sondern auch in der Anzahl der δ -Untereinheiten pro Rezeptor-Pentamer.¹³ 2010 erschien aus der Arbeitsgruppe die dritte Publikation zum Thema Assemblierung konkatamerer, δ -enthaltender GABA_AR. Untersucht wurde dabei der Aufbau in Kombination von $\alpha 1$ und $\alpha 6$ Untereinheiten. ($\beta 3\alpha 1\delta$)($\alpha 6\beta 3$), ($\beta 3\alpha 6\delta$)($\alpha 1\beta 3$), ($\alpha 6\beta 3\alpha 1$)($\beta 3\delta$) und ($\beta 3\alpha 6\delta$)($\beta 3\alpha 1$) lieferten Ströme in Anwesenheit von GABA und zeigten wieder, dass die δ -Untereinheit eventuell verschiedene Positionen im Pentamer einnehmen kann.¹⁸⁶ Dies scheint unabhängig von der α Untereinheit zu sein. Die bevorzugte Position scheint jedoch in Kombinationen mit $\alpha 1$, $\alpha 6$ oder $\alpha 1/6$ die zwischen zwei α Untereinheiten zu sein.¹⁸⁶

2 Ziele

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Aufbaus und der Funktion δ -enthaltender GABA_AR. Der genaue Aufbau ist bis heute nicht geklärt. Zu Beginn der Doktorarbeit standen dabei zwei große Ziele im Raum. Zum einen sollten mithilfe der Affinitätschromatographie selektiv δ -enthaltende, native GABA_AR aus Hirnproben von Mäusen oder Ratten gewonnen werden. Diese aufgereinigten Rezeptoren sollten mit rekombinanten Rezeptoren aus der Zellkultur verglichen werden. Da auch die genaue Zusammensetzung rekombinanter Rezeptoren aus einzeln transfizierten Untereinheiten nicht bekannt ist, musste die Abfolge der Untereinheiten im Pentamer festgelegt werden. Eine Methode, dies zu erreichen, ist die Möglichkeit, Untereinheiten bereits auf DNA-Ebene zu verknüpfen. Kovalent durch eine kurze Aminosäurekette verbunden sind die Untereinheiten, jedenfalls theoretisch, dazu gezwungen, eine bestimmte Reihenfolge im pentameren Rezeptorkomplex einzunehmen. Solche multimeren, kovalent verbundenen Untereinheiten werden als Konkatomere bezeichnet. Zu Beginn der Arbeit wurden zahlreiche dieser Konkatomere erstellt, die aus zwei oder drei verlinkten Untereinheiten bestanden. Später wurden etliche Konkatomere aus vier oder fünf verlinkten Untereinheiten erstellt. Ziel war es, einen rekombinanten GABA_AR aus Konkatomeren zu finden, der robuste Bindungswerte in radioaktiven Liganden-Bindungsstudien lieferte und mit nativen, δ -enthaltenden (aus der Affinitätschromatographie gewonnenen) Rezeptoren verglichen werden konnte. Zur Aufreinigung nativen Materials in der Affinitätschromatographie sollte ein δ -selektiver Ligand dienen. Leitstruktur dieses selektiven Liganden waren die Moleküle DS1 und DS2. Eine ausgedehnte SAR-Studie in Kooperation mit der Medizinischen Chemie im Institut für Pharmazie und zwei weiteren Instituten sollte Erkenntnis über essentielle Bindungsbereiche der Leitstrukturen bringen. An einen für Bindung und Sensitivität unbedeutenden Bereich sollte eine Kohlenstoffkette angehängt werden, die über eine Aminogruppe mit dem Säulenmaterial hätte gekoppelt werden können.

Im Verlauf der Arbeit ergaben sich dann weitere Ziele. Die ausgeprägte Bildung von Artefakten bei der Untersuchung der Konkatomere machte es unabdingbar, dieses Phänomen zumindest ansatzweise näher zu untersuchen. Eine Möglichkeit der Ausbildung von scheinbar intakten Rezeptoren ist die Degradation der Linker. Daher wurden von allen hergestellten Konkatomere Western Blots angefertigt. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung von Rezeptoren, die von der pentameren Struktur abweichen, vorstellbare Konstrukte waren z.B. ein Pentamer mit einer zusätzlichen heraushängenden Untereinheit, ein Tetramer, ein Hexamer oder ein Dipentamer. Um dies zu erforschen wurde die Methode der Dichtegradientenzentrifugation etabliert, die es ermöglicht, im Dichtegradienten native Proteine voneinander zu trennen. Ein weiterer Punkt war die Untersuchung der Assemblierungsrichtung von Konkatomeren. Bei der Untersuchung der DS-Derivate ergaben sich ebenfalls zusätzliche Fragen, die genauer erforscht wurden. Dazu gehörte die Untersuchung der Bindestelle einiger Substanzen, die durch Herstellung chimärer Untereinheiten eingegrenzt werden

konnte, ebenso wie die Bindung an Membranen des Cerebellums wildtypischer und δ^- - Mäuse und die Frage einer möglichen irreversiblen Bindung der Substanzen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tab. 2: Chemikalien

Substanz	Hersteller
4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz	Roth (4165.1)
6-Aminocapronsäure	Sigma
Acrylamid (30% Acrylamid/Bis Solution 29:1)	Bio-Rad
Agar	BD
Agarose	Lonza
Aldolase	Sigma (A8811-100UN)
Alkalische Phosphatase	Sigma (P7923-2KU)
Amidoschwarz	Serva
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	GERBU Trading
Antarctic Phosphatase	NEB
AquaSafe 300 Plus	Zinsser Analytik
Bovines Serum Albumin	Sigma (A4503-100G)
Bradford Reagenz (Roti-Quant) 5x	Roth
Brilliant Blue R	Sigma
Calciumchlorid	Fluka
Carbenicillin	Applichem
Cäsiumchlorid	Sigma
Catalase	Sigma (C9322-1G)
Chaps	Sigma
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsufoxid	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck/Roth
DNA Leiter 1kb peqGOLD	Peqlab
dNTPs (10 mM)	NEB
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
ECL Reagenz Western Bright Sirius	Advansta
EDTA	Sigma
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Roth
Ethanol	Roth

Substanz	Hersteller
Ethidiumbromid Lösung (10 mg/ml)	Sigma
FBS (Fetal bovine serum)	Gibco
Gel Loading Dye, Purple 6x	NEB
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
Hämoglobin	Sigma (H2625-25G)
Hefeextrakt	BD
HEPES	Roth
Imidazol	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
L-Glutamin (200 mM)	Sigma
Ligase (T4 DNA Ligase)	Thermo Fisher (EL0014)
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Merck
MEM (Minimum essential medium)	Gibco
Methanol	Roth
Milchpulver	Applichem
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
NHS-Fluorescein	Thermo Fisher (46410)
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma (D8537-500ML)
Penicillin (10000 Units/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma
Phosphorsäure	Merck
Polyethylenimin Lösung	Sigma
ProSieve Ex Running Puffer 10x	Lonza
ProSieve Ex Western Blot Transfer Puffer 10x	Lonza
ProSieve QuadColor Protein Marker (4,6 – 300 kDa)	Lonza

Substanz	Hersteller
Proteaseinhibitor Tabletten (complete mini)	Roche
Restriktionsenzyme	NEB
RNase A	Quiagen
RotiLoad 3 4x	Roth
Rotiphorese (40% Acrylamid/Bis Solution 37,5:1)	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure, rauchend	Merck
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin)	Sigma
T4 Polynucleotide Kinase	Thermo Fisher
TEMED	Sigma
Tricin	Roth
Tris	Roth
Tris-ATP	Sigma
Triton X 100	Sigma
Trypton	BD
Tween 20	Roth
WesternBright ChemiPen	Advansta
Zitronensäure	Merck

Tab. 3: Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
0,5 M Na ₂ -EDTA	84,06 g Na ₂ -EDTA in 500 ml H ₂ O, pH=8,0 mit NaOH
Amidoschwarz Färbelösung	0,5% Amidoschwarz in 50% Methanol und 10% Eisessig
Blocking Reagenz	0,5 g Milchpulver in 100 ml TBST
Calciumchlorid Lösung 2,5 M	109,54 g CaCl ₂ *6H ₂ O in 200 ml H ₂ O
Cäsiumchlorid Lösung	90 g CsCl, 90 ml TE Puffer
Coomassie Blue Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R in 450 ml Methanol, 100 ml Eisessig, 400 ml H ₂ O
Entfärbelösung	20% Methanol, 10% Eisessig in H ₂ O
Gradientenpuffer	KCl 0,2 M, Na ₂ -EDTA 1 mM, 0,1% Sarkoysl, Sucrose 5% bzw. 20% in 50 mM Tris/Citrat Puffer, pH=7,5
HBS 2x	8 g NaCl, 0,2 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 6,5 g HE PES in 500 ml H ₂ O, pH=7,0 mit NaOH
Kulturmedium HEK293 Zellen	500 ml MEM + 50 ml FBS + 5 ml Glutamin + 5 ml Pen./Strep.

Lösung	Zusammensetzung
LB Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 l H ₂ O, pH=7,0 mit NaOH
LB-Agar	1 l LB Medium + 15 g Agar
Lösung 1 (Plasmid-Präp.)	50 mM Glucose in 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Lösung 2 (Plasmid-Präp.)	1% SDS in 0,2 M NaOH
Lösung 3 (Plasmid-Präp.)	600 ml 5 M Kaliumacetat-Lösung, 115 ml Eisessig, 285 ml H ₂ O
NaCl-gesättigtes Isopropanol	100 ml NaCl gesättigtes H ₂ O + 300 ml Isopropanol, kräftig schütteln
Salzlösung Zellkultur	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, pH=7,4-7,5 mit HCl
Sammelgelpuffer 5x	0,3 M Tris, 0,25% SDS, pH=6,7 mit Phosphorsäure
SOB Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, 10 ml 1 M MgCl ₂ in 1 l H ₂ O, pH=7,0 mit NaOH
SOC Medium	980 ml SOB Medium + 20 ml 1 M Glucose
Solubilisierungspuffer	KCl 0,2 M, Na ₂ -EDTA 1 mM, Glycerol 6%, Protease-Inhibitoren in 50 mM Tris/Citrat Puffer, pH=7,5
TAE Puffer	242 g Tris, 0,5 M Na ₂ -EDTA (pH 8,0), 57,1 ml Eisessig in 1 l H ₂ O
TB Medium	(a) 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin in 900 ml H ₂ O (b) 0,17 M KH ₂ PO ₄ , 0,72 M K ₂ HPO ₄ 900 ml (a) + 100 ml (b)
TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl in H ₂ O, pH=7,5 mit HCl
TBST	1 l TBS Puffer + 1 ml Tween 20
TE Puffer 100x	1 M Tris-HCl, 0,1 M Na ₂ -EDTA, pH=7,5 mit HCl
Transformationspuffer	10 mM Pipes, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl in H ₂ O, pH=6,7-6,8 mit KOH, anschließend 55 mM MnCl ₂ zugeben
Trenngelpuffer 2,5x	1,875 M Tris, 0,25% SDS, pH=8,9 mit HCl
Tris/Citrat Puffer 1 M	121,1 g Tris in 1 l H ₂ O, pH=7,5 mit Zitronensäure
Tris/HCl Puffer 1 M	121,1 g Tris in 1 l H ₂ O, pH=7,5 mit HCl

Tab. 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Airfuge Ultracentrifuge	Beckman
Analysenwaage Quintix 124	Sartorius
Biofuge 13	Heraeus
Brutschrank Forma Steri-Cult CO ₂ Incubator	Thermo Scientific
Brutschrank Modell 500	Memmert
C-Digit Scanner	Licor
Dispenser	Eppendorf
Drucker Mitsubishi P91	Mitsubishi

Gerät	Hersteller
Fraktionierer LKB RediFrac	Pharmacia
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
Harvester M-24	Brandel
Heizblock DRI-BLOCK DB-2D	Techne
Incubator Shaker innova 4300	New Brunswick Scientific
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter	Beckman
Mastercycler gradient	Eppendorf
Megafuge 1.0R	Heraeus
Mikroskop IX50	Olympus
Mini-Protean II Electrophoresis Cell	Bio-Rad
NanoDrop ND-1000	Peqlab
Optima L-70K Ultracentrifuge	Beckman
ph-Elektrode SenTix Plus	WTW
pH-Meter pH526	WTW
Pipetten, diverse	Eppendorf, Gilson
PowerPAC 3000	Bio-Rad
Schüttler 3013	GFL
Schüttler KS250 basic	IKA Labortechnik
Schüttler Mini Rocker-Shaker PMR-30	Grant
SonoPlus HD 2070	Bandelin
Sorvall RC5B Plus	Sorvall
Sprout Minizentrifuge	Biozym
SterilCARD Class II Type A/B3	Baker Company
Thermomixer comfort	Eppendorf
Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell	Bio-Rad
Überkopfschüttler 3025	GFL
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel
Ultraschallbad Transsonic 460/H	Faust Elma
UV Kasten N90	Konrad Benda
UV/Vis Spectrometer Lambda Bio	Perkin Elmer
Waage BP2100S	Sartorius
Wasserbad 1083	GFL

Tab. 5: Rotoren

Rotor	Hersteller
SS-34	Sorvall
SM24	Sorvall
SLA1500	Sorvall
SW27	Beckman
VTI65.1	Beckman
VTI50	Beckman
70.1 Ti	Beckman

Tab. 6: Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Hersteller
1,5/2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
6-well Platten Nunclon Delta	Thermo Scientific
Agarschalen 100*20 mm	Sarstedt
Bakterienkulturröhrchen 14 ml	Greiner Bio-One
CombiTips advanced	Eppendorf
Extra Thick Blotting Paper	Thermo Scientific
Falkon Reaktionsgefäße 15/50 ml	Greiner Bio-One
Glasfaserfilter GF/C	GE Healthcare
Immobilon-P Membran PVDF	Millipore
Kanülen 1,10*40mm	BD
Küvetten, Halbmikro, PS	Ratiolab
Messpipetten	Greiner Bio-One
OptiSeal Zentrifugenröhrchen	Beckman
PCR Reaktionsgefäße	Sarstedt
Pipettenspitzen, diverse	Brand, Eppendorf
Zählfläschchen 6 ml Minis 2000	Zinsser Analytik
Zellkulturflaschen 550 ml	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen 145*20 mm	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen Airfuge	Beckman
Zentrifugenröhrchen Thinwall Polypropylen	Beckman

Tab. 7: Verwendete primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Untereinheit	Verdünnung	Hersteller
GABA _A Rβ3 (D-12) sc-376252 Maus monoklonal	β3	1:5000	Santa Cruz
GABA _A Rβ2/3 62-3G1	β2/3	1:5000	Millipore
GABA _A Rδ AB5643 Kaninchen polyklonal	δ	1:1000	Chemicon
GABA _A Rα6 (B-22) sc-135680 Kaninchen polyklonal	α6	1:2500	Santa Cruz
GABA _A Rα1 (B-22) sc-135680 Kaninchen polyklonal	α1	1:2500	Chemicon
GABA _A bd-28	sämtliche	1:500	Gabe Hanns Möhler

Tab. 8: Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus HRP gekoppelt P0447 Ziege	1:10000	DAKO
Anti-Kaninchen HRP gekoppelt P0448 Schwein	1:10000	DAKO

Tab. 9: Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
NucleoSpin Plasmid EasyPure	Plasmidpräparation in kleinem Maßstab	Macherey-Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	DNA Extraktion aus PCR-Ansätzen und Gelstücken	Macherey-Nagel
NucleoBond Xtra Maxi	Plasmidpräparation aus max. 2,25 g Bakterien	Macherey-Nagel
NucleoBond Xtra Midi	Plasmidpräparation aus max. 0,75 g Bakterien	Macherey-Nagel
FastPlasmid Mini Kit	Plasmidpräparation in kleinem Maßstab	5Prime
Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	DNA Extraktion aus PCR-Ansätzen und Gelstücken	Promega
Plasmid Mini Kit	Plasmidpräparation in kleinem Maßstab	Quiagen
QIAQuick Gel Extraction Kit	DNA Extraktion aus PCR-Ansätzen und Gelstücken	Quiagen

Tab. 10: Substanzen für Bindungsstudien

Substanz	Hersteller	Konzentration	Lösungsmittel
GABA	Sigma	10 mM	Tris/Citrat 50 mM
DS-Derivate	AG Schirmeister/Rösch/Frølund	10 mM	DMSO
Diazepam	Sigma-Aldrich	40 mM	Ethanol
Bretazenil	Roche	100 mM	Ethanol
EBOB	Laborbestand	20 mM	Ethanol
Flumazenil	Sigma-Aldrich	10 mM	Ethanol
RO15-4513	Laborbestand	10 mM	Ethanol
Muscimol	Laborbestand	10 mM	Ethanol

Tab. 11: Radioaktive Liganden für Bindungsstudien

[³ H]Ligand	Bindestelle	Hersteller
[³ H]Ethynylbicycloorthobenzoate ([³ H]EBOB)	Kanalpore	Perkin Elmer
[³ H]Muscimol	GABA Bindestelle	Perkin Elmer
[³ H]RO15-4513	Benzodiazepin Bindestelle	Perkin Elmer

Tab. 12: Verwendete Polymerase

Polymerase	Hersteller
Phusion High Fidelity Polymerase	NEB

Tab. 13: Primer

Nr.	Primer	Sequenz
1	pRK 3' seq	AGCTGCAATAAACAAGTTGG
2	pRK 5' seq	TCCACTTTGCCTTTCTCTCC
3	b3_delta fw	GCAATTTAAATCAAGCTCAGCAACAGGGCC AAGCAGCTAATGGCCAGCCGCACCATGGCG
4	g2/d_b3 bw	CTGGCGCGCCAGCGCTGTTCTGTTCTGCATT GCGGCCGCCACCG
5	a1_TPDFFFH_fw	ACTCCAGATACATTTTTCCAC
6	a1_LMASKIW_bw	CCAGATTTTACTGGCCATCAG
7	a6_TPDFFFH_fw	ACTCCGGACACATTTTTCCGA
8	a6_LMVSKIW_bw	CCAGATCTTACTGACCATCAA
9	a1_YTIDVFF_fw	TATACAATAGATGTGTTTTTCCGC
10	a1_VSDHDME_bw	TTCCATATCGTGGTCTGACAC

Nr.	Primer	Sequenz
11	a6_YTMDVFF_fw	TACACAATGGATGTTTTCTTC
12	a6_VSDVEME_bw	CTCCATCTCCACATCTGACAC
13	a1_LKFKGPM_fw	TTAAAATTCAAAGGCCCATG
14	a1_QSWKDER_bw	TCTTTCATCCTTCCAGCTTTG
15	a6_LKFKGPA_fw	CTGAAGTTCAAAGGCCCTGCT
16	a6_QTWTDER_bw	CCTTCTCATCAGTCCATGTCTG
17	g2_FRNSKKA_fw	TTCAGGAACTCCAAAAAAGCG
18	g2_IWIPDTF_bw	GAAAGTGTCTGGAATCCAGAT
19	d_IVNAKSA_fw	ATTGTGAATGCCAAGTCTGCC
20	d_LWLPTDF_bw	GAAGGTGTCAGGGAGCCACAG
21	a1_GFGGAVT_fw	GAGACCAGGCTTCGGAGGGGCCGTAAGTGA AGTG
22	a1_GFGGAVT_bw	CACTTCAGTTACGGCCCCTCCGAAGCCTGGT CTCAG
23	a6_GLGERVT_fw	GTCTACGGCCGGGACTGGGAGAGCGCGTAA CAGAGGTC
24	a6_GLGERVT_bw	GACCTCTGTTACGCGCTCTCCCAGTCCCGGC CGTAG
25	a1_VSDVEME_fw	GGACCCGTGTCAGACGTGGAGATGGAATAT ACA
26	a1_VSDVEME_bw	ATTGTATATTCCATCTCCACGTCTGACACGG G
27	a6_VSDHDME_fw	GGGCCTGTGTCAGATCACGACATGGAGTAC ACA
28	a6_VSDHDME_bw	ATTGTGTACTCCATGTCGTGATCTGACACAG G

Tab. 14: Erstellte Konkamere

Plasmid	Vektor	Insert	Enzyme
($\beta 3\delta\beta 3$)	($\beta 3\alpha 6\beta 3$)	PCR (3, 4) pRK5($\delta\alpha 1$)	SwaI, BssHII
($\alpha 1\delta\alpha 1$)	($\alpha 1\delta$)	($\delta\alpha 1$)	EcoRV, PstI
($\alpha 1\delta\beta 3$)	($\alpha 1\delta$)	($\beta 3\delta\beta 3$)	EcoRV, PstI
($\beta 3\alpha 1\delta$)	($\beta 3\alpha 1\gamma 2$)	($\alpha 1\delta$)	BssHII, KpnI
($\beta 3\alpha 6\delta$)	($\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	($\alpha 6\delta$)	BssHII, KpnI
($\alpha 6\delta\beta 3$)	($\alpha 1\delta\beta 3$)	($\alpha 6\beta 3$)	NdeI, AscI
($\alpha 6\delta$)	($\alpha 1\delta$)	($\alpha 6\beta 3$)	NdeI, AscI
($\beta 3\delta$)	($\beta 3\delta\beta 3$)	pRK5- δ	EcoRV, PstI
($\delta\beta 3$)	pRK5- δ	($\beta 3\delta\beta 3$)	EcoRV, PstI

Plasmid	Vektor	Insert	Enzyme
($\beta 3\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6$)	($\alpha 1\beta 3\alpha 6$)	($\beta 3\gamma 2\alpha 1$)	AlwNI, PmeI
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$)	($\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	($\alpha 6\beta 3$)	KpnI, EcoRV
($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	($\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	($\beta 3\alpha 6$)	EcoRV, PstI
($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$)	($\alpha 6\beta 3\alpha 1$)	($\alpha 1\gamma 2$)	StuI, PmeI
($\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6$)	($\alpha 1\beta 3\alpha 6$)	($\gamma 2\alpha 1$)	PmeI, SpeI
($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	($\alpha 6\gamma 2$)	BglII, StuI
($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$)	($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	($\alpha 6\delta$)	BglII, Acc65I
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	($\alpha 6\beta 3$)	BglII, NdeI
($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$)	($\alpha 6\beta 3\gamma 2$)	($\beta 3\alpha 6$)	BglII, NdeI
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$)	($\alpha 6\beta 3\gamma 2$)	($\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	BglII, NdeI
($\alpha 6\beta 3\gamma 2$)	($\beta 3\gamma 2$)	($\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	NotI, NdeI
($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	($\alpha 1\beta 3\alpha 6$)	($\alpha 6\gamma 2$)	StuI, BglII
($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$)	($\beta 3\alpha 6\beta 3$)	($\delta\beta 3$)	SalI, NdeI
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$)	($\beta 3\alpha 6\delta$)	($\alpha 6\beta 3$)	SalI, NdeI
($\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3$)	($\gamma 2\beta 3\alpha 1$)	($\alpha 1\beta 3$)	Bsu36I, StuI

Alle klonierten Konkatameren befanden sich in pRK5r Vektoren

Tab. 15: Erstellte Chimären

Plasmid	Primer	Ausgangs-Plasmide
$\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6$	2, 6 1, 7	pRK5- $\alpha 1$ rat (N-terminales Fragment) pRK5- $\alpha 6$ rat
$\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1$	2, 8 1, 5	pRK5- $\alpha 6$ rat (N-terminales Fragment) pRK5- $\alpha 1$ rat
$\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6$	2, 10 1, 11	pRK5- $\alpha 1$ rat (N-terminales Fragment) pRK5- $\alpha 6$ rat
$\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1$	2, 12 1, 9	pRK5- $\alpha 6$ rat (N-terminales Fragment) pRK5- $\alpha 1$ rat
$\alpha 1$ QSWKDER $\alpha 6$	2, 14 1, 15	pRK5- $\alpha 1$ rat (N-terminales Fragment) pRK5- $\alpha 6$ rat
$\alpha 6$ QWTWDER $\alpha 1$	2, 16 1, 13	pRK5- $\alpha 6$ rat (N-terminales Fragment) pRK5- $\alpha 1$ rat
$\gamma 2$ IWIPDTF δ	2, 18 1, 19	pRK5- $\gamma 2$ short rat (N-terminales Fragment) pRK5- δ rat
δ LWLPDTF $\gamma 2$	2, 20 1, 17	pRK5- δ rat (N-terminales Fragment) pRK5- $\gamma 2$ short rat

Alle klonierten Chimären befanden sich in pRK5r Vektoren

Tab. 16: Durch Umklonierung erstellte Chimären

Plasmid	Vektor	Insert	Enzyme
$\alpha 6$ VSDVEME- $\alpha 1$ Bsu36I- $\alpha 6$	$\alpha 6$ VSDVEME- $\alpha 1$	$\alpha 6$ MluI- $\alpha 1$ Bsu36I- $\alpha 6$	Kpn I / Bsu36 I
$\alpha 6$ LMVSKIW- $\alpha 1$ Bsu36I- $\alpha 6$	$\alpha 6$ LMVSKIW- $\alpha 1$	$\alpha 6$ MluI- $\alpha 1$ Bsu36I- $\alpha 6$	Acc65 I / Bsu36 I
$\alpha 1$ VSDHDME- $\alpha 6$ LMVSKIW- $\alpha 1$	$\alpha 1$ VSDHDME- $\alpha 6$	$\alpha 6$ LMVSKIW- $\alpha 1$	Bgl II / Acc65 I
$\alpha 6$ VSDVEME- $\alpha 1$ LMASKIW- $\alpha 6$	$\alpha 6$ VSDVEME- $\alpha 1$	$\alpha 1$ LMASKIW- $\alpha 6$	Msc I / Acc65 I
$\alpha 6$ MluI- $\alpha 1$	$\alpha 6$ MluI- $\alpha 1$ Bsu36I- $\alpha 6$	pRK5- $\alpha 1$ rat	Mlu I / Acc65 I

Alle klonierten Chimären befanden sich in pRK5r Vektoren

Tab. 17: Erstellte Mehrfach-Punktmutanten

Plasmid	Primer	Ausgangs-Plasmid
$\alpha 1$ VSDVEME	25, 26	pRK5- $\alpha 1$ rat
$\alpha 6$ VSDHDME	27, 28	pRK5- $\alpha 6$ rat
$\alpha 1$ GFGGAVT	21, 22	pRK5- $\alpha 1$ rat
$\alpha 6$ GLGERVT	23, 24	pRK5- $\alpha 6$ rat

Alle klonierten Chimären befanden sich in pRK5r Vektoren

Tab. 18: Verwendete Vektoren aus dem Laborbestand

Plasmid	$\mu\text{g pro Platte (143 cm}^2\text{)}$	$\mu\text{g pro 6-well (9,6 cm}^2\text{)}$
pRK5- $\alpha 1$ rat	2,5	0,167
pRK7-a2 rat	6	
pRK5-a3 rat	1,5	
pRK5-a4-short rat	12,5	
pRK7-a5 rat	1	
pRK5-a6 rat	2,5	0,167
pRK7-b1 rat	1,5	
pRK5-b2 rat	12,5	
pRK5-b3 rat	0,5	0,033
pRK5-g2-short rat	0,375	0,025
pRK5-d rat	2,5	0,167
pRK5-Konkatamere rat	12,5	0,833

Tab. 19: Verwendete Konkatomere aus dem Laborbestand

Vektor
pRK5-r($\beta 2\alpha 6$)
pRK5-r($\beta 3\alpha 6\beta 3$)
pRK5-r($\beta 3\alpha 1\beta 3$)
pRK5-r($\beta 1\alpha 6$)
pRK5-r($\beta 2\alpha 6\beta 2$)
pRK5-r($\alpha 1\beta 3\alpha 6$)
pRK5-r($\alpha 6\beta 3\alpha 1$)
pRK5-r($\alpha 6\beta 3$)
pRK5-r($\alpha 6\beta 1$)
pRK5-r($\beta 3\alpha 6$)
pRK5-r($\beta 3\alpha 1$)
pRK5-r($\alpha 1\delta$)
pRK5-r($\beta 3\alpha 4\beta 3$)
pRK5-rC1
pRK5-rC2
pRK5-rC4
pRK5-r $\alpha 6$ -61
pRK5-r $\gamma 2$ -N-term- δ -C-term
pRK5-r δ -N-term- $\gamma 2$ -C-term
pRK5-r $\alpha 1$ Arg101
pRK5-r $\alpha 6$ His100

Die aufgelisteten Vektoren befanden sich bereits im Laborbestand und wurden zur Erstellung dieser Arbeit verwendet.

Tab. 20: Software

Software	Verwendung	Hersteller
Microsoft Office	Textverarbeitung	Microsoft
Image Studio Lite 3.1	Bearbeitung Western Blot Scans	Licor
Prism 6	Datenanalyse Statistik	Graph Pad
SeqScanner 2.0	Auswertung Sequenzierung	Applied Biosystems
SnapGene	Klonierung	GSL Biotech
EndNote	Zitieren	Clarivate Analytics
NEBicalculator	Annealing Temperatur der Primer	NEB

3.2 Proteinbiochemie

3.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode. Verwendet wurde das 5x Konzentrat von BioRad bzw. Roth. Die Eichgerade wurde für beide Reagenzien mit BSA bestimmt und kam bei der Berechnung des Proteingehalts zum Einsatz. Für das Reagenz von Roth ergab sich die Gleichung $y = 36,32 \cdot x + 0,1015$ und bei BioRad war es $y = 20,531 \cdot x + 0,591$. Es wurden dabei 10 μl der Proteinsuspension mit 790 μl Wasser und 200 μl 5x Konzentrat in einer Küvette vereinigt, gemischt und 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.2.2 Solubilisierung membranständiger Proteine mittels LDS für SDS-PAGE

Transfizierte HEK293 Zellen wurden 24 h nach Transfektion gewaschen und nach 48 h geerntet. Dazu wurde das Medium der auf 6-well Platten wachsenden Zellen vorsichtig abgesaugt und mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers in 1 ml kaltem PBS vom Plattenboden abgelöst und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 350 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 0,5 ml Tris/Citrat Puffer 50 mM mit zugesetzten Protease-Inhibitoren resuspendiert und die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen (10 Pulse bei 50% Power). Die DNA wurde dabei durch einwirkende Scherkräfte in kleine Fragmente zerlegt und konnte somit bei späterer Solubilisierung mit LDS nicht mehr zu einer Schleimbildung führen. Die Zellfragmente wurden anschließend bei 20000 g, 4 °C für 30 min zentrifugiert, um lösliche Proteine zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 100 μl Tris/Citrat Puffer 50 mM mit zugesetzten Protease-Inhibitoren mit 2-3 Ultraschallimpulsen (Power 50%) resuspendiert. Es wurden 39 μl der Suspension entnommen und 6 μl 1 M DTT sowie 15 μl Roti-Load3 4x ergänzt. Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C erhitzt und anschließend 10 min in der Airfuge bei 126000 g (Luftdruck: 152 kPa) abzentrifugiert, um zu gewährleisten, dass nur solubilierte Proteine auf das SDS-Gel aufgetragen wurden und keine suspendierten Proteine die Taschen verstopfen konnten. Roti-Load3 enthält Lithiumdodecylsulfat (LDS) statt Natriumdodecylsulfat (SDS), das den Vorteil einer höheren Löslichkeit in Wasser besitzt und damit eine Elektrophorese bei 4 °C ermöglicht. Roti-Load3 enthält noch keine reduzierenden Zusätze und daher wurde DTT zu einer Endkonzentration von 100 mM ergänzt. LDS ist in der Lage durch seine amphotere Struktur die Proteine aus der hydrophoben Membran herauszulösen, zu denaturieren und an der Oberfläche des Proteins sitzend durch sein hydrophiles Ende eine Löslichkeit zu gewährleisten. LDS bindet die meisten Proteine im Verhältnis 1,4 g LDS/g Protein, woraus ein konstantes Ladungs- zu Masse-Verhältnis resultiert. Durch DTT werden Disulfidbrücken in der Quartärstruktur gespalten, sodass die Denaturierung und damit die Begradigung der Proteinstruktur gewährleistet wird. Da das Ladungs- zu Masse-Verhältnis immer gleich ist und die Proteine in denaturierter Form vorliegen, wandern sie unabhängig von ihrer

Eigenladung oder ursprünglichen Quartärstruktur nur aufgrund ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld.

3.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde die Apparatur BioRad Mini Protean 2 verwendet. Die Zusammensetzung des Gels erfolgte nach Auflistung in Tab. 21. Das 6-8%ige Trenngel wurde in die Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um einen exakten Übergang zum Sammelgel zu erhalten. Nach Polymerisation des Acrylamids wurde das Isopropanol abgegossen und kurz gewartet, damit Reste verdunsten konnten. Daraufhin wurde das Sammelgel in die Gelkammer gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Gelkammer in einen Mini Protean 2 Apparat eingesetzt. Als Elektrophoresepuffer wurde der ProSieve Ex Running Puffer von Lonza verwendet. Der Überstand der aufbereiteten Proben aus 1.1 wurde für die SDS-PAGE verwendet. Je nach Expressionsstärke (Erfahrungswerte) wurden mit einer Hamiltonspritze 5-30 µl des Überstands in die Taschen des Gels gefüllt. In eine Tasche wurden 5 µl ProSieve QuadColor Proteinmarker (Lonza) aufgetragen. Bedingungen der Elektrophorese waren 20 min bei 50 V, wobei die Proteine das Sammelgel passierten und dann, ungefähr mit Übertritt ins Trenngel wurde die Spannung auf 100 V für 90 min erhöht. Die äußere Plastikwanne des Mini Protean 2 Systems stand während der Elektrophorese auf Eis und sodass der Laufpuffer gekühlt wurde.

Tab. 21: Komponenten bei der Herstellung von SDS-Gelen

Komponente	Sammelgel 4%	Trenngel 8%
Puffer	1 ml (5x Puffer)	4 ml (2,5x Puffer)
Acrylamid (30%)	0,67 ml	2,67 ml
TEMED	7 µl	13 µl
Ammoniumpersulfat 10%	45 µl	136 µl
VE-Wasser	Auf 5 ml	Auf 10 ml

3.2.4 Western Blot

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel vorsichtig aus den beiden Glasplatten, die die Gelkammer bilden herausgelöst und 5 min in VE-Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel 5 min in ProSieve Ex Western Blot Transfer Puffer (Lonza) equilibriert. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, anschließend 5 min in VE-Wasser gewaschen und ebenfalls 5 min in Western Blot Transfer Puffer equilibriert. Dickes Filterpapier wurde mit Western Blot Transfer Puffer befeuchtet und das Sandwich bestehend aus Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier (Reihenfolge: Anode in Richtung Kathode) auf die Anode des BioRad SemiDry Blotters aufgebracht. Der Transfer fand bei 15 V für 20 min statt. Die Membran wurde anschließend kurz in VE-Wasser

gewaschen und die Leiter des Größenmarkers mit dem WesternBright ChemiPen (Advansta) nachgezeichnet. Die Membran wurde dann 1 h bei RT auf dem Kippschüttler mit 0,5% Milchpulver in TBST blockiert. Der primäre Antikörper wurde in 0,5% Milchpulver in TBST verdünnt (Verdünnungen siehe Tab. 7) und über Nacht bei 4 °C auf dem Kippschüttler mit der Membran inkubiert. Je nach Ausmaß der Membran und des Inkubiergefäßes wurden 7,5-10 ml von der Verdünnung des primären Antikörpers verwendet. Nach etwa 17 h Inkubation wurde der primäre Antikörper verworfen und die Membran einmal kurz und dreimal für 10 min mit 20 ml kaltem TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 0,5% Milchpulver in TBST verdünnt (Verdünnungen siehe Tab. 8) und 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran wie zuvor beschrieben gewaschen und zusätzlich noch einmal für 10 min mit 20 ml TBS. Da der sekundäre Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, wurde ein ECL (enhanced chemiluminescence) Reagenz (WesternBright Sirius) zur Sichtbarmachung des Antikörpers verwendet. Die beiden Komponenten des WesternBright Reagenz wurden zu gleichen Teilen (500 µl pro Komponente für 42 cm²) gemischt und 2 min mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann mit einem C-Digit Scanner von Licor gescannt und gescannte Bilder mit dem Programm Image Studio Lite 3.1 bearbeitet.

3.2.5 Anfärben von Gelen und Blots

Zur Sichtbarmachung von Proteinbanden in Gelen oder auf Blots ohne den Einsatz spezifischer Antikörper, wurden die Färbelösungen Coomassie Blue (Gele) und Amidoschwarz (Blots) verwendet. Gel oder Blot wurden dazu 15 min in der Färbelösung inkubiert. Da dabei nicht nur die Proteinbanden gefärbt werden, sondern auch das Gel oder der Blot Farbe ziehen, wurden sie anschließend 1 h mit Entfärbelösung inkubiert. Dabei wurde überschüssiger, nicht gebundener Farbstoff herausgewaschen. Die Entfärbelösung wurde alle 15 min erneuert.

3.2.6 Solubilisierung membranständiger Proteine für Bindungsassays oder Sucrosegradienten

Bei der Solubilisierung handelt es sich um das Herauslösen der membranständigen Proteine aus der Membran und anschließende Gewährleistung der Löslichkeit in wässrigem Milieu. Um die GABA Rezeptoren bei diesem Vorgang als gesamtes Pentamer zu erhalten, mussten schonende Detergenzien verwendet werden. Hierfür wurden nach Testung der Solubilisierungseffizienz vor allem Chaps und Sarkosyl in einer Konzentration von 1% verwendet.

Krude Membranen wurden dazu nass gewogen und in einem Verhältnis von 0,15 mg Pellet/µl Solubilisierungspuffer aufgenommen. Anschließend wurde das Pellet durch Sonifizieren (30 sec, Power 50%) resuspendiert und durch die einwirkenden Scherkräfte auch DNA zerkleinert, die sonst zur Schleimbildung mit Detergenzien führen würde. Das Detergenz wurde dann zugefügt, sodass sich eine Konzentration von 1% ergab. Die Solubilisierung erfolgte bei 4 °C für 1 h im Über-Kopf-

Schüttler. Um alle nicht gelösten Bestandteile danach zu entfernen, wurde der Ansatz bei 100000 g für 1,25 h abzentrifugiert (Beckman Rotor: 70.1 Ti). Der Überstand enthielt danach nur die solubilisierten Bestandteile des Membranpellets, während sich alle suspendierten Bestandteile im Pellet befanden. Für eine Proteinbestimmung musste der Überstand im Verhältnis 1:10 verdünnt werden, da eine 1%ige Detergenz-Konzentration die Proteinbestimmung nach Bradford stören würde. Für einen folgenden Bindungsassay wurde der Überstand ebenfalls im Verhältnis 1:10 verdünnt. Wurde der Überstand für eine Sucrosegradientenzentrifugation verwendet, wurde er im Verhältnis 1:1 in Solubilisierungspuffer, (ohne Glycerol) verdünnt. Unverdünnt ist die Dichte des Überstands zu hoch und ließe sich nicht über die 5%ige Sucrose-Lösung des Gradienten schichten.

3.2.7 Bindungsstudien

Liganden-Bindungsstudien wurden an kruden Membranen sowie solubilisierten Proteinen durchgeführt. Bei den eingesetzten radioaktiven Liganden handelt es sich um [³H]Muscimol, [³H]RO15-4513 und [³H]EBOB. [³H]Muscimol bindet an die GABA-Bindestelle zwischen β und α Untereinheit. [³H]RO 15-4513 bindet an alle bislang bekannten, γ 2-enthaltenden Benzodiazepin-Bindestellen, unabhängig von der Art der α - oder β -Untereinheit. Gewöhnlich verhält sich der Ligand dabei als partieller inverser Agonist, außer bei α 4/6-enthaltenden GABA_AR, an denen er als Agonist agiert.¹⁸⁷ [³H]EBOB ist ein sogenannter Kanal-Blocker. Er ist ein nicht-kompetitiver Antagonist, der in der Kanalpore bindet und empfindlich gegen konformative Änderungen im Chlorid-Kanal ist. [³H]Muscimol und [³H]RO15-4513 Bindungsstudien wurden unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Beide radioaktive Liganden wurden in einer Konzentration von 6 nM eingesetzt, was in etwa ihren K_D -Werten entspricht. Die Assays wurden mit 150-200 μ g Protein durchgeführt. Der Überstand solubilisierter Proteine wurde dabei 1:10 mit 50 mM Tris/Citrat-Puffer verdünnt und krude Membranen in 50 mM Tris/Citrat-Puffer resuspendiert. Insgesamt bestand jeder Ansatz aus 500 μ l, davon 100 μ l radioaktiver Ligand in einer Konzentration von 30 nM [³H]Muscimol, [³H]RO15-4513 in 50 mM Tris/Citrat-Puffer, 100 μ l Tris/Citrat-Puffer oder kalter Ligand und auf 300 μ l Proteinsuspension oder Proteinlösung Tris/Citrat-Puffer 50 mM. Die totalen Bindungswerte der radioaktiven Liganden an den GABA_AR wurden bestimmt, indem 100 μ l Tris/Citrat-Puffer statt eines kalten Liganden zugefügt wurden. Die unspezifische Bindung wurde bestimmt, indem GABA (Endkonzentration 100 μ M) bei den [³H]Muscimol-Assays und RO15-4513 (Endkonzentration 10 μ M) oder Flumazenil (Endkonzentration 20 μ M) bei den [³H]RO15-4513-Assays zugefügt wurde. Die spezifische Bindung ergab sich dann aus der Subtraktion der Werte der totalen und der unspezifischen Bindung. Inkubationszeit war 1 h auf Eis. Innerhalb dieser Zeit hatte sich ein Gleichgewicht der Bindung eingestellt. [³H]EBOB-Assays wurden unter prä-equilibrium Bedingungen durchgeführt (90 min bei RT). Diese prä-equilibrium Bedingungen wurden zunächst in [³⁵S]TBPS-Bindungsstudien untersucht¹²³ und für den Liganden [³H]EBOB übernommen.¹⁸⁸ Wie bei den Bindungsstudien mit den beiden anderen radioaktiven Liganden wurden auch bei [³H]EBOB-Assays 500 μ l Ansätze verwendet. [³H]EBOB wurde jedoch in Tris/Citrat-Puffer, dem 0,2 M NaCl zugesetzt war, verdünnt. Die

spezifische Bindung von [³⁵S]TBPS benötigt hohe Konzentrationen von Halogensalzen, wobei hierbei die Anwesenheit monovalenter Anionen wichtiger scheint als die von Kationen.¹²³ Der [³H]EBOB-Assay wurde daher immer in Anwesenheit von Natriumchlorid durchgeführt. Zur Ermittlung der unspezifischen Werte wurde EBOB (Endkonzentration 10 µM) eingesetzt. Die spezifische Bindung ergab sich auch hier aus der Differenz der totalen und der unspezifischen Bindung. Bei den meisten Bindungsstudien wurden die Messwerte in Triplikaten gemessen, mindestens jedoch in Duplikaten. Nach erfolgter Inkubation wurden die Reaktionsansätze über einen Zellernter von Brandel abgesaugt. Dabei war zwischen Vakuumpumpe und Reaktionsansatz ein angefeuchteter Glasfaserfilter (GF/C) eingesetzt, der Proteine und damit auch die gebundenen radioaktiven Liganden zurückhielt. Bei Bindungsassays an kruden Membranpräparationen wurde der Filter mit VE-Wasser befeuchtet. Bei Bindungsassays an solubilisierten Proteinen wurde der Filter mit Polyethylenimin-Lösung (3%, v/v) befeuchtet. So konnten die löslichen Proteine zurückgehalten werden. Nach Absaugung und Beladung auf die Glasfaserfilter wurden diese in Röhrchen mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und 1 h im Dunkeln inkubiert. Vermessen wurde die Radioaktivität in einem Szintillationszähler von Beckman. Auswertung der Bindungswerte erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 6.0.

3.2.8 Sucrosegradientzentrifugation

Diese Art der Zentrifugation wird auch als „rate-zonal centrifugation“ bezeichnet. Partikel wandern entsprechend Form, Größe und Gewicht unterschiedlich schnell im Gradienten und bilden so verschiedene Zonen. Nach erfolgter Zentrifugation können diese Zonen durch Fraktionierung des Gradienten abgenommen und zugeordnet werden. Gegossen wurde ein kontinuierlicher Sucrosegradient von 5-20%. Verwendet wurde dafür ein selbstentworfener Gradientenmischer, dessen gegossene Gradienten eine ausreichende Linearität aufwiesen. Zusätzlich wurden jedem Gradienten interne Standards zugesetzt und die abgenommenen Fraktionen mittels Refraktometrie auf ihre Sucrosekonzentration überprüft. Die Svedberg-Werte der GABA_AR wurden über die zugesetzten internen Standards mit bekannten S-Werten ermittelt. Dabei handelte es sich um Catalase (11,3 S¹⁸⁹), alkalische Phosphatase (6,5 S¹⁹⁰), Aldolase (7,7 S¹⁹¹), Fluorescein-gekoppeltes BSA (BSA: 4,3 S¹⁸⁹) und Hämoglobin (4,4 S¹⁹²). Zu Beginn wurden statt Catalase, Fluorescein-gekoppelte Catalase und statt alkalischer Phosphatase, Rhodamin-gekoppeltes IgG (IgG: 7,0 S¹⁹³⁻¹⁹⁴) verwendet. Die Dichtegradient-Zentrifugationen wurden in einem Swing-out Rotor von Beckman (SW27) durchgeführt.

Der Überstand nach Solubilisierung der kruden Membranen und einstündiger Zentrifugation bei 100000 g wurde zunächst 1:1 mit Solubilisierungspuffer (ohne Glycerol) verdünnt und mit internen Standards versetzt (75 Units alkalische Phosphatase; 3 µl Aldolase 1U/µl; 100 µl Catalase-Lsg. 10 mg/ml; 75 µl Hämoglobin-Lsg. 10 mg/ml, 1 µl Fluorescein-gekoppeltes BSA 10 mg/ml). Etwa 1,5 bis 2 ml Solubilisat wurden auf einen Gradienten geladen, dessen Volumen bei ca. 36 ml lag. Die Zentrifugation dauerte 48 h beim SW27 Rotor bei 87300 g. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der

Gradient von unten fraktioniert. Dazu wurde eine Kanüle (1,1 mm Durchmesser) in den Boden des Zentrifugationsröhrchens gesteckt und mit dem Fraktionierer LKB RediFrac in 90-Tropfen-Fractionen aufgeteilt. Die erhaltenen Fractionen wurden dann auf Sucrosegehalt und interne Standards geprüft und durch [³H]Muscimol-Bindungsassays auf die Anwesenheit von GABA_A Rezeptoren überprüft.

3.2.8.1 Linearität des Gradienten

Abb. 4 zeigt bei zwei unabhängig voneinander gegossenen Gradienten die Linearität. Der 20%igen Sucroselösung wurde Bromphenolblau zugesetzt. Die Linearität der Gradienten ist gut vergleichbar und die Methode des Gießens damit brauchbar. Ebenfalls dargestellt ist die Linearität nach 48 h Zentrifugation und nachfolgendem Abnehmen. Dabei wurde die Sucrosekonzentration mithilfe eines Handrefraktometers bestimmt. Auch nach 48 h ist die Linearität noch zuverlässig gegeben. Dennoch wurden jedem Gradienten interne Standards zugefügt.

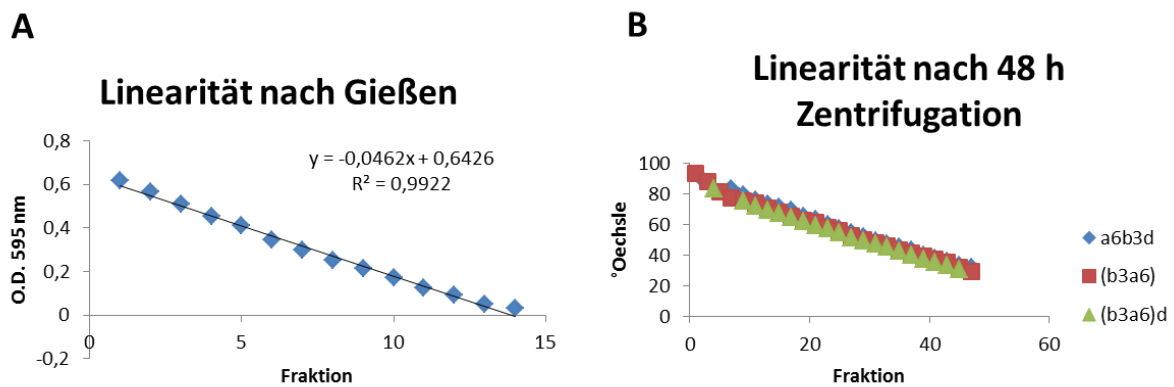


Abb. 4: Linearität der Gradienten. A: Messung der Linearität des Sucrosegradienten mittels Absorptionsmessung im UV/Vis Spektrophotometer bei 595 nm. Die dichtere 20%ige Sucrose-Lösung wurde mit Bromphenolblau eingefärbt. Die Fraktionierung erfolgte unmittelbar nach dem Gießen des Gradienten. Der Geraden liegt ein n von 2 zugrunde. B: Messung der Linearität des Sucrosegradienten mittels Refraktometrie der abgenommenen Fractionen nach 48 h Zentrifugation. Gemessen wurden °Oechsle. Dargestellt sind die Werte von drei verschiedenen Gradienten.

3.2.8.2 Detektion Fluorescein- und Rhodamin-gekoppelter Standards

Die Detektion der internen Standards Catalase-Fluorescein, BSA-Fluorescein und IgG-Rhodamin erfolgte durch Messung der Fluoreszenz. Das Rhodamin-gekoppelte IgG wurde bei 540 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 570 nm gemessen. Die Fluorescein-gekoppelten Standards wurden bei 485 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 520 nm gemessen. Der Gain des Fluoreszenz Plate Readers wurde so gewählt, dass die Intensität der gemessenen Fluoreszenz nicht zu hoch wurde und die Messbarkeit des Gerätes überschritt.

3.2.8.3 Detektion von Hämoglobin

Hämoglobin kann zum einen über die intrinsische Peroxidase-Eigenschaft gemessen werden. Dazu wurden 3-6 µl der entsprechenden Fractionen auf eine mit Methanol aktivierte und gewaschene

PVDF-Membran aufgetragen und 2 min mit ECL-Reagenz inkubiert (Bedingungen in Kapitel 3.2.4 Western Blot beschrieben). Die gemessene Intensität der Chemilumineszenz zeigte einen annähernd linearen Zusammenhang zur eingesetzten Hämoglobin-Menge (Abb. 5). Zum anderen wurde Hämoglobin spektrophotometrisch bestimmt durch Messung der Absorption der Lösung bei 415 nm. Beide Nachweismethoden sind zur Bestimmung der Hämoglobin-Menge geeignet, wie der gleichmäßige Aufbau des Hämoglobin-Peaks in den Sucrosegradienten zeigte (siehe Ergebnisteil).

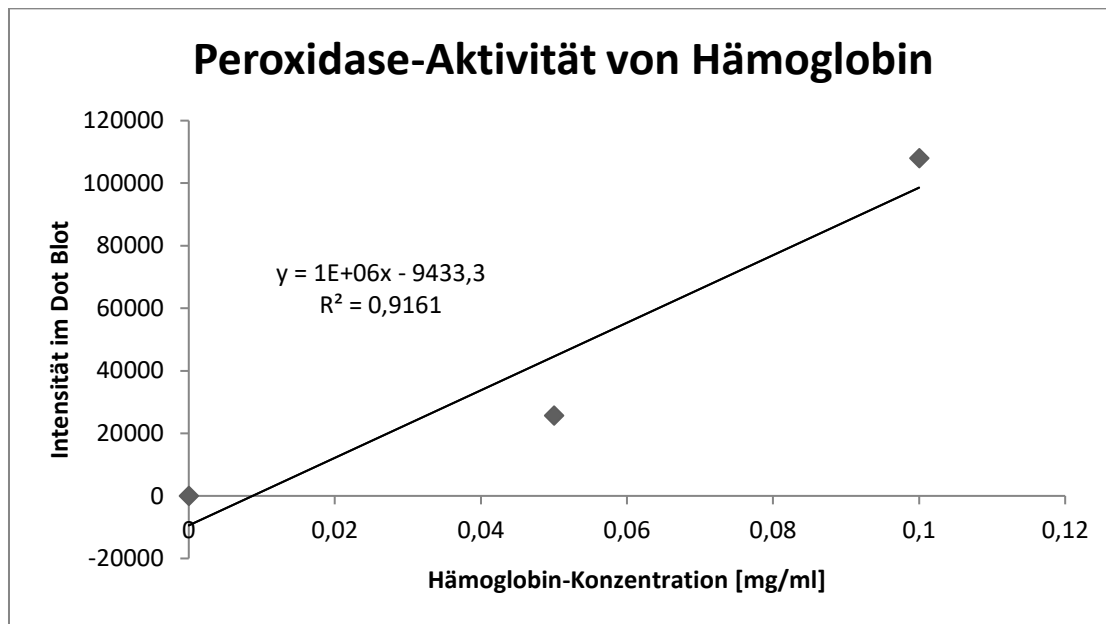


Abb. 5: Peroxidase-Aktivität von Hämoglobin. Linearer Zusammenhang steigender Konzentrationen von Hämoglobin. Die detaillierten Bedingungen der Nachweis-Methode sind dem Kapitel zu entnehmen. Die Peroxidase-Aktivität wurde zusammen mit ECL Reagenz im Chemilumineszenz-Scanner sichtbar gemacht. Quantifizierung erfolgte im Analyse-Programm des Herstellers.

3.2.8.4 Detektion von Catalase

Catalase wurde aufgrund der Peroxidase-Eigenschaften detektiert. Hierzu wurden zu 100 µl-Fractionen je 100 µl Triton X 100 1% zugesetzt und 100 µl Wasserstoffperoxid 30%. Die Umsetzung des Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff erfolgt durch die katalytische Wirkung der Catalase. Der sich bildende Sauerstoff wurde durch das zugesetzte Triton X 100 als Schaum eingefangen. Im Reagenzglas konnte dann mithilfe eines Lineals die Schaumhöhe gemessen werden. Die Linearität dieses Assays wurde in der Literatur beschrieben.¹⁹⁵

3.2.8.5 Detektion von alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase als interner Standard wurde durch ihre enzymatische Aktivität bestimmt. Dabei wurde ein Assay gewählt, in dem das Enzym die hydrolytische Spaltung von p-Nitrophenylphosphat (PNPP) zu p-Nitrophenol katalysiert. Die Absorption von p-Nitrophenol kann bei 405 nm gemessen werden. 50 µl der entsprechenden Fractionen wurden dazu mit 500 µl PNPP-

Lösung (1mg/ml PNPP in Substratpuffer aus 10 mM Tris/HCL, 0,5 mM MgCl₂, pH 9,2) versetzt und nach mehreren Minuten Inkubation bei 37°C im UV/Vis Spektrophotometer vermessen.

3.2.8.6 Detektion von Aldolase

Der Aldolase-Assay erfolgte über mehrere Schritte. Zunächst wurde durch das Enzym Aldolase (Fructose-1,6-diphosphataldolase) die Spaltung von Fructose-1,6-diphosphat in Glycerinaldehydphosphat und Dihydroxyacetonphosphat katalysiert. Die Triosephosphate wurden durch zugesetztes Hydrazinsulfat an einer Weiterreaktion gehindert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Trichloressigsäure gestoppt. In einem weiteren Reaktionsschritt wurden NaOH und 2,4-Dinitrophenylhydrazin zugegeben, wobei sich aus den Triosephosphaten die farbigen Dinitrophenylhydrazone bildeten. Deren Absorption konnte bei 540 nm bestimmt werden. Die Durchführung des Aldolase-Assays lehnte sich an ein Protokoll von Pinto aus dem Jahre 1969 an.¹⁹⁶

Im Falle der Fraktionen aus dem Sucrosegradienten wurden 100 µl der jeweiligen Fraktion mit 700 µl Tris/Citrat-Puffer pH 7,3, 100 µl Hydrazinsulfat 0,056 M und 100 µl Fructose-1,6-diphosphat 0,05 M versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl entnommen und die Enzymreaktion mit 100 µl Trichloressigsäure 10 % abgestoppt. Es wurden abermals 100 µl entnommen und mit 100 µl NaOH 0,75 N 10 min bei RT inkubiert. 100 µl 2,4-Dinitrophenylhydrazin [0,1 N] wurde zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Zu den 300 µl wurden 750 µl NaOH [0,75 N] gegeben und die Farbentwicklung der Dinitrophenylhydrazone erfolgte 5 min lang bei RT. Die Absorption wurde im UV/Vis Spektrophotometer bei 540 nm bestimmt. Die Linearität des Assays in Abhängigkeit der eingesetzten Units an Aldolase ist in Abb. 6 dargestellt.

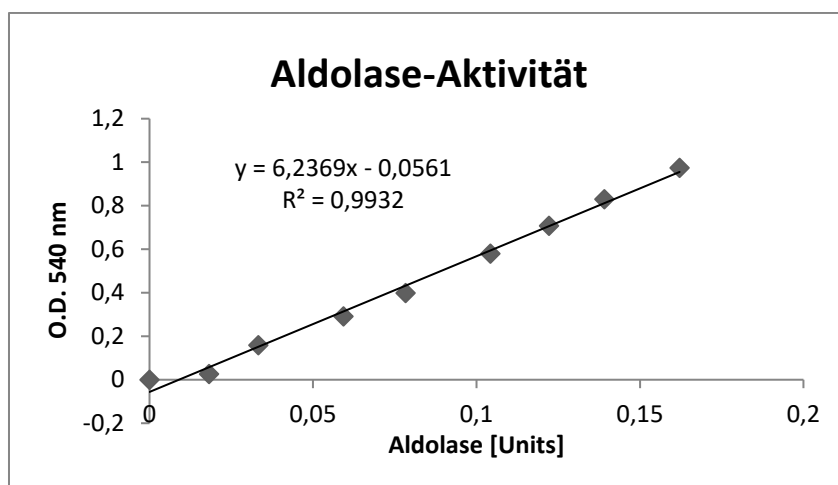


Abb. 6: Aldolase-Aktivität. Linearer Zusammenhang steigender Konzentrationen des Enzyms Aldolase im beschriebenen Nachweis-Assay. Die detaillierten Bedingungen sind dem Kapitel zu entnehmen. Die Messung der Absorption erfolgte bei 540 nm im UV-Vis Spektrophotometer.

3.2.9 Aufarbeitung Cerebellum

Gehirne waren entweder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren oder frisch entnommen verarbeitet. Die Gehirne wurden, wenn vorher eingefroren, auf Eis aufgetaut. Das Cerebellum wurde mit einer Pinzette vorsichtig entfernt und in eiskaltem 50 mM Tris/Citrat-Puffer mit dem Ultra Turrax zerkleinert. Anschließend wurde 30 min bei 40000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde noch zweimal mit dem Tris/Citrat-Puffer gewaschen und die Membranen mindestens über Nacht eingefroren. Am Tag des Bindungsassays wurden die Membranen noch zweimal gewaschen. Die häufigen Waschschrte waren notwendig, um endogenes GABA vollständig zu entfernen.

3.3 Molekularbiologie

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für alle PCR Ansätze wurde die Phusion Polymerase von NEB verwendet. Gegenüber der herkömmlichen Taq Polymerase zeichnet sich die Phusion durch eine höhere Genauigkeit und Geschwindigkeit aus. Die Fehlerrate der Phusion Polymerase ist 50fach niedriger als die der Taq Polymerase (Herstellerangaben). Etwa 40 ng Plasmid DNA wurden eingesetzt. Die Herstellerangaben zur Anwendung der Phusion Polymerase wurden eingehalten (Tab. 22). Die Annealing Temperatur der Primer wurde mittels NEBcalculator der Firma NEB berechnet. Die PCR wurde eingesetzt, um Fragmente für Chimären zu erzeugen, Mutationen in Plasmide einzufügen und Linkersequenzen an den N-terminalen Bereich der δ Untereinheit anzuhängen.

Tab. 22: Komponenten einer PCR

Komponente	50 μl Ansatz
Phusion HF Puffer 5x	10 μl
dNTPs 10 mM	1 μl
Forward Primer 10 μM	2,5 μl
Backward primer 10 μM	2,5 μl
Template-DNA	40 μg
Phusion Polymerase	0,5 μl
Nukleasefreies Wasser	auf 50 μl

3.3.2 Konstruktion der Chimären zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 6$

Als Ausgangsplamide wurden zum einen die wildtypische $\alpha 6$ -Untereinheit und zum anderen ein $\alpha 1$ -Konstrukt, in das ursprünglich Wieland et al. zusätzliche Restriktionsschnittstellen für MluI und Bsu36I eingefügt haben,¹⁹⁷ verwendet. Beide Untereinheiten sind in pRK5-Vektoren inkloniert.

Die Chimären wurden erstellt, um die Bindestelle von der Verbindung **22** (DS1) an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_AR näher zu untersuchen. Da der Ligand an $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren keine [³H]EBOB Modulation zeigte, wurden Chimären aus diesen beiden Untereinheiten erstellt, um die Bindestelle auf der $\alpha 6$ Untereinheit einzugrenzen. Verschiedene $\alpha 1/\alpha 6$ Chimären waren bereits im Laborbestand vorhanden und Bindungsversuche zeigten, dass die Bindestelle vermutlich N-terminal der MluI Bindestelle liegt. Daher wurden in diesem vorderen N-terminalen Bereich Teilfragmente ausgetauscht. Alle verwendeten Chimären, auch die bereits im Laborbestand vorhandenen, sind in Abb. 75 dargestellt. Im Anhang dargestellt sind die Schnittstellen der Chimären in der Proteinsequenz (Abb. 84).

Zur Herstellung einer Chimäre wurden je vier Primer verwendet, die in zwei verschiedenen PCR Ansätzen die beiden Fragmente der chimären Untereinheit lieferten. Zwei Primer setzten als forward bzw. backward Primer vor bzw. nach der kodierenden Sequenz im pRK5 Vektor-Rückgrat an. Die beiden anderen Primer dienten als forward bzw. backward Primer an der gewünschten Schnittstelle in jeweils einer der beiden Untereinheiten. Der backward Primer der kodierenden Sequenz wurde phosphoryliert. Die Enden der PCR Fragmente im nicht-kodierenden Bereich wurden mit BamHI (5' Ende) und HindIII (3' Ende) geschnitten, über ein Agarose Gel aufgetrennt und die ausgeschnittenen Banden mit dem Gel Clean-up Kit von Macherey Nagel aufgereinigt. Mit diesem Schritt entledigte man sich der Restfragmente sowie des Ausgangsplasmids, das in der PCR eingesetzt wurde. Ein $\alpha 6$ Vektor wurde ebenfalls mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten und das Fragment, das das Vektor-Rückgrat bildet aus dem Gel ausgeschnitten und mit demselben Kit aufgereinigt. Eine schematische Darstellung der Chimärenherstellung liefert Abb. 7. Die drei Fragmente wurden zur kompletten Chimäre ligiert. Alle Chimären wurden sequenziert und auf Richtigkeit überprüft. Genaue Angaben zu PCR Bedingungen, Phosphorylierung, Restriktionsverdau, Agarose-Gelelektrophorese, Ligation und Sequenzierung wurden bereits in anderen Teilen der molekularbiologischen Methoden erläutert.

Die Chimäre $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6$ wurde nach der Aminosäure 94 in der Proteinsequenz der $\alpha 1$ Untereinheit getrennt und der Rest der Untereinheit $\alpha 6$ ab der Aminosäurefolge TPD₉₄FFR (Position 94 der $\alpha 6$ Untereinheit) wurde angehängt. Die PCR mit den Primern (2) und (6) und dem Vektor pRK5 $\alpha 1$ als template DNA ergab das N-terminale $\alpha 1$ Fragment. Die PCR mit den Primern (1) und (7) und dem Vektor pRK5 $\alpha 6$ ergab das restliche $\alpha 6$ Fragment. Bei der komplementären Chimäre $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1$ wurde mit den Primer (2) und (8) und pRK5 $\alpha 6$ das N-terminale $\alpha 6$ Fragment gewonnen und mit den Primern (1) und (5) und pRK5 $\alpha 1$ das restliche $\alpha 1$ Fragment.

Nach demselben Prinzip wurden auch die weiteren Chimären konstruiert. Chimäre $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6$ nach Position 57 der $\alpha 1$ Untereinheit mit den Primern (2) und (10), sowie (1) und (11). Chimäre $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1$ an Position 56 der $\alpha 6$ Untereinheit mit den Primern (2) und (12), sowie (1) und (9). Chimäre $\alpha 1$ QSWKDER $\alpha 6$ an Position 72 der $\alpha 1$ Untereinheit mit den Primern (2) und (14), sowie (1)

und (15). Chimäre $\alpha 6$ QTWTDER $\alpha 1$ an der Position 71 der $\alpha 6$ Untereinheit mit den Primern (2) und (16), sowie (1) und (13).

Alle erstellten Chimären können zusammen mit den zur Herstellung verwendeten Vektoren und Primern der Tab. 15 entnommen werden. Eine Übersicht aller Primer liefert Tab. 13.

3.3.3 Konstruktion weiterer $\alpha 1/\alpha 6$ Chimären durch Umklonierung

Weitere Chimären wurden durch Umklonierung bereits vorhandener Chimären erstellt. Verwendete Vektoren, Inserts und Restriktionsenzyme sind Tab. 16 zu entnehmen.

3.3.4 Konstruktion der Chimären zwischen $\gamma 2$ und δ

Als Ausgangsplasmide wurden die $\gamma 2$ -short Variante und die wildtypische δ Untereinheit verwendet. Die kodierenden Sequenzen befanden sich in pRK5' Vektoren.

Die Schnittstelle zwischen $\gamma 2$ und δ Untereinheit befindet sich in einem Bereich ungefähr in der Mitte der N-terminalen Sequenz, in der sich beide Untereinheiten stark ähnelten. Die Schnittstelle liegt bei der $\gamma 2$ Untereinheit nach Position 150 und bei der δ Untereinheit nach Position 125. Das Herstellungsprinzip war dasselbe wie bei den $\alpha 1/\alpha 6$ Chimären (Abb. 7).

Die Chimäre $\gamma 2$ IWIPDTF δ wurde nach der Aminosäure 112 der Untereinheit $\gamma 2$ getrennt und der Rest der Untereinheit δ ab der Aminosäurefolge IVNAKSA wurde angehängt. Die PCR mit den Primern (2) und (18) und dem Vektor pRK5 $\gamma 2s$ als Template-DNA ergab das N-terminale $\gamma 2$ Fragment. Die PCR mit den Primern (1) und (19) und dem Vektor pRK5 δ ergab das restliche δ Fragment. Bei der komplementären Chimäre δ LWLPDTF $\gamma 2$ wurde mit den Primer (2) und (20) und pRK5 δ das N-terminale δ Fragment gewonnen und mit den Primern (1) und (17) und pRK5 $\gamma 2$ das restliche $\gamma 2$ Fragment.

Die erstellten Chimären können zusammen mit den zur Herstellung verwendeten Vektoren und Primern der Tab. 15 entnommen werden. Eine Übersicht aller Primer liefert Tab. 13. Die Chimären sind außerdem in Abb. 75 dargestellt. Im Anhang dargestellt sind die Schnittstellen der Chimären in der Proteinsequenz (Abb. 85).

3.3.5 Konstruktion der Mehrfach-Punktmutanten

Die Herstellung der Mehrfach-Punktmutanten sollte einer präzisen Zuordnung der Bindestelle auf der $\alpha 6$ Untereinheit dienen. Kurze Aminosäure-Sequenzen, in denen einzelne Aminosäuren beider Untereinheiten stark voneinander abwichen, wurden durch gezielte Mutagenese so verändert, dass sie der jeweils anderen α Untereinheit gleich waren. Durch ein Ausbleiben der [3 H]EBOB Modulation der mutierten $\alpha 6$ Untereinheit und eine entsprechende Modulation bei der mutierten $\alpha 1$ Untereinheit sollte die genaue Bindestelle bestätigt werden. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass sich die Bindung des Liganden nur oder hauptsächlich auf diese eine Region der Untereinheit begrenzt.

Zur Herstellung der Mehrfach-Punktmutanten wurden in der PCR zur Plasmid DNA der jeweiligen Untereinheiten zwei komplementäre Primer zugesetzt, die beide die Punktmutationen enthielten. Nach der PCR wurde der Ansatz mit dem Restriktionsenzym Dpn I verdaut, um sich der ursprünglichen Plasmid DNA zu entledigen. Danach konnte das PCR Produkt transformiert werden.

Bei der Mutante $\alpha 1VSDVEME$ wurden mithilfe der Primer (25) und (26) die Aminosäuren der Positionen Histidin54 und Asparaginsäure55 durch die Aminosäuren Valin54 und Glutaminsäure55 ausgetauscht. Entsprechend umgekehrt verhielt es sich mit der Mutante $\alpha 6VSDHDME$, die mit den Primern (27) und (28) erstellt wurde und die Aminosäuren in den Positionen 53 und 54 von Valin und Glutaminsäure zu Histidin und Asparaginsäure mutiert wurden.

Bei dem mutierten Vektor $\alpha 1GFGGAVT$ wurden mithilfe der Primer (21) und (22) die Aminosäuren der Positionen Leucin98, Glutaminsäure100 und Arginin101 durch Phenylalanin98, Glycin100 und Alanin101 ausgetauscht. Umgekehrt verhielt es sich mit der Mutante $\alpha 6GLGERVT$, die mit den Primern (23) und (24) erstellt wurde.

Die erstellten Punktmutanten können zusammen mit den zur Herstellung verwendeten Vektoren und Primern der Tab. 17 entnommen werden. Eine Übersicht aller Primer liefert Tab. 13. Alle verwendeten Punktmutanten, auch die bereits im Laborbestand vorhandenen, sind im Anhang in Abb. 76 dargestellt. Im Anhang dargestellt sind die genauen Positionen der Mutationen in der Proteinsequenz (Abb. 86).

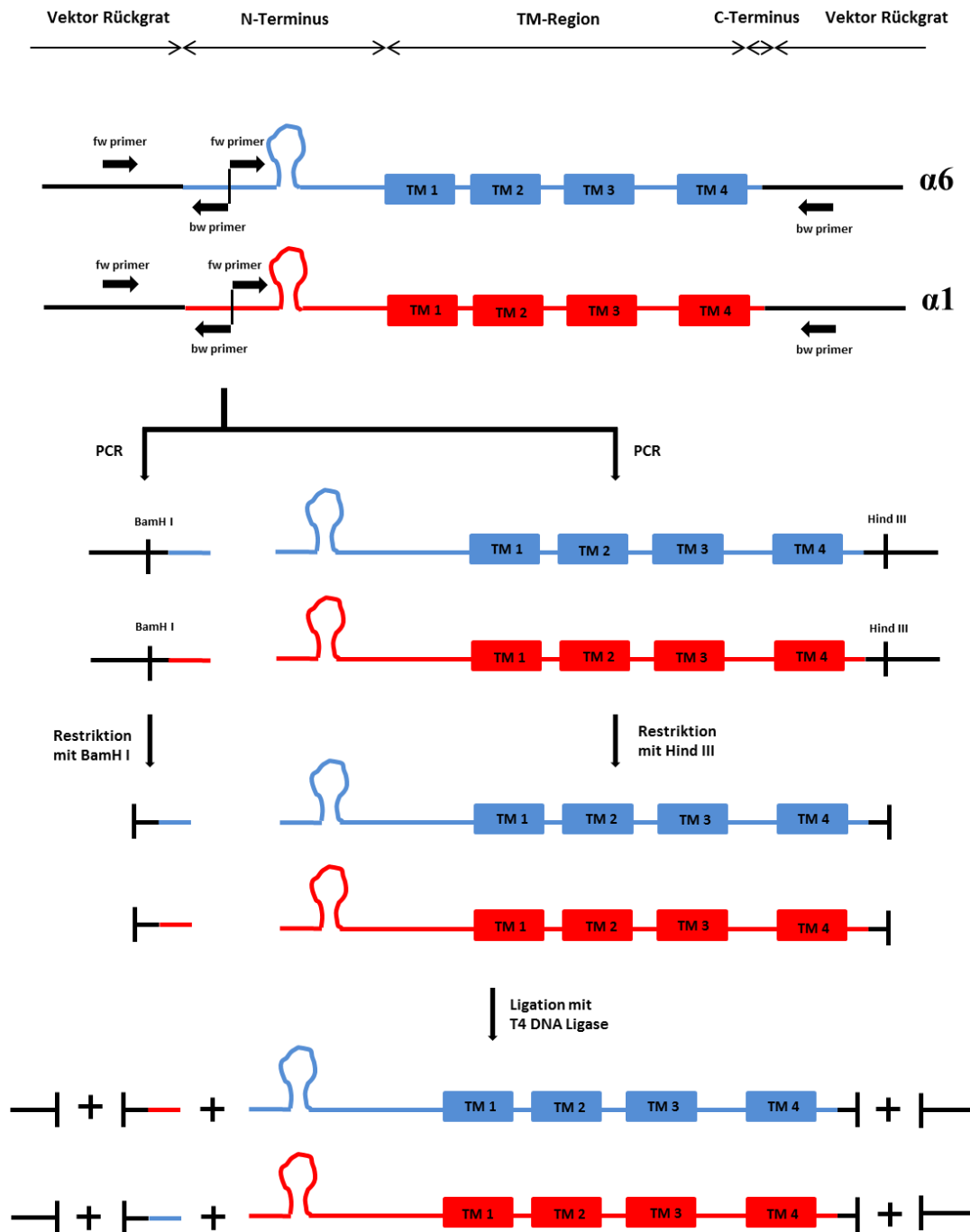


Abb. 7: Schematische Darstellung der Konstruktion von Chimären. Beispielhaft wird hier die Konstruktion zweier $\alpha 1/\alpha 6$ Chimären dargestellt. Die PCR im ersten Schritt erfolgt jeweils mit den $\alpha 1$ und $\alpha 6$ Vektoren. Es werden für die Fragmente im N-terminalen Bereich forward Primer, die im Vektor Rückgrat binden und backward Primer, die an der zu trennenden Sequenz ansetzen, verwendet. Für die C-terminalen Fragmente werden backward Primer, die im Vektor Rückgrat binden und forward Primer, die an der zu trennenden Sequenz ansetzen, verwendet. Die Primer sind als schwarze Pfeile dargestellt und werden fw primer für forward primer und bw primer für backward primer abgekürzt. In einem zweiten Schritt werden die Fragmente mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII geschnitten, damit sie wieder in einen Vektor inkloniert werden können. Die Schnittstellen sind als schwarze Balken dargestellt. Der Klonierungsvektor wird ebenfalls mit beiden Restriktionsenzymen geschnitten und die für die Untereinheit kodierende Sequenz entfernt. Vektor Rückgrat, N-terminales Fragment der einen α Untereinheit und C-terminales Fragment der anderen α Untereinheit werden zusammen zu einem chimären Vektor ligiert. Die Abbildung dient der schematischen Darstellung und ist nicht maßstabsgetreu.

3.3.6 Konstruktion der Linker an der δ Untereinheit

Um die δ Untereinheit in ein bereits im Laborbestand vorhandenes Konkater-Konstrukt einzuklonieren, mussten der wildtypischen Untereinheit Nucleotid-Sequenzen angehängt werden, die für die Aminosäure-Linker kodieren. Da in den Linkersequenzen aller Konkater Schnitstellen für bestimmte Restriktionsenzyme eingefügt wurden, kann nach erfolgreicher PCR und Verdau mit entsprechenden Enzymen das Fragment in einen geschnittenen Konkater-Vektor inkloniert werden. Zur Herstellung der mit Linker-Sequenzen ausgestatteten δ Untereinheit wurden die Primer (3) und (4) verwendet und als Plasmid DNA diente das bereits vorhandene Konkater ($\delta\alpha 1$), das aber keine BssH II Schnittstelle im Linker besaß, die nun durch den Primer (4) eingefügt wurde. Das fertige DNA-Fragment enthielt in den angefügten Linker-Sequenzen die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Swa I und BssH II. Das δ Fragment konnte so in einen ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) Vektor inkloniert werden aus dem die $\alpha 1$ Untereinheit herausgeschnitten wurden und ergab so das Konkater ($\beta 3\delta\beta 3$). Dieses und weitere wurden genutzt um eine Reihe von Konkateren zu klonieren. Alle klonierten Konkater mit den zur Herstellung verwendeten Inserts, Vektoren und Restriktionsenzymen können der Tab. 14 entnommen werden. Eine Übersicht aller Primer liefert Tab. 13.

3.3.7 Umklonierung

Zum Umklonieren wurde ein Plasmid zum Vektor bestimmt und ein weiteres lieferte das Insert. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass mindestens eines ein „sticky end“ lieferte. Mussten die Enzyme so gewählt werden, dass beide ein „blunt end“ lieferten, wurde der Vektor vor Ligation dephosphoryliert. Die Fragmente wurden in einem 1%igen Agarose-Gel getrennt und unter UV Licht bei 312 nm Wellenlänge ausgeschnitten, aufgereinigt, ihre Konzentration gemessen und ligiert.

3.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 0,7-1%ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. DNA Fragmente oder ganze Plasmide wurden mit 6x Ladepuffer (Gel loading dye, purple; NEB) versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Eine Spannung von 70-100 V wurde angelegt und das Gel entsprechend der Konzentration und der zu trennenden Größen der Fragmente zwischen 30-60 min laufen gelassen. Analytische Gele wurden anschließend auf einem Transilluminator bei 254 nm betrachtet, präparative Gele bei 312 nm. Die Fragmente eines präparativen Gels wurden mit einem Skalpell möglichst schnell ausgeschnitten, um Schädigung der DNA durch das UV Licht gering zu halten.

3.3.9 Gewinnung von DNA aus Gelstücken und PCR-Ansätzen

Ausgeschnittene DNA-Fragmente aus Agarosegelen und amplifizierte DNA aus PCR Ansätzen wurden mit verschiedenen Kits aufgereinigt. Verwendet wurden die Kits Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), QIAQuick Gel Extraction (Quiagen) und NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Es wurde jeweils nach den Herstellerangaben verfahren. Das Prinzip der

Kits war jeweils gleich. Gelstücke und PCR Ansätze wurden entsprechend ihres Gewichts bzw. Volumens mit Bindepuffer versetzt. Das Gelstück musste unter Erhitzen auf 55-60 °C aufgelöst werden. Der pH-Wert des Bindepuffers liegt zwischen 5,0-6,0. Unter diesen leicht sauren Bedingungen ist die Bindung von DNA-Fragmenten an die Silika-Membranen am besten. Zusätzlich sind im Bindepuffer chaotrope Salze (meist Guanidinthiocyanat) enthalten. Diese stören die Hybridisierung der Nukleinsäuren und erleichtern dadurch den Transfer an die Silika-Membran. An die Membran gebundene DNA musste noch zweimal mit ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen werden. Auch dieser verbessert die Bindung der DNA an die Membran und hilft überschüssige Salze von der Säule zu waschen. Eluiert wurde schließlich mit entionisiertem Wasser oder einem beigefügten Elutionspuffer (meist Tris-EDTA). Das dabei verwendete Volumen richtete sich nach den Herstellerangaben, aber auch nach der gewünschten Konzentration.

3.3.10 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mithilfe eines NanoDrop 1000 Spektrophotometers bestimmt. Für die Konzentrationsbestimmung nach Lambert-Beer wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm verwendet. Das Verhältnis A_{260}/A_{230} wird als Reinheitsmerkmal für erfolgreiche Entfernung des Guanidinthiocyanats gesehen und sollte größer als 2 sein. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} gilt als genereller Reinheitsindikator für aufgereinigte DNA und sollte bei 1,8 liegen. Niedrigere Werte können auf Verunreinigungen mit Protein zurückzuführen sein.

3.3.11 Mini-Präparationen

Mini-Präparationen sind Aufreinigungen von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen mit kleinem Volumen. Sie dienen vor allem der Kontrolle eines neuen Plasmids durch Kontrollverdau oder Sequenzierung. Die gewonnenen Mengen sind generell zu gering, um damit eine Transfektion durchführen zu können. Neu erstellte Plasmide wurden nach Transformation in kompetente *5α E. Coli* Bakterienzellen und Koloniebildung auf Carbenicillin-haltigen Agar-Platten gepickt und in 3 ml LB Medium + Ampicillin 100 µg/ml über Nacht bei 37°C und 210 rpm im Inkubator anwachsen gelassen. Für den Kontrollverdau von gepickten Klonen nach Klonierung eines neuen Plasmids wurde eine weniger reine Aufreinigungsmethode angewandt, da die Restriktionsenzyme nicht sehr empfindlich sind. Sollte das gewonnene Plasmid jedoch sequenziert werden, musste die DNA sehr rein sein und wurde mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt.

3.3.11.1 Mini-Präparationen mittels Kit

Verwendet wurden die Kits FastPlasmid (5Prime) und NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel). Bei der Vorgehensweise wurde sich exakt an die Vorschrift gehalten. Das Prinzip war bei beiden Kits dasselbe. Die Bakterienzellen wurden mittels alkalischer Lyse durch SDS und NaOH aufgebrochen und Proteine anschließend durch Zugabe von Guanidinhydrochlorid präzipitiert. Mitgefällt wurde dabei auch die genomische DNA, während die Plasmid DNA im Überstand verblieb.

Der Überstand wurde anschließend auf eine Säule mit Silika-Membran geladen. Dabei sorgte das chaotrope Guanidinhydrochlorid für eine Entfernung der Hydrathülle der DNA und erleichterte die Bindung an die Säule. Der ethanolhaltige Waschpuffer verbesserte ebenfalls die Bindung der DNA an das Säulenmaterial und half überschüssige Salze von der Säule zu waschen. Eluiert wurde anschließend mit Wasser.

3.3.11.2 Mini-Präparationen mit selbst hergestellten Lösungen

Es wurden 1,5 ml von einer 3 ml Kultur in LB Medium + Ampicillin 100 µg/ml entnommen und bei 1000 g für 3 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit 150 µl Lösung 1 resuspendiert. 150 µl von Lösung 2 wurden zugefügt und 6x invertiert. Dieser Schritt war für die alkalische Lyse verantwortlich, da Lösung 2 NaOH und SDS enthielt. Da es wichtig war, dass die an die Zellmembran gebundene genomische DNA nicht abgelöst wurde, musste bei diesem und dem nachfolgenden Schritt vorsichtig vorgegangen werden. Nach Zugabe von Lösung 3 wurden durch die enthaltene Essigsäure Proteine präzipitiert und gleichzeitig auch die daran gebundene genomische DNA. Das Präzipitat wurde anschließend bei 20000 g für 5 min abzentrifugiert und 400 µl des Überstandes vorsichtig entnommen. In diesem befand sich die gewünschte Plasmid DNA. Der Überstand wurde mit 280 µl Isopropanol 100% versetzt, was in einer 40%igen Isopropanol-Lösung resultierte. Bei dieser Konzentration präzipitierte die Plasmid DNA. Die gefällte DNA wurde dann bei 20000 g für 15 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet leicht getrocknet, um überschüssiges Isopropanol, das die Arbeit von Restriktionsenzymen stören könnte, zu entfernen. Die gefällte DNA wurde in 100 µl entionisiertem Wasser, das mit RNase (Endkonzentration: 100 µg/ml) versetzt war, aufgelöst. Da die DNA bei dieser Aufarbeitungsmethode nicht ausreichend gewaschen wird, ist mit Verunreinigungen zu rechnen. Zum Kontrollverdau größerer Mengen an Klonen ist sie aber gut geeignet, da sie ist entsprechend günstig und für den Verdau mit Restriktionsenzymen vollkommen ausreichend ist.

3.3.12 Midi- und Maxi-Präparationen

Midi- und Maxi-Präparationen wurden durchgeführt, um größere Mengen an Plasmid DNA zu gewinnen. Da diese zur Transformation in HEK293 Zellen verwendet wurde musste die DNA sehr rein sein. Zum einen wurden die Kits NucleoBond Xtra Midi und Maxi (Macherey-Nagel) verwendet, zum anderen kam die Aufreinigungsmethode über einen Cäsiumchlorid-Gradienten zum Einsatz.

3.3.12.1 Midi- und Maxi-Präparationen mittels Kit

Wichtig bei der Auswahl eines Kits ist die Methode, mit der die DNA aufgereinigt wird, denn die Reinheit der eluierten Plasmid DNA muss eine Transfektion gewährleisten können. Aufreinigung von DNA über Silika-Membranen ist für eine Sequenzierung der DNA rein genug, nicht jedoch für Transfektionen geeignet. Anionen-Austausch Chromatographie dagegen erzielt, wie auch die Reinigung über den Cäsiumchlorid-Gradienten, eine ausreichend hohe Reinheit. Entsprechend wurden

die NucleoBond Xtra Kits von Macherey-Nagel verwendet. Die Membran der Säulen besteht dabei aus Siliciumdioxid, welches eine ideale Porengröße für maximalen Kontakt der Oberfläche mit der DNA besitzt. Die Siliciumdioxid-Partikel besitzen eine hohe Dichte an positiv geladenen Methylaminoethanol-Seitenketten. Der protonierte, positiv geladene Zustand der Seitenketten besteht über einen bestimmten pH Bereich hinweg. Die negativ geladene Plasmid DNA bindet an das Säulenmaterial. Zwei Waschschrte führen zur Entfernung von Kontaminationen. Die Elution erfolgt unter basischen Bedingungen. Dabei werden die Seitenketten neutralisiert und die DNA freigesetzt. Zur weiteren Entfernung von Verunreinigungen wird die DNA mit Isopropanol präzipitiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen.

Zur Gewinnung von Plasmid DNA wurden Bakterienkulturen angelegt, die je nach Säulengröße 50 ml (Midi-Präp.) bis 150 ml (Maxi-Präp.) umfassten. Dabei wurde erst eine Kolonie des retransformierten Plasmids gepickt und für 6 h in 3 ml LB Medium + Ampicillin 100 µg/ml bei 37 °C und 210 rpm im Inkubator wachsen gelassen. Die Kultur wurde über Nacht in das entsprechende Volumen TB Medium + Ampicillin 100 µg/ml überführt und ebenfalls bei 37°C und 210 rpm im Inkubator anwachsen gelassen. Die Bakteriensuspension wurde am darauffolgenden Tag bei 6000 g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde gewogen und die Herstellerangaben dabei weitestgehend berücksichtigt (0,75 g bei Midi-Präp. und 2,25 g bei Maxi-Präp.). War das abzentrifugierte Pellet zu schwer, musste das eingesetzte Volumen verschiedener Puffer, wie in der Anleitung beschrieben, angepasst werden. Ansonsten wurde sich exakt an das Protokoll gehalten.

