

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

**Charakterisierung der
Benzodiazepinbindungstelle
an hypothalamischen GABA_A-Rezeptoren**

Dissertation

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

vorgelegt von

Andrea Christine May

(2016)

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

gez.

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

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Olga Sergeeva

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Orhan Aktas

Für meine Familie

Publikationen:

- 1) **May, A.C.**, Fleischer, W., Kletke, O., Haas, H.L. & Sergeeva, O.A. (2013) Benzodiazepine-site pharmacology on GABAA receptors in histaminergic neurons. *British journal of pharmacology*, **170**, 222-232.
- 2) Kletke, O., Gisselmann, G., **May, A.**, Hatt, H. & O, A.S. (2013) Partial Agonism of Taurine at Gamma-Containing Native and Recombinant GABAA Receptors. *PloS one*, **8**, e61733.
- 3) Yanovsky, Y., Schubring, S.R., Yao, Q., Zhao, Y., Li, S., **May, A.**, Haas, H.L., Lin, J.S. & Sergeeva, O.A. (2012b) Waking action of ursodeoxycholic acid (UDCA) involves histamine and GABAA receptor block. *PloS one*, **7**, e42512.

Posterbeiträge:

- 1) May A., Haas H.L., Sergeeva O.A. Pharmacological identification of γ 1-subunit-containing GABAA receptors, role in hepatic encephalopathy. 1. Doktorandenkongress der Medical Research School, Düsseldorf, 2010.
- 2) May A., Kletke O., Rudolph U., Gisselmann G., Haas H.L., Sergeeva O.A. Structure and function of native GABA_A receptors decoded by single-cell RT-PCR and mouse genetics. 8th World Congress of IBRO, Florence, Italy, 2011.

Preis:

Posterpreis der Medical Research School Düsseldorf für das beste Poster des Doktorandenkongresses 2010.

Zusammenfassung

Die histaminergen Neurone des Nucleus tuberomammillaris (TMN) im posterioren Hypothalamus sind für das Wachsein verantwortlich und unterliegen während des Schlafens einer Hemmung durch GABAerge Neurone. Anxiolytika und Sedativa verstärken die GABAerge Hemmung und vermindern die Vigilanz. Deshalb haben Strukturuntersuchungen der involvierten GABA_A-Rezeptoren eine hohe klinische Relevanz. Die Neurone im TMN exprimieren neun verschiedene Untereinheiten (UE) des GABA_A-Rezeptors mit drei α -UE (α 1, α 2 und α 5), drei β , zwei γ -UE (γ 1, γ 2) und eine ε -UE, welche potentiell mehr als 27 unterschiedliche pentamere Rezeptor-Kanal-Komplexe aufbauen können. Die Bindungsstelle für die pharmakologische Modulation durch Benzodiazepine (BZD) liegt zwischen der α - und der γ -UE. Die Modulation durch BZD variiert mit der Zusammensetzung des Rezeptors. Diese Dissertation beschreibt die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung unterschiedlicher Typen von GABA_A-Rezeptoren mit Hilfe elektrophysiologischer (*Multi-Electrode Array*) und molekularbiologischer (RT-PCR, RNA-Interferenz) Methoden. Besonderes Interesse galt dabei der Funktion der bisher wenig erforschten γ 1-UE und ihrer Bedeutung für die Netzwerkaktivität. Da keine selektiven Modulatoren der γ 1-UE bekannt sind, wurden verschiedene Substanzen (DMCM, Zolpidem, Flumazenil und Midazolam) hinsichtlich dieser Eigenschaft überprüft. Maus-Genetik diente der Ausschaltung der γ 2-Bindungsstelle, um die Präsenz anderer Typen von GABA_A-Rezeptoren sichtbar zu machen: in Zellkulturen von Mäusen mit einer Punktmutation an Position 77 der γ 2-UE (γ 2F77I) ist die Wirkung von DMCM verändert. Eine DMCM-Interaktion mit der „Etomidat-Bindungsstelle“ wurde ausgeschlossen, da eine Mutation an der β 3-UE (β 3N265M) diese entfernte, während die DMCM Modulation der neuronalen Netzwerkaktivität unverändert blieb. Unsere Ergebnisse bestätigen die Expression der γ 1-UE im TMN. Nach *knock-down* der γ 1-UE mit siRNA verliert DMCM seine positiv modulatorische Wirkung an γ 2F77I-Neuronen, sowie die „sedative“ Wirkung auf die Netzwerkaktivität. Die Modulatoren der BZD-Bindungsstelle Zolpidem und Flumazenil zeigten eine nur eine geringe Wirkung auf die Netzwerk-Aktivität, was durch die Interaktion mit synaptischen GABA_A-Rezeptoren erklärbar ist. Das klassische BZD Midazolam dagegen interagiert mit extrasynaptischen α 5 β 3 γ 2 Rezeptoren und hemmt das Feuern der Neurone. Midazolam verlor seine hochaffine (γ 2-UE) aber nicht die niedrigaffine Wirkung (γ 1-UE) in γ 2F77I-Mäusen und war daher nicht geeignet zur Identifizierung der γ 1-UE. Neben der α 2- und α 1-UE scheint die γ 1-UE eine bisher unterschätzte Rolle in hypothalamischen GABA_A-Rezeptoren zu spielen. Diese Studien sind hilfreich für das Verständnis der Benzodiazepin-Wirkungen bei Schlafstörungen und im Rahmen von metabolischen Erkrankungen wie der hepatischen Enzephalopathie.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BZD	Benzodiazepine
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C _T	<i>cycle threshold</i>
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
div	<i>days in vitro</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DMCM	Methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-β-carbolin-3-carboxylat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDAC	1-Ethyl-3-(3Dimethylamino-Propyl)-Carbodiimid
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEG	Elektroenzephalogramm
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i>
HDC	Histidindecaboxylase
HE	Hepatische Enzephalopathie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure
HKG	<i>housekeeping-Gen</i>
HT	heterozygot
I _{GABA}	GABAerger Strom
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
KI	<i>knock-in</i>
MAP-2	<i>microtubule associated protein-2</i>
MEA	<i>Multi Electrode Array</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mHE	minimale HE
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBM	Neurobasalmedium
nc	<i>negative control</i>

