

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. N. Klöcker

Wirkung von Gallensäuren als Neurosteroid am GABAA Rezeptor

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Roger Schubring

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referentin: Prof. Dr. Sergeeva
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. von Gall

Zusammenfassung

Neurosteroidale sind steroidale Moleküle des Cholesterinmetabolismus, welche im Nervensystem ebenso wie in peripheren Organen (Testes, Ovarien, Nebennierenrinde) synthetisiert werden und im Gehirn neuronale Wirkungen entfalten. Nach der Klassifikation von Morrow (2007) unterteilt man Neurosteroidale in inhibitorische (z.B. Allopregnanolon), welche die GABAerge Transmission verstärken und sedativ oder hypnotisch wirken und exzitatorische Neurosteroidale (z.B. Pregnenolonsulfat), welche die GABAerge Hemmung antagonisieren und dadurch erregend wirken.

Die Gallensäuren aus der Leber sind für den Verdauungsprozess essenziell, erreichen aber soweit bekannt nicht das Zentralnervensystem in relevanten Konzentrationen. Einige dieser Gallen-Steroide (G-S) werden allerdings auch im Gehirn synthetisiert. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass diese Substanzen Ligandengesteuerte Ionenkanäle im Gehirn von Maus und Ratte modulieren und die synaptische Übertragung verändern können: Inhibition des GABA_A Rezeptors führt zu Erregung und verstärkter Synchronisation. Verschiedene Steroide zeigen dabei unterschiedliche Wirksamkeit (halb-effektive Konzentrationen, IC₅₀) für den GABA_A Rezeptor-Block: Ursodeoxycholat, UDCA < Chenodeoxycholat, CDCA < Taurodeoxycholat, TDCA < Cholat < Dehydrocholat.

Neuronale Netzwerkaktivität wurde an Primärkulturen auf Mikroelektroden-gittern (*microelectrode array*, MEA) gemessen. Ferner wurden an einzelnen, akut aus Hirnschnitten isolierten Neuronen Ganzzell-Ströme als Antwort auf kurze (1-2 s) GABA-Exposition registriert. Spontane GABAerge synaptische Ströme, die durch GABA-Freisetzung aus anhaftenden Boutons resultieren, konnten ebenfalls analysiert werden. Eine dosisabhängige Abnahme der Abfallzeitkonstante (τ) der spontanen Ströme bei stabiler Amplitude belegt eine postsynaptische Modulation der GABAergen Transmission durch die Steroide. Eine positive Modulation mit gegenteiliger Wirkung, wie sie für andere Steroide beschrieben ist, haben wir hier nicht beobachtet. Ferner konnten wir eine Verminderung der erregenden Übertragung durch Blockierung des NMDA-Rezeptors nachweisen (Cholat, Chenodeoxycholat).

Die Untersuchungen wurden an hypothalamischen Neuronen und Netzwerken durchgeführt, die in vivo die Vigilanz kontrollieren. Die resultierende Voraussage einer Vigilanz fördernden Wirkung dieser Steroide ließ sich an frei beweglichen Nagern bestätigen. Damit können wir die untersuchten Gallensteroide prinzipiell der Klasse der Neurosteroidale zuordnen und das schon bekannte breite Wirkungsspektrum dieser Signalmoleküle erweitern.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA R	AMPA Rezeptor
CA	Cholat
CDCA	Chenodeoxycholol
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoinsäure
DH	Dehydrocholol
DHEAS	Dihydroepiandrosteronsulfat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABAA R	GABA Typ A Rezeptor
G-S	Gallen-Steroide (gilt für beide: Säuren und Salze)
HE	hepatische Enzephalopathie
IC50	halbmaximale blockierende Konzentration
MEA	<i>microelectrode array</i>
NMDA R	NMDA Rezeptor
PS	Pregnenolonsulfat
SIPS	spontane inhibitorische postsynaptische Ströme
TMN	tuberomamillärer Nucleus
TDCA	Taurodeoxycholol
THDOC	Tetrahydrodesoxycorticosteron (5 α -Pregnan-3 α ,21-diol-20on)
τ	Zeitkonstante
TTX	Tetrodotoxin
UDCA	Ursodeoxycholol
UE	Untereinheit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Inhibitorische und exzitatorische Neurosteroid	1
1.2	GABAA Rezeptor als Ziel von Neurosteroiden	1
1.3	Gallen-Steroide (G-S) als Signalmoleküle mit System-Relevanz	3
1.4	Hypothalamische wach-aktive Neurone im N. tuberomamillaris	4
1.5	Neurosteroid bei hepatischer Enzephalopathie (HE)	5
2	Ziele der Arbeit	6
3	Publizierte Originalarbeiten	7
3.1	The bile steroid chenodeoxycholate is a potent antagonist at NMDA and GABA(A) receptors. <u>Schubring SR</u> , Fleischer W, Lin JS, Haas HL, Sergeeva OA. Neuroscience Lett. 2012 Jan 11;506(2):322-6. doi: 10.1016/j.neulet.2011.11.036. Epub 2011 Dec PubMed PMID: 22155097	7
3.2	Waking action of ursodeoxycholic acid (UDCA) involves histamine and GABAA receptor block. Yanovsky Y, <u>Schubring SR</u> , Yao Q, Zhao Y, Li S, May A, Haas HL, Lin JS, Sergeeva OA. PLoS One. 2012;7(8):e42512. doi:10.1371/ journal.pone.0042512. Epub 2012 Aug 6. PubMed PMID: 22880010; PubMed Central PMCID: PMC3412845	8
4	Diskussion	9
4.1	Messungen mit Multielektroden (MEA)	9
4.2	Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (SIPS): <i>patch-clamp</i> Ableitungen	10
4.3	GABA-evozierte Ströme an akut isolierten Neuronen	11
5	Schlussfolgerungen	12

6 Literaturverzeichnis	13
7 Anhang	16
7.1 Elektrophysiologische Ableitungen und Auswertung	16
7.2 Veröffentlichungen	18
7.3 <i>Abstracts</i>	19
8 Danksagung	20
9 Eidesstattliche Versicherung	21

1 Einleitung

1.1 Inhibitorische und exzitatorische Neurosteroide

Steroidhormone aus der Peripherie können nach Passage der Blut-Hirn-Schranke Wirkungen entfalten. Über nukleäre Rezeptoren verändern sie die Genexpression im Gehirn. Diese „genetische“ Wirkung ist relativ langsam (Minuten-Stunden) und langdauernd. Zu nicht-genomischen Effekten gehört die Interaktion mit Ligandengesteuerten Ionenkanälen, wie GABAA, NMDA oder AMPA Rezeptoren, welche direkt aktiviert werden. Vor mehr als 70 Jahren berichtete Hans Selye über schnelle sedierende und anästhetische Wirkungen mancher Pregnan-Steroide und deren protektive Rolle bei der systemischen Stress-Antwort (Selye and Masson, 1942).