3.3.12.2 Midi- und Maxipräparationen mittels Cäsiumchlorid-Gradient

Es wurde sich weitestgehend an die Vorgaben von Lüddens und Korpi gehalten.¹⁹⁸ Dabei wurde eine Kolonie des retransformierten Plasmids gepickt und in 3 ml LB Medium + Ampicillin 100 µg/ml für 6 h bei 37 °C und 210 rpm im Inkubator anwachsen lassen. Die gesamte Vorkultur wurde in eine 50 ml (Midi) oder 200 ml (Maxi) Hauptkultur aus TB Medium + Ampicillin 100 µg/ml überführt und zu denselben Bedingungen über Nacht weiterwachsen gelassen. Die gesamte Kultur wurde am darauffolgenden Tag bei 3000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml (Midi) bzw. 30 ml (Maxi) Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 20 ml bzw. 60 ml Lösung 2 hinzugefügt, 6x vorsichtig invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter alkalischer Lyse wurden 16 ml bzw. 50 ml eiskalte Lösung 3 zugesetzt, 12x invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat, welches sich durch Fällung der Proteine im essigsauren Milieu bildete und assoziierte genomische DNA mitriss, wurde abzentrifugiert (27000 g, 15 min). Der Überstand wurde mit einer entsprechenden Menge Isopropanol 100% versetzt, sodass eine 40%ige Lösung entstand und die Plasmid DNA gefällt und abzentrifugiert (27000 g, 20 min, 4°C) werden konnte. Das DNA Pellet wurde dann in 5 ml bzw. 25 ml TE Puffer resuspendiert und mit 5 g bzw. 25 g Cäsiumchlorid versetzt. Zusätzlichen wurden 0,2 bzw. 0,4 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugefügt. Die Suspension wurde bei 3000 g für 15 min bei RT zentrifugiert, um grobe Bestandteile zu entfernen. Anschließend

wurde der Überstand in OptiSeal Gefäße (Beckman) überführt und im VTI65.2 (Beckman) für 4 h bei 400000 g und 25 °C (Midi-Präp.) oder im VTI50 Rotor (Beckman) für 24 h bei 200000 g und 25 °C (Maxi-Präp.) zentrifugiert. Der Dichtegradient bildete sich während der Zentrifugation aus dem zugesetzten Cäsiumchlorid aus. Wichtig ist, dass die Zentrifugation bei RT durchgeführt wird, da Cäsiumchlorid bei 4 °C ausfallen und den Gradienten so zerstören würde. Nach der Zentrifugation waren im Röhrchen zwei Banden zu sehen. Diese waren deutlich zu erkennen, da das zugesetzte Ethidiumbromid in die DNA interkalierte. Die untere Bande bestand aus der Plasmid-DNA und wurde abgenommen. Die obere Bande bestand aus Verunreinigungen genomischer DNA, die eine geringere Dichte besitzt. Die DNA aus der unteren Bande wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (VTI65.2, 400000 g, 4 h, 25°C), um ausreichende Reinheit zu gewährleisten. Nachdem die Bande ein zweites Mal abgenommen wurde, musste überschüssiges Ethidiumbromid entfernt werden. Dazu wurde so lange mit NaCl-gesättigter wässriger Lösung unter Isopropanol ausgeschüttelt, bis keine Rotfärbung der unteren wässrigen Phase mehr zu erkennen war. Die DNA-Lösung wurde in einen Dialyseschlauch überführt und mindestens 17 h gegen TE Puffer dialysiert. Der Puffer wurde einmal nach 1 h gewechselt. Reinheit und Gehalt der DNA wurden mit dem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Ein Kontrollverdau wurde zusätzlich durchgeführt, um die Identität des Plasmids zu bestätigen.

3.3.13 Ligation

Alle Ligationen wurden mit der T4 Ligase von Thermo Fisher durchgeführt. Pro 20 µl Ansatz wurden 5 Units Ligase eingesetzt. Es wurden 15-20 ng Vektor DNA eingesetzt und die Inserts in einem 5-7fachen molekularen Überschuss zugegeben. Neben dem 10fachen Ligase-Puffer wurden auch immer noch 2 µl 50%ige PEG 4000 Lösung zugesetzt. Ligationen von „sticky ends“ wurden 1 h bei RT, „blunt ends“ mindestens 2 h bei RT inkubiert.

3.3.14 Restriktionsverdau

Es wurden Restriktionsenzyme und Puffer von NEB verwendet. Es wurden pro 20 µl Ansatz jeweils 1 µl Enzym verwendet, was 10-20 Units entsprach und 500-1000 ng Plasmid DNA. Inkubiert wurde 1 h bei der Temperatur, die vom Hersteller angegeben war.

3.3.15 Dephosphorylierung

Dephosphorylierungen wurden durchgeführt, wenn zum Klonieren zwei Enzyme gewählt wurden, die ein „blunt end“ produzieren. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurden die geschnittenen Enden des Vektors dephosphoryliert. Es wurde die Antarctic Phosphatase von NEB verwendet. Eingesetzt wurden 100-300 ng Vektor DNA, dephosphoryliert wurde 30 min bei 37 °C. Die Phosphatase wurde anschließend bei 80 °C für 10 min inaktiviert.

3.3.16 Phosphorylierung

Bei der Herstellung von Chimären wurden die backward primer, die an der Schnittstelle zwischen den Untereinheiten ansetzten phosphoryliert. Verwendet wurde die T4 Polynukleotid Kinase von Thermo Fisher. Es wurde sich genau an die Herstellerangaben gehalten.

3.3.17 Sequenzierung

Plasmide, die entweder komplett oder teilweise durch eine PCR entstanden, wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft. Dazu wurde der Sequenzier-Service der Firma StarSEQ oder Genterprise in Anspruch genommen. Diese führte die Sequenzierung nach Sanger durch. Es wurden 500 ng Plasmid DNA (500 ng bei 5,6-6,5 kb Plasmiden) und 10 pmol Primer mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 7 µl aufgefüllt. Die nach Sequenzierung erhaltenen Dateien wurden mit dem Programm SeqScanner 2.0 ausgewertet und die Alignments mit dem Programm SnapGene durchgeführt.

3.3.18 Partieller Restriktionsverdau

Diese Art des Restriktionsverdaus wurde bei der Herstellung der 4er und 5er Konkatomere verwendet. Dabei wurde sich an ein Protokoll von Eric Campeau gehalten, welches im Anhang als Internetquelle zu finden ist. In einem 20 µl Ansatz wurden 1 µg Plasmid DNA mit 10-20 Units vom ersten Restriktionsenzym, welches nur eine Schnittstelle hat und mit dem daher vorständig verdaut werden soll, versetzt. Nach 1 h Inkubationszeit wurde der Ansatz mit 72 µl Wasser und 10 µl 10x Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde auf drei 1,5 ml Reaktionsgefäße a 20 µl und ein 1,5 ml Reaktionsgefäß a 10 µl aufgeteilt. In das Ausgangsgefäß wurden 10-20 Units des zweiten Restriktionsenzym zugesetzt, gut gemischt und 10 µl in das nächste Reaktionsgefäß überführt und so eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Reaktionsgefäße wurden bei der Verdünnung auf Eis gehalten und zum Start der Enzymreaktion bei der vom Hersteller angegeben Temperatur in den Thermocycler gestellt. Abhängig vom Enzym wurde dann 30 sec bis 6 min inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Ladepuffers gestoppt. Im Gel waren entsprechend mehrere Banden zu sehen, von denen die auserwählte ausgeschnitten und aufgearbeitet wurde.

2.4 Mikrobiologie

2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

Bei der Herstellung chemischer kompetenter *E. Coli* Bakterienzellen, Stamm DH5α, wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Inoue et al. verfahren, dass im Internet bei Flemington Lab erhältlich ist und im Anhang als Internetquelle angegeben ist. Es wurden 125 ml SOB Medium mit 50 µl *E. Coli* Zellen angeimpft und bei möglichst 18 °C wachsen gelassen, bis eine optische Dichte von 0,4-0,6 erreicht wurde. Geschüttelt wurde die Kultur dabei mit 200 rpm. Nachdem die optische Dichte erreicht wurde, wurden die Zellen bei 2500 g, 10 min, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen und mit 1/3 des Originalvolumens mit eiskaltem Transformationspuffer versetzt, vorsichtig resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen abermals zu gleichen Bedingungen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 1/12,5 des Originalvolumens mit eiskaltem Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert. Schließlich wurde 7% DMSO zugesetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 100-500 µl Portionen auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und unverzüglich bei -70 bis -80 °C eingefroren.

2.4.2 Bestimmung der Zellkompetenz

Die Zellkompetenz wurde nach Herstellung neuer kompetenter Zellen bestimmt. Dafür mussten die frisch hergestellten Zellen mindestens eine Nacht bei -70 bis -80 °C eingefroren gewesen sein. Ein Reaktionsgefäß mit 100 µl wurde auf Eis aufgetaut und mit 0,2 ng PUK18 DNA transformiert (siehe Kapitel 2.4.3). Eine Verdünnungsreihe wurde von den in SOC Medium angewachsenen Bakterien erstellt und auf Agarplatten aufgetragen. Anhand der gewachsenen Kolonien wurde die Kompetenz errechnet, die sich zwischen 10^6 bis 10^8 Kolonie bildenden Einheiten pro µg DNA befand.

2.4.3 Transformation von kompetenten Zellen

100-500 µl chemisch kompetente *E. Coli* Bakterienzellen, Stamm DH5α, die bei -70 bis -80 °C gelagert wurden, wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1/100 des Volumens der Bakteriensuspension an Plasmid DNA zugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze durch Umrühren vermischt. Die Bakterien wurden 20 min auf Eis stehen gelassen und schließlich bei 42 °C für 1 min erhitzt und direkt für 3 min auf Eis gesetzt. Durch den Hitze- und den anschließenden Kälteschock wurden die Membranen durchlässiger und nahmen die an der Oberfläche sitzende DNA leichter durch Endozytose auf. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf 1 ml mit SOC Medium aufgefüllt. 500 µl Ansätze wurden dazu auf 5 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Bei 37 °C wurden die Bakterien für 30 bis 40 min wachsen gelassen und anschließend auf Carbenicillin-haltige Agarplatten ausgestrichen. Bei Retransformationen wurden nur 20-50 µl verwendet, nach Klonierungen wurde meist die gesamte Bakteriensuspension aufgetragen. Dazu wurden die Bakterien abzentrifugiert bei 900 g für 7 min, ein Großteil des Überstandes verworfen und im Rest resuspendiert.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Auftauen von HEK 293 Zellen

HEK293 Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut. Dazu wurden die Zellen im 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut und in eine kleine Zellkulturflasche mit warmem Kulturmedium gegeben. Die Zellen wurden 4-6 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Feuchtigkeit) gelagert. Die Zellen waren dann soweit am Flaschenboden festgewachsen, dass das Medium abgenommen und durch neues, warmes Medium ersetzt werden konnte. Das Medium musste

wegen des zugesetzten DMSO, mit dem die Zellen im Stickstoff eingefroren werden, schnellstmöglich nach dem Anwachsen erneuert werden.

2.5.2 Kultur von HEK 293 Zellen

Zellen wurden in 550 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Einmal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die 20 ml Medium abgenommen und die Zellen mit Salzlösung vom Boden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml Medium resuspendiert und auf 160 bis 200 ml mit Medium aufgefüllt. 20 ml wurden in eine neue Zellkulturflasche oder Platten zur Transfektion überführt. Nach Passage 20 wurden die Zellen verworfen und neue aufgetaut.

2.5.3 Transfektion

Transfiziert wurde Plasmid-DNA mit der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode. Dazu wurde eine Calciumchlorid-Lösung 2,5 M zugegeben (Endkonzentration 0,156 M) und die Plasmid DNA mit Wasser zu 1 ml pro Platte verdünnt. Die Konzentrationen der Plasmid DNA sind in Tab. 18 aufgelistet. Anschließend wurde 1 ml HBS 2x zugesetzt und durch mehrmaliges Pipettieren der Lösung gemischt. Die Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes ist Tab. 23 zu entnehmen. Pro 145 mm Platte wurden 2 ml der Lösung gleichmäßig über die Fläche zugetropft und durch Schwenken der Platte verteilt. Durch die Zugabe von Calciumchlorid und HBS bildeten sich Calciumphosphat-Kristalle, an die die DNA oberflächlich gebunden wurde. Diese Kristalle wurden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen und die Plasmid DNA konnte im Inneren der Zelle transkribiert werden. Platten zur Transfektion wurden 3 bis maximal 4 Tage vor Transfektion mit Zellen bestückt, die sich in 20 ml Medium befanden. Konfluenz der Zellen bei Transfektion war 40-50 %. 16 bis 24 h nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch 15 ml frisches, warmes Medium ersetzt.

Tab. 23: Transfektionsansatz

Komponente	Platte (143 cm ²)	6-well (9,6 cm ²)
Plasmid-DNA	Tab.	Tab.
CaCl ₂ 2,5 M	0,125 ml	8,33 µl
HBS 2x	1 ml	66,7 µl
VE-Wasser	Auf 2 ml	Auf 133 µl

2.5.4 Ernten von Zellen und krude Membranpräparation

Etwa 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml kaltem PBS befüllt und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers von der Oberfläche abgelöst und in 50 ml Falcon Reaktionsgefäßen auf Eis gesammelt. Die Zellen wurden anschließend bei 300 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2-4 ml kaltem Tris/Citrat

Puffer 50 mM pro Platte aufgenommen und im Ultra Turrax für 15 sec zerkleinert. Die Zellmembranen wurden daraufhin durch Zentrifugation bei 4°C, 50000 g für 30 min von den löslichen Bestandteilen der Zellen getrennt und die Membranen anschließend noch einmal in kaltem Tris/Citrat Puffer 50 mM aufgenommen, resuspendiert und abzentrifugiert. Die kruden Membranen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.6 Präparative Chemie

Die Synthese der Leitstrukturen DS1 und DS2 sowie ihrer 25 Derivate wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für organische Synthese übernommen. Dazu gehören die AG Schirmeister im Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz, die AG Rösch aus dem Institut für Kernchemie, Universität Mainz und die AG Frølund aus dem Institut für Wirkstoff-Design und Pharmakologie der Universität Kopenhagen. Die Synthesen aller Verbindungen sind der gemeinsam veröffentlichten Publikation zu entnehmen.¹⁹⁹

2.7 Datenanalyse und Statistik

[³H]Liganden-Bindungsassays: Die Bindung wurde auf die Bindung des radioaktiven Liganden am ansprechenden GABAAR in fmol pro mg Protein angegeben. Dazu wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1) und die spezifische Bindung am eingesetzten Protein auf die zu erwartende Bindung an 1 mg Protein hochgerechnet.

Sucrosegradienten: In Prism 6.0 wurde die Gaußsche Verteilung im Sucrosegradienten der Standards und Rezeptoren ermittelt. Das Programm bediente sich dabei folgender Gleichung. $Y = \text{Amplitude} * e^{(-0,5 * ((X - \text{Mean}) / \text{SD})^2)}$. Mean beschreibt dabei den Erwartungswert, also den X-Wert im Zentrum der Verteilung, und SD das Maß für die Breite der Verteilung, angegeben in derselben Einheit wie die X-Werte.

[³H]EBOB-Modulation: Die nicht-lineare Regression wurde mit Prism 6.0 in der logarithmischen, vier-parametrischen Dosis-Wirkungs-Gleichung mit der Formel $(y = \text{min} + (\text{max} - \text{min}) / (1 + 10^{(\text{LogIC}_{50} - x) * \eta}))$ durchgeführt. Min und max beschreiben dabei den minimalen und maximalen Wert, x die Konzentration des Modulators in µM und η den Hillkoeffizienten. Hillkoeffizienten sind im Fall der [³H]EBOB-Modulation als pseudo-Hillkoeffizienten zu verstehen, da es sich um einen allosterischen und keinen direkten Effekt handelt. 100% wurde definiert als der maximale Bindungswert in Abwesenheit von Modulatoren und 0% wurde definiert als der unspezifische Wert in Anwesenheit eines Überschusses an nicht-radioaktivem EBOB. Das Maximum wurde konstant auf 100% gesetzt, während das Minimum gefittet wurde. Daten sind angegeben als Mittelwerte ± S.E.M. für IC₅₀-Kurven und Mittelwerte ± S.D. für die Effekte einzelner Konzentrationen.

Der Vergleich von Werten auf statistische Signifikanz erfolgte durch den Student's t-Test mit Prism 6.0. Dabei wurde als Signifikanzkriterium $p \leq 0,05$ festgelegt.

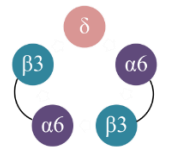

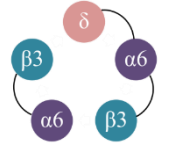
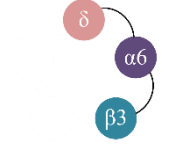
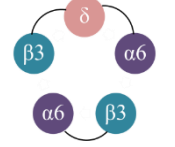

4 Ergebnisse


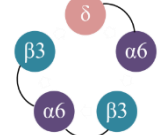

4.1 Charakterisierung von konkatameren Rezeptoren

Untersucht wurden Konkatamere, die kombiniert ein Pentamer bilden, welches die δ Untereinheit enthält und nach dem Schema $\beta_3\alpha\beta_3\alpha\delta$ aufgebaut ist. Diese Assemblierungsordnung ist von γ -enthaltenden GABA_AR übernommen worden, wobei ungewiss ist, ob die gleiche Reihenfolge auch für δ -enthaltende Rezeptoren gilt. Verwendet wurden Konkatamere, die entweder die α_1 oder die α_6 Untereinheit enthielten. Ausgetestet wurden die Konstrukte nach Transfektion in HEK293 Zellen und kruder Membrangewinnung in verschiedenen Radioliganden-Bindungsexperimenten.

4.1.1 Untersuchung α_6 -enthaltender 2er und 3er Konkatamere

Tab. 24: Bindung verschiedener Radioliganden an α_6 -enthaltende konkatamere Rezeptoren

Konkatamer	[³ H]Muscimol- [fmol/mg Protein]	n	[³ H]EBOB [fmol/mg Protein]	n	[³ H]EBOB + 10 μ M GABA [fmol/mg Protein]	n	Rezeptoraufbau
($\beta_3\alpha_6$) δ	285 \pm 46	4	112 \pm 18	3	40 \pm 3	3	
($\beta_3\alpha_6$)	328 \pm 37	3	163 \pm 77	3	82 \pm 53	3	
($\beta_3\alpha_6$) ($\beta_3\alpha_6\delta$)	194 \pm 71	3	78 \pm 33	3	44 \pm 14	3	
($\beta_3\alpha_6\delta$)	98 \pm 17	3	13 \pm 2	1	12 \pm 2	1	
($\alpha_6\beta_3$) ($\alpha_6\delta\beta_3$)	379 \pm 60	3	130 \pm 53	3	63 \pm 40	3	
($\alpha_6\beta_3$)	105 \pm 15	5	294 \pm 3	1	144 \pm 3	1	

Konkater	[³ H]Muscimol- [fmol/mg Protein]	n	[³ H]EBOB [fmol/mg Protein]	n	[³ H]EBOB + 10 μM GABA [fmol/mg Protein]	n	Rezeptoraufbau
(α6δβ3)	63 ± 11	2	n.d.	1	n.d.	1	
(β3α6β3)(α6δ)	259 ± 92	3	46 ± 22	3	34 ± 12	3	
(β3α6β3)	207 ± 48	2	210 ± 15	3	161 ± 79	2	

Gezeigt ist die Bindung von [³H]Muscimol und [³H]EBOB, sowie die Bindung von [³H]EBOB in Anwesenheit von 10 μM GABA an verschiedenen α6-enthaltenen GABA_AR, die aus Konkateren aufgebaut sind. Rezeptoren des Typs (β3α6) sind neben dem Konkater mit einer δ Untereinheit transfiziert worden und bestehen somit nicht vollständig aus verlinkten Untereinheiten. Zusätzlich kann man der Tabelle die Bindungsdaten von Artefakt-Rezeptoren entnehmen, die sich aus der Transfektion einzelner Konkater bilden und kein klassisches Pentamer ergeben sollten. Die Werte sind als Mittelwerte aus n Messungen ± SD angegeben. Drei der [³H]EBOB-Bindungswerte sind nur mit n=1 gemessen worden. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. n.d. (nicht detektierbar) wurde eingetragen, wenn sich die gemessenen Bindungswerte nicht signifikant von der unspezifischen Bindung unterschieden.

4.1.1.1 Untersuchung des dualen Konstrukts (β3α6) ± δ

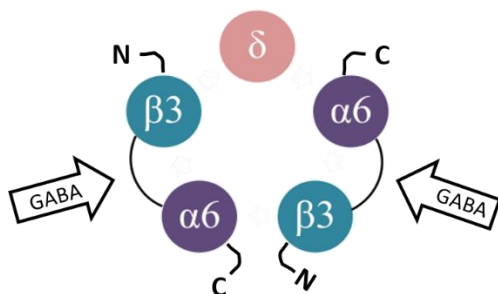


Abb. 8: Schematischer Aufbau von (β3α6)δ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von (β3α6) Konkateren bei Kotransfektion mit der δ Untereinheit.

Da sich die Konkater theoretisch gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus gesehen assemblieren,¹⁸³ sollten sich in der Kombination (β3α6) mit einer einzelnen δ Untereinheit zwei Konkater und eine δ Untereinheit nach dem Schema in Abb. 8 zusammenfinden. Die Ergebnisse mit [³H]Muscimol und [³H]EBOB sind in Tab. 24 zusammengefasst. Die [³H]Muscimol-Bindung, bezogen auf 1 mg Protein, betrug 285 ± 46 fmol. Die [³H]EBOB-Bindung belief sich auf 112 ± 18 fmol und die Bindung wurde in Anwesenheit von 10 μM des Agonisten GABA auf 44 ± 3 fmol reduziert. Prozentual bedeutete das eine Modulation von 61 ± 3%. Zur Kontrolle wurde das Konstrukt (β3α6) alleine transfiziert, um die Bildung von Artefakten zu überprüfen. Das Konstrukt zeigte eine

starke Artefakt-Bildung mit einer [^3H]Muscimol-Bindung von 328 ± 37 fmol/mg Protein und [^3H]EBOB-Bindung von 163 ± 77 fmol (Tab. 24). 10 μM GABA konnte die [^3H]EBOB-Bindung auf 82 ± 53 fmol/mg Protein modulieren, wobei diese Reduktion nicht signifikant war. Das gebildete Rezeptor-Artefakt besitzt somit neben einer Bindestelle für GABA auch einen Ionenkanal mit EBOB-Bindestelle.

Das Konkatamer ($\beta 3\alpha 6$) wurde mit verschiedenen Antikörpern auch im Western Blot untersucht. Dabei ging es vor allem um das Ausschließen von degradierten Linkern, die einzelne Untereinheiten freisetzen würden. Mit den Antikörpern gegen $\beta 2/3$, $\alpha 6$ und bd28 gegen sämtliche $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ Untereinheiten zeigte sich jeweils eine Bande bei ca. 100 kDa (Abb. 9). Das entsprach der erwarteten Größe eines Konkatamers aus zwei Untereinheiten. Der Antikörper gegen $\beta 2/3$, dessen Epitop im N-terminalen Bereich der $\beta 2/3$ Untereinheit liegt, konnte in diesem Fall benutzt werden, da der N-terminale Bereich der $\beta 3$ Untereinheit in dem Konkatamer nicht verlinkt ist. Der $\alpha 6$ -Antikörper hat sein Epitop im intrazellulären Loop zwischen M3 und M4 der $\alpha 6$ Untereinheit und konnte somit auch an der N-terminal verlinkten $\alpha 6$ Untereinheit binden. Der bd28 Antikörper richtet sich gegen sämtliche Untereinheiten des $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$, außer der $\alpha 4$ Untereinheit. Mit keinem der verwendeten Antikörper konnten Banden im Bereich einer einzelnen Untereinheit, die im Größenbereich von ca. 50 kDa liegt, detektiert werden. Daher wurde bei diesem Konstrukt nicht von proteolytischer Spaltung ausgegangen.

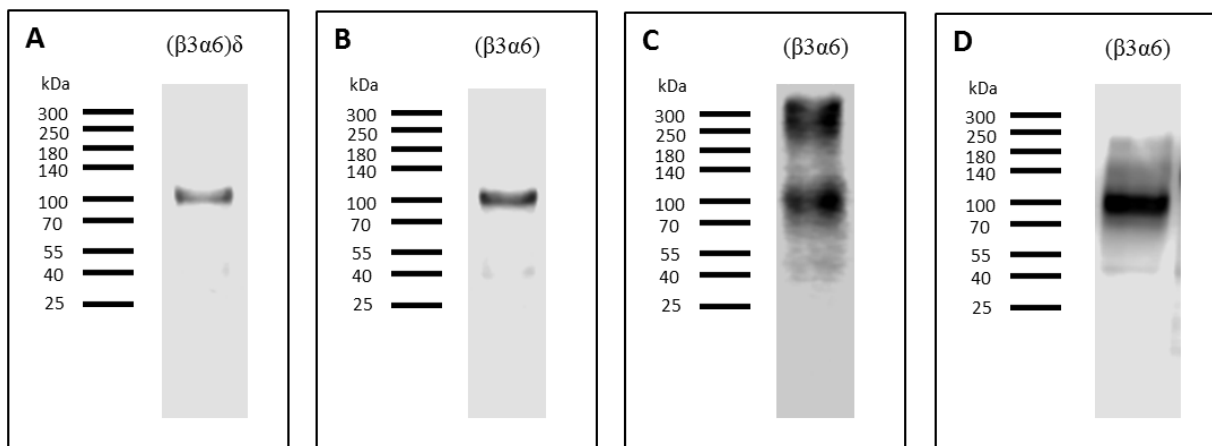


Abb. 9: Western Blots von ($\beta 3\alpha 6$) Konkatameren. A, B: Detektion von ($\beta 3\alpha 6$) mit dem $\beta 2/3$ Antikörper 1:5000. Im Fall von (A) wurde das Konkatamer zusammen mit der δ Untereinheit transfiziert. C: Detektion von ($\beta 3\alpha 6$) mit dem $\alpha 6$ Antikörper 1:2500. D: Detektion von ($\beta 3\alpha 6$) mit dem bd28 Antikörper 1:500. Es wurden 8%ige Trenngele verwendet.

4.1.1.2 Untersuchungen des dualen Konstrukts ($\beta 3\alpha 6$) in Kombination mit ($\beta 3\alpha 6\delta$)

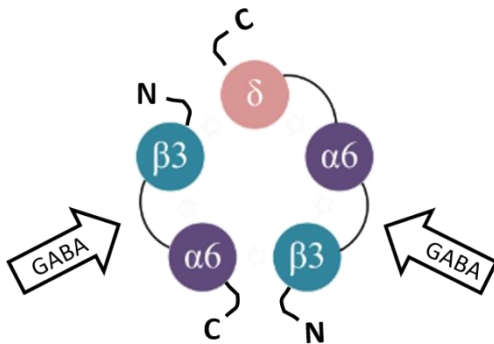


Abb. 10: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha 6$)($\beta 3\alpha 6\delta$) Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von ($\beta 3\alpha 6$) Konkatameren bei Kotransfektion mit ($\beta 3\alpha 6\delta$) Konkatameren.

Neben der Möglichkeit, das Konkatamer ($\beta 3\alpha 6$) mit einer einzelnen δ Untereinheit zu transfizieren, kann man es auch mit dem 3er Konstrukt ($\beta 3\alpha 6\delta$) kombinieren. Beide Konkatamere sollten theoretisch ein Rezeptor-Pentamer mit der Abfolge $\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$ ergeben (Abb. 10). Die [^3H]Muscimol-Bindung belief sich auf 194 ± 71 fmol/mg Protein, die [^3H]EBOB-Bindung auf 78 ± 33 fmol (Tab. 24). Diese konnte durch Zugabe von $10 \mu\text{M}$ GABA um $43 \pm 17\%$ auf 45 ± 14 fmol moduliert werden. Wurde das Konstrukt ($\beta 3\alpha 6\delta$) alleine transfiziert, scheint auch hier ein Komplex mit GABA-Bindestelle gebildet zu werden, da [^3H]Muscimol binden konnte (Tab. 24). Allerdings war die [^3H]EBOB-Bindung kaum mehr nachweisbar. Es wurden also auch bei diesem Konstrukt Artefakte gebildet. Diese besitzen jedoch keine Bindestelle für [^3H]EBOB und damit eventuell auch keinen funktionstüchtigen Ionenkanal.

Auf Western Blots des Konkatamers ($\beta 3\alpha 6\delta$) mit verschiedenen Antikörpern ist jeweils eine Bande im Bereich von 150 kDa zu sehen, wie man sie für ein Konstrukt, das aus drei GABA_AR Untereinheiten besteht, erwarten würde. Auch bei diesem Konstrukt konnte keiner der verwendeten Antikörper eine Bande im Bereich 50 kDa anfärben, die auf eine einzelne Untereinheit hingedeutet hätte (Abb. 11). Denkbar wäre auch eine teilweise Proteolyse bei der nur ein Linker abgebaut würde. Eine daraus resultierende Bande bei 100 kDa konnte aber ebenfalls nicht detektiert werden. Die Ergebnisse aus den Western Blot Untersuchungen schließen somit auch für das Konkatamer ($\beta 3\alpha 6\delta$) einen proteolytischen Abbau aus. Mit den Antikörpern bd28 und anti- $\alpha 6$ wurden auch Western Blots aus der Kombination ($\beta 3\alpha 6$)($\beta 3\alpha 6\delta$) angefärbt. Im Fall von bd28 konnte man deutlich zwei Banden erkennen. Eine im Bereich 150 kDa, die dem 3er Konstrukt zugeordnet wurde und eine im Bereich 100 kDa, die dem 2er Konstrukt zugeordnet wurde. Im Fall des $\alpha 6$ -Antikörpers war die Bande des ($\beta 3\alpha 6$) Konstrukts besonders deutlich zu erkennen und die des 3er Konstrukts war eher schwach ausgeprägt.

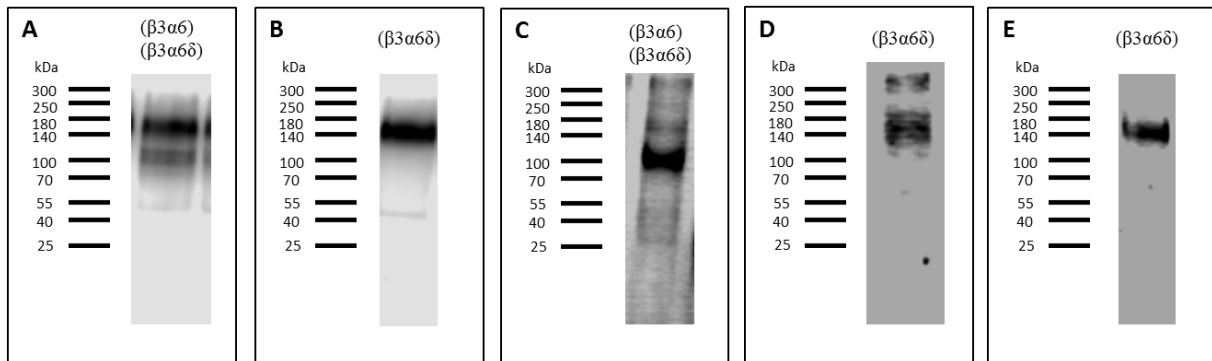


Abb. 11: Western Blots von ($\beta3\alpha6$) und ($\beta3\alpha6\delta$) Konkataleren. A, B: Detektion von ($\beta3\alpha6\delta$) mit dem bd28 Antikörper 1:500. Im Fall von (A) wurde das Konkataler zusammen mit dem ($\beta3\alpha6$) Konkataler transfiziert. C, D: Detektion von ($\beta3\alpha6\delta$) mit dem $\alpha6$ Antikörper 1:2500. Im Fall von (C) wurde das Konkataler zusammen mit dem ($\beta3\alpha6$) Konkataler transfiziert. E: Detektion von ($\beta3\alpha6\delta$) mit dem $\beta2/3$ Antikörper 1:5000. Es wurden 8%ige Trennenge verwendet.

4.1.1.3 Untersuchungen des dualen Konstrukts ($\alpha6\beta3$) in Kombination mit ($\alpha6\delta\beta3$)

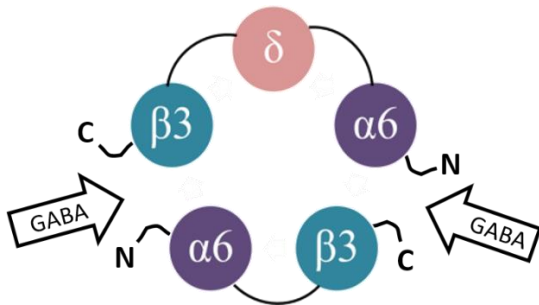


Abb. 12: Schematischer Aufbau von ($\alpha6\beta3$)($\alpha6\delta\beta3$) Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von ($\alpha6\beta3$) Konkataleren bei Kofunktions mit ($\alpha6\delta\beta3$) Konkataleren.

Abb. 12 zeigt die Zusammensetzung des Rezeptors bei Transfektion von ($\alpha6\beta3$) und ($\alpha6\delta\beta3$) Konstrukten. Auch hier wird die Reihenfolge $\beta3\alpha6\beta3\alpha6\delta$ gewahrt, wenn beide Konkatalere sich gegen den Uhrzeigersinn assemblieren und beide in das Pentamer eingebaut werden. Die Bindung von [^3H]Muscimol belief sich auf 379 ± 60 fmol/mg Protein, die [^3H]EBOB-Bindung auf 130 ± 53 fmol/mg Protein (Tab. 24). Die Modulation mit $10 \mu\text{M}$ GABA betrug $51 \pm 31\%$ und reduzierte die [^3H]EBOB-Bindung auf 63 ± 40 fmol/mg Protein. Das Konstrukt ($\alpha6\beta3$) alleine lieferte in der [^3H]Muscimol-Bindung mit 397 ± 56 fmol/mg Protein ebenso hohe Werte wie das Konstrukt in Kombination mit dem passenden Gegenstück ($\alpha6\delta\beta3$). Die Bindungswerte aus der [^3H]Muscimol-Bindung mit dem Konkataler ($\alpha6\delta\beta3$) lagen zwar niedriger, waren aber mit 239 ± 41 fmol/mg Protein dennoch nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,1893$) zu der Bindung an den ($\alpha6\beta3$)($\alpha6\delta\beta3$) Rezeptor. Bei diesen beiden Konkataleren zeigten sich somit wieder Artefakte, die einen Rezeptor bilden, der zumindest eine GABA-Bindestelle besitzt.

In Western Blot Untersuchungen zu den Konkataleren ($\alpha6\beta3$) und ($\alpha6\delta\beta3$) wurden Banden im Bereich 100 kDa (2er Konstrukt) und 150 kDa (3er Konstrukt) detektiert (Abb. 13). Anfärbt werden konnten die Blots nur mit dem $\alpha6$ -Antikörper und bd28-Antikörper, da der $\beta2/3$ -Antikörper $\beta2/3$

Untereinheiten, die N-terminal verlinkt sind nicht erkennen kann. Es konnten zu beiden Konstrukten keine Banden im Bereich 50 kDa detektiert werden, was auch hier gegen eine Proteolyse der Linker spricht. Bei teilweiser Proteolyse des 3er Konstrukts wäre auch eine Bande im Bereich 100 kDa denkbar. Diese war beim einzeln transfizierten Konkatermer aber ebenfalls nicht sichtbar.

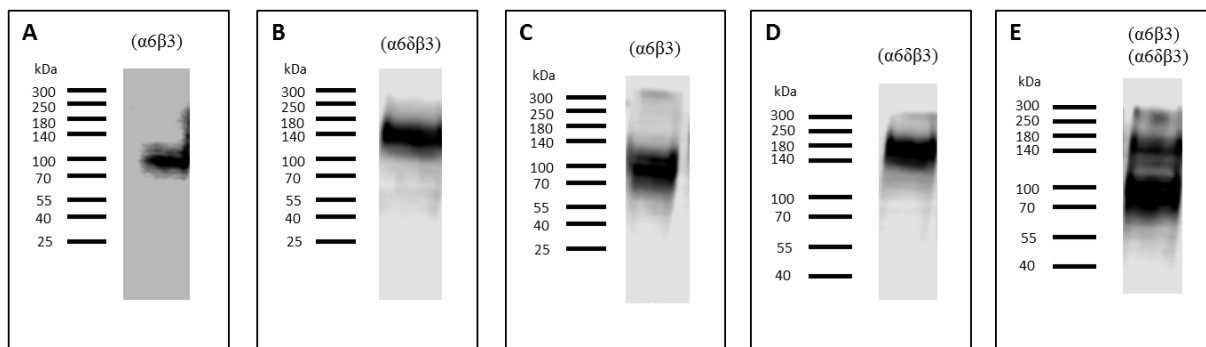


Abb. 13: Western Blots von $(\alpha 6\beta 3)$ und $(\alpha 6\delta\beta 3)$ Konkatermen. A: Detektion von $(\alpha 6\beta 3)$ mit dem bd28 Antikörper 1:500. B: Detektion von $(\alpha 6\delta\beta 3)$ mit dem bd28 Antikörper 1:500. C: Detektion von $(\alpha 6\beta 3)$ mit dem $\alpha 6$ Antikörper 1:2500. D: Detektion von $(\alpha 6\delta\beta 3)$ mit dem $\alpha 6$ Antikörper 1:2500. E: Detektion von $(\alpha 6\beta 3)$ und $(\alpha 6\delta\beta 3)$ mit dem $\alpha 6$ Antikörper 1:2500. Es wurden 8%ige Trenngele verwendet.

4.1.1.4 Untersuchungen des 3er Konkatermers ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) in Kombination mit ($\alpha 6\delta$)

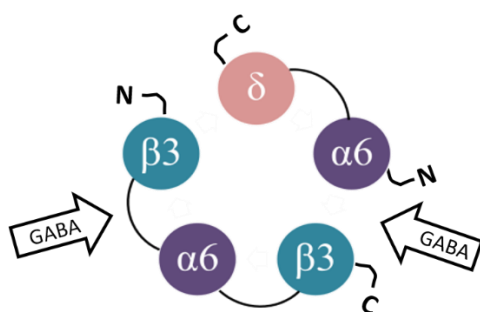


Abb. 14: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 6\beta 3)(\alpha 6\delta)$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von $(\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkatermen bei Kofunktion mit $(\alpha 6\delta)$ Konkatermen.

Die Konkaterme $(\beta 3\alpha 6\beta 3)$ und $(\alpha 6\delta)$ sollten sich nach dem in Abb. 14 dargestellten Schema zusammenfügen, wobei wieder die Reihenfolge $\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$ zustande kommt. In Bindungsstudien belief sich die $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung auf 259 ± 92 fmol/mg Protein und die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung auf 46 ± 22 fmol (Tab. 24). Diese ließ sich mit 34 ± 12 fmol nur unsignifikant modulieren ($p = 0.4502$). Da das duale Konstrukt $(\alpha 6\delta)$ ohne eine $\beta 3$ Untereinheit keine GABA-Bindestelle bilden kann, wurden hierzu auch keine Kontrollen durchgeführt. Kontrolluntersuchung des 3er Konstrukts ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) zeigten wieder eine hohe $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung. Die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung lag mit 210 ± 15 fmol/mg Protein ebenfalls sehr hoch. Die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung wurde durch $10 \mu\text{M}$ GABA auf 161 ± 79 fmol/mg Protein moduliert. Dieser Effekt war wiederum nicht signifikant ($p = 0,3381$).

Die Western Blot Untersuchungen der Konstrukte ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) und ($\alpha 6\delta$) sind in Abb. 15 dargestellt. Mit dem $\beta 2/3$ -Antikörper konnte sowohl in der einzeln transfizierten als auch in der kombiniert transfizierten Probe nur eine Bande bei 150 kDa detektiert werden, die dem Konkater ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) zugeordnet wurde. Der bd28-Antikörper vermochte zwei Banden anzufärben. Die Bande im Bereich 100 kDa wurde dem 2er Konstrukt ($\alpha 6\delta$) und die Bande im Bereich 150 kDa dem 3er Konstrukt ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) zugeordnet. Das Fehlen einer Bande im Bereich 50 oder 100 kDa deutet auf nicht-proteolytierte Linker hin.

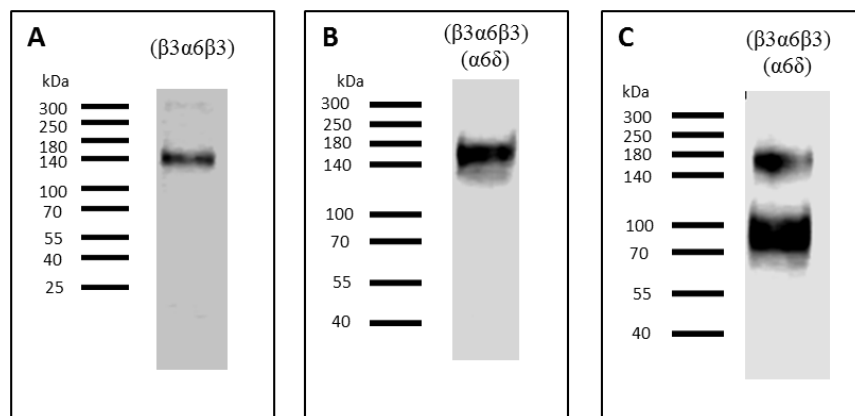
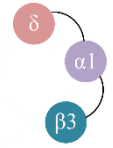
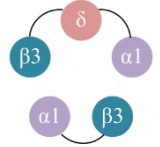


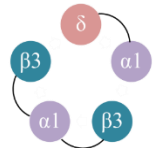
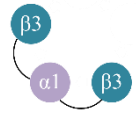


Abb. 15: Western Blots von ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) und ($\alpha 6\delta$) Konkateren. A, B: Detektion von ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) mit dem $\beta 2/3$ Antikörper 1:5000. Im Fall von (B) wurde das Konkater zusammen mit dem ($\alpha 6\delta$) Konkater transfiziert C: Detektion von ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) und ($\alpha 6\delta$) mit dem bd28 Antikörper 1:500. Es wurden 8%ige Trenngele verwendet.

4.1.2 Untersuchung $\alpha 1$ -enthaltender 2er und 3er Konkater

Tab. 25: Bindung verschiedener Radioliganden an $\alpha 1$ -enthaltende konkaterne Rezeptoren

Konkater	[^3H]Muscimol [fmol/mg Protein]	n	[^3H]EBOB [fmol/mg Protein]	n	[^3H]EBOB + 10 μM GABA [fmol/mg Protein]	n	Rezeptoraufbau
($\beta 3\alpha 1$) δ	45 ± 7	3	n.d.	3	n.d.	3	
($\beta 3\alpha 1$)	34 ± 14	3	n.d.	1	n.d.	1	
($\beta 3\alpha 1$) ($\beta 3\alpha 1\delta$)	54 ± 1	2	n.d.	3	n.d.	3	

Konkater	[³ H]Muscimol [fmol/mg Protein]	n	[³ H]EBOB [fmol/mg Protein]	n	[³ H]EBOB + 10 μM GABA [fmol/mg Protein]	n	Rezeptoraufbau
(β3α1δ)	n.d.	3					
(α1β3) (α1δβ3)	86 ± 2	3	42 ± 18	3	18 ± 6	2	
(α1β3)	124 ± 27	3	80 ± 4	1	23 ± 2	1	
(α1δβ3)	50 ± 3	3	6 ± 1	1	7 ± 1	1	
(β3α1β3)(α6δ)	57 ± 22	3	n.d.	3	n.d.	3	
(β3α1β3)	15 ± 2	1					

Gezeigt ist die Bindung von [³H]Muscimol und [³H]EBOB, sowie die Bindung von [³H]EBOB in Anwesenheit von 10 μM GABA an verschiedenen α1-enthaltenen GABA_AR, die aus Konkateren aufgebaut sind. Rezeptoren des Typs (β3α1) sind neben dem Konkater mit einer δ Untereinheit transfiziert worden und bestehen somit nicht vollständig aus verlinkten Untereinheiten. Zusätzlich kann man der Tabelle die Bindungsdaten von Artefakt-Rezeptoren entnehmen, die sich aus der Transfektion einzelner Konkater bilden und kein klassisches Pentamer ergeben sollten. Die Werte sind als Mittelwerte von n Messungen ± SD angegeben. Einige der [³H]EBOB-Bindungswerte sind nur mit n=1 gemessen worden. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. n.d. (nicht detektierbar) wurde eingetragen, wenn sich die gemessenen Bindungswerte nicht signifikant von der unspezifischen Bindung unterschieden.

4.1.2.1 Untersuchung des dualen Konstrukts ($\beta 3\alpha 1$) \pm δ

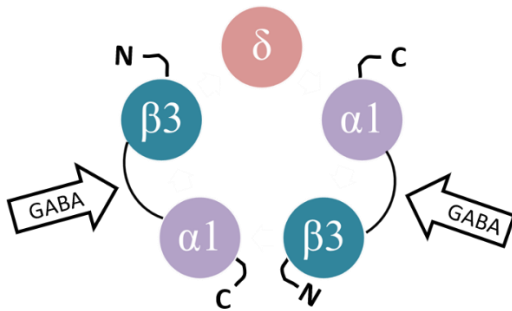


Abb. 16: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha 1$) δ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von ($\beta 3\alpha 1$) Konkatameren bei Kotransfektion mit der δ Untereinheit.

Entsprechend den Untersuchungen mit $\alpha 6$ -enthaltenden Konkatameren sollte sich das ($\beta 3\alpha 1$) Konstrukt, das zusammen mit einer δ Untereinheit transfiziert wird zu der in Abb. 16 dargestellten Anordnung zusammensetzen. Bindungsstudien ergaben eine [^3H]Muscimol-Bindung von 45 ± 7 fmol/mg Protein (Tab. 25). Die [^3H]EBOB-Bindung war dagegen nicht mehr messbar. Zur Kontrolle wurde das Konstrukt ($\beta 3\alpha 1$) alleine transfiziert um die Bildung von Artefakten zu überprüfen. Das Konstrukt zeigte eine [^3H]Muscimol-Bindung von 34 ± 14 fmol/mg Protein (Tab. 25). Die [^3H]Muscimol-Bindung mit 34 ± 14 fmol mutet zuerst sehr niedrig an, ist in Bezug zur Bindung an das Gesamtkonstrukt ($\beta 3\alpha 1$) δ mit 45 ± 7 fmol aber relevant. Es bedeutet, dass auch das Artefakt eine GABA-Bindestelle aufweist und in ähnlichem Umfang gebildet wird wie der Rezeptor ($\beta 3\alpha 1$) δ .

Die Western Blot Untersuchungen mit $\alpha 1$ - und $\beta 2/3$ -Antikörpern zeigten eine Bande im Bereich 100 kDa, wie sie für ein Konstrukt aus zwei GABA_AR Untereinheiten zu erwarten war (Abb. 17). Das einzeln transfizierte Konkatamer ($\beta 3\alpha 1$) zeigte mit dem $\alpha 1$ -Antikörper eine starke Bande oberhalb von 300 kDa, die direkt am Phasenübergang zwischen Sammel- und Trenngel lag und damit vermutlich auf einen unzureichenden Übertritt der Proteine ins Trenngel zurückzuführen ist. Das Fehlen einer Bande im Bereich 50 kDa lässt auf intakte Konkatamere schließen.

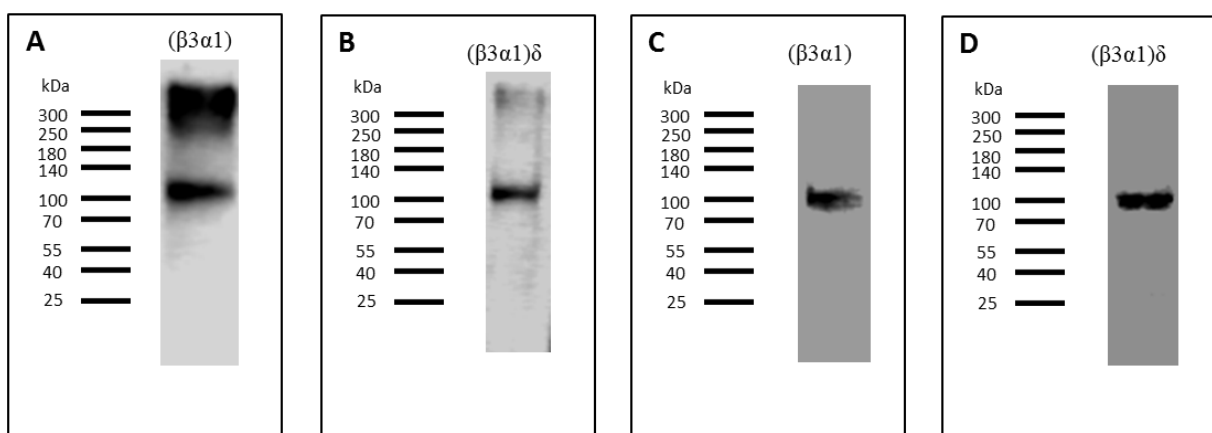


Abb. 17: Western Blots von ($\beta 3\alpha 1$) Konkatameren. A, B: Detektion von ($\beta 3\alpha 1$) mit dem $\alpha 1$ Antikörper 1:2500. Im Fall von (B) wurde das Konkatamer zusammen mit der δ Untereinheit transfiziert. C, D: Detektion von ($\beta 3\alpha 1$) mit dem $\beta 2/3$ Antikörper 1:5000. Im Fall von (D) wurde das Konkatamer zusammen mit der δ Untereinheit transfiziert. Es wurden 8%ige Trenngele verwendet.

4.1.2.2 Untersuchung des dualen Konstrukts ($\beta 3\alpha 1$) in Kombination mit ($\beta 3\alpha 1\delta$)

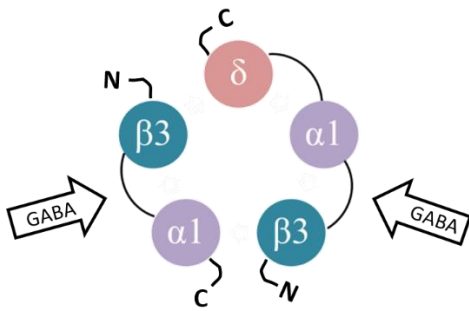


Abb. 18: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha 1$)($\beta 3\alpha 1\delta$) Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von ($\beta 3\alpha 1$) Konkatameren bei Kotransfektion mit ($\beta 3\alpha 1\delta$) Konkatameren.

Neben der Möglichkeit das Konkatamer ($\beta 3\alpha 1$) mit einer einzelnen δ Untereinheit zu transfizieren, kann man es auch mit dem 3er Konstrukt ($\beta 3\alpha 1\delta$) kombinieren. Beide Konkatamere sollten theoretisch ein Rezeptor-Pentamer mit der Abfolge $\beta 3\alpha 1\beta 3\alpha 1\delta$ ergeben (Abb. 18). Die [^3H]Muscimol-Bindung pro mg Protein belief sich auf 54 ± 1 fmol/mg Protein, die [^3H]EBOB-Bindung war nicht messbar (Tab. 25). Eine [^3H]Muscimol-Bindung beim einzeln transfizierten ($\beta 3\alpha 1\delta$) Konkatamer konnte nicht detektiert werden (Tab. 25).

Bei Western Blot Untersuchungen des Konkatamers ($\beta 3\alpha 1\delta$) bzw. der transfizierten Kombination aus beiden Konkatameren, konnte mit den verschiedenen Antikörpern eine Bande im Bereich 150 kDa detektiert werden, die dem 3er Konstrukt zugeordnet wurde. Bei den kombiniert transfizierten Konkatameren war die 100 kDa-Bande des 2er Konstrukts intensiver als die des 3er Konstrukts, was auf eine geringere Expression des 3er Konstrukts hindeuten könnte. Ein ähnliches Bild lieferte der $\alpha 6$ -Antikörper mit den Rezeptoren ($\beta 3\alpha 6$)($\beta 3\alpha 6\delta$) (siehe Kapitel 4.1.1.2 Untersuchungen des dualen Konstrukts ($\beta 3\alpha 6$) in Kombination mit ($\beta 3\alpha 6\delta$)). Abgespaltene Untereinheiten konnten nicht detektiert werden. Diese würde man bei kompletter Proteolyse der Linker im Bereich 50 kDa erwarten, bei teilweiser Proteolyse auch im Bereich 100 kDa.

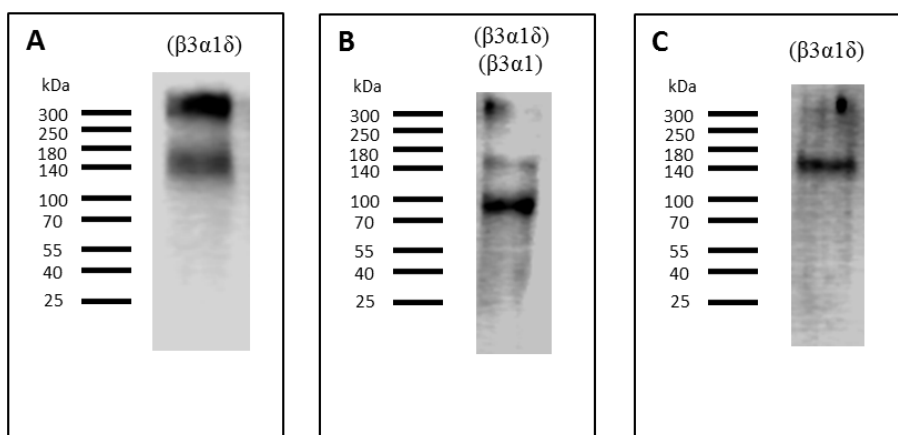


Abb. 19: Western Blots von ($\beta 3\alpha 1$) und ($\beta 3\alpha 1\delta$) Konkatameren. A, B: Detektion von ($\beta 3\alpha 1\delta$) mit dem $\alpha 1$ Antikörper 1:2500. Im Fall von (B) wurde das Konkatamer zusammen mit dem ($\beta 3\alpha 1$) Konkatamer transfiziert. C: Detektion von ($\beta 3\alpha 1\delta$) mit dem $\beta 2/3$ Antikörper 1:5000. Es wurden 8%ige Trenngele verwendet.

4.1.2.3 Untersuchung des dualen Konstrukts ($\alpha 1\beta 3$) in Kombination mit ($\alpha 1\delta\beta 3$)

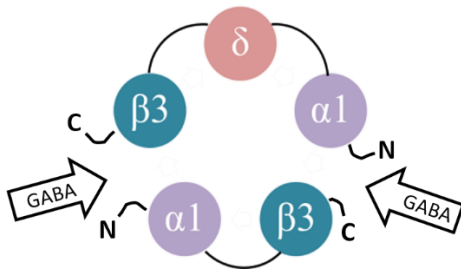


Abb. 20: Schematischer Aufbau von ($\alpha 1\beta 3$)($\alpha 1\delta\beta 3$) Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von ($\alpha 1\beta 3$) Konkatameren bei Kotransfektion mit ($\alpha 1\delta\beta 3$) Konkatameren.

Die Zusammensetzung des Rezeptors bei Transfektion von ($\alpha 1\beta 3$) und ($\alpha 1\delta\beta 3$) Konstrukten ist in Abb. 20 dargestellt. Auch hier wird die Reihenfolge $\beta 3\alpha 1\beta 3\alpha 1\delta$ gewahrt, wenn beide Konkatamere sich gegen den Uhrzeigersinn zusammensetzen und beide in das Rezeptor-Pentamer eingebaut werden. Die Bindung von [^3H]Muscimol belief sich auf 86 ± 2 fmol/mg Protein, die [^3H]EBOB-Bindung auf 42 ± 18 fmol/mg Protein. Die Modulation mit 10 μM GABA betrug $57 \pm 15\%$ und modulierte die [^3H]EBOB-Bindung auf 18 ± 6 fmol/mg Protein. Das Konstrukt ($\alpha 1\beta 3$) alleine lieferte in der [^3H]Muscimol-Bindung höhere Werte (124 ± 27 fmol/mg Protein) als das Konstrukt in Kombination mit dem passenden Gegenstück ($\alpha 1\delta\beta 3$). Die Bindungswerte aus der [^3H]Muscimol-Bindung an das Konkatamer ($\alpha 1\delta\beta 3$) lagen niedriger, waren aber mit 50 ± 3 fmol/mg Protein dennoch deutlich messbar. Die Konkatamere ($\alpha 1\beta 3$) und ($\alpha 1\delta\beta 3$) zeigten dabei sowohl einzeln als auch in Kombination höhere Werte als ($\beta 3\alpha 1$) δ oder ($\beta 3\alpha 1$)($\beta 3\alpha 1\delta$). Einzeln transfizierte ($\alpha 1\beta 3$) und ($\alpha 1\delta\beta 3$) Konkatamere sind in der Lage Komplexe zu bilden, die eine GABA-Bindestelle aufweisen.

Die Ergebnisse der Western Blot Untersuchungen zu den Konkatameren ($\alpha 1\beta 3$) und ($\alpha 1\delta\beta 3$) sind in Abb. 21 dargestellt. Beide Konstrukte wurden einzeln transfiziert und mit dem bd28-Antikörper untersucht. Die Bande bei Untersuchung des Konstrukts ($\alpha 1\beta 3$) lag bei 100 kDa und die des Konstrukts ($\alpha 1\delta\beta 3$) bei 150 kDa. Es konnten keine Spaltprodukte bei 100 kDa oder 50 kDa detektiert werden. Bei dem Konstrukt ($\alpha 1\delta\beta 3$) konnte man jedoch eine schwache Bande im Bereich 60 kDa erkennen.

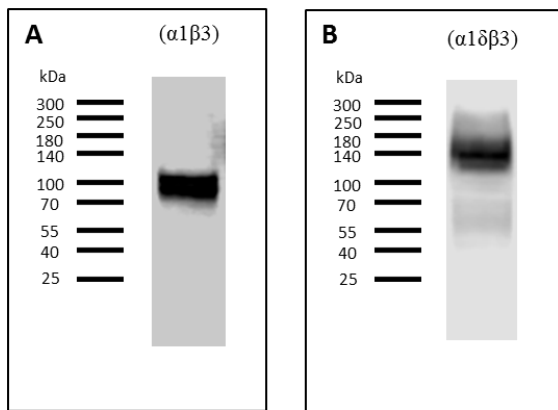


Abb. 21: Western Blots von $(\alpha 1\beta 3)$ und $(\alpha 1\delta\beta 3)$ Konkatameren. A: Detektion von $(\alpha 1\beta 3)$ mit dem bd28 Antikörper 1:500. B: Detektion von $(\alpha 1\delta\beta 3)$ mit dem bd28 Antikörper 1:500. Es wurden 8%ige Trenngele verwendet.

4.1.2.4 Untersuchung des 3er Konkatamers ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) in Kombination mit ($\alpha 1\delta$)

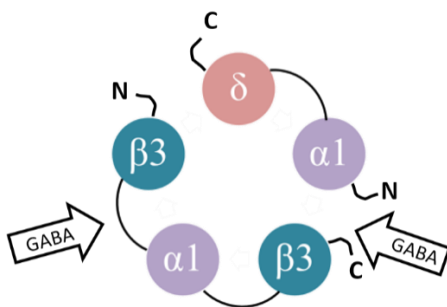


Abb. 22: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 1\beta 3)(\alpha 1\delta)$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von $(\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkatameren bei Kotransfektion mit $(\alpha 1\delta)$ Konkatameren.

Bei Transfektion von $(\beta 3\alpha 1\beta 3)$ und $(\alpha 1\delta)$ Konkatameren kommt wieder die Reihenfolge $\beta 3\alpha 1\beta 3\alpha 1\delta$ zustande (Abb. 22). Die $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung belief sich auf 57 ± 22 fmol/mg Protein (Tab. 25). Eine $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung konnte nicht gemessen werden. Da das duale Konstrukt $(\alpha 1\delta)$ ohne eine $\beta 3$ Untereinheit keine GABA-Bindestelle bilden kann, wurden hierzu keine Kontrollen durchgeführt. Die Kontrolluntersuchung des 3er Konstrukts $(\beta 3\alpha 1\beta 3)$ ergab eine $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung von 15 ± 2 fmol/mg Protein (Tab. 25). Dieser Wert war zwar sehr gering, deutet aber auch hier die auf die Anwesenheit einer GABA-Bindestelle hin.

Die Western Blot Untersuchung des $(\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkatamers sind in Abb. 23 dargestellt. Mit dem $\alpha 1$ - und $\beta 2/3$ -Antikörper konnte jeweils eine Bande im Bereich 150 kDa angefärbt werden. Beim Western Blot mit dem $\alpha 1$ -Antikörper zeigte sich eine Bande oberhalb von 300 kDa, die direkt am Phasenübergang zwischen Sammel- und Trenngel lag und damit vermutlich auf einen unzureichenden Übertritt der Proteine in das Trenngel zurückzuführen ist. Es waren keine Banden im Bereich 50 kDa oder 100 kDa zu erkennen. Eine Proteolyse der Linker liegt also auch bei diesem Konkatamer nicht nahe.

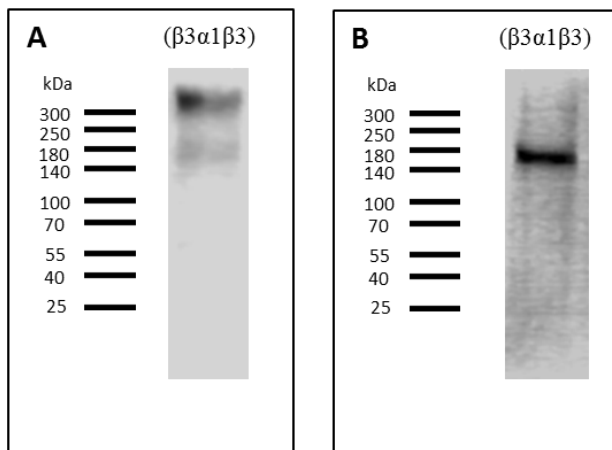


Abb. 23: Western Blots von ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) Konkateren. A: Detektion von ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) mit dem $\alpha 1$ Antikörper 1:2500. B: Detektion von ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) mit dem $\beta 2/3$ Antikörper 1:5000. Es wurden 8%ige Trenngele verwendet.

4.1.3 Untersuchung auf Degradation der Linkersequenzen

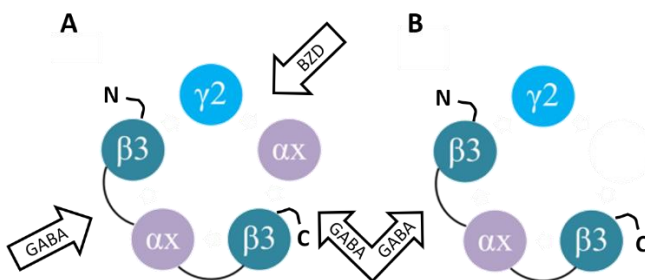


Abb. 24: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha x\beta 3$) $\alpha x\gamma 2$. A: Erwartete Zusammensetzung von ($\beta 3\alpha x\beta 3$) Konkateren bei Koverexpression mit der entsprechenden αx Untereinheit sowie einer $\gamma 2$ Untereinheit. B: Transfektion von ($\beta 3\alpha x\beta 3$) Konkateren mit einer einzelnen $\gamma 2$ Untereinheit. Bei intakten Linkern darf sich hier keine Benzodiazepin-Bindestelle bilden.

Generell stellte sich die Frage, ob Artefakte auch deshalb entstehen können, weil die Linker zwischen den Untereinheiten nicht stabil sind. Für Untereinheiten, die im Konkater an erster Stelle stehen und im C-terminalen Bereich verlinkt sind, kann man sich dieses Szenario durchaus vorstellen. Bei Untereinheiten, die im Konkater an zweiter oder dritter Stelle stehen und deren Signalpeptid bereits zur Herstellung der Konstrukte aus der DNA-Sequenz entfernt wurde, fällt die Vorstellung einer erfolgreichen Zusammensetzung mit anderen Untereinheiten zu einem Rezeptorkomplex schwerer. Eine einfache Möglichkeit, die Konstrukte auf Zerfall zu untersuchen, ist die Western Blot Analyse. Diese wurde für alle relevanten 2er und 3er Konkater, sowie auch für die später beschriebenen 4er und 5er Konkater durchgeführt. Gerade bei den 2er und 3er Konkater konnte dabei fast nie eine Bande im Bereich 50 kDa detektiert werden. Eine Bande im Bereich 100 kDa würde bei den 3er Konstrukten auf eine teilweise Proteolyse der Linker hinweisen, aber auch diese konnte nicht detektiert werden.

Neben der Analyse durch Western Blots wurden auch einige Experimente in radioaktiven Bindungsassays durchgeführt, die der Frage nach abgebauten Linkern und daraus resultierenden wieder frei assemblierenden Untereinheiten nachgehen.

4.1.3.1 [³H]RO15-4513-Bindung an ($\beta 3\alpha x\beta 3$)-enthaltenden Konkatameren

Konkret getestet wurden die Konkatamere ($\beta 3\alpha 1/4/6\beta 3$), welche zusammen mit der $\gamma 2$ Untereinheit und jeweils mit und ohne eine zusätzliche α Untereinheit transfiziert wurden. Die Konkatamere ($\beta 3\alpha 1/4/6\beta 3$) zusammen mit der $\gamma 2$ Untereinheit, könnten in Abwesenheit einer weiteren α Untereinheit zwar Artefakte bilden, diese sollten aber keine Benzodiazepin-Bindestelle aufweisen. Die Benzodiazepin-Bindestelle liegt ausschließlich zwischen α und γ Untereinheit und ist mithilfe des radioaktiven Liganden [³H]RO15-4513 messbar. Sollten die Linkersequenzen proteolysiert werden und daraus einzelne Untereinheiten freigesetzt werden, könnte man vermuten, dass [³H]RO15-4513 an eine damit ermöglichte Benzodiazepin-Bindestelle bindet. Auch eine teilweise Proteolyse der Konkatamere in ($\beta 3\alpha x$) und ($\alpha x\beta 3$) Konstrukte würde zusammen mit der $\gamma 2$ Untereinheit eventuell zu Rezeptoren mit Benzodiazepin-Bindestelle führen. Wieso das Konstrukt ($\alpha x\beta 3$) in Kombination mit der $\gamma 2$ Untereinheit eine Benzodiazepin-Bindestelle bilden kann, obwohl es sich theoretisch gegen den Uhrzeigersinn assemblieren und damit eine β - γ Nachbarschaft bilden sollte, wird in Kapitel 4.1.6.1 [³H]RO15-4513-Bindung an ($\alpha 6\beta 2/3$) $\gamma 2$ Rezeptoren thematisiert.

Die [³H]RO15-4513-Bindungsstudie zeigte, dass keines der 3er Konkatamere nur zusammen mit der $\gamma 2$ Untereinheit eine Benzodiazepin-Bindestelle bildete (Abb. 25). Zusammen mit einer weiteren α Untereinheit transfiziert zeigten dagegen alle Konstrukte Bindung. Eine Benzodiazepin-Bindestelle war damit vorhanden. Bei ($\beta 3\alpha 1\beta 3$) $\alpha 1\gamma 2$ lag die [³H]RO15-4513-Bindung bei 140 ± 6 fmol/mg Protein, bei ($\beta 3\alpha 4\beta 3$) $\alpha 4\gamma 2$ bei 44 ± 11 und bei ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\alpha 6\gamma 2$ lag die [³H]RO15-4513-Bindung mit 543 ± 85 fmol/mg Protein am höchsten. Eine Proteolyse der Linker kann auch in diesem Bindungsexperiment nicht bestätigt werden. Natürlich ist es möglich, dass Untereinheiten, die aus der Linkerproteolyse freigesetzt werden und eventuell noch Aminosäurefragmente an ihren N- und/oder C-terminalen Bereichen anheften haben, eine funktionelle GABA- Bindestelle aufweisen, die Benzodiazepin-Bindestelle aber dadurch empfindlich gestört wird.

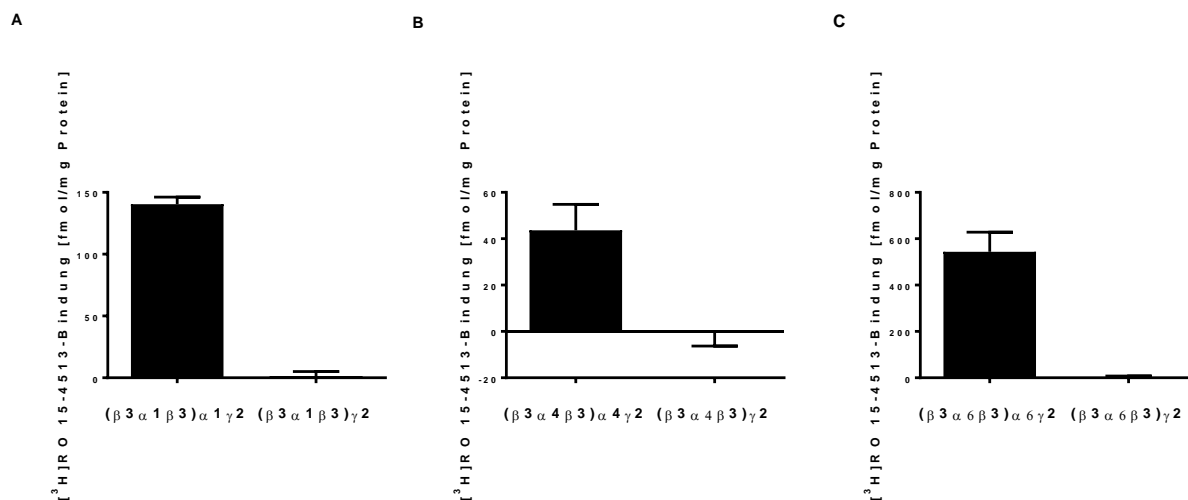


Abb. 25: Überprüfung der Degradation von Linkern in der [³H]RO15-4513-Bindung. A: (β3α1β3) Konkatomere wurden zusammen mit α1 und γ2 Untereinheiten und nur mit einer γ2 Untereinheit transfiziert und die [³H]RO15-4513-Bindung gemessen. B: (β3α4β3) Konkatomere wurden zusammen mit α4 und γ2 Untereinheiten und nur mit einer γ2 Untereinheit transfiziert und die [³H]RO15-4513-Bindung gemessen. C: (β3α6β3) Konkatomere wurden zusammen mit α6 und γ2 Untereinheiten und nur mit einer γ2 Untereinheit transfiziert und die [³H]RO15-4513-Bindung gemessen. Bindungswerte sind in fmol/mg Protein angegeben. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und deren Standardabweichung. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.1.3.2 [³H]EBOB-Bindung und Modulation durch GABA an (β3α6) Artefakten und α6β3 Rezeptoren

Der proteolytische Zerfall von (β3α6) wurde nach Western Blot Analyse als unwahrscheinlich angesehen (Kapitel 4.1.1.1). Dennoch wurde auch zu diesem Konkatomer ein Bindungsexperiment durchgeführt, das weiteren Aufschluss zum Thema Linkerdegradation liefern sollte. Getestet wurden zum einen Rezeptor-Artefakte aus (β3α6) und zum anderen α6β3 Rezeptoren aus einzeln transfizierten Untereinheiten in der [³H]EBOB-Modulation durch GABA. Das Konkatomer (β3α6) könnte neben der Bildung eines Pentamers mit heraushängender Untereinheit auch ein Dipentamer, oder, unwahrscheinlicher, ein Hexamer oder Tetramer bilden. In jedem der Fälle sollte die Bildung der GABA-Bindestellen unterschiedlich sein und sich von denen des normalen Pentamers aus einzeln transfizierten Untereinheiten unterscheiden lassen. Während der IC₅₀-Wert der [³H]EBOB-Modulation durch GABA an α6β3 Rezeptoren bei 0,200 ± 0,052 μM lag und die maximale Modulation durch 10 μM GABA 52 ± 9% betrug, lag der IC₅₀-Wert der [³H]EBOB-Modulation bei (β3α6) Rezeptoren bei 0,057 ± 0,031 μM und die maximale Modulation betrug 64 ± 10% (Abb. 26). Die Ergebnisse könnten als Hinweis dienen, dass (β3α6) Konkatomere alleine transfiziert Rezeptor-Artefakte bilden, die z.B. durch den unterschiedlichen Aufbau in der Affinität unterschiedliche Bindestellen für GABA besitzen. Zusätzlich wäre theoretisch denkbar, dass diese Rezeptoren drei GABA-Bindestellen besitzen. Damit

könnte GABA die [³H]EBOB-Bindung potenter und effizienter modulieren. Die Ergebnisse der Modulation an beiden Rezeptoren unterscheiden sich allerdings nicht signifikant.

[³H]EBOB-Bindung und GABA-Modulation: (α3α6) und α6β3

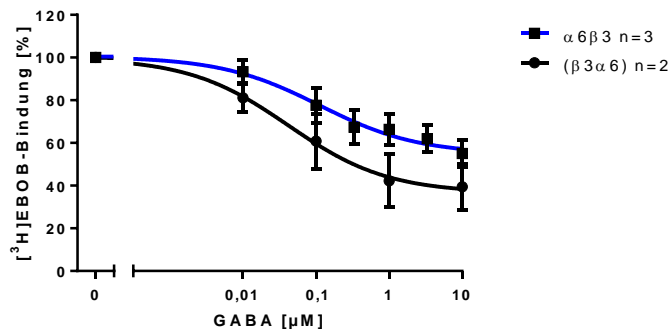


Abb. 26: Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA auf die [³H]EBOB-Bindung an α6β3 und (β3α6) Rezeptoren. Effekt von steigenden Konzentrationen GABA auf die [³H]EBOB-Bindung an α6β3 Rezeptoren und (β3α6) Artefakten. Die Werte sind prozentual zur maximalen Bindung angegeben, die in Abwesenheit des Liganden GABA gemessen und auf 100% gesetzt wurde. 0% gibt die unspezifische [³H]EBOB-Bindung, d.h. bei Überschuss an kaltem EBOB an. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte von n unabhängigen Messungen ± SEM. Es wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit angelegt. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methodenteil beschrieben.

4.1.4 Auswirkung der transfizierten DNA-Menge auf die Bildung von Artefakten

Die Menge an transfizierter DNA bei Konkataleren ist mit 12,5 μg Plasmid-DNA pro Platte im Vergleich zu einzelnen Untereinheiten sehr hoch. Artefakt-Bildung von Konkataleren ist in der Literatur bereits beschrieben.²⁰⁰⁻²⁰² Da ebenfalls beschrieben ist, dass eine Reduktion der transfizierten DNA-Menge die Artefakt-Bildung minimiert,²⁰⁰ wurden die Konkatalere (α1/6β3) und (α1/6δβ3) in einer reduzierten Menge von 2,5 μg und 0,5 μg DNA pro Platte transfiziert und auf ihre [³H]Muscimol-Bindung getestet.

Bei der Transfektion α1-enthaltender Konkatalere mit 12,5 μg DNA pro Platte zeigte die Kontrolle des Konstrukts (α1δβ3) prozentual zur Kombination (α1β3)(α1δβ3) betrachtet eine [³H]Muscimol-Bindung von 58 ± 3% und das Konstrukt (α1β3) eine [³H]Muscimol-Bindung von 143 ± 32% (Kapitel 4.1.2.3 Untersuchung des dualen Konstrukts (α1β3) in Kombination mit (α1δβ3)). Bei einer Transfektion von 2,5 μg DNA pro Platte lag die [³H]Muscimol-Bindung des Konkatalers (α1δβ3) prozentual bei 37 ± 25% und die von (α1β3) bei 92 ± 47% (Abb. 27 A). Bei einer Transfektion von 0,5 μg pro Platte konnte die [³H]Muscimol-Bindung von (α1δβ3) nicht mehr gemessen werden, aber die von (α1β3) lag mit 62 ± 28% weiterhin hoch (Abb. 27 B). Die [³H]Muscimol-Bindung der Kombination (α1β3)(α1δβ3) wurde durch Reduktion der transfizierten DNA-Menge von 86 ± 2 fmol/mg Protein auf 66 ± 19 fmol (2,5 μg DNA pro Platte) bzw. 18 ± 8 fmol/mg Protein (0,5 μg DNA pro Platte) ebenfalls erniedrigt (Abb. 27 A,B). Die [³H]Muscimol-Bindung des Konkatalers (α1δβ3)

wurde von 50 ± 3 fmol/mg Protein ($12,5 \mu\text{g}$ DNA pro Platte) auf 24 ± 17 fmol ($2,5 \mu\text{g}$ pro Platte) reduziert. Die spezifische Bindung unterschied sich dabei allerdings nicht mehr signifikant von der unspezifischen ($p = 0,126$). Beim Konkatamer ($\alpha 1\beta 3$) wurde die [^3H]Muscimol-Bindung von 124 ± 28 fmol/mg Protein auf 61 ± 31 fmol ($2,5 \mu\text{g}$ DNA pro Platte) und 11 ± 5 fmol ($0,5 \mu\text{g}$ pro Platte) reduziert. Die Bindung bei $0,5 \mu\text{g}$ pro Platte von 11 ± 5 fmol/mg Protein war mit $p = 0,06$ bereits nicht mehr signifikant zur unspezifischen Bindung. Bei einer Reduktion der transfizierten DNA-Menge scheint die Bildung von Artefakten demnach tatsächlich zurückzugehen, ist aber gerade im Fall von ($\alpha 1\beta 3$) weiterhin deutlich vorhanden. Selbst bei einer Reduktion auf $0,5 \mu\text{g}$ pro Platte ist die Artefakt-Bildung dieses Konstruktes noch messbar.

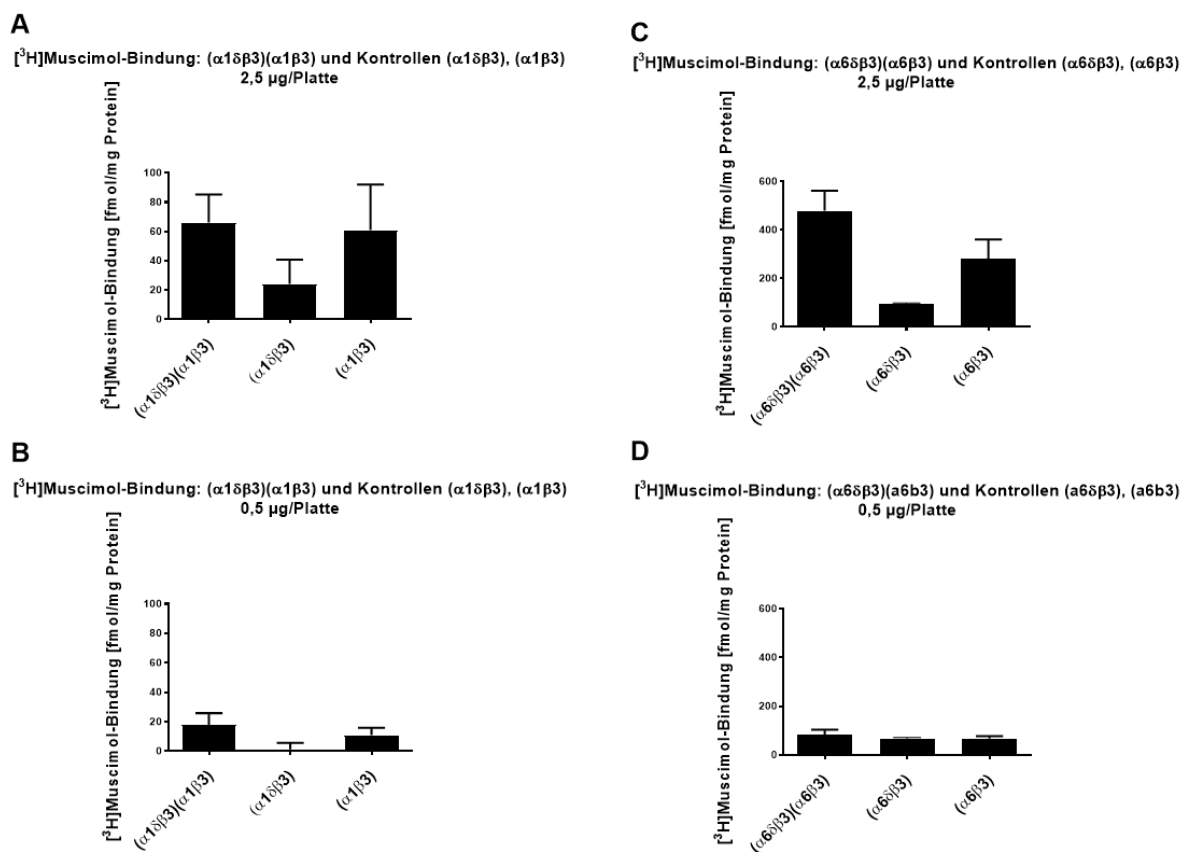


Abb. 27: Verringerung der transfizierten DNA-Menge bei Konkatameren. A, B: Einfluss einer Verringerung der transfizierten DNA-Menge von ($\alpha 1\beta 3$) und ($\alpha 1\delta\beta 3$) Konkatameren auf die [^3H]Muscimol-Bindung an ($\alpha 1\beta 3$)($\alpha 1\delta\beta 3$) Rezeptoren und Artefakte aus einzeln transfizierten ($\alpha 1\beta 3$) und ($\alpha 1\delta\beta 3$) Konstrukten. Reduktion von $12,5 \mu\text{g}/\text{Platte}$ auf $2,5 \mu\text{g}/\text{Platte}$ (A) und $0,5 \mu\text{g}/\text{Platte}$ (B). C, D: Einfluss einer Verringerung der transfizierten DNA-Menge von ($\alpha 6\beta 3$) und ($\alpha 6\delta\beta 3$) Konkatameren auf die [^3H]Muscimol-Bindung an ($\alpha 6\beta 3$)($\alpha 6\delta\beta 3$) Rezeptoren und Artefakte aus einzeln transfizierten ($\alpha 6\beta 3$) und ($\alpha 6\delta\beta 3$) Konstrukten. Reduktion von $12,5 \mu\text{g}/\text{Platte}$ auf $2,5 \mu\text{g}/\text{Platte}$ (C) und $0,5 \mu\text{g}/\text{Platte}$ (D). Die Bindungswerte sind in fmol/mg Protein angegeben. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und deren Standardabweichung. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

Bei der Transfektion $\alpha 6$ -enthaltender Konkatomere mit 12,5 μg DNA pro Platte zeigte die Kontrolle des Konstrukts ($\alpha 6\delta\beta 3$) prozentual zur Kombination ($\alpha 6\beta 3$)($\alpha 6\delta\beta 3$) betrachtet eine [^3H]Muscimol-Bindung von $63 \pm 11\%$ und das Konstrukt ($\alpha 6\beta 3$) eine [^3H]Muscimol-Bindung von $105 \pm 15\%$. Bei einer Transfektion von 2,5 μg DNA pro Platte lag die [^3H]Muscimol-Bindung des Konkatomers ($\alpha 6\delta\beta 3$) prozentual noch bei $20 \pm 1\%$ und die von ($\alpha 6\beta 3$) bei $59 \pm 17\%$ (Abb. 27 C). Bei einer Transfektion von 0,5 μg pro Platte lag die [^3H]Muscimol-Bindung von ($\alpha 6\delta\beta 3$) bei $81 \pm 6\%$ und die von ($\alpha 6\beta 3$) bei $81 \pm 12\%$ (Abb. 27 D). Die [^3H]Muscimol-Bindung der Kombination ($\alpha 6\beta 3$)($\alpha 6\delta\beta 3$) veränderte sich durch Reduktion der transfizierten DNA-Menge von 12,5 auf 2,5 μg pro Platte nicht signifikant (480 ± 82 fmol/mg Protein, $p = 0,159$) und erniedrigte sich auf 83 ± 22 fmol/mg Protein bei 0,5 μg DNA pro Platte (Abb. 27 C,D). Die [^3H]Muscimol-Bindung des Konkatomers ($\alpha 6\delta\beta 3$) wurde von 239 ± 41 fmol/mg Protein (12,5 μg DNA pro Platte) auf 97 ± 2 fmol (2,5 μg pro Platte) und 67 ± 5 fmol (0,5 μg pro Platte) reduziert und beim Konkatamer ($\alpha 6\beta 3$) von 397 ± 56 fmol/mg Protein auf 282 ± 80 fmol (2,5 μg DNA pro Platte) und 68 ± 10 fmol (0,5 μg pro Platte) reduziert. Auch bei den $\alpha 6$ -enthaltenden Konkatomeren scheint eine Reduktion von 12,5 μg auf 2,5 μg die prozentuale Bildung von Artefakten zu verringern. Gerade im Fall von ($\alpha 6\beta 3$) wird das deutlich, welches bei höherer DNA-Menge eine ebenso hohe [^3H]Muscimol-Bindung wie der Rezeptor aus beiden Konstrukten aufwies. Bei der [^3H]Muscimol-Bindung von ($\alpha 6\delta\beta 3$) mit 2,5 und 0,5 μg pro Platte lag der Auswertung allerdings nur ein Experiment zugrunde. Die Messwerte verstehen sich in diesem Fall nur als ein Hinweis. Bei einer Reduktion der transfizierten DNA-Menge auf 0,5 μg pro Platte war allerdings auch die [^3H]Muscimol-Bindung der Kombination aus ($\alpha 6\beta 3$) und ($\alpha 6\delta\beta 3$) entsprechend erniedrigt und konnte nicht mehr von der der einzeln transfizierten Konkatomere unterschieden werden. Transfiziert man die beiden Konstrukte ($\alpha 1/6\beta 3$) und ($\alpha 1/6\delta\beta 3$) zusammen, ist die [^3H]Muscimol-Bindung interessanterweise auch bei einer Reduktion der DNA-Menge von 12,5 auf 2,5 μg pro Platte ähnlich hoch. Das könnte auf eine überhöhte DNA-Menge bei der Transfektion von Konkatomeren hindeuten. Dies ist allerdings nur für diese beiden Konkatomere mit $\alpha 1/6$ gezeigt.

Da bei beiden Experimenten die Bildung von Artefakten nur reduziert aber nicht verhindert wurde, ist auch die Methode der reduzierten DNA-Menge nicht brauchbar, um die untersuchten Konkatomere zur Strukturaufklärung einzusetzen.