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
pc	<i>positive control</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
qRT-PCR	quantitative (<i>real-time</i>) <i>reverse transcription followed by PCR</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
Rn	<i>reporter normalization</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RT Reaktion	reverse Transkription-Reaktion
RT-PCR	reverse Transkription gefolgt von PCR
sc-RT-PCR	<i>single cell RT-PCR</i> (Einzelzell-RT-PCR)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPR	<i>spike raster plot</i>
TMN	Nucleus tuberomamillaris
TRH	Thyreotropin- <i>releasing</i> Hormon
UE	Untereinheit
VLPO	ventrolaterale präoptische Region
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Grundlagen	1
1.1 Der ionotrope GABA _A -Rezeptor	1
1.2 Der GABA _B -Rezeptor	3
1.3 Der GABA-Metabolismus	3
1.4 BZD-Wirkung am GABA _A -Rezeptor	5
1.5 Die γ 1-UE des GABA _A -Rezeptors.....	6
1.5.1 Lokalisation	6
1.5.2 Pharmakologische Eigenschaften	6
1.6 Hepatische Enzephalopathie	8
1.6.1 Pathogenese.....	8
1.6.2 Erhöhter GABAerger Tonus	9
1.6.3 Taurin und der GABA _A -Rezeptor	10
1.6.4 Weitere Pathomechanismen der HE	11
1.6.5 Klinik und Therapie der HE	11
1.7 Der Nucleus tuberomamillaris im Hypothalamus	13
1.8 Multi-Electrode-Arrays	15
1.9 si-RNA.....	16
2. Fragestellung und experimentelles Vorgehen.....	18
3. Material und Methoden	21
3.1 Organentnahme und Anlage der Zellkulturen	21
3.2 Charakterisierung der Neurone mittels Immunhistochemie.....	22
3.3 Multi-Electrode-Array.....	23
3.3.1 Vorbereitung der MEAs	23
3.3.2 MEAs und apparative Messvorrichtung	24
3.2.3 Datenanalyse	26
3.2.4 Messprotokoll.....	26
3.4 siRNA.....	28
3.5. Quantitative (Real-Time) RT-PCR	29
3.5.1 Prinzip der qRT-PCR	29
3.5.2 Versuchsprotokoll	30
3.4.3 Auswertung	33
3.6 Einzel-Zell-RT-PCR.....	34
3.7 Statistik	36
3.8 Erläuterungen zu den Abbildungen.....	37
3.9 Material	38