Die neuroaktiven Steroide (Neurosteroide) werden als endogene Modulatoren in Testes, Ovarien oder Nebennierenrinde als Geschlechts- oder Stress-Hormone sowie auch im Gehirn synthetisiert. Die inhibitorischen (hemmenden) Neurosteroide entfalten sedative, antikonvulsive und anxiolytische Wirkungen nach systemischer Verabreichung (Morrow, 2007). Hochwirksame Substanzen dieser Art wurden als Anaesthetika und Antiepileptika entwickelt. Ganaxolon (3 α -Hydroxy-3 β -methyl-5 α -pregnan-20-on) wurde als Antiepileptikum in klinischen Studien gut bewertet (Stephen and Brodie, 2011); Alfaxalon (5 α -Pregnan-3 α -ol-11,20-dion) wird als Anaesthetikum in der Tiermedizin und für Forschungszwecke verwendet. Zu den inhibitorischen Neurosteroiden gehören Progesteron-Abkömmlinge wie z.B. Pregnanolon (5 β -Pregnan-3 α -ol-20on), Allopregnanolon (5 α -Pregnan-3 α -ol-20on), Desoxycorticosteron und Tetrahydrodesoxycorticosteron (THDOC, 5 α -Pregnan-3 α ,21-diol-20on). Zu den exzitatorischen Neurosteroiden gehören z.B. sulfatierte Derivate von Pregnenolon (PS) und Dihydroepiandrosteron (DHEAS), die eine erregende Wirkung entfalten und in vergleichsweise höheren Konzentrationen (μ M) wirksam sind (Morrow, 2007).

1.2 Der GABAA Rezeptor als Ziel von Neurosteroiden

Die GABAerge Hemmung ist ubiquitärer Bestandteil neuronaler Netzwerke (Farrant and Nusser, 2005). GABAA Rezeptoren sind heteropentamere Proteine, die einen selektiven Fluss von Anionen, vor allem Chlorid-Ionen durch die Zellmembran ermöglichen. Die fünf Untereinheiten bestehen jeweils aus vier transmembranären Segmenten (siehe Abb.1). Die Bindungstasche des Agonisten GABA liegt zwischen α - und β -Untereinheiten, diejenige des Diazepam liegt zwischen α - und γ -Untereinheiten (Olsen and Sieghart, 2009). Das zweite Transmembransegment jeder Untereinheit

bildet die Pore. Es gibt 19 verschiedene UE, darunter finden sich 6 α -, 3 β -, 3 γ -, 3 ρ -, 1 δ -, 1 ϵ -, 1 θ - und 1 π -UE.

Über 60% aller GABA Rezeptoren des ZNS sind aus zwei α 1-, zwei β 2- und einer γ 2-Untereinheit aufgebaut (Olsen and Sieghart, 2009; Rudolph and Antkowiak, 2004). Abb. 1 zeigt schematisch einen GABAA Rezeptorkomplex. Maßgeblich für die Funktion des GABAA Rezeptors ist die heterogene Expression und Kombination seiner Untereinheiten. Dies zeigt sich auch an TMN Neuronen. Dort spielen GABA Rezeptoren, die sich aus den α 1/2-, β 1/3- und γ 1, γ 2- Untereinheiten aufbauen, eine besondere Rolle (Sergeeva et al., 2002; Sergeeva et al., 2010).

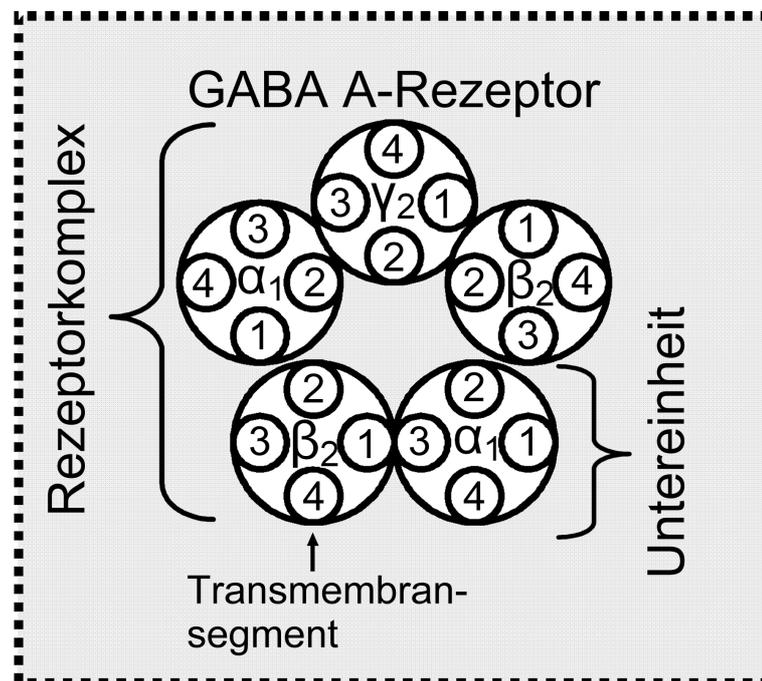


Abb. 1 GABAA Rezeptorkomplex mit 5 Untereinheiten und je 4 Transmembransegmenten (Einblick von der intrazellulären Seite)

Je nach Lokalisation und Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsverhalten unterscheidet man zwei Klassen von GABAA Rezeptoren. Die eine vermittelt eine phasische und die andere eine tonische Inhibition (Farrant and Nusser, 2005). Extrasynaptische Rezeptoren mit α 4-6 Untereinheiten und δ -UE vermitteln die tonische Inhibition (Farrant and Nusser, 2005; Olsen and Sieghart, 2009). Die synaptische (phasische Inhibition) kommt durch Rezeptorkomplexe aus α 1-3, β 2/3 und γ 2 Untereinheiten zustande (Olsen and Sieghart, 2009). Progesteronderivate potenzieren oder hemmen über separate Bindungsstellen den GABAA Rezeptor. Einerseits werden Neurosteroiden ortsständig durch Gliazellen im ZNS produziert, andererseits übernehmen auch

Steroide aus den peripheren endokrinen Organen neurosteroidale Funktionen (Lambert et al., 2009).