4.1.5 Artefakt-Bildung bei $\beta 1/2$ -enthaltenden Konkatomeren

Zunächst wurde die Kombination ($\beta 2\alpha 6\beta 2$)($\alpha 6\delta$) gewählt, da im zweiten Konkatamer keine β -Untereinheit vorhanden war und somit garantiert wurde, dass das zweite Konkatamer nicht zur Artefakt-Bildung beitragen konnte. Die Kombination zeigte eine mäßige [^3H]Muscimol-Bindung von 32 ± 3 fmol/mg Protein (Abb. 28 A). Verglichen mit der Bindung, die das Konkatamer ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) in Kombination mit ($\alpha 6\delta$) zustande brachte (239 ± 125 fmol/mg Protein) lässt sich schon die wesentlich schlechtere Expression des $\beta 2$ -enthaltenden Konkatomers erkennen. Dennoch zeigte die Kontrolle ($\beta 2\alpha 6\beta 2$) im Gegensatz zum $\beta 3$ -enthaltenden Äquivalent keine [^3H]Muscimol-Bindung. Die

[³H]Muscimol-Bindung von ($\beta 2\alpha 6$) δ belief sich auf 162 ± 25 fmol/mg Protein und ohne zusätzlich transfizierte δ Untereinheit konnte eine [³H]Muscimol-Bindung von 26 ± 4 fmol gemessen werden (Abb. 28 B). Ein Versuch, das $\beta 2$ -enthaltende Konkatermer im [³H]EBOB-Assay darzustellen, scheiterte aufgrund mangelnder Bindungswerte (Daten nicht abgebildet). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass $\beta 2$ -enthaltende Konkatermere weniger anfällig für die Artefakt-Bildung sind. Trotzdem ist durch die geringere Expression ein Ersetzen der $\beta 3$ durch die $\beta 2$ Untereinheit nicht möglich.

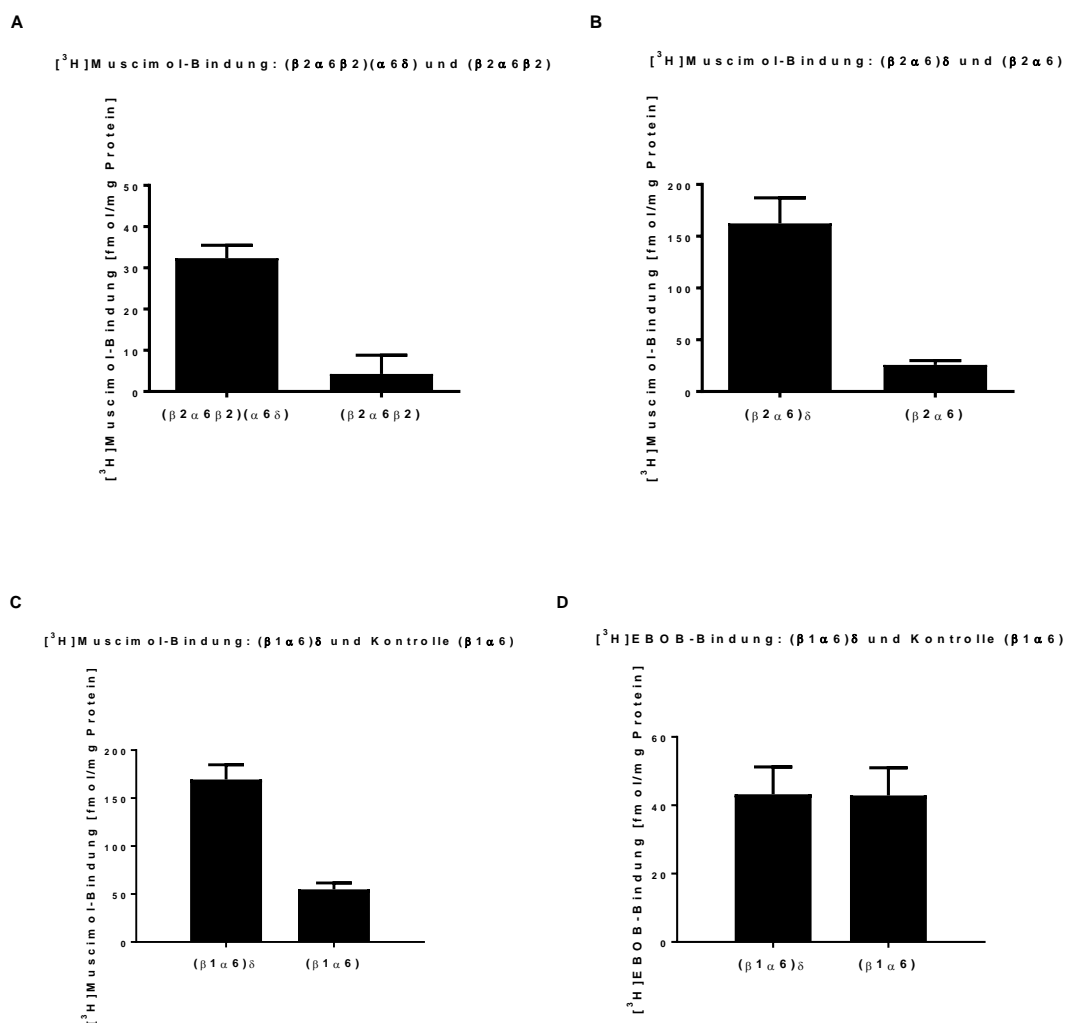


Abb. 28: Kontrolle der Artefakt-Bildung von $\beta 1$ - und $\beta 2$ -enthaltenden Konkatermeren. A: [³H]Muscimol-Bindung an ($\beta 2\alpha 6\beta 2$)($\alpha 6\delta$) Rezeptoren und ($\beta 2\alpha 6\beta 2$) Artefakte. B: [³H]Muscimol-Bindung an ($\beta 2\alpha 6$) δ Rezeptoren und ($\beta 2\alpha 6$) Artefakte. C: [³H]Muscimol-Bindung an ($\beta 1\alpha 6$) δ Rezeptoren und ($\beta 1\alpha 6$) Artefakte. D: [³H]EBOB-Bindung an ($\beta 1\alpha 6$) δ Rezeptoren und ($\beta 1\alpha 6$) Artefakte. Die Bindungswerte sind in fmol/mg Protein angegeben. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen und deren Standardabweichung. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

Bei den $\beta 1$ -enthaltenden Konkameren wurde das Konstrukt ($\beta 1\alpha 6$) getestet. Im Vergleich zu ($\beta 3\alpha 6$) ist die Artefakt-Bildung deutlich reduziert. Die [^3H]Muscimol-Bindung des Konkamers in Kombination mit einer δ Untereinheit belief sich auf 169 ± 22 fmol/mg Protein und die des Konstruktes bei alleiniger Transfektion war signifikant reduziert ($p = 0,0208$) auf 55 ± 9 fmol/mg Protein (Abb. 28 C). Die [^3H]EBOB-Bindung zeigte jedoch sowohl für die Kombination mit der δ Untereinheit als auch ohne eine Bindung von 43 ± 14 fmol/mg Protein (Abb. 28 D). Die [^3H]EBOB-Bindung von ($\beta 1\alpha 6$) δ war damit zum einen reduziert im Vergleich zum $\beta 3$ -enthaltenden Äquivalent und zum anderen ebenso hoch wie die des Artefaktes. Auch bei diesem $\beta 1$ -enthaltenden Konkamer kommt demnach Artefakt-Bildung vor.

4.1.6 Orientierung der Konkamere bei Assemblierung

4.1.6.1 [^3H]RO15-4513-Bindung an ($\alpha 6\beta 2/3$) $\gamma 2$ Rezeptoren

Um der Frage der Degradation der Linkersequenzen nachzugehen, wurde das Konkamer ($\alpha 6\beta 3$) zusammen mit der $\gamma 2$ Untereinheit transfiziert. Es wurde auf [^3H]RO15-4513-Bindung getestet und diese nachgewiesen (Abb. 29). Eine Bindung sollte theoretisch jedoch nicht möglich sein, wenn die Vermutung, Konkamere würden gegen den Uhrzeigersinn assemblieren, korrekt ist. Die Transfektion einer Kombination aus ($\alpha 6\beta 3$) und $\gamma 2$ sollte demnach eine $\beta 3$ - $\gamma 2$ Nachbarschaft bilden, die keine Benzodiazepin-Liganden binden kann. Eine Degradation der Linker wurde bereits ausgeschlossen, da das Konstrukt zum einen in Western Blot Untersuchungen nur eine Bande bei 100 kDa zeigte (Kapitel 4.1.1.3) und zum anderen anhand von Bindungsstudien an ($\beta 3\alpha x\beta 3$) $\gamma 2$ gezeigt werden konnte, dass die Linker wahrscheinlich intakt bleiben (Kapitel 4.1.5.1). Die verbleibende Möglichkeit dieses Phänomen zu erklären ist damit eine Assemblierung im Uhrzeigersinn. Dies ist aber nicht generell der Fall, denn ($\beta 3\alpha 6$) Konkamere bildeten zusammen mit der $\gamma 2$ Untereinheit auch eine Benzodiazepin-Bindestelle (Abb. 29). In den durchgeführten Dosis-Wirkungs-Experimenten ergab sich ein K_D -Wert von $3,5 \pm 1$ nM für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren und ein K_D -Wert von $4,3 \pm 0,5$ nM für ($\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ Rezeptoren (Abb. 29). Normalisierte man die maximale Bindung auf 100%, lagen die Kurven praktisch übereinander. Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Versuche mit [^3H]RO15-4513 weisen damit bei ($\alpha 6\beta 3$) Konkameren in Kombination mit der $\gamma 2$ Untereinheit auf die Bildung eines normalen GABA_AR hin. Zum Vergleich wurde noch eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ Rezeptoren erstellt (Abb. 29). Der K_D -Wert belief sich hier auf 2,8 nM. Die normalisierte Kurve war identisch zu den anderen beiden. Allerdings sind die Ergebnisse von ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ mit Vorsicht zu betrachten, da es sich bei dieser Dosis-Wirkungs-Kurve um Ergebnisse aus einem einfach durchgeführten Versuch handelt. Dennoch kann man die erhaltenden Ergebnisse als Hinweis verstehen, dass 2er Konkamere sich nicht zwingend an die Uhrzeiger-Regel halten.

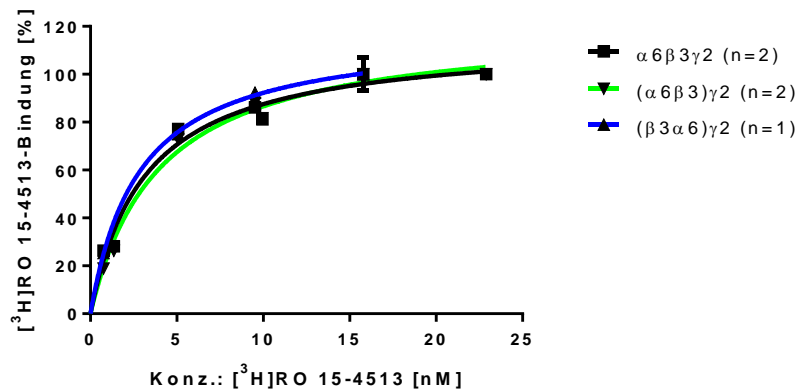


Abb. 29: Dosis-Wirkungs-Kurven von [³H]RO15-4513 an verschiedenen Rezeptoren. [³H]RO15-4513-Bindung an α6β3γ2, (α6β3)γ2 und (β3α6)γ2 Rezeptoren in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Radioliganden. Die Werte in % zur berechneten maximalen Bindung angegeben. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte von n Messungen ± SEM. Es wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit angelegt. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.1.6.2 [³H]EBOB-Bindung und Modulation durch GABA an (α6β3)δ, (β3α6)δ und α6β3δ Rezeptoren

Die Beobachtung einer [³H]RO15-4513-Bindung an (α6β3)γ2 Rezeptoren wurde in Kapitel 4.1.6.1 beschrieben und ließ die Vermutung aufkommen, dass diese 2er Konkatomere ihre Orientierung flexibel gestalten können. Da sowohl (α6β3)γ2 als auch (β3α6)γ2 Rezeptoren eine Benzodiazepin-Bindestelle aufwiesen und die K_D -Werte beider Rezeptoren für [³H]RO15-4513 dem von α6β3γ2 Rezeptoren gleichen, scheinen sich die beiden 2er Konkatomere sowohl im als auch gegen den Uhrzeigersinn assemblieren zu können. Die beiden Konkatomere wurden daraufhin in Kombination mit der δ Untereinheit auch im [³H]EBOB-Modulationsexperiment mit GABA untersucht und mit α6β3δ Rezeptoren verglichen. Der IC_{50} -Wert belief sich für (α6β3)δ auf $0,049 \pm 0,004 \mu\text{M}$ GABA mit einer maximalen Modulation der [³H]EBOB-Bindung durch $10 \mu\text{M}$ GABA von $70 \pm 3\%$ (Abb. 30). Der IC_{50} -Wert für (β3α6)δ lag bei $0,079 \pm 0,007 \mu\text{M}$ und die maximale Modulation bei $61 \pm 2\%$ (Abb. 30). Der rekombinante Rezeptor aus den einzeln transfizierten Untereinheiten α6β3δ zeigte einen IC_{50} -Wert von $0,043 \pm 0,001 \mu\text{M}$ und eine maximale Modulation von $62 \pm 4\%$ (Abb. 30). Der Vergleich der maximalen Modulation der konkatomeren Rezeptoren zueinander ($p = 0,848$ für (β3α6)δ und $p = 0,165$ für (α6β3)δ), sowie zu α6β3δ ($p = 0,077$), ergab keine signifikanten Unterschiede. Die physiologisch wahrscheinlich irrelevanten Unterschiede in den IC_{50} -Werten von (β3α6)δ zu α6β3δ bzw. (α6β3)δ sind allerdings signifikant ($p = 0,009$ bzw. $0,023$). Dagegen konnte zwischen α6β3δ und (α6β3)δ Rezeptoren kein Unterschied der IC_{50} -Werte festgestellt werden ($p = 0,1641$). Obwohl der IC_{50} -Wert von (β3α6)δ leicht höher lag als die der anderen beiden Rezeptoren, kann man doch sagen, dass sich alle drei Dosis-Wirkungs-Kurven ähneln und vermutlich einen identischen Rezeptor bilden. Die Ergebnisse lassen auch vermuten, dass sich das Konkatomer (α6β3) in Kombination mit der δ Untereinheit komplett oder zumindest größtenteils in der Assemblierung umkehrt. Es wird jedenfalls ein GABA_AR gebildet, dessen [³H]EBOB-Bindung durch GABA mit derselben Potenz und Effizienz

moduliert werden kann wie bei $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren. Da bei diesem der Aufbau aber nicht abschließend geklärt ist, könnte theoretisch auch eine Abfolge von $\alpha 6\text{-}\beta 3\text{-}\alpha 6\text{-}\beta 3\text{-}\delta$ der normalen Assemblierungsordnung entsprechen. Allerdings wurde schon bei dem Versuch mit $(\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ in der $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung eine Umkehr des 2er Konkatomers angenommen (Kapitel 4.1.6.1) und da die Rezeptoren $(\beta 3\alpha 6)\delta$ und $(\alpha 6\beta 3)\delta$ beide annähernd dieselbe $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation durch GABA aufwiesen, kann eine Umkehrung der Assemblierungsrichtung durchaus als möglich erachtet werden.

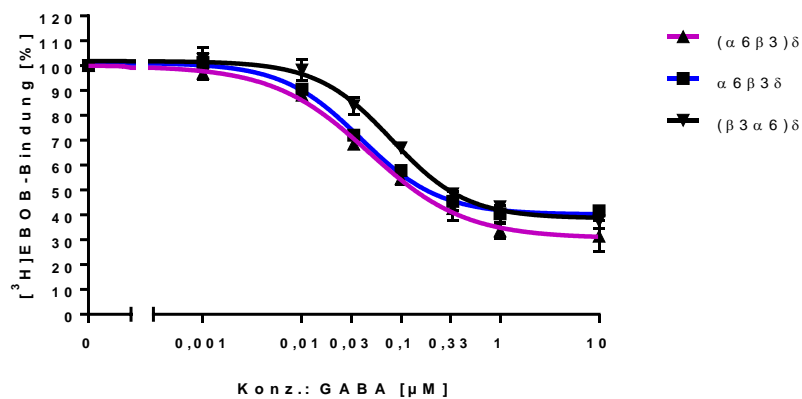


Abb. 30: Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA auf die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$, $(\beta 3\alpha 6)\delta$ und $(\alpha 6\beta 3)\delta$ Rezeptoren. Effekt von steigenden Konzentrationen GABA auf die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ und $(\beta 3\alpha 6)\delta$ Rezeptoren sowie $(\alpha 6\beta 3)\delta$ Artefakte. Die Werte sind in Prozentual zur maximalen Bindung angegeben, die in Abwesenheit des Liganden GABA gemessen wurde und auf 100% gesetzt wurde. 0% gibt die unspezifische $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung, d.h. bei Überschuss an kaltem EBOB an. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen \pm SEM. Es wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit angelegt. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.1.6.3 $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung an $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ - und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)$ -enthaltenden Rezeptoren

In den vorangegangenen Kapiteln ging es um die Möglichkeit, dass sich das 2er Konkatomer $(\alpha 6\beta 3)$ auch gegen den Uhrzeigersinn assemblieren kann. Hier werden nun die Untersuchungen zu den 3er Konkatomeren $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)$ dargestellt. Transfiziert wurden die Konkatomere in Kombination mit einzelnen $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheiten. Untersucht wurde im Folgenden die $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ Bindung an den konkatomeren Rezeptoren und die Möglichkeit diese Bindung durch einen Überschuss an $10 \mu\text{M}$ Diazepam zu verdrängen. Diazepam bindet nicht an $\alpha 4/\alpha 6$ -enthaltende Benzodiazepin-Bindestellen. Bei Assemblierung im Uhrzeigersinn könnte eine Verdrängung der $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ Bindung demnach nur an $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren stattfinden. Die Konkatomere bildeten in Kombination mit den einzelnen Untereinheiten Rezeptoren mit robuster $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung. Diese lag bei $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3\gamma 2$ bei $143 \pm 11 \text{ fmol/mg Protein}$ und bei $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)\beta 3\gamma 2$ bei $175 \pm 15 \text{ fmol/mg Protein}$. Prozentual verglichen mit dieser spezifischen $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung wurde die Bindung von $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$. Bei $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3\gamma 2$ konnte, wie erwartet, keine Verdrängung der $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung beobachtet werden ($93 \pm 11 \%$) (Abb. 31).

Allerdings konnte der erhoffte Effekt auch nicht bei $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren gezeigt werden. Dort lag die spezifische $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung in Anwesenheit von $10\ \mu\text{M}$ Diazepam immer noch bei $75 \pm 9\%$ der Gesamtbindung (Abb. 31). Die Verdrängung der $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung an beiden Rezeptoren in Anwesenheit von Diazepam unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,0941$).

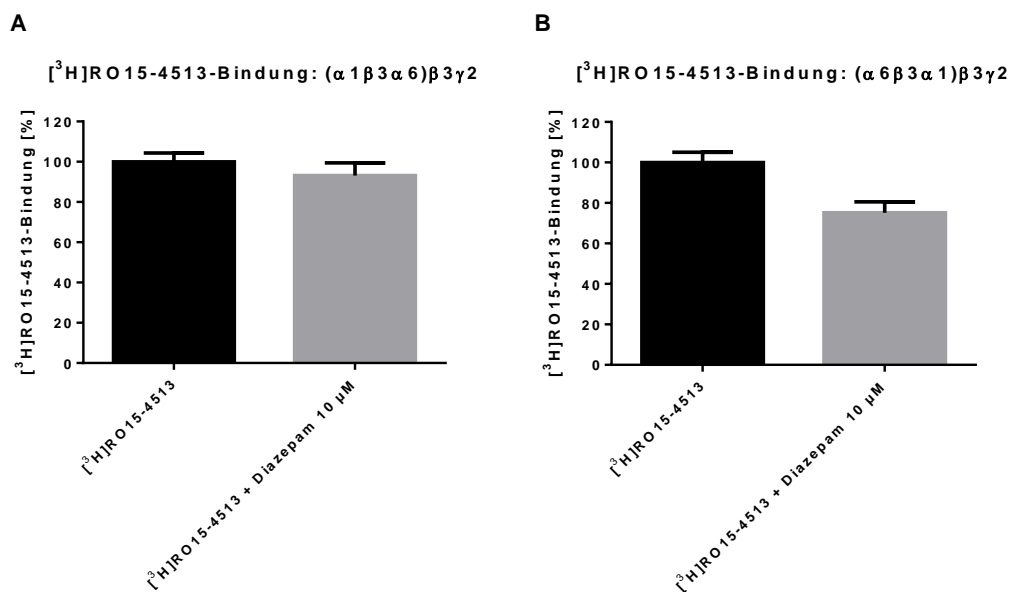


Abb. 31: Orientierung von $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)$ Konkaternen. A: $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung an $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren und Modulation durch $10\ \mu\text{M}$ Diazepam. B: $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung an $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren und Modulation durch $10\ \mu\text{M}$ Diazepam. In beiden Darstellungen wurde der $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ Bindungswert in Abwesenheit von Diazepam auf 100% gesetzt und die Diazepam-Modulation prozentual angegeben. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen und deren Standardabweichung. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.1.7 Einbau angebotener Untereinheiten

4.1.7.1 $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung und Modulation durch GABA an $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$, $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren

Bei fast allen untersuchten Konkaternen zeigte sich, dass alleinige Transfektion zur Artefakt-Bildung führt. Viele Artefakte zeigten neben einer $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ - auch eine $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung, was neben einer GABA-Bindestelle auch auf die Anwesenheit eines Ionenkanals hindeutet. Fraglich bleibt jedoch, ob Konkaternen die ihnen bei Transfektion angebotenen Untereinheiten in den Rezeptorkomplex einbauen oder eher zur Artefakt-Bildung neigen. Dazu wurde das 3er Konkatern $(\beta 3\alpha 6\beta 3)$ zusammen mit einer $\alpha 6$ und $\gamma 2$ Untereinheit transfiziert und in der $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation mit $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren verglichen (Abb. 32). Während sich die IC_{50} -Werte der $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation durch GABA an den Rezeptoren nicht unterschieden ($0,059 \pm 0,011\ \mu\text{M}$ an $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$

und $0,066 \pm 0,005 \mu\text{M}$ an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$), zeigten die Werte der maximalen Modulation durch GABA einen hoch signifikanten Unterschied ($p = 0,0016$). Die Modulation betrug bei $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ lediglich $49 \pm 5\%$, während sie bei $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren bei $85 \pm 2\%$ lag. Da das Artefakt des einzeln transfizierten Konkamers ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) zwar eine robuste [^3H]EBOB-Bindung aufwies, diese aber durch $10 \mu\text{M}$ GABA nicht modulierbar war (Tab. 24), deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ein Teil der gemessenen [^3H]EBOB-Bindung aus dem nicht-modulierbaren Artefakt ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) bestand, während der Rest die Bindung an das Rezeptor-Pentamer mit $\alpha 6$ und $\gamma 2$ Untereinheiten widerspiegelt. Diese Theorie wird auch durch die Tatsache gestützt, dass beide Rezeptoren denselben IC_{50} Wert aufwiesen. Nahm man die $\alpha 6$ Untereinheit in das Konkatamer auf und bildete so ein 4er Konstrukt, zeigte sich zwar ein signifikant höherer IC_{50} -Wert der [^3H]EBOB-Modulation durch GABA ($0,193 \pm 0,006 \mu\text{M}$) aber dieselbe maximale Modulierbarkeit von $89 \pm 2\%$. Das Konstrukt ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) alleine konnte zwar ebenfalls ein Artefakt bilden, dass [^3H]EBOB-Bindung zeigte, aber auch dessen Modulation durch $10 \mu\text{M}$ GABA war eher moderat (Abb. 32). Da $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ eine starke Modulation der [^3H]EBOB-Bindung durch GABA zeigte, schienen bei dieser Transfektion wenig Artefakte gebildet worden zu sein. Dies würde zusammengefasst bedeuten, dass das 3er Konstrukt ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) auch in Kombination mit den passenden Gegenstücken, in diesem Fall mit den einzelnen Untereinheiten $\alpha 6$ und $\gamma 2$ einen hohen Anteil an Artefakten bildet, während das bei dem 4er Konkatamer ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) anscheinend nicht der Fall ist.

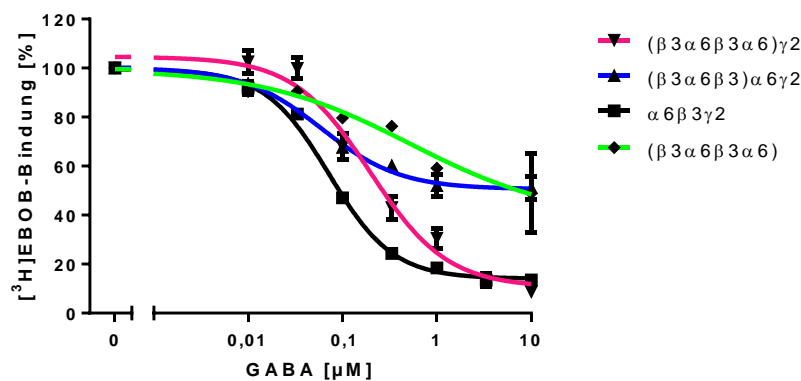


Abb. 32: Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA auf die [^3H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$, $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ Rezeptoren. Effekt von steigenden Konzentrationen GABA auf die [^3H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ Rezeptoren, sowie $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ Artefakte. Die Werte sind prozentual zur maximalen Bindung angegeben, die in Abwesenheit des Liganden GABA gemessen und auf 100% gesetzt wurde. 0% gibt die unspezifische [^3H]EBOB-Bindung, d.h. bei Überschuss an kaltem EBOB an. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Messungen \pm SEM. Es wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit angelegt. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.1.8 Untersuchung $\alpha 6$ - und $\alpha 1$ -enthaltender 4er und 5er Konkatomere

Tab. 26: Bindung verschiedener Radioliganden an 4er Konkatomere

Konkatamer	[³ H]Muscimol	n	[³ H]RO 15-4513	n	[³ H]RO15-4513 + 10 μ M Diazepam	n	[³ H]EBOB	n	[³ H]EBOB + 10 μ M GABA	n
($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$)	103 \pm 21	4	5 \pm 11	2			78 \pm 6	3	56 \pm 9	3
($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) $\beta 3$	188 \pm 60	3								
($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$	117 \pm 24	4	128 \pm 9	3			44 \pm 6	3	10 \pm 4	3
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$)	36 \pm 22	4	1 \pm 1	2			23 \pm 0	2	15 \pm 7	2
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\beta 3$	195 \pm 66	3								
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$	35 \pm 12	4	64 \pm 11	3			45 \pm 33	2	1 \pm 17	2
($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	13 \pm 2	2	12 \pm 3	2			n.d.	1	n.d.	1
($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$) $\beta 3$	64 \pm 2	3	32 \pm 7	3	29 \pm 8	3	62 \pm 4	1	42 \pm 3	1
($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$)	39 \pm 8	2	11 \pm 3	2			14 \pm 3	1	9 \pm 7	1
($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) $\beta 3$	181 \pm 13	3	28 \pm 9	3	15 \pm 6	3	196 \pm 8	1	180 \pm 5	1
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$)	32 \pm 17	3	23 \pm 9	3			13 \pm 5	2	14 \pm 3	2
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$) $\beta 3$	197 \pm 47	3	31 \pm 3	3			303 \pm 11	3	281 \pm 22	3
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$)	97 \pm 10	3					13 \pm 3	1	10 \pm 3	1
($\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$) $\beta 3$	332 \pm 80	3					280 \pm 8	1	271 \pm 5	1
($\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6$)	29 \pm 6	3	31 \pm 11	4	37 \pm 4	2	7 \pm 2	1	22 \pm 16	1
($\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6$) $\alpha 6$	22 \pm 2	3	28 \pm 6	4	25 \pm 11	2	n.d.	1	n.d.	1
($\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6$) $\beta 3$	43 \pm 5	3	39 \pm 4	4	29 \pm 7	2	30 \pm 3	1	32 \pm 2	1
($\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3$)	n.d.	2	n.d.	2			15 \pm 3	1	25 \pm 14	1
($\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3$) $\alpha 6$	156 \pm 28	3	186 \pm 8	3			34 \pm 3	1	21 \pm 3	1
($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$)	32 \pm 4	2					n.d.	1	n.d.	1
($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\alpha 6$	265 \pm 38	3					40 \pm 11	3		
($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$)	36 \pm 4	3	n.d.	3						
($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$) $\alpha 6$	160 \pm 13	3	44 \pm 19	3						

Gezeigt ist die Bindung von [³H]RO15-4513, [³H]Muscimol und [³H]EBOB, sowie die Bindung von [³H]EBOB in Anwesenheit von 10 μ M GABA und die Bindung von [³H]RO15-4513 in Anwesenheit von 10 μ M Diazepam an verschiedenen GABA_AR, die aus 4er Konkatomeren aufgebaut sind. Zusätzlich kann man der Tabelle die Bindungsdaten von Rezeptor-Artefakten entnehmen, die sich aus der Transfektion einzelner Konkatomere bilden und kein klassisches Pentamer ergeben sollten. Die Bindung der Radioliganden ist in fmol/mg Protein angegeben. Die Werte sind als Mittelwerte von n Messungen mit der Standardabweichung angegeben. Einige der [³H]EBOB-Bindungswerte sind mit n=1 gemessen worden. n.d. (nicht detektierbar) wurde eingetragen, wenn sich die gemessenen Bindungswerte nicht signifikant von der unspezifischen Bindung unterschieden. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.1.8.1 Untersuchung des $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ Konkatomers

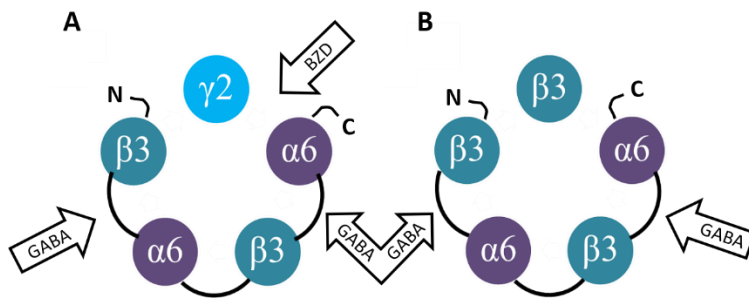


Abb. 33: Schematischer Aufbau von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\beta 3$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ Konkatomeren bei Kotransfektion mit $\gamma 2$ (A) bzw. $\beta 3$ (B) Untereinheiten.

Eine Ausweitung von 2er und 3er Konkatomeren auf 4er und 5er Konkatomeren wurde durchgeführt, da bei sämtlichen 2er und 3er Konstrukten ausgeprägte Artefakt-Bildung zu beobachten war. Die Ergebnisse an $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ Rezeptoren in der $[^3\text{H}]$ EBOB Dosis-Wirkungs-Kurve mit GABA deuteten außerdem darauf hin, dass auch die Anwesenheit der passenden Untereinheiten die Artefakt-Bildung wahrscheinlich nicht verhindern kann. Die Ergebnisse verschiedener Radioliganden-Bindungsstudien mit dem 4er Konkatamer $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ sind in Tab. 26 zusammengefasst. Die $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung war beim alleine transfizierten Konkatamer mit 103 ± 21 fmol/mg Protein wieder sehr hoch und damit ist auch wieder die Artefakt-Bildung bestätigt. Eine $[^3\text{H}]$ RO15-4513 Bindung konnte, wie zu erwarten, nicht gemessen werden. Die $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung lag bei 78 ± 6 fmol/mg Protein, die durch Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ GABA um $28 \pm 12\%$ auf 56 ± 9 fmol/mg Protein reduziert wurde. Die Modulation der $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung war mit $p = 0,0298$ signifikant. Die geringe Modulation von $[^3\text{H}]$ EBOB durch $10 \mu\text{M}$ GABA beim Artefakt $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ im Vergleich zur starken Modulation bei $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ bestätigte die Ergebnisse des Versuchs in Kapitel 4.1.7.1, die darauf hindeuteten, dass dieses Konkatamer in Anwesenheit der passenden einzelnen Untereinheit ein Rezeptor-Pentamer bildet, das $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren gleicht. Transfizierte man das $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ Konkatamer mit einer $\beta 3$ Untereinheit, erhielt man eine $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung von 188 ± 60 fmol/mg Protein. Wurde das Konkatamer mit der $\gamma 2$ Untereinheit transfiziert ergaben sich Bindungswerte mit $[^3\text{H}]$ Muscimol von 117 ± 24 fmol/mg Protein. Die $[^3\text{H}]$ RO15-4513-Bindung lag bei 128 ± 9 fmol/mg Protein. Auch hier zeigte die hohe Bindung, dass ein erheblicher Teil der Konkatomere mit der $\gamma 2$ Untereinheit zusammen im Rezeptor verpartnert waren. Die $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung lag bei 44 ± 6 fmol/mg Protein und wurde durch $10 \mu\text{M}$ GABA um $78 \pm 8\%$ auf 10 ± 4 fmol reduziert. Die Untersuchungen zum Konkatamer $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ ergaben zwar insgesamt mit den Untereinheiten $\beta 3$ oder $\gamma 2$ zusammen gute Bindungswerte, doch die erhebliche Artefakt-Bildung des Konkatomers bei alleiniger Transfektion führte zur Suche nach weiteren Konkatomeren.

Zwar wurde bereits für die 2er und 3er Konkatomere Proteolyse ausgeschlossen, dennoch wurden die hergestellten 4er und 5er Konkatomere auch wieder in Western Blots analysiert. 4er Konkatomere erwartet man bei ca. 200 kDa, 5er bei etwa 250 kDa. Die Ergebnisse von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$, alleine transfiziert und jeweils in Kombination mit einer $\gamma 2$ Untereinheit oder einer $\beta 3$ Untereinheit sind in

Abb. 34 dargestellt. Die Banden zeigten sich sehr ausgeprägt, was auf eine starke Expression hindeutet. Als Antikörper wurde der $\beta 3$ -Antikörper von Santa Cruz verwendet. An diesem Beispiel lässt sich gut erkennen, dass der Antikörper unspezifisch eine Bande im Bereich von 55 kDa anfärbt. Bei dem transfizierten Konkater in Kombination mit der $\beta 3$ Untereinheit zeigten sich im Bereich 55 kDa dann zwei Banden, eine auf der Höhe 55 kDa und eine leicht unterhalb. Da zwar bei den Western Blots eine Bande im Bereich 55 kDa angefärbt wurde, diese aber wahrscheinlich unspezifisch ist und auch keine weiteren Banden zwischen 55 und 200 kDa auftauchten, kann man davon ausgehen, dass das Konkater ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) intakt blieb. Eine weitere Bande zeigte sich oberhalb von 300 kDa. Diese wurde auf unzureichend ins Trenngel gelaufene Proteine zurückgeführt, da sie sich unmittelbar an der Granze zwischen Sammel- und Trenngel befand. Da die Konkater mit ca. 200 kDa sehr groß sind, ist der Übertritt ins Trenngel entsprechend schwieriger.

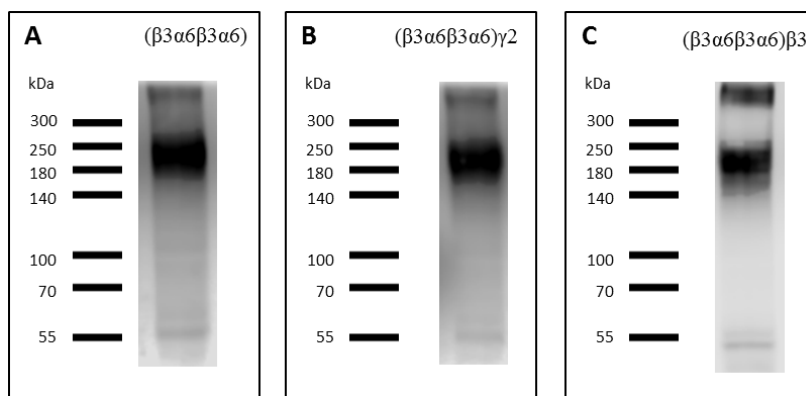


Abb. 34: Western Blots von ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) Konkateren. A, B, C: Detektion von ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) mit dem $\beta 3$ Antikörper 1:5000. Im Fall von (B) wurde das Konkater zusammen mit der $\gamma 2$ Untereinheit transfiziert. Im Fall von (C) wurde das Konkater zusammen mit der $\beta 3$ Untereinheit transfiziert. In allen Fällen wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.8.2 Untersuchung des ($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) Konkaters

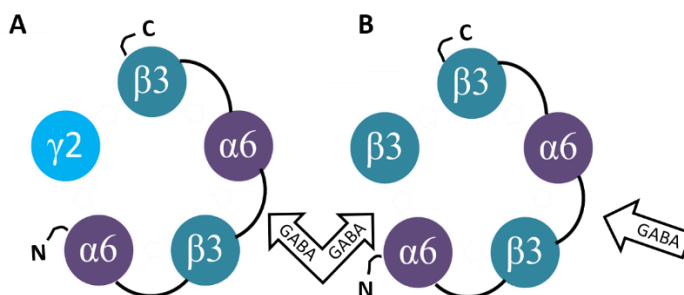


Abb. 35: Schematischer Aufbau von ($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ Artefakten und ($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\beta 3$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von ($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) Konkateren bei Koftransfektion mit $\gamma 2$ (A) bzw. $\beta 3$ (B) Untereinheiten. (A) führt zu einem Rezeptor, dessen Anordnung der Untereinheiten nicht der natürlichen Abfolge entspricht.

Die Ergebnisse der Radioliganden-Bindungsstudien zum 4er Konkater ($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) sind in Tab. 26 zusammengefasst. Das Konkater alleine transfiziert zeigte eine sehr niedrige [^3H]Muscimol-Bindung, wie zu erwarten, keine [^3H]RO15-4513-Bindung und eine geringe [^3H]EBOB-Bindung mit

leichter, aber nicht signifikanter Modulation durch 10 μM GABA. In Kombination mit der $\gamma 2$ Untereinheit ergaben sich ebenfalls nur geringe Bindungswerte für [^3H]Muscimol mit 35 ± 12 fmol/mg Protein. Die [^3H]EBOB-Bindungswerte lag mit 45 ± 33 fmol/mg Protein auf den ersten Blick zwar auch nicht niedriger als die von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$, war aber mit einem hohen Fehler behaftet. Interessant war jedoch die [^3H]RO15-4513 Bindung mit 64 ± 11 fmol/mg Protein. Das Konkatermer sollte bei Assemblierung gegen den Uhrzeigersinn keine Benzodiazepin-Bindestelle bilden können (Abb. 35). Dieses Ergebnis könnte auf eine Assemblierung im Uhrzeigersinn hindeuten. Dennoch waren die Bindungswerte von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ eher niedrig und extensive Bildung von Artefakten konnte somit nicht gezeigt werden. Die Transfektion mit einer $\beta 3$ -Untereinheit entspricht der angenommenen Assemblierung für α - und β -enthaltende Rezeptoren (Abb. 35). Die [^3H]Muscimol-Bindung, vor allem auch im Vergleich zu den Bindungswerten nach alleiniger Transfektion oder der mit $\gamma 2$, zeigte hohe Bindungswerte mit 195 ± 66 fmol/mg Protein. Die Werte lagen damit ähnlich hoch wie die, die das Konkatermer $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)$ mit $\beta 3$ zeigte (Tab. 26).

Die Ergebnisse der Western Blots des $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkatermers sind in Abb. 36 dargestellt. Das Konkatermer $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)$ wurde alleine und in Kombination mit der $\beta 3$ Untereinheit transfiziert. Bei diesem Konstrukt zeigte sich keine definierte Bande, sondern eher eine Aufspaltung in zwei Banden. Betrachtet man das Konkatermer, das mit der $\beta 3$ Untereinheit transfiziert wurde, zeigten sich sogar eher drei Banden im Bereich von etwa 200, 170, 150 kDa. Dabei könnte es sich um Spaltprodukte handeln. Die einzelnen Untereinheiten könnte man in diesem Blot nicht erkennen, da im Bereich von ca. 50 kDa sowieso die Bande der einzeln transfizierten $\beta 3$ Untereinheit zu sehen ist und der verwendete Antikörper eine $\alpha 6$ Untereinheit nicht detektieren würde. Auch möglich wäre eine unterschiedliche Glykolysierung des Konkatermers. Im Western Blot des einzeln transfizierten Konkatermers konnte jedoch keine einzelne Bande im Bereich 50 kDa detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich bei diesem Konkatermer keine Ansammlung von Proteinen am Übergang zum Trenngel.

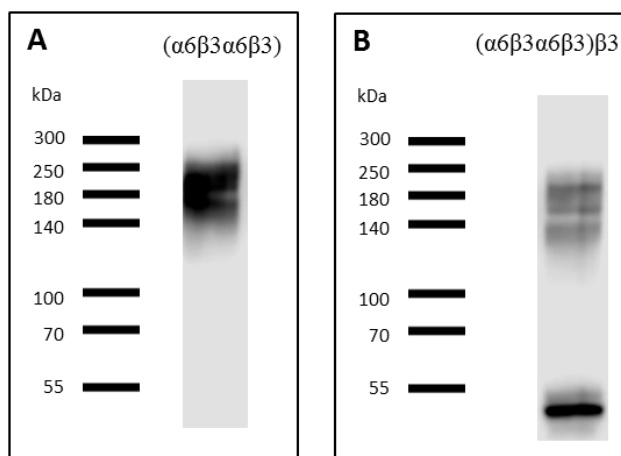


Abb. 36: Western Blots von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkatermen. A, B: Detektion von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3)$ mit dem $\beta 3$ Antikörper 1:5000. Im Fall von (B) wurde das Konkatermer zusammen mit der $\beta 3$ Untereinheit transfiziert. In beiden Fällen wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.8.3 Untersuchung der ($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$) und ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) Konkatomere

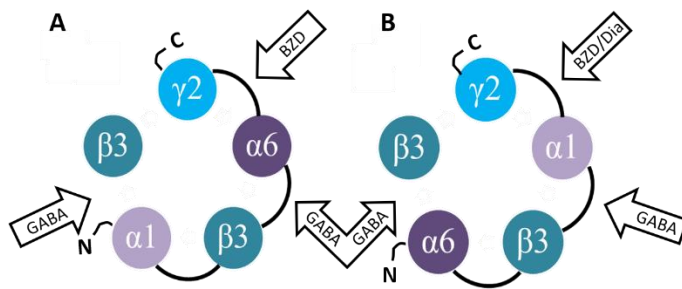


Abb. 37: Schematischer Aufbau von ($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$) $\beta 3$ und ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) $\beta 3$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von ($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$) (A) und ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) (B) Konkatomeren bei Kotransfektion mit der $\beta 3$ Untereinheit.

Die Ergebnisse der Radioliganden-Bindungsstudien der 4er Konkatomere ($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$) und ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) sind in Tab. 26 zusammengefasst. Die Bindungswerte des einzeln transfizierten ($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$) Konstrukts liegen sehr niedrig. Die [^3H]Muscimol-Bindung belief sich auf 13 ± 2 fmol/mg Protein, die [^3H]RO15-4513-Bindung auf 12 ± 3 fmol und die [^3H]EBOB-Bindung war nicht messbar. Dieses Konkatomer zeigte also sehr geringe Artefakt-Bildung. Zusammen mit der $\beta 3$ Untereinheit war die Bindung allerdings immer noch eher niedrig, was bedeuten könnte, dass dieses Konstrukt allgemein eine geringe Expressionsstärke besitzt. Die Bindung von [^3H]RO15-4513 konnte durch einen Überschuss von $10 \mu\text{M}$ Diazepam nicht verdrängt werden (29 ± 8 fmol/mg Protein). Die vorhandene [^3H]RO15-4513 Bindung lässt auf eine Assemblierung des Konstrukts zusammen mit der $\beta 3$ Untereinheit gegen den Uhrzeigersinn schließen, denn im Falle einer Assemblierung im Uhrzeigersinn mit Einbau der $\beta 3$ Untereinheit würde sich keine Benzodiazepin-Bindestelle bilden. Eine fehlende Verdrängung von [^3H]RO15-4513 durch $\alpha 6$ -insensitives Diazepam lässt darauf schließen, dass keine Assemblierung im Uhrzeigersinn und Bildung eines Tetramers erfolgt, denn in diesem Fall würde man vermuten (gegeben, dass die Benzodiazepin-Bindestelle in einem Tetramer erhalten bliebe), dass sich die $\alpha 1$ mit der $\gamma 2$ Untereinheit verpartnert und durch $\alpha 1$ -sensitives Diazepam [^3H]RO15-4513 verdrängt werden würde. Aber auch die Abwesenheit der [^3H]RO15-4513-Bindung bei einzeln transfizierten Konkatomeren deutet darauf hin, dass keine extensive Bildung von Tetrameren erfolgt. Die Ergebnisse der Bindungstests an ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) sind in Tab. 26 zusammengefasst. Die Bindung von [^3H]Muscimol an einzeln transfizierten ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) Konstrukten war mit 39 ± 8 fmol/mg Protein leicht höher als bei ($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$). Die Bindung von [^3H]RO15-4513 lag bei 11 ± 3 und die von [^3H]EBOB bei 14 ± 4 fmol/mg Protein. Damit zeigte auch das ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) Konkatomer kaum Artefakt-Bildung. Transfizierte man das Konstrukt mit einer $\beta 3$ Untereinheit konnte ein enormer Anstieg der [^3H]Muscimol-Bindung auf 181 ± 12 fmol/mg Protein verzeichnet werden. Die Expression des Konkatomers an sich und die Bildung von Rezeptoren in Kombination mit der $\beta 3$ schienen also vorhanden zu sein. Die [^3H]EBOB-Bindung war ebenfalls sehr gut mit 196 ± 8 fmol/mg Protein. Diese Bindung wurde durch $10 \mu\text{M}$ GABA aber scheinbar nicht moduliert, denn sie lag immer noch bei 180 ± 5 fmol/mg Protein. Allerdings sind die Ergebnisse des [^3H]EBOB-Bindungstests nur in einem

Experiment gezeigt und dienen daher nur als Hinweis. Die Bindung von [^3H]RO15-4513 an $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)\beta 3$ war mit 28 ± 9 fmol/mg Protein eher moderat. Die Bindung ließ sich durch $10 \mu\text{M}$ Diazepam auf 15 ± 6 fmol/mg Protein reduzieren. Diese Reduktion war allerdings nicht signifikant ($p = 0,128$). Die Konkatomere zeigten mit der $\gamma 2$ als letztem Glied der verlinkten Untereinheiten eine sehr niedrige Artefakt-Bildung.

Die Ergebnisse der Western Blots mit dem $\beta 3$ Antikörper sind in Abb. 38 dargestellt. Bei $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ zeigte sich eine sehr hohe Zahl an Proteinen, die den Übergang ins Trenngel nicht schafften, dafür war die Bande im Bereich 200 kDa relativ scharf und teilte sich nicht in mehrere Banden auf. Eine unspezifische Bande konnte in diesem Fall nicht detektiert werden. Das Konkatomer $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)$ zeigte leider eine sehr unscharfe und breite Bande, die sich an den Rändern der Laufbahn nach oben zog. Ob es sich hier um mehrere Banden handelte ist nicht erkennbar. Auch bei diesem Konstrukt war ein Teil des Konkatomers am Übergang zum Trenngel steckengeblieben. Die Bande befand sich im Bereich 200 kDa und im Bereich von 55 kDa war eine leichte Bande erkennbar.

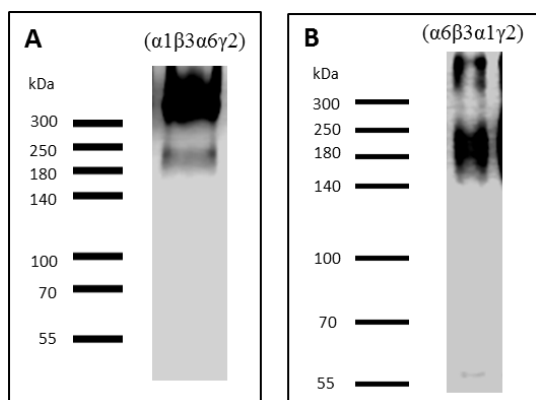


Abb. 38: Western Blot von $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)$ Konkatomeren. Detektion von $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ (A) und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)$ (B) mit dem $\beta 3$ Antikörper 1:5000. Es wurden 6%ige Trenngele verwendet.

4.1.8.4. Untersuchung des $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ Konkatomers

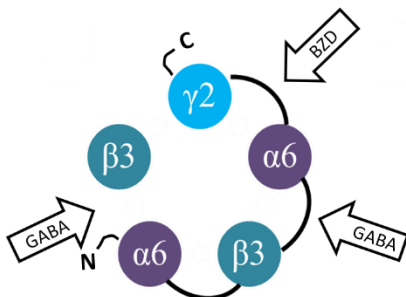


Abb. 39: Schematischer Aufbau von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)\beta 3$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ Konkatomeren bei Kotransfektion mit der $\beta 3$ Untereinheit.

Die 4er Konkatomere $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)$ wiesen in Radioliganden-Bindungsstudien eine geringe Artefakt-Bildung auf und wurden entsprechend um das Konkatomer $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ erweitert (Abb. 39). Die Ergebnisse sind in Tab. 26 und Abb. 40 zusammengefasst. Das einzeln transfizierte

Konkatamer zeigte eine niedrige [^3H]Muscimol-Bindung mit 32 ± 17 fmol/mg Protein und ebenfalls niedrigen Bindungswerten für die [^3H]RO15-4513-Bindung mit 23 ± 9 fmol und einer [^3H]EBOB-Bindung von 13 ± 5 fmol/mg Protein. Die [^3H]EBOB-Bindung konnte durch $10 \mu\text{M}$ GABA nicht moduliert werden und lag bei 14 ± 3 fmol/mg Protein. Durch Kotransfektion des Konkatamers mit einer $\beta 3$ Untereinheit, wurde die Bindung höher: Die [^3H]Muscimol-Bindung lag bei 197 ± 47 fmol/mg Protein, die [^3H]EBOB-Bindung bei 303 ± 11 fmol/mg Protein. Allerdings ließ sich die [^3H]EBOB-Bindung nicht durch $10 \mu\text{M}$ GABA modulieren, obwohl GABA-Bindestellen vorhanden waren, wie die hohe [^3H]Muscimol-Bindung zeigt. Die [^3H]RO15-4513-Bindung war mit 31 ± 3 fmol/mg Protein erstaunlich niedrig angesichts der hohen [^3H]Muscimol- und [^3H]EBOB-Bindung. Da auch die [^3H]RO15-4513-Bindung an $(\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2)\beta 3$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2)\beta 3$ in der Größenordnung 30 fmol/mg Protein lag, ist es möglich, dass die Benzodiazepin-Bindestelle durch N-terminale Verlinkung der $\gamma 2$ Untereinheit auf unbekannte Weise beeinträchtigt wird.

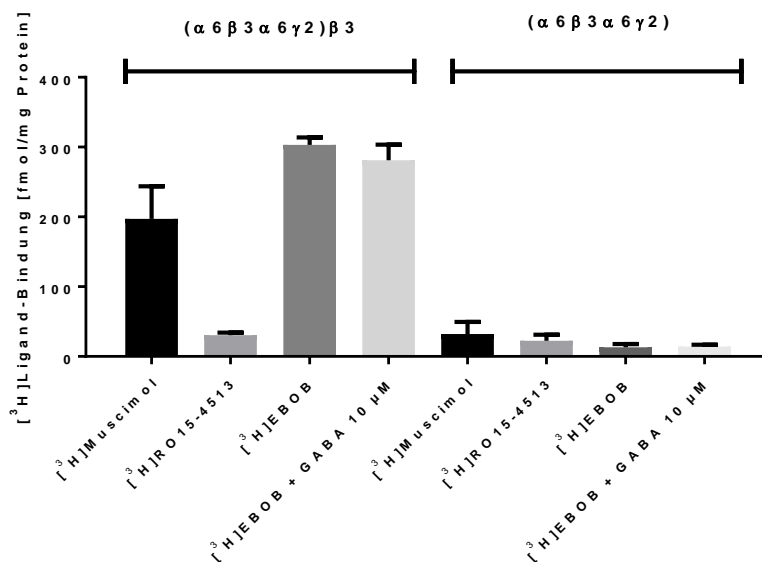


Abb. 40: Bindung verschiedener [^3H]Liganden an $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ -enthaltenden Rezeptoren und Artefakte. [^3H]Ligand-Bindung an $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)\beta 3$ Rezeptoren und $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ Artefakten. Bei den Bindungswerten handelt es sich um die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Messungen. Die Bindungswerte von [^3H]EBOB und [^3H]EBOB + GABA des $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2)$ Artefakts sind im $n = 2$ gemessen. Die Bindungswerte sind Tab. 26 zu entnehmen.

Die Ergebnisse des Western Blots mit dem $\beta 3$ Antikörper sind in Abb. 41 dargestellt. Neben der Bande bei ca. 200 kDa wurde noch eine weitere Bande im Bereich von 170 kDa detektiert. Ein Großteil der konkatameren Proteine war wieder am Übergang zum Trenngel steckengeblieben. Bei der zweiten Bande bei 170 kDa könnte es sich theoretisch um ein 3er Konkatamer handeln, bei dem entweder die $\alpha 6$ oder die $\gamma 2$ Untereinheit abgespalten wurde. Beide Unterheiten würden durch den verwendeten Antikörper nicht detektiert werden. Mit 170 kDa wäre es allerdings etwas zu groß für drei verlinkte Untereinheiten.

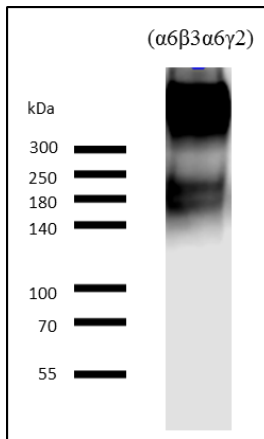


Abb. 41: Western Blot von $(\alpha6\beta3\alpha6\gamma2)$ Konkatameren. Detektion von $(\alpha6\beta3\alpha6\gamma2)$ mit dem $\beta3$ Antikörper 1:5000. Es wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.8.5 Untersuchung des $(\alpha6\beta3\alpha6\delta)$ Konkatamers

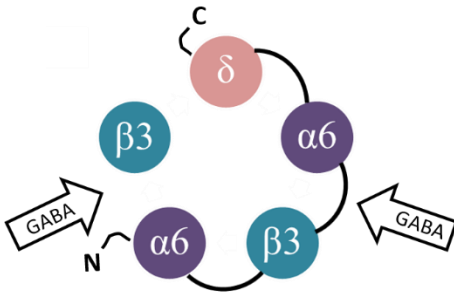


Abb. 42: Schematischer Aufbau von $(\alpha6\beta3\alpha6\delta)\beta3$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von $(\alpha6\beta3\alpha6\delta)$ Konkatameren bei Kotransfektion mit der $\beta3$ Untereinheit.

Da bei dem Konkatamer $(\alpha6\beta3\alpha6\gamma2)$ die Artefakt-Bildung minimal war (Abb. 40) und die $[^3\text{H}]$ Muscimol- sowie $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung sehr gut waren, wurde das entsprechende Konstrukt mit einer δ Untereinheit hergestellt. Abb. 42 zeigt den schematischen Aufbau von $(\alpha6\beta3\alpha6\delta)$ Konkatameren bei Kotransfektion mit einer $\beta3$ Untereinheit. Die Bindung der Radioliganden an das einzeln transfizierte Konstrukt muten zunächst im Vergleich zum Konstrukt bei Kotransfektion mit einer $\beta3$ Untereinheit sehr niedrig an (Tab. 26, Abb. 43), obwohl eine $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung von 97 ± 10 fmol/mg Protein gemessen werden konnte. Die $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung lag bei 13 ± 3 fmol und war damit sehr gering. Bei $(\alpha6\beta3\alpha6\delta)\beta3$ Rezeptoren lag die $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung mit 332 ± 80 fmol/mg Protein sehr hoch, ebenso wie die $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindungswerte. Diese konnte aber nicht durch $10 \mu\text{M}$ GABA moduliert werden. Dieses Phänomen wurde bereits bei $(\alpha6\beta3\alpha6\gamma2)\beta3$ und $(\alpha6\beta3\alpha1\gamma2)\beta3$ Rezeptoren beobachtet.

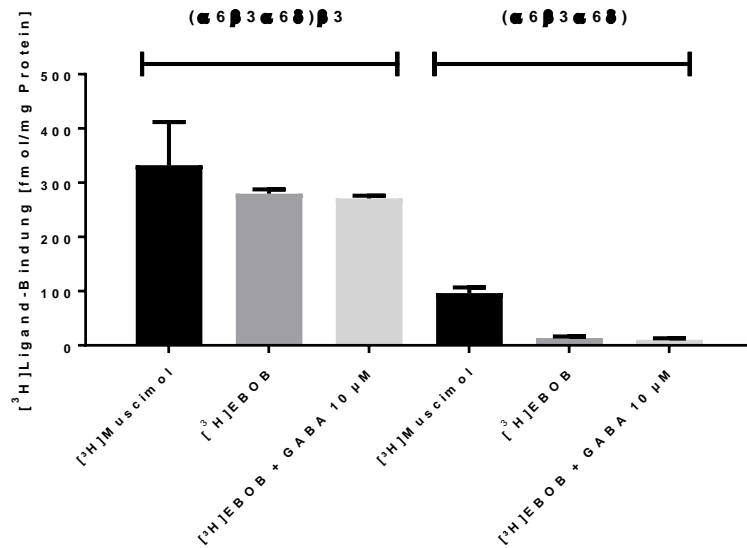


Abb. 43: Bindung verschiedener $[^3\text{H}]$ Liganden an $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ -enthaltende Rezeptoren und Artefakte. $[^3\text{H}]$ Ligand-Bindung an $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)\beta 3$ Rezeptoren und $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ Artefakte. Bei den Bindungswerten handelt es sich um die gemittelte Bindung \pm SD dreier unabhängiger Messungen. Die $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindungen wurden im $n = 1$ gemessen. Die Werte sind Tab. 26 zu entnehmen.

Die Ergebnisse des Western Blots mit dem $\beta 3$ -Antikörper sind in Abb. 44 dargestellt. Es wurde eine Bande im Bereich 200 kDa detektiert und eine weitere Bande im Bereich von 170 kDa. Eine Bande im Bereich 50 kDa war nicht erkennbar, allerdings würden endständig abgespaltene Untereinheiten nicht vom $\beta 3$ -Antikörper erkannt. Ein Großteil der konkatameren Proteine war am Übergang zum Trenngel steckengeblieben.

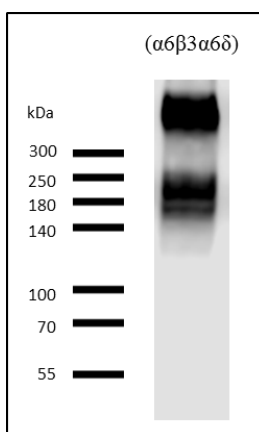


Abb. 44: Western Blot von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ Konkatameren. Detektion von $(\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta)$ mit dem $\beta 3$ -Antikörper 1:5000. Es wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.8.6 Untersuchung der $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkatomere

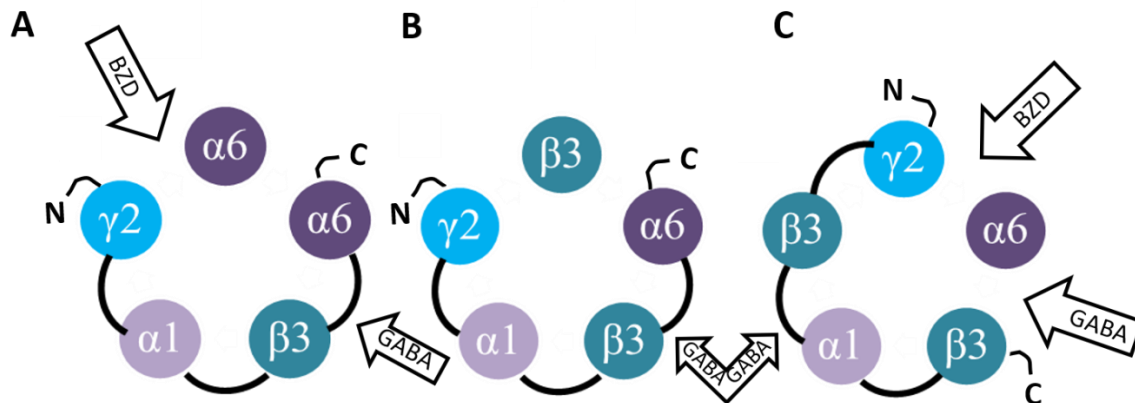


Abb. 45: Schematischer Aufbau von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\alpha 6$ und $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3$ Artefakten sowie $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 6$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ Konkatomeren bei Kotransfektion mit $\alpha 6$ (A) bzw. $\beta 3$ (B) Untereinheiten und erwartete Zusammensetzung von $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkatomeren bei Kotransfektion mit $\alpha 6$ (C). (A) und (B) führen zu einem Rezeptor, dessen Anordnung der Untereinheiten nicht der natürlichen Abfolge entspricht.

Auch bei den 4er Konkatomeren wurde der Versuch unternommen, die Assemblierungsrichtung genauer zu untersuchen. Dazu wurden die Konkatomere $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ und $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ erstellt. Das Konkatomer $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ würde bei Assemblierung gegen den Uhrzeigersinn und Kotransfektion mit einer α Untereinheit einen Rezeptor ergeben, der der natürlichen Anordnung $\beta 3\alpha 1\beta 3\alpha 2$ folgt. Das Konkatomer $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ dagegen würde bei Assemblierung gegen den Uhrzeigersinn und Kotransfektion mit einer $\beta 3$ Untereinheit eine falsche Anordnung ergeben und sollte zumindest keine Benzodiazepin-Bindestelle aufweisen. Das Konstrukt $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ wurde jeweils einzeln, mit einer $\alpha 6$ oder einer $\beta 3$ Untereinheit transfiziert und die Rezeptoren sowohl im $[^3\text{H}]$ Muscimol als auch im $[^3\text{H}]$ RO15-4513 Assay gemessen und die Verdrängung des Liganden $[^3\text{H}]$ RO15-4513 durch einen Überschuss Diazepam untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 26 dargestellt. Die Bindungswerte waren bei allen Kombinationen eher niedrig. Beim alleine transfizierten Konkatomer $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ lag die $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung bei 29 ± 6 fmol/mg Protein, die von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\alpha 6$ bei 22 ± 2 fmol/mg Protein und die von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3$ bei 43 ± 5 fmol/mg Protein. Die $[^3\text{H}]$ RO15-4513-Bindung war ebenfalls sehr gering und lag bei $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ bei 31 ± 11 fmol/mg Protein, die von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\alpha 6$ bei 28 ± 6 fmol und die von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3$ bei 39 ± 4 fmol/mg Protein. Die $[^3\text{H}]$ RO15-4513-Bindung wurde bei $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\alpha 6$ Rezeptoren nicht durch die Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Diazepam beeinflusst. Eine leichte Reduktion der Bindung bei $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3$ Rezeptoren war mit $p = 0,082$ nicht signifikant. Eine Bildung von Rezeptoren aus einzeln transfizierten Konkatomeren oder auch in Anwesenheit von $\alpha 6$ oder $\beta 3$ Untereinheiten schien nicht in großem Ausmaß zu erfolgen. Dennoch war eine $[^3\text{H}]$ RO15-4513-Bindung von 39 ± 4 fmol/mg Protein an $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)\beta 3$ Rezeptoren messbar. Eventuell erfolgt eine Assemblierung im Uhrzeigersinn in sehr geringem Ausmaß. Im Gegensatz zum vorher dargestellten $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ Konkatomer handelt es sich bei $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ um ein Konstrukt, das die

richtige Abfolge der vier verlinkten Untereinheiten widerspiegelt. [^3H]Muscimol- und [^3H]RO15-4513-Bindung war am einzeln transfizierten Konkatermer nicht messbar (Tab. 26, Abb. 46). Kombiniert mit der $\alpha 6$ Untereinheit ergab sich ein Rezeptor mit hoher [^3H]Muscimol-Bindung von 156 ± 28 fmol/mg Protein und einer [^3H]RO15-4513-Bindung von 186 ± 8 fmol/mg Protein (Tab. 26, Abb. 46).

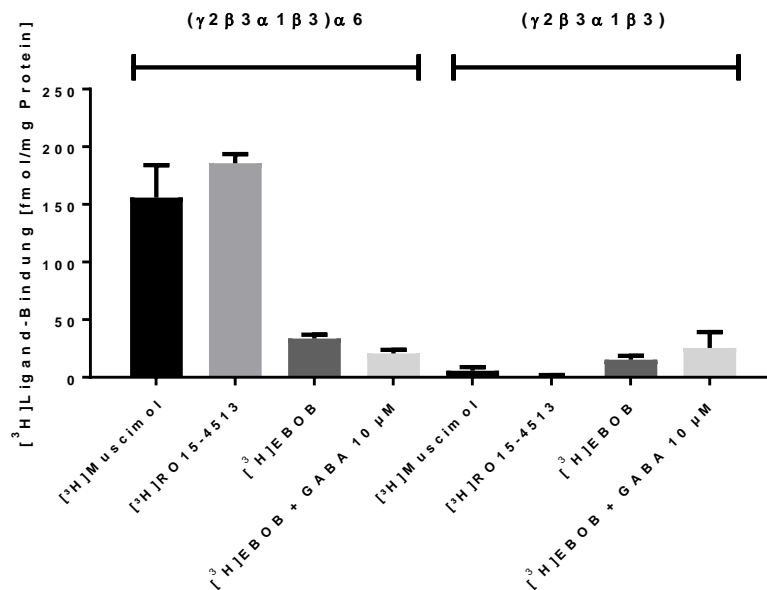


Abb. 46: Bindung verschiedener [^3H]Liganden an $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ -enthaltende Rezeptoren und Artefakte. [^3H]Ligand-Bindung an $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 6$ Rezeptoren und $\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3$) Artefakten. Bei den Bindungswerten der Radioliganden an $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)\alpha 6$ Rezeptoren handelt es sich um die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Messungen. Bei den Bindungswerten der Radioliganden an $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Artefakten handelt es sich um die Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Messungen. Die [^3H]EBOB-Bindungen wurden im $n = 1$ gemessen. Die Werte sind Tab. 26 zu entnehmen.

Die Ergebnisse der Western Blots mit dem $\beta 3$ -Antikörper sind in Abb. 47 dargestellt. Das Konkatermer $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ zeigte nur eine sehr geringe Proteinmenge, die am Übergang zum Trenngel steckengeblieben ist. Die Bande im Bereich 200 kDa war dafür eher unscharf und breit und eine Aufspaltung in zwei Banden konnte nicht ausgeschlossen werden. Weitere Banden waren nicht zu erkennen. Das Konkatermer $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ zeigte eine sehr scharfe Bande im Bereich von 200 kDa und keine weiteren Banden. Am Übergang zum Trenngel befanden sich sehr wenige konkatermere Proteine.

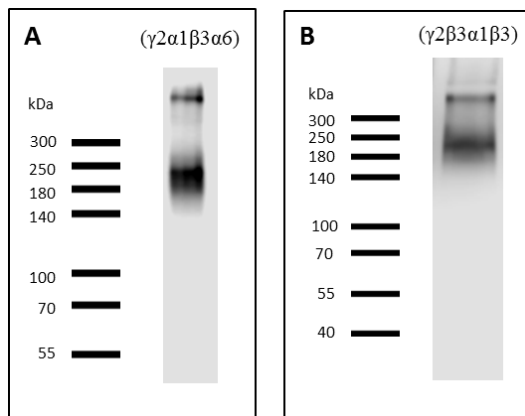


Abb. 47: Western Blot von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ Konkateren. Detektion von $(\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ (A) und $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ (B) Konkateren mit dem $\beta 3$ -Antikörper 1:5000. Es wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.8.7 Untersuchung des $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkaterens

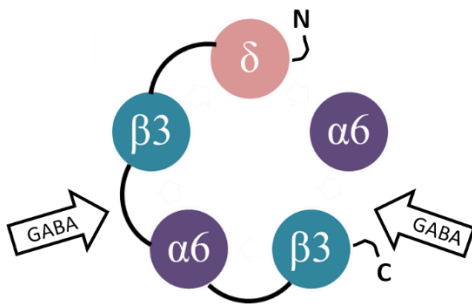


Abb. 48: Schematischer Aufbau von $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konkateren bei Kofunktion mit der $\alpha 6$ Untereinheit.

Vorangegangene Versuche mit dem Konkater $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ zeigten geringe Artefakt-Bildung und in Anwesenheit einer einzelnen $\alpha 6$ Untereinheit gute Bindungswerte. Daher wurden die Versuche mit dem δ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Äquivalent $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)$ wiederholt. Bei $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ wurde durch den freien N-Terminus der $\gamma 2$ Untereinheit die Benzodiazepin-Bindestelle nicht beeinflusst. Ein freier N-Terminus könnte auch bei δ -spezifischen Liganden wichtig sein. Die Ergebnisse sind in Tab. 26 und Abb. 49 dargestellt. Die $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung des einzeln transfizierten $(\delta\beta 3\alpha 6\beta 3)$ Konstruktes war mit 32 ± 4 fmol/mg Protein gut messbar. Eine $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindung konnte beim $\gamma 2$ -enthaltenden Konkater $(\gamma 2\beta 3\alpha 1\beta 3)$ nicht festgestellt werden. Dies könnte an der höheren Expression $\alpha 6$ -enthaltender Konkater liegen. Eine $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindung war beim Artefakt nicht messbar. Transfizierte man das Konkater mit einer zusätzlichen $\alpha 6$ Untereinheit wurden $[^3\text{H}]$ Muscimol-Bindungswerte von 265 ± 38 fmol/mg Protein gemessen. Die $[^3\text{H}]$ EBOB Bindung war mit 40 ± 11 fmol/mg Protein allerdings sehr niedrig. Das Konkater war damit für weitere Charakterisierungen in $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindungsstudien nicht brauchbar.

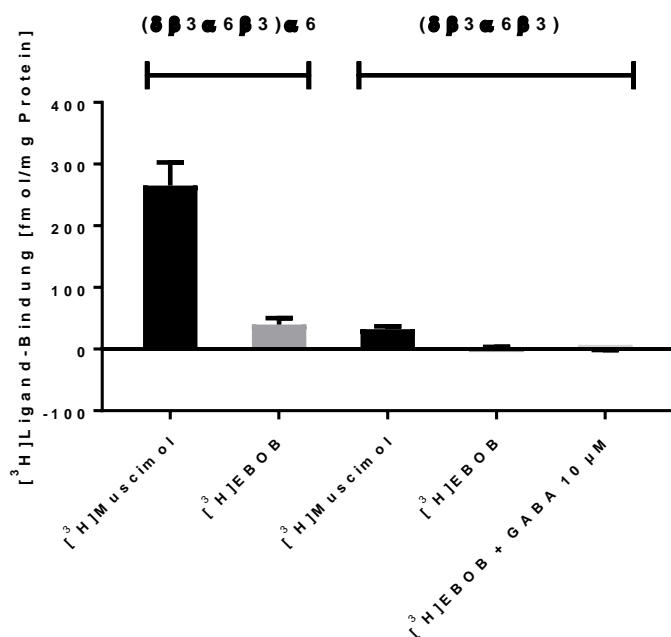


Abb. 49: Bindung verschiedener [³H]Liganden an ($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$)-enthaltende Rezeptoren und Artefakte. [³H]Ligand-Bindung an ($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\alpha 6$ Rezeptoren und ($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$) Artefakte. Bei den Bindungswerten handelt es sich um die gemittelte Bindung \pm SD von n unabhängigen Messungen. Die Bindungswerte, sowie die Anzahl durchgeführter Experimente sind Tab. 26 zu entnehmen.

Die Ergebnisse der Western Blot Untersuchung mit dem $\beta 3$ -Antikörper sind in Abb. 50 dargestellt. Die Bande im Bereich 200 kDa war sehr unscharf und breit und weitere Banden in dem Bereich deshalb nicht ausgeschlossen werden. Am Übergang zum Trenngel hatte sich dagegen wenig Protein angesammelt. Eine leichte Bande im Bereich 50 kDa war erkennbar. Vermutlich handelte es sich dabei aber um eine unspezifische Anfärbung durch den Antikörper, denn im Bereich 150 kDa konnte keine Bande detektiert werden. Ein kompletter Zerfall des Konkatomers würde natürlich keine Bande bei 150 oder 100 kDa produzieren, ist aber unwahrscheinlich.

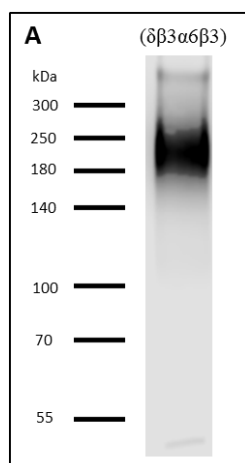


Abb. 50: Western Blot von ($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$) Konkatomeren. Detektion von ($\delta\beta 3\alpha 6\beta 3$) mit dem $\beta 3$ Antikörper 1:5000. Es wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.8.8 Untersuchung des ($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$) Konkatomers

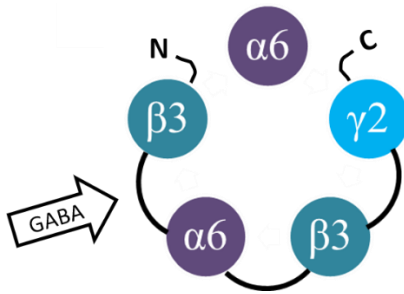


Abb. 51: Schematischer Aufbau von ($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$) $\alpha 6$ Artefakten. Erwartete Zusammensetzung von ($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$) Konkatomeren bei Kotransfektion mit der $\alpha 6$ Untereinheit. Dieses Konkatomer führt zu einem Rezeptor, dessen Anordnung der Untereinheiten nicht der natürlichen Abfolge entspricht.

Das Konkatomer ($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$) ist ein Konstrukt, das eine falsche Anordnung der Untereinheiten vorgibt und somit untersucht werden kann, ob die Assemblierung, wie für einige 2er und 3er Konkatomeren gezeigt, im Uhrzeigersinn erfolgen kann. Eine Assemblierung gegen den Uhrzeigersinn bei Kotransfektion mit einer α Untereinheit würde dem Aufbau in Abb. 51 entsprechen. Das einzeln transfizierte Konstrukt zeigte eine geringe [^3H]Muscimol-Bindung von 36 ± 4 fmol/mg Protein und keine [^3H]RO15-4513-Bindung (Tab. 26). Zusammen mit der $\alpha 6$ Untereinheit ergaben sich Bindungswerte für [^3H]Muscimol von 160 ± 13 fmol und für [^3H]RO15-4513 von 44 ± 19 fmol/mg Protein. Gerade die hohe [^3H]Muscimol-Bindung des Konstrukts in Kombination mit der $\alpha 6$ Untereinheit im Vergleich zu der des einzeln transfizierten Konstrukts zeigt, dass Rezeptoren gebildet werden. Die [^3H]RO15-4513-Bindung war nicht sehr hoch und mit einer großen Standardabweichung belastet. Da allerdings auch andere Konkatomere, deren $\gamma 2$ Untereinheit N-terminal verlinkt war, kaum [^3H]RO15-4513-Bindung zeigten, kann man eine Umkehr der Assemblierungsordnung nicht ausschließen. In Anbetracht der Ergebnisse der Konkatomere ($\alpha 1\beta 3\alpha 6\gamma 2$), ($\alpha 6\beta 3\alpha 1\gamma 2$) und ($\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$) könnte sich das Konstrukt auch im Uhrzeigersinn assemblieren und keine hochaffine Benzodiazepin Bindestelle besitzen.

In Western-Blot-Untersuchungen (Abb. 52) erkennt man neben einer leicht unscharfen Bande im Bereich 200 kDa wieder eine Bande im Bereich von 50 kDa. Bei diesem Konstrukt war wenig Protein am Übergang zum Trenngel steckengeblieben. Eine leichte Bande im Bereich 50 kDa war erkennbar. Vermutlich handelte es sich dabei aber um eine unspezifische Anfärbung durch den Antikörper, denn im Bereich 150 kDa oder 100 kDa konnte keine Bande detektiert werden. Ein kompletter Zerfall des Konkatomers würde keine Bande bei 150 oder 100 kDa produzieren, ist aber eher unwahrscheinlich.

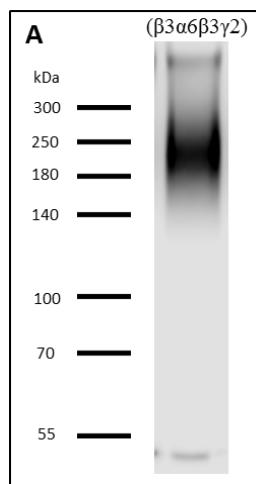


Abb. 52: Western Blot von $(\beta3\alpha6\beta3\gamma2)$ Konkatanen. Detektion von $(\beta3\alpha6\beta3\gamma2)$ mit dem $\beta3$ Antikörper 1:5000. Es wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.8.9 Untersuchung der 5er Konkatanere ($\beta3\alpha6\beta3\alpha6\gamma2$) und ($\beta3\alpha6\beta3\alpha6\delta$)

Tab. 27: Bindung verschiedener Radioliganden an 5er Konkatanere

Konkataner	[^3H]Muscimol-Bindung	n	[^3H]RO15-4513-Bindung	n	[^3H]EBOB-Bindung	n	[^3H]EBOB-Bindung + 10 μM GABA	n
$(\beta3\alpha6\beta3\alpha6\gamma2)$	30 ± 6	4	13 ± 3	3	9 ± 6	2	9 ± 9	2
$(\beta3\alpha6\beta3\alpha6\delta)$	44 ± 3	3			n.d.	1	10 ± 4	1

Gezeigt ist die Bindung von [^3H]RO15-4513, [^3H]Muscimol und [^3H]EBOB, sowie die Bindung von [^3H]EBOB in Anwesenheit von 10 μM GABA an verschiedenen GABA_AR, die aus 5er Konkatanen aufgebaut sind. Die Bindung der Radioliganden ist in fmol/mg Protein angegeben. Die Werte sind als Mittelwerte von n Messungen mit der Standardabweichung angegeben. Einige der [^3H]EBOB-Bindungswerte sind mit n=1 gemessen worden. n.d. (nicht detektierbar) wurde eingetragen, wenn sich die gemessenen Bindungswerte nicht signifikant von der unspezifischen Bindung unterschieden. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methodenteil beschrieben.

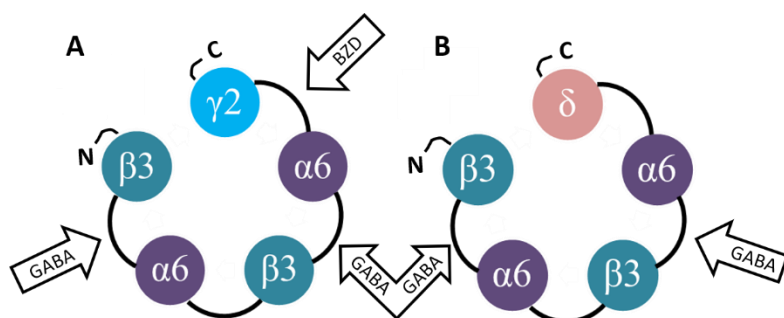


Abb. 53: Schematischer Aufbau von $(\beta3\alpha6\beta3\alpha6\gamma2)$ und $(\beta3\alpha6\beta3\alpha6\delta)$ Rezeptoren. Erwartete Zusammensetzung von (A) $(\beta3\alpha6\beta3\alpha6\gamma2)$ Konkatanen und (B) $(\beta3\alpha6\beta3\alpha6\delta)$ Konkatanen.

5er Konkatanere wurden erstellt, da diese wenig Spielraum für Interpretationen zur Artefakt-Bildung zulassen. Die Bindung war durchweg niedrig und entsprechend wenig brauchbar für eine potentielle

Untersuchung zur Assemblierung der δ -enthaltenden GABA_AR (Tab. 26). Die Konstrukte waren vermutlich zu groß, um sie unter Verwendung von HEK293 Zellen effektiv transfizieren zu können und/oder die Transfektionsrate der großen Vektoren war zu gering.

Im Western Blot mit dem $\beta 3$ Antikörper entsprachen die Banden im Bereich 270 kDa dem erwarteten Größenbereich und waren erstaunlich scharf. Weitere Banden waren nicht zu erkennen.

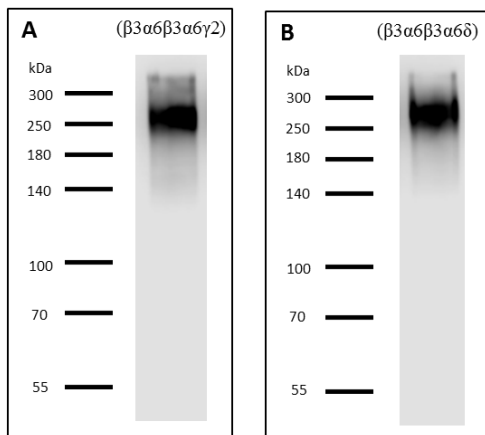


Abb. 54: Western Blot von ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$) und ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$) Konkatanen. A: Detektion von ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$) mit dem $\beta 3$ Antikörper 1:5000. B: Detektion von ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$) mit dem $\beta 3$ Antikörper 1:5000. Es wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.1.9 Unspezifische Antikörperbindung

Mit dem für die Western Blots der 4er und 5er Konkatanen verwendeten $\beta 3$ -Antikörper wurden immer wieder Banden im Bereich von 50-60 kDa detektiert. Diese konnten nicht eindeutig abgespaltenen Untereinheiten zugeordnet werden. Gerade die Tatsache, dass Western Blots der 4er Konkatanen, deren erste oder letzte verlinkte Untereinheit eine $\beta 3$ Untereinheit war, diese Bande aufwiesen, sprach für eine Abspaltung der endständigen Untereinheit. Es wurden Western Blots mit verschiedenen Konkatanen, untransfizierten HEK293 Zellen und einer $\alpha 6\beta 3$ Probe durchgeführt (Abb. 55). Es wurde 30 μ g Protein pro Spur eingesetzt, um die Sichtbarkeit der Bande zu verbessern. Bei allen Proben, auch bei untransfizierten HEK293 Zellen, war eine Bande im Bereich 55 kDa erkennbar. Die $\alpha 6\beta 3$ Probe zeigt zusätzlich eine zweite Bande unterhalb der unspezifischen Bande. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Banden um eine unspezifische Bindung des Antikörpers handelt. Die in diesem Beispiel eingesetzten Konkatanen hatten als endständige Untereinheiten sowohl $\beta 3$ als auch andere Untereinheiten.

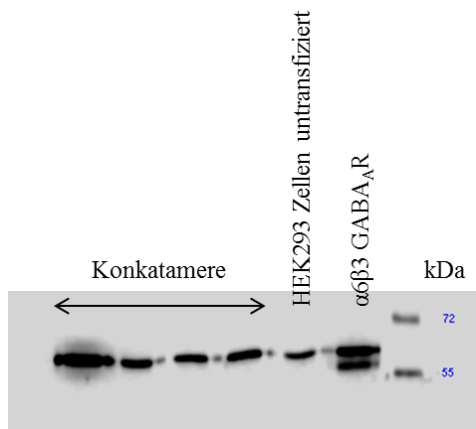


Abb. 55: Unspezifische Bindung des $\beta 3$ -Antikörpers. Der Western Blot mit verschiedenen Konkatameren, rekombinanten $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren und untransfizierten HEK293 Zellen zeigt, dass der $\beta 3$ -Antikörper in der Konzentration 1:5000 eine unspezifische Bande detektiert. Die einzelne $\beta 3$ Untereinheit hebt sich bei längerer Elektrophorese und geringerer Acrylamid-Konzentration im Trenngel deutlich von der unspezifischen Bande ab. Unspezifische und spezifische Bande der einzelnen $\beta 3$ Untereinheit liegen im ähnlichen Größenbereich. Es wurde ein 6%iges Trenngel verwendet.

4.2 Sucrosegradientenzentrifugation

In Radioliganden-Bindungsstudien konnte die Frage nach einem korrekten Zusammenbau der Konkamere mit passenden Gegenstücken nicht eindeutig geklärt werden. Die Ergebnisse mit $(\beta 3\alpha 6\beta 3)\alpha 6\gamma 2$ Rezeptoren im $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulationsversuch mit GABA sprechen dagegen (Abb. 32). Andererseits waren die Ergebnisse von $(\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ Rezeptoren wieder vielversprechend (Abb. 32). Die Bewertung der $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindungsstudien gestaltete sich allerdings oft nicht einfach aufgrund der niedrigen Bindungswerte, vor allem bei den größeren Konkameren. Eine Möglichkeit $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ in ihrer Größe zu unterscheiden, besteht in der Auftrennung über einen Dichtegradienten. Die Separation erfolgt dabei nicht nur aufgrund des vorliegenden Molekulargewichtes, welches bei Artefakten vermutlich höher ist, sondern auch aufgrund der Form und Hydrathülle des Proteins. Die Dichtegradientenzentrifugation könnte damit eine geeignete Methode darstellen, um Artefakte zu erkennen, Aufschluss über die Größe der Artefakte zu geben und eine Artefakt-Bildung bei korrekter Transfektion der Konkamere auszuschließen.

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde ein linearer Sucrosegradient im Konzentrationsbereich 5-20% gewählt. Der Literatur entsprechend sollten $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ einen S-Wert von etwa 9 besitzen.¹⁸⁰ Die Zentrifugationszeit wurde so angepasst, dass die Rezeptoren bis zur Mitte des Gradienten wanderten. Zur Bestimmung des S-Wertes der $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ wurden interne Standards mitzentrifugiert, deren S-Werte bekannt waren.