3.9.1	Hersteller	38
3.9.2	Kulturmedium: mv10	39
3.9.3	Nährmedium	39
3.9.4	Standardbadlösung (magnesiumfreie Hepes-Buffered Solution)	39
3.9.5	PCR-Mastermix.....	40
4.	Ergebnisse.....	41
4.1	Immunhistochemische Charakterisierung der TMN Neurone.....	41
4.2	Identifizierung γ 1-UE exprimierender GABA _A -Rezeptoren	42
4.2.1	Testung von DMCM	42
4.2.2	Testung von Zolpidem.....	46
4.2.3	Testung von Flumazenil	47
4.3	Vermittlung des DMCM-Effektes über die γ 1-UE oder die β 2/3-UE	49
4.4	siRNA-Versuche.....	52
4.4.1	DMCM.....	52
4.4.2	Flumazenil	54
4.4.3	Feuerrate der Kulturen	55
4.5	PCR-Ergebnisse.....	55
4.6	Sequenzierung der Einzelzell-RT-PCR-Produkte	63
4.7	Midazolam Effekt.....	64
4.8	Funktionsfähigkeit des GABA _A -Rezeptors in γ 2F771-Kulturen	65
5.	Diskussion	68
5.1	Pharmakologie der BZD-Bindungsstelle	68
5.1.1	Überblick.....	68
5.1.2	DMCM.....	69
5.1.3	Zolpidem	72
5.1.4	Flumazenil	75
5.1.5	Midazolam	76
5.2	Anstieg der Feuerrate nach γ 1-siRNA	77
5.3	Zellkulturen und MEA-System	77
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	78
6.	Literaturverzeichnis.....	81

1. Einleitung und Grundlagen

1.1 Der ionotrope GABA_A-Rezeptor

γ-Aminobuttersäure (GABA) ist der häufigste inhibitorische Transmitter im Gehirn. In Nerven- und Gliazellen wird GABA in einer Decarboxylierungsreaktion aus Glutamat gebildet und in synaptischen Vesikeln gespeichert.

Das Eintreffen eines Aktionspotentials in der Nervenendigung eines GABAergen Neurons bewirkt die Exozytose von GABA in den synaptischen Spalt. Die GABA-bindenden Rezeptoren werden unterteilt in GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren, die sich in ihrer Struktur und Funktion und in ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden.

GABA_A-Rezeptoren sind ligandenaktivierte Chloridionenkanäle, die in der Regel postsynaptisch auf Somata von Neuronen und Dendriten lokalisiert sind. Das Eintreffen eines Aktionspotentials in der Präsynapse führt zu einem Calciumeinstrom, wodurch die mit GABA beladenen Vesikel mit der präsynaptischen Membran verschmelzen. Jedes Vesikel entlädt Tausende von GABA-Molekülen in den synaptischen Spalt, sodass die GABA-Konzentration dort kurzfristig stark ansteigt (millimolarer Bereich) (Mody *et al.*, 1994). Nach Diffusion von GABA durch den synaptischen Spalt und Anlagerung an den Rezeptor kommt es zu einem Chlorid-Ioneneinstrom in die Zelle. Als Folge dieses Anioneneinstroms entsteht ein schnelles, meist inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP), das die Erregbarkeit des Neurons vermindert. Dieser Effekt tritt also auf, wenn postsynaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren für einen kurzen Moment einer hohen GABA-Konzentration ausgesetzt sind und wird üblicherweise als schnelle, „phasische“ Inhibition beschrieben (Farrant & Nusser, 2005).

Abhängig vom Chlorid-Gleichgewichtspotential und dem Ruhemembranpotential kann die Rezeptoraktivierung auch zu einer Depolarisation oder keiner Veränderung des Membranpotentials führen (Mody *et al.*, 1994). Der hemmende Effekt beruht in diesem Fall allein auf dem Membrankurzschluss durch die geöffneten Kanäle.

1. Einleitung und Grundlagen

GABA_A-Rezeptoren weisen eine hetero-pentamere Untereinheiten-Stöchiometrie auf. Molekularbiologische Studien konnten zeigen, dass die im Menschen und Säugetier vorkommenden Untereinheiten (UE) acht verschiedenen Klassen zugeordnet werden können (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , π , ρ 1-3, ϵ und θ) und von 19 unterschiedlichen Genen kodiert werden (Luscher *et al.*, 2011). Dabei sind die UE pseudo-symmetrisch mit der Sequenz γ - β - α - β - α um den Ionenkanal herum angeordnet (Baumann *et al.*, 2002).

Die UE-Komposition des GABA_A-Rezeptors bestimmt dessen pharmakologische Eigenschaften und die GABA-Sensitivität (Sieghart, 1995). Die exakte Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors ist noch umstritten, wobei die Variante 2 α -, 2 β -, 1 γ -UE bevorzugt wird (Sieghart *et al.*, 1999).