In Gegenwart von GABA vermitteln inhibitorische Neurosteroidoide eine sedierende, anxiolytische, hypnotische und analgesierende Wirkung. Diese Effekte werden über die α -Untereinheit vermittelt: der Austausch von Glutamin in der Transmembran-Domäne 1 (TM1) Q141 gegen Methionin oder Leucin an der α 1-UE oder analoge Mutationen an anderen α -UE verhindert die Potenzierung durch THDOC oder Allopregnanolon (Hosie et al., 2009). Exzitatorische Neurosteroidoide interagieren mit einer anderen Stelle an der α -UE: Valin 256 an der α 1-UE ist essenziell für die hemmende Wirkung des Pregnenolonsulfats auf GABA-Ströme (Akk et al., 2001). Extrasynaptische GABAA R, welche aus $\alpha/\beta/\delta$ -UE bestehen, sind nicht empfindlicher auf inhibitorische Neurosteroidoide als synaptische Rezeptortypen, wie die $\alpha\beta\gamma\delta$ Rezeptoren (Hosie et al., 2009). Allerdings können sie im Gegensatz zu den synaptischen Rezeptoren die neuronale Aktivität stark beeinflussen (Farrant and Nusser, 2005). Deshalb fällt die sedierende Wirkung inhibitorischer Neurosteroidoide an δ -UE defizienten Mäusen (δ -KO) bei niedrigen Konzentrationen aus (Mihalek et al., 1999).

Die Mausgenetik hat in den letzten Jahren unser Verständnis der Bedeutung unterschiedlicher GABAA R Bindungsstellen für allosterische Modulatoren enorm verbessert. So wurde durch eine Punkt-Mutation an der Propofol-Bindungsstelle des GABAA R (Jurd et al., 2003) eine Propofol-resistente Maus erzeugt und damit bewiesen, dass der GABAA R ein höchst sensitives Ziel dieses Anaesthetikums ist. Maus-Mutanten für die Neurosteroid-Bindungsstellen gibt es noch nicht, auch weil diese Mutationen die GABA-Sensitivität des GABAA R enorm verändern (Yanovsky et al., 2012b) und damit die Aussagekraft eines solchen Modells vermindern.

1.3 Gallen-Steroide (G-S) als Signalmoleküle mit System-Relevanz

Die Leber beherbergt zahlreiche Stoffwechselwege, darunter den Harnstoffzyklus zur Ausscheidung von Aminogruppen und damit Regulation der Ammoniakspiegel im Blut, sowie Enzymfamilien zum Abbau von Steroidhormonen durch P450 Cytochrome (Schwarz et al., 1997). Aus dem Steroidgrundgerüst erfolgt in der Leber die Synthese von Gallensäuren. Das Schlüsselenzym dieser Synthese ist die 7α -Hydroxylase. Produkte sind die primären Gallensäuren Cholat und Chenodeoxycholat. Der molekulare Aufbau von Cholat ist in Abb. 2 dargestellt.

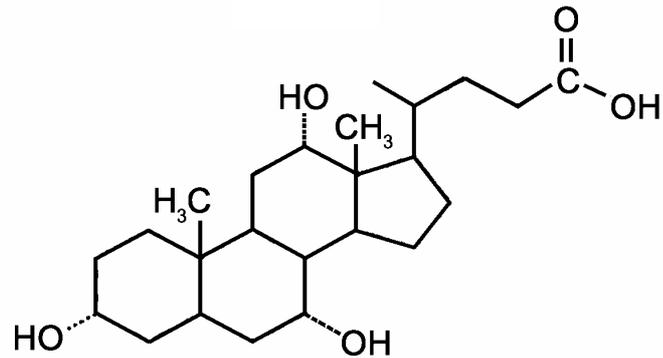


Abb. 2 Steroidgerüst von Cholat

Da Gallensäuren den Neurosteroiden ähneln bzw. gleichen, boten sie sich für eine Untersuchung ihrer Fähigkeit zur Modulation des GABAA R an. Die 7α -Hydroxylase, das Schlüsselenzym der Gallensäuresynthese, findet sich nicht nur in der Leber sondern auch im ZNS. Die primären Gallensäuren Cholat und Chenodeoxycholat resultieren aus dieser Synthese (Schubring et al., 2012; Schwarz et al., 1997).

Neben den digestiven Aufgaben übernehmen Gallensäuren auch zahlreiche parakrine und endokrine Funktionen (Keitel et al., 2008), die G-Protein gekoppelte Signalwege über TGR-5-Rezeptoren einschliessen - auch im ZNS (Keitel et al., 2007; Keitel et al., 2010). Gallensäuren interagieren wie die meisten Steroidhormone ebenfalls mit nukleären Rezeptoren. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Farnesoid-X-alpha Rezeptor (Watanabe et al., 2004; Watanabe et al., 2006).

Darüberhinaus eröffnen diese Signalkaskaden, die unter dem Einfluss von Gallensäuren stehen, neue Ziele für die Therapie des metabolischen Syndroms (Thomas et al., 2008; Watanabe et al., 2006). Mano et al. (2004) fanden Chenodeoxycholat und Cholat auch im Zytoplasma von Neuronen des Rattenhirns, möglicherweise als Zwischenprodukte der Neurosteroidsynthese (Ogundare et al., 2010). Eine potenzielle Wirkung von G-S auf die neuronale Aktivität ist bisher nicht erforscht. Bei Cholestase muss mit einem Übertritt von Gallensäuren durch die Bluthirnschranke ins ZNS gerechnet werden.

1.4 Hypothalamische wach-aktive Neurone im N. tuberomamillaris

Im Nucleus tubero-mamillaris (TMN) zwischen den Corpora mamillaria, dem Chiasma opticum und dem Tuber cinerum liegen die zentralen histaminergen Neurone, deren Aktivität eine exklusive Korrelation mit dem Wachzustand aufweist. Einige andere Neuronengruppen im Hirnstamm und Hypothalamus sind ebenfalls wachaktiv,

allerdings weniger ausschließlich. Die histaminergen Neurone nehmen für die Erhaltung des Wachzustandes eine Schlüsselposition ein (Haas and Panula, 2003;Haas et al., 2008;Lin et al., 2011) und waren das Objekt dieser Untersuchung an den Gehirnen von Maus und Ratte. Sie verfügen über eine hohe Expression des GABAA Rezeptors und werden während des Schlafes durch starke GABAerge Projektionen aus dem anterioren Hypothalamus vollständig gehemmt (Haas et al., 2008;Sergeeva et al., 2002;Sergeeva et al., 2010;Yanovsky et al., 2012b).