4.2.1 Interne Standards

Den Sucrosegradienten wurden interne Standards zugesetzt um die Vergleichbarkeit zwischen den Gradienten zu erhöhen. Während der Etablierung der Sucrosegradientenzentrifugation wurden dabei verschiedene Standards eingesetzt. Zuerst wurde eine Kombination aus Catalase-Fluorescein, IgG-Rhodamin und BSA-Fluorescein verwendet. Die mit Fluorescein gekoppelte Catalase wurde gegen nicht-gekoppelte Catalase getauscht, nachdem sich gezeigt hatte, dass das gebundene Fluorescein das Laufverhalten der Catalase in der nativen Gelelektrophorese veränderte (Daten nicht gezeigt) und ein Einfluss auf die Sedimentation nicht ausgeschlossen werden konnte. Die nicht-gekoppelte Catalase wurde durch ihre Peroxidase-Aktivität detektiert (siehe Methodenteil). Bei BSA, das aufgrund seiner geringen Größe nicht sehr weit in den Gradienten hineinläuft, machte die Kopplung mit Fluorescein in der nativen Gelelektrophorese keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). BSA-Fluorescein wurde schließlich trotzdem durch Hämoglobin ersetzt, das einen schmalen Peak mit ähnlichem Sedimentationskoeffizienten aufwies. IgG-Rhodamin wurde durch alkalische Phosphatase ersetzt, denn auch hier konnte keine Aussage zum Einfluss des gekoppelten Rhodamins auf das Laufverhalten im Gradienten gemacht werden. Das Laufverhalten vierer Standards (Catalase, Aldolase, alkalische Phosphatase, Hämoglobin) ist in Abb. 56 dargestellt. Die Fraktionen, in denen die Standards detektiert wurden, waren zwischen den vier Gradienten nahezu identisch. Gießen des Gradienten und Laufverhalten der Standards schienen daher sehr gut reproduzierbar zu sein. Die Literaturwerte,

Erwartungswerte und Standardabweichungen der Normalverteilung der Standards sind in Tab. 28 zusammengefasst. Der Erwartungswert bildet den Schwerpunkt der glockenförmigen Gauss-Verteilung und bezeichnet somit den zu erwartenden S-Wert bzw. die Fraktion in der der Großteil des Proteins wiederzufinden ist. Während die S-Werte von Catalase, Aldolase und Hämoglobin einen linearen Zusammenhang bilden, ist der S-Wert der alkalischen Phosphatase verschoben. Wieso der S-Wert nicht mit dem publizierten übereinstimmte, ließ sich nicht ermitteln. Da er jedoch bei der Ermittlung der Trendlinie mit zugrunde gelegt wurde, ist die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Gradienten gewährleistet.

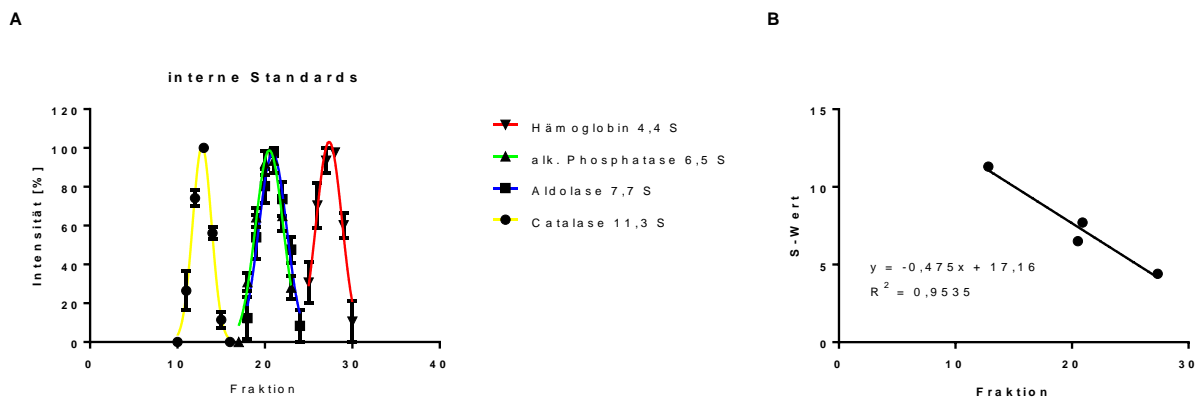


Abb. 56: Verteilung der internen Standards im 5-20%igen Sucrosegradienten nach 48 h Zentrifugation. A: Detektion der internen Standards Hämoglobin (4,4 S), alkalische Phosphatase (6,5 S), Aldolase (7,7 S) und Catalase (11,3 S) im 5-20%igen Sucrosegradienten nach 48 h Zentrifugation. Die maximale Intensität der jeweiligen Nachweismethode wurde auf 100% gesetzt. Es handelt sich bei den Werten um die Mittelwerte \pm SEM der Verteilung der Standards in vier verschiedenen Gradienten. B: Linearer Zusammenhang der vier Standards. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

Tab. 28: Verteilung der internen Standards in einem 5-20%igen Sucrosegradienten nach 48 h Zentrifugation.

Standard	Erwartungswert \pm SD (Fraktion)	n
Catalase 11,3 S	$12,82 \pm 1,08$	4
Aldolase 7,7 S	$20,90 \pm 1,60$	4
Alk. Phosphatase 6,5 S	$20,51 \pm 1,58$	4
Hämoglobin 4,4 S	$27,35 \pm 1,47$	4

Dargestellt sind die Erwartungswerte \pm SD der internen Standards in einem 5-20%igen Sucrosegradienten nach 48 h Zentrifugation. Der Erwartungswert der Gauss-Verteilung jedes Standards ist die zu erwartende Fraktion als Mittelwert \pm SD von vier unabhängigen Zentrifugationen. Der Erwartungswert wurde durch einen Gauss-Fit ermittelt. Insgesamt wurden den Gradienten im Schnitt 32 Fraktionen abgenommen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.2 Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien

Abb. 57 zeigt in einem Vorversuch die [^3H]Muscimol-Bindung an Überstände und Pellets von $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren, die durch verschiedene Detergenzien solubilisiert wurden. Solubilisiert wurde jeweils mit einer Endkonzentration von 1% Detergenz. Nur bei Desoxycholat wurde eine Endkonzentration von 0,5% eingesetzt. Bei allen Detergenzien war der Großteil der [^3H]Muscimol-Bindung im Pellet wiederzufinden. Verglichen mit der Bindung an nicht solubilierten Rezeptoren aus dem Pellet zeigten die Detergenzien n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und Desoxycholat die höchste [^3H]Muscimol-Bindung im Überstand. Wie zu erwarten, konnte man nach Solubilisierung mit SDS weder im Überstand noch im Pellet eine [^3H]Muscimol-Bindung messen, da SDS als chaotropes Detergenz die Untereinheiten der Rezeptoren auseinanderreißt. Die [^3H]Muscimol-Bindung nach Solubilisierung mit Triton X-100 lag bei 937 ± 12 fmol/mg Protein im Überstand (27%) und 2513 ± 119 fmol/mg Protein im Pellet (73%). Die Solubilisierung mit 1% DDM zeigte eine Bindung von 759 ± 16 fmol im Überstand (36%) und 1325 ± 12 fmol im Pellet (64%). Bei Octyl- β -D-glucopyranosid (OdGP) waren es 602 ± 31 fmol im Überstand (25%) und 1843 ± 111 im Pellet (75%). Die Solubilisierung mit 1% CHAPS zeigte eine Bindung von 540 ± 17 fmol im Überstand (28%) und 1372 ± 22 fmol im Pellet (72%). Bei 0,5% Desoxycholat waren es 1096 ± 30 fmol im Überstand (34%) und 2137 ± 10 fmol im Pellet (66%).

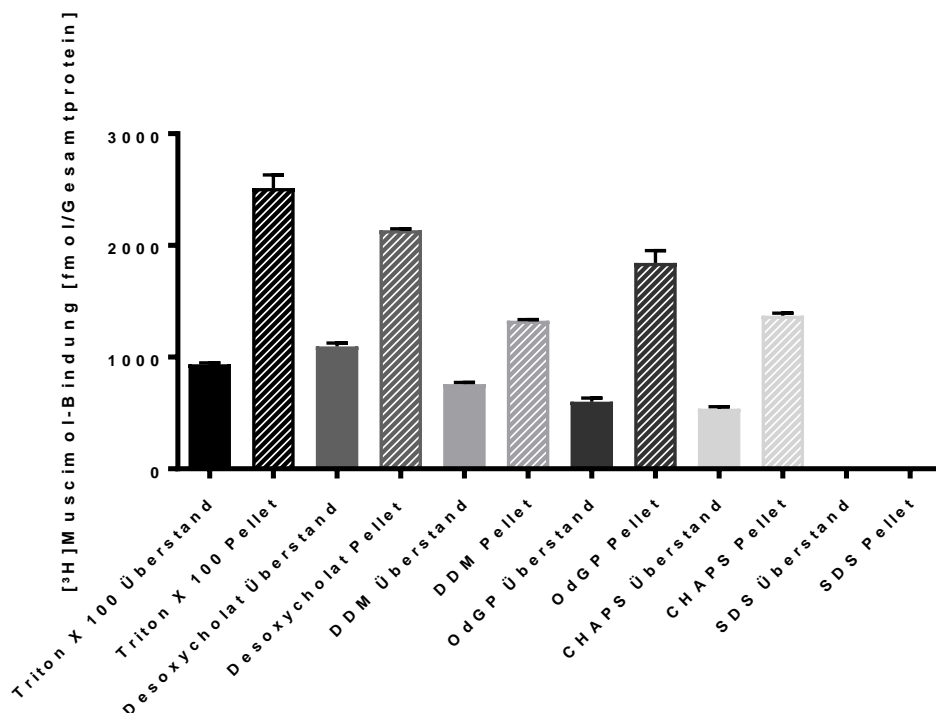


Abb. 57: Solubilisierungseffizienz verschiedener Detergenzien an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_AR. Die Solubilisierung erfolgte 1 h bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler. Solubilisiert wurden Membranen, die mit $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ transient transfiziert worden waren. Die Proteinkonzentration der kruden Membranen bei Solubilisierung lag bei ca. 4 mg/ml. Gemessen wurden die Überstände und Pellets nach 1 h Zentrifugation bei 100000 g im [^3H]Muscimol-Assay. Die Bindungswerte repräsentieren die gesamte Bindung, die jeweils in Überstand und Pellet gemessen wurde. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse aus einem Experiment. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

Bei der Solubilisierung von konkatameren Rezeptoren fiel auf, dass diese durch die in Abb. 57 dargestellten Detergenzien schwerer zu solubilisieren waren als Rezeptoren aus einzeln transfizierten Untereinheiten. In Solubilisierungsversuchen mit CHAPS, Desoxycholat und Octyl- β -D-glucopyranosid konnte sowohl bei $(\beta 3\alpha 6)\delta$ Rezeptoren als auch bei einzeln transfizierten $(\beta 3\alpha 6)$ Artefakten nur geringe $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung im Überstand nachgewiesen werden (Abb. 58). Auffallend hohe $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung fand sich dagegen im Pellet wieder. Die konkatameren Rezeptoren scheinen demnach schwerer aus der Plasmamembran herauszulösen zu sein. Sarkosyl wurde als härteres Detergenz eingesetzt und die Bindungswerte im Überstand nach Solubilisierung waren hoch (Abb. 58). Die Solubilisierungskraft von Sarkosyl war dabei so hoch, dass praktisch kein Protein im Pellet wiedergefunden werden konnte. Überraschend war daher, dass das Detergenz trotz seiner Aggressivität viele GABA_AR intakt ließ. Die gesamte $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung von $(\beta 3\alpha 6)\delta$ betrug im Überstand 37 ± 1 fmol und im Pellet 4 ± 1 fmol. $90 \pm 2\%$ der Rezeptoren wurden damit im Überstand wiedergefunden. Bei $(\beta 3\alpha 6)$ betrug die gesamte $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung im Überstand 160 ± 4 fmol und im Pellet 44 ± 2 fmol. Entsprechend wurden $79 \pm 2\%$ der Rezeptoren solubilisiert.

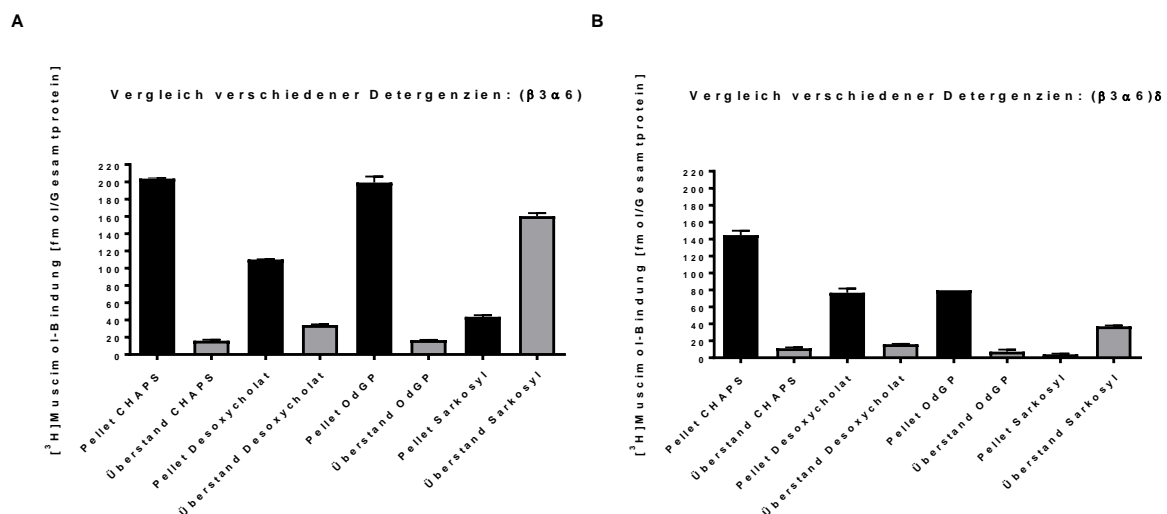


Abb. 58: Solubilisierungseffizienz verschiedener Detergenzien an konkatameren Rezeptoren. Die Solubilisierung erfolgte 1 h bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler. Solubilisiert wurden Membranen, die mit $(\beta 3\alpha 6)$ (A) und $(\beta 3\alpha 6)\delta$ (B) transient transfiziert worden waren. Die Proteinkonzentration der kruden Membranen bei Solubilisierung lag bei ca. 4 mg/ml. Gemessen wurden die Überstände und Pellets nach 1 h Zentrifugation bei 100000 g im $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ Assay. Die Bindungswerte repräsentieren die gesamte Bindung, die jeweils in Überstand und Pellet gemessen wurde. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse aus einem Experiment. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Solubilisierung von $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren. Dort konnte nach Solubilisierung kein Pellet mehr nachgewiesen werden, weder im Bradford-Assay noch in der $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung. In diesem Experiment wurde die $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung der kruden

Proteinsuspension mitgemessen, um den Anteil intakter GABA_AR nach einstündiger Solubilisierung mit Sarkosyl zu bestimmen. Die gesamte Bindung im Überstand nach Solubilisierung betrug 217 ± 11 fmol in ca. 750 μ g Protein. Verglichen mit der Bindung der kruden Proteinsuspension, die eine [³H]Muscimol-Bindung von 365 ± 23 fmol/750 μ g Protein aufwies, bedeutet das, dass 59% der Rezeptoren intakt solubilisiert wurden. Der Bindungsvergleich mit kruder Membransuspension deutet darauf hin, dass Sarkosyl während des Solubilisierungsprozesses bereits 40% der Rezeptoren zerstört.

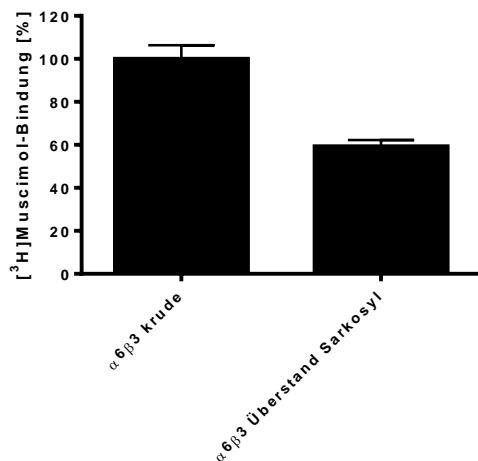


Abb. 59: Solubilisierungseffizienz von Sarkosyl an $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren. Die Solubilisierung erfolgte 1 h bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler. Solubilisiert wurden Membranen, die mit $\alpha 6\beta 3$ transient transfiziert wurden. Die Proteinkonzentration der kruden Membranen bei Solubilisierung lag bei ca. 4 mg/ml. Gemessen wurden die krude Membransuspension und der Überstand nach Solubilisierung im [³H]Muscimol-Assay. Die auf 1 mg Protein bezogene [³H]Muscimol-Bindung an Rezeptoren der kruden Membransuspension wurde auf 100% gesetzt und die Bindung an solubilierte Rezeptoren des Überstands ist prozentual dazu angegeben. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse aus einem Experiment. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.3 Stabilität der solubilierten Rezeptoren und Einfluss von Sarkosyl auf die [³H]Muscimol Bindung

Sarkosyl zeigte in einer Endkonzentration von 1% eine zuverlässige Solubilisierung von GABA_AR. Vor Durchführung des [³H]Muscimol-Bindungsexperiments musste das Solubilisat 1:10 verdünnt werden, um die Sarkosyl-Konzentration auf 0,1% zu reduzieren, denn eine Sarkosyl-Konzentration von 1% störte die [³H]Muscimol-Bindung (Abb. 60). Der abgebildete Versuch zeigte die [³H]Muscimol-Bindung an kruder Membransuspension mit und ohne Zusatz von Sarkosyl in unterschiedlicher Konzentration. Das Bindungsexperiment wurde unmittelbar nach Zugabe des Detergenz durchgeführt, damit eine mögliche Reduktion der [³H]Muscimol-Bindung nicht durch Degradation der Rezeptoren verursacht werden konnte. Die [³H]Muscimol-Bindung betrug 381 ± 16 fmol/mg Protein in Abwesenheit des Detergenz. Die Anwesenheit von 0,1 % Sarkosyl beeinflusste die

Bindung nicht (450 ± 27 fmol/mg Protein). Die Anwesenheit von 1% Sarkosyl reduzierte die [^3H]Muscimol-Bindung auf 42 ± 12 fmol/mg Protein.

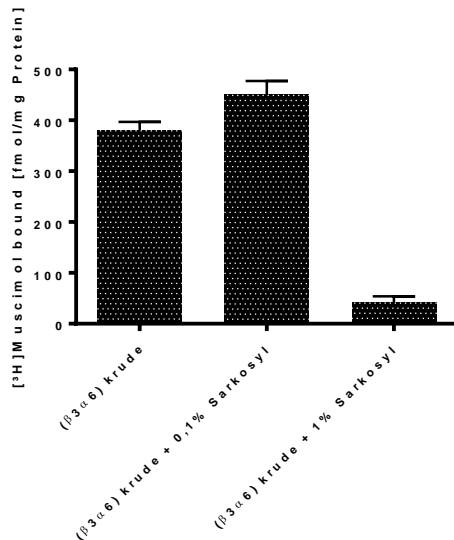


Abb. 60: Einfluss von Sarkosyl auf die [^3H]Muscimol-Bindung. Gemessen wurde die [^3H]Muscimol-Bindung an ($\beta 3\alpha 6$) Rezeptor-Artefakte von kruden Membranen ohne Zusatz und jeweils mit Zusatz von 0,1% und 1% Sarkosyl. Dabei wurde der Einfluss des Detergenz auf die [^3H]Muscimol-Bindung ermittelt. Die Bindungswerte sind in fmol/mg Protein angegeben. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse aus einem Experiment. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

Nachdem Probleme auftraten, die Rezeptoren nach einer Zentrifugation von 48 h im Gradienten wiederzufinden, stellte sich die Frage nach der Stabilität der solubilisierten Proteine über einen längeren Zeitraum hinweg bei einer bestimmten Sarkosyl-Konzentration. Dem Gradientenpuffer wurde Sarkosyl zu einer Endkonzentration von 0,1% zugefügt. Es wurde ein Experiment durchgeführt, in dem $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren unmittelbar nach Solubilisierung, sowie 24 und 48 h später auf ihre [^3H]Muscimol-Bindung überprüft wurden. Das Solubilisat wurde dazu 24 bzw. 48 h bei 4°C unverdünnt und 1:10 verdünnt gelagert. Die Ergebnisse sind in Abb. 61 dargestellt. Während die [^3H]Muscimol-Bindung sofort nach der Solubilisierung 89 ± 2 fmol pro mg Protein betrug, änderte diese sich in unverdünntem Zustand auch nach 24 h (100 ± 4 fmol/mg Protein) und 48 h (80 ± 1 fmol/mg Protein) nicht. Wurde das Solubilisat jedoch in verdünntem Zustand aufbewahrt, reduzierte sich die [^3H]Muscimol Bindung auf 55 ± 3 fmol/mg Protein nach 24 h, blieb dann aber konstant und betrug nach 48 h immer noch 53 ± 4 fmol/mg Protein. Dennoch scheint eine Reduktion der [^3H]Muscimol-Bindung durch Degradation einiger GABA_{A} R in 0,1%iger Sarkosyl-Konzentration wahrscheinlich, da diese Reduktion nach 24 h sowie 48 h gezeigt wurde. Ein 1%iger Sarkosyl-haltiger Gradientenpuffer wäre demnach für die Stabilität der Rezeptoren von Vorteil. Da allerdings die [^3H]Muscimol-Bindung erheblich durch die hohe Sarkosyl-Konzentration gestört würde, wurde eine 0,1%ige Sarkosyl-Konzentration im Gradientenpuffer beibehalten.

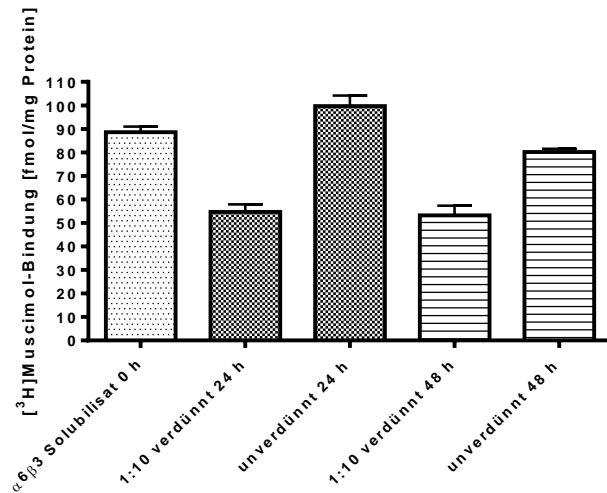


Abb. 61: Einfluss von Zeit und Konzentration auf die Degradation von solubilisierten Rezeptoren. Gemessen wurde die [³H]Muscimol-Bindung in fmol/mg Protein an solubilisierten $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren. Das Solubilisat wurden jeweils unverdünnt und 1:10 verdünnt bei 4°C für 24 bzw. 48 h im Kühlschrank gelagert und die Degradation im [³H]Muscimol-Assay überprüft. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse aus einem Experiment. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.4 Sucrosegradientenzentrifugationen verschiedenener GABA_AR

Die S-Werte einiger konkatamerer Rezeptoren und Artefakt-Rezeptoren sowie von $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren aus einzeln transfizierten Untereinheiten wurden über die Sucrosegradientenzentrifugation ermittelt. Dabei ergab sich für alle untersuchten Rezeptor-Proteine ein sehr ähnlicher S-Wert. Die ermittelten S-Werte stimmen zudem mit dem Wert überein, der für ein Rezeptor-Pentamer publiziert wurde.¹⁸⁰ In den hier durchgeführten Experimenten wurden nicht die absoluten S-Werte ermittelt, sondern Werte in Relation zu den S-Werten der internen Standards. Wichtig ist daher, die S-Werte der konkatameren Rezeptoren mit denen von Rezeptoren aus einzeln transfizierten Untereinheiten zu vergleichen.

4.2.4.1 Sucrosegradientenzentrifugation mit $\alpha 6\beta 3\gamma 2$

Als interne Standards wurden Catalase, Aldolase, alkalische Phosphatase und Hämoglobin eingesetzt. Diese konnten nach 48 h Zentrifugation in den folgenden Fraktionen detektiert werden: Catalase (F12,91), Aldolase (F20,98), alk. Phosphatase (F20,65), Hämoglobin (F27,61). Der sich daraus ergebende lineare Zusammenhang ist in Abb. 62 dargestellt. Bei der Auswertung der internen Standards erkennt man, dass Aldolase und alkalische Phosphatase trotz der publizierten unterschiedlichen S-Werte in annähernd denselben Fraktionen wiederzufinden sind. Die beiden Standards verhielten sich bei allen durchgeführten Zentrifugationen in dieser Hinsicht gleich. Die Linearität der Gradienten wurde nach der Zentrifugation überprüft und keine Auffälligkeiten festgestellt.

Die Ermittlung des S-Wertes von $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_AR ergab in drei unabhängigen Zentrifugationen einen Peak bei einem mittleren Wert von $8,93 \pm 0,83$ (Abb. 62). Die Abhängigkeit der Fraktionen von den S-Werten, die sich aus den Positionen der internen Standards ergibt, wurde gegen die prozentualen [³H]Muscimol-Bindungswerte der Fraktionen aufgetragen. Die maximale Bindung wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Eine leicht erhöhte Bindung (4% in Relation zur maximalen Bindung) wurde zusätzlich bei $12,28 \pm 2,20$ S festgestellt.

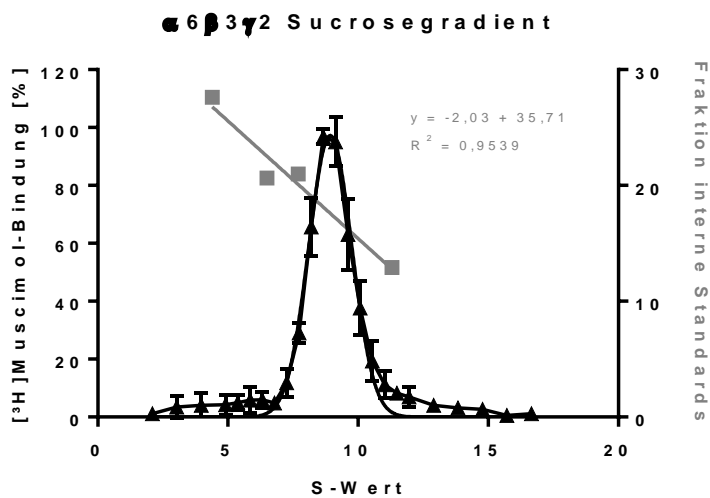


Abb. 62: Sucrosegradientenzentrifugation von solubilisierten $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. Der lineare Zusammenhang der internen Standards aus drei verschiedenen Gradienten ist in grau dargestellt. Die [³H]Muscimol-Bindung aus drei unabhängigen Zentrifugationen ist in fmol/300 μ l Fraktion \pm SD der abgenommenen Fraktionen angegeben. Die $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren wurden mit 1% Sarkosyl solubilisiert und 48 h zentrifugiert. Zur Ermittlung des Erwartungswertes wurde ein Gauss-Fit angelegt. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse von drei unabhängigen Dichtegradientenzentrifugationen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.4.2 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\beta 3\alpha 6$) Rezeptor-Artefakten

Anfangs wurden vor allem Rezeptor-Artefakte aus ($\beta 3\alpha 6$) Konkatameren in der Sucrosegradientenzentrifugation analysiert. Dies geschah aufgrund der hohen [³H]Muscimol-Bindung und der robusteren Solubilisierung bzw. Beständigkeit dieser Rezeptoren gegen Sarkosyl. Bei den zwei hier zusammengefassten Versuchen wurden teilweise unterschiedliche interne Standards verwendet. Beim ersten Versuch wurden Catalase, Rhodamin-gekoppeltes IgG und Fluorescein-gekoppeltes BSA verwendet. Beim zweiten Versuch wurde das Rhodamin-gekoppelte IgG gegen alkalische Phosphatase ersetzt, da sich die S-Werte in ähnlichen Bereichen befanden und beim IgG der Einfluss des gekoppelten Rhodamins auf den S-Wert unklar war. Außerdem zeigte sich die alkalische Phosphatase als interner Standard aufgrund des schmalen Peaks von Vorteil. Die Ergebnisse sind in Abb. 63 dargestellt. A und B zeigen die Verteilung der internen Standards im Gradienten. Die Nachweisverfahren der einzelnen Standards sind im Material- und Methodenteil aufgeführt. C und D

stellen den linearen Zusammenhang der internen Standards dar und bilden die Grundlage der Berechnung des geschätzten S-Werts der GABA_AR. E und F zeigen die [³H]Muscimol-Bindung der Fraktionen der beiden Sucrosegradienten. Die Peaks befanden sich im Bereich 9,24 S und 8,55 S. Als Mittelwert ergab sich damit ein S-Wert von $8,90 \pm 0,49$. Da dieser im Bereich der publizierten 9 S für ein GABA_AR-Pentamer liegt, scheint das Artefakt im Vergleich zu normalen Rezeptoren keine gravierenden Unterschiede in der Dichtegradientenzentrifugation zu zeigen. In Abb. 63 E sind zusätzliche Peaks erkennbar. Diese liegen im Bereich von 6, 12 und 15 S, ließen sich aber in der zweiten Zentrifugation (Abb. 63 F) nicht bestätigen, obwohl auch dort die Bindung im niedrigen S-Bereich wieder anstieg.

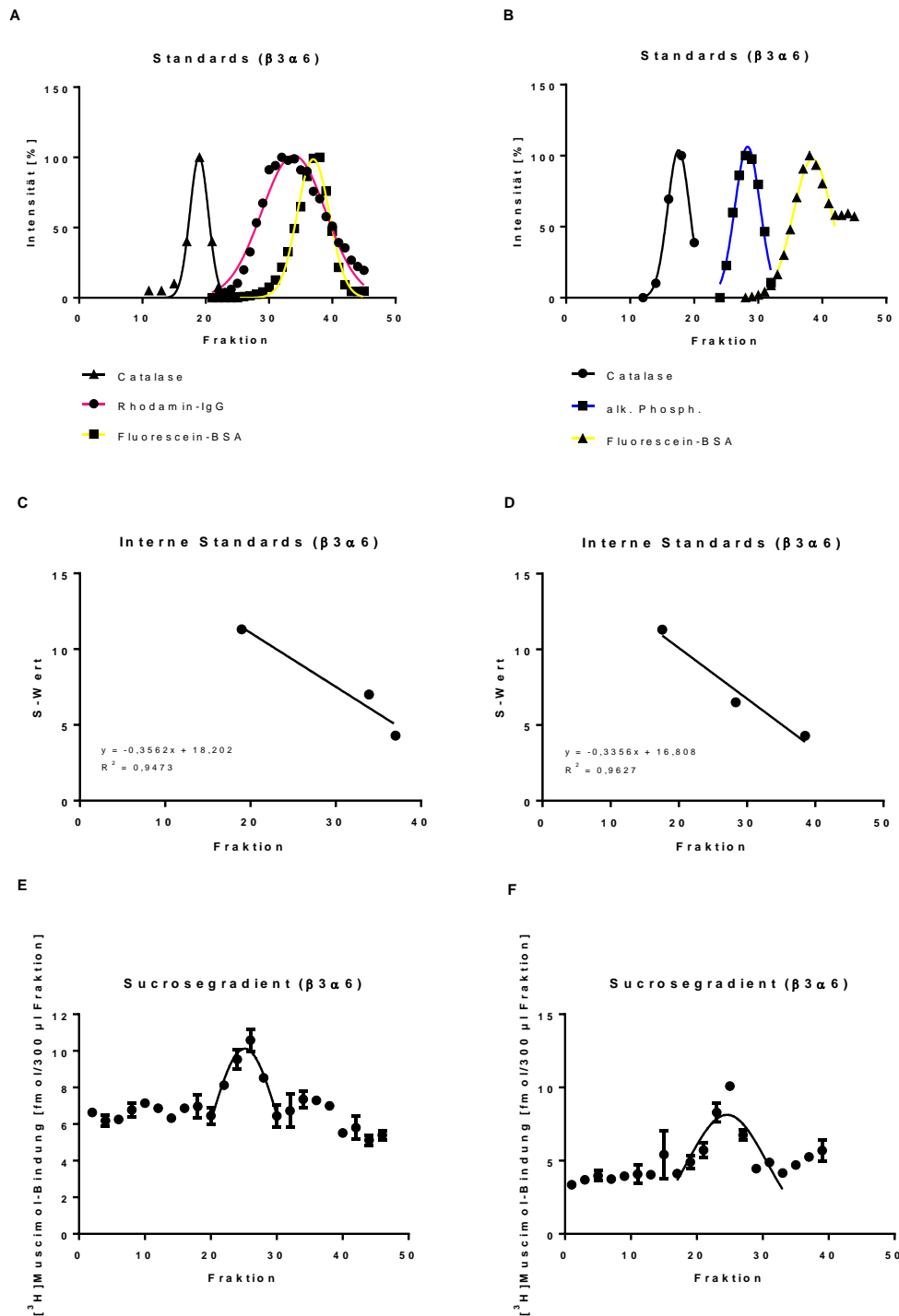


Abb. 63: Sucrosegradientenzentrifugation von solubilisierten ($\beta 3\alpha 6$) Rezeptor-Artefakten. A, B: Laufverhalten der zugesetzten internen Standards im Gradienten der beiden Zentrifugationen. C, D: Linearer Zusammenhang der internen Standards. E, F: $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung in fmol/300 μl Fraktion der abgenommenen Fraktionen. Die ($\beta 3\alpha 6$) Rezeptor-Artefakte wurden mit 1% Sarkosyl solubilisiert und 48 h zentrifugiert. Zur Ermittlung des Erwartungswertes wurde ein Gauss-Fit angelegt. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse aus einem Experiment. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.4.3 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\alpha 6\beta 3$) Rezeptor-Artefakten

Die Dichtegradientenzentrifugation wurde fortgeführt mit ($\alpha 6\beta 3$) Konkakameren. Diese zeigten ebenfalls ausgeprägte Artefakt-Bildung und hohe Bindungswerte in [^3H]Muscimol-Bindungsexperimenten. Als interne Standards wurden Catalase, Aldolase, alkalische Phosphatase und Hämoglobin eingesetzt. Diese konnten nach 48 h Zentrifugation in den folgenden Fraktionen detektiert werden: Catalase (F13,23), Aldolase (F21,32), alk. Phosphatase (F21,06), Hämoglobin (F27,95). Der sich daraus ergebende lineare Zusammenhang ist in Abb. 64 dargestellt. Die Sucrosegradientenzentrifugation von ($\alpha 6\beta 3$) GABA_AR ergab in drei unabhängigen Experimenten einen Peak bei $9,00 \pm 0,90$ S (Abb. 64). Die Abhängigkeit der Fraktionen von den S-Werten, die sich aus den Positionen der internen Standards ergibt, wurde gegen die prozentuale [^3H]Muscimol-Bindung der Fraktionen aufgetragen. Die höchste gemessene Bindung wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Ein weiterer Peak wurde bei $5,37 \pm 1,42$ S detektiert. Dieser war mit 15% der maximalen Bindung deutlich ausgeprägt.

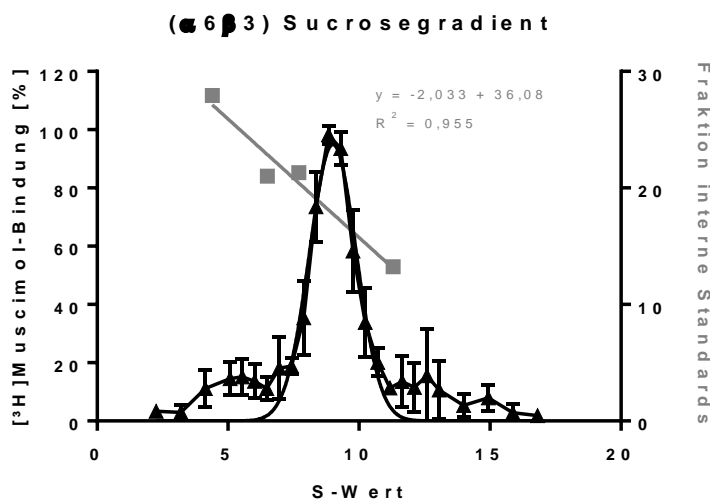


Abb. 64: Sucrosegradientenzentrifugation von solubilisierten ($\alpha 6\beta 3$) Rezeptor-Artefakten. Der lineare Zusammenhang der internen Standards aus drei verschiedenen Gradienten ist in grau dargestellt. Die [^3H]Muscimol-Bindung aus drei unabhängigen Zentrifugationen ist in fmol/300 μl Fraktion \pm SD der abgenommenen Fraktionen angegeben. Die ($\alpha 6\beta 3$) Rezeptor-Artefakte wurden mit 1% Sarkosyl solubilisiert und 48 h zentrifugiert. Zur Ermittlung des Erwartungswertes wurde ein Gauss-Fit angelegt. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse aus drei unabhängigen Dichtegradientenzentrifugationen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.4.4 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ Rezeptoren

GABA_AR, die zum 2er Konstrukt ($\alpha 6\beta 3$) eine $\gamma 2$ Untereinheit Rezeptoren enthielten und somit ein gewöhnliches Rezeptor-Pentamer bilden können, wurden ebenfalls untersucht, um mögliche Abweichungen zu den Artefakt-Rezeptoren ($\alpha 6\beta 3$) zu bestimmen. Als interne Standards wurden Catalase, Aldolase, alkalische Phosphatase und Hämoglobin eingesetzt. Diese konnten nach 48 h Zentrifugation in den folgenden Fraktionen detektiert werden: Catalase (F12,8), Aldolase (F20,83),

alk. Phosphatase (F21,02), Hämoglobin (F27,97). Der sich daraus ergebende lineare Zusammenhang ist in Abb. 65 dargestellt. Die Ermittlung des S-Wertes von ($\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ GABA_AR ergab in drei unabhängigen Zentrifugationen einen mittleren Wert von $9,06 \pm 0,93$ S (Abb. 65). Die Abhängigkeit der Fraktionen von den S-Werten, die sich aus den Positionen der internen Standards ergibt, wurde gegen die prozentuale [³H]Muscimol-Bindung der Fraktionen aufgetragen. Ein zusätzlicher Anstieg der Bindung wurde bei $13,12 \pm 1,34$ S detektiert. Dieser war mit 5% der Maximalbindung aber gering.

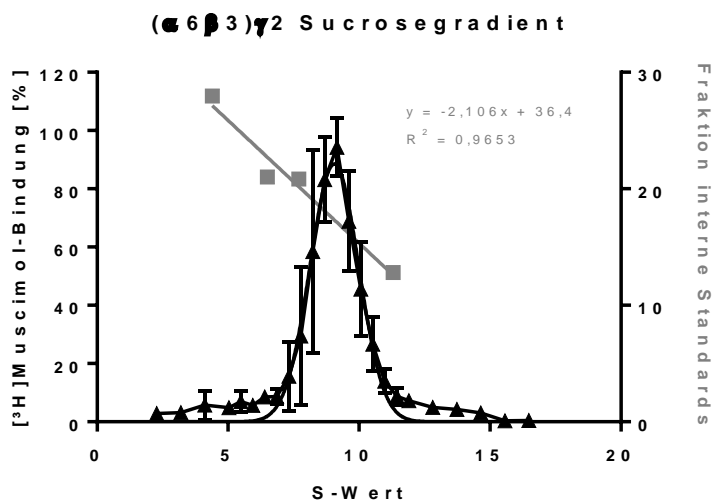


Abb. 65: Sucrosegradientenzentrifugation von solubilisierten ($\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ Rezeptoren. Der lineare Zusammenhang der internen Standards aus drei verschiedenen Gradienten ist in grau dargestellt. Die [³H]Muscimol-Bindung aus drei unabhängigen Zentrifugationen ist in fmol/300 μ l Fraktion \pm SD der abgenommenen Fraktionen angegeben. Die ($\alpha 6\beta 3$) $\gamma 2$ Rezeptoren wurden mit 1% Sarkosyl solubilisiert und 48 h zentrifugiert. Zur Ermittlung des Erwartungswertes wurde ein Gauss-Fit angelegt. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse dreier unabhängiger Dichtegradientenzentrifugationen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.4.5 Sucrosegradientenzentrifugation von ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ Rezeptoren

GABA_AR, die zum 2er Konstrukt ($\beta 3\alpha 6$) eine $\gamma 2$ Untereinheit Rezeptoren enthielten und somit ein gewöhnliches Rezeptor-Pentamer bilden können, wurden untersucht, um mögliche Abweichungen zu den Artefakt-Rezeptoren ($\beta 3\alpha 6$) zu bestimmen. Als interne Standards wurden Catalase, Aldolase, alkalische Phosphatase und Hämoglobin eingesetzt. Diese konnten nach 48 h Zentrifugation in den folgenden Fraktionen detektiert werden: Catalase (F12,53), Aldolase (F20,48), alk. Phosphatase (F20,09), Hämoglobin (F26,83). Der sich daraus ergebende lineare Zusammenhang ist in Abb. 66 dargestellt. Die Ermittlung des S-Wertes von ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ GABA_AR ergab in drei unabhängigen Zentrifugationen einen mittleren Wert von $8,96 \pm 0,91$ S (Abb. 66). Die Abhängigkeit der Fraktionen von den S-Werten, die sich aus den Positionen der internen Standards ergibt, wurde gegen die prozentuale [³H]Muscimol-Bindung der Fraktionen aufgetragen. Wie schon bei den Sucrosegradienten

von $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ und $(\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ Rezeptoren wurde auch hier ein geringfügiger Anstieg der $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung bei $13,21 \pm 1,91$ S detektiert, der sich mit 5% der Maximalbindung abhob.

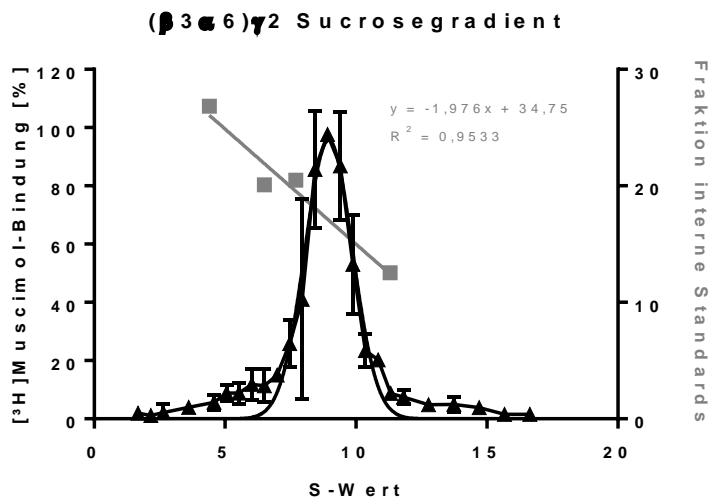


Abb. 66: Sucrosegradientenzentrifugation von solubilisierten ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ Rezeptoren. Der lineare Zusammenhang der internen Standards aus zwei verschiedenen Gradienten ist in grau dargestellt. Die $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung aus zwei unabhängigen Zentrifugationen ist in fmol/300 μl Fraktion \pm SD der abgenommenen Fraktionen angegeben. Die ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ Rezeptoren wurden mit 1% Sarkosyl solubilisiert und 48 h zentrifugiert. Zur Ermittlung des Erwartungswertes wurde ein Gauss-Fit angelegt. Bei den dargestellten Bindungswerten handelt es sich um die Ergebnisse zwei unabhängigen Dichtegradientenzentrifugationen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben.

4.2.4.6 Vergleich der einzelnen Zentrifugationen

In Tab. 29 sind alle gemittelten S-Werte der Rezeptoren zusammengefasst. Deutlich lässt sich erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den ermittelten S-Werten der Hauptpeaks gibt. Die verschiedenen Rezeptor-Proteine zeigten in diesem Bereich dasselbe Zentrifugationsverhalten im Sucrosegradienten von 5-20%. Bei $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $(\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ und $(\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ Rezeptoren zeigte sich in den Zentrifugationen eine leichte Erhebung im Bereich von 12 bis 13 S. Bei $(\alpha 6\beta 3)$ Artefakten war neben dem Hauptpeak ein deutlicher Peak im Bereich von 5 S zu beobachten, der bei den anderen Rezeptoren fehlte.

Tab. 29: Ermittelte Sedimentationskoeffizienten verschiedener Rezeptoren

Rezeptor	S-Wert	n	p-Wert bei Vgl. mit $\alpha\beta\gamma_2$
$\alpha\beta\gamma_2$	$8,93 \pm 0,83$	3	
$(\alpha\beta\beta_3)$	$9,00 \pm 0,90$	3	0,926
$(\alpha\beta\beta_3)\gamma_2$	$9,06 \pm 0,93$	3	0,865
$(\beta_3\alpha\beta)\gamma_2$	$8,96 \pm 0,91$	2	0,972
$(\beta_3\alpha\beta)$	$8,90 \pm 0,49$	2	0,967

In Sucrosegradientenzentrifugationen ermittelte S-Werte verschiedener GABA_AR. Die S-Werte wurden anhand jeweils mitzentrifugierter interner Standards mit bekannten S-Werten berechnet. Die Mittelwerte der Erwartungswerte aus den Gauss-Fits wurden zur Berechnung der S-Werte herangezogen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zum statistischen Vergleich der S-Werte der konkatameren Rezeptoren mit dem Sedimentationskoeffizienten von $\alpha\beta\gamma_2$ Rezeptoren wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet.

4.3 Untersuchung der Liganden DS1/DS2 und ihrer Derivate

DS1 und DS2 wurden im Jahr 2009 von Wafford et al. als δ -selektive Liganden des $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ publiziert. Bei DS1 fand man neben dem GABA-modulatorischen Effekt an $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren auch eine direkte Rezeptoraktivierung.²⁰³ DS2 schien dagegen nur einen GABA-modulatorischen Effekt zu besitzen und zeigte Selektivität für $\alpha 1/4/6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren.¹⁷⁴ Mit DS1 hätte man demnach einen GABA-unabhängigen, δ -selektiven $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ -Liganden, um eine Affinitätschromatographie durchführen zu können. Der Ligand müsste an ein Säulenmaterial, z.B. NHS-Agarose, gekoppelt werden. Dazu muss eine für die Bindung an den $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ wenig bedeutsame Struktur im Molekül identifiziert werden, an die eine aminierte Kohlenstoffkette angehängt werden kann. Um die dazu unerlässliche SAR-Studie durchführen zu können, wurden in Kooperation mit Instituten für organische Chemie 25 Derivate angefertigt.

4.3.1 Derivate von DS1 und DS2

Die 25 Derivate von DS1 und DS2 wurden auf ihre Aktivität und Selektivität an $\alpha 6\beta 3\delta$ $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ getestet. Diese Rezeptoren kommen neben $\alpha 6\beta 2\delta$ Rezeptoren exklusiv in den Granulazellen des Cerebellums vor.^{18, 204} Die Derivate wurden entsprechend ihrer Synthesefolge durchnummeriert und werden im weiteren Verlauf als solche dargestellt. Im Anhang findet sich Tab. 33, in der die Molekülstrukturen aller Derivate, sowie die der Leitstrukturen dargestellt sind. DS1 und DS2 unterscheiden sich nur durch die Anzahl der Bromierungen. Während DS1 im Pyridin-Teil doppelt bromiert ist (Abb. 67), weist DS2 in diesem Bereich keine Substituenten auf. Die Derivate zeigen strukturelle Veränderungen im Bereich der Thiophen-Gruppe und der Benzamid-Gruppe, die an den Imidazol-Teil des Grundgerüsts gebunden sind und im Bereich der Bromierung am Pyridin-Teil (Abb. 67).

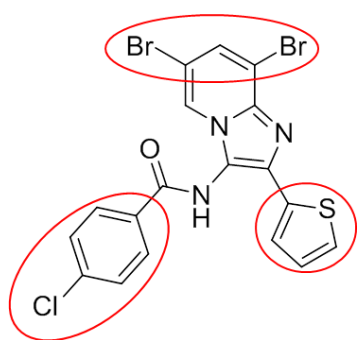


Abb. 67: Struktur der Verbindung DS1. Dargestellt sind durch rote Markierung die Bereiche, in denen das Molekül verändert wurde.

4.3.2 Bindung der Substanzen an rekombinante δ -enthaltende $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$

Zunächst wurden die Leitstrukturen DS1 und DS2 sowie alle Derivate in [^3H]EBOB-Bindungsstudien an rekombinanten $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren getestet. Zu einer Konzentration des Liganden [^3H]EBOB von 3

nM wurde zunächst eine sehr hohe Konzentration (10 μM) der Substanzen gegeben. Es wurde nach einem Liganden gesucht, der auch in Abwesenheit von GABA die [^3H]EBOB-Bindung am Rezeptor modulierte. Zeigten die Derivate an diesem Rezeptortyp keine direkte Aktivität, wurden sie nicht weiter untersucht. Substanzen, die Aktivität zeigten, wurden auch an weiteren $\alpha 6$ -enthaltenden $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ getestet. Für einige Verbindungen wurden zudem Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt.

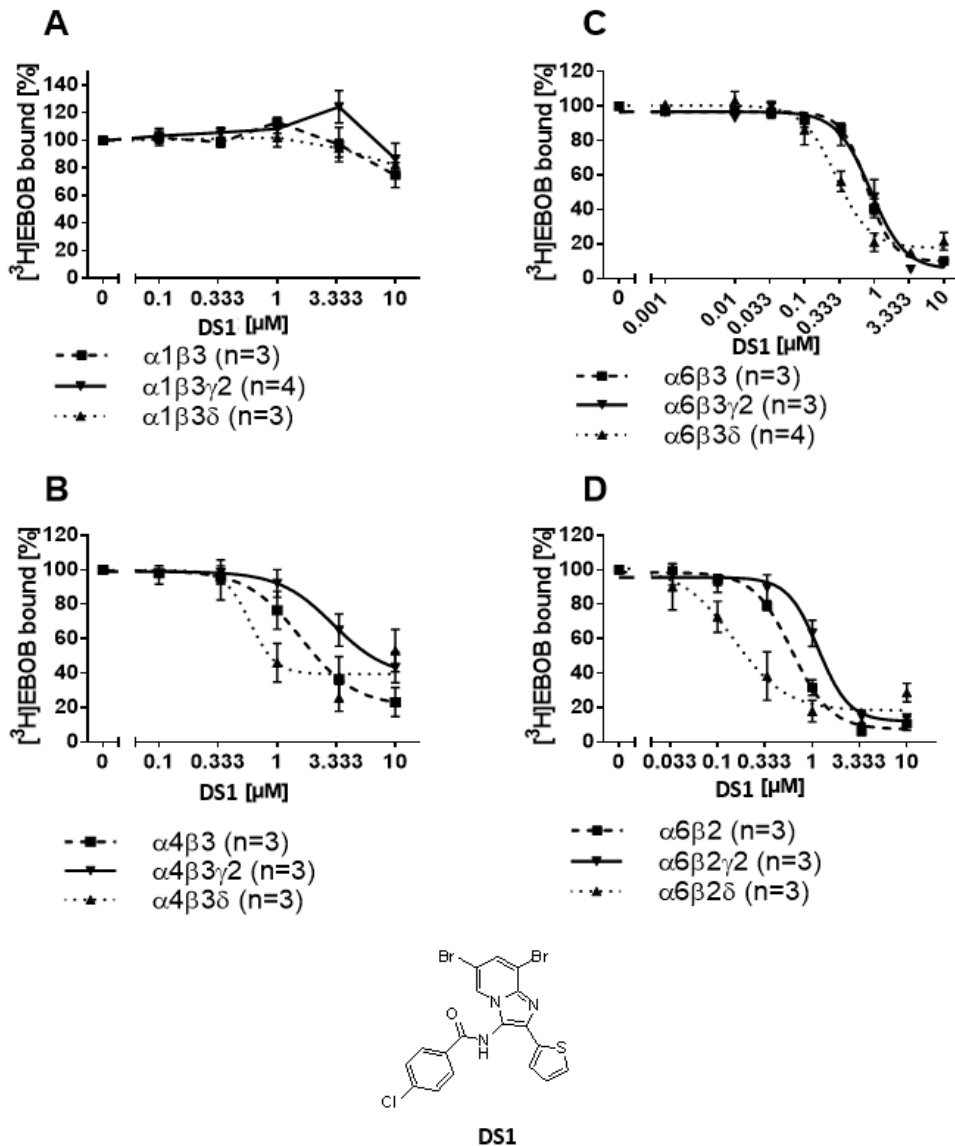


Abb. 68: Dosis-Wirkungs-Kurven von DS1 an verschiedenen Rezeptoren. [^3H]EBOB-Modulation an $\alpha 1\beta 3\pm\gamma 2/\delta$ (A), $\alpha 4\beta 3\pm\gamma 2/\delta$ (B), $\alpha 6\beta 3\pm\gamma 2/\delta$ (C) und $\alpha 6\beta 2\pm\gamma 2/\delta$ (D) Rezeptoren durch die Leitstruktur DS1. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen von DS1 und 3 nM des Liganden [^3H]EBOB inkubiert. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zur Darstellung wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit durch die Mittelwerte \pm SEM von n Messungen angelegt. Die modulierten [^3H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. IC_{50} - und maximale Inhibitionswerte sind Tab. 30 zu entnehmen.

4.3.3 Bindung von DS1 und DS2 an rekombinante $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren

Die Verbindungen DS1 und DS2 wurden initial auf ihre Fähigkeit untersucht, die [^3H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren direkt zu modulieren. DS2 zeigte dabei auch in hohen Konzentrationen keine Modulation der [^3H]EBOB Bindung (Tab. 30). Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen rein GABA-modulatorischen Effekt der Substanz.^{174, 203} DS2 wurde daher in [^3H]EBOB-Bindungsexperimenten nicht weiter untersucht. Die Verbindung DS1 dagegen zeigte in einer Konzentration von 10 μM einen hocheffizienten Effekt auf die [^3H]EBOB-Bindung (max. Modulation: $84 \pm 4\%$). In der Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte sich eine hohe Potenz im zweistelligen nanomolaren Bereich auf die [^3H]EBOB-Modulation an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren (IC_{50} : $0,31 \pm 0,04 \mu\text{M}$) (Tab. 30, Abb. 68).

4.3.4 Bindung der Derivate an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren

Von den Derivaten zeigten nur **28, 29, 31, 34, 35, 38, 39** und **41** direkte Modulationsfähigkeit der [^3H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren (Tab. 30). Zu allen Derivaten, die einen Effekt bei einer Konzentration von 10 μM zeigten, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Teilweise war die Potenz aber so gering, dass kein IC_{50} -Wert ermittelt werden konnte. Die Ergebnisse der maximalen Modulation und IC_{50} -Werte, die die Derivate in der [^3H]EBOB-Bindungsmodulation zeigten, sind in Tab. 30 zusammengefasst.

Tab. 30: [^3H]EBOB Modulation der aktiven Derivate an verschiedenen rekombinanten GABA_{A} R

Verbindung	Rezeptortyp	IC_{50} -Wert [μM]	Max. Inhibition [%]	n
DS2	$\alpha 6\beta 3\delta$	-	20 ± 10 (10 μM)	3
DS1	$\alpha 1\beta 3$	-	25 ± 18 (10 μM)	4
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	-	13 ± 23 (10 μM)	4
	$\alpha 1\beta 3\delta$	-	18 ± 10 (10 μM)	3
	$\alpha 4\beta 3$	1.86 ± 0.43	80 ± 16	3
	$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	3.29 ± 0.42	67 ± 28	3
	$\alpha 4\beta 3\delta$	0.51 ± 0.23	61 ± 16	3
	$\alpha 6\beta 3$	0.79 ± 0.07	90 ± 2	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	0.93 ± 0.23	94 ± 5	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.31 ± 0.04	84 ± 8	4
	$\alpha 6\beta 2$	0.63 ± 0.08	93 ± 6	3
	$\alpha 6\beta 2\gamma 2$	1.13 ± 0.11	89 ± 6	3
	$\alpha 6\beta 2\delta$	0.15 ± 0.03	82 ± 6	3
28	$\alpha 6\beta 3$	16 (12.6, 19.5)	21 (24, 17)	2
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	25 (21.5, 29)	≥ 89	2
	$\alpha 6\beta 3\delta$	10.1 ± 2.8	85 ± 14	3
29	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	-	kein Effekt	2
	$\alpha 1\beta 3\delta$	-	kein Effekt	2
	$\alpha 4\beta 3$	-	kein Effekt	4
	$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	-	kein Effekt	4
	$\alpha 4\beta 3\delta$	-	kein Effekt	7
	$\alpha 6\beta 3$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	-	10 ± 4 (10 μM)	3

Verbindung	Rezeptortyp	IC ₅₀ -Wert [μ M]	Max. Inhibition [%]	n
	$\alpha 6\beta 3\delta$	2.18 \pm 0.40	46 \pm 9	3
	$\alpha 6\beta 2$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 6\beta 2\gamma 2$	-	13 \pm 23 (10 μ M)	3
	$\alpha 6\beta 2\delta$	2.43 \pm 0.78	54 \pm 24	4
31	$\alpha 6\beta 3$	2.50 \pm 0.89	46 \pm 10	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	5.51 \pm 1.65	24 \pm 7	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.86 \pm 0.30	71 \pm 7	3
34	$\alpha 6\beta 3$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	-	15 \pm 16 (10 μ M)	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	-	37 \pm 31 (10 μM)	3
35	$\alpha 6\beta 3$	3.06 \pm 0.25	91 \pm 2	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	3.39 \pm 0.25	103 \pm 4	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	1.20 \pm 0.24	87 \pm 9	3
38	$\alpha 6\beta 3$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	1 (1.1, 0.9)	38 (38, 38)	2
39	$\alpha 1\beta 3$	-	kein Effekt	2
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	-	kein Effekt	2
	$\alpha 1\beta 3\delta$	-	kein Effekt	2
	$\alpha 4\beta 3$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 4\beta 3\delta$	-	kein Effekt	4
	$\alpha 6\beta 3$	-	11 \pm 6 (10 μ M)	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.76 \pm 0.08	53 \pm 12	3
	$\alpha 6\beta 2$	0.74 \pm 0.16	33 \pm 4	3
	$\alpha 6\beta 2\gamma 2$	-	kein Effekt	3
	$\alpha 6\beta 2\delta$	0.27 \pm 0.02	55 \pm 7	3
41	$\alpha 6\beta 3$	-	kein Effekt	2
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	-	kein Effekt	2
	$\alpha 6\beta 3\delta$	-	54 \pm 11 (10 μM)	3

Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen der Derivate und 3 nM des Liganden [³H]EBOB inkubiert. Höchste Testkonzentration war dabei 10 μ M aufgrund der limitierten Löslichkeit der Substanzen, Derivate **28** und **29** wurden bis 20 μ M getestet. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. IC₅₀-Werte stammen aus logarithmischen, vier-parametrischen Fits und stellen die Mittelwerte \pm SEM von n Messungen dar. Maximale Inhibitionswerte stammen aus logarithmischen, vier-parametrischen Fits und stellen die Mittelwerte \pm SD von n Messungen dar. Bei einem n=2 wurden auf die Darstellung von SEM und SD verzichtet. Die maximale Inhibition von Derivat **28** an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ ist mit einem \geq Zeichen versehen, da bei einem Experiment ein „Bottom constraint“ von 0% erzwungen wurde. Wenn in mindestens zwei Experimenten keine [³H]EBOB-Modulation bis zu einer Konzentration von 10 μ M (20 μ M bei **29**) beobachtet wurde, wurde „kein Effekt“ in die Spalte eingetragen. Derivate, die keinen Effekt auf die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren zeigten, sind in der Tabelle nicht dargestellt.

4.3.5 Structure-Activity-Relationship

Als Grundstruktur besitzen alle Verbindungen ein Imidazopyridin-Gerüst. Die Leitstrukturen DS1 und DS2 wurden in den erwähnten drei Bereichen (chlorierte Benzamid-Gruppe und Thiophen-Gruppe am Imidazol-Teil, Brom-Substituenten am Pyridin-Teil) moduliert, sodass mehr über die strukturellen Voraussetzungen für die Bindung an GABA_AR herausgefunden werden konnte. Ein Großteil der Derivate konnte bereits bei initialer Testung an rekombinanten $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren aufgrund

mangelnder Aktivität in Abwesenheit von GABA verworfen werden. Dazu zählten neben der Leitstruktur DS2 auch die Derivate **17-21**, **23-27**, **30**, **32-33**, **40**, **42-44**.

Verbindungen, die keine Thiophen-Gruppe (**44**) aufwiesen oder diese durch eine Phenyl- (**17**, **19**), eine *p*-Methoxyphenyl- (**24**), eine Brompropoxyphenyl- (**25**), eine Methylthiophen-Gruppe (**43**) oder einen Furan-Ring (**42**) ersetzt wurde, zeigten keine [³H]EBOB-Bindungsmodulation an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_AR.

Verbindungen, die weniger als zwei Brom-Atome (DS2, **18**, **29**, **33**) am Pyridin-Ring aufwiesen, zeigten keine oder nur eine geringe Aktivität, während ihre doppelt bromierten Äquivalente (DS1, **31**) potente Modulatoren der [³H]EBOB-Bindung waren mit IC₅₀-Werten von jeweils 0,31 μ M und 0,86 μ M (Tab. 30). Die Anzahl der Brom-Atome an dieser Stelle scheint daher äußerst wichtig für die Potenz der Derivate zu sein. Wurde das Brom-Atom durch ein Chlor-Atom ersetzt (**27**, **32**), führte dies zum Verlust der Fähigkeit die [³H]EBOB-Bindung zu modulieren. Dies unterstreicht ebenfalls die wichtige Rolle dieses Molekülbereichs.

Der dritte Bereich der DS1/2 Leitstruktur, der eingehender untersucht wurde, war die Benzamid-Gruppe und besonders der Substituent in *para*-Position der Benzamid-Gruppe. Derivat **26**, welches anstatt der Benzamid-Gruppe eine Acetamid-Gruppe besitzt, zeigte keine Aktivität in der [³H]EBOB-Bindungsmodulation mehr. Damit scheint auch die Benzamid-Gruppe eine bedeutende Rolle in der [³H]EBOB-Modulation an GABA_AR zu spielen. Interessanterweise konnte Derivat **28**, welches an dieser Stelle eine Cyclohexylcarboxamid-Gruppe aufweist, die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren modulieren, allerdings nur mit vernachlässigbarer Potenz (IC₅₀ = 10,1 \pm 2,8 μ M) (Tab. 30). Bei Verbindungen, die eine Benzamid-Gruppe besitzen und deren Substituent in *para*-Position variiert, schien ein Fluor-Atom (**35**), aber weder eine Methoxy- (**23**) noch eine Fluormethoxy-Gruppe (**34**) toleriert zu werden. Verlängerte man jedoch die Kohlenstoffkette zu einer Propoxy- (**38**) oder einer Butoxy-Gruppe (**29**, **39**), fluoriert in zwei Fällen (**38**, **39**), schien dies vorteilhaft für die Aktivität und/oder δ -Selektivität an GABA_AR zu sein (Tab. 30). Verbindung **41** besitzt eine Benzoxo-Gruppe an der *para*-Position und zeigte den geringsten modulatorischen Effekt auf die [³H]EBOB-Bindung der δ -selektiven Verbindungen. Inhibition trat erst bei einer Konzentration von 10 μ M auf (54 \pm 11%). Ein IC₅₀-Wert war nicht messbar. Bei dieser Substanz fehlen die Brom-Substituenten am Pyridin-Ring, was für die geringe Potenz verantwortlich sein könnte. Die restlichen aktiven Verbindungen (DS1, **31** und **35**) zeigten zwar keine Selektivität für δ -enthaltende Rezeptoren, aber dennoch in den meisten Fällen eine Präferenz (Tab. 30). Im Fall von Derivat **31** war dieser Effekt jedoch nicht signifikant.

Die detaillierte SAR-Analyse zeigte, dass ein Grundgerüst aus einem Imidazopyridin mit mindestens einem Brom-Atom am Pyridin-Teil, und einer Thiophen-Gruppe sowie einer Benzamid-Gruppe am Imidazol-Teil essentiell für die [³H]EBOB-Modulation ist (Abb. 67). Der Chlor-Substituent der Leitstruktur in der *para*-Position des Benzamids konnte dagegen durch bestimmte Gruppen

ausgetauscht werden, war aber trotzdem bedeutend für die [³H]EBOB-Bindungsmodulation und zum Teil auch für die δ -Selektivität.

4.3.6 Bindung der Leitstruktur DS1 an weitere rekombinante GABA_AR

Zunächst wurde DS1 an weiteren $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren getestet (Tab. 30, Abb. 68). Dabei zeigte sich, dass die [³H]EBOB-Bindung auch an $\alpha 6\beta 3$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren moduliert wurde. Die maximale Inhibition betrug bei $\alpha 6\beta 3$ $90 \pm 2\%$ und bei $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ $94 \pm 5\%$. Die maximale [³H]EBOB-Modulation unterschied sich damit nicht von der, die an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren erreicht wurde. Die Potenz von DS1 an $\alpha 6\beta 3$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren war bei IC₅₀-Werten von $0,79 \pm 0,07 \mu\text{M}$ für $\alpha 6\beta 3$ und $0,93 \pm 0,23 \mu\text{M}$ für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ niedriger. Die DS1 zeigte also in der Potenz eine Präferenz für $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren, die Effizienz war jedoch an allen $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren gleich. Die 2,5- bis 3-fache Verschiebung der IC₅₀-Werte ist signifikant ($p < 0,005$ für $\alpha 6\beta 3$ und $p < 0,05$ für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$).

Um einen Einfluss der $\beta 3$ Untereinheit auf die [³H]EBOB-Modulation von DS1 auszuschließen, wurden auch Rezeptoren, die die $\alpha 6$ Untereinheit in Kombination mit der $\beta 2$ Untereinheit enthielten, getestet (Tab. 30, Abb. 68). Die Ergebnisse ähneln denen mit $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren. Die maximale Inhibition der [³H]EBOB-Bindung betrug bei $\alpha 6\beta 2\delta$ $82 \pm 6\%$, bei $\alpha 6\beta 2$ waren es $93 \pm 6\%$ und bei $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ $89 \pm 6\%$. Die maximale Modulation an den verschiedenen Rezeptoren unterschied sich damit nicht signifikant. Die IC₅₀-Werte der [³H]EBOB-Modulation lagen bei $\alpha 6\beta 2\delta$ bei $0,15 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Die von $\alpha 6\beta 2$ und $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ waren um das 4-fache ($0,63 \pm 0,08 \mu\text{M}$, $p < 0,005$) und 7-fache ($1,13 \pm 0,11 \mu\text{M}$, $p < 0,005$) zu niedrigerer Potenz verschoben.

An $\alpha 4$ -enthaltenden Rezeptoren zeigte sich wieder ein ähnliches Bild (Tab. 30, Abb. 68). DS1 modulierte die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren mit einer maximalen Inhibition von $61 \pm 16\%$ und einem IC₅₀-Wert von $0,51 \pm 0,23 \mu\text{M}$. Die maximalen Inhibitionswerte von $\alpha 4\beta 3$ und $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ lagen mit $80 \pm 16\%$ und $67 \pm 28\%$ im selben Bereich und unterschieden sich nicht signifikant. Die IC₅₀-Werte von $\alpha 4\beta 3$ ($1,86 \pm 0,43 \mu\text{M}$) und $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ ($3,29 \pm 0,42 \mu\text{M}$) waren um das 4-fache ($p = 0,051$) bzw. 7-fache ($p < 0,005$) verschoben. Auch an $\alpha 4$ -enthaltenden GABA_AR ist damit keine δ -Selektivität gegeben, sondern nur eine Präferenz bezüglich der Potenz.

Die sehr geringe Modulation der [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren konnte nur in der höchsten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ gemessen werden (Tab. 30). Entsprechend kann man vermuten, dass keine Bindung an $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren erfolgt.

Insgesamt zeigte DS1 an allen $\alpha 6$ - und $\beta 2/3$ -enthaltenden, sowie an $\alpha 4$ - und $\beta 3$ -enthaltenden GABA_AR eine Modulation der [³H]EBOB-Bindung. Die Modulation zeigte in allen Fällen eine hohe Effizienz ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptortypen. Die Potenz der [³H]EBOB-Modulation war in allen Fällen für die entsprechenden δ -enthaltenden Rezeptoren signifikant erhöht. Insgesamt wurden die IC₅₀-Werte aber nur um das 2,5- bis 7-fache verschoben. Für

detaillierte Untersuchungen der δ -enthaltenden Rezeptoren oder die Durchführung einer Affinitätschromatographie reicht diese Präferenz vermutlich nicht aus.

4.3.7 Bindung der aktiven Derivate an weitere rekombinante GABA_AR

Die Derivate **28**, **31** und **35** zeigten neben ihrer Aktivität an $\alpha\beta\beta\delta$ Rezeptoren zusätzlich [³H]EBOB-Modulation an anderen $\alpha\delta$ - und $\beta\delta$ -enthaltenden Rezeptoren (Tab. 30). Bei Derivat **28** war die Effizienz für $\alpha\beta\beta\delta$ ($85 \pm 14\%$), aber auch für $\alpha\beta\beta\gamma\delta$ Rezeptoren ($\geq 89\%$) sehr hoch, während die Modulation an $\alpha\beta\beta$ mit 21% eher moderat war. Die Potenz war bei allen drei Rezeptortypen sehr gering. Die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha\beta\beta\delta$ wurde mit einem IC₅₀-Wert von $10,1 \pm 2,8 \mu\text{M}$ moduliert, bei $\alpha\beta\beta$ lag der IC₅₀-Wert bei $16 \mu\text{M}$ und bei $\alpha\beta\beta\gamma\delta$ bei $25 \mu\text{M}$. Eine Präferenz für δ -enthaltende Rezeptoren bezüglich der Potenz kann nur vermutet werden, da bei den Dosis-Wirkungs-Kurven an $\alpha\beta\beta$ und $\alpha\beta\beta\gamma\delta$ Rezeptoren nur zwei Messungen auswertbar waren und ein Standardfehler somit nicht ermittelbar war.

Derivat **34** zeigte nur in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ eine [³H]EBOB-Modulation an $\alpha\beta\beta\gamma\delta$ und $\alpha\beta\beta\delta$ Rezeptoren. Dabei konnten keine IC₅₀-Werte bestimmt werden und die maximale Inhibition lag bei $15 \pm 16\%$ ($\alpha\beta\beta\gamma\delta$) und $37 \pm 31\%$ ($\alpha\beta\beta\delta$). Die Standardabweichung war so hoch, dass die Modulation nicht signifikant war.

Derivat **35** als fluoriertes Pendant zur Leitstruktur DS1 zeigte ebenfalls [³H]EBOB-Bindungsmodulation an allen $\alpha\delta$ - und $\beta\delta$ -enthaltenden Rezeptoren (Tab. 30). Die maximale Inhibition der [³H]EBOB-Bindung lag an $\alpha\beta\beta\delta$ Rezeptoren bei $87 \pm 9\%$. Die beiden anderen Rezeptortypen wurden ebenso effizient moduliert. Dort lag die maximale Inhibition bei $91 \pm 2\%$ ($\alpha\beta\beta$) und $103 \pm 4\%$ ($\alpha\beta\beta\gamma\delta$). Betrachtet man die Potenz von Derivat **35** war diese bei der [³H]EBOB-Modulation von $\alpha\beta\beta\delta$ signifikant höher als bei den anderen Subtypen. Die IC₅₀-Werte lagen für $\alpha\beta\beta\delta$ bei $1,20 \pm 0,24 \mu\text{M}$ und waren bei $\alpha\beta\beta$ um das 2,5-fache ($3,06 \pm 0,25 \mu\text{M}$, $p < 0,001$) und bei $\alpha\beta\beta\gamma\delta$ um das fast 3-fache ($3,39 \pm 0,25 \mu\text{M}$, $p < 0,005$) erhöht.

Derivat **31** ist das doppelt bromierte Äquivalent zum δ -selektiven Derivat **29**. Es zeigte [³H]EBOB-Modulation an allen $\alpha\delta$ - und $\beta\delta$ -enthaltenden Rezeptoren (Tab. 30). Die Effizienz der [³H]EBOB-Modulation an $\alpha\beta\beta\delta$ Rezeptoren war mit $71 \pm 7\%$ signifikant höher als bei den beiden anderen Subtypen. Diese zeigten eine maximale Inhibition von $46 \pm 10\%$ ($\alpha\beta\beta$, $p < 0,05$) und $24 \pm 7\%$ ($\alpha\beta\beta\gamma\delta$, $p < 0,005$). Hier zeigte sich im Vergleich zur Leitstruktur, dass eine Änderung der Gruppe in *para*-Position des Benzamids einen Einfluss auf die Effizienz an $\alpha\delta$ - und $\beta\delta$ -enthaltenden GABA_AR haben könnte. Die Potenz der [³H]EBOB-Modulation an $\alpha\beta\beta\delta$ schien mit einem IC₅₀ von $0,86 \pm 0,30 \mu\text{M}$ höher zu sein als bei $\alpha\beta\beta$ ($2,50 \pm 0,89 \mu\text{M}$, $p = 0,16$) und $\alpha\beta\beta\gamma\delta$ ($5,51 \pm 1,65 \mu\text{M}$, $p = 0,05$). Die Effekte waren jedoch in beiden Fällen nicht signifikant, wobei die Differenz der IC₅₀-Werte zwischen $\alpha\beta\beta\gamma\delta$ und $\alpha\beta\beta\delta$ Rezeptoren mit $p = 0,05$ einem signifikanten Ergebnis sehr nahe kam.

Im Gegensatz zu den Derivaten **28**, **31** und **35** zeigten die Derivate **29**, **38**, **39** und **41** Selektivität für δ -enthaltende GABA_AR in der Abwesenheit von GABA. Die Derivate **38** und **41** wurden nur an $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren getestet und aufgrund ihrer geringen Effizienz nicht weiter untersucht.

Das Derivat **29** ist am Pyridin-Ring einfach bromiert und besitzt in der *para*-Position des Benzamids eine Butoxy-Gruppe. Die IC₅₀-Werte der [³H]EBOB-Modulation lagen bei $2,43 \pm 0,78 \mu\text{M}$ für $\alpha 6\beta 2\delta$ und $2,18 \pm 0,40$ für $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren. Die maximale Inhibition an den beiden Rezeptoren lag bei $54 \pm 24\%$ bzw. $46 \pm 9\%$. Die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ Rezeptoren schien in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ moduliert zu werden, aber dieser Effekt war nicht signifikant (Tab. 30, Abb. 69). Derivat **29** konnte die [³H]EBOB-Bindung weder an $\alpha 1$ - noch bei $\alpha 4$ -enthaltenden GABA_AR modulieren. Für Derivat **29** wurde auch keine [³H]EBOB-Bindungsmodulation an $\alpha 2/3\beta 3\delta$ Rezeptoren festgestellt (Daten nicht abgebildet). Die beiden Kombinationen kommen zwar vermutlich nicht natürlich im ZNS vor, könnten aber als Hinweise für eine $\alpha 6$ -selektive Bindestelle des Derivates dienen.

Derivat **39** ähnelt Derivat **29**, mit den Ausnahmen, dass es am Pyridin-Ring doppelt bromiert ist und die Butoxy-Gruppe in der *para*-Position des Benzamids fluoriert ist. Derivat **39** zeigte ebenfalls δ -Selektivität für $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltende Rezeptoren (Tab. 30, Abb. 69). Dabei wurde in der [³H]EBOB-Bindung eine maximale Inhibition von $53 \pm 12\%$ und ein IC₅₀-Wert von $0,76 \pm 0,08 \mu\text{M}$ erreicht. Die Potenz wurde durch die doppelte Bromierung und/oder die Fluorierung um mehr als das doppelte ($p < 0,05$) gesteigert. Die Effizienz blieb aber mit der von **29** vergleichbar. An $\alpha 6$ - und $\beta 2$ -enthaltenden Rezeptoren verlor Derivat **39** seine δ -Selektivität (Tab. 30, Abb. 69). Die IC₅₀-Werte der [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 6\beta 2\delta$ Rezeptoren betrug $0,27 \pm 0,02 \mu\text{M}$ und an $\alpha 6\beta 2$ $0,74 \pm 0,16 \mu\text{M}$. Die maximale Inhibition der [³H]EBOB-Bindung war mit $33 \pm 4\%$ an $\alpha 6\beta 2$ geringer als an $\alpha 6\beta 2\delta$ Rezeptoren ($55 \pm 7\%$). Auch an $\alpha 6\beta 3$ zeigte das Derivat eine sehr geringe und nicht signifikante Modulation von $11 \pm 6\%$ bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$. Die [³H]EBOB-Bindung anderer $\alpha 1/4/6\beta 2/3\gamma 2$ Rezeptoren wurden nicht moduliert.

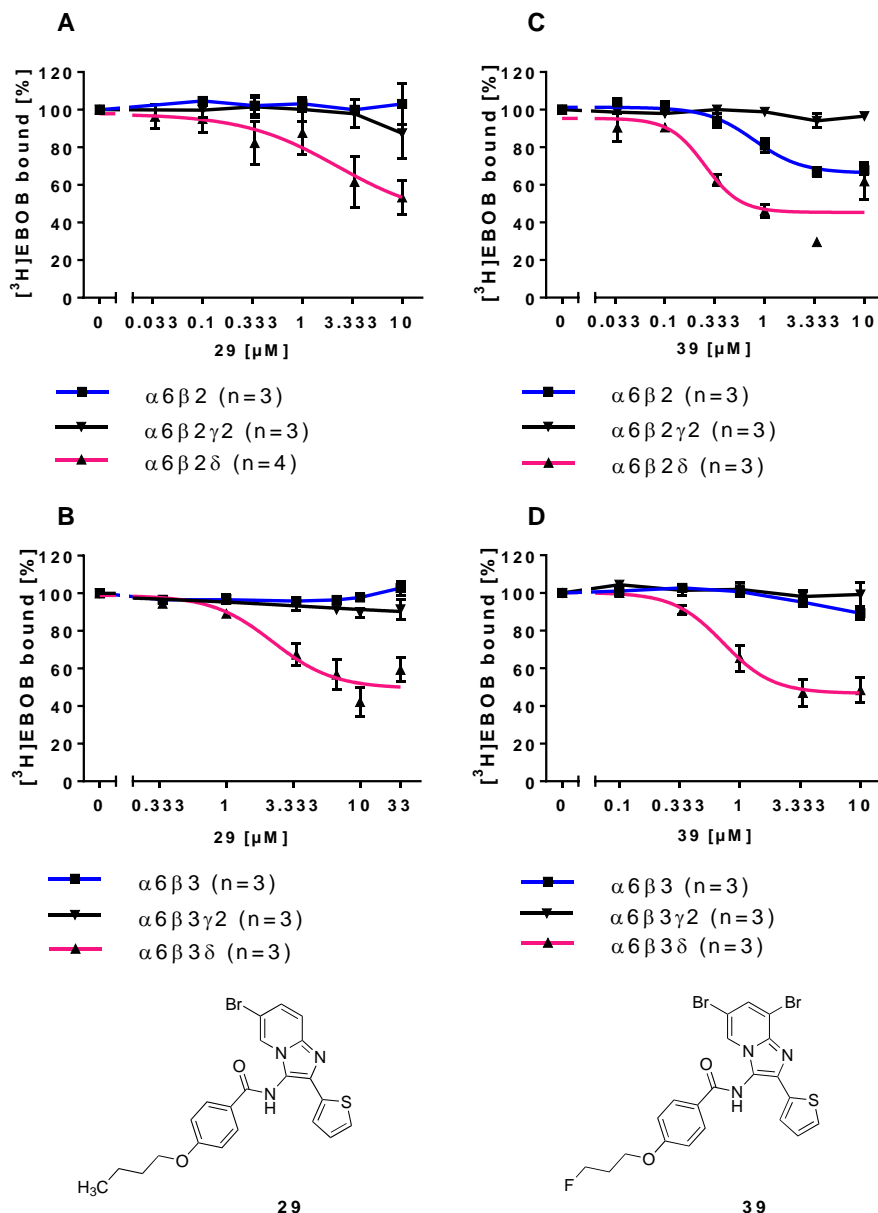


Abb. 69: Dosis-Wirkungs-Kurven der Derivate 29 und 39 an verschiedenen Rezeptoren. A, B: [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 6\beta 2 \pm \gamma 2 / \delta$ (A), $\alpha 6\beta 3 \pm \gamma 2 / \delta$ (B) Rezeptoren durch das Derivat 29. C, D: [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 6\beta 2 \pm \gamma 2 / \delta$ (C), $\alpha 6\beta 3 \pm \gamma 2 / \delta$ (D) Rezeptoren durch das Derivat 39. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen der Substanzen 29 bzw. 39 und 3 nM des Liganden [³H]EBOB inkubiert. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zur Darstellung wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit durch die Mittelwerte \pm SEM von n Messungen angelegt. Die modulierten [³H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. IC₅₀ und maximale Inhibitionswerte sind Tab. 30 zu entnehmen.

4.3.8 Effekt der Brom-Substituenten auf Potenz und Effizienz

Der Einfluss des Bromierungsstatus am Pyridin-Ring auf die [³H]EBOB-Modulation von GABA_AR kann anhand der Verbindungen DS1, DS2 und 18 verdeutlicht werden. Während das nicht bromierte DS2 und das einfach bromierte Derivat 18 keine Aktivität in [³H]EBOB-Bindungsversuchen in Abwesenheit von GABA zeigten, war DS1 ein potenter und effizienter Modulator. Da die drei

Verbindungen sich nur in der Anzahl der Brom-Atome unterscheiden, wird deutlich, dass dies einen erheblichen Einfluss auf die Effizienz und/oder Potenz haben muss. Ein weiteres Beispiel liefern die Derivate **29**, **31** und **33**. Derivat **31** ist das doppelt bromierte Pendant zu **29**. Verglichen mit diesem zeigte **31** eine erhöhte Potenz und Effizienz an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren (Tab. 30). Im Gegensatz zu Derivat **29** wurde allerdings auch die [^3H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3$ und $\alpha 6\beta 3\gamma$ Rezeptoren moduliert. Derivat **33** ist das nicht bromierte Gegenstück zu Derivat **29**. Dieses zeigte keine [^3H]EBOB-Modulation an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren. Obwohl der Unterschied in der Effizienz zwischen **29** und **31** an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren signifikant ($p < 0,05$) ist ($46 \pm 9 \%$ bei **29** und $71 \pm 7 \%$ bei **31**), scheint es vor allem einen großen Sprung in der Potenz zu geben ($2,18 \pm 0,40 \mu\text{M}$ bei **29** und $0,86 \pm 0,30 \mu\text{M}$ bei **31**). Der Bromierungsstatus scheint somit einen Einfluss auf die Effizienz und vor allem die Potenz der [^3H]EBOB-Modulation an $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ zu haben.

4.3.9 Effekt von GABA auf die δ -Selektivität der Derivate DS1, 29 und 39

Da der Fokus der Studie auf der Entwicklung eines direkten Liganden lag, wurden die bisher beschriebenen Bindungsexperimente mit [^3H]EBOB in Abwesenheit von GABA durchgeführt. Gründlich gewaschenes Hirnmaterial zum Auftragen auf die Affinitätschromatographie-Säule, würde ebenfalls keine großen Mengen an GABA enthalten. Dennoch wurden für einige Verbindungen (DS1, **29**, **39**) [^3H]EBOB-Modulationen in Anwesenheit von GABA durchgeführt. Interessanterweise ist der potente Effekt von DS1 auf beinahe alle $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren unabhängig von GABA in der getesteten Konzentration (Tab. 31). Ähnliche Ergebnisse wurden für DS1 an $\alpha 4\beta 3\delta$ Rezeptoren in elektrophysiologischen Experimenten beschrieben.²⁰³

Tab. 31: [^3H]EBOB-Modulation der Verbindungen DS1, 29 und 39 in Anwesenheit von GABA

Verbindung	Rezeptortyp	IC ₅₀ -Wert [μM]	p-Wert	Max. Inhibition [%]	p-Wert	n
DS1	$\alpha 6\beta 3$	0.96 ± 0.36	0.660	96 ± 3	0.039	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	1.09 ± 0.42	0.765	93 ± 3	0.760	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.37 ± 0.17	0.688	88 ± 4	0.516	3
29	$\alpha 6\beta 3$	4.07 ± 0.36	n.a.	26 ± 6	0.002	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	4.34 ± 1.18	n.a.	40 ± 5	0.006	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.87 ± 0.29	0.058	51 ± 1	0.484	3
39	$\alpha 6\beta 3$	1.29 ± 0.02	n.a.	57 ± 11	0.003	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	1.28 ± 0.10	n.a.	44 ± 7	0.001	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.49 ± 0.11	0.112	55 ± 8	0.795	3

Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen der Verbindungen DS1, **29** und **39**, $0,1 \mu\text{M}$ GABA ($\alpha 6\beta 3\gamma 2/\delta$) bzw. $0,5 \mu\text{M}$ GABA ($\alpha 6\beta 3$) und 3 nM des Liganden [^3H]EBOB inkubiert. Höchste Testkonzentration war dabei $10 \mu\text{M}$ aufgrund der limitierten Löslichkeit der Substanzen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. IC₅₀ Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM von n logarithmischen, vier-parametrischen Fits dar. Maximale Inhibitionswerte stellen die Mittelwerte \pm SD von n logarithmischen, vier-parametrischen Fits dar. IC₅₀-Werte und maximale Inhibition wurden mit Werten in der Abwesenheit von GABA verglichen. Für den statistischen Vergleich wurde der Student's t-Test verwendet. Die Strukturen der Verbindungen sind Tab. 33 zu entnehmen. Die IC₅₀-Werte und maximale Inhibition in Abwesenheit von GABA an den entsprechenden Rezeptoren sind Tab. 30 zu entnehmen. N.a. ist die Abkürzung für „not applicable“.

Verglichen mit weiteren $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptortypen modulierten die Derivate **29** und **39** in Abwesenheit von GABA selektiv die δ -enthaltenden GABA_AR, im Falle von Derivat **29** galt das auch für $\alpha 6$ - und $\beta 2$ -enthaltende Rezeptoren. In Experimenten, die in Anwesenheit von GABA durchgeführt wurden, verloren beide ihre Selektivität (Tab. 31). Während der modulatorische Effekt der Derivate auf $\alpha 6\beta 3$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ in Anwesenheit von GABA erhöht war, konnte kein signifikanter Effekt auf $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren festgestellt werden, weder in der Potenz noch in der Effizienz. In Anwesenheit von GABA modulierte Derivat **29** die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren mit einem maximalen Effekt von $26 \pm 6\%$ und an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren mit einem maximalen Effekt von $40 \pm 5\%$. Derivat **39** modulierte die [³H]EBOB-Bindung der $\alpha 6\beta 3$ Rezeptoren mit einem maximalen Effekt von $57 \pm 11\%$ und die der $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren mit einem maximalen Effekt von $44 \pm 7\%$. Der Effekt von GABA auf die Effizienz beider Derivate an $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren war hoch signifikant (Tab. 31). Die IC₅₀-Werte, mit denen die [³H]EBOB-Bindung moduliert wurde, lagen an $\alpha 6\beta 3$ bei $4,07 \pm 0,36 \mu\text{M}$ (**29**) bzw. $1,29 \pm 0,02 \mu\text{M}$ (**39**), an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren bei $4,34 \pm 1,18 \mu\text{M}$ (**29**) bzw. $1,28 \pm 0,10 \mu\text{M}$ (**39**). Obwohl die Modulation in Anwesenheit von GABA an $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren nicht mehr als δ -selektiv bezeichnet werden kann, modulierte Derivat **29** die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren mit einer signifikant höheren Effizienz ($p < 0,005$ für $\alpha 6\beta 3$ und $p < 0,05$ für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$) und Potenz ($p < 0,005$ für $\alpha 6\beta 3$ und $p < 0,05$ für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$). Derivat **39** hingegen hatte nur in der Potenz einen signifikant höheren Effekt auf die [³H]EBOB-Modulation von $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren ($p < 0,005$ für $\alpha 6\beta 3$ und $p < 0,01$ für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$), während die Effizienz bei allen $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren sehr ähnlich war.