Der GABA_A-Rezeptor kann durch die Bindung einer Vielzahl von Substanzen pharmakologisch beeinflusst werden u.a. Benzodiazepine (BZD), Barbiturate, Ethanol, Muscimol (Agonist) und Neurosteroide. Entsprechend dem heutigen Modell des GABA_A-Rezeptors geht man davon aus, dass sich die GABA-Bindungsstelle im Bereich der α/β -UE und die BZD-Bindungsstelle im Bereich der α/γ -UE befindet (**Abb. 1**) (Sigel & Buhr, 1997).

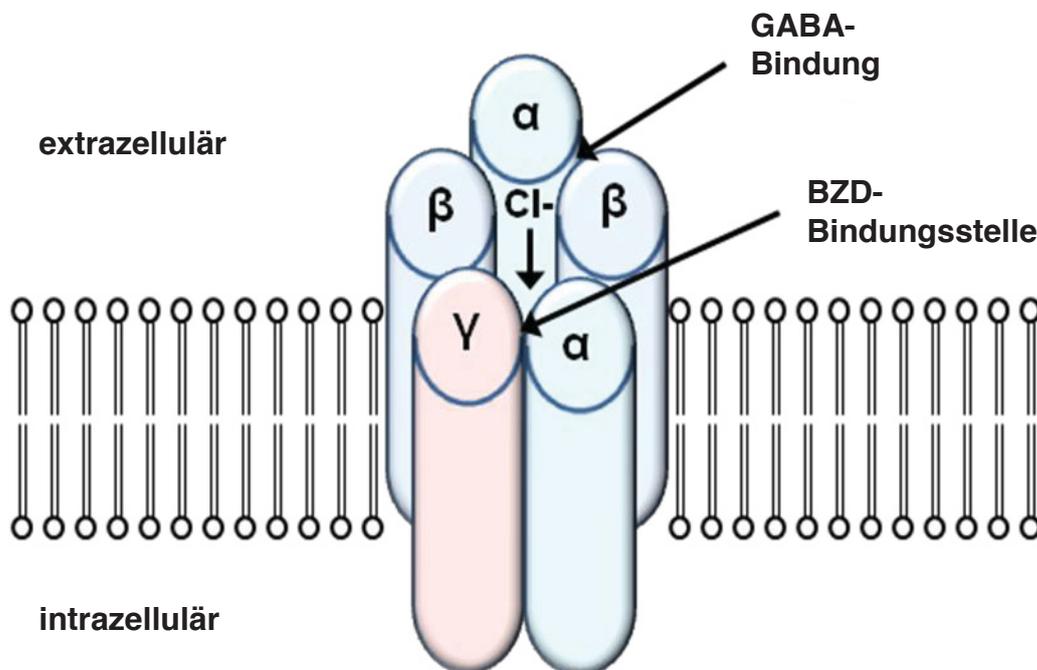


Abb 1: Der GABA_A-Rezeptor

1. Einleitung und Grundlagen

Neben den synaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptoren mit $\gamma 2$ - oder $\gamma 1$ -UE, gibt es sowohl Rezeptoren, die nur α - und β -UE aufweisen als auch Rezeptoren, die aus α -, β - und δ -UE bestehen. Diese extrasynaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptoren wurden in verschiedenen Hirnregionen entdeckt und vermitteln statt der schnellen phasischen eine „tonische“ Inhibition.

Aktiviert werden diese Rezeptoren bereits durch geringe GABA-Konzentrationen im Extrazellulärraum. Sie bestehen neben β - und γ -UE aus entweder $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - oder $\alpha 6$ -UE. Oft ersetzt die δ -UE die γ -UE in diesem Rezeptor-Kanal-Komplex. Typische Eigenschaften der meisten extrasynaptischen GABA-Rezeptoren sind außerdem eine geringe Desensibilisierung und Insensitivität gegenüber BZD (Farrant & Nusser, 2005; Belelli *et al.*, 2009). Diese Rezeptoren sind besonders empfindlich für Ethanol (Wallner *et al.*, 2003), Neurosteroiden (Belelli *et al.*, 2002) und Anästhetika (Jia *et al.*, 2008a).

1.2 Der GABA_B-Rezeptor

GABA_B-Rezeptoren sind metabotrope G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung zu Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit (meist somatisch postsynaptisch) und zur Verminderung der Calcium-Leitfähigkeit (meist an axo-axonischen) Synapsen führt. Baclofen aktiviert den GABA_B-Rezeptor, aber oben genannte Modulatoren des GABA_A-Rezeptors haben auf den metabotropen GABA_B-Rezeptor keinen Einfluss (Bormann, 2000). GABA_B-Rezeptoren kommen sowohl auf der prä- als auch auf der postsynaptischen Membran vor.