Die synaptischen und extrasynaptischen GABA Rezeptoren der histaminergen Neurone stellen einen Angriffsort neuer Anästhetika wie z.B. Propofol, Etomidat und Neurosteroiden dar. Besonders die sedative und die hypnotische Wirkung der Anästhetika wird auf diesem Wege vermittelt (Nelson et al., 2002;Yanovsky et al., 2012a). Die histaminergen TMN-Neurone sind somit ein zentraler Ort der physiologischen und der medikamentösen Schlafinduktion. Ausserdem reagieren diese Neurone mit metabolischen Veränderungen auf Cholestase (Zimatkin et al., 2008), was auf eine noch nicht erforschte Leber-Hirn Kommunikation verweist.

1.5 Neurosteroiden bei hepatischer Enzephalopathie (HE)

Den Neurosteroiden wird eine große Bedeutung für die Entstehung des erhöhten GABAergen Tonus im Rahmen der hepatischen Enzephalopathie (HE) zugeschrieben. Im Fokus stehen vor allem die Progesteron-Abkömmlinge THDOC und Allopregnenolon, die während der HE im ZNS akkumulieren und den GABAA R potenzieren (Ahboucha and Butterworth, 2008). Zusätzlich sinkt der Spiegel exzitatorischer Neurosteroiden (DHEAS) im Gehirn von HE Patienten (Ahboucha et al., 2012).

Einerseits wird für die Akkumulation von Neurosteroiden eine vermehrte Synthese der Progesteron-Abkömmlinge in Astrozyten verantwortlich gemacht, andererseits ist auch eine Akkumulation von Steroid-Hormonen aus der Peripherie möglich. Auf Grund des mangelnden Steroidabbaus in einer zirrhotischen Leber entwickeln die Patienten klinisch häufig eine Gynäkomastie und eine Hodenatrophie, ein Indiz für periphere Steroidakkumulation und verminderte Testosteronsynthese (Dasarathy et al., 2006). Die Bedeutung von Gallensäuren für die Pathogenese der HE wurde bis heute nicht berücksichtigt. Die Expression des Gallensäurenrezeptors TGR5 fällt im Gehirn von HE Patienten ab (Keitel et al., 2010). An einem HE-Tiermodell verbesserte das exzitatorische Neurosteroid Pregnenolonsulfat kognitive Fähigkeiten der Ratte (Gonzalez-Usano et al., 2013), was durch Antagonismus gegen den erhöhten GABAergen Tonus erklärbar ist (Sergeeva, 2013;Steiger et al., 1993).

2 Ziele der Arbeit

Gallen-Steroide (G-S) sind Signalmoleküle mit digestiven, endokrinen und parakrinen Funktionen. Bekannte G-S Wirkungen werden vermittelt über nukleäre Gallensalzrezeptoren und andere Steroid-Rezeptoren oder den an zyklisch-AMP gekoppelten membranständigen Rezeptor TGR5. Ob und mit welchen Mechanismen G-S mit Liganden-gesteuerten Ionenkanälen interagieren ist weitgehend unbekannt und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Folgende elektrophysiologische Methoden kamen zur Anwendung:

- a) für das Screening von G-S Wirkungen auf neuronale Netzwerkaktivität - *microelectrode array* (MEA);
- b) Einzelzell-Ableitungen (*patch-clamp*) von synaptischen Strömen;
- c) Einzelzell-*patch-clamp* Ableitungen von makroskopischen Ganzzellströmen induziert durch kurzdauernde (1-2s) Substanzapplikation.

3 Publierte Originalarbeiten

3.1 The bile steroid chenodeoxycholate is a potent antagonist at NMDA and GABA(A) receptors. Schubring SR, Fleischer W, Lin JS, Haas HL, Sergeeva OA. *Neuroscience Lett.* 2012 Jan 11;506(2):322-6. doi: 10.1016/j.neulet.2011.11.036. Epub 2011 Dec PubMed PMID: 22155097

3.2 Waking action of ursodeoxycholic acid (UDCA) involves histamine and GABAA receptor block. Yanovsky Y, [Schubring SR](#), Yao Q, Zhao Y, Li S, May A, Haas HL, Lin JS, Sergeeva OA. PLoS One. 2012;7(8):e42512. doi:10.1371/journal.pone.0042512. Epub 2012 Aug 6. PubMed PMID: 22880010; PubMed Central PMCID: PMC3412845

4 Diskussion

Diese Arbeiten erweiterten die bekannten endokrinen, parakrinen und digestiven Funktionen der Gallen-Steroide. Mit elektrophysiologischen Methoden zeigen wir die Interaktion von G-S mit Liganden-gesteuerten Ionenkanälen sowie die Modulation neuronaler Netzwerkaktivität durch G-S. Damit schreiben wir G-S die Rolle von Neurosteroiden zu, da sie auch im ZNS synthetisiert werden und neuronale Wirkungen haben. GABAA R und NMDA R sind durch unterschiedliche G-S blockierbar. Die Netzwerksynchronisierung nimmt unter negativer Modulation der GABAA R durch G-S (DH oder UDCA) zu. Zusätzlich kann die Feuerfrequenz durch eine negative Modulation des NMDA R abfallen (durch CA oder TDCA). GABAA R sind nicht nur im Nervensystem vorhanden, sondern unterliegen auch in Lunge, Leber, Pankreas und in den Immunzellen des Blutes physiologisch und pathophysiologisch (z.B. bei Cholestase) der Modulation durch G-S.

4.1 Messungen mit Multielektroden (MEA)

Die ersten Screening-Versuche fanden an hypothalamischen Primärkulturen statt. Alle getesteten Substanzen, darunter DH, UDCA, TDCA und Cholat steigerten die Synchronisierung eines neuronalen Netzwerkes. Ab einer Grenzkonzentration von 10 μ M synchronisierte TDCA, ab einer Konzentration von 30 μ M UDCA das untersuchte neuronale Netzwerk signifikant. Die Grenzkonzentrationen für Synchronisation und Reduktion der Spike-Anzahl (Frequenz) sind in Tabelle 1 ersichtlich. Das Phänomen der Synchronisation wird auch bei physiologischen und pathologischen zentralnervösen Oszillationen beobachtet und kann verschiedene Ätiologien haben.