4.3.10 Selektivität der Substanzen für α Untereinheiten

Die δ Untereinheit kommt in nativer Form im Gehirn, soweit bekannt, nur in Kombination mit $\alpha 1$, $\alpha 4$ und $\alpha 6$ Untereinheiten vor. Der Fokus der Untersuchungen lag daher auf der [³H]EBOB-Bindungsmodulation dieser Rezeptoren. DS1 zeigte an allen $\alpha 4/6$ -enthaltenden Rezeptoren eine Modulation der [³H]EBOB-Bindung, während keiner der $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren moduliert wurde (Tab. 30). Dies deutet auf eine Beteiligung der α Untereinheit an der Bindestelle für DS1 hin, deren Anwesenheit in Anbetracht der Modulation sämtlicher $\alpha 4/6$ -enthaltender Rezeptoren sogar wichtiger scheint als die der δ Untereinheit. Verwunderlich ist auch nicht, dass sowohl $\alpha 4$ -, als auch $\alpha 6$ -enthaltende Rezeptoren moduliert werden, denn beide Untereinheiten haben in ihrer Sequenz eine hohe Homologie. Die Derivate **29** und **39** modulierten hingegen nur $\alpha 6$ -enthaltende GABA_AR (Tab. 30), scheinen also durch die Veränderungen in ihrer Molekülstruktur sogar selektiv für die $\alpha 6$ Untereinheit geworden zu sein.

4.3.11 Modulation der [³H]EBOB-Bindung im Cerebellum von wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Mäusen

Um die Ergebnisse der [³H]EBOB-Bindungsmodulation von rekombinanten GABA_AR zu bestätigen, wurden Bindungsstudien an kruden Membranen des Cerebellums wildtypischer und $\delta^{-/-}$ Mäuse

durchgeführt. Um die Abwesenheit von GABA zu gewährleisten, wurden die Hirnproben intensiv gewaschen und mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen. Da alle Derivate an $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren getestet wurden und teilweise der Verdacht auf $\alpha 6$ -Selektivität bestand, wurde zum Vergleich zwischen nativen und rekombinanten Rezeptoren GABA_AR das Cerebellum gewählt. Das Cerebellum ist der einzige Bereich im ZNS in dem die $\alpha 6$ Untereinheit vorkommt und damit auch der einzige Bereich in dem die $\alpha 6$ in Kombination mit der δ Untereinheit auftreten kann.^{18, 204} An Proben des Cerebellums von wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Mäusen wurden die Derivate **29** und **39** getestet, um ihre Selektivität in Abwesenheit von GABA auch an nativen Rezeptoren zu bestätigen und DS1 wurde getestet, um die fehlende δ -Selektivität an $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren auf nativer Ebene zu beweisen.

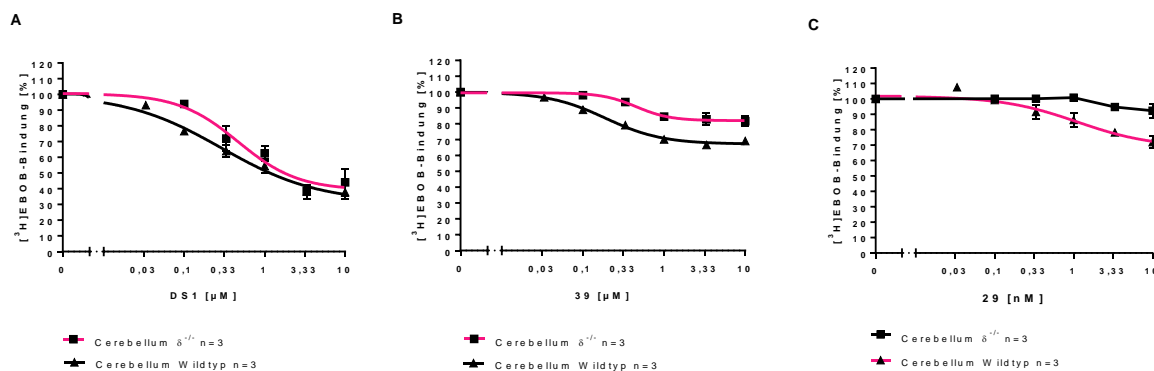


Abb. 70: Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindungen DS1, 29 und 39 an wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Cerebella. [³H]EBOB-Modulation an wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Cerebella durch die Verbindungen DS1 (A), **39** (B) und **29** (C). Krude Membranen der Cerebella wurden mit steigenden Konzentrationen der Verbindungen und 3 nM des Liganden [³H]EBOB inkubiert. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zur Darstellung wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit durch die Mittelwerte \pm SEM von 3 Messungen angelegt. Die modulierten [³H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. IC₅₀- und maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel (4.3.11 Modulation der [³H]EBOB-Bindung im Cerebellum von wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Mäusen) beschrieben.

DS1 zeigte nur eine geringfügige Differenz in der Modulation der [³H]EBOB-Bindung zwischen wildtypischen und $\delta^{-/-}$ Cerebella (Abb. 70). DS1 zeigte eine maximale Inhibition der [³H]EBOB-Bindung von $73 \pm 9\%$ und einen IC₅₀-Wert von $0,43 \pm 0,17 \mu\text{M}$ an wildtypischen Membranen und an $\delta^{-/-}$ Membranen eine maximale Inhibition von $64 \pm 8\%$ und einen IC₅₀-Wert von $0,71 \pm 0,29 \mu\text{M}$. In der Effizienz der [³H]EBOB-Modulation besteht offensichtlich kein Unterschied. Der leicht verschobene IC₅₀-Wert bei $\delta^{-/-}$ Cerebella war nicht signifikant ($p = 0,4599$). Auch an nativen Rezeptoren konnte damit keine δ -Selektivität nachgewiesen werden. Der IC₅₀-Wert der [³H]EBOB-Modulation an wildtypischen Membranen passte zu den Werten, die an rekombinanten $\alpha 6\beta 2/3$, $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren gemessen wurden (Tab. 30), wenn man von einem Effekt von DS1 an diesen Rezeptortypen ausgeht. Bei den $\delta^{-/-}$ Membranen fielen die $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren weg und der

IC₅₀-Wert wurde leicht nach oben verschoben. Auch dies passt gut zu den Ergebnissen an rekombinanten Rezeptoren, denn dort zeigte sich eine niedrigere Potenz der Substanz für nicht δ -enthaltende Rezeptoren.

Das Derivat **29** zeigte an rekombinanten Rezeptoren eine Selektivität für $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren und vermochte die [³H]EBOB-Bindung anderer $\alpha 6$ - und $\beta 2/3$ -enthaltender GABA_AR nicht zu modulieren. Die [³H]EBOB-Bindung an Rezeptoren des wildtypischen Cerebellums modulierte das Derivat mit einer maximalen Inhibition von $27 \pm 2\%$ und einem IC₅₀-Wert von $0,96 \pm 0,42 \mu\text{M}$. An $\delta^{-/-}$ Membranen konnte mit einer maximalen Modulation von $9 \pm 4\%$ kein Effekt gemessen werden (Abb. 70). Die Modulation der [³H]EBOB-Bindung an Rezeptoren des wildtypischen Cerebellums war signifikant im Vergleich zum vernachlässigbaren Effekt an Membranen des $\delta^{-/-}$ Cerebellums ($p < 0,05$). Der IC₅₀-Wert war mit $0,96 \pm 0,42 \mu\text{M}$ geringer als die gemessenen IC₅₀-Werte der [³H]EBOB-Modulation von rekombinanten $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren. Der Unterschied in der Potenz der Modulation zwischen wildtypischem Cerebellum und rekombinanten $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren war allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). Die geringere Effizienz von **29** auf die [³H]EBOB-Bindung an Rezeptoren des wildtypischen Cerebellums ($27 \pm 2\%$) im Vergleich zu rekombinanten Rezeptoren ($46 \pm 9\%$ bei $\alpha 6\beta 3\delta$ und $54 \pm 24\%$ bei $\alpha 6\beta 2\delta$) könnte mit dem geringen Gehalt an δ -enthaltenden GABA_AR im Cerebellum von ca. 30% erklärt werden.^{10, 205}

Derivat **39** zeigte eine signifikant höhere Modulation der [³H]EBOB-Bindung an Rezeptoren des wildtypischen Cerebellums im Vergleich zu denen des $\delta^{-/-}$ Cerebellums, sowohl in der Potenz ($p < 0,05$) als auch in der Effizienz ($p < 0,05$). Die [³H]EBOB-Bindung an wildtypischen Membranen des Cerebellums wurde mit einer maximalen Inhibition von $33 \pm 2\%$ und einem IC₅₀-Wert von $0,21 \pm 0,02 \mu\text{M}$ moduliert. Dennoch wurde auch die [³H]EBOB-Bindung an Membranen des $\delta^{-/-}$ Cerebellums moduliert mit einem maximalen Effekt von $18 \pm 4\%$ und einem IC₅₀-Wert von $0,43 \pm 0,04 \mu\text{M}$. Dies zeigte auch an nativen GABA_AR, dass das Derivat **39** in der Lage ist, auch andere Rezeptoren als $\alpha 6\beta 2/3\delta$ zu modulieren. In [³H]EBOB-Bindungsversuchen mit rekombinanten Rezeptoren vermochte Derivat **39** auch $\alpha 6\beta 2$ Rezeptoren zu modulieren mit einer maximalen Inhibition von $33 \pm 4\%$ und einem IC₅₀-Wert von $0,74 \pm 0,16 \mu\text{M}$. Diese dualen Rezeptoren sind zwar für das wildtypische Cerebellum nicht beschrieben, machen aber wahrscheinlich im $\delta^{-/-}$ Cerebellum einen Anteil von 23% der gesamten GABA_AR aus.^{10, 205} Die Effizienz des Derivates auf die [³H]EBOB-Bindung an Membranen des wildtypischen Cerebellums spiegelt auch hier die Verhältnisse aus Experimenten mit rekombinanten Rezeptoren wider, wenn man den Gehalt an δ -enthaltenden GABA_AR im Cerebellum bedenkt. Dort belief sich die maximale Inhibition von $\alpha 6\beta 3\delta$ auf $53 \pm 12\%$ und von $\alpha 6\beta 2\delta$ auf $55 \pm 7\%$, während sie beim wildtypischen Cerebellum bei $33 \pm 2\%$ lag. Die Potenz der [³H]EBOB-Modulation lag ebenfalls in demselben Bereich wie die bei rekombinanten Rezeptoren. Für wildtypische Membranen des Cerebellums lag der IC₅₀-Wert bei $0,21 \pm 0,02 \mu\text{M}$ und bei rekombinanten Rezeptoren bei $0,27 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ($\alpha 6\beta 2\delta$) und $0,76 \pm 0,08 \mu\text{M}$ ($\alpha 6\beta 3\delta$). Die maximale

Modulation der [³H]EBOB-Bindung am $\delta^{-/-}$ Cerebellum lag mit $18 \pm 4\%$ im Rahmen der angenommenen 23% $\alpha 6\beta 2$ Rezeptoren im knockout Cerebellum.^{10, 205}

4.3.12 Untersuchung der Bindestelle

4.3.12.1 Verdrängung der Derivate **29** und **39** durch DS1 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_AR

Auf der Suche nach der Bindestelle der Leitstrukturen und ihrer Derivate kam die Frage nach einer zusätzlichen Bindestelle der unselektiven Liganden auf. Dies würde erklären, wieso manche Derivate δ -Selektivität zeigen und andere Derivate, die eine zusätzliche Bindestelle auf dem GABA_AR besitzen, eben nicht. Eine gänzlich unterschiedliche Bindestelle würde ebenso die Selektivität mancher Derivate erklären, ist aber aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Derivate und dem Verlust der δ -Selektivität in Anwesenheit von GABA eher unwahrscheinlich. Um dies eingehender untersuchen zu können, wurden in [³H]EBOB-Bindungsexperimenten an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren zu einer hohen Konzentration eines selektiven Liganden (**29**, **39**) steigende Konzentrationen des nicht-selektiven Liganden DS1 gegeben. Wenn eine zweite Bindestelle bei DS1 existieren würde, dann wäre sie vermutlich für die Modulation der Rezeptoren $\alpha 6\beta 3$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ verantwortlich und die [³H]EBOB-Modulation würde mit einer Potenz im Bereich von deren IC₅₀-Werten ($0,79 \pm 0,07 \mu\text{M}$; $0,93 \pm 0,23 \mu\text{M}$) erfolgen.

Die Ergebnisse aus der [³H]EBOB-Bindungsmodulation an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren mit einer konstant hohen Konzentration von $10 \mu\text{M}$ des Derivates **29** und steigenden Konzentrationen der Substanz DS1 deuteten auf dieselbe Bindestelle der beiden Liganden hin. DS1 besitzt eine 7-fach höhere Potenz ($p < 0,005$) und eine 3,5-fach höhere Effizienz ($p < 0,005$) als das Derivat **29**. Dieses modulierte die [³H]EBOB-Bindung in der Konzentration $10 \mu\text{M}$ um $28 \pm 9\%$ und die Inhibition wurde durch steigende Konzentration des Liganden DS1 weiter erhöht (Abb. 71). Bei einer Kombination aus $10 \mu\text{M}$ **29** und $1 \mu\text{M}$ DS1 war die [³H]EBOB-Modulation bereits auf $46 \pm 11\%$ gestiegen im Vergleich zum Effekt von Derivat **29** alleine, lag aber dennoch signifikant ($p < 0,05$) unter den zu erwartenden Werten von DS1 in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ($79 \pm 5\%$). Bei einer Konzentration von $3,33 \mu\text{M}$ ko-appliziertem DS1 näherte sich die Inhibition der [³H]EBOB-Bindung bereits dem Modulationswert für DS1 in Abwesenheit eines weiteren Liganden an. So betrug die Modulation beider Substanzen $63 \pm 6\%$ und unterschied sich bereits nicht mehr signifikant vom alleinigen Effekt von DS1. Dagegen war die Modulation signifikant ($p < 0,05$) erhöht im Vergleich zum Effekt von Derivat **29** alleine. Anhand dieser Ergebnisse kann man eine kompetitive Inhibition des gebundenen Derivates **29** durch steigende Konzentrationen des potenteren Liganden DS1 vermuten. Würden beide Liganden dagegen an komplett verschiedene Bindestellen binden, würde man einen synergistischen Effekt der Modulation erwarten. Dieser Versuch schließt jedoch nicht aus, dass die Modulation jenseits des Effektes von **29** auch durch eine weitere nicht-gemeinsame Bindestelle von DS1 verursacht werden könnte.

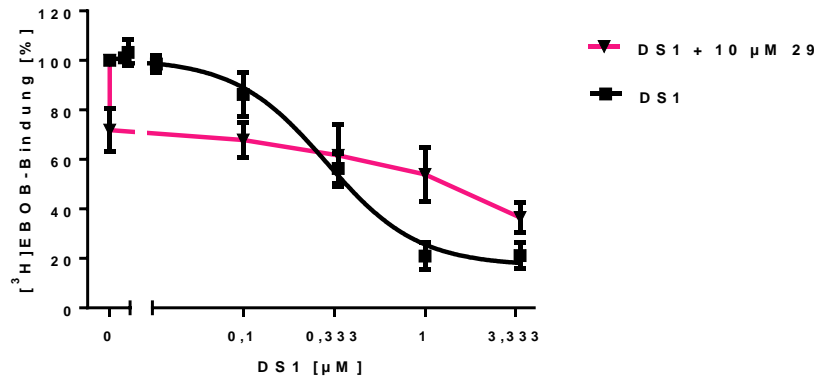


Abb. 71: Dosis-Wirkungs-Kurven von DS1 in An- und Abwesenheit von 10 µM 29 an α6β3δ GABA_AR. [³H]EBOB-Modulation an α6β3δ Rezeptoren durch DS1 alleine (schwarz) und in Kombination mit 10 µM des Derivates 29 (rot). Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen von DS1 und 3 nM des Liganden [³H]EBOB inkubiert. Beim Verdrängungsversuch mit Derivat 29 wurde der Konzentration von DS1 jeweils eine hohe Konzentration von 29 (10 µM) zugesetzt. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zur Darstellung wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit durch die Mittelwerte ± SEM von 3 Messungen angelegt. Die modulierten [³H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. IC₅₀- und maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel (4.3.12.1 Verdrängung der Derivate 29 und 39 durch DS1 an α6β3δ GABA_AR) beschrieben.

Um dies noch eingehender untersuchen zu können, wurde in einem weiteren Kombinationsversuch zu steigenden Konzentrationen von DS1 das Derivat 39 in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Da 39 im Gegensatz zu 29 vor allem potenter ist, könnte es in der eingesetzten Konzentration die gemeinsame Bindestelle auch noch bei höheren Konzentrationen von DS1 blockieren und einen zusätzlichen Effekt von DS1 auf eine potentielle weitere Bindestelle enthüllen. Die [³H]EBOB-Bindung durch 39 in einer Konzentration von 10 µM wurde auf $65 \pm 2\%$ moduliert. Wie zu erwarten zeigten niedrigere Konzentrationen von DS1 keinen Effekt (Daten nicht gezeigt), aber auch in den Konzentrationen 3,33 µM und 10 µM konnte die [³H]EBOB-Bindung nicht über den Punkt der Modulation durch das Derivat 39 hinaus moduliert werden (Abb. 72). Die Kombination aus 10 µM 39 und 3,33 µM DS1 erzielte nur eine Modulation von $37 \pm 3\%$ und die von 10 µM 39 und 10 µM DS1 erzielte eine Modulation von $42 \pm 2\%$. Im Vergleich dazu moduliert DS1 alleine in einer Konzentration von 3,33 µM die [³H]EBOB-Bindung von α6β3δ Rezeptoren um $81 \pm 4\%$ und in einer Konzentration von 10 µM um $75 \pm 2\%$. Dieses Ergebnis zeigt, dass es wahrscheinlich keine weitere Bindestelle auf dem GABA_AR für nicht-selektive Derivate gibt. Des Weiteren stellt es aber auch die reversible Bindung des Derivates 39 in Frage, denn bei einer höheren Potenz von DS1 an den Rezeptoren sollte in der gleichen Konzentration von 10 µM vor allem der Ligand DS1 gebunden sein und durch dessen hohe Effizienz eine stärkere Modulation der [³H]EBOB Bindung beobachtet werden.

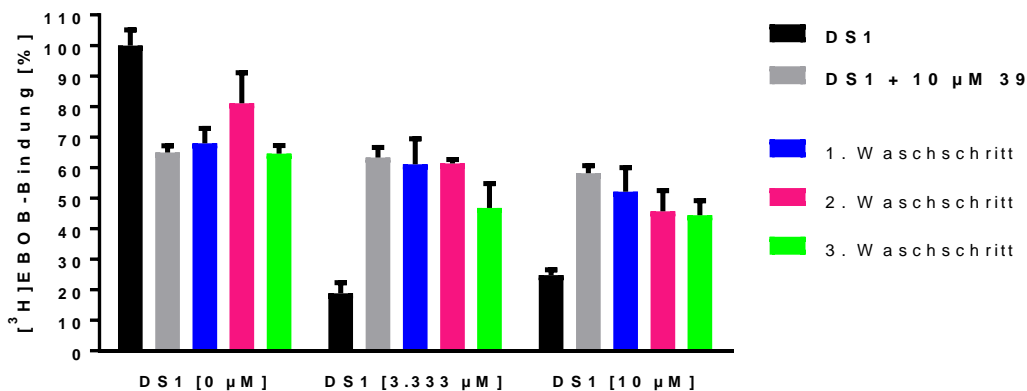


Abb. 72: [³H]EBOB-Modulation von DS1 und Verdrängung von gebundenem Derivat 39 an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden mit zwei Konzentrationen von DS1 (3,333 μ M und 10 μ M) und 3 nM [³H]EBOB inkubiert. Zusätzlich wurde DS1 auch in Anwesenheit von 10 μ M 39 auf seine Fähigkeit zur Verdrängung des Derivates getestet (grau). Bei den Waschschrritten 1-3 handelt es sich um eine einstündige Präinkubation der Membranen mit 10 μ M 39 mit nachfolgend bis zu drei Waschschrritten um reversibel gebundenes 39 zu entfernen. Die [³H]EBOB-Bindung an den präinkubierten Membranen wurde mit DS1 in den zwei genannten Konzentrationen moduliert. Die modulierten [³H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. Bei den Bindungswerten handelt es sich um die Mittelwerte \pm SD von mindestens drei verschiedenen Messungen. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Maximale prozentuale Inhibitionswerte sind in den Kapiteln (4.3.12.1 Verdrängung der Derivate 29 und 39 durch DS1 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABAAR) und (4.3.12.2 Irreversible Bindung von Derivat 39 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABAAR) beschrieben.

4.3.12.2 Irreversible Bindung von Derivat 39 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_AR

Um der Frage nach einer irreversiblen Bindung des Derivates 39 an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren nachzugehen wurden die mit $\alpha 6\beta 3\delta$ transfizierten kruden Membranen mit 10 μ M des Derivates 39 präinkubiert und anschließend drei aufeinanderfolgenden Waschschrritten unterzogen um den Liganden, falls reversibel gebunden, vollständig zu entfernen. Zum einen zeigte sich, dass die komplette [³H]EBOB-Bindung je mg Protein auch nach mehreren Waschschrritten nicht wieder erreicht werden konnte. Dies könnte bereits ein Hinweis auf eine irreversible Bindung durch das Derivat 39 sein. Auch die nachfolgende [³H]EBOB-Bindungsmodulation der gewaschenen Fraktionen durch DS1 erfolgte mit niedriger Effizienz (Abb. 72). Nach dem ersten Waschschrift zeigte sich eine Reduktion der gesamten [³H]EBOB-Bindung, ohne dass weitere Liganden zugesetzt wurden um $32 \pm 5\%$, nach dem zweiten Waschschrift waren es $19 \pm 10\%$ und nach dem dritten Waschschrift waren es $35 \pm 3\%$. Bei Zugabe von 3,33 μ M DS1 nach dem ersten Waschschrift erhielt man eine [³H]EBOB-Modulation von $39 \pm 8\%$ bezogen auf die Gesamtbindung, $39 \pm 1\%$ nach dem zweiten Waschschrift und $53 \pm 8\%$ nach dem dritten Waschschrift. Bei Zugabe von 10 μ M DS1 nach dem ersten Waschschrift erhielt man eine [³H]EBOB-Modulation von $48 \pm 8\%$ bezogen auf die Gesamtbindung, $54 \pm 7\%$ nach dem zweiten

Waschschrift und $56 \pm 5\%$ nach dem dritten Waschschrift. Außer bei dem dritten Waschschrift und einer Inkubation von $10 \mu\text{M}$ DS1 waren nach allen Waschschriften und in allen gemessenen Konzentrationen von DS1 die [^3H]EBOB-Bindungswerte nicht signifikant unterschiedlich zur alleinigen Modulation durch $10 \mu\text{M}$ **39** und signifikant unterschiedlich zu der Modulation, die durch die entsprechende Konzentration DS1 normalerweise verursacht wurde (Abb. 72, Tab. 32) Die Ergebnisse zeigen, dass eine irreversible Bindung des Liganden **39** an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_AR wahrscheinlich ist.

Tab. 32: Statistischer Vergleich der [^3H]EBOB-Modulation durch DS1 und [^3H]EBOB-Modulation durch DS1 nach Präinkubation mit $10 \mu\text{M}$ **39 und nachfolgenden Waschschriften an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren.**

DS1 [μM]	Waschschrift	n	p-Werte	Signifikanz
0 μM (n=5)	1.	4	0,0030	s**
	2.	4	0,1141	ns
	3.	4	0,0008	s***
3.333 μM (n=4)	1.	3	0,0036	s**
	2.	3	0,0002	s***
	3.	2	0,0175	s*
10 μM (n=5)	1.	4	0,0070	s**
	2.	4	0,0126	s*
	3.	3	0,0034	s**
DS1 [μM] + Derivat 39 (10 μM)	Waschschrift	n	p-Werte	Signifikanz
0 μM (n=5)	1.	4	0,5660	ns
	2.	4	0,1213	ns
	3.	4	0,9127	ns
3.333 μM (n=4)	1.	3	0,7893	ns
	2.	3	0,6432	ns
	3.	2	0,0743	ns
10 μM (n=5)	1.	4	0,4493	ns
	2.	4	0,0839	ns
	3.	3	0,0292	s*

Mit $10 \mu\text{M}$ Derivat **39** präinkubierte (1 h) und bis zu dreimal gewaschene crude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen ($\alpha 6\beta 3\delta$) wurden mit zwei Konzentrationen von DS1 ($3,333 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$) und 3 nM [^3H]EBOB inkubiert. Statistischer Vergleich zwischen den [^3H]EBOB-Bindungsmodulationen durch DS1 mit und ohne Präinkubation durch $10 \mu\text{M}$ **39** bei verschiedenen Waschschriften und statistischer Vergleich zwischen den [^3H]EBOB-Bindungsmodulationen durch DS1 in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ **39** mit und ohne Präinkubation durch $10 \mu\text{M}$ **39** bei verschiedenen Waschschriften. Die modulierten [^3H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. Bei den Bindungswerten handelt es sich um die Mittelwerte \pm SD von mindestens drei verschiedenen Messungen. Für den statistischen Vergleich wurde der Student's t-Test verwendet. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Maximale prozentuale Inhibitionswerte sind in Abb. 72 dargestellt und im Kapitel (4.3.12.2 Irreversible Bindung von Derivat 39 an $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_AR) beschrieben.

4.3.12.3 [³H]EBOB-Bindungsstudie mit DS1 und 10 μM 39 an α6β3γ2 GABA_AR

Ein interessantes Ergebnis lieferte das Kombinationsexperiment mit 10 μM des Derivates **39** und 3,33 μM und 10 μM des Liganden DS1 (Abb. 73). Das Derivat **39** vermochte auch in einer Konzentration von 10 μM die [³H]EBOB-Bindung an α6β3γ2 Rezeptoren nicht zu modulieren ($7 \pm 5\%$). DS1 dagegen zeigte eine starke Modulation der [³H]EBOB-Bindung von $79 \pm 3\%$ bei einer Konzentration von 3,33 μM und $88 \pm 1\%$ bei einer Konzentration von 10 μM. Da das Derivat **39** in Abwesenheit von GABA an den α6- und β3-enthaltenden Rezeptoren für α6β3δ selektiv ist, würde man keine Bindung an α6β3γ2 Rezeptoren erwarten. Dennoch zeigte eine Kombination aus 10 μM **39** und 3,33 bzw. 10 μM DS1 deutlich eine Reduktion der [³H]EBOB-Modulation im Vergleich zur Modulation, die nur durch DS1 verursacht wurde. So konnte die [³H]EBOB-Bindung durch 10 μM **39** und 3,33 μM DS1 nur noch um $43 \pm 8\%$ moduliert werden und 10 μM **39** und 10 μM DS1 um $57 \pm 7\%$ moduliert werden. Der Versuch zeigt deutlich, dass das Derivat **39** an α6β3γ2 Rezeptoren bindet. Da in Anwesenheit von GABA das Derivat **39** ebenfalls eine [³H]EBOB-Modulation zeigt, könnte es sich bei der Bindestelle auf den γ2-enthaltenden Rezeptoren für **39** um eine GABA-modulatorische Bindestelle handeln.

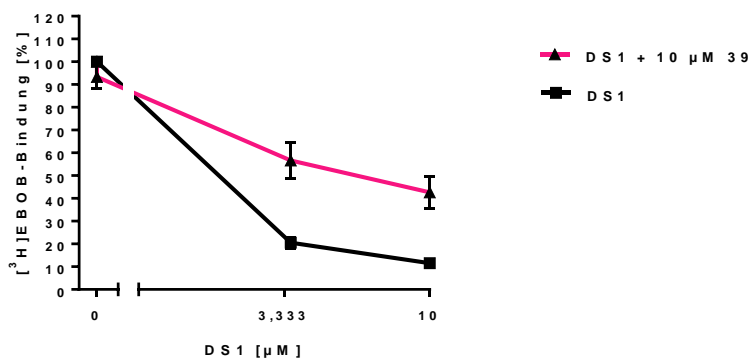


Abb. 73: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 alleine und in Kombination mit Derivat 39 an α6β3γ2 Rezeptoren. [³H]EBOB-Modulation an α6β3γ2 Rezeptoren durch DS1 alleine (schwarz) und in Kombination mit 10 μM des Derivates **39** (rot). Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen von DS1 und 3 nM des Liganden [³H]EBOB inkubiert. Beim Verdrängungsversuch mit Derivat **39** wurde der Konzentration von DS1 jeweils eine hohe Konzentration von **39** (10 μM) zugesetzt. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zur Darstellung wurden die Mittelwerte ± SEM von 3 Messungen verwendet. Die modulierten [³H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. IC₅₀- und maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel (4.3.12.3 [³H]EBOB-Bindungsstudie mit DS1 und 10 μM 39 an α6β3γ2 GABA_AR) beschrieben.

4.3.12.4 Einsatz von Chimären zur Untersuchung der Bindestelle von DS1

Tab. 30 zeigt deutlich, dass DS1 in [³H]EBOB-Bindungsversuchen zwischen α1- und α6-enthaltenden GABA_AR unterscheidet. Während die [³H]EBOB-Bindung an α6-enthaltenden Rezeptoren hoch potent und effizient moduliert wurde, zeigte die Substanz an α1-enthaltenden Rezeptoren keine Aktivität. Eine Unterscheidung zwischen verschiedenen α Untereinheiten macht die Bindung der Substanz an

diesen wahrscheinlich. Bei der Eingrenzung der Bindestelle auf der $\alpha 6$ Untereinheit wurde sich verschiedener $\alpha 1/\alpha 6$ Chimären bedient. Die Schemata aller beschriebenen Chimären sind in Abb. 75 aufgeführt.

Bei der ersten ausgetesteten Chimäre handelte es sich um eine Untereinheit, die bis zur Aminosäure-Position 191 der $\alpha 6$ Untereinheit und nach der Bsu36I Schnittstelle eine $\alpha 6$ Untereinheit war und dazwischen die Sequenz der $\alpha 1$ Untereinheit trug. Die Chimäre wurde als $\alpha 6-61$ bezeichnet. $\alpha 6-61$ wurde zusammen den $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheiten transfiziert und mit mehreren Konzentrationen DS1 im [^3H]EBOB-Modulationsversuch getestet. Abb. 74 zeigt die [^3H]EBOB-Bindungsmodulation des chimären Rezeptors $\alpha 6-61\beta 3\gamma 2$ im Vergleich zu $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. Die [^3H]EBOB-Bindung von $\alpha 6-61\beta 3\gamma 2$ wurde durch DS1 ähnlich moduliert wie $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. Damit ergibt sich, dass der Bereich, der bei dieser Chimäre durch die $\alpha 1$ Sequenz ausgetauscht wurde höchstwahrscheinlich nicht an der Bindung von DS1 beteiligt ist.

Im nächsten Versuch wurden Chimären verwendet, bei denen bereits größere Bereiche durch die jeweils andere Untereinheit ersetzt wurden. Abb. 74 zeigt die Ergebnisse der [^3H]EBOB-Modulation durch DS1 an C1 $\beta 3\gamma 2$, C2 $\beta 3\gamma 2$, C4 $\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6\text{-MluI-}\alpha 1\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren und den Vergleich zur Modulation an $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. C1 besitzt bis zur MluI-Schnittstelle und nach der Bsu36I-Schnittstelle die Sequenz einer $\alpha 1$ Untereinheit und in dem Bereich dazwischen, der sich aus fast der Hälfte des N-Terminus und den beiden ersten Transmembrandomänen zusammensetzt, die Sequenz einer $\alpha 6$ Untereinheit. Bei der Chimäre C2 verhält es sich genau umgekehrt. Der Rezeptor C1 $\beta 3\gamma 2$ zeigte keine [^3H]EBOB-Modulation durch DS1, während C2 $\beta 3\gamma 2$ verglichen mit $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren eine sehr ähnliche Modulation aufwies. Die Effizienz lag dabei mit einer maximalen Inhibition von 65% und einem IC_{50} -Wert von 1,66 μM sehr nahe an den Ergebnissen für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$. Bei der Chimäre C4 besteht der Anfang des N-Terminus bis zu MluI Schnittstelle aus der $\alpha 1$ Untereinheit und der Rest aus der $\alpha 6$. Bei der Chimäre $\alpha 6\text{-MluI-}\alpha 1$ verhält es sich gerade umgekehrt. Der Rezeptor C4 $\beta 3\gamma 2$ zeigte keine Reduktion der [^3H]EBOB-Bindung durch DS1, dagegen war eine Erhöhung der [^3H]EBOB-Bindung gerade im Bereich von 3,33 μM DS1 sehr deutlich ausgeprägt. Rückschlüsse auf eine Negativmodulation der [^3H]EBOB-Bindung und damit eben auch Bindung von DS1 an C4 kann man nicht ziehen, da es sich hierbei nur um ein ausgewertetes Experiment handelt. Der Rezeptor $\alpha 6\text{-MluI-}\alpha 1\beta 3\gamma 2$ wurde durch DS1 moduliert, aber mit niedrigerer Potenz und Effizienz als bei den Chimären, die im hinteren Teil (letzte zwei Transmembrandomänen und C-Terminus) die Sequenz der $\alpha 6$ Untereinheit beinhalten. Da der Rezeptor mit dieser Chimäre aber im Gegensatz zu C4 $\beta 3\gamma 2$ eine Inhibition der [^3H]EBOB-Bindung durch DS1 hervorrief, wurde der N-terminale Bereich der $\alpha 6$ Untereinheit beibehalten und weiter eingegrenzt.

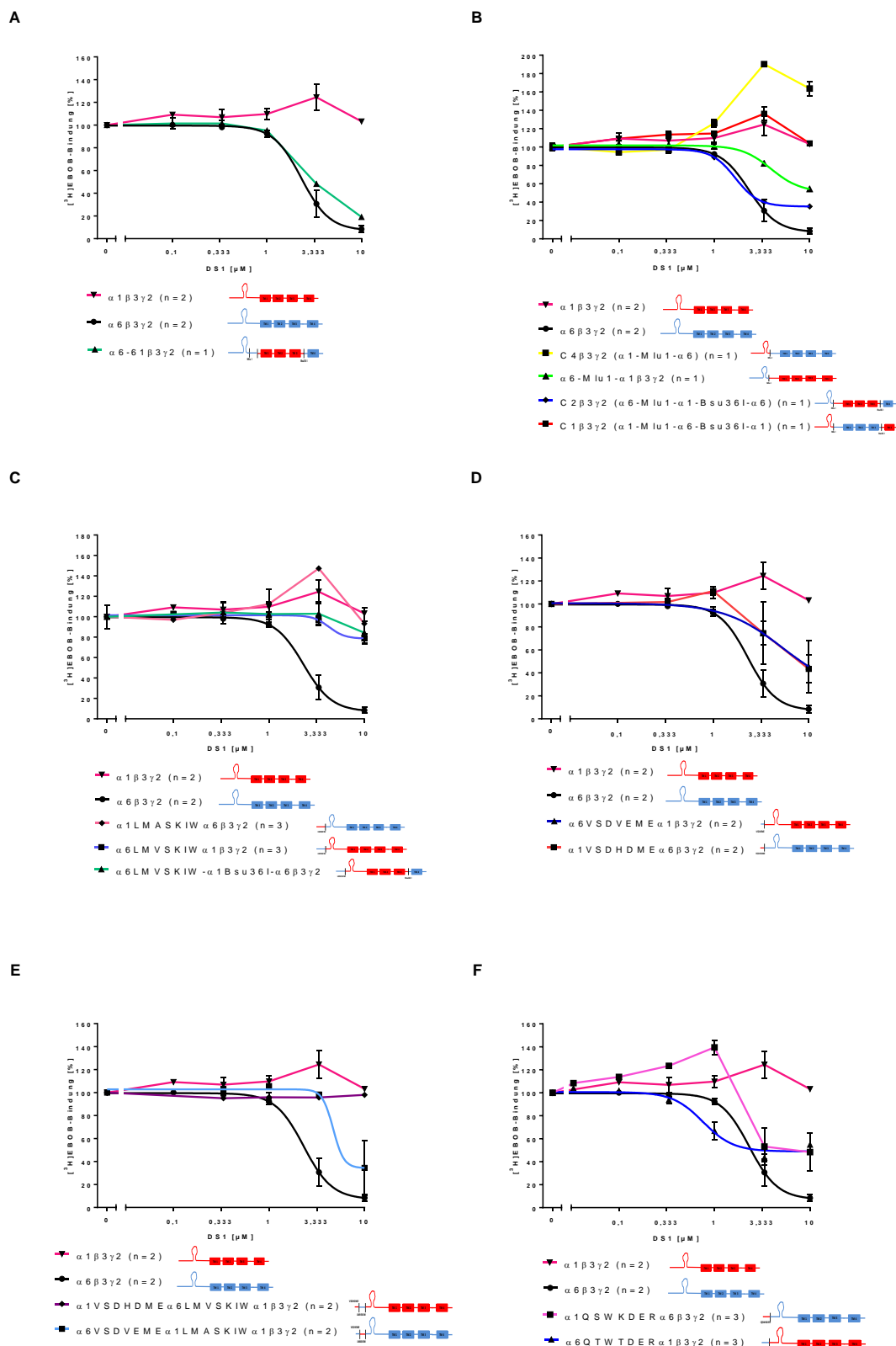
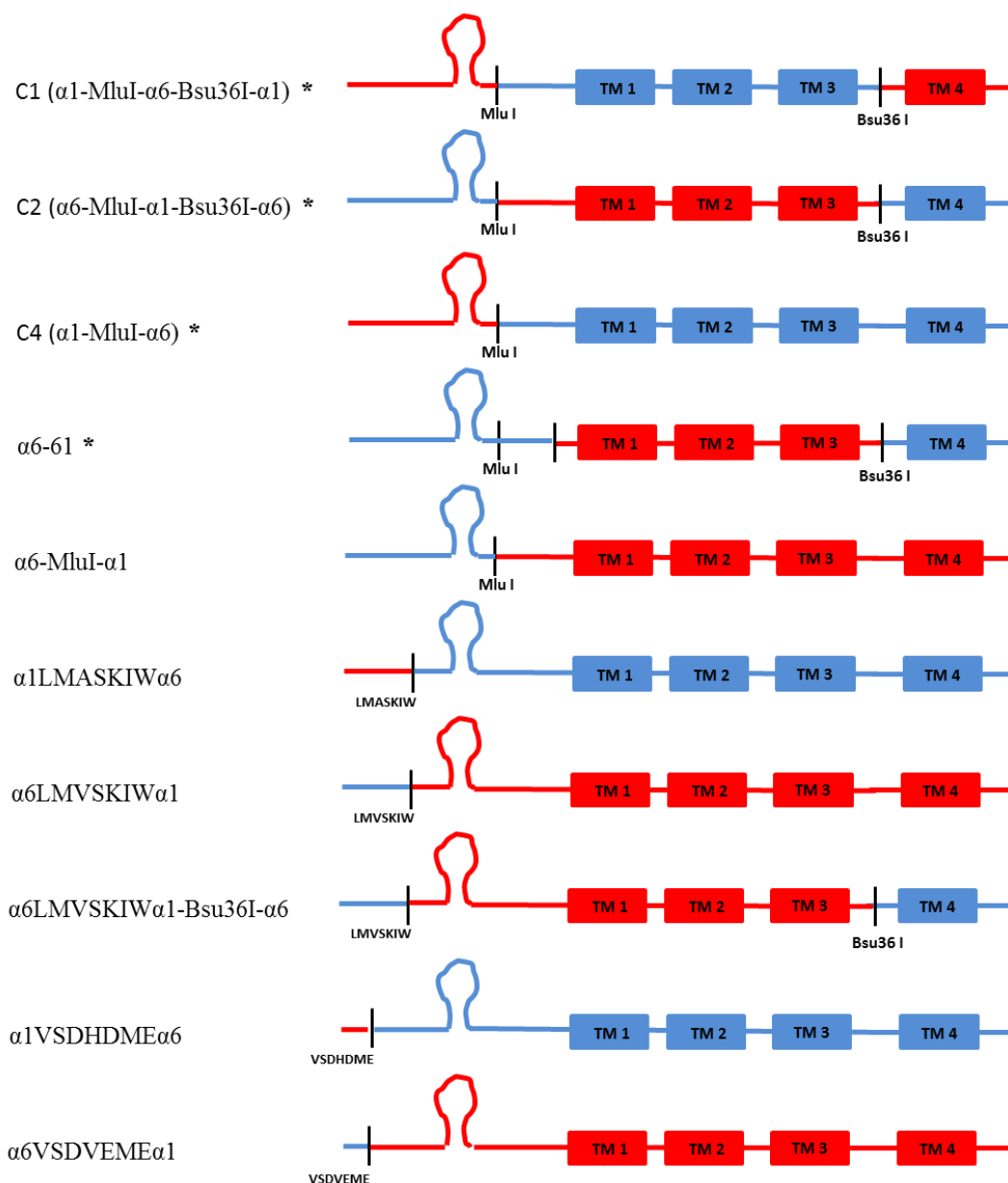


Abb. 74: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 an chimären Rezeptoren. $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation an $\alpha 1/6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren durch DS1, sowie an chimären α Untereinheiten in Kombination mit $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheiten. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen von DS1 und 3 nM des Liganden $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ inkubiert. In jeder Abbildung wird die $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation an $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren dargestellt um den Vergleich mit chimären Rezeptoren zu vereinfachen. A: $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation an $\alpha 6-61\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. B: $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation an C1/2/4/ $\alpha 6\text{MluI-}\alpha 1\beta 3\gamma 2$

Rezeptoren. C: [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, $\alpha 6$ LMVSKIW- $\alpha 1$ AocI- $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. D: [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. E: [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. F: [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 6$ QWTWDER $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 1$ QSWKDER $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zur Darstellung der Modulation wurde, falls möglich, ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit durch die Mittelwerte \pm SEM von n Messungen angelegt. Die modulierten [³H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die für jeden Rezeptortyp spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. Maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel (4.3.12.4 Einsatz von Chimären zur Untersuchung der Bindestelle von) beschrieben.

Schemata der verwendeten Chimären



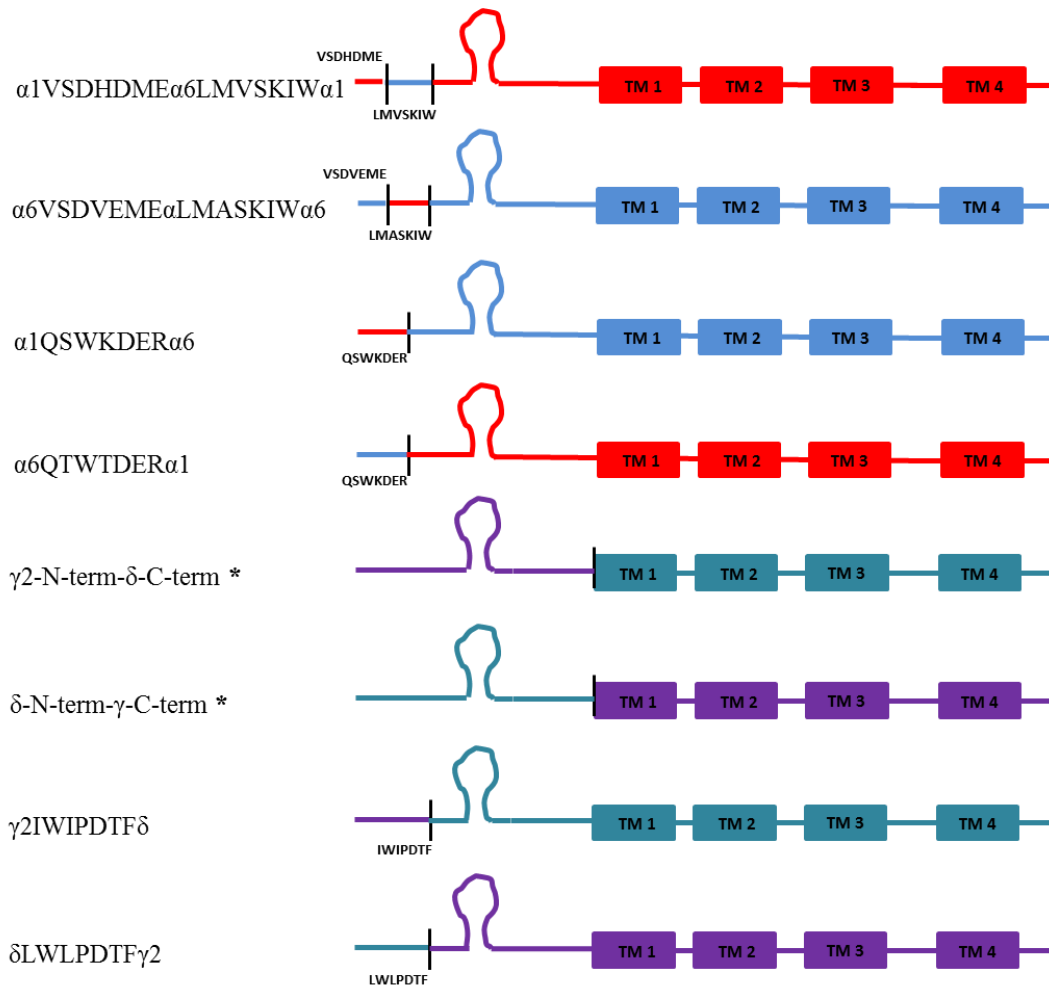


Abb. 75 Schemata aller verwendeten Chimären. Schematische Darstellung der verwendeten Chimären. Rote Bereiche stammen von der $\alpha 1$ Untereinheit, blaue Bereiche von der $\alpha 6$ Untereinheit, violette von der $\gamma 2$ Untereinheit und türkise von der δ Untereinheit. Die Schnittstellen sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. MluI und Bsu36I bezeichnen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Sind die Schnittstellen durch Primer in der PCR entstanden sind die letzten Aminosäuren des Fragments vom N-terminalen Bereich vor der Schnittstelle eingefügt. Chimären die mit einem „*“ gekennzeichnet sind, waren im Laborbestand enthalten und wurden nicht selbstständig hergestellt. Die Abbildungen dienen der schematischen Darstellung und sind nicht maßstabsgetreu.

Die MluI Schnittstelle, die in der $\alpha 1$ und $\alpha 6$ Untereinheit nicht natürlicherweise vorkommt, teilt den N-Terminus etwa in der Hälfte. Da die Chimäre $\alpha 6$ -MluI- $\alpha 1$ einen Rezeptor bildete, der nur in der ersten Hälfte des N-Terminus eine $\alpha 6$ Untereinheit war und dennoch durch DS1 moduliert werden konnte, wurde der vordere N-terminale Bereich weiter verkleinert. Die nachfolgend hergestellten Chimären $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ teilten den N-Terminus hinter der Aminosäure-Position 94 der $\alpha 1$ Untereinheit bzw. Position 93 der $\alpha 6$ Untereinheit (Abb. 74). $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ zeigte keine Modulation der [3 H]EBOB-Bindung durch DS1. Der Rezeptor $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ zeigte eine minimale Modulation der [3 H]EBOB-Bindung durch DS1 mit einer Effizienz von $24 \pm 6\%$ und einer Potenz von $5,46 \pm 2,10 \mu\text{M}$. Eine sehr geringe Modulation konnte also beobachtet werden, diese war aber im Gegensatz zu der an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren reduziert. Eine Möglichkeit für die schlechte Aktivität von DS1 an dieser Chimäre könnte eine unglücklich gewählte

Schnittstelle zwischen den beiden Untereinheiten sein, die z.B die Bindetasche durch veränderte Proteinwechselwirkungen beeinträchtigt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass sich die [³H]EBOB-Bindung an Rezeptoren, die diese chimäre Untereinheit enthalten, nicht normal modulieren lässt. Dies wurde auch schon für einige konkatamere Rezeptoren gezeigt. Die bisherigen chimären Rezeptoren, deren [³H]EBOB-Bindungsmodulation durch DS1 mit einer hohen Effizienz erfolgte, besaßen ab der Schnittstelle für Bsu36I die $\alpha 6$ Sequenz. Auch wenn eine Beteiligung des C-Terminus oder der letzten beiden Transmembrandomänen an der Bindestelle eher unwahrscheinlich ist, wurde der Chimäre $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1$ hinter der Bsu36I-Schnittstelle eine $\alpha 6$ Sequenz eingefügt ($\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1$ -Bsu36I- $\alpha 6$). Die Ergebnisse aus der [³H]EBOB-Modulation durch DS1 unterschieden sich nicht von denen der $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1\beta\gamma 2$ Rezeptoren (Abb. 74).

Trotz der geringen [³H]EBOB-Bindungsmodulation kann vermutet werden, dass der Rezeptor mit der Chimäre $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1$ durch DS1 moduliert wurde. Der Anfang des N-Terminus wurde daher weiter verkleinert und die Chimären $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6$ und $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1$ hergestellt. Die Schnittstelle befindet sich hier nach den Aminosäurepositionen 57 ($\alpha 1$) bzw. 56 ($\alpha 6$). Abb. 74 zeigt die Ergebnisse des [³H]EBOB-Bindungsexperimentes mit beiden chimären Rezeptoren und den Vergleich zu $\alpha 1\beta\gamma 2$ und $\alpha 6\beta\gamma 2$. Die [³H]EBOB-Bindungsmodulation an beiden Rezeptoren durch DS1 war allerdings nicht eindeutig. Die Ergebnisse aus drei verschiedenen Bindungsexperimenten zeigen für beide Rezeptortypen eine ähnliche maximale Inhibition der [³H]EBOB-Bindung von $55 \pm 23\%$ für $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1\beta\gamma 2$ und $57 \pm 12\%$ für $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6\beta\gamma 2$. Das nicht eindeutige Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bindestelle sehr nahe an der verwendeten Schnittstelle liegt.

Das nächste Chimären-Paar, das erstellt und getestet wurde, waren $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1$ und $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6$. $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1$ besteht bis zur Aminosäureposition 57 aus einer $\alpha 1$ Untereinheit, dann bis zur Aminosäureposition 93 aus einer $\alpha 6$ Untereinheit und der Rest aus einer $\alpha 1$ Untereinheit. Im Prinzip wurde nur ein kurzes Stück in der Mitte des N-Terminus durch die Sequenz der $\alpha 6$ Untereinheit ersetzt. Bei der Chimäre $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6$ verhält es sich entsprechend umgekehrt. Im Gegensatz zum Rezeptor $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6\beta\gamma 2$, der eine Modulation der [³H]EBOB-Bindung zeigte, konnte diese bei $\alpha 1$ VSDHDME $\alpha 6$ LMVSKIW $\alpha 1\beta\gamma 2$ nicht mehr nachgewiesen werden. Dagegen wurde die [³H]EBOB-Bindung bei $\alpha 6$ VSDVEME $\alpha 1$ LMASKIW $\alpha 6\beta\gamma 2$ durch 10 μ M DS1 auf $65 \pm 24\%$ reduziert. Die Modulation der [³H]EBOB-Bindung war im Vergleich zu der an $\alpha 6\beta\gamma 2$ Rezeptoren erniedrigt, obwohl die Chimäre größtenteils aus der Sequenz der $\alpha 6$ Untereinheit besteht. Dies zeigte sich besonders deutlich bei einer Konzentration von 3,333 μ M DS1. Dabei liegt wieder die Vermutung nahe, dass die Schnittstelle der Chimäre vielleicht die Bindetasche von DS1 beeinträchtigt oder die Bindestelle aus mehreren Bereichen der N-terminalen $\alpha 6$ Untereinheit gebildet wird und ein Teil davon in der Chimäre durch eine $\alpha 1$ Sequenz ersetzt wurden.

Der chimäre Rezeptor $\alpha 6\text{VSDVEME}\alpha 1\beta 3\gamma 2$ konnte in der [^3H]EBOB-Bindung moduliert werden, aber eben auch das Gegenstück $\alpha 1\text{VSDHDME}\alpha 6\beta 3\gamma 2$. Teilte man die $\alpha 1\text{VSDHDME}\alpha 6$ Chimäre dagegen hinter der Aminosäuresequenz $\alpha 6\text{LMVSKIW}$ noch einmal und fügte eine $\alpha 1$ Untereinheit dahinter, wurde die Fähigkeit zur [^3H]EBOB-Modulation durch DS1 wieder aufgehoben. Dagegen konnte bei der Chimäre $\alpha 6\text{VSDVEME}\alpha 1\text{LMASKIW}$ die Modulationsfähigkeit erhalten werden. Dies spricht dafür, dass die Bindestelle sich am Anfang des N-Terminus der $\alpha 6$ Untereinheit befindet und nicht im Bereich zwischen den Aminosäuren 56 und 93. Allerdings kann auch nicht ignoriert werden, dass der Rezeptor $\alpha 1\text{VSDHDME}\alpha 6\beta 3\gamma 2$ in mehreren [^3H]EBOB-Bindungsversuchen eine Modulation zeigte. Es ist durchaus möglich, dass mehrere Bereiche der N-terminalen $\alpha 6$ Untereinheit die Bindestelle für DS1 bilden. Da man bei dem Rezeptor $\alpha 1\text{LMASKIW}\alpha 6\beta 3\gamma 2$ keine [^3H]EBOB-Bindungsmodulation mehr messen konnte, ist es wahrscheinlich, dass sich der Bereich oder die Bereiche vor der Aminosäureposition 93 befinden. Der N-Terminus wurde in einem weiteren Chimären-Paar ($\alpha 1\text{QSWKDER}\alpha 6$, $\alpha 6\text{QTWTDER}\alpha 1$) an der Aminosäureposition 71 der $\alpha 6$ bzw. 72 der $\alpha 1$ Untereinheit geteilt (Abb. 74). Die [^3H]EBOB-Bindungsmodulation an $\alpha 6\text{QTWTDER}\alpha 1\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren erfolgte mit hoher Potenz. Der IC_{50} -Wert lag bei $0,83 \pm 0,13 \mu\text{M}$ und die maximale Inhibition lag bei $50 \pm 3\%$. Bei der Modulation an dieser Chimäre schien vor allem die Effizienz schlechter zu sein als bei $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren, während die Potenz ähnlich hoch war. Die [^3H]EBOB-Bindung am Rezeptor $\alpha 1\text{QSWKDER}\alpha 6\beta 3\gamma 2$ wurde jedoch ebenfalls moduliert, zwar mit einem hohen Standardfehler, aber dennoch zeigten $10 \mu\text{M}$ DS1 mit $52 \pm 17\%$ dieselbe Effizienz wie an $\alpha 6\text{QTWTDER}\alpha 1\beta 3\gamma 2$. Die Ergebnisse deuten stark auf eine Bindung von DS1 im vorderen N-terminalen Bereich hin, wo es aber vermutlich mehr als einen Bindungsbereich gibt.

4.3.12.5 Untersuchung der [³H]EBOB Bindungsmodulation durch DS1 und 39 an verschiedenen $\alpha 1/\alpha 6$ Punktmutanten

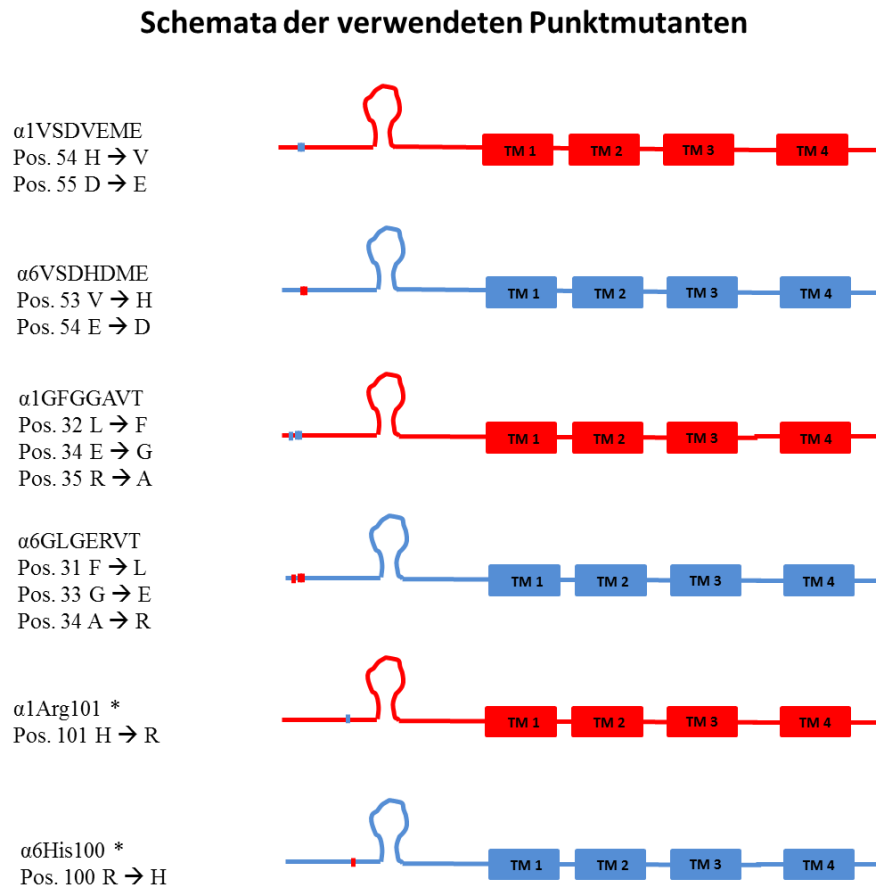


Abb. 76 Schemata aller verwendeten Punktmutanten. Schematische Darstellung der verwendeten Punktmutanten. Rote Bereiche stammen von der $\alpha 1$ Untereinheit, blaue Bereiche von der $\alpha 6$ Untereinheit. Die mutierten Bereiche sind mit kurzen Balken der Farbe der jeweils anderen α Untereinheit gekennzeichnet. Die Positionen der mutierten Aminosäuren, sowie die ausgetauschte Aminosäure sind unterhalb vom Namen der Mutante eingetragen. Punktmutanten die mit einem „*“ gekennzeichnet sind, waren im Laborbestand enthalten und wurden nicht selbstständig hergestellt. Die Abbildungen dienen der schematischen Darstellung und sind nicht maßstabsgetreu.

In dem vorderen N-terminalen Bereich, in dem die Bindestelle von DS1 vermutet wird, wurden an zwei Stellen, an denen sich die Aminosäuren zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 6$ Untereinheit besonders stark unterschieden, Mehrfach-Punktmutationen eingeführt (Abb. 76). Bei der Punktmutante $\alpha 6$ VSDHDME wurden die Aminosäuren 53 (Valin) und 54 (Glutaminsäure) der $\alpha 6$ Untereinheit gegen die entsprechenden der $\alpha 1$ Untereinheit (Histidin, Asparaginsäure) ausgetauscht. Bei der Punktmutante $\alpha 1$ VSDVEME wurden die Aminosäuren 54 (Histidin) und 55 (Asparaginsäure) der $\alpha 1$ Untereinheit gegen die entsprechenden der $\alpha 6$ Untereinheit (Valin, Glutaminsäure) ausgetauscht. Bei einer weiteren Punktmutante ($\alpha 6$ GLGERVT) wurden die Aminosäuren 31 (Phenylalanin), 33 (Glycin) und 34 (Alanin) der $\alpha 6$ Untereinheit gegen die entsprechenden der $\alpha 1$ Untereinheit (Leucin, Glutaminsäure, Arginin) ausgetauscht. Bei der komplementären Punktmutante $\alpha 1$ GFGGAVT wurden die

Aminosäuren 32 (Leucin), 34 (Glutaminsäure) und 35 (Arginin) der $\alpha 1$ Untereinheit gegen die entsprechenden der $\alpha 6$ Untereinheit (Phenylalanin, Glycin, Alanin) ausgetauscht. Sollten die ausgetauschten Aminosäuren essentiell an der Bindung von DS1 beteiligt sein, könnte ein Austausch im besten Fall zu einer Umkehr der [^3H]EBOB-Modulationsverhältnisse an den mutierten Rezeptoren führen. Andernfalls wäre auch ein Verlust der Aktivität von DS1 an Rezeptoren mit $\alpha 6$ Mutanten vorstellbar. Die mutierten α Untereinheiten wurden zusammen mit den $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheiten transfiziert und die Rezeptorproteine in [^3H]EBOB-Modulationsversuchen überprüft. Abb. 77 zeigt die Ergebnisse der beiden $\alpha 1/\alpha 6$ Mutantenpaare. Rezeptoren, die die mutierte $\alpha 1\text{GFGGAVT}$ Untereinheit enthielten, zeigten keine [^3H]EBOB-Modulation durch DS1. Rezeptoren, die die mutierte $\alpha 1\text{VSDVEME}$ Untereinheit enthielten, zeigten eine leichte [^3H]EBOB-Modulation von $21 \pm 1\%$. Starke Modulation zeigten dagegen Rezeptoren, die die mutierte $\alpha 6$ Untereinheit enthielten. Die maximale [^3H]EBOB-Modulation belief sich auf $83 \pm 2\%$ bei $\alpha 6\text{VSDHDME}\beta 3\gamma 2$ und $85 \pm 1\%$ bei $\alpha 6\text{GLGERVT}\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren. Ein weiteres Mutantenpaar, das im [^3H]EBOB-Bindungsexperiment mit DS1 untersucht wurde, waren die Einfach-Punktmutanten $\alpha 6\text{His100}$ und $\alpha 1\text{Arg101}$, die sich bereits im Laborbestand befanden. Mit den Punktmutanten wurde ursprünglich die Bedeutung einer einzigen Aminosäure für die α Selektivität einiger Benzodiazepine bewiesen.⁶⁴ Beim [^3H]EBOB-Modulationsversuch mit DS1 zeigte sich, dass der Rezeptor $\alpha 1\text{Arg101}\beta 3\gamma 2$ trotz mutierter $\alpha 1$ Untereinheit weiterhin nicht durch die Substanz moduliert werden konnte (Abb. 78). Dagegen wurde die [^3H]EBOB-Bindung des Rezeptors $\alpha 6\text{His100}\beta 3\gamma 2$ scheinbar unbeeinflusst moduliert (Abb. 78).

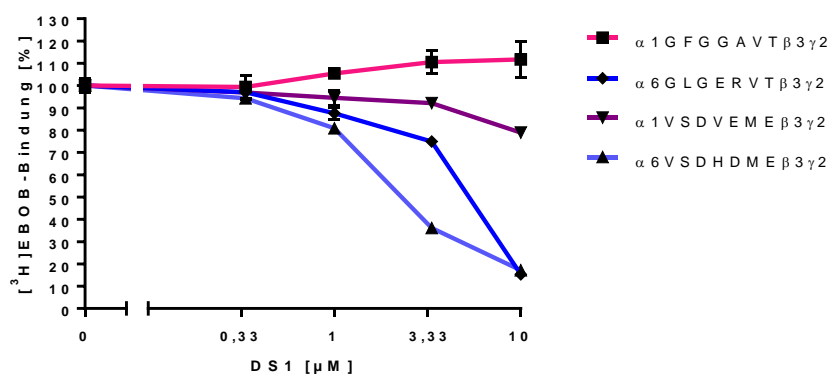


Abb. 77: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 an punktmutierten $\alpha 1/\alpha 6$ Rezeptoren. [^3H]EBOB-Modulation an punktmutierten Rezeptoren durch DS1. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen der Substanz und 3 nM des Liganden [^3H]EBOB inkubiert. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Bei der Darstellung der Modulation an $\alpha 1\text{GFGGAVT}\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $\alpha 6\text{GLGERVT}\alpha 1\beta 3\gamma 2$, $\alpha 1\text{VSDVEME}\alpha 6\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6\text{VSDHDME}\alpha 1\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren handelt es sich um die Mittelwerte \pm SEM von einer Messung. Die modulierten [^3H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die für jeden Rezeptortyp spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. Maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel 4.3.13.5 beschrieben.

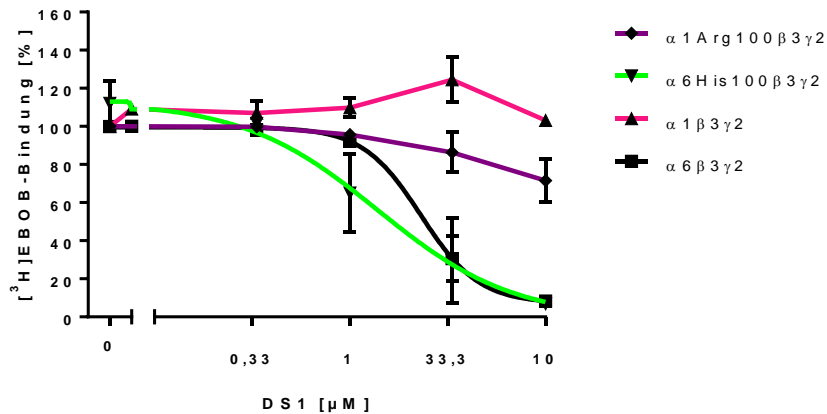


Abb. 78: Dosis-Wirkungs-Beziehung von DS1 an punktmutierten Rezeptoren. $[^3\text{H}]$ EBOB-Modulation an $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren durch DS1, sowie an punktmutierten α Untereinheiten in Kombination mit $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheiten. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen DS1 und 3 nM des Liganden $[^3\text{H}]$ EBOB inkubiert. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Zur Darstellung der Modulation an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 6\text{His}100\beta 3\gamma 2$ wurde ein logarithmischer, vier-parametrischer Fit durch die Mittelwerte \pm SEM von 2 Messungen angelegt. Bei der Darstellung der Modulation an $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 1\text{Arg}100\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren handelt es sich um die Mittelwerte \pm SEM von 2 Messungen. Die modulierten $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die für jeden Rezeptortyp spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. IC_{50} und maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel 4.3.13.5 beschrieben.

Die Mutantenpaare $\alpha 1\text{VSDVEME}/\alpha 6\text{VSDHDME}$ und $\alpha 1\text{GFGGAVT}/\alpha 6\text{GLGERVT}$ wurden in Kombination mit einer $\beta 3$ und δ Untereinheit auch auf ihre $[^3\text{H}]$ EBOB-Modulation durch das Derivat **39** untersucht. Die $\alpha 1$ mutierten Rezeptoren zeigten auch hier keine $[^3\text{H}]$ EBOB-Modulation durch die Substanz. $\alpha 6$ mutierte Rezeptoren wurden dagegen moduliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 79 dargestellt. Die maximale Inhibition bei 10 μM **39** an $\alpha 6\text{GLGERVT}\beta 3\delta$ lag bei $45 \pm 6\%$ und bei $\alpha 6\text{VSDHDME}\beta 3\delta$ bei $26 \pm 12\%$.

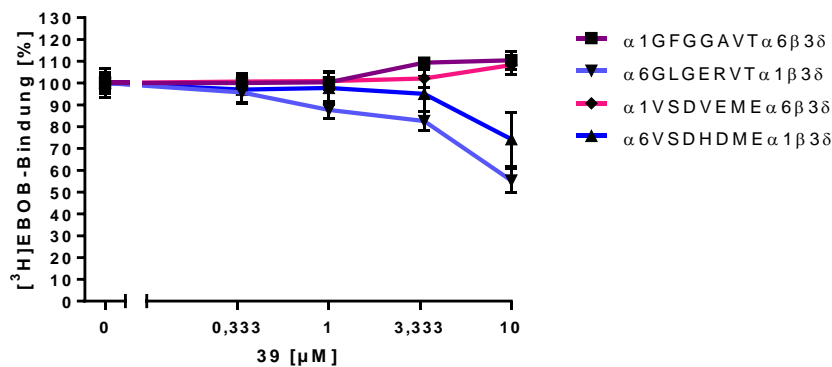


Abb. 79: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Verbindung 39 an punktmutierten $\alpha 1/\alpha 6$ Rezeptoren. $[^3\text{H}]$ EBOB-Modulation an punktmutierten Rezeptoren durch die Verbindung **39**. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen der Substanz und 3 nM des Liganden $[^3\text{H}]$ EBOB inkubiert. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Bei der Darstellung der Modulation an $\alpha 1\text{GFGGAVT}\alpha 6\beta 3\delta$, $\alpha 6\text{GLGERVT}\alpha 1\beta 3\delta$, $\alpha 1\text{VSDVEME}\alpha 6\beta 3\delta$ und $\alpha 6\text{VSDHDME}\alpha 1\beta 3\delta$ Rezeptoren handelt es sich um die Mittelwerte \pm SEM von einer Messung. Die modulierten $[^3\text{H}]$ EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die für jeden Rezeptortyp spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. Maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel 4.3.13.5 beschrieben.

4.3.12.6 Untersuchung der [³H]EBOB-Bindungsmodulation durch Derivat **39** an verschiedenen $\gamma 2/\delta$ Chimären

Zur Untersuchung des Teils der Bindestelle, die eventuell auf der δ Untereinheit liegt, wurden Chimären zwischen $\gamma 2$ und δ Untereinheit erstellt. Zunächst wurden Chimären untersucht, deren gesamter N-Terminus ausgetauscht war. Diese Chimären waren bereits im Laborbestand vorhanden. Die Chimäre, deren N-Terminus der δ Untereinheit entsprach, zeigte aus unbekanntem Grund keine [³H]EBOB-Bindung. Die [³H]EBOB-Bindung der Chimäre, deren N-Terminus der $\gamma 2$ Untereinheit entsprach, konnte durch DS1 moduliert werden. Die Inhibition bei einer Konzentration von DS1 von 0,33 μM betrug $20 \pm 7\%$ und bei einer Konzentration von 1 μM betrug sie $65 \pm 13\%$ (Daten nicht dargestellt). Da die Modulation durch DS1 damit der an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren ähnelte, wurde vermutet, dass sich die Bindestelle im N-Terminus dieser Untereinheiten befindet. Der N-Terminus wurde daher bei einem weiteren Paar Chimären ($\gamma 2\text{IWIPDTF}\delta$ und $\delta\text{LWLPDTF}\gamma 2$) etwa in der Hälfte geteilt (Aminosäureposition 125 der δ Untereinheit bzw. Position 150 der $\gamma 2$ Untereinheit, Abb. 75). Die Chimären wurden zusammen mit der $\alpha 6$ und $\beta 3$ Untereinheit transfiziert und die Rezeptoren im [³H]EBOB-Modulationsversuch mit Derivat **39** getestet (Abb. 80). Rezeptoren, die die Chimäre $\delta\text{LWLPDTF}\gamma 2$ enthielten, zeigten in der [³H]EBOB-Modulation mit Derivat **39** eine maximale Inhibition bei einer Konzentration von 3,33 μM von $40 \pm 4\%$, während die [³H]EBOB-Bindung in $\alpha 6\beta 3\gamma 2\text{IWIPDTF}\delta$ Rezeptoren nicht moduliert werden konnte. Die Bindestelle für Derivat **39** könnte damit am Anfang des N-terminalen Bereichs der δ Untereinheit liegen.

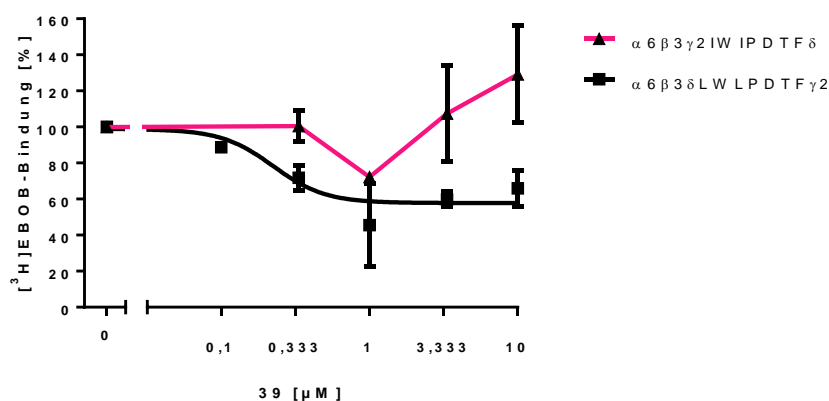


Abb. 80: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verbindung **39 an chimären $\gamma 2/\delta$ Rezeptoren.** [³H]EBOB-Modulation an chimären Rezeptoren durch Verbindung **39**. Krude Membranen von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden dazu mit steigenden Konzentrationen der Substanz **39** und 3 nM des Liganden [³H]EBOB inkubiert. Versuchsdurchführung und Berechnungen sind im Methoden-Teil beschrieben. Bei der Darstellung der Modulation an $\alpha 6\beta 3\gamma 2\text{IWIPDTF}\delta$ und $\alpha 6\beta 3\delta\text{LWLPDTF}\gamma 2$ Rezeptoren handelt es sich um die Mittelwerte \pm SEM von 3 Messungen. Die modulierten [³H]EBOB-Bindungswerte beziehen sich auf die für jeden Rezeptortyp spezifische Gesamtbindung, die auf 100% gesetzt wurde. Maximale Inhibitionswerte sind im Kapitel (4.3.12.6 Untersuchung der [³H]EBOB-Bindungsmodulation durch Derivat **39** an verschiedenen $\gamma 2/\delta$ Chimären) beschrieben.

5 Diskussion

5.1 Untersuchung des Aufbaus δ -enthaltender GABA_AR mithilfe von Konkatomeren

5.1.1 Konkatomere aus zwei und drei verlinkten Untereinheiten zur Bildung eines Pentamers

Um GABA_AR-Pentamere der theoretischen Abfolge $\beta 3\alpha 1/6\beta 3\alpha 1/6\delta$ (gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet) zu konstruieren, wurden verschiedene Konkatomere erstellt. Die Konkatomer-Kombination, die dabei die höchsten Bindungswerte lieferte, sollte für weitere Untersuchungen herangezogen werden. Die Abfolge der Untereinheiten ist in Konkatomeren durch die kovalente Verlinkung strikt festgelegt, während einzeln transfizierte Untereinheiten frei assemblieren können. Im Fall der $\gamma 2$ -enthaltenden GABA_AR erfolgt die Assemblierung in einem festgelegten Muster mit der Abfolge $\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta\text{-}\alpha\text{-}\gamma 2$ (gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet).^{11, 183} GABA_AR, die die δ Untereinheit beinhalten, scheinen ihre Assemblierung dagegen flexibler gestalten zu können.^{13-14, 186} Ein direkter Vergleich der [³H]EBOB-Modulation rekombinanter $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_AR aus einzeln transfizierten Untereinheiten und konkatomeren Rezeptoren hätte so zur Strukturaufklärung rekombinanter δ -enthaltender GABA_AR beitragen können.

Die Untersuchung der $\alpha 6$ -enthaltenden Konkatomere mit zwei und drei verlinkten Untereinheiten in [³H]Muscimol- und [³H]EBOB-Bindungsstudien zeigte für alle Kombinationen hohe Bindungswerte für [³H]Muscimol. Die [³H]EBOB-Bindung der Kombinationen $(\beta 3\alpha 6)\delta$, $(\beta 3\alpha 6)(\beta 3\alpha 6\delta)$ und $(\beta 3\alpha 6\beta 3)(\alpha 6\delta)$ war jedoch gering. Da der Vergleich mit einzeln transfizierten, δ -enthaltenden GABA_AR vor allem über die [³H]EBOB-Modulation mit verschiedenen Liganden erfolgen sollte, wäre nur die Kombination $(\alpha 6\beta 3)(\alpha 6\delta\beta 3)$ geeignet. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Untersuchung mit $\alpha 1$ -enthaltenden Konkatomeren aus zwei und drei verlinkten Untereinheiten (Tab. 24, Tab. 25).

Durchgeführte Kontrollen mit einzeln transfizierten Konkatomeren zeigten, dass diese durchaus in der Lage sind, Artefakte zu bilden, obwohl Konkatomere aus zwei oder drei verlinkten Untereinheiten kein Rezeptor-Pentamer bilden sollten. Gerade die $\alpha 6$ -enthaltenden 2er Konkatomere $(\beta 3\alpha 6)$ und $(\alpha 6\beta 3)$ zeigten in den Bindungsstudien eine ähnlich hohe [³H]Muscimol-Bindung und eine sogar höhere [³H]EBOB-Bindung als Rezeptoren, die mit passendem Gegenstück transfiziert wurden (Tab. 24). Die Interpretation von Bindungsergebnissen konkatomerer Rezeptoren wird damit deutlich erschwert, da die Möglichkeit besteht, neben pentameren Rezeptoren auch Artefakte zu erfassen. Einige Konkatomere wie die 3er Konstrukte $(\beta 3\alpha 6\delta)$ und $(\alpha 6\delta\beta 3)$ zeigten eine hohe [³H]Muscimol-Bindung, jedoch keine [³H]EBOB-Bindung. Das deutet darauf hin, dass diese Konkatomere Rezeptor-Artefakte bilden, die zwar eine Bindestelle für GABA besitzen aber keinen Ionenkanal, der eine Bindestelle für EBOB besitzt. Die gemessene [³H]EBOB-Bindung an den Rezeptoren $(\beta 3\alpha 6)(\beta 3\alpha 6\delta)$

und $(\alpha 6\beta 3)(\alpha 6\delta\beta 3)$ kann demnach nicht von Artefakten aus 3er Konkameren stammen. Ein weiteres 3er Konkamer, $(\beta 3\alpha 6\beta 3)$, zeigte dagegen neben einer hohen $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung auch $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung. Diese ließ sich jedoch durch $10\ \mu\text{M}$ GABA nicht signifikant modulieren, obwohl durch die $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung eine GABA-Bindestelle nachgewiesen worden war. Die Anwesenheit einer $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindestelle deutet auf das Vorhandensein eines Ionenkanals hin und damit auf einen Rezeptor, der dem Pentamer ähnlich sein müsste. Aufgrund der fehlenden Modulationsfähigkeit der $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung könnte es sich jedoch um einen nicht-funktionstüchtigen Rezeptor handeln. Dass auch keine Modulation der $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung an $(\beta 3\alpha 6\beta 3)(\alpha 6\delta)$ Rezeptoren erfolgte, lässt die Vermutung aufkommen, dass Konkamere auch bei korrekter Transfektion zur Artefakt-Bildung neigen könnten.

Artefakt-Bildung schien ebenfalls bei $\alpha 1$ -enthaltenden Konkameren vorzukommen (Tab. 25). Die $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung der Kombinationen $(\beta 3\alpha 1)\delta$, $(\beta 3\alpha 1)(\beta 3\alpha 1\delta)$ und $(\beta 3\alpha 1\beta 3)(\alpha 1\delta)$ war eher niedrig und eine $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung nicht messbar. Die einzeln transfizierten Konkamere $(\beta 3\alpha 1)$ und $(\beta 3\alpha 1\beta 3)$ zeigten eine vergleichbare $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung. Auch hier kann man nicht ausschließen, dass Artefakte bei korrekter Transfektion gebildet und bei Bindungsstudien mitgemessen werden. Die Kombination $(\alpha 1\beta 3)(\alpha 1\delta\beta 3)$ ist bei den $\alpha 1$ -enthaltenden Konkameren die einzige Kombination, die relativ hohe $[^3\text{H}]\text{Muscimol}$ -Bindung und eine annehmbare $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung zeigte. Allerdings zeigte auch das einzeln transfizierte Konstrukt $(\alpha 1\beta 3)$ vergleichbare Bindungswerte.

Generell zeigen einzeln transfizierte 2er Konstrukte häufiger höhere Bindungswerte als 3er Konstrukte und scheinen demnach verstärkt Artefakte zu bilden. Da auch $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung beobachtet wurde, besitzen die Artefakte eine EBOB-Bindestelle und damit vermutlich einen Ionenkanal. Obwohl die Bindestelle der Kanalblocker noch nicht detailliert erforscht ist, kann man dennoch vermuten, dass die Kanalpore der Artefakte der von gewöhnlichen GABA_AR gleicht und damit aus fünf Untereinheiten gebildet wird. Gut vorstellbar als Struktur eines Artefaktes aus 2er Konkameren ist daher ein Pentamer mit heraushängender Untereinheit oder ein Dipentamer. Hexamere oder Tetramere sind dagegen eher unwahrscheinlich. Abb. 81 zeigt den möglichen Aufbau von Artefakten aus $(\beta 3\alpha 6)$ Konkameren.

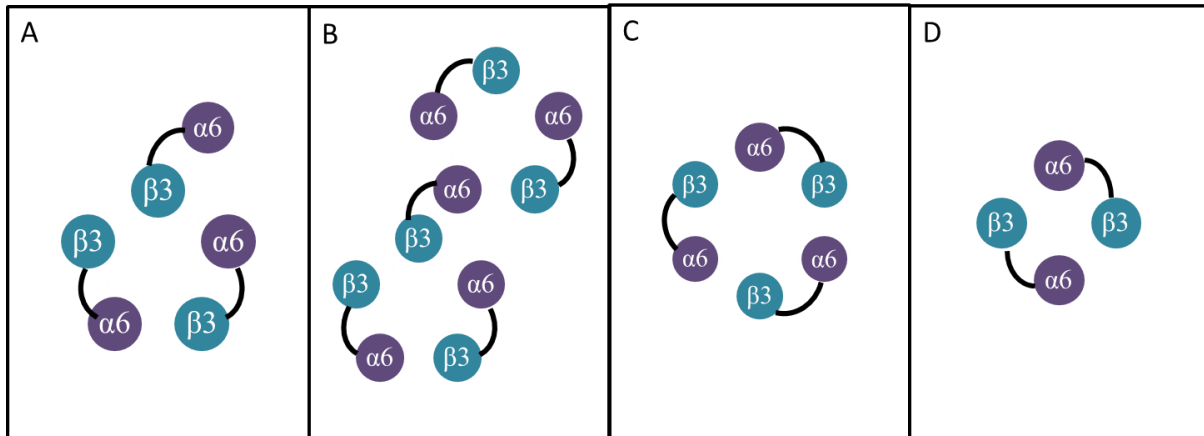


Abb. 81: Mögliche Zusammensetzung von Artefakten aus (β3α6) Konkameren. A: Pentamer mit heraushängender Untereinheit. B: Dipentamer. C: Hexamer. D: Tetramer. Das Verhältnis zwischen Linkern und Untereinheiten ist nicht maßstabsgetreu nachgestellt.

Artefakt-Bildung von verlinkten Untereinheiten des GABA_AR ist in der Literatur bereits beschrieben.²⁰⁰⁻²⁰² Eine der dort aufgeführten Regeln betrifft die transfizierte DNA-Menge. Diese sollte generell nicht höher sein als bei einzeln transfizierten Vektoren. Die Transfektion der Konkamere lag mit einer DNA-Menge von 12,5 µg pro transfizierter Platte deutlich darüber. Diese hohe Konzentration wurde etabliert, da die Expressionsstärke der Konkamere dabei am höchsten lag. Der Effekt auf die Artefakt-Bildung bei Reduktion der DNA-Menge wurde für die Konkamere (α1/6β3) und (α1/6δβ3) in der [³H]Muscimol-Bindung untersucht (Abb. 27). Eine Reduktion auf 0,5 µg pro Platte zeigte im Fall der α1-enthaltenden Konkamere keine vernünftige Bindung von [³H]Muscimol mehr und zeigte damit die mangelnde Expression der Konkamere bei einer zu niedrigen Konzentration. Bei den α6-enthaltenden Konkameren zeigte sich prozentual sogar eine Erhöhung der Artefakt-Bildung bei einzeln transfizierten Konkameren. Eine Reduktion auf 2,5 µg DNA pro Platte ließ die Artefakt-Bildung bei α1- sowie α6-enthaltenden Konkameren sinken, doch gerade das 2er Konstrukt zeigte weiterhin eine robuste [³H]Muscimol-Bindung. Für das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem in HEK293 Zellen, welches sich von dem der publizierten Ergebnisse unterscheidet, kann eine Reduktion der transfizierten DNA-Menge die Artefakt-Bildung nicht verhindern. Die Reduktion führte zudem zu einer Verringerung der Expression der konkameren Rezeptoren und wäre damit für Bindungsstudien, die auf eine hohe Expression angewiesen sind, ungeeignet.

In der Literatur ist eine geringere Artefakt-Bildung bei elektrophysiologischen Untersuchungen von β2-enthaltenden Konkameren beobachtet worden.²⁰⁰ Daher wurden einige β2-, aber auch β1-enthaltende Konkamere getestet (Abb. 28). In der [³H]Muscimol-Bindung zeigten die untersuchten β2-enthaltenden Konkamere keine Artefakt-Bildung. Die Expression der Rezeptoren war dabei jedoch so niedrig, dass eine Untersuchung in Bindungsstudien nicht möglich wäre. Ein Ersatz durch die β1-Untereinheit zeigte geringere, aber trotzdem noch vorhandene [³H]Muscimol-Bindung und

ähnlich hohe [³H]EBOB-Bindung. Der Einsatz β 1-enthaltender Konkatomere wäre auch insofern umstritten, als dass bislang nur die potentielle Existenz von nativen α 4 β 1 δ Rezeptoren beschrieben ist.²⁰⁶

Eine weitere Möglichkeit für die Artefakt-Bildung ist der Zerfall der Linkersequenzen, die die Untereinheiten der Konkatomere kovalent zusammenfügen. Dies erfolgt vermehrt bei Konkatomeren, deren N-terminal verlinkte Untereinheiten noch die Signalpeptide enthalten.²⁰⁰ Da diese im Verlauf der Translation abgespalten werden, entstehen wieder einzelne Untereinheiten. Dies ist jedoch bei den, in dieser Arbeit verwendeten Konkatomeren nicht der Fall. Eine gewöhnliche Proteolyse der Linker kann dennoch nicht ausgeschlossen werden und wurde entsprechend untersucht. Zu allen verwendeten Konkatomeren wurden Western Blots angefertigt, deren Ergebnisse auf intakte Konstrukte schließen lassen.