1.3 Der GABA-Metabolismus

Nach der Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt wird dieses durch rasche Wiederaufnahme in die Präsynapse von Neuronen oder in Gliazellen mittels GABA-Transportern (GATs) inaktiviert. In Astrozyten aufgenommener Transmitter wird durch das Enzym GABA-Transaminase zu Succinyl-Semialdehyd metabolisiert. Succinyl-Semialdehyd wird entweder enzymatisch

1. Einleitung und Grundlagen

zu Succinylsäure oxidiert, in den Citratzyklus eingeschleust und zu Glutamat transformiert oder mit Hilfe der Aldehyd-Reduktase in γ -Hydroxybuttersäure (GHB) umgewandelt (**Abb. 2**). In Gliazellen kann das anfallende Glutamat nicht zu GABA verstoffwechselt werden, da diese im Gegensatz zu GABAergen Neuronen das Enzym Glutamat-Decarboxylase nicht exprimieren. Daher wird aus Glutamat mit Hilfe des Enzyms Glutamin-Synthetase zunächst Glutamin gebildet und dieses über spezifische Mechanismen in neuronale Axone transportiert. Im GABAergen Neuron wird dann in einem ersten Schritt Glutamin zu Glutamat desaminiert und in einem zweiten Glutamat erneut zu GABA decarboxyliert. Transmitter, der direkt in GABAerge Neurone aufgenommenen wird, kann wiederum in synaptische Vesikel verpackt werden oder den gleichen Stoffwechselweg wie in Astrozyten durchlaufen. Im Unterschied zu Gliazellen entsteht am Ende dieses enzymatischen Prozesses aber GABA und nicht Glutamin (Brambilla *et al.*, 2003; Belebony *et al.*, 2004).

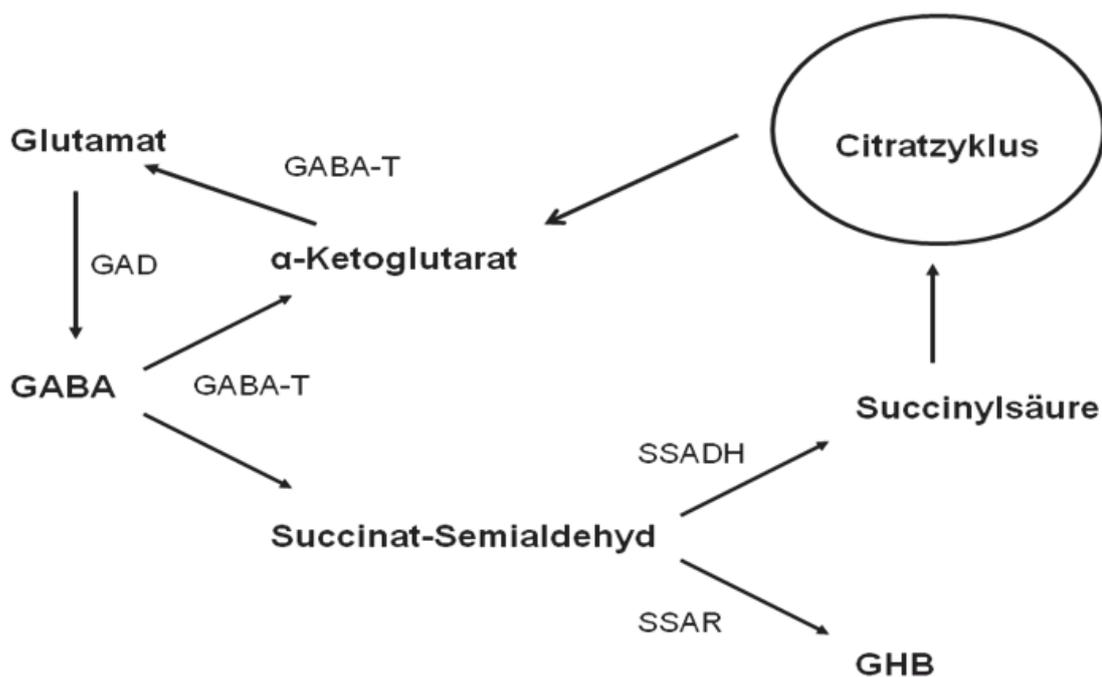


Abb. 2: GABA Metabolisierung in Neuronen (modifiziert nach Belebony et al, 2004)

Abkürzungen: GAD: GABA-Decarboxylase; GABA-T: GABA-Transaminase bzw. α -Ketoglutaratdehydrogenase; SSADH: Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase; SSAR: Succinat-Semialdehyd-Reduktase; GHB: γ -Hydroxybuttersäure.