Dennoch spielen für die hier beobachteten Änderungen der Netzwerkaktivität GABAerge Interneurone eine Schlüsselrolle. Taurodeoxycholat und Cholat bewirken bei steigenden Konzentrationen zusätzlich eine Verminderung der gesamten Spikeanzahl (Tab. 1). Ursache dafür ist eine Blockierung des NMDA R durch diese beiden Substanzen (Schubring et al., 2012). Eine mögliche Interaktion mit dem G-Protein gekoppelten TGR 5 Rezeptor, der im ZNS exprimiert ist und bekannte Neurosteroid bindet (Keitel et al., 2010), haben wir an akut isolierten Neuronen geprüft. Die gemessene Verkürzung der GABAA R Kinetik durch Chenodeoxycholat wurde nicht durch Forskolin, das die Adenylylzyklase vollständig aktiviert, okkludiert (Schubring et al., 2012). Damit sind die von uns gemessenen Wirkungen von Gallensäuren auf die Netzwerk- und Einzelzellaktivität der Modulation des GABAA R (Synchronisierung) und des NMDA R (hemmende Einfluss auf Aktionspotentiale) zuzuschreiben.

Gallensäuren	Signifikante GK (μM) für Synchronisation	Signifikante GK (μM) für Abnahme der Spike-Anzahl
CDCA	30	30
DH	1000	kein Effekt
Cholat	100	300
UDCA	30	kein Effekt
TDCA	10	300

Tabelle 1 Grenzkonzentration (GK) in μM für signifikante ($p < 0,05$) Effekte auf die Synchronisation (Cohen's Kappa) und die Abnahme der Spikeanzahl

Chenodeoxycholol (CDCA), Dehydrocholol (DH), Ursodeoxycholol (UDCA), Taurodeoxycholol (TDCA)

4.2 Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (SIPS, engl.: sIPSCs): *patch-clamp* Ableitungen

Alle Neurone aus dem histaminergen TMN demonstrierten spontane synaptische GABAerge Ströme, welche durch den GABAA R Antagonisten Gabazin (SR 95531) 10 μM vollständig blockiert wurden. Diese Ströme waren von Aktionspotentialen und glutamatergen Synapsen unabhängig, da sie unter Blockierung der Na^+ -Kanäle (durch Tetrodotoxin, TTX) sowie der AMPA R (durch CNQX) und der NMDA R (durch D-AP5) gemessen wurden. Die Abfallzeitkonstante der durch GABA erzeugten Ströme verringerte sich erwartungsgemäß unter dem Einfluss der G-S. Die Reihenfolge der Wirksamkeit (IC_{50}) war folgende: UDCA (70 μM) > CDCA (130 μM) > Taurodeoxycholol (210 μM) > Cholat (400 μM) > DH (900 μM). Die Grenzkonzentrationen (minimale Konzentrationen welche mindestens in einem der getesteten Neurone eine signifikante Verkürzung der SIPS verursacht haben) sind im Rahmen klinischer Relevanz (Tab. 2).

Gallensäuren	Signifikante GK (μM) für τ Verkürzung	Signifikante GK (μM) für Reduktion Amplitude
CDCA	30	300
UDCA	10	100
TDCA	30	kein Effekt
Cholat	100	1000
DH	100	3000

Tabelle 2 Grenzkonzentration (GK) in μM für signifikante ($p < 0,05$) Effekte auf die Abfallzeitkonstante (τ) und die Amplitude: Chenodeoxycholol (CDCA), Dehydrocholol (DH), Taurodeoxycholol (TDCA) und Ursodeoxycholol (UDCA).

Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose haben eine erhöhte Blutserumkonzentrationen konjugierter G-S (Kakiyama et al., 2013): die Glycochenodeoxycholatkonzentration steigt 20fach und erreicht $17 \mu\text{M}$. Bei der genetisch-bedingten primär biliären Cholestase steigen Gallensäuren bis auf $616 \mu\text{M}$ im Blutserum an (Keitel et al., 2005). In hypothalamischen Neuronen der Maus verursachten Chenodeoxycholol (CDCA) und TDCA bereits ab einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ und UDCA ab $10 \mu\text{M}$ signifikante Effekte (Tabelle 2) auf die SIPS.

4.3 GABA-evozierte Ströme an akut isolierten Neuronen

Unter submaximalen GABA-Konzentrationen inhibierte UDCA in aufsteigenden Konzentrationen den Chlorid-Einstrom durch den GABAA R. Während sich unter maximalen GABA-Konzentrationen das Maximum des Chlorideinstroms kaum änderte, verschwand stattdessen die Plateauphase fast vollständig: das Ausmaß des GABAA R-Blocks ist potenzialabhängig (Schubring et al., 2012). Nach Berechnung der Dosis-Wirkungsbeziehung und der IC_{50} Werte für UDCA an akut isolierten Zellen und kultivierten Neuronen (für die Abfallzeitkonstante von SIPS) ergaben sich ähnliche Wirkstärken auf den GABAA Rezeptor (ca $90 \mu\text{M}$). Dies bestätigte wiederum die Interaktion mit dem GABAA Rezeptor und postuliert modulierende Eigenschaften ähnlich den exzitatorischen Neurosteroiden, so dass eine Interaktion mit der Bindungsstelle für Neurosteroiden plausibel wäre. In der Tat hat die bekannte Mutation an der α -UE, $\alpha 1V256S$, welche die Wirkung des exzitatorischen Neurosteroids

Pregnenolonsulfat vermindert (Akk et al., 2001), auch die Wirkstärke von UDCA gesenkt (Yanovsky et al., 2012b). Die hier untersuchten G-S müssen in das Konzept der Neurosteroiden als exzitatorische Substanzen einbezogen werden. Ob in vivo der Einfluss der G-S auf die tonische extrasynaptische oder auf die phasische synaptische GABAerge-Aktivität von größerer Bedeutung ist, verlangt weitere Untersuchungen.