In Bindungsstudien wurde ebenfalls die Proteolyse der Linker untersucht. Die Konkatomere (β 3 α 1/4/6 β 3) wurden neben einer γ 2 Untereinheit mit und ohne zusätzliche α Untereinheit transfiziert (Abb. 25). Da ein Zerfall der Fusionsproteine einzelne Untereinheiten freisetzen würde, wäre es denkbar, dass Konstrukte, die ohne weitere α Untereinheit transfiziert werden, eine Benzodiazepin-Bindestelle bilden können. Das konnte nicht bestätigt werden. Keines der transfizierten Konkatomere bildete ohne eine zusätzliche α Untereinheit einen Rezeptor, an den der Benzodiazepin-Ligand [³H]RO15-4513 binden konnte. Inwiefern proteolytierte Linker α Untereinheiten freisetzen, die Benzodiazepin-Bindestellen bilden können, bleibt jedoch unklar. Eine Aminosäuresequenz, die dem N-Terminus der Untereinheit noch angeheftet ist, könnte die Ausbildung der Bindetasche mit der γ 2 Untereinheit verhindern. Dennoch spricht der durchgeführte Versuch zusammen mit den Ergebnissen der Western Blot Untersuchungen eher gegen eine Proteolyse der Linker.

5.1.2 Orientierung der Konkatomere

Neben der Fähigkeit, einzeln transfizierter Konkatomere Rezeptor-Artefakte zu bilden, wurde auch die Orientierung der Konkatomere bei der Zusammensetzung zum GABA_AR untersucht. Dies würde ebenfalls zu Artefakten führen. Abb. 82 zeigt am Beispiel von (β 3 α 6) Konkatomeren wie sich 2er Konstrukte auch im Uhrzeigersinn zusammenfügen können. Generell geht man von einer Orientierung gegen den Uhrzeigersinn aus,¹⁸³ was die natürliche Zusammensetzung einzelner Untereinheiten widerspiegeln würde. Diese setzen sich ebenfalls vom C-Terminus zum N-Terminus gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus betrachtet zusammen. Die Länge der Linker spielt hier eine bedeutende Rolle. Sind die Linker zu kurz gewählt, können sich die Untereinheiten nicht frei zusammensetzen, Bindestellen würden so eventuell verzerrt und unbrauchbar. Sind die Linker jedoch zu lang, können sich die Untereinheiten, die vom C-Terminus zum nächsten N-Terminus verlinkt sind auch im Uhrzeigersinn assemblieren. Gerade für die langen N-Termini der GABA_AR Untereinheiten, könnte man sich dieses Szenario vorstellen. Einen deutlichen Hinweis auf eine Assemblierung im Uhrzeigersinn lieferte die [³H]RO15-4513 Bindung an (α 6 β 3) γ 2 Rezeptoren, die bei

„ordnungsgemäßer“ Zusammensetzung keine Benzodiazepin-Bindestelle aufweisen sollten. $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ konnte bei den Experimenten nicht nur binden, auch die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwar nahezu identisch (Abb. 29). Die K_D -Werte von $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ lagen sowohl für $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ als auch für $(\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ und $(\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ Rezeptoren im selben Bereich. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Dosis-Wirkungs-Kurve von GABA im $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulationsversuch an $\alpha 6\beta 3\delta$, $(\alpha 6\beta 3)\delta$ und $(\beta 3\alpha 6)\delta$ Rezeptoren (Abb. 30). Wieder lagen die Kurven annähernd übereinander und die IC_{50} -Werte waren ähnlich. Dieser Test ist zwar aufgrund der allosterischen $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Modulation über die GABA-Bindung nicht so aussagekräftig wie die direkte Bindung von $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ an der Benzodiazepin-Bindestelle, dennoch würde man bei einer Assemblierung gegen den Uhrzeigersinn erwarten, dass der Rezeptor $(\alpha 6\beta 3)\delta$ nur eine GABA-Bindestelle bildet und die Modulation der $[^3\text{H}]\text{EBOB}$ -Bindung durch GABA verändert ist. Für 2er Konkatomere scheint eine Assemblierung im Uhrzeigersinn daher möglich und beeinträchtigt auch die Benzodiazepin-Bindestelle zwischen α und $\gamma 2$ Untereinheit nicht. Die Assemblierung von $(\alpha\text{-}\beta)$ Konkatomeren im und gegen den Uhrzeigersinn wurde bereits in der Literatur beschrieben.¹⁸¹

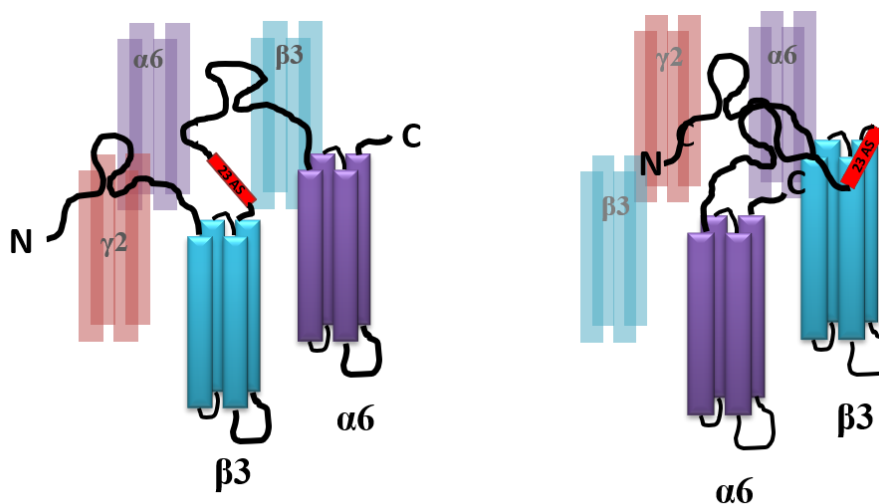


Abb. 82: Mögliche Orientierung eines $(\beta 3\alpha 6)$ Konkatomers. Assemblierung des Konkatomers $(\beta 3\alpha 6)$ gegen den Uhrzeigersinn (links) und mögliche Assemblierung des Konkatomers $(\beta 3\alpha 6)$ im Uhrzeigersinn (rechts). Die Verhältnisse zwischen Linkern, Transmembrandomänen und intra- und extrazellulären Loops sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Die Versuche zur Orientierungsrichtung wurden auf 3er Konkatomere ausgeweitet (Abb. 31). Hierbei wurde die Orientierung von $(\alpha 1\beta 3\alpha 6)$ und $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)$ Konkatomere untersucht. Diese wurden zusammen mit $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheiten transfiziert. Die bei beiden Kombinationen beobachtete $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ Bindung sollte nur bei $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren Diazepam-sensitiv sein, da nur die Assemblierung gegen den Uhrzeigersinn bei diesem Konkatomer eine $\alpha 1/\gamma 2$ Nachbarschaft erzeugen würde. Bei den Untersuchungen wurde interessanterweise herausgefunden, dass beide Konkatomere in Kombination mit $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheiten Rezeptoren bilden, die Diazepam-insensitiv sind. Zwar wurde die $[^3\text{H}]\text{RO15-4513}$ -Bindung bei $(\alpha 6\beta 3\alpha 1)\beta 3\gamma 2$ durch $10\ \mu\text{M}$ Diazepam erniedrigt, jedoch nicht vollständig verdrängt. Dass Diazepam in der Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ in der Lage ist, $[^3\text{H}]\text{RO15-}$

4513 von $\alpha 1$ -enthaltenden GABA_AR zu verdrängen wurde an Cortex Membranen gezeigt. Jedoch ist es theoretisch möglich, dass die Verlinkung der Untereinheiten die Bindestelle für Benzodiazepine auf unbekannte Weise verändert und die Sensitivität für Diazepam damit stark reduziert. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, denn Versuche von Baumann et. al aus dem Jahr 2002 zeigten an N-terminal verlinkten $\alpha 1$ Untereinheiten in Nachbarschaft zu unverlinkten $\gamma 2$ Untereinheiten Diazepam-Modulation der GABA-Antwort in elektrophysiologischen Untersuchungen.¹¹ Die Linker entsprachen dabei in Art und Länge denen in dieser Arbeit für die Konkatomere verwendeten Linkern. Allerdings könnte das unterschiedliche Expressionssystem (*Xenopus* Oozyten) einen Einfluss auf die Struktur der Fusionsproteine haben.

Einige 4er Konkatomere wurden ebenfalls auf ihre Assemblierungsrichtung untersucht (Kapitel 4.1.8 Untersuchung $\alpha 6$ - und $\alpha 1$ -enthaltender 4er und 5er Konkatomere). Bei dem Konkatomer ($\alpha 6\beta 3\alpha 6\beta 3$) ergab sich zum Beispiel zusammen mit einer $\gamma 2$ Untereinheit eine [³H]RO15-4513-Bindung. Diese war zwar niedrig, aber dennoch deutlich messbar. Es wurden auch einige 4er Konkatomere erstellt, deren Untereinheiten absichtlich in falscher Reihenfolge verlinkt waren. Dazu gehörte auch das Konstrukt ($\gamma 2\alpha 1\beta 3\alpha 6$), welches weder in Kombination mit einer $\beta 3$ Untereinheit noch mit einer $\alpha 6$ Untereinheit wesentliche [³H]Muscimol- oder [³H]RO15-4513-Bindung zeigte. Würde sich das Konstrukt im Uhrzeigersinn assemblieren, könnte man in Kombination mit einer einzelnen $\beta 3$ Untereinheit einen gewöhnlichen Rezeptor mit normaler Bindung erwarten. Würde sich das Konkatomer gegen den Uhrzeigersinn assemblieren, könnte es mit einer einzelnen $\alpha 6$ Untereinheit eine Benzodiazepin-Bindestelle bilden. Dies würde jedoch nicht der natürlichen Anordnung der Untereinheiten in einem $\gamma 2$ -enthaltenden GABA_AR entsprechen. Auch in dieser Kombination wurde keine bedeutende [³H]RO15-4513-Bindung gemessen. Dieses Konkatomer scheint sich demnach weder im Uhrzeigersinn zu assemblieren noch eine unnatürliche Anordnung von Untereinheiten zu tolerieren. Wurde das Konkatomer ($\beta 3\alpha 6\beta 3\gamma 2$) mit einer $\alpha 6$ Untereinheit transfiziert, zeigte sich dagegen eine moderate, aber deutlich messbare [³H]RO15-4513-Bindung. Eine niedrige [³H]RO15-4513-Bindung wurde allerdings auch für andere $\gamma 2$ -verlinkte Konkatomere festgestellt und schließt in diesem Fall keine Assemblierungsrichtung im Uhrzeigersinn aus. Die [³H]Muscimol-Bindung an diesem Artefakt war sogar hoch. Entsprechend vermag dieses Konkatomer entweder im Uhrzeigersinn zu assemblieren oder eine unnatürliche Abfolge der Untereinheiten im Rezeptor zu tolerieren. Auch für 4er Konkatomere kann damit keine absolute Assemblierungsrichtung festgestellt werden.

Eine Assemblierung von verlinkten Untereinheiten im Uhrzeigersinn erscheint auf den ersten Blick eher unwahrscheinlich, denn die N-Termini müssten durch die Verbindung mit dem Linker so verzerrt sein, dass die Ausbildung von Bindestellen für [³H]Muscimol oder [³H]RO15-4513 schwer vorstellbar ist. Dennoch ist dieses Phänomen bereits in der Literatur beschrieben^{181, 183} und die hier beschriebenen Ergebnisse, gerade in Bezug auf das 2er Konkatomer ($\alpha 6\beta 3$), eindeutig.

5.1.3 Konkatamere aus vier und fünf verlinkten Untereinheiten zur Bildung eines Pentamers

Gerade die starke Neigung zur Artefakt-Bildung der 2er und 3er Konkatamere führte zum Design weiterer Konkatamere, die mit vier und fünf verlinkten Untereinheiten idealerweise besser zu verwenden sein sollten (Kapitel 4.1.8 Untersuchung α - und α 1-enthaltender 4er und 5er Konkatamere). Tatsächlich gibt es auch bei den 4er Konkatameren Kandidaten, die eine hohe Artefakt-Bildung vor allem in der [^3H]Muscimol-Bindung zeigen, so z.B. (β 3 α 6 β 3 α 6). Dennoch neigen 4er Konkatamere weniger zur Bildung von Artefakten. Einige vielversprechende Kandidaten, die einzeln transfiziert keine oder sehr niedrige Artefakt-Bildung zeigten, waren trotzdem nicht brauchbar. So zeigte das Konkatamer (α 1 β 3 α 6 γ 2) auch in Kombination mit einer einzelnen β 3 Untereinheit nur sehr niedrige Bindung. Andere Konkatamere wie z.B. (δ β 3 α 6 β 3) zeigten zwar eine hohe [^3H]Muscimol-, aber keine [^3H]EBOB-Bindung. Konkatamere, die dem Schema (α 6 β 3 α 6 γ / δ) folgten, zeigten zwar hohe [^3H]EBOB-Bindung, diese konnte aber nicht moduliert werden und macht die Kandidaten damit unbrauchbar für weitere Untersuchungen im [^3H]EBOB-Modulationsassay. Inwiefern Rezeptoren, die vier verlinkte Untereinheiten beinhalten, funktionsuntüchtig sind, könnte man eventuell in elektrophysiologischen Versuchen näher untersuchen. Bei Konkatameren, deren γ 2 Untereinheit N-terminal verlinkt war, fiel eine durchweg niedrige [^3H]RO15-4513-Bindung auf.

Die geringere Bildung von Artefakten bei 4er Konkatameren erscheint logisch, wenn man die Idee der heraushängenden Untereinheiten aufgreift. So würden bei der Bildung von Artefakten aus 2er oder 3er Konkatameren Rezeptoren entstehen, bei denen eine Untereinheit heraushängt. Bei den 4er Konkatameren wären es in diesem Fall drei Untereinheiten, was vielleicht nicht mehr toleriert wird (Abb. 83).

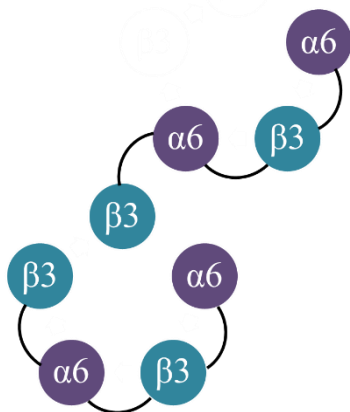


Abb. 83: Mögliche Zusammensetzung von Artefakten aus (β 3 α 6 β 3 α 6) Konkatameren. Pentamer mit drei heraushängenden Untereinheiten. Das Verhältnis zwischen Linkern und Untereinheiten ist nicht maßstabsgetreu nachgestellt.

Die Verwendung von Rezeptoren, deren gesamte fünf Untereinheiten verlinkt sind, würde den geringsten Interpretationsspielraum bieten. Allerdings zeigten beide erstellte 5er Konkatomere ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\gamma 2$) und ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6\delta$) sehr niedrige Bindung. Dies ist wahrscheinlich auf die Größe des transfizierten Vektors zurückzuführen und den damit verbundenen Transfektions- und Expressionsproblemen. Diese Konkatomere konnten daher, jedenfalls im gegebenen Expressionssystem mit HEK293 Zellen und der verwendeten Transfektionsmethode, nicht zur Untersuchung der δ -enthaltenden GABA_AR verwendet werden.

5.1.4 Einbau von angebotenen Untereinheiten

Die meisten brauchbaren Konkatomere zeigten in Bindungsversuchen Artefakte, wenn man sie einzeln transfizierte. Generell stellt sich hier die Frage, ob Artefakte auch gebildet werden, wenn man den Konkatomeren bei Transfektion geeignete Gegenstücke anbietet. In einigen [³H]EBOB-Modulationsversuchen wurde dieser Fragestellung nachgegangen (Abb. 32). Die IC₅₀-Werte der [³H]EBOB-Modulation durch GABA an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ und ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\alpha 6\gamma 2$ Rezeptoren zeigten keinen Unterschied, während der an ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ Rezeptoren etwas höher lag. Interessant jedoch war die stark verringerte maximale Inhibition der [³H]EBOB-Bindung durch GABA an ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) $\alpha 6\gamma 2$ Rezeptoren. Artefakte aus einzeln transfizierten ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) Konkatomeren zeigten keine Modulationsfähigkeit der [³H]EBOB-Bindung und die beschriebenen Ergebnisse könnten damit ein Hinweis auf einen hohen Anteil an Artefakten bei Transfektion dieses Konkatomers zusammen mit $\alpha 6$ und $\gamma 2$ Untereinheiten sein. Der Rezeptor ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ zeigte hingegen eine ebenso starke Inhibition der [³H]EBOB-Bindung durch GABA wie $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren, während die Modulation von Artefakten aus einzeln transfizierten ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) Konkatomeren eher gering war. Die hohe [³H]RO15-4513-Bindung von ($\beta 3\alpha 6$) $\gamma 2$ würde ebenfalls für einen Einbau der angebotenen $\gamma 2$ Untereinheit sprechen (Abb. 29). Auch die nahezu identische Modulation der [³H]EBOB-Bindung durch GABA an $\alpha 6\beta 3\delta$ und ($\beta 3\alpha 6$) δ Rezeptoren spricht für einen Einbau der δ Untereinheit (Abb. 30). Durch Radioliganden-Bindungsstudien kann die gestellte Frage hier nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse deuten auf ein widersprüchliches Verhalten einzelner Konkatomere hin. So scheinen ($\beta 3\alpha 6\beta 3$) Konkatomere Artefakte zu bilden, selbst wenn sie mit passenden Untereinheiten transfiziert werden, und ($\beta 3\alpha 6$) sowie ($\beta 3\alpha 6\beta 3\alpha 6$) Konkatomere scheinen die angebotene Untereinheit einzubauen.

5.1.5 Sucrosegradientenzentrifugation zur Unterscheidung von Artefakten und Pentameren

Die Methode der Dichtegradientenzentrifugation ist ein geeignetes Mittel um native Proteine aufzutrennen. Das Sedimentationsverhalten ist dabei abhängig vom Molekulargewicht, der Größe, der Form und der Hydrathülle der Proteine. Die Idee der Etablierung dieser Methode zielte darauf ab, den Aufbau konkatomerer Artefakt-Rezeptoren näher zu untersuchen und der Frage nach Artefakt-Bildung auch bei Transfektion mit geeigneten Gegenständen nachzugehen. Die Hauptpeaks der

Sucrosegradienten zeigten jedoch keine unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten zwischen $(\beta 3\alpha 6)$, $(\alpha 6\beta 3)$, $(\beta 3\alpha 6)\gamma 2$, $(\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ und $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren (Kapitel 4.2.4 Sucrosegradientenzentrifugationen verschiedenener GABA_AR). Alle Sedimentationskoeffizienten liegen bei etwa 9 S. Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen Wert für GABA_AR.¹⁸⁰ Beim Artefakt $(\alpha 6\beta 3)$ zeigte sich neben dem Hauptpeak ein kleinerer Peak im Bereich von 5 S, der bei den anderen Rezeptoren nicht detektiert wurde. Ob es sich bei diesem um die Sedimentation von Tetrameren oder von 2er Konstrukten handelt, ließ sich nicht klären. Die Abschätzung ist schwierig, da der Sedimentationskoeffizient stark von der Proteinstruktur abhängt. Bei $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $(\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ und $(\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ Rezeptoren ist neben dem Hauptpeak eine geringe Erhebung im Bereich von 12 bis 13 S zu finden, die jedoch mit etwa 5% im Vergleich zur Maximalbindung vernachlässigbar ist. Alle beschriebenen Nebenpeaks, auch der von $(\alpha 6\beta 3)$ Artefakten, sind im Vergleich zum Hauptpeak gering ausgeprägt und können nicht für die Ergebnisse der Rezeptorartefakte verantwortlich sein. Da man bezüglich des Hauptpeaks keinen Unterschied zwischen Artefakten aus 2er Konkameren und einzeln transfizierten Rezeptoren sieht, kann man auch die Frage nach dem korrekten Einbau von angebotenen Untereinheiten mit dieser Methode nicht beantworten. Dennoch lassen sich einige Schlussfolgerungen ziehen. Eine mögliche Ausbildung von Tetrameren oder Hexameren bei einzeln transfizierten 2er Konkameren wurde schon durch die Bindung des Kanalblockers [³H]EBOB als unwahrscheinlich erachtet. Die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugationen bestätigen diese Vermutung zum größten Teil. Tetramere und hexamere Rezeptoren hätten vermutlich eine ähnliche Form wie pentamere und würden entsprechend ihrer niedrigeren bzw. höheren Molekulargewichte einen niedrigeren bzw. höheren Sedimentationskoeffizienten zeigen. Bei $(\alpha 6\beta 3)$ Artefakten konnte ein Peak bei einem niedrigeren S-Wert detektiert werden, der allerdings im Vergleich zum Hauptpeak schwach ausgeprägt war und in keinem großen Ausmaß zu den Ergebnissen beitragen kann. Ebenso ist die Vorstellung eines Dipentamers sehr unwahrscheinlich, da dieses mit dem doppelten Molekulargewicht einen sehr viel höheren S-Wert aufweisen müsste. Für Dipentamere von konkameren nikotinischen Acetylcholinrezeptoren wurden Sedimentationskoeffizienten von 13 S gefunden, während Monopentamere einen Sedimentationskoeffizienten von 9 S besaßen.¹⁷⁹ Bei $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $(\alpha 6\beta 3)\gamma 2$ und $(\beta 3\alpha 6)\gamma 2$ Rezeptoren zeigte sich eine niedrige Erhebung im Bereich von 13 S. Sollte es sich dabei um ein Dipentamer handeln, wird es auch bei Konkameren nicht in größerem Ausmaß gebildet als bei einzeln transfizierten Rezeptoren. Bei einzeln transfizierten 2er Konstrukten konnten keine eindeutigen Peaks in diesem S-Bereich detektiert werden. Die verbleibende Lösung ist die Bildung eines Pentamers mit heraushängender Untereinheit. Die heraushängende Untereinheit bringt zwar zusätzliches Molekulargewicht mit sich, verändert aber auch die Form und Größe des Proteins, sodass ein höherer Widerstand bei der Zentrifugation zu erwarten ist. An nikotinischen Acetylcholinrezeptoren wurde gezeigt, dass Pentamere mit heraushängenden Untereinheiten sogar leicht niedrigere Sedimentationskoeffizienten aufweisen als die entsprechenden Pentamere.¹⁷⁹ Die Vorstellung einer Bildung von Pentameren, an denen die überschüssigen Untereinheiten

heraushängen, würde auch gut dazu passen, dass, wie oben beschrieben, 4er Konkatomere im Vergleich zu 2er und 3er Konkatomeren eine geringere Artefakt-Bildung zeigen. Ob bei Transfektion von Konkatomeren mit passenden Gegenstücken die Bildung eines normalen Pentamers bevorzugt wird oder sich trotzdem in größerem Ausmaß Artefakte bilden, konnte in diesem Experiment nicht ermittelt werden.

Die Verwendung von Konkatomeren zur Strukturaufklärung von GABA_AR wurde gerade in die Arbeitsgruppe um Sigel genutzt.^{13-14, 186} Die Verlinkung von Untereinheiten wurde neben GABA_AR auch für andere Cys-Loop Rezeptoren als elegantes Werkzeug zur Strukturanalyse verwendet, wobei Artefakt-Bildung bereits früh als Problem identifiziert wurde.¹⁸¹ Durch Einhaltung einiger Regeln gelang es der Arbeitsgruppe um Sigel jedoch dieses Phänomen umgehen zu können.²⁰⁰ Konkatomere sollten daher auch in der hier vorliegenden Arbeit zur Strukturaufklärung δ -enthaltender GABA_AR verwendet werden. Dabei wurde schnell klar, dass die Artefakt-Bildung unter den gegebenen Bedingungen (gewählte Untereinheiten, Expressionssystem, transfizierte DNA-Menge) nicht einfach umgangen werden konnte. Daher wurde der Fokus bei der Erstellung dieser Arbeit auf die detaillierte Untersuchung der Artefakt-Strukturen und deren Vermeidung gelegt, denn ohne das Wissen, welches Konkatomer unter welchen Umständen Artefakte bildet, kann kein Vergleich mit nativen δ -enthaltenden Rezeptoren erfolgen. Genauer untersucht wurde daher die Möglichkeit der Degradation der Linkersequenzen, die Assemblierungsrichtung, die Fähigkeit einzelner Konkatomere zur Rezeptorbildung und der Einbau angebotener Untereinheiten. Degradierete Linker wurden anhand der Western Blot Ergebnisse ausgeschlossen. Freigesetzte Untereinheiten sind bei Konkatomeren, deren Untereinheiten noch die Signalpeptide besitzen denkbar,²⁰⁰ was bei den in dieser Arbeit eingesetzten Konstrukten aber nicht der Fall ist. Die Möglichkeit im Uhrzeigersinn zu assemblieren wurde in der Literatur für (α - β) Konkatomere bereits beschrieben¹⁸¹ und in dieser Arbeit detailliert auch für 3er Konkatomere untersucht. Die Ergebnisse deuten dabei auch bei diesen auf eine Assemblierung im Uhrzeigersinn hin. Das würde bedeuten, dass Konkatomere in ihrer Ausrichtung wesentlich flexibler sind als angenommen, was die Interpretation von Ergebnissen, die mit 2er und 3er Konkatomeren erzeugt wurden, enorm erschwert. Sigel et al. nutzen in ihren Untersuchungen der Zusammensetzung δ -enthaltender GABA_AR vor allem 2er und 3er Konkatomere.^{13-14, 186} Einige 5er Konstrukte wurden ebenfalls getestet.¹⁸⁶ 4er Konkatomere lassen sich dagegen in den referenzierten Publikationen nicht finden. In dieser Arbeit lieferten sie vielversprechende Ergebnisse. Unter den gegebenen Bedingungen neigten sie weder zur Assemblierung im Uhrzeigersinn, noch zu extensiver Artefakt-Bildung bei alleiniger Transfektion. Eine detaillierte Untersuchung des Aufbaus von Artefakten aus Konkatomeren wurde bislang für GABA_AR nicht unternommen. Für Acetylcholin-Rezeptoren zeigten sich in Sedimentationsanalysen Unterschiede für Artefakte und pentamere Rezeptoren, die auf deren Aufbau schließen lassen.¹⁷⁹ Dabei wurde auch gezeigt, dass angebotene Untereinheiten in den untersuchten Fällen eingebaut wurden und Artefakte nur infolge von absichtlich falscher Transfektion auftraten. Für GABA_AR konnte dies nicht gezeigt werden, da kein Unterschied der Sedimentationskoeffizienten

verschiedener Rezeptoren erkennbar war. Dennoch lässt das Ergebnis mit großer Wahrscheinlichkeit bei Transfektion eines einzelnen 2er Konstrukts auf ein Pentamer mit heraushängender Untereinheit schließen. Da die genaue Struktur der GABA_AR Konkater-Artefakte bislang noch nicht geklärt wurde, könnte dieses Ergebnis einen wertvollen Hinweis liefern.

5.2 DS-Derivate

5.2.1 Structure-Activity Relationship

Die detaillierte Studie zum Structure-Activity Relationship von DS1 und DS2, die mit den Leitstrukturen und 25 Derivaten durchgeführt wurde, zeigte, dass das Imidazopyridingerüst, das als Grundgerüst beibehalten wurde, zumindest einen Brom-Substituenten am Pyridin-Teil und eine Thiophen- sowie eine Benzamid-Gruppe am Imidazol-Teil aufweisen muss, um die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha\beta\delta$ GABA_AR zu modulieren. Der Chlor-Substituent, der sich bei den Leitstrukturen DS1 und DS2 in der *para*-Position des Benzamids befindet, kann gegen spezifische Gruppen ausgetauscht werden. Obwohl flexibler als die drei anderen Bereiche, ist diese Position dennoch wichtig für die [³H]EBOB-Modulation und zumindest teilweise verantwortlich für die beobachtete δ -Selektivität einiger Liganden. So wurde an dieser Stelle zwar ein Fluor-Atom toleriert, aber weder eine Methoxy- noch eine Fluorethoxy-Gruppe. Wurde die Kohlenstoffkette dagegen verlängert, zeigte sich dies vorteilhaft für die Aktivität auf die [³H]EBOB-Bindung und/oder Selektivität an δ -enthaltenden GABA_AR.

Die Anzahl der Brom-Substituenten am Pyridin-Teil spielt wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Potenz, mit der die [³H]EBOB-Bindung an GABA_AR moduliert wird. So zeigt sich bei Substanzen, die sich nur in der Anzahl der Brom-Substituenten unterscheiden, z.B. **33**, **29** und **31**, die höchste Potenz beim doppelt bromierten Derivat.

5.2.2 Die Leitstrukturen DS1 und DS2

Die Ergebnisse der [³H]EBOB-Modulation mit den beiden Leitstrukturen führten teilweise zu Widersprüchen mit publizierten Daten.^{174, 203} Da diese Daten jedoch vorwiegend an anderen Rezeptorsubtypen in der Elektrophysiologie erhoben wurden, ist ein direkter Vergleich zu den aus der [³H]EBOB-Modulation stammenden Daten nicht ohne Vorbehalte möglich. DS1 zeigte in An- und Abwesenheit von GABA im [³H]EBOB-Modulationsversuch keine Selektivität für δ -enthaltende GABA_AR (Tab. 30, Tab. 31), sondern nur eine Präferenz hinsichtlich der Potenz, die in den meisten Fällen signifikant war. Unterschiede in der Effizienz der [³H]EBOB-Modulation an verschiedenen GABA_AR konnte nicht gemessen werden. Eine Publikation zu den beiden Substanzen aus dem Jahr 2016 von Ahring stützt die in der [³H]EBOB-Modulation ermittelten Ergebnisse.¹⁷⁶ In der erwähnten Studie wurden humane rekombinante $\alpha\beta\gamma\delta$ GABA_AR elektrophysiologisch untersucht und keine Selektivität für δ -enthaltende im Vergleich zu $\gamma\delta$ -enthaltenden Rezeptoren gefunden.¹⁷⁶ Elektrophysiologische Experimente, die im Molekularbiologischen Labor von [REDACTED]

durchgeführt wurden, bestätigen ebenfalls die meisten in der [³H]EBOB-Bindungsmodulation erhaltenen Ergebnisse. Eine genauere Beschreibung der Daten kann der gemeinsamen Publikation entnommen werden.¹⁹⁹ Übereinstimmend mit allen publizierten Daten zu den Substanzen ist jedoch die Vermutung, dass DS2 nur GABA-modulatorische Eigenschaften besitzt und deshalb keine [³H]EBOB-Modulation in Abwesenheit von GABA zeigt und dass DS1 GABA-mimetische Eigenschaften besitzt und entsprechend die [³H]EBOB-Bindung auch in Abwesenheit von GABA modulieren kann. Auch die publizierte GABA-Unabhängigkeit der Potenz von DS1²⁰³ konnte in [³H]EBOB-Bindungsstudien reproduziert werden.

5.2.3 Effekt von GABA auf die [³H]EBOB-Modulation der Liganden DS1, **29** und **39**

Um sich physiologischen Bedingungen anzunähern wurden drei Liganden (DS1, **29**, **39**) auch in Anwesenheit von GABA an den Rezeptoren $\alpha\beta\beta_3$, $\alpha\beta\beta_3\gamma_2$ und $\alpha\beta\beta_3\delta$ getestet. Wie bereits in der Literatur anhand von elektrophysiologischen Experimenten für $\alpha\beta\beta_3\delta$ Rezeptoren beschrieben,²⁰³ zeigte DS1 auch in der [³H]EBOB-Modulation eine GABA-unabhängige Potenz an allen getesteten $\alpha\beta$ - und β_3 -enthaltenden Rezeptoren (Tab. 31). Die Derivate **29** und **39** zeigten an $\alpha\beta\beta_3\delta$ Rezeptoren ebenfalls eine GABA-unabhängige Potenz und Effizienz. Allerdings verloren beide Derivate in Anwesenheit von GABA ihre Selektivität für $\alpha\beta\beta_3\delta$ Rezeptoren und modulierten die [³H]EBOB-Bindung auch an $\alpha\beta\beta_3$ und $\alpha\beta\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren.

Der Verlust der Selektivität in Anwesenheit von GABA kann auf verschiedene Weise erklärt werden. Eine Möglichkeit besteht in der Aktivierung der Rezeptoren durch GABA und eine dadurch verursachte Verschiebung des IC₅₀-Wertes für die Derivate. Dies würde dann einen Effekt offenbaren, der in Abwesenheit von GABA verborgen bliebe. Dieses Szenario ist durchaus denkbar für Derivate wie **29**, die eine sehr niedrige Affinität am GABA_AR besitzen und eine Verschiebung der IC₅₀-Werte zwischen $\alpha\beta\beta_3\delta$ und $\alpha\beta\beta_3$ bzw. $\alpha\beta\beta_3\gamma_2$ zu Konzentrationen führen würde, die jenseits der Löslichkeit für diese Substanz liegen würden. Alternativ oder zusätzlich könnte GABA die Rezeptorkonformation an $\alpha\beta\beta_3$ und $\alpha\beta\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren ändern und dadurch den Derivaten Zugang zur nun erreichbaren Bindestelle ermöglichen. Im Fall von Derivat **39** wurde jedoch gezeigt, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in Abwesenheit von GABA an $\alpha\beta\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren bindet, denn die Kombination aus DS1 und Derivat **39** zeigte eine verringerte Effizienz von DS1 in der [³H]EBOB-Modulation (Abb. 73). Dies deutet neben der Bindung von **39** an $\alpha\beta\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren zudem auf eine gemeinsame Bindestelle von DS1 und **39** auf diesem Rezeptor hin. Die dritte Möglichkeit besteht damit in einer Bindung der Derivate an $\alpha\beta\beta_3$ und $\alpha\beta\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren in Abwesenheit von GABA ohne den Rezeptor jedoch direkt zu aktivieren und damit die [³H]EBOB-Bindung zu modulieren. In diesem Fall wären die Derivate nur positive allosterische Modulatoren an nicht δ -enthaltenden GABA_AR.

5.2.4 Bindestelle und Bindeeigenschaften der Liganden

Der Effekt der Liganden auf die [³H]EBOB-Bindung ist klar von der α Untereinheit abhängig. So modulierte die Leitstruktur DS1 nur Rezeptoren, die eine $\alpha 4$ oder $\alpha 6$ Untereinheit enthielten, während kein Effekt an $\alpha 1$ -enthaltende Rezeptoren beobachtet wurde. Rezeptoren, die die $\alpha 6$ Untereinheit enthalten, werden dabei, die Potenz der [³H]EBOB-Modulation betreffend, von DS1 scheinbar präferiert (Tab. 30), obwohl dieser Effekt nur für $\alpha 4/6\beta 3\gamma 2$ signifikant ist. Die Wahl der α Untereinheit ist für die [³H]EBOB-Modulation dieser Substanz damit sogar bedeutender als die Anwesenheit einer δ Untereinheit. Die Derivate **29** und **39** modulierten ausschließlich die [³H]EBOB-Bindung von $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren, was ebenfalls die bedeutende Rolle der α Untereinheit auf die Bindung der Substanzen unterstreicht.

Die Wahl der β Untereinheit scheint dagegen eine weniger wichtige Rolle zu spielen, obwohl zumindest für Derivat **39** δ -Selektivität nur in Kombination mit der $\beta 3$ Untereinheit gegeben ist (Tab. 30, Abb. 69). Derivat **39** zeigte auch eine 3-fach höhere Potenz in der [³H]EBOB-Modulation an $\alpha 6\beta 2\delta$ im Vergleich zu $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren. DS1 zeigte einen ähnlichen Effekt mit einer 2-fach höheren Potenz für $\alpha 6\beta 2\delta$ Rezeptoren, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen $\alpha 6\beta 2/3$ oder $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ Rezeptoren. Betrachtet man die Effizienz, mit der [³H]EBOB-Bindung moduliert wurde, ist kein Unterschied zwischen $\beta 2$ - und $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren erkennbar. Derivat **29** zeigte keine Unterschiede in der [³H]EBOB-Modulation zwischen $\alpha 6\beta 2/3\delta$ GABA_AR, weder in der Potenz noch in der Effizienz. Die geschilderten Ergebnisse lassen damit auf einen leichten Einfluss der β Untereinheit auf die modulatorische Wirkung einiger Derivate schließen.

Die Substanzen DS1, **28**, **35** und **31** modulierten die [³H]EBOB-Bindung auch an nicht δ -enthaltenden Rezeptoren, obwohl sie stets eine Präferenz für δ -enthaltende Rezeptoren zeigten (Tab. 30). Für Derivat **31** war diese Präferenz allerdings nicht signifikant. Die Verbindungen **29**, **38**, **39** und **41** zeigten δ -Selektivität in Abwesenheit von GABA für $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren und im Fall von **29** auch für $\alpha 6\beta 2\delta$ Rezeptoren (Tab. 30, Abb. 69). Wie bereits zuvor beschrieben, besteht die Möglichkeit, dass es eine Bindestelle auf nicht δ -enthaltenden Rezeptoren gibt, an der einige Derivate zwar binden, aber keinen direkten, sondern nur einen GABA-modulatorischen Effekt besitzen, während andere Derivate einen GABA-mimetischen Effekt entfalten können. Die Bindung der GABA-modulatorischen Derivate würde dann erst in Anwesenheit von GABA zutage treten. Ein ähnlicher Effekt ist bereits für die beiden Leitstrukturen an δ -enthaltenden GABA_AR beschrieben.^{199, 203}

Betrachtet man die hohe Effizienz ($84 \pm 8\%$) und Potenz ($0,31 \pm 0,041 \mu\text{M}$) von DS1 an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren stellt sich die Frage, ob Potenz und Effizienz der Derivate korrelieren. Vergleicht man jedoch die Effekte einiger Derivate auf die [³H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren kann diese Vermutung verworfen werden. So zeigt Derivat **35** eine hohe Effizienz ($87 \pm 9\%$), aber nur eine moderate Potenz ($1,20 \pm 0,24 \mu\text{M}$). Stärker ist dies noch bei Verbindung **28** zu beobachten, die neben hoher Effizienz ($84 \pm 14\%$) eine sehr niedrige Potenz zeigt ($10,1 \pm 2,8 \mu\text{M}$). Im Gegensatz dazu zeigt

Derivat **39** eine hohe Potenz ($0,76 \pm 0,08 \mu\text{M}$) und nur eine mittelmäßige Effizienz ($53 \pm 12\%$). Die Potenz und Effizienz der Liganden auf die [^3H]EBOB-Modulation an $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ scheint unabhängig vom strukturellen Aufbau der Moleküle zu sein.

Um der Frage auf den Grund zu gehen, ob nicht-selektive Liganden eventuell eine andere oder weitere Bindestelle belegen als selektive, wurden Verdrängungsversuche durchgeführt, in denen die [^3H]EBOB-Modulation mit steigenden Konzentrationen von DS1 in Anwesenheit einer hohen Konzentration eines selektiven Derivates durchgeführt wurde. Die Ergebnisse mit Derivat **29** lassen hierbei auf eine kompetitive Verdrängung des selektiven Liganden schließen (Abb. 71). **29** moduliert die [^3H]EBOB-Bindung an $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren mit geringer Potenz und bei der zusätzlichen Anwesenheit von $3,33 \mu\text{M}$ DS1 konnte bereits kein signifikanter Unterschied mehr zur Modulation durch diese Konzentration in Abwesenheit von **29** festgestellt werden. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ DS1 war dagegen die Modulation der [^3H]EBOB-Bindung in Kombination mit **29** deutlich geringer als mit DS1 alleine. Es handelt sich daher vermutlich um eine kompetitive Verdrängung des weniger affinen Liganden (**29**) durch den höher affinen (DS1). Der Versuch ist in Kapitel 4.3.12.1 Verdrängung der Derivate **29** und **39** durch DS1 an $\alpha 6\beta 3\delta$ $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ näher beschrieben. Eine gänzlich unterschiedliche Bindestelle beider Liganden ist in Anbetracht dieses Ergebnisses eher unwahrscheinlich, da man in diesem Fall einen synergistischen Effekt erwarten würde. Die Frage, ob eine weitere Bindestelle durch den nicht-selektiven Liganden DS1 belegt wird, ist damit aber nicht beantwortet. Das Derivat **29** wurde durch den höher potenten Liganden **39** ersetzt, da Effekte an einer weiteren Bindestelle durch DS1 hier eher auffallen würden. Bei diesem Versuch wurde interessanterweise festgestellt, dass sich Derivat **39** auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen von DS1 nicht verdrängen lässt und die [^3H]EBOB-Bindung nicht über den Punkt der Inhibition bei alleiniger Gabe von **39** hinweg modulieren lässt. In nachfolgenden Versuchen wurde festgestellt, dass sich das Derivat auch nach mehrmaligem Waschen der Membranen nicht entfernen ließ und somit anscheinend irreversibel an die Bindestelle bindet (Abb. 72, Tab. 32). Die Möglichkeit, dass DS1 an weitere Bindestellen bindet, wird mit diesen Ergebnissen auch unwahrscheinlich. Da sich das Derivat **29** verdrängen ließ und somit nicht irreversibel bindet, scheint die Fluorierung an der Butoxy-Gruppe des Benzamids von Derivat **39** für diesen Effekt verantwortlich zu sein. An $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren wurde die Kombination aus $10 \mu\text{M}$ **39** und steigenden Konzentrationen DS1 ebenfalls getestet und obwohl **39** alleine auch in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ keine [^3H]EBOB-Modulation an diesem Rezeptortyp zeigte, war die Modulationsfähigkeit von DS1 in Anwesenheit von **39** reduziert. Dies lässt, wie bereits vorher schon diskutiert, auf eine Bindung auch an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren schließen, die jedoch an dieser Bindestelle nicht irreversibel ist.

Es wurde gezeigt, dass die Leitstruktur DS1 sowie aktive Derivate eine Präferenz oder sogar Selektivität für die $\alpha 6$ Untereinheit besitzen, während die [^3H]EBOB-Bindung an $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren von keiner der Substanzen moduliert wurde. Um die Bindestelle auf der $\alpha 6$ Untereinheit

besser eingrenzen zu können wurde DS1 an verschiedenen chimären $\alpha 1/\alpha 6$ Untereinheiten getestet. Da DS1 neben hoher Potenz auch eine hohe Effizienz an $\alpha 6$ -enthaltenden Rezeptoren aufweist, sind die Effekte auf die [^3H]EBOB-Modulation chimärer Rezeptoren mit diesem Liganden am deutlichsten ausgeprägt. Die Ergebnisse lassen auf eine Bindung am Anfang des N-Terminus der $\alpha 6$ Untereinheit schließen. Die [^3H]EBOB-Bindung der $\alpha 6$ -MluI- $\alpha 1$ Chimäre, die bis zur Aminosäureposition 158 einer $\alpha 6$ Untereinheit entspricht, was etwa drei Viertel des N-Terminus sind, zeigte in Kombination mit der $\beta 3$ und $\gamma 2$ Untereinheit eine Modulation durch DS1. Dagegen wurde die [^3H]EBOB-Bindung am Rezeptor, der die komplementäre Chimäre $\alpha 1$ -MluI- $\alpha 6$ enthielt, nicht mehr durch DS1 reduziert (Abb. 74). Drei weitere Chimären, die den N-Terminus weiter N-terminal teilen, zeigten keine eindeutigen Ergebnisse mehr. Die Chimäre, die bis zur Aminosäureposition 93 der $\alpha 6$ Untereinheit entspricht, zeigte nur eine sehr geringe [^3H]EBOB-Modulation, die komplementäre Chimäre wurde nicht moduliert (Abb. 74). Chimären, die den $\alpha 6$ N-Terminus an den Positionen 56 ($\alpha 6\text{VSDVEME}\alpha 1$) und 71 ($\alpha 6\text{QTWTDER}\alpha 1$) teilen, zeigten in [^3H]EBOB-Bindungsversuchen mit DS1 eine Modulation. Diese wurde jedoch auch durch die komplementären Chimären mit einer $\alpha 1$ Sequenz im vorderen N-terminalen Bereich hervorgerufen (Abb. 74). Damit sind an der Bildung der Bindetasche für DS1 vermutlich mehrere Bereiche im beginnenden N-Terminus der $\alpha 6$ Untereinheit beteiligt. Die potente [^3H]EBOB-Modulation des Rezeptors $\alpha 6\text{VSDVEME}\alpha 1\beta 3\gamma 2$, dessen Chimäre nur noch bis zur Aminosäureposition 56 einer $\alpha 6$ Untereinheit entspricht, beweist jedoch, dass dieser vordere N-terminale Bereich enorm wichtig für die Bindung der Substanz ist. Versuche mit Derivat **39** an chimären $\gamma 2/\delta$ Untereinheiten in Kombination mit $\alpha 6$ und $\beta 3$ zeigten auch hier eine wahrscheinliche Bindung in der vorderen Hälfte des N-Terminus der δ Untereinheit (Abb. 80).

Betrachtet man die Ergebnisse zur Untersuchung der Bindestelle kann man zusammenfassen, dass die $\alpha 6$ Untereinheit offensichtlich eine entscheidendere Rolle spielt als die δ Untereinheit und einige Derivate (**29**, **39**) sogar selektiv für die $\alpha 6$ Untereinheit sind, während andere (DS1) zusätzlich noch die strukturell sehr ähnliche $\alpha 4$ Untereinheit modulieren. Die δ -selektiven Derivate verlieren ihre Selektivität in Anwesenheit von GABA und im Fall von **39** wurde auch eine Bindung in Abwesenheit von GABA an $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ Rezeptoren bewiesen. Ebenfalls mit Derivat **39** wurde gezeigt, dass die Bindung neben der $\alpha 6$ Untereinheit auch vom N-terminalen Bereich der δ Untereinheit abhängt. Eine Bindestelle zwischen der $\alpha 6$ und der δ Untereinheit, die von den beiden N-Termini gebildet wird, kann man sich daher gut vorstellen. Die Bindung der Substanzen an nicht δ -enthaltenden Rezeptoren lässt sich vielleicht auf eine Bindung nur an der α Untereinheit oder eine Ausbildung der Bindetasche durch benachbarte $\beta 3$ oder $\gamma 2$ Untereinheiten zurückführen. Die Bindestelle in Abwesenheit der δ Untereinheit scheint, zumindest für das δ -selektive Derivat **39**, eine GABA-modulatorische Bindestelle zu sein, die nicht zu direkter Öffnung des Kanals und damit zur [^3H]EBOB-Modulation führt.

5.2.5 [³H]EBOB-Modulation an nativen GABA_AR

Die Assemblierung von δ -enthaltenden GABA_AR in den Granulazellen des Cerebellums ist recht komplex und es können Variationen auftreten, die sich schwer in rekombinanten Systemen reproduzieren lassen, wie zum Beispiel Rezeptoren, die $\alpha 1$ und $\alpha 6$ Untereinheiten in einem Pentamer vereinen. Der Vergleich von IC₅₀- und maximalen Inhibitionswerten aus den Modulationsversuchen mit [³H]EBOB an nativen und rekombinanten GABA_AR mit verschiedenen Derivate ist also mit Vorsicht zu sehen. Etwa 30% der gesamten GABA_AR des Cerebellums enthalten die δ Untereinheit.^{10, 205} 97% der δ -enthaltenden Rezeptoren ko-assemblieren mit der $\alpha 6$ Untereinheit,^{10, 205} aber nur 50% davon bilden reine $\alpha 6\beta\delta$ Rezeptoren, während die andere Hälfte zusätzlich auch eine $\alpha 1$ Untereinheit enthält.²⁰⁷ Circa 66% der auftretenden β Untereinheiten des Cerebellums sind $\beta 2$ Untereinheiten,²⁰⁷ was eine Kombination mit diesen wahrscheinlich macht. Es gibt aber auch Publikationen, die auf mehr als einen β Subtyp pro Rezeptorpentamer hinweisen.²⁰⁷ $\alpha\beta$ Rezeptoren sind für das wildtypische Cerebellum nicht beschrieben, formen sich aber wahrscheinlich im $\delta^{-/-}$ Cerebellum in einem Ausmaß von etwa 23% der gesamten GABA_AR Konzentration.^{10, 205}

Die Ergebnisse aus den [³H]EBOB-Experimenten mit den Substanzen DS1, **29** und **39** an Membranen des Cerebellums von $\delta^{-/-}$ und wildtypischen Mäusen können trotz der vielen Ungereimtheiten des Rezeptoraufbaus im nativen Cerebellum recht gut mit den Modulationswerten an rekombinanten Rezeptoren verglichen werden. So zeigte DS1 keine gravierenden Unterschiede in Potenz oder Effizienz der Modulation der [³H]EBOB-Bindung zwischen wildtypischem und $\delta^{-/-}$ Cerebellum (Abb. 70), was abermals die fehlende Selektivität dieser Substanz beweist. Derivat **29** hingegen konnte nur die [³H]EBOB-Bindung an wildtypischen Membranen modulieren. Während jedoch die rekombinanten $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren mit einer maximalen Inhibition von etwa 50% moduliert wurden, konnte im wildtypischen Cerebellum nur eine maximale Inhibition von $27 \pm 2\%$ erreicht werden (Abb. 70, Tab. 30). Vermutlich ist das auf die limitierte Anwesenheit von δ -enthaltenden Rezeptoren im Cerebellum zurückzuführen. Mit einem nicht signifikanten Effekt unterschied sich auch die Potenz des Derivates an wildtypischen Membranen des Cerebellums von denen an rekombinanten $\alpha 6\beta 2/3\delta$ Rezeptoren.

Das Derivat **39** zeigte neben einer Modulation der [³H]EBOB-Bindung an wildtypischen Membranen auch eine an $\delta^{-/-}$ Cerebella (Abb. 70). Die damit beobachtete [³H]EBOB-Modulation an nicht δ -enthaltenden GABA_AR könnte auf die beschriebenen artifiziellen $\alpha 6\beta 2/3$ Rezeptoren zurückzuführen sein. An rekombinanten $\alpha 6\beta 2$ GABA_AR zeigte **39** ebenfalls eine Modulation der [³H]EBOB-Bindung (Tab. 30). Da diese Rezeptoren im wildtypischen Gehirn wahrscheinlich nicht vorkommen, kann man Derivat **39** dennoch als δ -selektiv in natürlicher Umgebung beschreiben. Die Modulation der [³H]EBOB-Bindung am wildtypischen Cerebellum erfolgte mit einer Effizienz von $33 \pm 2\%$, was ebenso wie bei Derivat **29** niedriger ist als bei den rekombinanten Rezeptoren und sich wieder durch

den limitierten Gehalt an δ -enthaltenden Rezeptoren im Cerebellum erklären lassen könnte. Die Potenz der [^3H]EBOB-Modulation stimmt dagegen gut mit der an rekombinanten Rezeptoren überein.

Die in der Literatur beschriebenen Leitstrukturen DS1 und DS2 wurden ursprünglich als selektive Liganden für δ -enthaltende GABA_AR vorgestellt.^{174, 203} 2016 stellten Ahring et al in elektrophysiologischen Untersuchungen diese Selektivität in Frage.¹⁷⁶ In der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturanalyse der Leitsubstanzen konnte ebenfalls keine Selektivität von DS1 festgestellt werden. Dies wurde hier in der [^3H]EBOB-Bindungsmodulation an $\alpha 4/6\beta 3\delta$ Rezeptoren jedoch zum ersten Mal gezeigt. Vier Derivate aus der Strukturanalyse zeigten dagegen in Abwesenheit von GABA Selektivität für $\alpha 6\beta 3\delta$ Rezeptoren. Gerade in Hinblick auf die *in vitro* Strukturaufklärung dieser Rezeptoren können die entwickelten Liganden damit ein wertvolles neues Hilfsmittel darstellen. Die fehlende Modulation an $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren wurde dazu genutzt, mithilfe von $\alpha 1/6$ Chimären die Bindestelle von DS1 einzugrenzen, die sich vermutlich im vorderen Teil der des N-Terminus der $\alpha 6$ Untereinheit befindet. Diese Versuche wurden in der Form noch nicht durchgeführt und führen zur erstmaligen Eingrenzung der Bindestelle auf der α Untereinheit. Ahring et al stellten in ihrer Veröffentlichung 2016 verschiedene Chimären zwischen δ und $\gamma 2$ Untereinheit vor und zeigten eine Präferenz der Substanz DS2 für Rezeptoren, deren Chimäre die extrazellulären Bereiche, sowie die Transmembrandomäne der δ Untereinheit enthielten.¹⁷⁶ Dies steht in Einklang mit Ergebnissen, die in dieser Arbeit mit $\delta/\gamma 2$ Chimären erzielt wurden. Diese konnten die wahrscheinliche Bindestelle bzw. einen bedeutsamen Teil der Bindestelle auf die vordere Hälfte des δ N-Terminus eingrenzen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Konkatomere

Der detaillierte Aufbau von δ -enthaltenden GABA_AR ist noch nicht bekannt. Die Untersuchung von Nachbarschaftsbeziehungen in diesen Rezeptoren wird durch den Mangel an selektiven Liganden erschwert. Eine Möglichkeit die Abfolge der Untereinheiten von rekombinanten Rezeptoren zu untersuchen ist die Verwendung von verlinkten Untereinheiten, sogenannten Konkatomeren. Die Konkatomere zeigen im Idealfall keine Artefakt-Bildung und bilden Rezeptoren, die sich ohne Einschränkungen mit gewöhnlichen rekombinanten Rezeptoren oder auch nativen Rezeptoren vergleichen lassen. Im Falle der durchgeführten Radioliganden-Bindungsexperimente sollte ein solcher Vergleich durch die [³H]EBOB-Modulation mit verschiedenen Liganden möglich sein.

Die zunächst eingesetzten 2er und 3er Konkatomere zeigten alle eine hohe Artefakt-Bildung. Gerade die Konkatomere waren betroffen, die eine hohe Bindung in Kombination mit einem passenden Gegenstück zeigten und sie ließen sich daher nicht bedenkenlos einsetzen um Rezeptoren miteinander vergleichen zu können. Auch die Orientierung von 2er und 3er Konkatomeren konnte nicht abschließend geklärt werden. Eine gezwungene Assemblierungsfolge gegen den Uhrzeigersinn vom synaptischen Spalt aus gesehen konnte bei dem Konkatomer ($\alpha 6\beta 3$) definitiv widerlegt werden. Aber auch 3er Konkatomere wie ($\alpha 6\beta 3\alpha 1$) zeigten widersprüchliche Ergebnisse.

Um zu den Themen Assemblierungsrichtung und Artefakt-Bildung mehr Sicherheit zu erhalten, wurde sich auf die erstellten 4er Konkatomere konzentriert. Sogar bei diesen zeigten einige Artefakt-Bildung und einen fragwürdigen Aufbau, scheinen aber in beiden Bereichen weniger anfällig zu sein als kürzere Konkatomere. 4er Konkatomere, die keine Artefakt-Bildung zeigen, würden sich dementsprechend für Vergleiche mit anderen Rezeptoren eignen. Mit der Methode der [³H]EBOB-Modulation durch verschiedene Liganden konnte dies jedoch nicht durchgeführt werden, da die entsprechenden Konkatomere entweder keine [³H]EBOB-Bindung oder keine Modulation zeigten. Dennoch könnte man diese Konkatomere mit anderen Messmethoden testen und wertvolle Ergebnisse zum Aufbau der δ -enthaltenden GABA_AR erhalten. 5er Konkatomere, die ebenfalls hergestellt wurden, zeigten nur sehr niedrige Bindungswerte.

Das Abspalten von Untereinheiten aus den verlinkten Konkatomeren wurde durch Western Blot Analyse und Radioliganden-Bindungsstudien ausgeschlossen und kann daher nicht als Ursache der Artefakt-Bildung angesehen werden.

Ob Konkatomere, die ihnen bei Transfektion angebotenen Untereinheiten mit in den Rezeptor einbauen oder bevorzugt Artefakte bilden bleibt ungewiss. [³H]EBOB-Modulationsversuche mit verschiedenen Konkatomeren zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Die bevorzugte Bildung von Artefakten ist damit vielleicht auch vom einzelnen Konkatomer abhängig. Die

Dichtegradientenzentrifugation, die Aufschluss geben sollte, lieferte nicht die erhofften Antworten. So konnte kein signifikanter Unterschied der Sedimentationskoeffizienten von $(\alpha\beta\beta)$, $(\alpha\beta\beta)\gamma_2$, $(\beta\beta\alpha)$, $(\beta\beta\alpha)\gamma_2$ und $\alpha\beta\beta\gamma_2$ Rezeptoren gemessen werden. Durch die gleichen Sedimentationskoeffizienten pentamerer und artifizierender Rezeptoren kann ein Pentamer mit heraushängender Untereinheit als Struktur der Artefakte aus 2er Konkameren angenommen werden.

6.2 DS-Derivate

Die Leitstruktur DS1 wurde ursprünglich als δ -selektiver GABA_AR-Modulator publiziert.²⁰³ In den durchgeführten [³H]EBOB-Bindungsstudien konnte jedoch keine Selektivität des Liganden bestätigt werden. Dennoch zeigte es eine signifikante Präferenz für δ -enthaltende GABA_AR. 25 Derivate der Leitstrukturen DS1 und DS2 erlaubten eine ausgedehnte Studie zum Structure-Activity Relationship.

Vier der synthetisierten Derivate zeigten dabei tatsächlich δ -Selektivität an α_6 - und β_3 -enthaltenden Rezeptoren und konnten die [³H]EBOB-Bindung direkt modulieren. Die Verbindungen besitzen vergleichbare Alkyl-Gruppen in der *para*-Position der Benzamid-Gruppe, was zugleich auch der größte Unterschied zu DS1 ist, das an dieser Stelle einen Chlor-Substituenten trägt. Zwei der Derivate (**29**, **39**) wurden aufgrund ihrer vielversprechenden Effekte auf die [³H]EBOB-Bindung detaillierter untersucht. Beide Derivate zeigten Selektivität für $\alpha_6\beta_3\delta$ Rezeptoren in der Abwesenheit von GABA, Derivat **29** ebenfalls für $\alpha_6\beta_2\delta$ Rezeptoren. Neben ihrer δ -Selektivität zeigten beide Verbindungen auch α_6 -Selektivität. In der Anwesenheit von GABA verloren beide Substanzen ihre δ -Selektivität und modulierten auch andere α_6 - und β_3 -enthaltende Rezeptoren.

Da gezeigt wurde, dass es keine Korrelation zwischen Potenz und Effizienz der Derivate an $\alpha_6\beta_3\delta$ Rezeptoren gibt, scheinen die strukturellen Voraussetzungen für diese beiden Parameter unterschiedlich zu sein.

Die Bindungsstelle von DS1 an der α_6 Untereinheit wurde auf den vorderen Teil des N-Terminus eingegrenzt. Selektive Derivate sind zudem, zumindest im Fall von **39**, zusätzlich auf die vordere Hälfte des N-Terminus des δ Untereinheit angewiesen. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Bindestelle von selektiven Derivaten zwischen der α_6 und der δ Untereinheit liegt, aber auch von der α_6 Untereinheit alleine gebildet werden kann. Dies könnte im Fall der selektiven Liganden dann eine GABA-modulatorische Bindestelle ohne direkte Aktivierung sein.

Es konnten zwei vielversprechende Kandidaten (**29**, **39**) identifiziert werden. Vor allem in Hinblick auf *in vitro* Untersuchungen von rekombinanten δ -enthaltenden GABA_AR können diese Verbindungen helfen den bislang unbekanntem Aufbau von $\alpha_6\beta_2/3\delta$ Rezeptoren zu verstehen. Dabei würde das Wissen um die detaillierte Bindestelle ungemein helfen und müsste näher erforscht werden.

Eine Nutzung der selektiven Derivate als PET Liganden ist vermutlich aufgrund ihrer niedrigen Affinität aussichtslos. Auch die Idee einen selektiven Liganden für die Affinitätschromatographie zu

entwickeln ist nicht gelungen. Alle Bereiche, in denen das Molekül verändert wurde und somit eine Kopplung an Säulenmaterial ermöglichen sollte, waren entscheidend für die Bindung an GABA_AR.

Da die [³H]EBOB-Bindungsmodulation eine indirekte Methode ist und die Effekte der Liganden auf die verschiedenen Rezeptortypen nicht direkt messen kann, ist es unabdingbar, die Derivate, auch in Hinblick auf ihre Bindung an die chimären Rezeptoren, in weiteren Messmethoden zu analysieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F. B.; Starke, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier: 2009; Vol. 10, p 1248.
2. Schmidt, R. F., *Human Physiology*. Springer: 1989; Vol. 2.
3. Smith, G. B.; Olsen, R. W., Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **1995**, *16* (5), 162-8.
4. Schofield, P. R.; Darlison, M. G.; Fujita, N.; Burt, D. R.; Stephenson, F. A.; Rodriguez, H.; Rhee, L. M.; Ramachandran, J.; Reale, V.; Glencorse, T. A.; et al., Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **1987**, *328* (6127), 221-7.
5. Amin, J.; Weiss, D. S., GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* **1993**, *366* (6455), 565-9.
6. Galzi, J.; Changeux, J., Neurotransmitter-gated ion channels as unconventional allosteric proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 554-565.
7. Vandenberg, R. J.; Handford, C. A.; Schofield, P. R., Distinct agonist- and antagonist-binding sites on the glycine receptor. *Neuron* **1992**, *9* (3), 491-6.
8. Schmieden, V.; Kuhse, J.; Betz, H., Mutation of glycine receptor subunit creates beta-alanine receptor responsive to GABA. *Science* **1993**, *262* (5131), 256-8.
9. Olsen, R. W.; Tobin, A. J., Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J* **1990**, *4* (5), 1469-80.
10. Tretter, V.; Ehya, N.; Fuchs, K.; Sieghart, W., Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci* **1997**, *17* (8), 2728-37.
11. Baumann, S. W.; Baur, R.; Sigel, E., Forced subunit assembly in $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A receptors. Insight into the absolute arrangement. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (48), 46020-5.
12. Baur, R.; Minier, F.; Sigel, E., A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett* **2006**, *580* (6), 1616-20.
13. Baur, R.; Kaur, K. H.; Sigel, E., Structure of $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A receptors and their lack of ethanol sensitivity. *J. Neurochem.* **2009**, *111* (5), 1172-81.
14. Kaur, K. H.; Baur, R.; Sigel, E., Unanticipated structural and functional properties of δ -subunit-containing GABA_A receptors. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (12), 7889-96.
15. Bollan, K. A.; Baur, R.; Hales, T. G.; Sigel, E.; Connolly, C. N., The promiscuous role of the epsilon subunit in GABAA receptor biogenesis. *Mol Cell Neurosci* **2008**, *37* (3), 610-21.
16. Luddens, H.; Wisden, W., Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *Trends Pharmacol Sci* **1991**, *12* (2), 49-51.
17. Laurie, D. J.; Seeburg, P. H.; Wisden, W., The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory Bulb and Cerebellum. *J. Neurosci.* **1992**, *12* (3), 1063-1076.
18. Wisden, W.; Korpi, E. R.; Bahn, S., The cerebellum: a model system for studying GABA_A receptor diversity. *Neuropharmacology* **1996**, *35* (9-10), 1139-60.
19. Sieghart, W.; Sperk, G., Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2* (8), 795-816.
20. Minuk, G. Y.; Zhang, M.; Gong, Y.; Minuk, L.; Dienes, H.; Pettigrew, N.; Kew, M.; Lipschitz, J.; Sun, D., Decreased hepatocyte membrane potential differences and GABAA-beta3 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2007**, *45* (3), 735-45.
21. Mizuta, K.; Xu, D.; Pan, Y.; Comas, G.; Sonett, J. R.; Zhang, Y.; Panettieri, R. A., Jr.; Yang, J.; Emala, C. W., Sr., GABAA receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**, *294* (6), L1206-16.
22. Alam, S.; Laughton, D. L.; Walding, A.; Wolstenholme, A. J., Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Mol Immunol* **2006**, *43* (9), 1432-42.
23. Bjurström, H.; Wang, J.; Ericsson, I.; Bengtsson, M.; Liu, Y.; Kumar-Mendru, S.; Issazadeh-Navikas, S.; Birnir, B., GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. *J Neuroimmunol* **2008**, *205* (1-2), 44-50.
24. Hedblom, E.; Kirkness, E. F., A novel class of GABAA receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biol Chem* **1997**, *272* (24), 15346-50.

25. Lu, J.; Zhang, Q.; Tan, D.; Luo, W.; Zhao, H.; Ma, J.; Liang, H.; Tan, Y., GABA A receptor pi subunit promotes apoptosis of HTR-8/SVneo trophoblastic cells: Implications in preeclampsia. *Int J Mol Med* **2016**, *38* (1), 105-12.
26. Hevers, W.; Korpi, E. R.; Lüddens, H., Assembly of functional $\alpha 6\beta 3\gamma 2\delta$ GABA_A receptors *in vitro*. *Neuroreport* **2000**, *11* (18), 4103-4106.
27. Jackel, C.; Kleinz, R.; Mäkelä, R.; Hevers, W.; Jezequel, S.; Korpi, E. R.; Lüddens, H., The main determinant of furosemide inhibition on GABA_A receptors is located close to the first transmembrane domain. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *357* (2-3), 251-256.
28. Haas, K. F.; Macdonald, R. L., GABA_A receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABA_A receptor currents in mouse fibroblasts. *J. Physiol.* **1999**, *514* (Pt 1), 27-45.
29. Laurie, D. J.; Seeburg, P. H.; Wisden, W., The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J. Neurosci.* **1992**, *12* (3), 1063-76.
30. Chandra, D.; Jia, F.; Liang, J.; Peng, Z.; Suryanarayanan, A.; Werner, D. F.; Spigelman, I.; Houser, C. R.; Olsen, R. W.; Harrison, N. L.; Homanics, G. E., GABA_A receptor $\alpha 4$ subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, *103* (41), 15230-5.
31. Sur, C.; Farrar, S. J.; Kerby, J.; Whiting, P. J.; Atack, J. R.; McKernan, R. M., Preferential coassembly of $\alpha 4$ and δ subunits of the γ -aminobutyric acid_A receptor in rat thalamus. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56* (1), 110-5.
32. Glykys, J.; Peng, Z.; Chandra, D.; Homanics, G. E.; Houser, C. R.; Mody, I., A new naturally occurring GABA_A receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10* (1), 40-8.
33. Fritschy, J. M.; Johnson, D. K.; Mohler, H.; Rudolph, U., Independent assembly and subcellular targeting of GABA_A-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons *in vivo*. *Neurosci. Lett.* **1998**, *249* (2-3), 99-102.
34. Kaila, K.; Pasternack, M.; Saarikoski, J.; Voipio, J., Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. *J Physiol* **1989**, *416*, 161-81.
35. Coull, J. A.; Beggs, S.; Boudreau, D.; Boivin, D.; Tsuda, M.; Inoue, K.; Gravel, C.; Salter, M. W.; De Koninck, Y., BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **2005**, *438* (7070), 1017-21.
36. Ben-Ari, Y.; Gaiarsa, J. L.; Tyzio, R.; Khazipov, R., GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* **2007**, *87* (4), 1215-84.
37. Wright, R.; Raimondo, J. V.; Akerman, C. J., Spatial and temporal dynamics in the ionic driving force for GABA(A) receptors. *Neural Plast* **2011**, *2011*, 728395.
38. Betz, H., Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* **1990**, *5* (4), 383-92.
39. Belelli, D.; Lambert, J. J., Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* **2005**, *6* (7), 565-75.
40. Sigel, E.; Baur, R.; Racz, I.; Marazzi, J.; Smart, T. G.; Zimmer, A.; Gertsch, J., The major central endocannabinoid directly acts at GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (44), 18150-5.
41. Sieghart, W., Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **1995**, *47* (2), 181-234.
42. Baumann, S. W.; Baur, R.; Sigel, E., Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci* **2003**, *23* (35), 11158-66.
43. Ernst, M.; Brauchart, D.; Boesch, S.; Sieghart, W., Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* **2003**, *119* (4), 933-43.
44. Bergmann, R.; Kongsbak, K.; Sorensen, P. L.; Sander, T.; Balle, T., A unified model of the GABA(A) receptor comprising agonist and benzodiazepine binding sites. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e52323.
45. Hibbs, R. E.; Gouaux, E., Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* **2011**, *474* (7349), 54-60.
46. Wagner, D. A.; Czajkowski, C., Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* **2001**, *21* (1), 67-74.

47. Gynther, B. D.; Curtis, D. R., Pyridazinyl-GABA derivatives as GABA and glycine antagonists in the spinal cord of the cat. *Neurosci Lett* **1986**, *68* (2), 211-5.
48. Boileau, A. J.; Evers, A. R.; Davis, A. F.; Czajkowski, C., Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci* **1999**, *19* (12), 4847-54.
49. Jansen, M.; Rabe, H.; Strehle, A.; Dieler, S.; Debus, F.; Dannhardt, G.; Akabas, M. H.; Luddens, H., Synthesis of GABAA receptor agonists and evaluation of their alpha-subunit selectivity and orientation in the GABA binding site. *J Med Chem* **2008**, *51* (15), 4430-48.
50. Baur, R.; Sigel, E., On high- and low-affinity agonist sites in GABAA receptors. *J Neurochem* **2003**, *87* (2), 325-32.
51. Chang, Y.; Ghansah, E.; Chen, Y.; Ye, J.; Weiss, D. S., Desensitization mechanism of GABA receptors revealed by single oocyte binding and receptor function. *J Neurosci* **2002**, *22* (18), 7982-90.
52. Krosgaard-Larsen, P.; Hjeds, H.; Curtis, D. R.; Lodge, D.; Johnston, G. A., Dihydromuscimol, thiomuscimol and related heterocyclic compounds as GABA analogues. *J Neurochem* **1979**, *32* (6), 1717-24.
53. Korpi, E. R.; Mihalek, R. M.; Sinkkonen, S. T.; Hauer, B.; Hevers, W.; Homanics, G. E.; Sieghart, W.; Lüddens, H., Altered receptor subtypes in the forebrain of GABA_A receptor δ subunit-deficient mice: recruitment of $\gamma 2$ subunits. *Neuroscience* **2002**, *109* (4), 733-43.
54. Mihalek, R. M.; Banerjee, P. K.; Korpi, E. R.; Quinlan, J. J.; Firestone, L. L.; Mi, Z. P.; Lagenaur, C.; Tretter, V.; Sieghart, W.; Anagnostaras, S. G.; Sage, J. R.; Fanselow, M. S.; Guidotti, A.; Spigelman, I.; Li, Z.; DeLorey, T. M.; Olsen, R. W.; Homanics, G. E., Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (22), 12905-10.
55. Quirk, K.; Whiting, P. J.; Ragan, C. I.; McKernan, R. M., Characterisation of delta-subunit containing GABAA receptors from rat brain. *Eur J Pharmacol* **1995**, *290* (3), 175-81.
56. Pritchett, D. B.; Lüddens, H.; Seeburg, P. H., Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* **1989**, *245* (4924), 1389-92.
57. Haefely, W.; Martin, J. R.; Schoch, P., Novel anxiolytics that act as partial agonists at benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **1990**, *11* (11), 452-6.
58. Suzdak, P. D.; Glowa, J. R.; Crawley, J. N.; Schwartz, R. D.; Skolnick, P.; Paul, S. M., A selective imidazobenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. *Science* **1986**, *234* (4781), 1243-7.
59. Mohler, H.; Sieghart, W.; Richards, J. G.; Hunkeler, W., Photoaffinity labeling of benzodiazepine receptors with a partial inverse agonist. *Eur J Pharmacol* **1984**, *102* (1), 191-2.
60. Hunkeler, W.; Mohler, H.; Pieri, L.; Polc, P.; Bonetti, E. P.; Cumin, R.; Schaffner, R.; Haefely, W., Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature* **1981**, *290* (5806), 514-6.
61. Benke, D.; Mertens, S.; Trzeciak, A.; Gillissen, D.; Mohler, H., GABAA receptors display association of gamma 2-subunit with alpha 1- and beta 2/3-subunits. *J Biol Chem* **1991**, *266* (7), 4478-83.
62. Pritchett, D. B.; Sontheimer, H.; Shivers, B. D.; Ymer, S.; Kettenmann, H.; Schofield, P. R.; Seeburg, P. H., Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* **1989**, *338* (6216), 582-5.
63. McKernan, R. M.; Wafford, K.; Quirk, K.; Hadingham, K. L.; Harley, E. A.; Ragan, C. I.; Whiting, P. J., The pharmacology of the benzodiazepine site of the GABA-A receptor is dependent on the type of gamma-subunit present. *J Recept Signal Transduct Res* **1995**, *15* (1-4), 173-83.
64. Wieland, H. A.; Lüddens, H.; Seeburg, P. H., A single histidine in GABA_A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* **1992**, *267* (3), 1426-1429.
65. Hanson, S. M.; Morlock, E. V.; Satyshur, K. A.; Czajkowski, C., Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the gamma-aminobutyric acid type-A (GABAA) receptor are different. *J Med Chem* **2008**, *51* (22), 7243-52.
66. Tan, K. R.; Baur, R.; Gonthier, A.; Goeldner, M.; Sigel, E., Two neighboring residues of loop A of the alpha1 subunit point towards the benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *FEBS Lett* **2007**, *581* (24), 4718-22.
67. Tan, K. R.; Gonthier, A.; Baur, R.; Ernst, M.; Goeldner, M.; Sigel, E., Proximity-accelerated chemical coupling reaction in the benzodiazepine-binding site of gamma-aminobutyric acid type A receptors: superposition of different allosteric modulators. *J Biol Chem* **2007**, *282* (36), 26316-25.

68. Amin, J.; Brooks-Kayal, A.; Weiss, D. S., Two tyrosine residues on the alpha subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol* **1997**, *51* (5), 833-41.
69. Buhr, A.; Baur, R.; Malherbe, P.; Sigel, E., Point mutations of the alpha 1 beta 2 gamma 2 gamma-aminobutyric acid(A) receptor affecting modulation of the channel by ligands of the benzodiazepine binding site. *Mol Pharmacol* **1996**, *49* (6), 1080-4.
70. Schaerer, M. T.; Buhr, A.; Baur, R.; Sigel, E., Amino acid residue 200 on the alpha1 subunit of GABA(A) receptors affects the interaction with selected benzodiazepine binding site ligands. *Eur J Pharmacol* **1998**, *354* (2-3), 283-7.
71. Wingrove, P. B.; Safo, P.; Wheat, L.; Thompson, S. A.; Wafford, K. A.; Whiting, P. J., Mechanism of alpha-subunit selectivity of benzodiazepine pharmacology at gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Eur J Pharmacol* **2002**, *437* (1-2), 31-9.
72. Tan, K. R.; Baur, R.; Charon, S.; Goeldner, M.; Sigel, E., Relative positioning of diazepam in the benzodiazepine-binding-pocket of GABA receptors. *J Neurochem* **2009**, *111* (5), 1264-73.
73. Buhr, A.; Schaerer, M. T.; Baur, R.; Sigel, E., Residues at positions 206 and 209 of the alpha1 subunit of gamma-aminobutyric AcidA receptors influence affinities for benzodiazepine binding site ligands. *Mol Pharmacol* **1997**, *52* (4), 676-82.
74. Sigel, E.; Schaerer, M. T.; Buhr, A.; Baur, R., The benzodiazepine binding pocket of recombinant alpha1beta2gamma2 gamma-aminobutyric acidA receptors: relative orientation of ligands and amino acid side chains. *Mol Pharmacol* **1998**, *54* (6), 1097-105.
75. Buhr, A.; Baur, R.; Sigel, E., Subtle changes in residue 77 of the gamma subunit of alpha1beta2gamma2 GABAA receptors drastically alter the affinity for ligands of the benzodiazepine binding site. *J Biol Chem* **1997**, *272* (18), 11799-804.
76. Wingrove, P. B.; Thompson, S. A.; Wafford, K. A.; Whiting, P. J., Key amino acids in the gamma subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site. *Mol Pharmacol* **1997**, *52* (5), 874-81.
77. Sigel, E.; Buhr, A., The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **1997**, *18* (11), 425-9.
78. Roehrs, T.; Roth, T., Drug-related Sleep Stage Changes: Functional Significance and Clinical Relevance. *Sleep Med Clin* **2010**, *5* (4), 559-570.
79. Arbilla, S.; Depoortere, H.; George, P.; Langer, S. Z., Pharmacological profile of the imidazopyridine zolpidem at benzodiazepine receptors and electrocorticogram in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1985**, *330* (3), 248-51.
80. Rudolph, U.; Mohler, H., GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* **2006**, *6* (1), 18-23.
81. Darcourt, G.; Pringuey, D.; Salliere, D.; Lavoisy, J., The safety and tolerability of zolpidem--an update. *J Psychopharmacol* **1999**, *13* (1), 81-93.
82. Scharf, M. B.; Roth, T.; Vogel, G. W.; Walsh, J. K., A multicenter, placebo-controlled study evaluating zolpidem in the treatment of chronic insomnia. *J Clin Psychiatry* **1994**, *55* (5), 192-9.
83. Sanger, D. J., The pharmacology and mechanisms of action of new generation, non-benzodiazepine hypnotic agents. *CNS Drugs* **2004**, *18 Suppl 1*, 9-15; discussion 41, 43-5.
84. Wieland, H. A.; Luddens, H., Four amino acid exchanges convert a diazepam-insensitive, inverse agonist-preferring GABAA receptor into a diazepam-preferring GABAA receptor. *J Med Chem* **1994**, *37* (26), 4576-80.
85. Pritchett, D. B.; Seeburg, P. H., Gamma-aminobutyric acidA receptor alpha 5-subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology. *J Neurochem* **1990**, *54* (5), 1802-4.
86. Benavides, J.; Peny, B.; Durand, A.; Arbilla, S.; Scatton, B., Comparative in vivo and in vitro regional selectivity of central omega (benzodiazepine) site ligands in inhibiting [3H]flumazenil binding in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* **1992**, *263* (2), 884-96.
87. Graham, D.; Faure, C.; Besnard, F.; Langer, S. Z., Pharmacological profile of benzodiazepine site ligands with recombinant GABAA receptor subtypes. *Eur Neuropsychopharmacol* **1996**, *6* (2), 119-25.
88. Krystal, A. D.; Walsh, J. K.; Laska, E.; Caron, J.; Amato, D. A.; Wessel, T. C.; Roth, T., Sustained efficacy of eszopiclone over 6 months of nightly treatment: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study in adults with chronic insomnia. *Sleep* **2003**, *26* (7), 793-9.

89. Victorri-Vigneau, C.; Dailly, E.; Veyrac, G.; Jolliet, P., Evidence of zolpidem abuse and dependence: results of the French Centre for Evaluation and Information on Pharmacodependence (CEIP) network survey. *Br J Clin Pharmacol* **2007**, *64* (2), 198-209.
90. Buhr, A.; Wagner, C.; Fuchs, K.; Sieghart, W.; Sigel, E., Two novel residues in M2 of the gamma-aminobutyric acid type A receptor affecting gating by GABA and picrotoxin affinity. *J Biol Chem* **2001**, *276* (11), 7775-81.
91. Horenstein, J.; Wagner, D. A.; Czajkowski, C.; Akabas, M. H., Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABA(A) receptor pore-lining M2 segment. *Nat Neurosci* **2001**, *4* (5), 477-85.
92. Jensen, M. L.; Timmermann, D. B.; Johansen, T. H.; Schousboe, A.; Varming, T.; Ahring, P. K., The beta subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor. *J Biol Chem* **2002**, *277* (44), 41438-47.
93. Scheller, M.; Forman, S. A., Coupled and uncoupled gating and desensitization effects by pore domain mutations in GABA(A) receptors. *J Neurosci* **2002**, *22* (19), 8411-21.
94. Filippova, N.; Wotring, V. E.; Weiss, D. S., Evidence that the TM1-TM2 loop contributes to the rho1 GABA receptor pore. *J Biol Chem* **2004**, *279* (20), 20906-14.
95. Kalueff, A. V., Mapping convulsants' binding to the GABA-A receptor chloride ionophore: a proposed model for channel binding sites. *Neurochem Int* **2007**, *50* (1), 61-8.
96. Holland, K. D.; Yoon, K. W.; Ferrendelli, J. A.; Covey, D. F.; Rothman, S. M., Gamma-butyrolactone antagonism of the picrotoxin receptor: comparison of a pure antagonist and a mixed antagonist/inverse agonist. *Mol Pharmacol* **1991**, *39* (1), 79-84.
97. Twyman, R. E.; Green, R. M.; MacDonald, R. L., Kinetics of open channel block by penicillin of single GABAA receptor channels from mouse spinal cord neurones in culture. *J Physiol* **1992**, *445*, 97-127.
98. Yoon, K. W.; Wotring, V. E.; Fuse, T., Multiple picrotoxin effect on glycine channels in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* **1998**, *87* (4), 807-15.
99. Dibas, M. I.; Dillon, G. H., The central nervous system convulsant pentylenetetrazole stimulates gamma-aminobutyric acid (GABA)-activated current in picrotoxin-resistant GABA(A) receptors in HEK293 cells. *Neurosci Lett* **2000**, *285* (3), 193-6.
100. Sinkkonen, S. T.; Rabe, H.; Luddens, H.; Korpi, E. R., Evidence for a reduction of coupling between GABAA receptor agonist and ionophore binding sites by inorganic phosphate. *Neurochem Res* **2005**, *30* (12), 1471-82.
101. Miller, C., Genetic manipulation of ion channels: a new approach to structure and mechanism. *Neuron* **1989**, *2* (3), 1195-205.
102. Zhorov, B. S.; Lin, S. X., Monte Carlo-minimized energy profile of estradiol in the ligand-binding tunnel of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: atomic mechanisms of steroid recognition. *Proteins* **2000**, *38* (4), 414-27.
103. Dibas, M. I.; Gonzales, E. B.; Das, P.; Bell-Horner, C. L.; Dillon, G. H., Identification of a novel residue within the second transmembrane domain that confers use-facilitated block by picrotoxin in glycine alpha 1 receptors. *J Biol Chem* **2002**, *277* (11), 9112-7.
104. Mortensen, M.; Wafford, K. A.; Wingrove, P.; Ebert, B., Pharmacology of GABA(A) receptors exhibiting different levels of spontaneous activity. *Eur J Pharmacol* **2003**, *476* (1-2), 17-24.
105. Lynch, J. W.; Rajendra, S.; Barry, P. H.; Schofield, P. R., Mutations affecting the glycine receptor agonist transduction mechanism convert the competitive antagonist, picrotoxin, into an allosteric potentiator. *J Biol Chem* **1995**, *270* (23), 13799-806.
106. Lee, D.; Su, H.; O'Dowd, D. K., GABA receptors containing Rdl subunits mediate fast inhibitory synaptic transmission in Drosophila neurons. *J Neurosci* **2003**, *23* (11), 4625-34.
107. Zhang, H. G.; Lee, H. J.; Rocheleau, T.; French-Constant, R. H.; Jackson, M. B., Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of Drosophila gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol Pharmacol* **1995**, *48* (5), 835-40.
108. Wang, T. L.; Hackam, A. S.; Guggino, W. B.; Cutting, G. R., A single amino acid in gamma-aminobutyric acid rho 1 receptors affects competitive and noncompetitive components of picrotoxin inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (25), 11751-5.
109. Jursky, F.; Fuchs, K.; Buhr, A.; Tretter, V.; Sigel, E.; Sieghart, W., Identification of amino acid residues of GABA(A) receptor subunits contributing to the formation and affinity of the tert-butylbicyclophosphorothionate binding site. *J Neurochem* **2000**, *74* (3), 1310-6.

110. Atack, J. R.; Ohashi, Y.; McKernan, R. M., Characterization of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate ([³⁵S]TBPS) binding to GABA_A receptors in postmortem human brain. *Br J Pharmacol* **2007**, *150* (8), 1066-74.
111. Hisano, K.; Ozoe, F.; Huang, J.; Kong, X.; Ozoe, Y., The channel-lining 6' amino acid in the second membrane-spanning region of ionotropic GABA receptors has more profound effects on 4'-ethynyl-4-n-propylbicycloorthobenzoate binding than the 2' amino acid. *Invert Neurosci* **2007**, *7* (1), 39-46.
112. Hosie, A. M.; Aronstein, K.; Sattelle, D. B.; French-Constant, R. H., Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci* **1997**, *20* (12), 578-83.
113. Squires, R. F.; Casida, J. E.; Richardson, M.; Saederup, E., [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binds with high affinity to brain-specific sites coupled to γ -aminobutyric acid-A and ion recognition sites. *Mol. Pharmacol.* **1983**, *23* (2), 326-36.
114. Wong, D. T.; Threlkeld, P. G.; Bymaster, F. P.; Squires, R. F., Saturable binding of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate to the sites linked to the GABA receptor and the interaction with GABAergic agents. *Life Sci* **1984**, *34* (9), 853-60.
115. Seifert, J.; Casida, J. E., Regulation of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binding sites in rat brain by GABA, pyrethroid and barbiturate. *Eur J Pharmacol* **1985**, *115* (2-3), 191-8.
116. Supavilai, P.; Karobath, M., Differential modulation of [³⁵S]TBPS binding by the occupancy of benzodiazepine receptors with its ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **1983**, *91* (1), 145-6.
117. Supavilai, P.; Karobath, M., [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binding sites are constituents of the γ -aminobutyric acid benzodiazepine receptor complex. *J. Neurosci.* **1984**, *4* (5), 1193-200.
118. Wood, P. L.; Loo, P.; Braunwalder, A.; Yokoyama, N.; Cheney, D. L., In vitro characterization of benzodiazepine receptor agonists, antagonists, inverse agonists and agonist/antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **1984**, *231* (3), 572-6.
119. Braestrup, C.; Honore, T.; Nielsen, M.; Petersen, E. N.; Jensen, L. H., Ligands for benzodiazepine receptors with positive and negative efficacy. *Biochem Pharmacol* **1984**, *33* (6), 859-62.
120. Maksay, G.; Ticku, M. K., Dissociation of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binding differentiates convulsant and depressant drugs that modulate GABAergic transmission. *J Neurochem* **1985**, *44* (2), 480-6.
121. Maksay, G.; Ticku, M. K., GABA, depressants and chloride ions affect the rate of dissociation of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binding. *Life Sci* **1985**, *37* (23), 2173-80.
122. Trifiletti, R. R.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H., Barbiturate recognition site on the GABA/benzodiazepine receptor complex is distinct from the picrotoxinin/TBPS recognition site. *Eur J Pharmacol* **1984**, *106* (2), 441-7.
123. Maksay, G.; Simonyi, M., Kinetic regulation of convulsant (TBPS) binding by GABAergic agents. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *30* (4), 321-8.
124. Maksay, G.; Simonyi, M., Benzodiazepine anticonvulsants accelerate and beta-carboline convulsants decelerate the kinetics of [³⁵S]TBPS binding at the chloride ionophore. *Eur J Pharmacol* **1985**, *117* (2), 275-8.
125. Korpi, E. R.; Luddens, H., Regional γ -aminobutyric acid sensitivity of t-butylbicyclophosphoro[³⁵S]thionate binding depends on γ -aminobutyric acid_A receptor α subunit. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44* (1), 87-92.
126. Hawkinson, J. E.; Kimbrough, C. L.; Belevi, D.; Lambert, J. J.; Purdy, R. H.; Lan, N. C., Correlation of neuroactive steroid modulation of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate and [³H]flunitrazepam binding and γ -aminobutyric acid_A receptor function. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *46* (5), 977-85.
127. Maksay, G., From kinetics and thermodynamics of GABA_A receptor binding to ionophore function. *Neurochem. Int.* **1996**, *29* (4), 361-70.
128. Maksay, G.; Biro, T., High affinity, heterogeneous displacement of [³H]EBOB binding to cerebellar GABA_A receptors by neurosteroids and GABA agonists. *Neuropharmacology* **2005**, *49* (4), 431-8.
129. Mathers, D. A.; Barker, J. L., Chemically induced ion channels in nerve cell membranes. *Int Rev Neurobiol* **1982**, *23*, 1-34.