Aus Glutamat entstandenes GABA wird in GABAergen Neuronen entweder über die Stoffwechselprodukte Succinat-Semialdehyd, Succinylsäure und α -Ketoglutarat recycelt oder zu GHB abgebaut.

1.4 BZD-Wirkung am GABA_A-Rezeptor

Die BZD-Bindungsstelle erfordert die Interaktion der α - und γ -UE am GABA_A-Rezeptor. Unter den α -UE scheinen die $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ in Verbindung mit der $\gamma 2$ -UE relevant für die BZD-Effekte zu sein. Die BZD-Anlagerung führt zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des GABA_A-Rezeptors, die eine Hyperpolarisation der Zelle nach sich zieht und die Erregbarkeit des Neurons herabsetzt. Daraus ergeben sich die charakteristischen Wirkungen der klassischen BZD wie Anxiolyse, Sedation, Antikonvulsion, Hypnose, zentrale Muskelrelaxation sowie die Nebenwirkungen anterograde Amnesie und Abhängigkeit.

In den letzten Jahren haben zahlreiche Untersuchungen an Tiermodellen mit gezielten Punktmutationen im Bereich der BZD-Bindungsstelle gezeigt, dass deren charakteristische Effekte bestimmten UE des GABA_A-Rezeptors zugeordnet werden können. Die klassischen Benzodiazepine wie Diazepam, Clonazepam und Midazolam haben vergleichbare Affinitäten zu BZD-sensitiven GABA_A-Rezeptoren, die aus $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -UE aufgebaut sind. Eine Gemeinsamkeit dieser α -UE ist die konservierte Aminosäure Histidin an Position 101, wohingegen die $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -UE an der gleichen Stelle Arginin aufweisen. Der Ersatz von Histidin durch Arginin bewirkt eine Reduktion der Diazepam-Wirkung an den Rezeptoren und gibt Aufschluss über die Bedeutung der jeweiligen α -UE (Rudolph *et al.*, 1999): Die Mutation (H101R) in der $\alpha 1$ -UE hebt die sedierende und antikonvulsive Wirkung von Diazepam auf (McKernan *et al.*, 2000) und vermindert den typischen Nebeneffekt der klassischen BZD, die anterograde Amnesie (Rudolph *et al.*, 1999). Die gleiche genetische Manipulation an der $\alpha 2$ -UE zeigt, dass diese entscheidend für die anxiolytische und muskelrelaxierende Wirkung von Diazepam ist (Low *et al.*, 2000; Crestani *et al.*, 2001). Die in extrasynaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptoren vorkommende $\alpha 5$ -UE ist wichtig für kognitive Fähigkeiten wie Lernen und Gedächtnis (Mohler, 2006).

Neben der α -UE ist die jeweilig exprimierte γ -UE für die pharmakologische Modulation der BZD-Bindungsstelle relevant. Rezeptoren mit $\gamma 2$ -UE kommen ubiquitär im ZNS vor und sind bisher genauer charakterisiert als $\gamma 1$ -UE enthaltende Rezeptoren, über deren Funktion noch wenig bekannt ist.

1. Einleitung und Grundlagen

Die Vielfalt der GABA_A-Rezeptor-Subtypen ist nicht vollständig erforscht. Unsere Arbeitsgruppe ist auf der Suche nach neuen UE-spezifischen Modulatoren des GABA_A-Rezeptors, welche die funktionelle Rolle seltener Rezeptor-Typen erhellen können. Die Funktion und die Bedeutung der γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors sind bis heute noch weitgehend unklar und sollen in dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

Das Vorkommen und gewisse pharmakologische Eigenschaften der γ 1-UE sind bereits von anderen Gruppen beschrieben worden.

1.5 Die γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors

1.5.1 Lokalisation

Bisher ist bekannt, dass die γ 1-UE im Gegensatz zur γ 2-UE nur in ca. 5 % der GABA_A-Rezeptoren im ZNS exprimiert wird (Benke *et al.*, 1996). In höherer Dichte kommt sie aber im centralen Nucleus der Amygdala (Esmaeili *et al.*, 2009), in der medialen präoptischen Region (Nett *et al.*, 1999), im Septum, im Thalamus und im Hypothalamus vor (Ymer *et al.*, 1990; Wisden *et al.*, 1992; Pirker *et al.*, 2000; Sergeeva *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist die γ 1-UE die weitaus dominierende γ -UE in Primärkulturen von Rattenastrozyten sowohl im Cerebellum (Bovolín *et al.*, 1992) als auch im Cerebrum (Bormann & Kettenmann, 1988).