5 Schlussfolgerungen

Gallen-Steroide beeinflussen die GABAerge Transmission an wach-aktiven hypothalamischen Neuronen über eine direkte Interaktion mit dem GABAA Rezeptor, die der Modulation durch exzitatorische Neurosteroiden ähnelt. Die exzitatorische (GABAA R-hemmende) Wirkung auf die histaminergen Neurone im tuberomammillären Kern erzeugt eine Vigilanzsteigerung. Eine Blockierung von GABAA R birgt naturgemäß auch erhebliche Risiken, wie Krampfanfälle. Die Reduzierung der NMDA R-Funktion könnte kognitive Defekte hervorrufen oder vertiefen. Unter pathologischen Bedingungen, bei Cholestase, können auch peripher synthetisierte Gallensäuren in das ZNS gelangen und dort neuronale Wirkungen entfalten. Tiermodelle mit induzierter Cholestase, wie Nager mit Gallengangsligatur, bieten sich daher für Untersuchungen der hepatischen Enzephalopathie an.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahboucha S, Butterworth RF (2008) The neurosteroid system: implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 52:575-587.
2. Ahboucha S, Talani G, Fanutza T, Sanna E, Biggio G, Gamrani H, Butterworth RF (2012) Reduced brain levels of DHEAS in hepatic coma patients: significance for increased GABAergic tone in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 61:48-53.
3. Akk G, Bracamontes J, Steinbach JH (2001) Pregnenolone sulfate block of GABA(A) receptors: mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the alpha subunit. *J Physiol* 532:673-684.
4. Dasarathy S, Mullen KD, Dodig M, Donofrio B, McCullough AJ (2006) Inhibition of aromatase improves nutritional status following portacaval anastomosis in male rats. *J Hepatol* 45:214-220.
5. Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
6. Gonzalez-Usano A, Cauli O, Agusti A, Felipo V (2013) Hyperammonemia alters the modulation by different neurosteroids of the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway through NMDA- GABAA - or sigma receptors in cerebellum in vivo. *J Neurochem* 125:133-143.
7. Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4:121-130.
8. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O (2008) Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 88:1183-1241.
9. Hosie AM, Clarke L, da SH, Smart TG (2009) Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Neuropharmacology* 56:149-154.
10. Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaugg M, Vogt KE, Ledermann B, Antkowiak B, Rudolph U (2003) General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J* 17:250-252.
11. Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, Takei H, Muto A, Nittono H, Ridlon JM, White MB, Noble NA, Monteith P, Fuchs M, Thacker LR, Sikaroodi M, Bajaj JS (2013) Modulation of the Fecal Bile Acid Profile by Gut Microbiota in Cirrhosis. *J Hepatol* 10.
12. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kuhlkamp T, Keppler D, Haussinger D, Kubitz R (2005) Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 41:1160-1172.
13. Keitel V, Gorg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Spomer L, Zilles K, Haussinger D (2010) The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. *Glia* 58:1794-1805.

14. Keitel V, Kubitz R, Haussinger D (2008) Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 14:5620-5629.
15. Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, Rupprecht C, Gorg B, Selbach O, Haussinger D, Kubitz R (2007) The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 45:695-704.
16. Lambert JJ, Cooper MA, Simmons RD, Weir CJ, Belelli D (2009) Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S48-58. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.08.009. Epub .:S48-S58.
17. Lin JS, Anaclet C, Sergeeva OA, Haas HL (2011) The waking brain: an update. *Cell Mol Life Sci* 68:2499-2512.
18. Mano N, Goto T, Uchida M, Nishimura K, Ando M, Kobayashi N, Goto J (2004) Presence of protein-bound unconjugated bile acids in the cytoplasmic fraction of rat brain. *J Lipid Res* 45:295-300.
19. Mihalek RM, Banerjee PK, Korpi ER, Quinlan JJ, Firestone LL, Mi ZP, Lagenaur C, Tretter V, Sieghart W, Anagnostaras SG, Sage JR, Fanselow MS, Guidotti A, Spigelman I, Li Z, DeLorey TM, Olsen RW, Homanics GE (1999) Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12905-12910.
20. Morrow AL (2007) Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacol Ther* 116:1-6.
21. Nelson LE, Guo TZ, Lu J, Saper CB, Franks NP, Maze M (2002) The sedative component of anesthesia is mediated by GABA(A) receptors in an endogenous sleep pathway. *Nat Neurosci* 5:979-984.
22. Ogundare M, Theofilopoulos S, Lockhart A, Hall LJ, Arenas E, Sjoval J, Brenton AG, Wang Y, Griffiths WJ (2010) Cerebrospinal fluid steroidomics: are bioactive bile acids present in brain? *J Biol Chem* 285:4666-4679.
23. Olsen RW, Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56:141-148.
24. Rudolph U, Antkowiak B (2004) Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 5:709-720.
25. Schubring SR, Fleischer W, Lin JS, Haas HL, Sergeeva OA (2012) The bile steroid chenodeoxycholate is a potent antagonist at NMDA and GABA(A) receptors. *Neurosci Lett* 506:322-326.
26. Schwarz M, Lund EG, Lathe R, Bjorkhem I, Russell DW (1997) Identification and characterization of a mouse oxysterol 7alpha-hydroxylase cDNA. *J Biol Chem* 272:23995-24001.
27. Selye H, Masson G (1942) Additional steroids with luteoid activity. *Science* 96:358.
28. Sergeeva OA (2013) GABAergic transmission in hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 10.

29. Sergeeva OA, Eriksson KS, Sharonova IN, Vorobjev VS, Haas HL (2002) GABA(A) receptor heterogeneity in histaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 16:1472-1482.
30. Sergeeva OA, Kletke O, Kragler A, Poppek A, Fleischer W, Schubring SR, Gorg B, Haas HL, Zhu XR, Lubbert H, Gisselmann G, Hatt H (2010) Fragrant dioxane derivatives identify beta1-subunit-containing GABAA receptors. *J Biol Chem* 285:23985-23993.
31. Steiger A, Trachsel L, Guldner J, Hemmeter U, Rothe B, Rupprecht R, Vedder H, Holsboer F (1993) Neurosteroid pregnenolone induces sleep-EEG changes in man compatible with inverse agonistic GABAA-receptor modulation. *Brain Res* 615:267-274.
32. Stephen LJ, Brodie MJ (2011) Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents. *CNS Drugs* 25:89-107.
33. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7:678-693.
34. Watanabe M, Houten SM, Matakci C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439:484-489.
35. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J (2004) Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113:1408-1418.
36. Yanovsky Y, Schubring S, Fleischer W, Gisselmann G, Zhu XR, Lubbert H, Hatt H, Rudolph U, Haas HL, Sergeeva OA (2012a) GABAA receptors involved in sleep and anaesthesia: beta1- versus beta3-containing assemblies. *Pflugers Arch* 463:187-199.
37. Yanovsky Y, Schubring SR, Yao Q, Zhao Y, Li S, May A, Haas HL, Lin JS, Sergeeva OA (2012b) Waking action of ursodeoxycholic acid (UDCA) involves histamine and GABAA receptor block. *PLoS One* 7:e42512.
38. Zimatkin SM, Baraban OV, Emel'yanchik SV (2008) Metabolic changes in rat brain histaminergic neurons during subhepatic cholestasis. *Neurosci Behav Physiol* 38:807-810.