130. Harris, R. A.; Allan, A. M., Functional coupling of gamma-aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes. *Science* **1985**, 228 (4703), 1108-10.
131. Korpi, E. R.; Kuner, T.; Seeburg, P. H.; Lüddens, H., Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific γ -aminobutyric acid type A receptor. *Mol. Pharmacol.* **1995**, 47 (2), 283-289.
132. Korpi, E. R.; Lüddens, H., Furosemide interactions with brain GABA_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 120 (5), 741-8.
133. Krishek, B. J.; Moss, S. J.; Smart, T. G., Homomeric beta 1 gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties. *Mol Pharmacol* **1996**, 49 (3), 494-504.
134. Davies, P. A.; Kirkness, E. F.; Hales, T. G., Modulation by general anaesthetics of rat GABAA receptors comprised of alpha 1 beta 3 and beta 3 subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Br J Pharmacol* **1997**, 120 (5), 899-909.
135. Feng, H. J.; Bianchi, M. T.; Macdonald, R. L., Pentobarbital differentially modulates alpha1beta3delta and alpha1beta3gamma2L GABAA receptor currents. *Mol Pharmacol* **2004**, 66 (4), 988-1003.
136. Evans, R. H., Potentiation of the effects of GABA by pentobarbitone. *Brain Res* **1979**, 171 (1), 113-20.
137. Study, R. E.; Barker, J. L., Diazepam and (-)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, 78 (11), 7180-4.
138. Franks, N. P.; Lieb, W. R., Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* **1994**, 367 (6464), 607-14.
139. Robertson, B., Actions of anaesthetics and avermectin on GABAA chloride channels in mammalian dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol* **1989**, 98 (1), 167-76.
140. Peters, J. A.; Kirkness, E. F.; Callachan, H.; Lambert, J. J.; Turner, A. J., Modulation of the GABAA receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol* **1988**, 94 (4), 1257-69.
141. Schwartz, R. D.; Suzdak, P. D.; Paul, S. M., gamma-Aminobutyric acid (GABA)- and barbiturate-mediated ³⁶Cl⁻ uptake in rat brain synaptoneuroosomes: evidence for rapid desensitization of the GABA receptor-coupled chloride ion channel. *Mol Pharmacol* **1986**, 30 (5), 419-26.
142. Mathers, D. A.; Barker, J. L., (-)Pentobarbital opens ion channels of long duration in cultured mouse spinal neurons. *Science* **1980**, 209 (4455), 507-9.
143. Jackson, M. B.; Lecar, H.; Mathers, D. A.; Barker, J. L., Single channel currents activated by gamma-aminobutyric acid, muscimol, and (-)-pentobarbital in cultured mouse spinal neurons. *J Neurosci* **1982**, 2 (7), 889-94.
144. Rogers, C. J.; Twyman, R. E.; Macdonald, R. L., Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol* **1994**, 475 (1), 69-82.
145. Belelli, D.; Lambert, J. J.; Peters, J. A.; Wafford, K.; Whiting, P. J., The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94 (20), 11031-6.
146. Pistis, M.; Belelli, D.; McGurk, K.; Peters, J. A.; Lambert, J. J., Complementary regulation of anaesthetic activation of human (alpha6beta3gamma2L) and Drosophila (RDL) GABA receptors by a single amino acid residue. *J Physiol* **1999**, 515 (Pt 1), 3-18.
147. Wafford, K. A.; Bain, C. J.; Quirk, K.; McKernan, R. M.; Wingrove, P. B.; Whiting, P. J.; Kemp, J. A., A novel allosteric modulatory site on the GABAA receptor beta subunit. *Neuron* **1994**, 12 (4), 775-82.
148. Jurd, R.; Arras, M.; Lambert, S.; Drexler, B.; Siegwart, R.; Crestani, F.; Zaugg, M.; Vogt, K. E.; Ledermann, B.; Antkowiak, B.; Rudolph, U., General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J* **2003**, 17 (2), 250-2.
149. Majewska, M. D.; Harrison, N. L.; Schwartz, R. D.; Barker, J. L.; Paul, S. M., Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **1986**, 232 (4753), 1004-7.
150. Belelli, D.; Bolger, M. B.; Gee, K. W., Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one. *Eur J Pharmacol* **1989**, 166 (2), 325-9.

151. Lambert, J. J.; Belelli, D.; Hill-Venning, C.; Peters, J. A., Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **1995**, *16* (9), 295-303.
152. Wang, M.; He, Y.; Eisenman, L. N.; Fields, C.; Zeng, C. M.; Mathews, J.; Benz, A.; Fu, T.; Zorumski, E.; Steinbach, J. H.; Covey, D. F.; Zorumski, C. F.; Mennerick, S., 3beta -hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA(A) receptor antagonists. *J Neurosci* **2002**, *22* (9), 3366-75.
153. Eisenman, L. N.; He, Y.; Fields, C.; Zorumski, C. F.; Mennerick, S., Activation-dependent properties of pregnenolone sulfate inhibition of GABA_A receptor-mediated current. *J Physiol* **2003**, *550* (Pt 3), 679-91.
154. Belelli, D.; Lambert, J. J.; Peters, J. A.; Gee, K. W.; Lan, N. C., Modulation of human recombinant GABA_A receptors by pregnanediols. *Neuropharmacology* **1996**, *35* (9-10), 1223-31.
155. Lambert, J. J.; Belelli, D.; Harney, S. C.; Peters, J. A.; Frenguelli, B. G., Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Res Brain Res Rev* **2001**, *37* (1-3), 68-80.
156. Belelli, D.; Casula, A.; Ling, A.; Lambert, J. J., The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* **2002**, *43* (4), 651-61.
157. Hadingham, K. L.; Wingrove, P. B.; Wafford, K. A.; Bain, C.; Kemp, J. A.; Palmer, K. J.; Wilson, A. W.; Wilcox, A. S.; Sikela, J. M.; Ragan, C. I.; et al., Role of the beta subunit in determining the pharmacology of human gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol* **1993**, *44* (6), 1211-8.
158. Maitra, R.; Reynolds, J. N., Subunit dependent modulation of GABA_A receptor function by neuroactive steroids. *Brain Res* **1999**, *819* (1-2), 75-82.
159. Hosie, A. M.; Wilkins, M. E.; da Silva, H. M.; Smart, T. G., Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **2006**, *444* (7118), 486-9.
160. Farrant, M.; Nusser, Z., Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6* (3), 215-29.
161. Cope, D. W.; Hughes, S. W.; Crunelli, V., GABA_A receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J Neurosci* **2005**, *25* (50), 11553-63.
162. Feng, H. J.; Kang, J. Q.; Song, L.; Dibbens, L.; Mulley, J.; Macdonald, R. L., Delta subunit susceptibility variants E177A and R220H associated with complex epilepsy alter channel gating and surface expression of alpha4beta2delta GABA_A receptors. *J Neurosci* **2006**, *26* (5), 1499-506.
163. Dibbens, L. M.; Feng, H. J.; Richards, M. C.; Harkin, L. A.; Hodgson, B. L.; Scott, D.; Jenkins, M.; Petrou, S.; Sutherland, G. R.; Scheffer, I. E.; Berkovic, S. F.; Macdonald, R. L.; Mulley, J. C., GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABA_A receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* **2004**, *13* (13), 1315-9.
164. Wohlfarth, K. M.; Bianchi, M. T.; Macdonald, R. L., Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci* **2002**, *22* (5), 1541-9.
165. Hosie, A. M.; Clarke, L.; da Silva, H.; Smart, T. G., Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Neuropharmacology* **2009**, *56* (1), 149-54.
166. Thompson, S. A.; Wingrove, P. B.; Connelly, L.; Whiting, P. J.; Wafford, K. A., Tracazolate reveals a novel type of allosteric interaction with recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *Mol Pharmacol* **2002**, *61* (4), 861-9.
167. Lewis, R. W.; Mabry, J.; Polisar, J. G.; Eagen, K. P.; Ganem, B.; Hess, G. P., Dihydropyrimidinone positive modulation of delta-subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors, including an epilepsy-linked mutant variant. *Biochemistry* **2010**, *49* (23), 4841-51.
168. Scholfield, C. N., Potentiation of inhibition by general anaesthetics in neurones of the olfactory cortex in vitro. *Pflugers Arch* **1980**, *383* (3), 249-55.
169. Gage, P. W.; Robertson, B., Prolongation of inhibitory postsynaptic currents by pentobarbitone, halothane and ketamine in CA1 pyramidal cells in rat hippocampus. *Br J Pharmacol* **1985**, *85* (3), 675-81.
170. Irifune, M.; Sato, T.; Kamata, Y.; Nishikawa, T.; Dohi, T.; Kawahara, M., Evidence for GABA(A) receptor agonistic properties of ketamine: convulsive and anesthetic behavioral models in mice. *Anesth Analg* **2000**, *91* (1), 230-6.

171. Hevers, W.; Hadley, S. H.; Lüddens, H.; Amin, J., Ketamine, But Not Phencyclidine, Selectively Modulates Cerebellar GABA_A Receptors Containing $\alpha 6$ and δ Subunits. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (20), 5383-5393.
172. Brown, N.; Kerby, J.; Bonnert, T. P.; Whiting, P. J.; Wafford, K. A., Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol* **2002**, *136* (7), 965-74.
173. Sperk, G.; Schwarzer, C.; Tsunashima, K.; Fuchs, K.; Sieghart, W., GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience* **1997**, *80* (4), 987-1000.
174. Jensen, M. L.; Wafford, K. A.; Brown, A. R.; Belelli, D.; Lambert, J. J.; Mirza, N. R., A study of subunit selectivity, mechanism and site of action of the delta selective compound 2 (DS2) at human recombinant and rodent native GABA_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168* (5), 1118-32.
175. Belelli, D.; Callachan, H.; Hill-Venning, C.; Peters, J. A.; Lambert, J. J., Interaction of positive allosteric modulators with human and Drosophila recombinant GABA receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Br J Pharmacol* **1996**, *118* (3), 563-76.
176. Ahring, P. K.; Bang, L. H.; Jensen, M. L.; Strobaek, D.; Hartiadi, L. Y.; Chebib, M.; Absalom, N., A pharmacological assessment of agonists and modulators at $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA_A receptors: The challenge in comparing apples with oranges. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 563-76.
177. Mamalaki, C.; Barnard, E. A.; Stephenson, F. A., Molecular size of the gamma-aminobutyric acid A receptor purified from mammalian cerebral cortex. *J Neurochem* **1989**, *52* (1), 124-34.
178. Marks, M. S., Determination of molecular size by zonal sedimentation analysis on sucrose density gradients. *Curr Protoc Cell Biol* **2001**, Chapter 5, Unit 5.3.
179. Zhou, Y.; Nelson, M. E.; Kuryatov, A.; Choi, C.; Cooper, J.; Lindstrom, J., Human alpha4beta2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. *J Neurosci* **2003**, *23* (27), 9004-15.
180. Gorrie, G. H.; Vallis, Y.; Stephenson, A.; Whitfield, J.; Browning, B.; Smart, T. G.; Moss, S. J., Assembly of GABA_A receptors composed of alpha1 and beta2 subunits in both cultured neurons and fibroblasts. *J Neurosci* **1997**, *17* (17), 6587-96.
181. Ericksen, S. S.; Boileau, A. J., Tandem cointure: Cys-loop receptor concatamer insights and caveats. *Mol Neurobiol* **2007**, *35* (1), 113-28.
182. Isacoff, E. Y.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y., Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **1990**, *345* (6275), 530-4.
183. Baumann, S. W.; Baur, R.; Sigel, E., Subunit arrangement of γ -aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (39), 36275-80.
184. Altschuler, E. L.; Hud, N. V.; Mazrimas, J. A.; Rupp, B., Random coil conformation for extended polyglutamine stretches in aqueous soluble monomeric peptides. *J Pept Res* **1997**, *50* (1), 73-5.
185. Im, W. B.; Pregenzer, J. F.; Binder, J. A.; Dillon, G. H.; Alberts, G. L., Chloride channel expression with the tandem construct of alpha 6-beta 2 GABA_A receptor subunit requires a monomeric subunit of alpha 6 or gamma 2. *J Biol Chem* **1995**, *270* (44), 26063-6.
186. Baur, R.; Kaur, K. H.; Sigel, E., Diversity of structure and function of $\alpha 1\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A receptors: comparison with $\alpha 1\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (23), 17398-405.
187. Linden, A. M.; Schmitt, U.; Leppa, E.; Wulff, P.; Wisden, W.; Lüddens, H.; Korpi, E. R., Ro 15-4513 Antagonizes Alcohol-Induced Sedation in Mice Through α 6 β 2 γ 2-type GABA(A) Receptors. *Front Neurosci* **2011**, *5*, 3.
188. Maksay, G.; Fodor, L., Differential effects of two major neurosteroids on cerebellar and cortical GABA_A receptor binding and function. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *650* (1), 94-101.
189. Koslov, E. R.; Maupin, P.; Pradhan, D.; Morrow, J. S.; Rimm, D. L., Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin. *J Biol Chem* **1997**, *272* (43), 27301-6.
190. Neumann, H.; Lustig, A., The activation of alkaline phosphatase by effector molecules. A combined kinetic and hydrodynamic study. *Eur J Biochem* **1980**, *109* (2), 475-80.
191. Guha, A.; Lai, C. Y.; Horecker, B. L., Lobster muscle aldolase: isolation, properties and primary structure at the substrate-binding site. *Arch Biochem Biophys* **1971**, *147* (2), 692-706.
192. Neurath, H.; Hill, R. L., *The Proteins*. 3 ed.; 1975; Vol. 1.
193. Crook, M. A., *Clinical Biochemistry and Metabolic Medicine*. 8 ed.; 2012.
194. Cruse, J. M.; Lewis, R. E., *Illustrated Dictionary of Immunology*. 2 ed.; 2003; p 675.

195. Iwase, T.; Tajima, A.; Sugimoto, S.; Okuda, K.; Hironaka, I.; Kamata, Y.; Takada, K.; Mizunoe, Y., A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Sci Rep* **2013**, *3*, 3081.
196. Pinto, P. V.; Van Dreal, P. A.; Kaplan, A., Aldolase. I. Colorimetric determination. *Clin Chem* **1969**, *15* (5), 339-48.
197. Wieland, H. A.; Luddens, H.; Seeburg, P. H., A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* **1992**, *267* (3), 1426-9.
198. Lüddens, H.; Korpi, E. R., Methods for Transient Expression of Hetero-Oligomeric Ligand-Gated Ion Channels. In *Receptor Signal Transduction Protocols*, Challiss, R. A. J., Ed. Humana Press: Totowa, New Jersey, 1997; Vol. 83, pp 55-63.
199. Yakoub, K.; Jung, S.; Sattler, C.; Damerow, H.; Weber, J.; Kretzschmann, A.; Cankaya, A. S.; Piel, M.; Rosch, F.; Haugaard, A. S.; Frolund, B.; Schirmeister, T.; Luddens, H., Structure-Function Evaluation of Imidazopyridine Derivatives Selective for delta-Subunit-Containing gamma-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. *J Med Chem* **2018**, *61* (5), 1951-1968.
200. Sigel, E.; Kaur, K. H.; Luscher, B. P.; Baur, R., Use of concatamers to study GABAA receptor architecture and function: application to delta-subunit-containing receptors and possible pitfalls. *Biochem Soc Trans* **2009**, *37* (Pt 6), 1338-42.
201. Sigel, E.; Baur, R.; Boulineau, N.; Minier, F., Impact of subunit positioning on GABA_A receptor function. *Biochem Soc Trans* **2006**, *34* (Pt 5), 868-71.
202. Minier, F.; Sigel, E., Techniques: Use of concatenated subunits for the study of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **2004**, *25* (9), 499-503.
203. Wafford, K. A.; van Niel, M. B.; Ma, Q. P.; Horridge, E.; Herd, M. B.; Peden, D. R.; Belelli, D.; Lambert, J. J., Novel compounds selectively enhance δ subunit containing GABA_A receptors and increase tonic currents in thalamus. *Neuropharmacology* **2009**, *56* (1), 182-9.
204. Jones, A.; Korpi, E. R.; McKernan, R. M.; Pelz, R.; Nusser, Z.; Makela, R.; Mellor, J. R.; Pollard, S.; Bahn, S.; Stephenson, F. A.; Randall, A. D.; Sieghart, W.; Somogyi, P.; Smith, A. J.; Wisden, W., Ligand-gated ion channel subunit partnerships: GABA_A receptor $\alpha 6$ subunit gene inactivation inhibits δ subunit expression. *J. Neurosci.* **1997**, *17* (4), 1350-62.
205. Tretter, V.; Hauer, B.; Nusser, Z.; Mihalek, R. M.; Hoyer, H.; Homanics, G. E.; Somogyi, P.; Sieghart, W., Targeted disruption of the GABA(A) receptor delta subunit gene leads to an up-regulation of gamma 2 subunit-containing receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* **2001**, *276* (13), 10532-8.
206. Villumsen, I. S.; Wellendorph, P.; Smart, T. G., Pharmacological characterisation of murine $\alpha 4\beta 1\delta$ GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Neurosci.* **2015**, *16*, 8.
207. Jechlinger, M.; Pelz, R.; Tretter, V.; Klausberger, T.; Sieghart, W., Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing alpha6 subunits. *J Neurosci* **1998**, *18* (7), 2449-57.

7.1 Internetquellen

<http://ericcampeau.com/manuals.html>.

<http://www.flemingtonlab.com/Protocols/CompetentCellsLowTempMeth.pdf>

8 Anhang

8.1 Schnittstellen in der Proteinsequenz von Chimären

	P62813 GBRA1_RAT	1	MKKSRLSDYLIAHTLLSTLSGRSYGPPSDELDK-----NTTVFTRIDRLLDGYDNRLL	56
	P30191 GBRA6_RAT	1	-----MILLLLPILFSLW-----IENAAQALEDEGNFYSENVSRILDNLLLEGYDNRLL	47
	P62813 GBRA1_RAT	57	RPGLGERVTEVKTDI-VTTSFGPVSVDHMEITIDVFFRQSKDERLKFKGPMTVLRNLNLM	116
	P30191 GBRA6_RAT	48	RPGFGGAVTEVKTDI-VTTSFGPVSVDHMEITIDVFFRQINIDERLKFKGPMTVLRNLNLM	107
Binding site				
Mutagenesis	P62813 GBRA1_RAT	117	ASKIINLPDITFFNGKKSVAHNIITTPKIKLLRITIEDGTLVYTHRLTVRACPIHLEDFPPIA	176
Signal peptide	P30191 GBRA6_RAT	108	ASKIINLPDITFFNGKKSVAHNIITTPKIKLLRIMHGTLVYTHRLTVRACPIHLEDFPPIA	167
Modified residue				
Topological domain	P62813 GBRA1_RAT	177	HACPLKFGSYVYTRAEVYVNIITREPARSVVVAEDGSRINVOYDLGOTVDSGIVOSSTGEY	236
Chain	P30191 GBRA6_RAT	168	HACPLKFGSYVYPKSELIITNKKGRLYSVEVPEESSSILQYDLGGOTVDSGIVOSSTGEY	227
Region				
Disulfide bond	P62813 GBRA1_RAT	237	VWITTFHFLKRRKIGVYVYIOTLRCIHTVLLSOVSPHLLNRESVPARTVFGVITVLLHTITLS	296
Sequence conflict	P30191 GBRA6_RAT	228	VITITVYFHLQKLVGYVYVYIOTLRCIHTVLLSOVSPHLLNRESVPARTVFGVITVLLHTITLS	287
Transmembrane	P62813 GBRA1_RAT	297	LSARNSLQKVAAYATAQWDFIAVCYAFVFSALTEFAVNYFTNLRGYANDGKSVVPEKPKKV	356
Glycosylation	P30191 GBRA6_RAT	288	LSARNSLQKVAAYATAQWDFIAVCYAFVFSALTEFAVNYFTNLRQSKAERQAQT---AA	343
Similarity				
Hydrophobic	P62813 GBRA1_RAT	357	KDPLIKKINITYA-----PTATSVTPILARGDQGLATI---AKSATI--ERKEVKPETK	404
Negative	P30191 GBRA6_RAT	344	KPPVAKSKITETESLEAEIVVHSDSKVHLKRRISSELTPIVPSSEASKVLSRTILPSTPVT	403
Positive				
	P62813 GBRA1_RAT	405	PPKPKTINVSFKIDRLSRIAFRLIFGIFNLVVAITLNRPEQLKPTPHQ	455
	P30191 GBRA6_RAT	404	PPLLPAGTGGTSKIDQYRSLIFNVAE-GENLYVNIYVLSKDTNEVSSIVV-	453

Abb. 84: Darstellung der Aminosäuresequenz der GABA_AR α 1/ α 6 Chimären. 70% der Aminosäuren beider Untereinheiten sind identisch. Identität wird über Graustufen dargestellt. Hellgraue Bereiche zeigen ähnliche Aminosäuren an und weiße Bereiche stark unterschiedliche. Gelbe Bereiche kennzeichnen die Transmembrandomänen. Rosa Bereiche stellen das Signalpeptid dar. Die Schnittstellen MluI und Bsu36I sind als solche bezeichnet. Die Schnittstellen 1,2,3 und 4 stellen die Schnittstellen der Chimären dar, wobei (1) die Schnittstelle der Chimären α 1VSDHDME α 6 und α 6VSDVEME α 1, (2) die Schnittstelle von α 1QSWKDER α 6 und α 6QWTWDER α 1, (3) die Schnittstelle von α 1LMASKIW α 6, α 6LMVSKIW α 1 und α 6LMVSKIW α 1-Bsu36I- α 6, (1) und (3) die Schnittstellen von α 1VSDHDME α 6LMVSKIW α 1 und α 6VSDVEME α 1LMASKIW α 6 und (4) die Schnittstelle von α 6-61 ist. Proteinsequenzen stammen aus der Datenbank UniProt Knowledgebase (α 1 = P62813, α 6 = P30191).

	P18508 GBRG2_RAT	1	MSSPNTNMGSTVSYSPVFSQHTLTLILLLSLY---RGFTSQKSDDEYEDY---SLIKTH	54
	P18506 GBRD_RAT	1	-----MNLGLHLLPILLLCTOPHH-GARANNIGDYVGSNLEISL	40
Signal peptide				
Modified residue				
Topological domain	P18508 GBRG2_RAT	55	VLTPKVPEGDVTVILNNILEGYDNKLRDQGVKPTLHITDVIYNSIGPVNAINMEYTIOT	114
Chain	P18506 GBRD_RAT	41	L-----PILDGLVEGYARNFRRIGGPPVWALALEVASTDHISEANMEYTIITV	89
Disulfide bond				
Sequence conflict				
Transmembrane	P18508 GBRG2_RAT	115	FFADITVDRLLKFIETIKVLRNLSVWVCKIILPDTHANSKVADAMITTPRRRLRINW	174
Glycosylation	P18506 GBRD_RAT	90	FLHSHRDSRLSYHINETLGLDSRFVCKLHLPDTHVNAKSAHFQDITVENKLRILQPD	149
Similarity				
Hydrophobic				
Negative				
Positive				
Aliphatic				
Tiny				
Aromatic				
Charged				
Small				
	P18508 GBRG2_RAT	175	GRVLYTLRLTIDAEQLOLHNFPHDEISCPLEFSVYGVPREETVYQKRSVVEVGDTRSW	234
	P18506 GBRD_RAT	150	GVLYLSIRITSTVACDMDLAKYPHDEQECMLDLESYGSSEDIYVYNSENQEQIHGLDRL	209
	P18508 GBRG2_RAT	235	RLYDFSFVGLRNTTEVVK--ITSGDYVWVSVYFQLSRPHGVTIOTIYIPCTLIVLWVSRF	293
	P18506 GBRD_RAT	210	QLAQFTITSYRFITELMNFKSAGQFPRLSLHFOLRNRGVIILQSYRFSVLLVWVSRF	269
	P18508 GBRG2_RAT	294	WIKDAVPAKTSLSGTTVLTHTLSTIARKSLPKVSYVTVVQLFVSVCFIVFVSALVEYG	353
	P18506 GBRD_RAT	270	WLSQAAVPARVSLGTTVLTHTLTVSARSSLPRASAKLDDVYVWICVYVFPALVEYV	329
	P18508 GBRG2_RAT	354	TLHVFVSNRKPSSKOKKKKINAPTIDIRPRSATIHHNATHLGERDEEYGYECLDQKOC	413
	P18506 GBRD_RAT	330	FAHFNADYKRRKRAVWV-TKRAEHDVNRNATVLFSLSARGVSEL-----AISRRGRVP	384
	P18508 GBRG2_RAT	414	ASFPCCFE-----DCRTGAWHGRHTRIAKIDSARIFRPTAFCLFLVLYV	460
	P18506 GBRD_RAT	385	GNLNGSYRVSVEEAKKGGSRPGGPGIISRLKPIADDTIDIVARAVPAAPAAVNIIVY	444
	P18508 GBRG2_RAT	461	VSYLYL	466
	P18506 GBRD_RAT	445	AAVTH-	449

Abb. 85: Darstellung der Aminosäuresequenz der GABA_AR γ 2/ δ Chimären. Identität der beiden Untereinheiten wird über Graustufen dargestellt. Hellgraue Bereiche zeigen ähnliche Aminosäuren an und weiße Bereiche stark unterschiedliche. Gelbe Bereiche kennzeichnen die Transmembrandomänen. Rosa Bereiche stellen das Signalpeptid dar. Die Schnittstelle zwischen γ 2 und δ Untereinheit der Chimären γ 2IWIPDTP δ und δ LWLPDTP γ 2 ist eingezeichnet. Proteinsequenzen stammen aus der Datenbank UniProt Knowledgebase (γ 2 = P18508, δ = P18506).

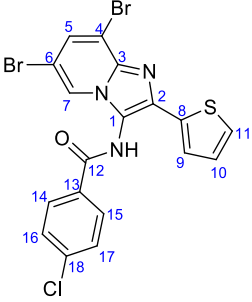
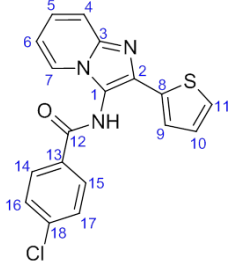
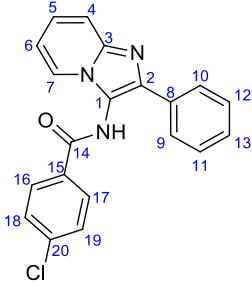
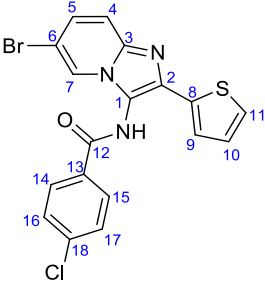
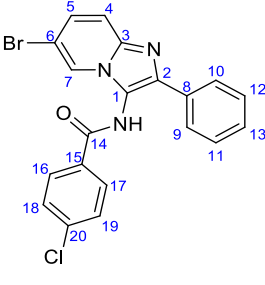
8.2 Schnittstellen in der Proteinsequenz von Punktmutanten

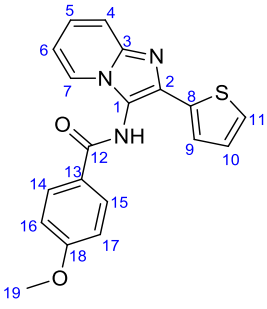
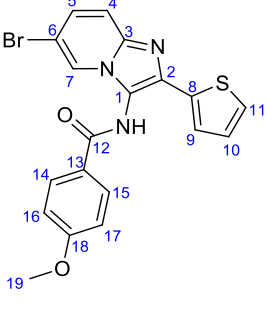
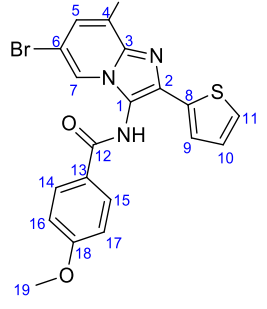
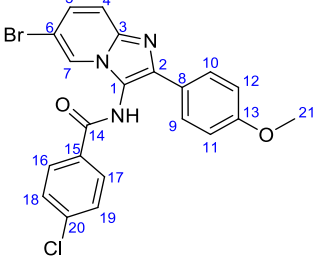
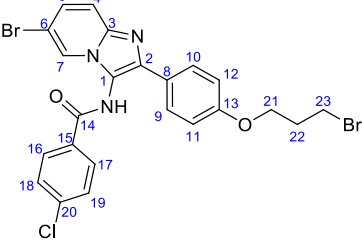
	P62813 GBRA1_RAT	1	MKKSRLSDYLIAWTLILSTLSGRSYGQPSDEELKQ---NITVFTRTRLDRLDGYDNRLL	56
	P30191 GBRA6_RAT	1	-----MILLLLPMLFSLIW-----TENCAOLEDEGNFYSENVSRTRLDLLEGYDNRLL	47
			1 2	
	P62813 GBRA1_RAT	57	RISLGERVTVEKTDIVVTSFGIIVSDHDMETIDVFFRQSNKDERLKFKGNTVRLNNLI	116
	P30191 GBRA6_RAT	48	RIGFGGAVTVEKTDIVVTSFGIVSDVEMETIDVFFRQNTDERLKFKGAEIISLNNLI	107
Binding site				
Mutagenesis	P62813 GBRA1_RAT	117	ASKIINTPDTFFHNGKKSVAHNMTMPNKLIRITEDGTLTYTHRLTVRAECPMHLDFPMDA	176
Signal peptide	P30191 GBRA6_RAT	108	VSKIINTPDTFFHNGKKSIAHNMTTPNKLRLMHTIILYTHRLTIADCPMRLVDFPMDG	167
Modified residue				
Topological domain	P62813 GBRA1_RAT	177	HACPLKFGSYAVTRAEVVEHTREPARSVVAEDGERLINOYDLGOTVDSGIVOSITGEY	236
Chain	P30191 GBRA6_RAT	166	HACPLKFGSYAVPKSEIILYTHKGRLYSVEIPEESLLOYDLGOTVSEETIKSITGEY	227
Region				
Disulfide bond	P62813 GBRA1_RAT	237	VVMTIHFHLKRRKIGYEVQIOTYLRPCIMTVILSQVSNLNRESVPARTVFGVITVLTHTLTS	296
Sequence conflict	P30191 GBRA6_RAT	228	VIMTVYFHLQRYGYEMIQIYTPCIMTVILSQVSNLNRESVPARTVFGVITVLTHTLTS	287
Transmembrane	P62813 GBRA1_RAT	297	ESARNSLPKVAYATAIDNIFAVCYAFVFSALTEFANVYFTKRGYAMDGKSVPEKPKKV	356
Glycosylation	P30191 GBRA6_RAT	288	ESARNSLPKVSYATAIDNIFAVCFAPVFSALTEFANVYFTILQSQAERQQT---AR	343
Similarity	P62813 GBRA1_RAT	357	KDPLIKNNIYA-----PTATSYTPNLARGDPGLATT---AKSATI--EKKEVKPETK	404
Hydrophobic	P30191 GBRA6_RAT	344	KPPVAKSKTIESLEAEIVVHSQKYHLKRISSLTPIVPSSEASKVLSRTIILPSTPVT	403
Negative	P62813 GBRA1_RAT	405	PEEPKKTINSKIDRLSRFAFLLFIFNLVYNIATYINREPOLKAPTPHQ	455
Positive	P30191 GBRA6_RAT	404	PELLLPATGGTSKIDQYSRLFFVAPAGFNLYYNIATYYSKDTMEVSSIVE-	453

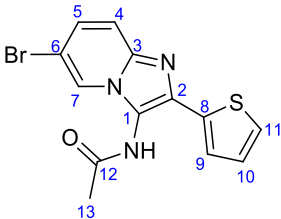
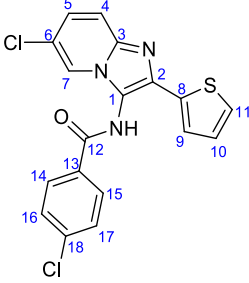
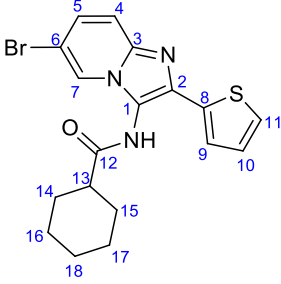
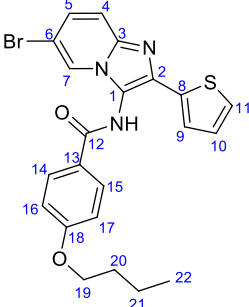
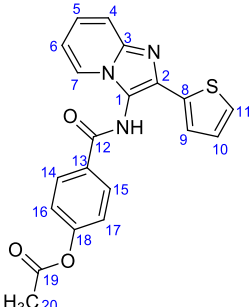
Abb. 86: Darstellung der Aminosäuresequenz der GABA_AR α 1/ α 6 Mehrfach-Punktmutanten. 70% der Aminosäuren beider Untereinheiten sind identisch. Identität wird über Graustufen dargestellt. Hellgraue Bereiche zeigen ähnliche Aminosäuren an und weiße Bereiche stark unterschiedliche. Gelbe Bereiche kennzeichnen die Transmembrandomänen. Rosa Bereiche stellen das Signalpeptid dar. Die Bereiche in denen mehrere Aminosäuren mutiert wurden sind beziffert. (1) stellt dabei die Mehrfach-Punktmutanten α 1GFGGAVT und α 6GLGERVT dar. (2) stellt die Mehrfach-Punktmutanten α 1VSDVEME und α 6VSDHDMET dar. Proteinsequenzen stammen aus der Datenbank UniProt Knowledgebase (α 1 = P62813, α 6 = P30191).

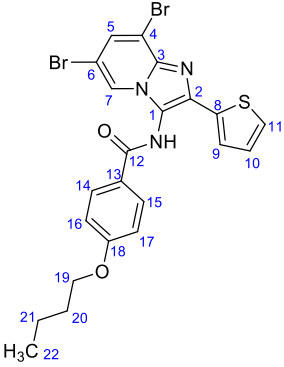
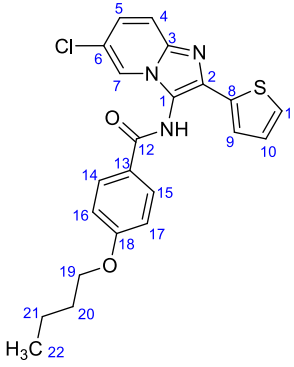
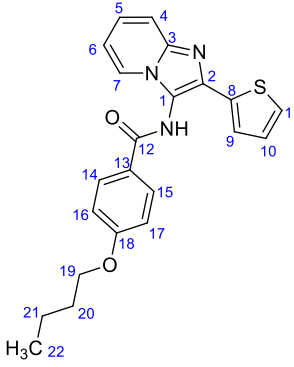
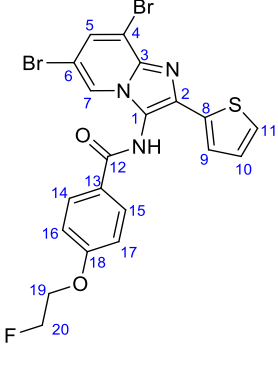
8.5 Strukturen

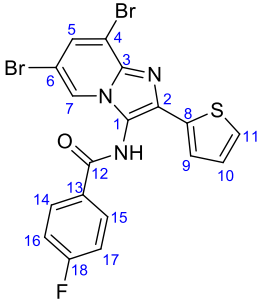
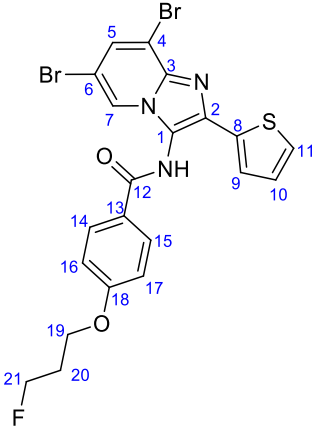
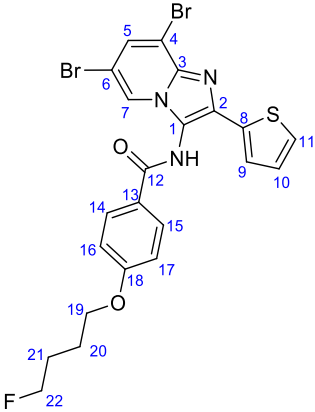
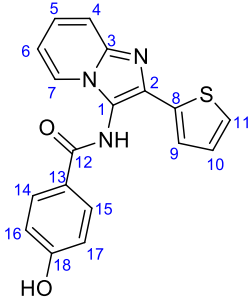
Tab. 33: Molekülstrukturen aller getesteten Substanzen

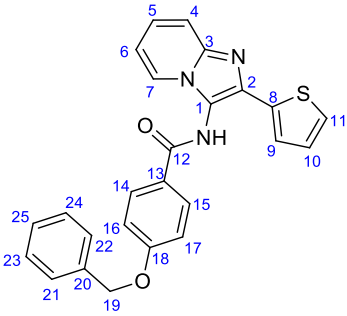
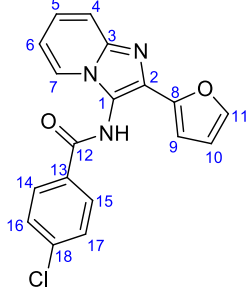
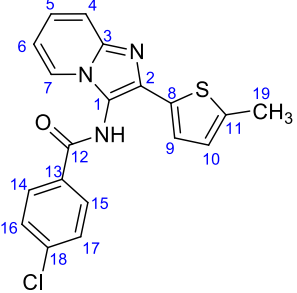
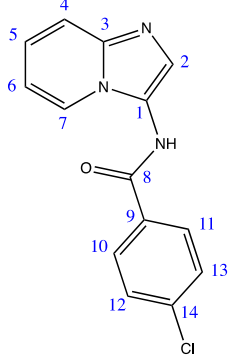
Substanz	Molekülstruktur
DS1	
DS2	
17	
18	
19	

20	
21	
23	
24	
25	

26	
27	
28	
29	
30	

31	 <chem>CCOCc1ccc(cc1)C(=O)Nc2nc3c(ncn3)sc2BrBr</chem>
32	 <chem>CCOCc1ccc(cc1)C(=O)Nc2nc3c(ncn3)sc2Cl</chem>
33	 <chem>CCOCc1ccc(cc1)C(=O)Nc2nc3c(ncn3)sc2</chem>
34	 <chem>FCOCc1ccc(cc1)C(=O)Nc2nc3c(ncn3)sc2BrBr</chem>

35	
38	
39	
40	

41	
42	
43	
44	

Dargestellt sind die Molekülstrukturen aller hergestellten und getesteten Substanzen. Die Leitstrukturen sind die Verbindungen DS1 und DS2.

8.6 Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Abkürzung
4,5,6,7-Tetrahydroisothiazol-[5,4-c]pyridin-3-ol	THIP
Bovines Serumalbumin	BSA
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>C. elegans</i>
Delta Selective Compounds 1/2	DS1/2
Dithiothreitol	DTT
n-Dodecyl- β -D-maltosid	DDM
Enhanced chemiluminescence	ECL
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
Exzitatorisches postsynaptisches Potential	EPSP
Glutamat gated chloride channel	GluCl
Human embryonic kidney	HEK
Immunoglobulin G	IgG
Inhibitorisches postsynaptisches Potential	IPSP
Lithiumdodecylsulfat	LDS
Natriumdodecylsulfat	SDS
Nikotinische Acetylcholin Rezeptoren	nAChR
Octyl- β -D-glucopyranosid	OdGP
Pentylentetrazol	PTZ
Piperidin-4-sulfonsäure	P4S
Polyacrylamid Gelelektrophorese	PAGE
Polyvinylidenfluorid	PVDF
Raumtemperatur	RT
Serotonin Rezeptor Typ 3	5-HT ₃ R
Structure-Activity Relationship	SAR
Svedberg Wert	S-Wert
tert-Butylbicyclophosphorothionate	TBPS
Tetrahydrodeoxycorticosteron	THDOC
Transmembrandomäne	TM
Vollentsalztes Wasser	VE-Wasser
Zentralnervensystem	ZNS
γ -Aminobuttersäure	GABA
γ -Aminobuttersäure Rezeptor Typ A	GABA _A R
δ -knockout	δ -KO

8.7 Lebenslauf

[Redacted text block]

[Redacted text block]

8.8 Publikationen

Structure-function evaluation of imidazopyridine derivatives selective for δ subunit containing γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors.

Yakoub, K.; Jung, S.; Sattler, C.; Damerow, H.; Weber, J.; Kretzschmann, A.; Cankaya, A. S.; Piel, M.; Rosch, F.; Haugaard, A. S.; Frolund, B.; Schirmeister, T.; Luddens, H., Structure-Function Evaluation of Imidazopyridine Derivatives Selective for delta-Subunit-Containing gamma-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. *J Med Chem* **2018**, *61* (5), 1951-1968.

8.9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank folgenden Personen aussprechen, ohne deren Mithilfe diese Promotionsarbeit nicht zustandegekommen wäre.

Zuerst bedenke ich mich sehr bei meinem Doktorvater [REDACTED] für die Möglichkeit unter seiner Betreuung diese Arbeit anzufertigen. Sehr dankbar bin ich für die Hilfsbereitschaft, Ideengebung und zahlreichen Gespräche, die mir den Zugang zu dieser Thematik eröffnet haben und die Durchführung vieler Versuche erleichterten.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei [REDACTED] für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit und den fachlichen Beitrag beim Verfassen unserer gemeinsamen Publikation. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei [REDACTED] bedanken für die sehr gute Zusammenarbeit und die zuverlässige Synthese sämtlicher Derivate.

Auch bei [REDACTED] und [REDACTED], sowie [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit während der Verfassung unserer gemeinsamen Publikation sehr bedanken. Auch hier hat mir die Synthese der Derivate und der fachliche Beitrag sehr geholfen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitstreitern und Kollegen für die schöne Zeit bedanken. Besonderer Dank gilt hier [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]. Es hat immer viel Spaß gemacht mit euch zusammen im Labor zu stehen.

Zuletzt möchte ich mich sehr bei meiner Familie und bei meinem Ehemann bedanken, die mich immer unterstützt haben.

8.10 Eidesstattliche Versicherung

Mainz, 07.08.2018

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Kirsten Yakoub, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades.

Ein bisher erworbener Doktorgrad wurde mir nicht aberkannt.

Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

Mit freundlichen Grüßen

Manuskript lt. Kapitel 8.8

“This document is the Accepted Manuscript version of a Published Work that appeared in final form in Structure-Function Evaluation of Imidazopyridine Derivatives Selective for delta-Subunit-Containing gamma-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. *J Med Chem* 2018, 61 (5), 1951-1968, copyright © American Chemical Society after peer review and technical editing by the publisher. To access the final edited and published work see <https://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-pjU5TdDpWb9SpvgwDz6I>

Structure-function evaluation of imidazopyridine derivatives selective for δ subunit containing γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors

Kirsten Yakoub^{a#}, Sascha Jung^{b#}, Christian Sattler^a, Helen Damerow^b, Judith Weber^c, Annika Kretzschmann^c, Aylin S. Cankaya^c, Markus Piel^c, Frank Rösch^c, Anne S. Haugaard^d, Bente Frølund^d, Tanja Schirmeister^{b}, Hartmut Lüddens^{a*}*

Institutes ^aDept. of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Mainz, Faculty of Health and Medical Sciences, D-55131 Mainz, Germany; ^bDept. of Pharmacy & Biochemistry and ^cDept. of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University Mainz, D-55128 Mainz, Germany; ^dDept. of Drug Design and Pharmacology, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark

GABA_A receptors; δ -selectivity; DS1; DS2; structure-activity relationship

ABSTRACT: Delta selective compounds 1 and 2 (DS1, compound **22**; DS2, compound **16**) were introduced as functionally selective modulators of δ -containing GABA receptors type A (GABA_AR). In our hands [³H]EBOB binding experiments with recombinant GABA_AR using compound **22**, showed no proof of δ -selectivity, though a minimally higher preference with respect to potency for $\alpha 4\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 2/3\delta$ receptors. In order to delineate the structural determinant for δ -preference, we synthesized 25 derivatives of DS1 and DS2, and investigated their structure-activity relationship (SAR). Four of our derivatives showed selectivity for $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors (**29**, **38**, **39**, **41**). All of them possess a variation at the *para*-position of the benzamide group as the major difference to compound **22**. However, two compounds (**29**, **39**), when tested in the presence of GABA, revealed an effect at several additional GABA_AR. The newly synthesized compounds will still serve as useful tools to investigate $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors.

INTRODUCTION

The main inhibitory neurotransmitter system in the brain, the γ -aminobutyric acid (GABA) system, with its predominant GABA receptors type A (GABA_AR) system is a target for several molecules, including benzodiazepines, neurosteroids, barbiturates, propofol, volatile anesthetics and, putatively, ethanol.¹⁻⁶ Their action leads to anxiolytic, sedative, memory-modifying, anticonvulsant, as well as hypnotic effects.

GABA_AR assemble as heteropentameric complexes from a variety of subunits (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π and ρ 1-3).² There are two different forms of inhibition mediated by GABA_AR. The subunit composition differs with different synaptic localization as well as type of inhibition mediated. Synaptic receptors, typically composed of two α , two β and one γ subunit, lead to phasic inhibition, whereas tonic inhibition is mediated mostly by peri- and extrasynaptic δ -containing receptors.⁷ These receptors are characterized by their enhanced GABA sensitivity and reduced desensitization properties and can be regarded as prototypic extrasynaptic receptors at ambient GABA concentrations.⁷ Extrasynaptic GABA_AR containing the δ subunit are found in the cerebellum, thalamus, olfactory bulb, cortex and hippocampus,⁸⁻⁹ where the δ subunit is frequently co-distributed with α 4 and α 6 subunits.⁹ The GABA_AR subtypes α 6 β 2/3 δ are expressed at high levels exclusively by mature cerebellar granule neurons.¹⁰⁻¹¹ In forebrain areas, e.g., in thalamic relay cells, neostriatum, dentate gyrus and some layers of the cortex, δ subunits are combined with α 4 and β 2/3 subunits.¹²⁻¹⁴ The existence of α 4 β 1 δ receptors is so far only postulated and still under investigation.¹⁵ In hippocampal interneurons tonic inhibition seems to be also conveyed via α 1 β δ receptors.¹⁶ The major fraction of non- δ -containing receptors found in areas other than synapses may be constituted by α 5 β 2-type receptors in the hippocampus.^{7, 17}

In contrast to γ 2-containing GABA_AR, which follow a strict arrangement order,¹⁸⁻¹⁹ δ -containing receptors may assemble less stringently.²⁰⁻²² Although the occurrence of δ -containing GABA_AR in different brain areas is well documented, the co-assembly and composition of these receptors, native or recombinant, as well as their detailed function is not completely understood. These receptors may be linked to several disorders like alcoholism, stroke, depression, epilepsy, schizophrenia and traumatic brain injury.²³⁻²⁴ In addition to the occurrence of δ -containing GABA_AR in the brain, δ subunit protein and mRNA was detected in the lamina II tissue of the spinal cord, where they could play a role in analgesia.²⁵⁻²⁷

Taken together, the uncertainties of δ -containing GABA_AR concerning physiological processes, pharmacological interactions, assembly order and partnering subunits demand novel pharmacological tools to differentiate these receptors from other subtypes *in vitro* and *in vivo*. Although many ligands, such as general anesthetics, neurosteroids and gaboxadol show enhanced potency at δ -containing GABA_AR, especially when partnered with α 4/6 and β 3 subunits,¹⁴ their selectivity is insufficient for detailed investigations. Later, the imidazopyridines DS1 and DS2 (Delta Selective compounds 1 and 2) were introduced by Wafford et al.

in 2009. In electrophysiological experiments, using human recombinant GABA_AR, the authors showed δ -selectivity for both compounds in combination with $\alpha 4$ and $\beta 3$ subunits.²⁸ Later experiments revealed a GABA-enhancing effect of DS2 at additional δ -containing receptors ($\alpha 1\beta 2\delta$, $\alpha 4\beta 1/2/3\delta$, $\alpha 6\beta 2\delta$), while numerous other GABA_AR remained unaffected.²⁹ However, the site of action for DS1 and DS2 is still unknown.²⁹

In the present study we used [³H]ethynylbicycloorthobenzoate ([³H]EBOB) binding to rat recombinant GABA_AR as an assay for the modulatory effect on GABA_AR function of the studied compounds. [³H]EBOB as well as *t*-[³⁵S]butylbicyclopophosphorothionate ([³⁵S]TBPS), both so called “cage convulsants”, are potent non-competitive GABA_AR antagonists binding to the picrotoxinin binding site within the GABA_AR ion channel.³⁰⁻³¹ The binding of [³H]EBOB and [³⁵S]TBPS is sensitive to conformational changes in the chloride channel, e.g. being reduced by increasing concentrations of the agonist GABA.³²⁻³⁵ This effect is potentiated by modulators such as benzodiazepines and neurosteroids, or in turn, reversed by inverse agonists.^{33, 35-39} Allosteric modulation of [³H]EBOB or [³⁵S]TBPS binding is also shown in the absence of GABA, indicating a direct effect on receptor conformation.^{32, 35, 38-40}

The correlation between allosteric modulation of GABA_AR binding of the cage convulsants and ionophore function has been shown numerous times, mostly for [³⁵S]TBPS,^{32, 41-43} but also for [³H]EBOB.^{31, 33, 40} The pharmacological profile of allosteric agents for [³⁵S]TBPS and [³H]EBOB binding modulation is very similar and therefore comparable.^{31, 34-35}

In initial [³H]EBOB binding experiments we experienced that DS1 (compound **22**, Figure 1) recognizes receptor subtypes additional to $\alpha 6\beta \delta$. In electrophysiological experiments this was also shown for DS2 (compound **16**, Figure 1), although, in both cases, with higher effects on δ -containing receptors. Thus, we set out to identify the pharmacophore of these δ -preferring candidates. A systematic structure-activity relationship (SAR study) was performed by synthesis of 25 derivatives of DS1 and DS2 (Figure 1), followed by their characterization in radioligand binding assays employing the ability of these ligands to modulate the [³H]EBOB binding.

We identified important positions in the chemical scaffold of DS1/DS2 for modulation of [³H]EBOB binding and provide evidence that the $\alpha 6$ subunit is more critical than the δ subunit. Our SAR study shows that replacing the chloride of the original DS1 molecule by a fluorinated or non-fluorinated butoxy group led to novel, now truly δ -selective modulators of [³H]EBOB binding using rat recombinant GABA_AR.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. The synthesis of *N*-[2-arylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]amides (**16–36**, **41–44**) was typically achieved in a two-step procedure. In the first step, the respective 2-aryl-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amines (**1–11**) were synthesized by multicomponent reactions starting from commercially available 2-amino-pyridines and aromatic aldehydes, cf. Scheme 1.

Amines **1–7** were synthesized using a modified version of the multicomponent reaction reported by van Niel et al. for the preparation of 8-methyl-2-thiophen-2-yl-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-ylamine (Method A, Scheme 1).⁴⁴ The aldehyde is converted into the bisulfite adduct with Na₂S₂O₅ and then refluxed with the respective 2-amino-pyridine to form the corresponding Schiff base. Addition of KCN to the reflux followed by slowly cooling to room temperature precipitated the desired amines, which were collected and further purified (yield range 41–68%). Another version of this reaction was used for the synthesis of amines **10** and **11** (Method B, Scheme 1). Here, the reaction was performed in ethanol/water with added BiCl₃ to enhance the electrophilicity of the aldehyde. However, amine **8** could not be derived with the above procedures. The double bromination of the 2-aminopyridine starting material likely results in reduced nucleophilicity of the amine group and poor solubility in aqueous solution. In a first attempt, amine **8** was synthesized in a mixture of water/ethanol (2.25/1) and refluxing for several hours after KCN addition (Method C, Scheme 1), but yields ranged between 9% and 17%. Therefore, the approach by Bienaymé et al. was envisaged for this compound (Method D, Scheme 1).⁴⁵ Bienaymé et al. use isocyanides instead of KCN to form secondary 2-aryl-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amines in methanol at room temperature. The use of *tert*-butyl isocyanide should allow acidic removal of the *tert*-butyl group afterwards. The *tert*-butyl protected intermediate was isolated in an acceptable yield (52%) and could be deprotected quantitatively to the desired amine **8** using 5 M hydrobromic acid. Amine **9** was obtained from **6** and 1,3-dibromobutane in a nucleophilic substitution step using K₂CO₃ as base (Method E, Scheme 1).

The second step in the reaction sequence was the amide bond formation (Scheme 2). The amines **1–11** were reacted with the respective acid chlorides in a mixture of toluene and pyridine at room temperature giving the desired *N*-[2-arylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]amides (**16–36**, **41–44**) in good yields (60–80%). Attempts to form the amide bond via standard coupling protocols (HBTU/TBTU, PPA, IBCF) failed due to the low nucleophilicity of the aromatic amine. Compounds with a free hydroxyl group (**37**, **40**) were synthesized either from the acetoxy protected precursor **30** or from the TBDPS protected compound **36** (Scheme 3). Removal of the acetoxy group was accomplished with 5 M NaOH in THF at room temperature. Cleavage of the TBDPS group was achieved with a 1 M solution of tetrabutyl ammonium fluoride. Both reactions provided the desired products in excellent yields (88–92%). Compound **37** was used for further derivatization. It was reacted in typical Williamson ether syntheses to form products **38** and **39** with a terminal fluorine as analogues to compound **29** (Scheme 4).

Screening for δ direct acting DS derivatives. In order to identify the structural characteristics of a directly acting, δ -selective [^3H]EBOB modulator on GABA_{A} R, the binding assay was initially executed in the absence of GABA. Promising candidates were then tested in the presence of GABA, thus mimicking a more physiological condition.

At first, the compounds were tested on $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_{A} R, one of the two δ -containing receptors in cerebellar granule cells of the mammalian brain, the other being the $\alpha 6\beta 2\delta$ receptor.¹⁰⁻¹¹ If no [^3H]EBOB binding modulation in concentrations up to 10 μM was observed the compounds were not further analyzed. Promising candidates displaying effects on $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_{A} R (Table 1, data highlighted in bold) were tested at $\alpha 1$ -, $\alpha 4$ - and $\alpha 6$ -containing receptors, as *in vivo* δ subunits only occur together with these three α subunits in addition to any of the three β variants.^{11, 13, 15-16}

Structure-Activity Relationship. All studied compounds possess an imidazopyridine moiety as the core structure. The lead compounds **16** and **22** were modified at three sites, i.e., the thiophene group, the chlorinated benzamide group and the bromo substituents at the pyridine moiety to investigate the structure-activity relationship. A broad range of derivatives (**16-21**, **23-27**, **30**, **32-33**, **40**, **42-44**), including the published compound **16** could be dismissed after the first testing on $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_{A} R as they showed no effect in the absence of GABA.

Compounds lacking the thiophene group (**44**) or having it replaced by a phenyl (**17**, **19**), a *p*-methoxyphenyl (**24**), a bromopropoxyphenyl (**25**), a furanyl (**42**) or a methylthiophene group (**43**) showed no [^3H]EBOB binding modulation. This indicates an essential role for the thiophene group for [^3H]EBOB binding modulation.

Compounds with less than two bromide atoms (**16**, **18**, **29**, **33**) showed no or little activity, while their double-brominated counterparts (**22**, **31**) were potent modulators with IC_{50} values of 0.31 and 0.86 μM , respectively (Table 1). The bromination state seems to play a major part in the potency of [^3H]EBOB binding modulation (see section below). Replacement of a bromide atom by a chloride atom (**27**, **32**) led to loss of activity, indicating the crucial role of this site.

The third site in the core scaffold of DS1 investigated in more detail was the benzamide group, in particular the *para*-position of the benzamide group. Compound **26**, possessing an acetamide group instead of the benzamide group showed no effect, indicating that the benzamide group is indeed crucial for action. Interestingly, even with only one bromide substituent, compound **28** with a cyclohexylcarboxamide group instead of the benzamide group was able to modulate [^3H]EBOB binding, but only with a negligible potency (Table 1, $\text{IC}_{50} = 10.1 \pm 2.8 \mu\text{M}$). For the group of analogs where only the *para*-position of the benzamide group is varied, a fluoro atom (**35**) but neither a methoxy (**23**) nor a fluoroethoxy (**34**) group is tolerated. However, elongating the carbon chain to a propoxy (**38**) or butoxy (**29**, **39**) group, fluorinated in two cases (**38**, **39**), seem to be beneficial for activity and selectivity for δ -containing GABA_{A} R in [^3H]EBOB binding assays (Table 1). Compound **41** bears a benzyloxy group at this position and showed the

lowest modulatory effect of the δ -selective compounds with no measurable IC_{50} value and an observable effect only at 10 μ M (max. inhibition = $54 \pm 11\%$), which may simply due to absence of bromide atoms. For the rest of the active compounds, **31**, **35** and **22** no δ -selectivity but a preference for most δ -containing $GABA_{A}R$ as revealed by their differential potency (Table 1) was observed. However, in case of compound **31** these effects were not significant.

The detailed SAR analysis revealed that a structural scaffold consisting of an imidazopyridine with at least one bromo substituent in the pyridine part and a thiophene and benzamidine group connected to the imidazo part were crucial for direct modulation of [3H]EBOB binding. The chloro substituent in the *para*-position of the benzamide group proved to be exchangeable by specific moieties, but was still important for [3H]EBOB binding modulation and partly responsible for δ -selectivity.

Modulation of [3H]EBOB binding by compounds **22 and **16** and comparison with electrophysiological data.** As we primarily searched for direct modulators, compound **16** was dismissed as a candidate for further investigation as no direct [3H]EBOB modulation was observed (max. inhibition = $20 \pm 10\%$ at 10 μ M). In contrast, compound **22** showed a robust modulation of recombinant δ -containing $GABA_{A}R$ in [3H]EBOB binding experiments (Table 1). The assumption of a direct effect by compound **22** and a GABA-modulatory effect of compound **16** is in agreement with previously published, electrophysiological data.²⁸ However, in [3H]EBOB binding assays with additional recombinant $GABA_{A}R$, we experienced a preference, but no selectivity for δ -containing receptors in terms of potency (Table 1, Figure 2). Comparison of $\alpha 4\beta 3\delta$ with other $\alpha 4$ -containing receptors showed increased IC_{50} values of 7-fold ($p < 0.005$) for $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ and 4-fold for $\alpha 4\beta 3$ receptors (difference nearly reaching significance with $p = 0.051$) (Figure 2B). In case of $\alpha 6$ - and $\beta 2$ -containing receptors the increase was 4- and 7-fold ($p < 0.005$ for $\alpha 6\beta 2$ and $\alpha 6\beta 2\gamma 2$) compared to $\alpha 6\beta 2\delta$ $GABA_{A}R$ (Figure 2D). The smallest difference in potency was observed for $\alpha 6$ - and $\beta 3$ -containing receptors with only a 2.5- to 3-fold shift compared to $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors ($p < 0.005$ for $\alpha 6\beta 3$, $p < 0.05$ for $\alpha 6\beta 3\gamma 2$) (Figure 2C). Although the potency of compound **22** for δ -containing $GABA_{A}R$ was for the most part significantly higher, no differences in efficacy between δ - and non- δ -containing receptors could be measured (Table 1, Figure 2). A slight modulation of [3H]EBOB binding in $\alpha 1$ -containing receptors by **22** was only observed at the highest concentration (10 μ M) (Figure 2A). Compound **22** was the most potent modulator of [3H]EBOB binding of all tested compounds, however, a 2.5-7-fold preference for δ -containing receptors might be insufficient for investigational use.

The results of [3H]EBOB binding modulation by **22** contradict the reported δ -selectivity of this compound in previously published electrophysiological tests.²⁸ Still, recent findings from Ahring et al. support our results. These findings also indicate a lack of selectivity of **22**, as the compound modulated the activity of human recombinant $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ receptors in the presence of GABA, as shown electrophysiologically.⁴⁶ In order to allow a better comparison between published electrophysiological data and our findings from [3H]EBOB binding assays, we also performed patch-clamp experiments of the lead compounds on rat recombinant

GABA_AR. There is no major publication that hints to crucial differences in the function of human as compared to rat GABA_AR subunits. Thus, this difference between our and previously reported data cannot be regarded as a potential pitfall. Additionally, we were able to further investigate compound **16**, which did not show any effect in [³H]EBOB binding modulation. This approach supported our results from [³H]EBOB binding modulation, as compound **16** was unable to sufficiently activate recombinant GABA_AR in the absence of GABA (Table 2, Figure 3A). Even at a concentration of 10 μM, **16** only slightly activated α4/6β3 and α4/6β3δ GABA_AR. In the presence of a GABA EC₂₀, compound **16** modulated α1/4/6β3δ receptors, as well as α6β3 ones (Table 3). These results confirm the assumption of compound **16** being solely a positive allosteric modulator,²⁸ but also challenge the reported δ-selectivity.²⁹ Consistent with the [³H]EBOB binding data compound **22** induced robust currents in the patch-clamp experiment in the absence of GABA (Table 2, Figure 3B). However, no δ-selectivity was observed as the compound was highly efficient at α4/6βδ receptors, as well as at α6β3 and α6β3γ2. The only discrepancy to [³H]EBOB binding modulation data is the lack of activation of α4β3 and α4β3γ2 receptors in electrophysiological experiments. In the presence of a GABA EC₂₀, the effect of compound **22** on not δ-containing receptors was even more pronounced (Table 3). Especially the binary receptors α1/4/6β3 exhibited similar EC₅₀ values as the corresponding δ-containing ones.

δ-selectivity of compound 29 and effect of bromo substituents on potency and efficacy. Compound **29** with its butoxy moiety attached to the benzamide group showed selectivity for α6β2/3δ receptors with IC₅₀ values of 2.18 ± 0.40 μM and 2.43 ± 0.78 μM, respectively with no measurable potency on α6β2/3 or α6β2/3γ2 receptors (Figure 4A,B). However, a marginal modulation of α6β3γ2 receptors could be observed at a concentration of 10 μM (10 ± 4%). [³H]EBOB binding in GABA_AR containing α1 and α4 subunits was unaffected (Table 1).

Compound **31** represents the double brominated derivative of **29**. Compared to compound **29** it showed an increased potency and efficacy on α6β3δ receptors (IC₅₀ = 0.86 ± 0.30 μM; max. inhibition = 71 ± 7%). However, in contrast to **29** it modulated the [³H]EBOB binding of other α6- and β3-containing receptors (Table 1). Compound **33** as the non-brominated derivative of **29** was devoid of any activity. The dissimilar results for these three compounds, only differing in the bromination state, underline its crucial role in the action on GABA_AR.

With the butoxy moiety not being exclusively responsible for δ-selectivity and bromination probably being a key factor for potency, the selectivity of compound **29** could be explained by concentration, obscuring the effect on other receptors in the low micromolar range. Nevertheless, in [³H]EBOB binding assays compound **29** remains selective up to 20 μM which approaches the solubility limit. This notion is further supported by the loss of selectivity of this compound in the presence of GABA (see section below).

Effect of GABA on δ -selectivity of DS derivatives 22, 29 and 39. [³H]EBOB binding experiments were performed in the presence of GABA for three compounds (22, 29, 39). Surprisingly, the potent effect of compound 22 on [³H]EBOB binding on nearly all $\alpha 6$ - and $\beta 3$ -containing receptors tested was independent of GABA in the test solution (Table 4). Similar findings have previously been described in electrophysiological experiments of 22 at $\alpha 4\beta 3\delta$ receptors.²⁸

Compounds 29 and 39 were both selective for $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors in comparison to the $\alpha 6\beta 3$ and $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ ones in the absence of GABA. However, both lost their selectivity in the presence of GABA (Table 4). While the modulatory effect on $\alpha 6\beta 3$ and $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptors was enhanced in the presence of GABA, no significant effect on $\alpha 6\beta 3\delta$ receptor modulation was observed, neither in potency nor in efficacy. In the presence of GABA, compound 29 modulated $\alpha 6\beta 3$ receptors to a maximal effect of $26 \pm 6\%$ and $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptors to $40 \pm 5\%$, compound 39 modulated $\alpha 6\beta 3$ receptors to a maximal effect of $57 \pm 11\%$ and $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptors to $44 \pm 7\%$. The effect of GABA on the efficacy of both compounds was highly significant (Table 4).

The fact that both compounds modulate additional receptors in presence of GABA may be explained in several ways. One possibility is that GABA activates receptors and leads to an IC_{50} shift and thus visualizes an effect that is obscured in its absence. That is a reasonable possibility for low affinity ligands like 29 where a further shift in potency between $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors and other $\alpha 6$ - and $\beta 3$ -containing receptors would result in IC_{50} values approaching the solubility limit. Alternatively or additionally, GABA changes the receptor conformation in such a way that it enables the compounds to enter the now available binding site. As a third option, selective compounds may bind to $\alpha 6\beta 3$ and $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptors in the absence of GABA but lack the ability to directly activate these receptors, thus they are positive allosteric modulators solely increasing the affinity for GABA. Differentiating between these possibilities was beyond the scope of this series of experiments.

Question of binding site and binding properties. The modulatory effect of the DS derivatives is clearly dependent on the α variant of $GABA_A$ R. Receptors containing $\alpha 6$ subunits are preferred by compound 22 over $\alpha 4$ -containing ones with regard to potency (Table 1). However, this effect was only significant for $\alpha 4/6\beta 3\gamma 2$ receptors ($p = 0.008$). The δ -selective compounds 29 and 39 exclusively modulated $\alpha 6$ -containing receptors (Table 1). None of the tested compounds was able to modulate [³H]EBOB binding to $\alpha 1$ -containing receptors. The β subunit seems to play a minor role, though for compound 39 selectivity for δ -containing receptors was only observed in combination with the $\beta 3$ variant (Table 1, Figure 4C,D). For this compound the potency for $\alpha 6\beta 2\delta$ receptors ($0.27 \pm 0.02 \mu M$) was increased 3-fold ($p < 0.005$) compared to $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors ($0.76 \pm 0.08 \mu M$). For compound 22 the effect was similar ($0.15 \pm 0.03 \mu M$ vs. $0.31 \pm 0.04 \mu M$) with a 2-fold higher ($p < 0.05$) potency on $\alpha 6\beta 2\delta$ receptors. No significant difference could be measured for the $\alpha 6\beta 2/3$ ($p = 0.185$) and $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ ($p = 0.486$) receptor pairs. Further, compound 22 did not differentiate between $\beta 2/3$ -containing receptors regarding its efficacy (Table 1). Compound 29 did not distinguish between $\alpha 6\beta 2/3\delta$ receptors, neither in potency ($p = 0.812$) nor in efficacy ($p = 0.615$). The significantly ($p < 0.05$) increased efficacy of compound

39 for $\alpha 6\beta 2$ receptors ($33 \pm 4\%$) in comparison to $\alpha 6\beta 3$ receptors ($11 \pm 6\%$), and the shift in potency for δ -containing receptors by compounds **22** and **39**, indicates a slight influence of the β subunit on modulatory properties of the mentioned compounds.

Compounds **22**, **28**, **35**, **31** modulated [^3H]EBOB binding also in the absence of a δ subunit, but with a preference for most δ -containing receptors (Table 1), however, these effects were not significant for compound **31**. Compounds **29**, **38**, **39**, **41** showed selectivity in the absence of GABA for $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors and in the case of **29** for $\alpha 6\beta 2\delta$ receptors as well (Table 1, Figure 4). These results lead to the question whether non-selective compounds address the same, an additional or a completely different binding site as δ -selective compounds. An additional binding site would explain the loss of selectivity for certain substances, with one binding site located on the δ subunit and an additional one located on another part of the receptor complex. The two binding site model could as well extend the three possibilities to explain the differences of selectivity in the absence and presence of GABA, i.e., one binding site being GABA-mimetic and thus enabling access to the modulatory site.

Regarding the high efficacy ($84 \pm 8\%$) and potency ($0.31 \pm 0.04 \mu\text{M}$) of compound **22** in comparison to compound **29** ($46 \pm 9\%$; $2.18 \pm 0.40 \mu\text{M}$) at $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors, the question of a correlation between potency and efficacy arises. After comparing measurements of several compounds at $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors this assumption can be dismissed. Compound **35** has a high efficacy ($87 \pm 9\%$), combined with a modest potency ($1.20 \pm 0.24 \mu\text{M}$). An even stronger phenotype is observed for compound **28**, where potency is especially low ($10.1 \pm 2.8 \mu\text{M}$) but efficacy is quite high ($85 \pm 14\%$). On the contrary, compound **39** showed high potency ($0.76 \pm 0.08 \mu\text{M}$), but only modest efficacy ($53 \pm 12\%$). Thus, potency and efficacy of the compounds for modulating $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ seem to be independently influenced by the structural composition of the molecules.

CONCLUSION

Compound **22** was originally published as a δ -selective $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ modulator.²⁸ In our hands this compound did not show selectivity but a significant preference for δ -containing receptors, which caused us to investigate the SAR and further optimize the structure to gain a selective derivative.

Four of the synthesized compounds stood out because they selectively and directly modulated the [^3H]EBOB binding of δ -containing $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$. These compounds have comparable alkyl groups in *para*-position of the benzamide group, which is the major difference to compound **22** possessing a chloro substituent at this position. Two of these compounds (**29**, **39**) were further investigated because of their promising modulatory effect on [^3H]EBOB binding. Both compounds showed selectivity in the absence of GABA for $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors, compound **29** additionally for $\alpha 6\beta 2\delta$ receptors. Besides the δ subunit selectivity, both compounds also showed $\alpha 6$ -selectivity. In the presence of GABA, compounds **29** and **39** lost their δ -selectivity and modulated other $\alpha 6$ - and $\beta 3$ -containing receptors.

Since no correlation between potency and efficacy of the compounds for $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors could be observed the structural determinants are apparently different and have to be investigated by more detailed SAR studies.

Altogether we identified two promising candidates, compounds **29** and **39**. Especially with regard to the *in vitro* investigation of recombinant δ -containing GABA_AR, these compounds may help to further investigate the assembly of $\alpha 6\beta 2/3\delta$ receptors.

EXPERIMENTAL SECTION

Syntheses.

General.

All reagents and solvents were of analytical-grade quality and purchased from *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Acros*, or *TCl*. Commercial chemicals were used without further purification, unless otherwise noted. Solvents were purified by distillation and desiccated by standard methods if necessary. ¹H and ¹³C spectra were recorded on a *Bruker Fourier AC-300*, on a *Bruker Avance* 400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm PABBO BB)¹H, ¹⁹F) Z-GRD probe or a *Bruker Avance* 600 MHz spectrometer equipped with a cryogenically cooled 5 mm CPDCH ¹³C(¹H) Z-GRD probe at 300 K using TMS as internal standard. DMSO-*d*₆, CDCl₃ or CD₃OD were used as solvent. Chemical shifts δ are given in parts per million (ppm) using residual proton peaks of the solvent as reference (¹H / ¹³C: DMSO: 2.50 / 39.52 ppm, CHCl₃: 7.26 / 77.16 ppm, MeOH: 3.31 / 49.00 ppm). Mass spectra were recorded on an *ESI-Micromass LCT* from *Micromass*. High resolution mass spectra were obtained on a *Waters Q-TOF-Ultima 3* instrument or on a *Thermo QExactive Orbitrap* mass spectrometer (*Thermo Scientific*, Bremen, Germany) equipped with an *AP-SMALDI* 10 ion source (*TransmitMIT*, Gießen, Germany) and operated at mass resolving power 140,000@m/z200 in positive ion mode with MALDI ionization. FD-MS was measured on a *Finnigan MAT 95* instrument. Purity of the compounds was determined using analytical reverse-phase HPLC and was > 95% for all compounds. Analytical HPLC was executed with a 250*4.6 mm *Kromasil 100 C18* 7 μ m column from *MZ-Analysentechnik*. The pump was a *PK-2080* from *Jasco*. The detector was a *UV-2075 Plus* from *Jasco*. Detection wavelength was $\lambda = 280$ nm. The flow rate was 1 mL/min. Analytical HPLC was also performed on a *Merck-Hitachi* HPLC system consisting of an L-7100 pump, an L-7200 autosampler, and an L-7400 UV detector (254 nm), using an *Chromolith SpeedROD RP-18* column (4.6 * 50 mm) eluted at a flow rate of 4.0 mL/min. A linear gradient elution was performed with eluent A (H₂O/TFA 100:0.1) containing 0% of solvent B (MeCN/H₂O/TFA, 90:10:0.01) rising to 100% of B during 5 min. Column chromatography was performed with silica gel (0.06 - 0.02 mm or 0.040 - 0.063 mm) purchased from *Macherey-Nagel* or *Merck*. All reactions were monitored by thin-layer chromatography using *Macherey-Nagel ALUGRAM Xtra SIL G/UV254* silica gel 60 plates for detection at 254 nm.

Syntheses of 2-aryl-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amines.

General Procedure.

0.015 mol (0.5 eq.) Na₂S₂O₅ were dissolved in 80 mL of distilled water. Then 0.03 mol (1.0 eq.) of the respective aldehyde was added and the mixture stirred for 30 min at rt. After addition of 0.03 mol (1.0 eq.) of the respective 2-amino-pyridine, the resulting solution was refluxed for 2 h. The solution was allowed to cool to 80 °C before 0.03 mol (1.0 eq.) KCN were added in one portion. After stirring for 1 h at 80 °C, the mixture was cooled to rt and stirred for additional 3 h. In the following, the mixture was cooled with an ice bath and the precipitate was collected by vacuum filtration. The residue was washed several times with cold water and once with 10 mL cooled (– 18 °C) ethyl acetate. Recrystallization of the crude product from H₂O/EtOH 4:1 yielded the respective 2-aryl-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amines (1–7) as yellow solids.

2-(Thiophen-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (1)

Synthesized following the general procedure using 2.85 g Na₂S₂O₅, 3.36 g thiophene-2-carbaldehyde, 2.82 g 2-amino-pyridine and 1.95 g KCN. Yield: 4.4 g (68%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.26. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.19 (dt, *J* = 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 3.6, 1.0 Hz, 1H), 7.46–7.29 (m, 2H), 7.11 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 7.03 (ddd, *J* = 9.1, 6.7, 1.2 Hz, 1H), 6.83 (td, *J* = 6.7, 1.1 Hz, 1H), 5.28 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 138.8, 138.5, 127.8, 125.5, 123.6, 123.2, 122.4, 121.9, 121.8, 116.2, 111.0.

2-Phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (2)⁴⁷

Synthesized following the general procedure using 2.85 g Na₂S₂O₅, 3.18 g benzaldehyde, 2.82 g 2-amino-pyridine and 1.95 g KCN. Yield: 4.1 g (65%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:3) = 0.47. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.24 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.46–7.36 (m, 3H), 7.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.04 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.83 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 138.8, 135.2, 128.3, 127.3, 126.5, 126.1, 125.9, 122.5, 121.8, 116.6, 110.8.

6-Bromo-2-(thiophen-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (3)

Synthesized following the general procedure using 2.85 g Na₂S₂O₅, 3.36 g thiophene-2-carbaldehyde, 5.19 g 2-amino-5-bromo-pyridine and 1.95 g KCN. Yield: 4.9 g (56%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.65. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.50 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.18–7.03 (m, 2H), 5.49 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 138.2, 136.7, 127.9, 126.2, 124.2, 124.0, 123.5, 122.2, 122.2, 117.3, 105.2.

6-Bromo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (4)⁴⁸

Synthesized following the general procedure using 2.85 g Na₂S₂O₅, 3.18 g benzaldehyde, 5.19 g 2-amino-5-bromo-pyridine and 1.95 g KCN. Yield: 4.5 g (52%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.62. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.54 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.53–7.35 (m, 3H), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 9.5, 1.5 Hz, 1H), 5.38 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 136.9, 134.7, 128.4, 127.6, 127.3, 126.1, 124.2, 122.3, 117.7, 105.1.

6-Bromo-2-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (5)

Synthesized following the general procedure using 2.85 g Na₂S₂O₅, 4.08 g 4-methoxy-benzaldehyde, 5.19 g 2-amino-5-bromo-pyridine and 1.95 g KCN. Yield: 3.9 g (41%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.51. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.50 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.79 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 157.9, 136.9, 128.6, 127.5, 127.2, 126.0, 123.9, 122.2, 117.4, 113.8, 104.9, 55.1.

4-(3-Amino-6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)phenol (6)

Synthesized following the general procedure using 2.85 g Na₂S₂O₅, 3.66 g 4-hydroxybenzaldehyde, 5.19 g 2-amino-5-bromo-pyridine and 1.95 g KCN. Yield: 3.7 g (43%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.16. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.45 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 156.1, 136.9, 129.2, 127.6, 125.6, 123.7, 122.1, 117.3, 115.2, 104.8.

6-Chloro-2-(thiophen-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (7)

Synthesized following the general procedure using 2.85 g Na₂S₂O₅, 3.36 g thiophene-2-carbaldehyde, 3.86 g 2-amino-5-chloro-pyridine and 1.95 g KCN. Yield: 4.3 g (58%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.64. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.44 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.48–7.39 (m, 2H), 7.12 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 11 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 138.2, 136.7, 127.9, 126.4, 124.0, 123.8, 122.19, 122.18, 120.1, 118.3, 117.1.

Synthesis of 6,8-dibromo-2-(thiophen-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (8)

Procedure 1. 0.01 mol (0.5 eq.) Na₂S₂O₅ were dissolved in 90 mL distilled water and 0.02 mol (1.0 eq.) thiophene-2-carbaldehyde were added. The resulting solution was stirred at rt for 30 min. Then 36 mL EtOH and 0.02 mol (1.0 eq.) 2-amino-3,5-dibromopyridine were added and the mixture was refluxed for 2 h. 0.02 mol (1.0 eq.) KCN were added in small portions to the

refluxing mixture. After heating at reflux for 2 h, the mixture was allowed to cool to rt and stirred for additional 3 h. EtOH was removed under reduced pressure and the remaining aqueous solution was cooled in an ice bath. The precipitate was collected by vacuum filtration and washed several times with cold water and once with cooled ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) ethyl acetate. Pure **8** was obtained after recrystallization from H₂O/MeOH 4:1 as brown-yellow solid (1.6 g, 17%).

Procedure 2. 2-Amino-3,5-dibromopyridine (1.00 g, 3.97 mmol) was dissolved in methanol (10 mL). Thiophene-2-carbaldehyde (557 μL , 5.96 mmol), *tert*-butylisocyanide (517 μL , 4.57 mmol) and a 1 M solution of perchloric acid in methanol (500 μL) were added before the solution was stirred for 24 h at room temperature. After additional isocyanide was added (135 μL , 1.20 mmol), the reaction mixture was again stirred for 24 h before it was diluted with dichloromethane (50 mL) and washed with aqueous NaHCO₃ ($2 \times 50\text{ mL}$) and brine (50 mL). The organic layer was dried with Na₂SO₄ and the solvent was evaporated *in vacuo*. The obtained residue was purified by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 30:1 + 3% triethylamine) to yield 6,8-dibromo-*N*-(*tert*-butyl)-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine as yellow crystals (888 mg, 2.07 mmol), yield 52%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.57 (d, $J = 1.7\text{ Hz}$, 1H), 7.82 (dd, $J = 3.6, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 7.74 (d, $J = 1.7\text{ Hz}$, 1H), 7.53 (dd, $J = 5.1, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 7.12 (dd, $J = 5.1, 3.6\text{ Hz}$, 1H), 4.83 (s, 1H), 1.10 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 137.4, 136.9, 135.7, 128.7, 127.5, 126.0, 125.7, 125.2, 123.8, 110.9, 104.4, 56.6, 30.1. This compound (716 mg, 1.67 mmol) was suspended in 5 M hydrobromic acid (20 mL) and stirred at 110 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h, then at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 1.5 h. After alkalization with 5 M solution of NaOH and extraction with ethyl acetate ($2 \times 50\text{ mL}$), the organic layer was dried with Na₂SO₄. Removal of the solvent *in vacuo* yielded **8** as yellow solid (610 mg, 1.64 mmol), yield 98%. R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:3) = 0.47. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.57 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 3.6\text{ Hz}$, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 5.1\text{ Hz}$, 1H), 7.14 (t, $J = 8.6\text{ Hz}$, 1H), 5.68 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 137.6, 134.3, 128.0, 125.6, 124.4, 123.7, 122.7, 121.9, 110.4, 104.1.

Synthesis of 6-bromo-2-[4-(3-bromopropoxy)phenyl]-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (**9**)

0.3 g (1 mmol, 1.0 eq.) **6**, 0.4 g (0.2 mL, 2 mmol, 2.0 eq.) 1,3-dibromopropane and 0.17 g (1.2 mmol, 1.2 eq.) K₂CO₃ were refluxed in 10 mL acetone for 8 h. Acetone was removed *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1) yielding **9** as yellow solid. Yield: 0.31 g (74%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.60. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.51 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 8.6\text{ Hz}$, 2H), 7.38 (d, $J = 9.4\text{ Hz}$, 1H), 7.11 (d, $J = 9.5\text{ Hz}$, 1H), 7.01 (d, $J = 8.6\text{ Hz}$, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.12 (t, $J = 5.9\text{ Hz}$, 2H), 3.69 (t, $J = 6.5\text{ Hz}$, 2H), 2.27 (quint, $J = 6.1\text{ Hz}$, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 157.0, 136.9, 128.3, 127.6, 127.4, 126.1, 124.1, 122.2, 117.4, 114.4, 105.0, 65.3, 31.9, 31.3.

Synthesis of 2-(furan-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (**10**)

To a solution of furan-2-carbaldehyde (0.2 mL, 2.41 mmol) in a mixture of H₂O (0.5 mL) and EtOH (0.5 mL) was added 2-aminopyridine (229 mg, 2.43 mmol), KCN (164 mg, 2.52 mmol) and BiCl₃ (37 mg, 0.117 mmol). H₂O (1 mL) was additionally added and the mixture was stirred at 110 °C for 1.5 h. The resulting dark brown mixture was evaporated directly on celite and purified by flash column chromatography (7:3 EtOAc/heptane) yielding the product as an orange semi-solid (147 mg, 31%). ¹H NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.16—8.13 (m, 1H), 7.69—7.68 (m, 1H), 7.35 (dt, *J* = 9.1, 1.1 Hz, 1H), 7.04—7.00 (m, 1H), 6.83—6.79 (m, 1H), 6.69 (dd, *J* = 3.3, 0.7 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 5.42—5.35 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 151.0, 141.6, 139.1, 127.5, 122.8, 122.1, 118.9, 116.9, 111.9, 111.4, 104.8.

Synthesis of 2-(5-methylthiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (11)

To a solution of 5-methylthiophene-2-carbaldehyde (0.87 mL, 7.93 mmol) in EtOH (10 mL) was added BiCl₃ (250 mg, 0.792 mmol) to form a suspension, which was stirred at ambient temperature for 20 min followed by addition of 2-aminopyridine (761 mg, 8.08 mmol). The reaction was refluxed at 95 °C for 1.5 h after which KCN (1.03 g, 15.9 mmol) was added along with H₂O (5 mL) and heating was continued at 107 °C for 6 h. The dark mixture was quenched with NaOH (1 M, 6 mL) and extracted with EtOAc (3 x 200 mL). The combined organic phase was dried over MgSO₄ and purified by flash column chromatography (8:2 EtOAc/heptane). The product was precipitated from EtOAc/heptane to afford an orange solid (315 mg, 17%). ¹H NMR (400 MHz; CD₃OD): δ [ppm] = 8.15 (dt, *J* = 6.9, 1.2 Hz, 1H), 7.38 (dt, *J* = 9.1, 1.1 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.17 (ddd, *J* = 9.1, 6.7, 1.3 Hz, 1H), 6.90—6.86 (m, 1H), 6.78 (dt, *J* = 3.5, 1.1 Hz, 1H), 2.52—2.50 (m, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 140.2, 138.6, 134.4, 125.5, 123.4, 123.3, 122.1, 115.2, 111.6, 13.7.

Syntheses of acid chlorides.

4-Butoxybenzoyl chloride (12)⁴⁹⁻⁵⁰

5.0 g (0.033 mol, 1.0 eq.) methyl-4-hydroxybenzoate, 6.75 g (0.05 mol, 1.5 eq.) 4-bromobutane and 5.5 g (0.04 mol, 1.2 eq.) K₂CO₃ were refluxed in 65 mL acetone for 10 h. The solution was cooled to rt and the precipitated inorganic salts were filtered off before acetone was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (SiO₂, petroleum/ethyl acetate 9:1) yielding methyl-4-butoxybenzoate as colorless oil (4.40 g, 64%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.71. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 1.78 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.49 (sext, *J* = 7.4 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 167.0, 163.1, 131.7, 122.4, 114.2, 68.0, 51.9, 31.3, 19.3, 13.9. 1.0 g (5 mmol, 1.0 eq.) methyl-4-butoxybenzoate and 1.0 g (25 mmol, 5 eq.) NaOH in 10 mL distilled water were refluxed for 2 h. After cooling to rt, the solution was acidified to pH 1 by addition of 1 M HCl. The

mixture was extracted three times with ethyl acetate, the combined organic layers were dried with Na₂SO₄ and the solvent was evaporated to yield 4-butoxybenzoic acid as colorless solid (0.93 g, 96%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 3:1) = 0.23. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.80 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.51 (sext, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 172.1, 163.8, 132.5, 121.5, 114.3, 68.1, 31.3, 19.3, 14.0. 0.7 g 4-butoxybenzoic acid was dissolved in 3 mL SOCl₂ and refluxed for 2 h. Then SOCl₂ was removed *in vacuo* yielding **12** as light-yellow oil, which was used directly in the next step without further purification or characterization.