1.5.2 Pharmakologische Eigenschaften

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass γ 1-UE-exprimierende Rezeptoren besondere pharmakologische Charakteristika aufweisen: DMCM (Methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carbolin-3-carboxylat), ein inverser Agonist an der BZD-Bindungsstelle, potenziert α 2 β 1 γ 1-Rezeptoren, aber inhibiert α 2 β 1 γ 2-Rezeptoren (Wafford *et al.*, 1993; Khom *et al.*, 2006). Hervorzuheben ist auch der starke Affinitätsverlust von DMCM an γ 1-UE-tragenden Rezeptoren (Ymer *et al.*, 1990).

1. Einleitung und Grundlagen

Zolpidem ist ein reiner Agonist an der BZD-Bindungsstelle an $\alpha 2\beta 1\gamma 2$ -Rezeptoren, wohingegen es an $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ -Rezeptoren als partieller Agonist wirkt (Wafford *et al.*, 1993) und diese Rezeptoren nur in geringerem Ausmaß potenziert (Khom *et al.*, 2006). Was die Affinität von Zolpidem für Rezeptoren mit $\gamma 1$ -UE angeht, gibt es kontroverse Ergebnisse: Wafford *et al.* (1993) stellen eine vierfach höhere Affinität im Vergleich zu Rezeptoren mit $\gamma 2$ -UE fest; Benke *et al.* (1996) verweisen auf einen Affinitätsverlust dieser Rezeptoren für Zolpidem.

Flumazenil, ein Antagonist an der BZD-Bindungsstelle, hat eine ähnlich geringe Affinität zur $\gamma 1$ -UE wie DMCM (Ymer *et al.*, 1990; Benke *et al.*, 1996). In der Konzentration $1\mu\text{M}$ kann Flumazenil die Wirkung von Clotiazepam und Triazolam (beides BZD) an $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ -Rezeptoren nicht abschwächen. Im Gegenteil, in höheren Konzentrationen ($10\mu\text{M}$ und $100\mu\text{M}$) verstärkt es sogar den I_{GABA} (Khom *et al.*, 2006).

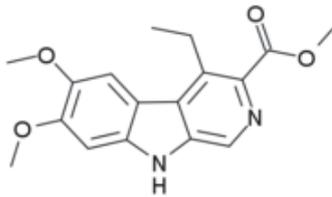
Flumazenil findet bereits klinische Anwendung im Rahmen einer schweren oder durch Benzodiazepine getriggerten hepatischen Enzephalopathie (Haussinger, 2006a; Grunhage *et al.*, 2007). Darüber hinaus wird es zur Aufhebung einer BZD-Sedierung oder BZD-Narkose eingesetzt (Karow & Lang-Roth, 2007).

Das klassische BZD Midazolam hat eine siebenfach geringere Affinität zu $\gamma 2\text{F77I}$ -Neuronen im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen (Ogris *et al.*, 2004). Auch der Austausch der Aminosäure Phenylalanin durch Tyrosin an der gleichen Position geht mit einem drastischen (88fachem) Affinitätsverlust für Midazolam einher (Sigel & Buhr, 1997). Die Gruppe um Khom *et al.* (2006) stellte fest, dass Midazolam den I_{GABA} an $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ -Rezeptoren wesentlich geringer potenziert als an $\alpha 1\beta 2\gamma 2\text{S}$ -Rezeptoren (92 % vs. 342 %).

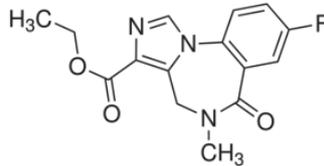
Eine neuartige Zugang zur Funktion der GABA_AR , die die $\gamma 1$ -UE enthalten, wird in dieser Arbeit angewendet: Mäuse mit einer mutierten $\gamma 2$ -UE, $\gamma 2\text{F77I}$, zeigen keine Modulation durch die niedrig-dosierte Substanz Zolpidem und durch DMCM. In hypothalamischen histaminergen Neuronen von $\gamma 2\text{F77I}$ Mäusen ist die Modulation durch diese beiden Substanzen aber erstaunlicherweise in 40% der Neuronen vorhanden. Vermutlich weist diese

1. Einleitung und Grundlagen

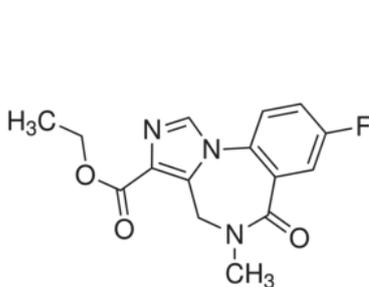
Subklasse an Rezeptoren die $\gamma 1$ -UE auf. Die Strukturformeln der experimentell verwendeten Substanzen sind in **Abb. 3** dargestellt.