7 Anhang

7.1 Elektrophysiologische Ableitungen und Auswertung

Die MEA (*microelectrode array*) Ableitungen, Kulturen-Herstellung und Messung der GABA-Ströme von akut isolierten Neuronen sind ausführlich in den Publikationen beschrieben. Zur Messung der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Ströme (SIPS) erfolgte die lichtmikroskopische Auswahl eines Neurons bei 100facher Vergrößerung nach Morphologie und Größe des Zellkörpers. Die Beurteilung der Zellintegrität gelang besonders gut durch das Verändern des Kontrastes. Das ausgewählte Neuron wurde nun kontinuierlich mit Messlösung aus dem Applikationssystem umspült. Eine Pumpe hielt den dafür erforderlichen Fluss in dem System aufrecht. Über eine separate Polyethylenkapillare, befestigt am Applikationssystem, konnte mit Hilfe einer Spritze und einem kleinen Schlauch zur Kapillare die Substanz lokal an das ausgewählte Neuron appliziert werden (siehe Abb. 3).

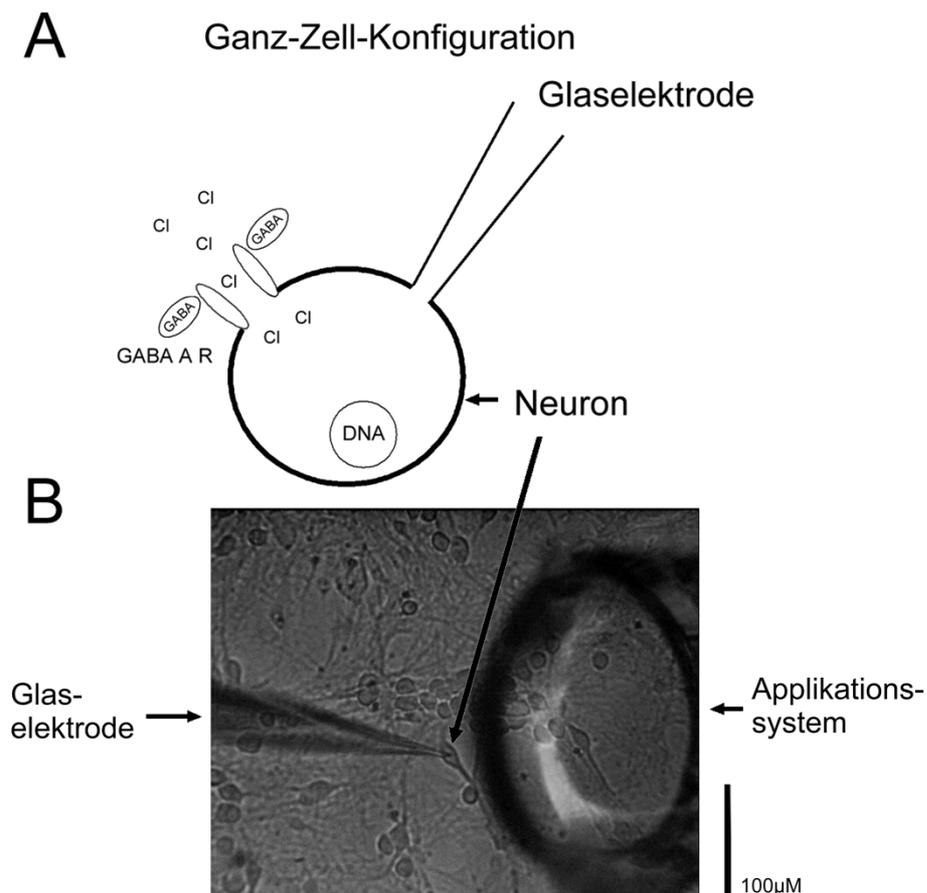


Abb. 3

A Schema der Ganz-Zell-Konfiguration eines Neurons

B Neuron in Ganz-Zell-Konfiguration und Applikationssystem

Eine Versuchsserie gliederte sich in verschiedene Abschnitte: Vor den Experimenten wurde das Nährmedium gegen die Messlösung ausgetauscht. Zunächst wurde 15 min abgewartet, um eine mögliche Beeinflussung des neuronalen Netzwerkes in Folge von Manipulation nicht als Artefakt in die Messungen zu übernehmen.

Nach erfolgreicher Herstellung der Ganz-Zell-Konfiguration (siehe Abb. 3) konnten nun spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (SIPS) gemessen werden (siehe Abb. 4), die durch GABA-Ausschüttung aus angelagerten Synaptosomen (axonalen Varikositäten) zustande kommen. Auf eine erste Kontrollaufnahme von 90 s folgte die Zugabe der Testsubstanz. Für jede aufsteigende Konzentration wurden SIPS wiederum über 90s abgeleitet. Am Ende einer jeden Messreihe, nachdem die Testsubstanzen ausgewaschen worden waren, erfolgte eine ebenfalls 90s dauernde Kontrollaufnahme.