4-(2-fluoroethoxy)benzoyl chloride (**13**)⁵¹

4-Hydroxybenzoic acid (200 mg, 1.45 mmol) and 40% aqueous *n*-Bu₄POH solution (2.02 mL, 2.896 mmol) was dissolved in dry THF (3 mL). After the mixture was cooled in an ice bath, 1-bromo-2-fluoroethanol (184 mg, 1.45 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 16 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude 4-(2-fluoroethoxy)benzoic acid was purified by column chromatography (methanol:dichloromethane, 1:40 + 3% formic acid) to give a colorless solid (95 mg, 0.52 mmol), yield 36%. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 7.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.79 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.21 (m, 1H). Spectral data match that reported in literature.⁵¹ Thionyl chloride (0.50 mL, 6.9 mmol) was added dropwise to 4-(2-fluoroethoxy)benzoic acid (85 mg, 0.46 mmol) under inert atmosphere. After heating at 85 °C for 4 h the excess of thionyl chloride was removed under high vacuum to give the title compound as light yellow oil. It was used without further purification or characterization.

4-Fluorobenzoyl chloride (**14**)⁵²

Thionyl chloride (77.7 μL, 1.07 mmol) was added dropwise to 4-fluorobenzoic acid (50.0 mg, 0.357 mmol) under inert atmosphere. After heating at 85 °C for 1.5 h the excess of thionyl chloride was removed under high vacuum to give the desired product **14** as colorless oil at room temperature, which sets under cooling. It was used without further purification or characterization in the next step.

4-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)benzoyl chloride (**15**)⁵³

To a solution of 4-hydroxybenzaldehyde (1.00 g, 8.20 mmol) and imidazole (1.45 g, 31.3 mmol) in DMF (15 mL) *tert*-butylchlorodiphenylsilane (2.77 mL, 10.7 mmol) was added and the mixture was stirred for 42 h at room temperature. After repeated addition of TBDPS-Cl (640 μL, 2.46 mmol), the solution was stirred for another 24 h before saturated aqueous NH₄Cl (20 mL) was added and extracted with diethyl ether (3 × 50 mL). The combined organic extracts were washed with brine (50 mL) and dried with Na₂SO₄ before the solvent was removed *in vacuo*. Purification of the crude product by column chromatography

(cyclohexan:ethyl acetate, 30:1) gave 4-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)benzaldehyde as colorless crystals (2.13 g, 5.92 mmol), yield 72%. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 9.81 (s, 1H), 7.74 – 7.67 (m, 4H), 7.67 – 7.61 (m, 2H), 7.49 – 7.34 (m, 6H), 6.90 – 6.82 (m, 2H), 1.11 (s, 9H). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 191.1, 161.3, 135.5, 132.0, 131.9, 130.4, 128.1, 127.9, 120.4, 26.5, 19.6.⁵³ 4-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)benzaldehyde (102 mg, 0.283 mmol) was dissolved in a mixture of dichloromethane/water (4 mL, ratio 1:1) before tetrabutylammonium hydrogensulfate (8.00 mg, 0.0248 mmol) was added. KMnO₄ (44.7 mg, 0.283 mmol) was subsequently added portion wise under ice cooling. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature before dichloromethane (15 mL) and 2 M hydrochloric acid (15 mL) were added and separated. After extraction of the aqueous phase with dichloromethane (2 × 20 mL) the organic layers were dried with Na₂SO₄ and the solvent removed *in vacuo*. Purification by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 9:1 + 3% formic acid) gave 4-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)benzoic acid as colorless solid (74 mg, 0.197 mmol), yield 70%. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.92 – 7.81 (m, 2H), 7.78 – 7.66 (m, 4H), 7.50 – 7.33 (m, 6H), 6.86 – 6.75 (m, 2H), 1.12 (s, 9H). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 171.8, 160.7, 135.5, 132.2, 130.3, 128.1, 122.2, 119.8, 26.5, 19.6.⁵⁴ 4-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)benzoic acid (374 mg, 0.99 mmol) was combined with oxalyl chloride (1 mL) under inert atmosphere and stirred for 3 h at room temperature. Excess oxalyl chloride was removed under high vacuum to yield **15** as slightly yellow liquid, which was used directly in the next step without further purification or characterization.

Syntheses of *N*-[2-arylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]amides.

General Procedure.

1.7 mmol (1.0 eq.) of the respective 2-aryl-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (**1–9**) were dissolved in 8 mL dry toluene and 4 mL dry pyridine. Then 1.9 mmol (1.1 eq.) of the specified acid chloride were added in one portion and the resulting mixture stirred for 1h at rt. 6 mL of distilled water were added and stirred for additional 15 min. The solution was cooled with an ice bath and the precipitate was collected by vacuum filtration, then washed several times with water and once with cooled (– 18 °C) acetone. The residue was purified by column chromatography (SiO₂) to yield the respective *N*-[2-arylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]amides (**16–33**) as colorless solids.

4-Chloro-*N*-[2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]benzamide (**16**)⁴⁴

Synthesized following the general procedure using 0.37 g **1** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 100:0. Yield: 0.43 g (71%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.14. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ [ppm] = 10.75 (s, 1H); 8.18-8.14 (m, 3H); 7.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); 7.62 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H); 7.55 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H); 7.49 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H); 7.34 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H); 7.13 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H); 6.96 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz,

DMSO-*d*₆), δ [ppm] = 165.7, 142.2, 137.3, 136.2, 134.1, 131.8, 130.0, 128.8, 127.9, 126.2, 125.6, 124.4, 123.9, 116.6, 114.1, 112.4. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₁₂ClN₃OS: 354.05, found: 354.06. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 9.48 min, purity > 99%. Spectral data match that reported in literature.⁴⁴

4-Chloro-*N*-(2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (17)

Synthesized following the general procedure using 0.36 g **2** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 25:75 to 50:50. Yield: 0.40 g (67%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 3:1) = 0.46. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.79 (s, 1H), 8.23–8.09 (m, 3H), 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.78–7.60 (m, 3H), 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.39–7.29 (m, 2H), 6.96 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.7, 142.1, 137.8, 137.3, 133.5, 131.8, 130.0, 128.8, 128.6, 127.7, 126.6, 125.3, 123.9, 116.9, 115.2, 112.3. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₁₄ClN₃O: 348.08, found: 348.09. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 10.68 min, purity: 98%.

***N*-[6-Bromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-4-chlorobenzamide (18)**

Synthesized following the general procedure using 0.50 g **3** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 100:0. Yield: 0.57 g (79%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.49. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.74 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.63–7.56 (m, 2H), 7.50–7.54 (m, 2H), 7.13 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.8, 140.6, 137.2, 135.7, 134.8, 131.9, 130.2, 128.7, 128.5, 128.0, 126.6, 124.8, 124.1, 117.7, 114.8, 106.5. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₁₁BrClN₃OS: 431.95, found: 431.92. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 18.07 min, purity: 98%.

***N*-(6-Bromo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-4-chlorobenzamide (19)**

Synthesized following the general procedure using 0.49 g **4** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 40:60 to 90:10. Yield: 0.44 g (61%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.53. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.78 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.77–7.59 (m, 3H), 7.51–7.38 (m, 3H), 7.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.8, 140.6, 138.6, 137.2, 133.1, 131.8, 130.2, 128.6, 128.3, 128.0, 126.7, 124.1, 118.1, 115.9, 106.5. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₁₃BrClN₃O: 425.99 found: 426.02. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 20.49 min, purity > 99%.

4-Methoxy-*N*-[2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]benzamide (20)⁴⁴

Synthesized following the general procedure using 0.37 g **1** and 0.32 g 4-methoxybenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 100:0. Yield: 0.39 g (66%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.18. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.50 (s, 1H), 8.22–8.00 (m, 3H), 7.61 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.19–7.08 (m, 3H), 6.95 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.0, 162.5, 142.1, 136.4, 134.1, 130.1, 127.8, 126.1, 125.4, 125.1, 124.3, 123.8, 116.6, 114.6, 113.9, 112.3, 55.6. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₁₅N₃O₂S: 350.09, found: 350.09. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 6.75 min, purity > 99%. Spectral data match that reported in literature.⁴⁴

***N*-[6-Bromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-4-methoxybenzamide (21)**

Synthesized following the general procedure using 0.50 g **3** and 0.32 g 4-methoxybenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 60:40 to 90:10. Yield: 0.54 g (75%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.36. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.51 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.65–7.54 (m, 2H), 7.51–7.40 (m, 2H), 7.19–7.09 (m, 3H), 3.88 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.1, 162.5, 140.5, 135.8, 134.8, 130.2, 128.3, 127.9, 126.5, 125.2, 124.7, 123.9, 117.7, 115.3, 113.8, 106.4, 55.6. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₁₄BrN₃O₂S: 428.00, found: 427.99. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 10.27 min, purity > 99%.

4-Chloro-*N*-[6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]benzamide (22)⁴⁴

Synthesized following the general procedure using 0.63 g **8** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 75:25 to 100:0. Yield: 0.51 g (59%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 3:1) = 0.43. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.84 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.14 (t, *J* = 8.7 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.8, 138.5, 137.3, 135.4, 135.0, 131.8, 130.2, 130.1, 128.6, 128.0, 127.0, 125.3, 124.0, 116.5, 110.7, 105.6. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₁₀Br₂ClN₃O₂S: 509.87, found: 509.89. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 38.73 min, purity > 99%. Spectral data match that reported in literature.⁴⁴

***N*-[6,8-Dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-4-methoxybenzamide (23)⁴⁴**

Synthesized following the general procedure using 0.63 g **8** and 0.32 g 4-methoxybenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 90:10. Yield: 0.53 g (62%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:3) = 0.27. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.59 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.27–6.99 (m, 3H), 3.88 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.1, 162.6, 138.4, 135.4, 135.2, 130.3,

130.0, 128.0, 126.9, 125.2, 125.1, 123.8, 117.0, 113.8, 110.4, 105.5, 55.6. ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{19}H_{13}Br_2N_3O_2S$: 505.91 found: 505.95. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 22.03 min, purity: 98%. Spectral data match that reported in literature.⁴⁴

***N*-[6-Bromo-2-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-4-chlorobenzamide (24)**

Synthesized following the general procedure using 0.54 g **5** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 100:0. Yield: 0.60 g (78%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.38. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.73 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.14 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.8, 159.2, 140.5, 138.7, 137.2, 131.9, 130.1, 128.6, 128.0, 125.5, 123.9, 117.8, 115.0, 114.1, 106.2, 55.2. ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{15}BrClN_3O_2$: 456.00, found: 456.03. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 20.45 min, purity > 99%.

***N*-[6-Bromo-2-[4-(3-bromopropoxy)phenyl]imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-4-chloro-benzamide (25)**

Synthesized following the general procedure using 0.72 g **9** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 100:0. Yield: 0.68 g (71%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.51. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.73 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.10 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.66 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.24 (quint, J = 6.2 Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.8, 158.3, 140.5, 138.7, 137.2, 131.8, 130.1, 128.6, 128.1, 125.7, 123.9, 117.8, 115.0, 114.7, 106.2, 65.3, 31.8, 31.2. ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{18}Br_2ClN_3O_2$: 561.95, found: 561.98. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 35.54 min, purity: 97%.

***N*-[6-Bromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]acetamide (26)**

Synthesized following the general procedure using 0.50 g **3** and 0.15 g acetyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 40:60 to 80:20. Yield: 0.44 g (78%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.30. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.15 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.63–7.50 (m, 3H), 7.42 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 2.24 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.5, 140.3, 135.9, 134.2, 128.2, 128.0, 126.4, 124.7, 123.9, 117.7, 115.1, 106.3, 22.9. ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{13}H_{10}BrN_3OS$: 335.97, found: 335.98. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 4.28 min, purity > 99%.

4-Chloro-*N*-[6-chloro-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]benzamide (27)⁴⁴

Synthesized following the general procedure using 0.42 g **7** and 0.33 g 4-chlorobenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 100:0. Yield: 0.48 g (73%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.52. ¹H NMR (300 MHz,

DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.76 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.75–7.63 (m, 3H), 7.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.8, 140.6, 137.2, 135.7, 135.1, 131.8, 130.2, 128.7, 128.0, 126.6, 126.4, 124.8, 122.1, 119.6, 117.5, 115.0. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₁₁Cl₂N₃OS: 380.00 found: 388.01. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 16.19 min, purity > 99%.

***N*-[6-Bromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]cyclohexancarboxamide (28)**

Synthesized following the general procedure using 0.50 g **3** and 0.28 g cyclohexanecarbonyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 40:60 to 50:50. Yield: 0.46 g (67%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:3) = 0.45. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.03 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.66–7.54 (m, 2H), 7.49 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.16 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.59 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 2.06 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.68 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 1.57–1.12 (m, 5H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 176.0, 140.4, 135.9, 134.4, 128.2, 127.9, 126.5, 124.7, 123.5, 117.8, 115.0, 106.3, 43.7, 28.9, 25.4, 25.3. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₁₈BrN₃OS: 404.04, found: 404.04. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 15.03 min, purity > 99%.

***N*-[6-Bromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-4-butoxybenzamide (29)**

Synthesized following the general procedure using 0.50 g **3** and 0.28 g **12**. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 90:10. Yield: 0.45 g (57%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:3) = 0.42. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.49 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.64–7.53 (m, 2H), 7.51–7.41 (m, 2H), 7.16–7.09 (m, 3H), 4.10 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.75 (quint, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.47 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.1, 162.0, 140.5, 135.8, 134.8, 130.2, 128.3, 127.9, 126.5, 124.9, 124.7, 123.9, 117.7, 115.3, 114.2, 106.4, 67.5, 30.6, 18.7, 13.7. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₂₀BrN₃O₂S: 470.05, found: 470.04. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 8.45 min, purity > 99%.

4-((2-(Thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)carbamoyl)phenyl acetate (30)

Synthesized following the general procedure using 197 mg **1** and 200 mg 4-acetoxybenzoyl chloride. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50 to 100:0. Yield: 0.23 g (65%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.45. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.69 (s, 1H), 8.25 – 8.11 (m, 3H), 7.66 – 7.47 (m, 3H), 7.43 – 7.29 (m, 3H), 7.13 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.0, 165.9, 153.6, 142.1, 136.26, 134.1, 130.5, 129.7, 127.9, 126.1, 125.5, 124.4, 123.9, 122.2, 116.6, 114.2, 112.4, 20.9. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₁₅N₃O₃S: 378.0907, found: 378.0888. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 9.26 min, purity: 98%.

4-Butoxy-*N*-(6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (31)

Synthesized following the general procedure using 200 mg **8** and 150 mg of **12**. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50. Yield: 0.21 g (62%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.55. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.57 (s, 1H), 8.60 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 3.7, 1.2 Hz, 1H), 7.21 – 7.05 (m, 3H), 4.10 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.74 (dq, *J* = 8.3, 6.5 Hz, 2H), 1.56 – 1.36 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.1, 162.0, 138.4, 135.4, 135.2, 130.3, 130.0, 128.0, 126.9, 125.2, 124.8, 123.7, 116.9, 114.2, 110.7, 105.5, 67.6, 30.6, 18.7, 13.7. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₁₉Br₂N₃O₂S: 547.9637, found: 547.9618. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 9.88 min, purity: 97%.

4-Butoxy-*N*-(6-chloro-2-(thiophene-2-yl)imidazol[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (32)

Synthesized following the general procedure using 0.50 g **7** and 0.64 g **12**. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 50:50. Yield: 0.50 g (66%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 1:1) = 0.38. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.56 (s, 1H), 8.50 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.75 – 7.66 (m, 1H), 7.59 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 3.6, 1.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 9.5, 1.3 Hz, 1H), 7.18 – 7.08 (m, 3H), 4.10 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.81 – 1.68 (m, 2H), 1.47 (h, *J* = 7.6 Hz, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.1, 162.0, 140.1, 135.0, 134.4, 130.3, 127.9, 126.9, 126.8, 125.1, 124.9, 122.1, 119.9, 117.1, 115.6, 114.3, 67.6, 30.6, 18.7, 13.7. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₂₀ClN₃O₂S: 426.10, found: 426.11. RP-HPLC: R_t (MeCN/H₂O 1:1) = 6.18 min, purity: 98%.

4-Butoxy-*N*-(2-(thiophene-2-yl)imidazol[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (33)

Synthesized following the general procedure using 0.30 g **1** and 0.45 g **12**. Column chromatography: SiO₂, ethyl acetate/petroleum 60:40. Yield: 0.24 g (60%). R_f (ethyl acetate/petroleum ether 2:1) = 0.45. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.73 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.20 – 8.05 (m, 2H), 7.84 – 7.53 (m, 4H), 7.26 – 7.06 (m, 4H), 4.11 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.55 – 1.36 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.3, 162.2, 140.4, 132.7, 131.1, 130.3, 128.7, 128.7, 127.9, 127.7, 126.1, 124.6, 115.3, 114.9, 114.4, 114.2, 67.6, 30.6, 18.7, 13.7. ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₂₁N₃O₂S: 392.1427 found: 392.1415. R_t (MeOH) = 4.82 min, purity: 98%.

Synthesis of *N*-(6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-4-(2-fluoroethoxy)benzamide (34)

To a solution of **8** (132.0 mg, 0.355 mmol) in a mixture of dry toluene (1.5 mL) and dry pyridine (0.9 mL) under inert atmosphere **13** (93.4 mg, 0.461 mmol) was added and the mixture was stirred for 16 h at room temperature. Water (0.5 mL) was added and the mixture was stirred for 10 min at room temperature. After cooling in an ice bath the precipitate was filtered off and washed with

cold water. Purification of the crude product by column chromatography (gradient hexane:ethyl acetate, 1:1 to hexane:ethyl acetate, 0:1) yielded **34** as colorless solid (132.6 mg, 0.25 mmol), yield 70%. ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.62 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 1.2, 3.6 Hz, 1H), 7.17 (m, 3H), 4.88 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.43 (m, 1H), 4.34 (m, 1H). ¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.5, 161.9, 138.9, 135.9, 135.6, 130.8, 130.5, 128.4, 127.4, 125.8, 125.7, 124.2, 117.3, 114.8, 111.2, 106.0, 83.3, 81.7. FD-MS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₁₄N₃O₂SBr₂F: 539.9, found: 539.9.

***N*-(6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-4-fluorobenzamide (35)**

Compound **8** (74.6 mg, 0.200 mmol) was dissolved in a mixture of dry toluene (0.5 mL) and dry pyridine (0.3 mL) under inert atmosphere before **14** (60.0 μL, 0.508 mmol) was added. The mixture was stirred for 69 h, then dichloromethane (10 mL) was added. The organic phase was washed with equal volumina of water, 1 M aqueous NaOH and 1 M aqueous hydrochloric acid before it was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was purified by column chromatography (gradient cyclohexane:ethyl acetate, 6:1 + 3% triethylamine to cyclohexane:ethyl acetate, 1:1 + 3% triethylamine) to yield **35** as colorless solid (89.8 mg, 0.181 mmol), yield 91%. ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.78 (s, 1H), 8.73 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.26 – 8.16 (m, 2H), 7.92 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 3.7, 1.2 Hz, 1H), 7.50 – 7.41 (m, 2H), 7.15 (dd, *J* = 5.0, 3.6 Hz, 1H). ¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.7, 164.6 (d, *J* = 250 Hz), 138.6, 135.4, 135.0, 131.1 (d, *J* = 9.3 Hz), 130.2, 129.5 (d, *J* = 2.8 Hz), 128.0, 127.0, 125.3, 123.9, 116.5, 115.6 (d, *J* = 22 Hz), 110.7, 105.7. HR-MS (ESI): [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₁₁N₃OSBr₂F: *m/z* = 493.8974, found 493.8981.

Synthesis of 4-((*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-*N*-(6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (36)

Compound **8** (185 mg, 0.496 mmol) was dissolved in a mixture of dry toluene (3 mL) and dry pyridine (1.5 mL) before it was added to **15** (353 mg, 0.893 mmol) under inert atmosphere. The solution was stirred for 43 h. Ethyl acetate (30 mL) was added and the organic layer was washed with 1 M aqueous hydrochloric acid and 1 M aqueous NaOH, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification of the crude product by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 8:1) gave **36** as colorless solid (271 mg, 0.370 mmol), yield 75%. ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.54 (s, 1H), 8.63 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.99 – 7.91 (m, 2H), 7.89 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.77 – 7.67 (m, 4H), 7.59 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.56 – 7.44 (m, 7H), 7.12 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 6.94 – 6.87 (m, 2H), 1.08 (s, 9H). ¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.0, 158.5, 138.4, 135.4, 135.1, 135.0, 131.5, 130.5, 130.2, 130.0, 128.2, 128.00, 126.9, 126.0, 125.3, 123.8, 119.2, 116.7, 110.7, 105.5, 26.2, 19.0.

Synthesis of *N*-(6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-4-hydroxybenzamide (37)

Compound **36** (129 mg, 0.176 mmol) was dissolved in freshly distilled tetrahydrofuran (2 mL) before a 1 M solution of tetrabutylammonium fluoride in THF (264 μ L, 0.264 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 24 h. After removal of the solvent under reduced pressure the crude product was obtained. Purification by column chromatography (gradient cyclohexane:ethyl acetate, 4:1 + 3% formic acid until 100% ethyl acetate + 3% formic acid) yielded product **37** as colorless solid (76.6 mg, 0.155 mmol), yield 88%. ^1H NMR: (300 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.49 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 8.57 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.07 – 7.95 (m, 2H), 7.91 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 5.0, 1.2 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 3.7, 1.2 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 6.99 – 6.88 (m, 2H). ^{13}C NMR: (75 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 166.2, 161.3, 138.4, 135.4, 135.2, 130.4, 130.0, 128.0, 126.9, 125.2, 123.7, 123.4, 117.1, 115.1, 110.8, 105.5. HR-MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{SBr}_2$: m/z = 491.9017, found 491.9023.

Synthesis of *N*-(6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-4-(3-fluoropropoxy)benzamide (**38**)

To a solution of 3-fluoropropan-1-ol (324 μ L, 4.00 mmol) in dichloromethane (4 mL) was added 4-methylbenzenesulfonyl chloride (839 mg, 4.40 mmol) portion-wise and pyridine (360 μ L, 4.40 mmol, 1.10 eq.) dropwise under ice cooling. The reaction mixture was then stirred for 7 h at room temperature. After addition of water (20 mL) and saturated aqueous NH_4Cl solution (10 mL) the mixture was extracted with ethyl acetate (3×60 mL). The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* before purification of the crude product by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 7:1) which yielded 3-fluoropropyl 4-methylbenzenesulfonate as highly viscous, colorless oil (684 mg, 2.95 mmol), yield 74%. ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.90 – 7.71 (m, 2H), 7.43 – 7.30 (m, 2H), 4.48 (dt, J = 47, 5.7 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.16 – 1.91 (m, 2H). ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 145.1, 132.9, 130.1, 128.0, 79.7 (d, J = 166 Hz), 66.3 (d, J = 4.9 Hz), 30.2 (d, J = 20 Hz), 21.8. This compound (31.5 mg, 0.134 mmol) was added to a solution of **37** (50.0 mg, 0.103 mmol) and K_2CO_3 (18.5 mg, 0.134 mmol) in DMF (4 mL). The resulting mixture was heated to 40 $^\circ\text{C}$ and stirred for 24 h under inert atmosphere. Next ethyl acetate (40 mL) was added and the organic phase washed with 1 M aqueous NaOH (3×30 mL) and dried over Na_2SO_4 before the solvent was removed under reduced pressure. Purification by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 5:1) yielded the title compound as colorless solid (17.5 mg, 0.0316 mmol), yield 31%. ^1H NMR: (300 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.60 (s, 1H), 8.63 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.20 – 8.04 (m, 2H), 7.91 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 5.1, 1.2 Hz), 7.52 (dd, J = 3.7, 1.2 Hz, 1H), 7.25 – 7.09 (m, 3H), 4.64 (dt, J = 47, 5.9 Hz, 2H), 4.21 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.16 (dp, J = 26, 6.1 Hz, 2H). ^{13}C NMR: (75 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 166.1, 161.7, 138.5, 135.4, 135.2, 130.3, 130.1, 128.0, 127.0, 125.2, 125.1, 123.8, 116.9, 114.3, 110.8, 105.6, 80.8 (d, J = 162 Hz), 64.0 (d, J = 5.4 Hz), 29.7 (d, J = 20 Hz). HR-MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{FSBr}_2$: m/z = 551.9392, found 551.9404.

Synthesis of *N*-(6,8-dibromo-2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-4-(4-fluorobutoxy)benzamide (**39**)

Compound **37** (38.7 mg, 0.0785 mmol) was dissolved in acetone (2 mL) and K_2CO_3 (14.1 mg, 0.102 mmol) was added. The mixture was stirred shortly before 1-bromo-4-fluorobutane (11.0 μ L, 0.102 mmol) and a catalytic amount of KI were added. The reaction mixture was then stirred for 24 h and heated under reflux, whereupon additional alkyl halogenide (0.0306 mmol) in acetone (0.5 mL) was added. The reaction mixture was finally stirred and heated under reflux for another 23 h before ethyl acetate (30 mL) was added and the organic phase was washed with 1 M aqueous NaOH solution (3×30 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 6:1 + 3% triethylamine) to yield **39** as colorless solid (15.3 mg, 0.0270 mmol), yield 35%. 1H NMR: (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 10.59 (s, 1H), 8.62 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.15 – 8.06 (m, 2H), 7.91 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 5.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 3.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.17 – 7.10 (m, 3H), 4.52 (dt, $J = 47, 5.9$ Hz, 2H), 4.14 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.93 – 1.72 (m, 4H). ^{13}C NMR: (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 166.1, 161.9, 138.5, 135.4, 135.2, 130.3, 130.0, 128.0, 127.0, 125.2, 124.9, 123.8, 116.9, 114.3, 110.8, 105.6, 83.6 (d, $J = 162$ Hz), 67.4, 26.6 (d, $J = 19$ Hz), 24.6 (d, $J = 5.3$ Hz). HR-MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{19}N_3O_2SBr_2F$: $m/z = 565.9549$, found 565.9551.

Synthesis of 4-hydroxy-*N*-(2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (**40**)

0.15 g of compound **30** were dissolved in 3 mL THF and 3 mL 5 M NaOH were added. The biphasic mixture was vigorously stirred for 3 h at rt. THF was removed under reduced pressure and the residue was diluted with 10 mL H_2O . The solution was acidified to pH 1 by addition of 3 M HCl. The precipitate formed was collected by vacuum filtration and dried *in vacuo*. The product was obtained as colorless solid (0.13 g, 92%). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 10.78 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 8.53 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.96 – 7.72 (m, 4H), 7.37 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 4.9, 3.9$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 166.6, 161.7, 144.7, 130.5, 129.3, 129.3, 128.0, 125.4, 122.9, 116.04, 115.98, 115.3, 113.40, 113.37, 108.8, 105.6. Purity by HPLC: 99%. ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{18}H_{13}N_3O_2S$: 336.0801, found: 336.0788.

4-(Benzyloxy)-*N*-(2-(thiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (**41**)

Compound **1** was reacted with 4-benzyloxybenzoylchloride following the general procedure. Yield: 90 mg (63%). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 10.49 (s, 1H), 8.18 – 8.04 (m, 3H), 7.60 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.57 – 7.28 (m, 8H), 7.22 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.12 (dd, $J = 4.9, 3.7$ Hz, 1H), 7.00 – 6.87 (m, 1H), 5.25 (s, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 166.1, 161.6, 139.8, 138.4, 136.6, 135.4, 135.2, 130.3, 128.5, 128.00, 127.98, 127.8, 127.0, 125.3, 123.8, 116.5, 114.7, 112.5, 110.7, 105.5, 69.4. ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{19}N_3O_2S$: 425.13, found: 425.14. RP-HPLC: R_t (MeCN/ H_2O 1:1) = 4.35 min, purity 98%.

Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-(furan-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (**42**)

Compound **10** (122 mg, 0.612 mmol) was dissolved in dry THF (20 mL). Pyridine (0.74 mL, 9.17 mmol) was added under nitrogen atmosphere and the reaction mixture was stirred for 5 min followed by addition of 4-chlorobenzoyl chloride (0.086 mL, 0.673 mmol). The reaction was stirred at ambient temperature for 1 h and subsequently quenched with H₂O (15 mL) and extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The combined organic phase was washed with H₂O and brine, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and reduced *in vacuo* to afford a light brown solid which was purified by flash column chromatography (8:2 EtOAc/heptane + 0.1% AcOH) to afford a brown film (162 mg). The product was precipitated from DCM/EtOAc (1:1, 30 mL) as a light brown solid, which was filtered, washed with EtOAc and dried (82.6 mg, 40%). ¹H-NMR (600 MHz; DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.69 (s, 1H), 8.15—8.12 (m, 3H), 7.75 (dd, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H), 7.70—7.68 (m, 2H), 7.60 (dt, *J* = 9.1, 1.0 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 9.1, 6.7, 1.3 Hz, 1H), 6.96 (td, *J* = 6.8, 1.1 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 3.3, 0.8 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 166.1, 149.1, 143.5, 142.8, 137.6, 132.4, 131.4, 130.4, 129.2, 125.9, 124.4, 117.2, 115.2, 112.8, 112.1, 108.3. Purity by HPLC: 99%, HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₁₂ClN₃O₂: 338.0691; found: 338.0693.

Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-(5-methylthiophene-2-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (**43**)

Compound **11** (315 mg, 1.37 mmol) was dissolved in dry THF (20 mL) and put under nitrogen atmosphere. Pyridine was added and the solution was stirred for 5 min followed by addition of 4-chlorobenzoyl chloride (0.19 mL, 1.51 mmol), the reaction was stirred at ambient temperature for 17 h and then at 50 °C for 30 min. After cooling to rt, H₂O (10 mL) was added and the aqueous phase was extracted with EtOAc (1 x 150 mL, 1 x 75 mL). The combined organic phase was washed with H₂O and brine and dried over MgSO₄ after which it was concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (2:1 EtOAc/heptane). The product was precipitated from EtOAc/heptane to afford a light yellow solid (264 mg, 52%). ¹H-NMR (600 MHz; DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.67 (s, 1H), 8.15—8.12 (m, 3H), 7.71—7.69 (m, 2H), 7.59 (dt, *J* = 9.1, 1.1 Hz, 1H), 7.32 (ddd, *J* = 9.1, 6.7, 1.3 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.94 (td, *J* = 6.8, 1.1 Hz, 1H), 6.81—6.80 (m, 1H), 2.45 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 166.1, 142.6, 140.0, 137.7, 134.8, 134.3, 132.3, 130.4, 129.3, 126.6, 125.8, 124.9, 124.2, 117.0, 114.1, 112.7, 15.4. Purity by HPLC: 96%, HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₁₄ClN₃OS: 368.0619; found: 368.0625.

Synthesis of 4-chloro-*N*-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)benzamide (**44**)

To a solution of formaldehyde (37% in H₂O, 0.94 mL, 12.6 mmol) in EtOH (10 mL) BiCl₃ (394 mg, 1.25 mmol) was added to form a white suspension, which was stirred at ambient temperature for 20 min. To the reaction mixture 2-aminopyridine (1.2 g, 12.7 mmol) was added and the reaction was refluxed for 1.5 h followed by addition of KCN (1.6 g, 24.5 mmol) along with H₂O (10 mL), the heating was continued for 4 h after which the reaction was quenched with NaOH (1 M, 6 mL) and filtered. The aqueous phase was extracted with EtOAc (100 mL) and the organic layer was washed with H₂O and brine and dried over MgSO₄

after which it was reduced on celite and purified by flash column chromatography (9:1 DCM/MeOH) to afford a yellow oil which crystallized over time (216 mg, 13%). The yellow residue was taken up in dry THF (20 mL) and pyridine (1.9 mL, 23.8 mmol) was added under nitrogen atmosphere followed by addition of 4-chlorobenzoyl chloride (0.25 mL, 1.90 mmol). The mixture was stirred at ambient temperature until the reaction was shown to be complete after 4 days. At the end of this time, H₂O (5 mL) was added, and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined organic phase was washed with H₂O and brine and dried over MgSO₄. The residue was evaporated on celite and purified by flash column chromatography (9.5:0.5 DCM/MeOH) to afford a mixture of white solid and yellow oil. The product was precipitated from EtOAc/heptane as a white fibrous solid (200 mg, 47%). ¹H-NMR (600 MHz; CD₃OD): δ [ppm] = 8.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.06—8.05 (m, 2H), 7.60—7.57 (m, 4H), 7.38 (ddd, *J* = 9.1, 6.7, 1.2 Hz, 1H), 7.01 (td, *J* = 6.8, 1.0 Hz, 1H). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.6, 142.8, 137.5, 132.4, 130.4, 129.1, 128.2, 124.6, 124.5, 120.3, 117.7, 112.3. mp: 141.5—143.7 °C, purity by HPLC: 99%, HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₀ClN₃O: 272.0585; found: 272.0591.

Ligand binding to recombinant receptors. Human embryonic kidney cells [HEK 293 cells; German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ), Braunschweig, Germany] were grown to < 50% confluency on 15-cm tissue plates in 20 mL DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1.8 mM glutamine as well as penicillin (1785 units) and streptomycin (1.8 mg). Transfection was carried out with a Ca²⁺-phosphate precipitation method essentially as previously described.⁵⁵ Briefly, plasmids were diluted in 1 mL/plate of 0.3125 M CaCl₂ in H₂O. One mL/plate of 2x HBS (274 mM NaCl; 1.5 mM Na₂HPO₄; 54.6 mM HEPES/ NaOH; pH 7.0) was added to the DNA and incubated for 90 s. Two mL of the mixture were pipetted immediately onto 15-cm plates. These were incubated for 18-24 h before the transfection medium was replaced by fresh medium. Double and triple combinations of rat GABA_A receptor cDNAs in eukaryotic expression vectors^{37, 56-57} of the α 1, α 4, α 6, β 2, β 3, γ 2S and δ subunits were employed. For optimal receptor expression, final concentrations (μ g vector DNA per 15-cm tissue culture plate) were: α 1, 2.5; α 4, 12; α 6, 2.5; β 2, 12; β 3, 0.5; γ 2S, 0.375 and δ , 2.5.

Cell membranes were prepared as previously described.⁵⁸ Briefly, cells were washed in PBS and harvested from tissue plates 48 h after transfection. Cells were homogenized in an Ultraturrax homogenizer for 15 s. Crude membranes were obtained after two centrifugation steps at 23000 g. Pellets were used immediately or frozen at -20 °C. Membrane pellets were resuspended in 50 mM Tris/citrate buffer, pH 7.3. Resuspended cell membranes (150-200 μ g protein per tube) were incubated in a final volume of 0.5 mL of 50 mM Tris/citrate buffer (pH 7.3), supplemented with 0.2 M NaCl, 3 nM [³H]EBOB (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and increasing concentrations of DS compounds in presence (0.1 μ M for α 6 β 3 γ 2/ δ and 0.5 μ M for α 6 β 3 receptors) or absence of GABA. DS derivatives were diluted in 50 mM Tris/citrate buffer (pH 7.3) from a stock of 10 mM in DMSO (giving a total DMSO concentration of 0.1%). GABA was diluted from a 10 mM solution in 50 mM Tris/citrate buffer (pH 7.3). Non-specific binding of

[³H]EBOB was determined by addition of 10 μM of EBOB. The binding assay procedure was essentially performed as described earlier,⁵⁸ though in the cited publication binding assays were executed with [³⁵S]TBPS. As the allosteric interaction of tested ligands on the binding properties of both convulsants has proven to be similar,^{31, 34-35} we adopted the procedure to assays executed with [³H]EBOB. Briefly, after addition of [³H]EBOB, cell membranes were incubated at room temperature for 90 min. We performed [³H]EBOB binding assays under these pre-equilibrium conditions (90 min incubation at 21 °C). The pre-equilibrium conditions were previously investigated and applied to [³⁵S]TBPS binding studies³² and adopted to [³H]EBOB binding experiments.⁴⁰ Assay mixtures were then rapidly diluted to 5 mL with ice-cold Tris/HCl, pH 7.5, and filtered through glass microfibre filters, grade GF/C (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, UK). The procedure was repeated once. Filters were incubated in 3.5 mL of Aquasafe 300 Plus scintillation fluid (*Zinsser Analytic*, Frankfurt, Germany). The radioactivity was determined in a Beckman liquid scintillation counter using external standardization. Protein quantification was performed according to the Bradford method⁵⁹ using Roti-Quant 5x concentrate (*Roth*, Karlsruhe, Germany).

Electrophysiology. HEK 293 cells were grown on glass cover slips and transiently transfected with final concentrations (μg vector DNA/94 mm tissue culture plate) of α1: 1, α4: 5, α6: 1, β3: 0.2, γ2: 0.4, δ: 1.5 and a Green Fluorescent protein (eGFP; *Clontech*, Heidelberg, Germany): 0.5. 24 h after transfection the medium was replaced by fresh solution and 48 h after transfection cover slips were transferred to a recording chamber under an upright microscope (*Zeiss Axioskop FS*, Jena, Germany). Cells were perfused at 3 mL/min with an extracellular solution (135 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, pH 7.4, adjusted to 320 mOsm with sucrose). Recordings of single, isolated and fluorescent cells were obtained in the whole cell configuration of the patch-clamp technique. The pipette solution contained 10 mM NaCl, 80 mM KCl, 50 mM KOH, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 3.1 mM ATP, 0.4 mM GTP, 10 mM EGTA and 10 mM HEPES, pH 7.2. Drugs were applied using a fast perfusion stepper system (SF-77B, *Warner Instruments, Inc.*, Midwest, USA) enabling solution exchange times of <20 ms (controlled by junction potential measurements). DS compounds were applied alone or in test solutions containing GABA at the receptor specific EC₂₀ of GABA for 4 s with 60 s between successive applications. Data were amplified, filtered at 1 kHz (4-pole Bessel) and recorded on a standard personal computer at a sampling rate of 3-5 kHz using EPC-9 patch-clamp amplifier and Pulse 8.11 (*HEKA electronics*, Lambrecht, Germany).

Calculation. [³H]EBOB binding analysis: Nonlinear regression was performed in Prism, version 6.05, on the four-parametric logarithmic dose-response equation formula ($y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{(\text{LogIC}_{50} - x) * \eta})$) with min and max being the minimum and maximum value, x the concentration of the derivative in μM and η Hill coefficient. The term “Hill coefficient” should be read as “pseudo-Hill coefficient” when dealing with allosteric as contrasting to direct effects. 100% was defined as the value in the absence of any modulator; 0% was defined by the blank value, i.e., in the presence of an excess of unlabelled EBOB. The maximum was set constant to 100%, the minimum was fitted. Data are given as the mean ± S.E.M. for the IC₅₀ curves and mean

± S.D. for effects of single concentration. For statistical comparison Student's t-test was used. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Electrophysiology: Data analysis was performed using ClampFit 8.1 (Axon Instruments) and Origin 8.5 (Microcal, Northampton, MA, USA). Direct activation by compounds **16** and **22** were expressed by the ratio $I_{1\mu\text{M}}/I_{1\text{mM GABA}}$. To calculate concentrations eliciting 50% of the maximal modulation of GABA induced currents (EC_{50}), peak currents (I_{max}) were plotted against the ligand concentration (LIG) and fitted with the logistic function $y = I_{\text{min}} + (I_{\text{max}} - I_{\text{min}}) / (1 + ([\text{LIG}]/EC_{50})^{\text{Hill}})$ using a least square fitting routine, where I_{min} represents the current induced by the receptor specific EC_{20} for GABA, I_{max} the maximal modulation, and Hill the Hill coefficient. The term "Hill coefficient" should be read as "pseudo-Hill coefficient" when dealing with allosteric as contrasting to direct effects. Responses of compounds **16** and **22** were expressed as percentage of control responses.

It should be explicitly mentioned that in this manuscript all shown Hill coefficients should be read as pseudo-Hill coefficients. True Hill coefficients reflect the number of binding sites of a ligand inducing the measured effect, i.e., the effect of GABA on GABA_AR has to be seen in this context. In contrast, a modulatory or indirect effect can assume any positive or negative figure, i.e., independent of the number of binding sites. It has to be called pseudo-Hill coefficient as the mathematics behind its determination are identical to that for the true Hill coefficient.

REFERENCES

1. Rudolph, U.; Antkowiak, B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5* (9), 709-720.
2. Rudolph, U.; Knoflach, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (9), 685-697.
3. Korpi, E. R.; Gründer, G.; Lüddens, H. Drug interactions in GABA_A receptors. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *67* (2), 113-159.
4. Roberto, M.; Varodayan, F. P. Synaptic targets: chronic alcohol actions. *Neuropharmacology* **2017**, *122*, 85-99.
5. Wang, M. Neurosteroids and GABA-A receptor function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2011**, *2*, 44.
6. Zurek, A. A.; Yu, J.; Wang, D. S.; Haffey, S. C.; Bridgwater, E. M.; Penna, A.; Lecker, I.; Lei, G.; Chang, T.; Salter, E. W.; Orser, B. A. Sustained increase in α 5GABA_A receptor function impairs memory after anesthesia. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (12), 5437-5441.
7. Farrant, M.; Nusser, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6* (3), 215-229.
8. Pirker, S.; Schwarzer, C.; Wieselthaler, A.; Sieghart, W.; Sperk, G. GABA_A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **2000**, *101* (4), 815-850.
9. Sieghart, W.; Sperk, G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2* (8), 795-816.
10. Wisden, W.; Korpi, E. R.; Bahn, S. The cerebellum: a model system for studying GABA_A receptor diversity. *Neuropharmacology* **1996**, *35* (9-10), 1139-1160.
11. Jones, A.; Korpi, E. R.; McKernan, R. M.; Pelz, R.; Nusser, Z.; Makela, R.; Mellor, J. R.; Pollard, S.; Bahn, S.; Stephenson, F. A.; Randall, A. D.; Sieghart, W.; Somogyi, P.; Smith, A. J.; Wisden, W. Ligand-gated ion channel subunit partnerships: GABA_A receptor α 6 subunit gene inactivation inhibits δ subunit expression. *J. Neurosci.* **1997**, *17* (4), 1350-1362.
12. Chandra, D.; Jia, F.; Liang, J.; Peng, Z.; Suryanarayanan, A.; Werner, D. F.; Spigelman, I.; Houser, C. R.; Olsen, R. W.; Harrison, N. L.; Homanics, G. E. GABA_A receptor α 4 subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, *103* (41), 15230-15235.
13. Sur, C.; Farrar, S. J.; Kerby, J.; Whiting, P. J.; Atack, J. R.; McKernan, R. M. Preferential coassembly of α 4 and δ subunits of the γ -aminobutyric acid_A receptor in rat thalamus. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56* (1), 110-115.
14. Olsen, R. W.; Sieghart, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60* (3), 243-260.
15. Villumsen, I. S.; Wellendorph, P.; Smart, T. G. Pharmacological characterisation of murine α 4 β 1 δ GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Neurosci.* **2015**, *16*, 8.
16. Glykys, J.; Peng, Z.; Chandra, D.; Homanics, G. E.; Houser, C. R.; Mody, I. A new naturally occurring GABA_A receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10* (1), 40-48.
17. Fritschy, J. M.; Johnson, D. K.; Mohler, H.; Rudolph, U. Independent assembly and subcellular targeting of GABA_A-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci. Lett.* **1998**, *249* (2-3), 99-102.

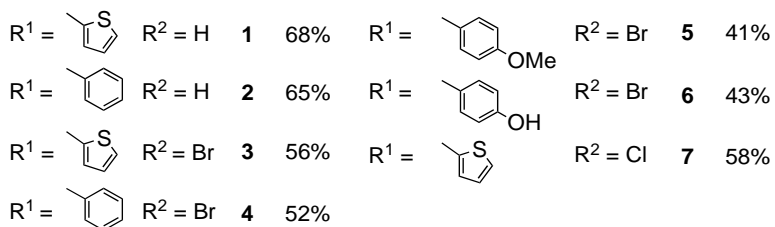
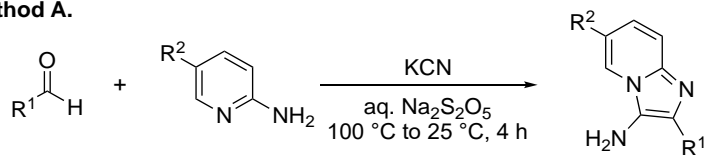
18. Baumann, S. W.; Baur, R.; Sigel, E. Forced subunit assembly in $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A receptors. Insight into the absolute arrangement. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (48), 46020-46025.
19. Baumann, S. W.; Baur, R.; Sigel, E. Subunit arrangement of γ -aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (39), 36275-36280.
20. Baur, R.; Kaur, K. H.; Sigel, E. Structure of $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A receptors and their lack of ethanol sensitivity. *J. Neurochem.* **2009**, *111* (5), 1172-1181.
21. Baur, R.; Kaur, K. H.; Sigel, E. Diversity of structure and function of $\alpha 1\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A receptors: comparison with $\alpha 1\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 3\delta$ receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (23), 17398-17405.
22. Kaur, K. H.; Baur, R.; Sigel, E. Unanticipated structural and functional properties of δ -subunit-containing GABA_A receptors. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (12), 7889-7896.
23. Egawa, K.; Fukuda, A. Pathophysiological power of improper tonic GABA_A conductances in mature and immature models. *Front. Neural Circuits* **2013**, *7*, 170.
24. Whissell, P. D.; Lecker, I.; Wang, D. S.; Yu, J.; Orser, B. A. Altered expression of δ GABA_A receptors in health and disease. *Neuropharmacology* **2015**, *88*, 24-35.
25. Bonin, R. P.; Labrakakis, C.; Eng, D. G.; Whissell, P. D.; De Koninck, Y.; Orser, B. A. Pharmacological enhancement of δ -subunit-containing GABA_A receptors that generate a tonic inhibitory conductance in spinal neurons attenuates acute nociception in mice. *Pain* **2011**, *152* (6), 1317-1326.
26. Takahashi, A.; Mashimo, T.; Uchida, I. GABAergic tonic inhibition of substantia gelatinosa neurons in mouse spinal cord. *Neuroreport* **2006**, *17* (12), 1331-1335.
27. Peng, H. Y.; Chen, G. D.; Lee, S. D.; Lai, C. Y.; Chiu, C. H.; Cheng, C. L.; Chang, Y. S.; Hsieh, M. C.; Tung, K. C.; Lin, T. B. Neuroactive steroids inhibit spinal reflex potentiation by selectively enhancing specific spinal GABA_A receptor subtypes. *Pain* **2009**, *143* (1-2), 12-20.
28. Wafford, K. A.; van Niel, M. B.; Ma, Q. P.; Horridge, E.; Herd, M. B.; Peden, D. R.; Belelli, D.; Lambert, J. J. Novel compounds selectively enhance δ subunit containing GABA_A receptors and increase tonic currents in thalamus. *Neuropharmacology* **2009**, *56* (1), 182-189.
29. Jensen, M. L.; Wafford, K. A.; Brown, A. R.; Belelli, D.; Lambert, J. J.; Mirza, N. R. A study of subunit selectivity, mechanism and site of action of the delta selective compound 2 (DS2) at human recombinant and rodent native GABA_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168* (5), 1118-1132.
30. Squires, R. F.; Casida, J. E.; Richardson, M.; Saederup, E. [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binds with high affinity to brain-specific sites coupled to γ -aminobutyric acid-A and ion recognition sites. *Mol. Pharmacol.* **1983**, *23* (2), 326-336.
31. Cole, L. M.; Casida, J. E. GABA-gated chloride channel: binding-site for 4'-ethynyl-4-normal-[2,3-H-3(2)]propylbicycloorthobenzoate (³H]EBOB) in vertebrate brain and insect head. *Pestic. Biochem. Phys.* **1992**, *44* (1), 1-8.
32. Maksay, G.; Simonyi, M. Kinetic regulation of convulsant (TBPS) binding by GABAergic agents. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *30* (4), 321-328.

33. Maksay, G.; Biro, T. High affinity, heterogeneous displacement of [³H]EBOB binding to cerebellar GABA_A receptors by neurosteroids and GABA agonists. *Neuropharmacology* **2005**, *49* (4), 431-438.
34. Yagle, M. A.; Martin, M. W.; de Fiebre, C. M.; de Fiebre, N. C.; Drewe, J. A.; Dillon, G. H. [³H]Ethynylbicycloorthobenzoate ([³H]EBOB) binding in recombinant GABA_A receptors. *Neurotoxicology* **2003**, *24* (6), 817-824.
35. Uusi-Oukari, M.; Maksay, G. Allosteric modulation of [³H]EBOB binding to GABA_A receptors by diflunisal analogues. *Neurochem. Int.* **2006**, *49* (7), 676-682.
36. Maksay, G.; Korpi, E. R.; Uusi-Oukari, M. Bimodal action of furosemide on convulsant [³H]EBOB binding to cerebellar and cortical GABA_A receptors. *Neurochem. Int.* **1998**, *33* (4), 353-358.
37. Korpi, E. R.; Lüddens, H. Furosemide interactions with brain GABA_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120* (5), 741-748.
38. Supavilai, P.; Karobath, M. Differential modulation of [³⁵S]TBPS binding by the occupancy of benzodiazepine receptors with its ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **1983**, *91* (1), 145-146.
39. Evers, A. S.; Chen, Z. W.; Manion, B. D.; Han, M.; Jiang, X.; Darbandi-Tonkabon, R.; Kable, T.; Bracamontes, J.; Zorumski, C. F.; Mennerick, S.; Steinbach, J. H.; Covey, D. F. A synthetic 18-norsteroid distinguishes between two neuroactive steroid binding sites on GABA_A receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333* (2), 404-413.
40. Maksay, G.; Fodor, L. Differential effects of two major neurosteroids on cerebellar and cortical GABA_A receptor binding and function. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *650* (1), 94-101.
41. Korpi, E. R.; Lüddens, H. Regional γ -aminobutyric acid sensitivity of *t*-butylbicyclophosphor[³⁵S]thionate binding depends on γ -aminobutyric acid_A receptor α subunit. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44* (1), 87-92.
42. Hawkinson, J. E.; Kimbrough, C. L.; Belelli, D.; Lambert, J. J.; Purdy, R. H.; Lan, N. C. Correlation of neuroactive steroid modulation of [³⁵S]*t*-butylbicyclophosphorothionate and [³H]flunitrazepam binding and γ -aminobutyric acid_A receptor function. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *46* (5), 977-985.
43. Maksay, G. From kinetics and thermodynamics of GABA_A receptor binding to ionophore function. *Neurochem. Int.* **1996**, *29* (4), 361-370.
44. Van Niel, M. B.; Miah, A. Substituted Imidazo[1,2-a]pyridines and their Use as Agonists at GABA_A Receptors for Treating and Preventing Neurological or Psychiatric Disorders. UKPatentGB2448808A, 21.04.2008, 2008.
45. Bienaymé, H.; Bouzid, K. A new heterocyclic multicomponent reaction for the combinatorial synthesis of fused 3-aminoimidazoles. *Angewandte Chemie* **1998**, *37* (16), 2234-2237.
46. Ahring, P. K.; Bang, L. H.; Jensen, M. L.; Strobaek, D.; Hartiadi, L. Y.; Chebib, M.; Absalom, N. A pharmacological assessment of agonists and modulators at $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA_A receptors: The challenge in comparing apples with oranges. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 563-576.
47. Guchhait, S. K.; Chaudhary, V.; Madaan, C. A chemoselective Ugi-type reaction in water using TMSCN as a functional isonitrile equivalent: generation of heteroaromatic molecular diversity. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (46), 9271-9277.
48. Shaabani, A.; Maleki, A. Ionic liquid promoted one-pot three-component reaction: synthesis of annulated imidazo[1,2-a]azines using trimethylsilylcyanide. *Monatsh. Chem.* **2007**, *138* (1), 51-56.

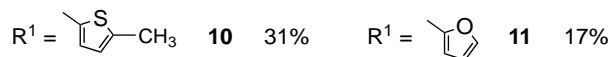
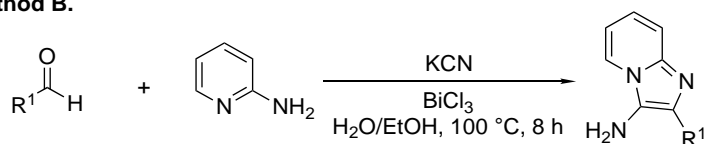
49. Jaseer, E. A.; Prasad, D. J. C.; Sekar, G. Domino synthesis of 2-arylbenzo[b]furans by copper(II)-catalyzed coupling of o-iodophenols and aryl acetylenes. *Tetrahedron* **2010**, *66* (11), 2077-2082.
50. Reddy, M. K.; Reddy, K. S.; Prakash, M.; Narasimhaswamy, T. Synthesis and characterization of two phenyl ring core-based thiophene mesogens. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2013**, *582* (1), 1-14.
51. Rosenberg, A. J.; Liu, H.; Jin, H.; Yue, X.; Riley, S.; Brown, S. J.; Tu, Z. Design, synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of an ¹⁸F-labeled sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) PET tracer. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (13), 6201-6220.
52. Hattori, T.; Satoh, T.; S., M. Convenient synthesis of triarlamines via ester-mediated nucleophilic aromatic substitution. *S. Synthesis* **1996**, *1996* (4), 514-518.
53. Manse, Y.; Ninomiya, K.; Nishi, R.; Kamei, I.; Katsuyama, Y.; Imagawa, T.; Chaipech, S.; Muraoka, O.; Morikawa, T. Melanogenesis inhibitory activity of a 7-O-9'-linked neolignan from *Alpinia galanga* fruit. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (23), 6215-6224.
54. Neubauer, T.; Kammerer-Pentier, C.; Bach, T. Total synthesis of (+)-bretonin B: access to the (E,Z,E)-triene core by a late-stage Peterson elimination of a convergently assembled silyl ether. *Chem. Commun. (Camb.)* **2012**, *48* (95), 11629-11631.
55. Jordan, M.; Schallhorn, A.; Wurm, F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (4), 596-601.
56. Hevers, W.; Korpi, E. R.; Lüddens, H. Assembly of functional $\alpha 6\beta 3\gamma 2\delta$ GABA_A receptors *in vitro*. *Neuroreport* **2000**, *11* (18), 4103-4106.
57. Lüddens, H.; Korpi, E. R. GABA antagonists differentiate between recombinant GABA_A/benzodiazepine receptor subtypes. *J. Neurosci.* **1995**, *15* (10), 6957-6962.
58. Lüddens, H.; Korpi, E. R. Methods for Transient Expression of Hetero-Oligomeric Ligand-Gated Ion Channels. In *Receptor Signal Transduction Protocols*, Challiss, R. A. J., Ed. Humana Press: Totowa, New Jersey, 1997; Vol. 83, pp 55-63.
59. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

Scheme 1. Syntheses of 2-aryl-imidazo[1,2-a]pyridin-3-amines

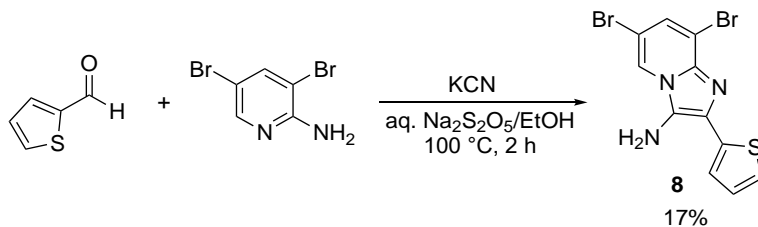
Method A.



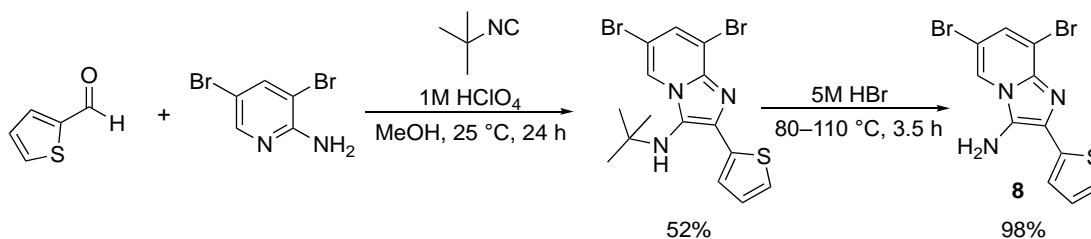
Method B.



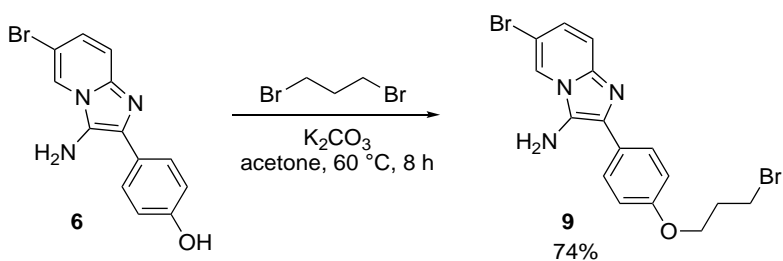
Method C.



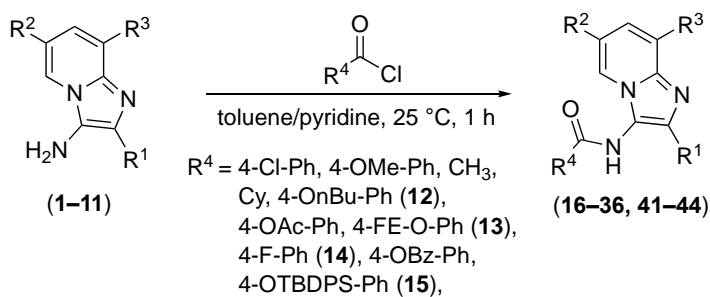
Method D.



Method E.

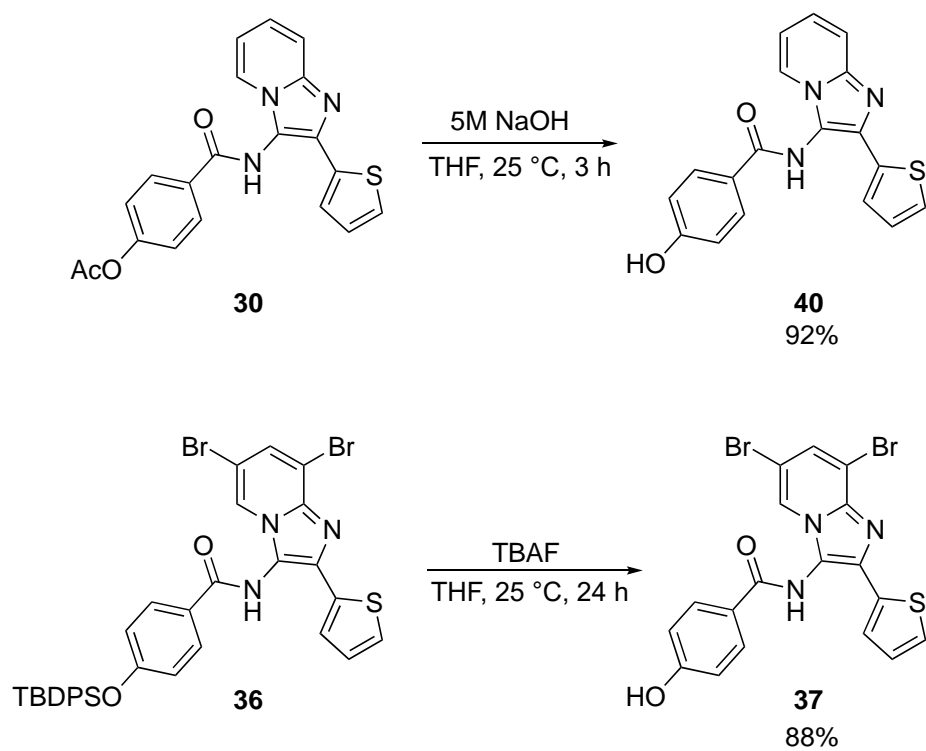


Scheme 2. Syntheses of *N*-[2-arylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]amides. Compound **16** = DS2, compound **22** = DS1.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Yield (%)		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Yield (%)
16		H	H		71	29		Br	H		57
17		H	H		67	30		H	H		65
18		Br	H		79	31		Br	Br		62
19		Br	H		61	32		Cl	H		66
20		H	H		66	33		H	H		60
21		Br	H		75	34		Br	Br		70
22		Br	Br		59	35		Br	Br		91
23		Br	Br		62	36		Br	Br		75
24		Br	H		78	41		H	H		63
25		Br	H		71	42		H	H		40
26		Br	H		78	43		H	H		52
27		Cl	H		73	44	H	H	H		47
28		Br	H		67						

Scheme 3. Syntheses of compounds with a hydroxyl group in *p*-position of the benzamide part



Scheme 4. Syntheses of compounds **38** and **39** with terminally fluorinated alkyl chains

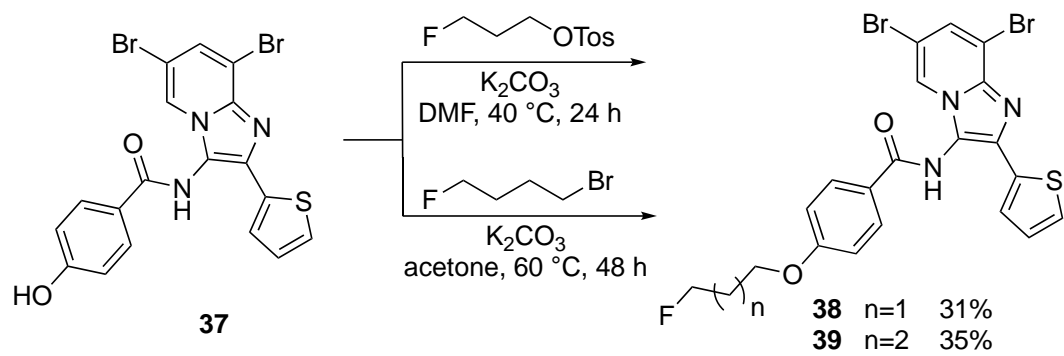


Figure 1. Structure of δ -selective compounds 1 and 2 (DS1 and DS2) and general structure of the derivatives synthesized for structure-function evaluation.

Figure 1

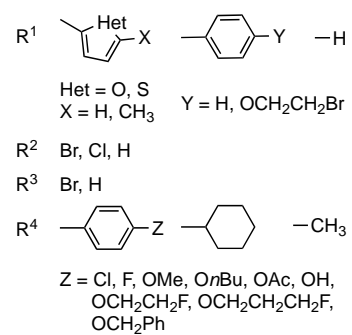
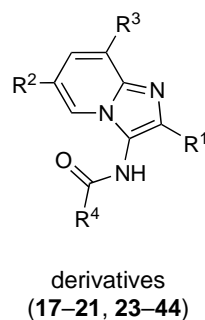
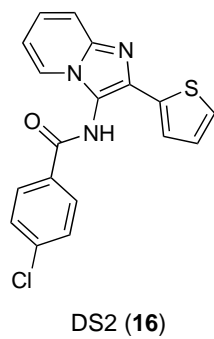
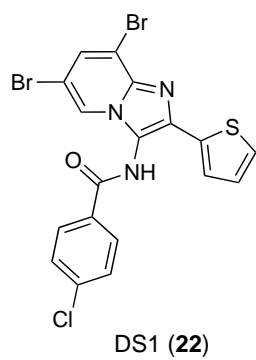
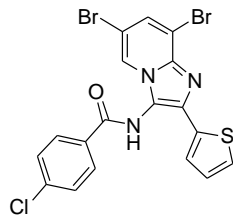
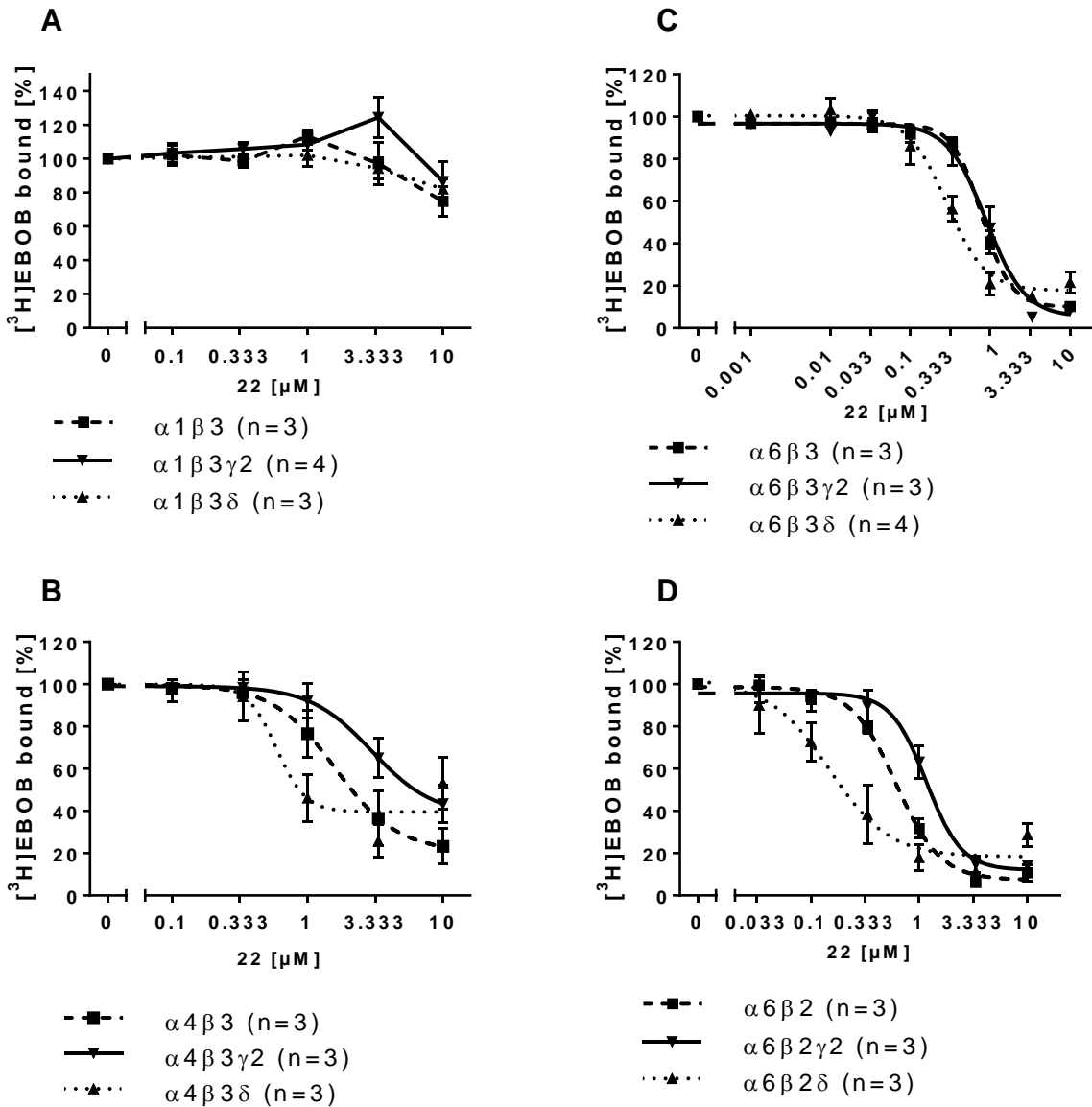


Figure 2. [³H]EBOB binding modulation by compound **22**. [³H]EBOB binding modulation at recombinant receptors consisting of $\alpha 1\beta 3 \pm \gamma 2/\delta$ (A), $\alpha 4\beta 3 \pm \gamma 2/\delta$ (B), $\alpha 6\beta 3 \pm \gamma 2/\delta$ (C) and $\alpha 6\beta 2 \pm \gamma 2/\delta$ (D). Crude membranes derived from transiently transfected HEK 293 cells were incubated with increasing concentrations of compound **22** and 3 nM of the ligand [³H]EBOB. Experimental and calculation procedures were as described under “Experimental section”. Curves are depicted as mean modulation \pm S.E. of at least three separate experiments. Modulated [³H]EBOB binding values refer to total specific binding, set to 100%. IC₅₀ and maximal inhibition values are listed in Table 1.

Figure 2



22

Figure 3. Direct activation of GABA_AR by compounds **16** (A) and **22** (B) in whole-cell patch-clamp experiments. Both compounds were measured at a concentration of 10 μ M at different recombinant receptors. Measured currents were set in correlation to the effect of 1 mM GABA at the equivalent receptor ($I_0/I_{\max \text{ GABA}}$). Experimental and calculation procedures were as described under “Experimental section”. $I_0/I_{\max \text{ GABA}}$ values are means \pm S.D. from n separate experiments and listed in Table 2.

Figure 3

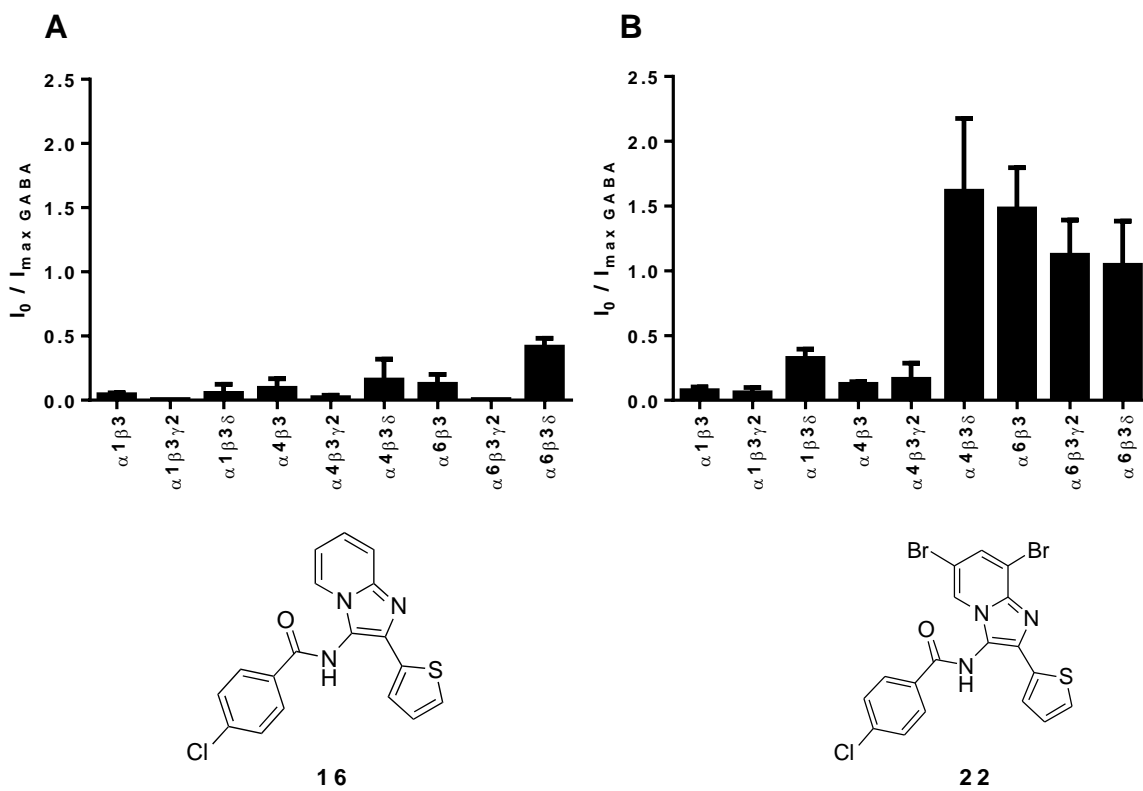


Figure 4. Modulation of [³H]EBOB binding by compounds **29** and **39**. (A,B) [³H]EBOB binding modulation at recombinant receptors consisting of $\alpha 6\beta 2 \pm \gamma 2/\delta$ (A) and $\alpha 6\beta 3 \pm \gamma 2/\delta$ (B) by compound **29**. (C,D) Modulation of [³H]EBOB binding at recombinant receptors consisting of $\alpha 6\beta 2 \pm \gamma 2/\delta$ (C) and $\alpha 6\beta 3 \pm \gamma 2/\delta$ (D) by compound **39**. Experimental procedures as described for Figure 2. IC₅₀ and maximal inhibition values are listed in Table 1.

Figure 4

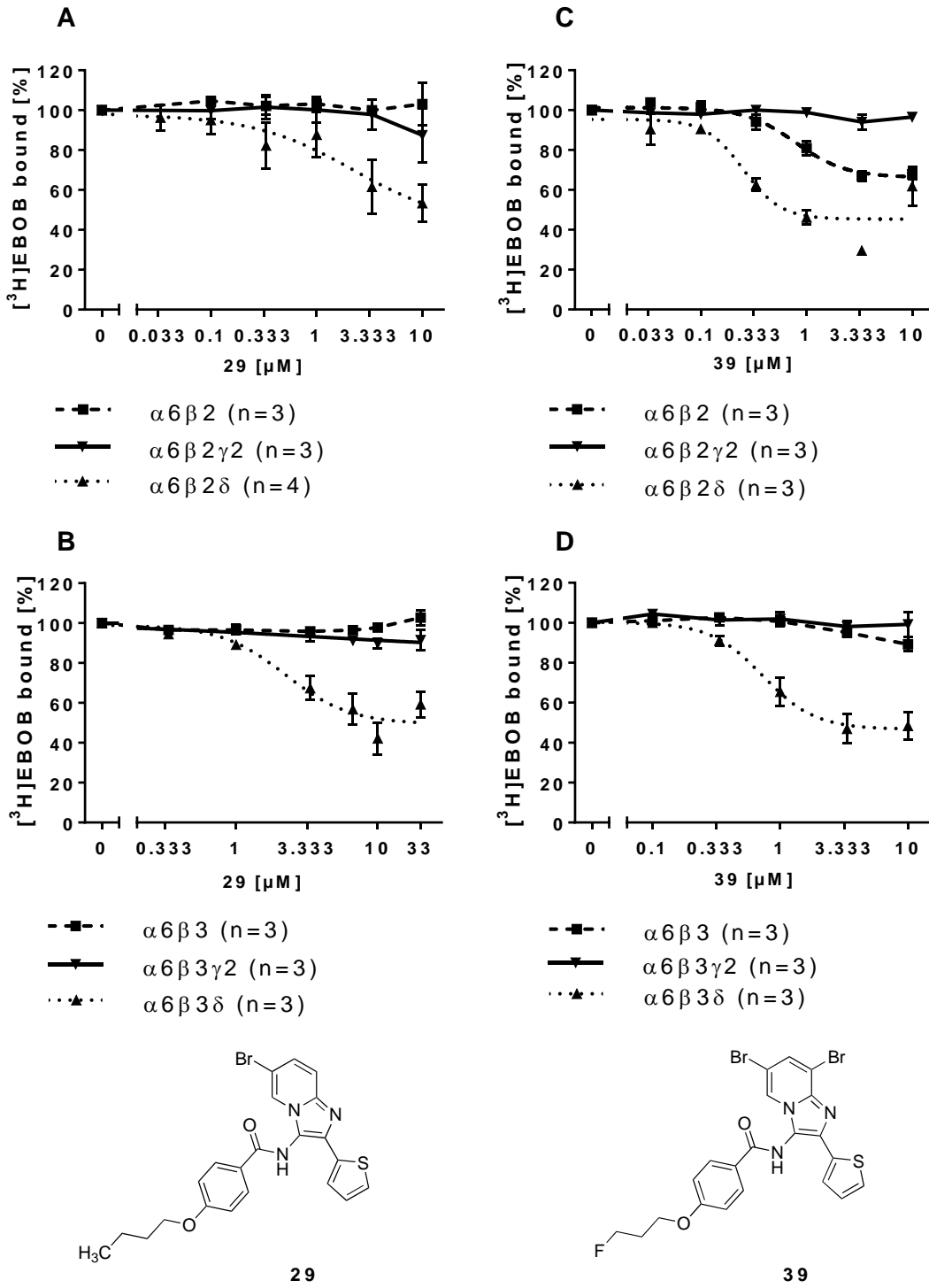


Table 1. [³H]EBOB modulation by test compounds

Cpd.	Rec. type	IC ₅₀ values [μM]	Max. inhibition [%]	η	n
16	α6β3δ	-	20 ± 10 (10 μM)	-	3
22	α1β3	-	25 ± 18 (10 μM)	-	4
	α1β3γ2	-	13 ± 23 (10 μM)	-	4
	α1β3δ	-	18 ± 10 (10 μM)	-	3
	α4β3	1.86 ± 0.43	80 ± 16	-2.41 ± 0.51	3
	α4β3γ2	3.29 ± 0.42	67 ± 28	-5.29 ± 3.85	3
	α4β3δ	0.51 ± 0.23	61 ± 16	-10.91 ± 4.61	3
	α6β3	0.79 ± 0.07	90 ± 2	-2.41 ± 0.13	3
	α6β3γ2	0.93 ± 0.23	94 ± 5	-1.87 ± 0.28	3
	α6β3δ	0.31 ± 0.04	84 ± 8	-1.56 ± 0.33	4
	α6β2	0.63 ± 0.08	93 ± 6	-2.22 ± 0.20	3
	α6β2γ2	1.13 ± 0.11	89 ± 6	-2.53 ± 0.53	3
α6β2δ	0.15 ± 0.03	82 ± 6	-1.63 ± 0.29	3	
28	α6β3	16 (12.6, 19.5)	21 (24, 17)	-	2
	α6β3γ2	25 (21.5, 29)	≥ 89	-3.2 (-2.2, -4.1)	2
	α6β3δ	10.1 ± 2.8	85 ± 14	-1.92 ± 0.19	3
29	α1β3γ2	-	no effect	-	2
	α1β3δ	-	no effect	-	2
	α4β3	-	no effect	-	4
	α4β3γ2	-	no effect	-	4
	α4β3δ	-	no effect	-	7
	α6β3	-	no effect	-	3
	α6β3γ2	-	10 ± 4 (10 μM)	-	3
	α6β3δ	2.18 ± 0.40	46 ± 9	-2.60 ± 0.64	3
	α6β2	-	no effect	-	3
α6β2γ2	-	13 ± 23 (10 μM)	-	3	

31	α6β2δ	2.43 ± 0.78	54 ± 24	-1.37 ± 0.45	4
	α6β3	2.50 ± 0.89	46 ± 10	-1.31 ± 0.04	3
	α6β3γ2	5.51 ± 1.65	24 ± 7	-2.19 ± 0.85	3
34	α6β3δ	0.86 ± 0.30	71 ± 7	-1.18 ± 0.35	3
	α6β3	-	no effect	-	3
	α6β3γ2	-	15 ± 16 (10 μM)	-	3
35	α6β3δ	1.20 ± 0.24	87 ± 9	-6.00 ± 3.75	3
	α6β3	3.06 ± 0.25	91 ± 2	-9.69 ± 4.09	3
	α6β3γ2	3.39 ± 0.25	103 ± 4	-6.32 ± 2.94	3
38	α6β3δ	1 (1.1, 0.9)	38 (38, 38)	-6.6 (-11.3, -1.8)	2
	α6β3	-	no effect	-	3
	α6β3γ2	-	no effect	-	3
39	α4β3δ	0.76 ± 0.08	53 ± 12	-2.28 ± 0.16	3
	α1β3	-	no effect	-	2
	α1β3γ2	-	no effect	-	2
	α1β3δ	-	no effect	-	2
	α4β3	-	no effect	-	3
	α4β3γ2	-	no effect	-	3
	α4β3δ	-	no effect	-	4
	α6β3	-	11 ± 6 (10 μM)	-	3
	α6β3γ2	-	no effect	-	3
α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3	
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β2	0.74 ± 0.16	33 ± 4	-5.20 ± 3.62	3
	α6β2γ2	-	no effect	-	3
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7	-4.82 ± 2.59	3
	α6β3	-	no effect	-	2
	α6β3γ2	-	no effect	-	2
41	α6β3δ	0.27 ± 0.02	55 ± 7		

Crude membranes derived from transiently transfected HEK 293 cells were incubated with increasing concentrations of the derivatives and 3 nM of [³H]EBOB. Highest tested concentrations were 10 μM due to the limited solubility of the compounds, except for compounds **28** and **29**, which were tested up to 20 μM. Experimental and calculation procedures were as described under “Experimental section”. IC₅₀ values and pseudo-Hill coefficients η derived from non-linear regression curve fits are means \pm S.E. from n separate experiments. Maximum inhibition values are means \pm S.D. from n separate experiments. When n = 2 was measured, maximum inhibition, IC₅₀, values and pseudo-Hill coefficients η were calculated as means of two experiments; S.D. and S.E.M. values were then omitted. Maximal inhibition of compound **28** at $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptors is denoted with a “ \geq ” sign as for the fitting process the maximal inhibition of one experiment was constrained to 100%. Maximal inhibition describes the percentage decrease of [³H]EBOB relative to total binding, set to 100%. When no modulation of [³H]EBOB binding at a ligand concentration of 10 μM (20 μM for **29**) could be observed in at least two separate experiments “no effect” was noted. Derivatives which showed no effect at any tested GABA_AR are not listed in this table. For the structures of the compounds see Schemes 2 and 4. Rec. type is the abbreviation for recombinant receptor type.

Table 2. Direct activation of recombinant receptors by compounds 16 and 22

Cpd.	Rec. type	$I_0/I_{\max \text{ GABA}}$	n
16	$\alpha 1\beta 3$	0.042 ± 0.016	3
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	0.004 ± 0.002	3
	$\alpha 1\beta 3\delta$	0.053 ± 0.072	4
	$\alpha 4\beta 3$	0.093 ± 0.074	3
	$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	0.020 ± 0.019	3
	$\alpha 4\beta 3\delta$	0.158 ± 0.162	4
	$\alpha 6\beta 3$	0.124 ± 0.078	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	0.004 ± 0.002	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.414 ± 0.069	3
22	$\alpha 1\beta 3$	0.074 ± 0.029	3
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	0.058 ± 0.042	3
	$\alpha 1\beta 3\delta$	0.323 ± 0.073	3
	$\alpha 4\beta 3$	0.124 ± 0.021	3
	$\alpha 4\beta 3\gamma 2$	0.163 ± 0.123	3
	$\alpha 4\beta 3\delta$	1.615 ± 0.562	3
	$\alpha 6\beta 3$	1.479 ± 0.318	6
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	1.119 ± 0.273	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	1.043 ± 0.341	4

A concentration of 10 μM of compounds **16** and **22** was tested at different recombinant GABA_AR in the absence of GABA. Measured currents were set in correlation to the effect of 1 mM GABA at the equivalent receptor type ($I_0/I_{\max \text{ GABA}}$). Experimental and calculation procedures were as described under “Experimental section”. $I_0/I_{\max \text{ GABA}}$ values are means \pm S.D. from n separate experiments. Graphs are depicted in Figure 3. Structures of compounds **16** and **22** are also shown in Figure 3. Rec. type is the abbreviation for recombinant receptor type.

Table 3. Modulation of GABA EC₂₀ currents by compounds 16 and 22

Cpd.	Rec. type	EC ₅₀ value [μ M]	η	Modulation [%]	n
16	α 1 β 3	no effect \leq 10 μ M			3
	α 1 β 3 γ 2	no effect \leq 1 μ M			3
	α1β3δ	0.86 \pm 0.10	1.0 \pm 0.1	213 \pm 8	3
	α 4 β 3	no effect \leq 1 μ M			2
	α 4 β 3 γ 2	no effect \leq 1 μ M			3
	α4β3δ	0.97 \pm 0.35	1.2 \pm 0.4	231 \pm 76	3
	α 6 β 3	2.44 \pm 0.82	3.1 \pm 3.3	588 \pm 254	3
	α 6 β 3 γ 2	no effect \leq 1 μ M			5
	α6β3δ	2.29 \pm 0.67	0.9 \pm 0.1	993 \pm 519	5
22	α 1 β 3	0.10 \pm 0.01	1.9 \pm 0.3	35 \pm 2	4
	α 1 β 3 γ 2	2.01 \pm 1.02	0.9 \pm 0.2	139 \pm 23	3
	α1β3δ	0.10 \pm 0.02	1.0 \pm 0.1	201 \pm 12	6
	α 4 β 3	0.06 \pm 0.02	1.7 \pm 0.7	168 \pm 29	4
	α 4 β 3 γ 2	no effect \leq 1 μ M			4
	α4β3δ	0.15 \pm 0.08	0.8 \pm 0.2	297 \pm 14	3
	α 6 β 3	0.17 \pm 0.02	1.2 \pm 0.1	1144 \pm 29	7
	α 6 β 3 γ 2	0.87 \pm 0.15	1.3 \pm 0.3	157 \pm 10	7
	α6β3δ	0.13 \pm 0.03	1.5 \pm 0.4	802 \pm 68	7

Increasing concentrations of compounds **16** and **22** were tested at different recombinant GABA_AR in the presence of the respective GABA EC₂₀ concentration. Highest tested concentration of each compound was 10 μ M. EC₅₀ values, pseudo-Hill coefficients η and percentage modulation values, derived from non-linear regression curve fits, are means \pm S.E. from n separate experiments. Experimental and calculation procedures were as described under “Experimental section”. Structures of compounds **16** and **22** are depicted in Figure 1. Rec. type is the abbreviation for recombinant receptor type.

Table 4. [³H]EBOB modulation of several derivatives in the presence of GABA

Cpd.	Rec. type	IC ₅₀ value [μM]	p value	Max. inhibition [%]	p value	η	p value	n
22	$\alpha 6\beta 3$	0.96 ± 0.36	0.660	96 ± 3	0.039	-1.88 ± 0.12	0.006	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	1.09 ± 0.42	0.765	93 ± 3	0.760	-1.58 ± 0.03	0.151	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.37 ± 0.17	0.688	88 ± 4	0.516	-0.93 ± 0.08	0.031	3
29	$\alpha 6\beta 3$	4.07 ± 0.36	n.a.	26 ± 6	0.002	-7.27 ± 4.63	n.a.	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	4.34 ± 1.18	n.a.	40 ± 5	0.006	-9.19 ± 7.12	n.a.	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.87 ± 0.29	0.058	51 ± 1	0.484	-7.28 ± 5.76	0.465	3
39	$\alpha 6\beta 3$	1.29 ± 0.02	n.a.	57 ± 11	0.003	-3.61 ± 1.08	n.a.	3
	$\alpha 6\beta 3\gamma 2$	1.28 ± 0.10	n.a.	44 ± 7	0.001	-2.28 ± 0.70	n.a.	3
	$\alpha 6\beta 3\delta$	0.49 ± 0.11	0.112	55 ± 8	0.795	-1.14 ± 0.20	0.012	3

Experimental and calculation procedures were as described for Table 1 and under “Experimental section”. Maximum inhibition, IC₅₀ values and pseudo-Hill coefficients η were compared with values derived from experiments in the absence of GABA (Table 1). For statistical comparison unpaired Student’s t test was used. n.a.: not applicable due to no effect of the compound in the absence of GABA. For the structures of the derivatives see Schemes 2 and 4. Rec. type is the abbreviation for recombinant receptor type.

TABLE OF CONTENTS GRAPHIC

Lead compound