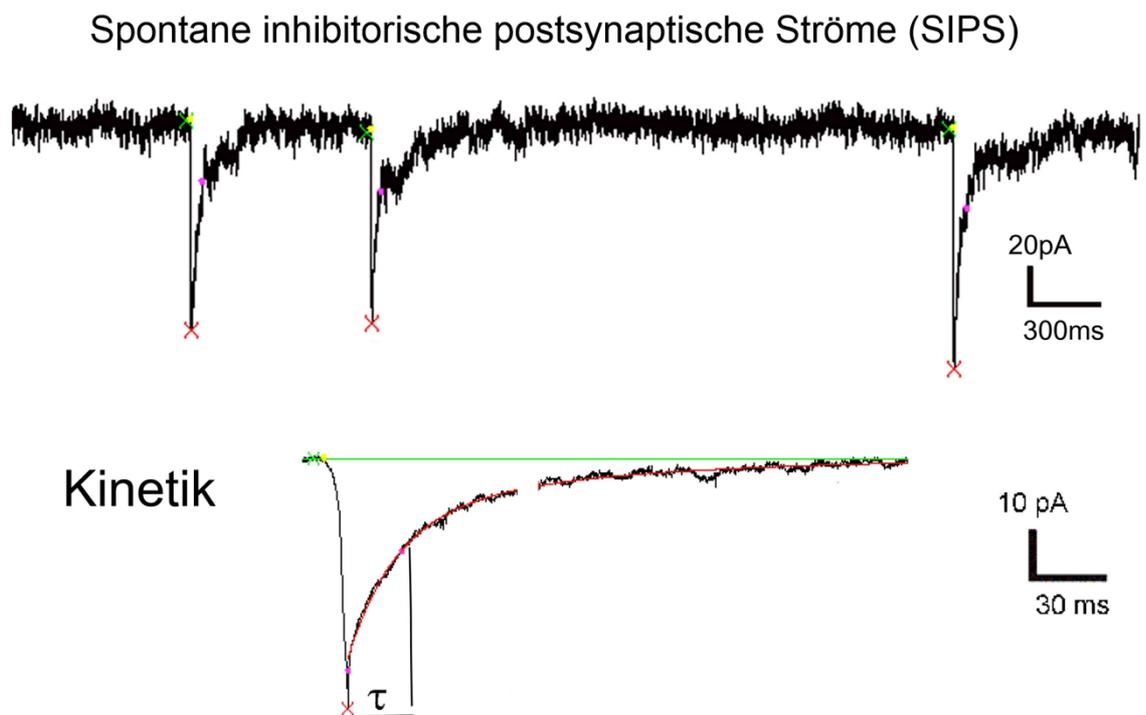


Abb. 4 Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (SIPS, engl. sIPSC)

Spontane inhibitorische (post)synaptische Ströme entstehen durch die vesikuläre Freisetzung von GABA aus den der Zelle anhaftenden Boutons (Synaptosomen). Glutamaterge und Aktionspotential-abhängige Ströme sind durch die Beifügung entsprechender Antagonisten ausgeschlossen. Die Zeitkonstante τ (die Zeit, in der der Strom auf $1/e$ seines Gipfelwertes abgefallen ist) ist ein wichtiges Maß für

Zusammensetzung und Modulation des GABAA R. Zur Auswertung der SIPS wurde MiniAnalysis (Synaptosoft,USA) verwendet.

Die Kalkulation der Dosis-Wirkungskurve erfolgte mit folgender Gleichung:

$$R = R_{\max}/(1 + (IC_{50}/[C])^n)$$

Im Falle der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Ströme (SIPS) wurde der Mittelwert der ersten Kontrollmessung als R_{max} bezeichnet. IC₅₀ ist die Konzentration einer Testsubstanz z.B. Cholat, unter der die spontane Aktivität der Kontrolle zu 50% blockiert wurde. [C] sind die unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen. Der Hill-Koeffizient n ist ein Abbild der Steilheit der Dosis-Wirkungskurve und damit des kinetischen Verhaltens der Interaktion der Testsubstanz mit dem GABAA Rezeptor.

7.2 Veröffentlichungen

The bile steroid chenodeoxycholate is a potent antagonist at NMDA and GABA(A) receptors. Schubring SR, Fleischer W, Lin JS, Haas HL, Sergeeva OA. Neuroscience Lett. 2012 Jan 11;506(2):322-6. doi: 10.1016/j.neulet.2011.11.036. Epub 2011 Dec PubMed PMID: 22155097

Waking action of ursodeoxycholic acid (UDCA) involves histamine and GABAA receptor block. Yanovsky Y, Schubring SR, Yao Q, Zhao Y, Li S, May A, Haas HL, Lin JS, Sergeeva OA. PLoS One. 2012;7(8):e42512. doi:10.1371/journal.pone.0042512. Epub 2012 Aug 6. PubMed PMID: 22880010; PubMed Central PMCID: PMC3412845

Fragrant dioxane derivatives identify beta1-subunit-containing GABAA receptors. Sergeeva OA, Kletke O, Kragler A, Poppek A, Fleischer W, Schubring SR, Görg B, Haas HL, Zhu XR, Lübbert H, Gisselmann G, Hatt H. J Biol Chem. 2010 Jul 30;285(31):23985-93. doi: 10.1074/jbc.M110.103309. Epub 2010 May 28. PubMed PMID: 20511229; PubMed Central PMCID: PMC2911342.

GABAA receptors involved in sleep and anaesthesia: β 1- versus β 3-containing assemblies. Yanovsky Y, Schubring S, Fleischer W, Gisselmann G, Zhu XR, Lübbert H, Hatt H, Rudolph U, Haas HL, Sergeeva OA. Pflugers Arch. 2012 Jan;463(1):187-99. doi: 10.1007/s00424-011-0988-4. Epub 2011 Jul 7. PubMed PMID: 21735059

7.3 Abstracts

Sergeeva OA, Schubring SR (2010) **Bile salts synchronize hypothalamic network activity by blocking GABAA receptors**. Society for Neuroscience, San Diego

S.R.Schubring, O.A. Sergeeva (2009) **Bile salts block GABA_A receptors and GABAergic Transmission**. 88th Annual Meeting 2009, Deutsche Physiologisches Gesellschaft, Giessen

O.A. Sergeeva, Y. Yanovsky, S.R. Schubring, Q. Yao, Y. Zhao, S. Li, A. May, H.L. Haas and J.S. Lin (2012) **Waking action of ursodeoxycholic acid (UDCA) depends on histamine and GABA_A receptor block**. 91st Annual Meeting 2012, Deutsche Physiologisches Gesellschaft, Dresden

8 Danksagung

An erster Stelle meines Dankes steht Frau Prof. Sergeeva. Unter ihrer hervorragenden Betreuung erlernte ich die Methodik des *patch-clamp*. Jeder Zeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite; sie verhalf mir so stets über alle Widerstände hinweg.

An dieser Stelle gilt auch Herrn Prof. Haas ein besonderer Dank, der für mich weitaus mehr als nur ein Betreuer war. Beide Mentoren förderten mich in herausragender Art und Weise. Sie ermöglichten mir die Teilhabe an einem faszinierenden Forschungsgebiet und vermittelten mir so essenzielle Grundlagen wissenschaftlicher Arbeit. Mit ihrer Faszination für den GABAA Rezeptor und das histaminerge System begeisterten sie mich für die Forschung und prägten rückblickend einen ganz bedeutenden Abschnitt meines Lebens. Dafür werde ich ihnen immer dankbar sein.

Des Weiteren danke ich meiner Mutter Traute-Ursula Schubring und meiner Schwester Katharina Schubring für ihren Rückhalt in dieser Zeit. Als letztes danke ich Frau Dr. Bettina Beyreuther, Frau Kathrin Glück und Herrn Ekkehard Gratz für ihre freundschaftliche Unterstützung.

9 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 6.6.2013

Stephan Roger Schubring