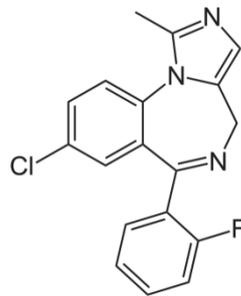
DMCM



Zolpidem



Flumazenil



Midazolam

Abb.3: Strukturformeln der eingesetzten Substanzen DMCM, Zolpidem, Flumazenil und Midazolam.

1.6 Hepatische Enzephalopathie

1.6.1 Pathogenese

Die Hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Krankheitsbild, das im Rahmen akuter oder chronischer Lebererkrankung auftreten kann. Die zu Grunde liegende Pathogenese ist multifaktoriell und noch nicht vollständig verstanden. Konsens besteht aber dahingehend, dass Ammonium eine der wichtigsten Noxen in der Entstehung der HE ist.

Ammonium wird hauptsächlich von Colonbakterien produziert und gelangt über die Pfortader in die Leber. Hier erfolgt die Verstoffwechslung und Entgiftung durch die Bildung von Harnstoff und Glutamin. Diese Metabolisierung erfolgt in der erkrankten Leber nur noch in unzureichendem Ausmaß (um ca. 80% verringert (Gerber & Schomerus, 2000), sodass die Ammoniumkonzentration im

1. Einleitung und Grundlagen

systemischen Kreislauf und im zentralen Nervensystem (ZNS) ansteigt (Bosoi & Rose, 2009).

Mehrfach bestätigt ist die Theorie, dass die Ammoniumüberladung des Gehirns zur Entwicklung eines leichtgradigen Hirnödems führt (Haussinger, 2006b; Haussinger & Schliess, 2008). Dieses geht einher mit einer Astrozytenschwellung und der Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, wodurch es zu RNA- und Protein-Modifikationen kommt. Eine Störung der glioneuronalen Kommunikation und eine pathologisch verlangsamte oszillatorische Aktivität, besonders zwischen Thalamus und Motorcortex, sind die Folge (Timmermann *et al.*, 2003; Vaquero *et al.*, 2003; Timmermann *et al.*, 2005; Haussinger, 2006b; Schliess *et al.*, 2006; Schnitzler *et al.*, 2006; Reinehr *et al.*, 2007; Haussinger & Schliess, 2008; Kahlbrock *et al.*, 2012).

1.6.2 Erhöhter GABAerger Tonus

Eine mehrfach beschriebene Erklärung zur Pathogenese der HE, die erstmals vor ca. dreißig Jahren formuliert wurde, ist ein erhöhter GABAerger Tonus (Schafer *et al.*, 1984). Folgende Befunde von Versuchen mit experimentell induzierte HE, sowohl an Tieren als auch am Menschen, unterstützen diese These:

(I) Visuell evozierte Potentialmuster bei Kaninchen mit Galactosamin-induzierter HE ähneln visuell evozierten Potentialen von Tieren, die mit verschiedenen allosterischen Agonisten des GABA_A-Rezeptors behandelt wurden (Schafer *et al.*, 1984; Jones & Basile, 1998). (II) Die spontane Aktivität isolierter Purkinje-Neurone wird bei Kaninchen mit Galactosamin-induzierter HE durch GABA-Rezeptor-Modulatoren stärker beeinflusst als bei gesunden Kaninchen (Basile *et al.*, 1988). (III) Flumazenil, ein hoch-selektiver Benzodiazepin-Antagonist am GABA_A-Rezeptor, kann die Verhaltensstörungen und die EEG-Aktivität von HE-Patienten verbessern (Barbaro *et al.*, 1998). (IV) Außerdem kann Flumazenil kurzfristig eine Linderung der Symptome und eine Prognoseverbesserung dieser Patienten bewirken. Die Substanz scheint aber keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben (Als-Nielsen *et al.*, 2004). (V) Das

1. Einleitung und Grundlagen

Ansprechen auf Medikamente ist vermindert, die normalerweise epileptische Anfälle auslösen, da sie den GABAergen Tonus senken (Jones *et al.*, 1990).

Zu den möglichen pathophysiologischen Mechanismen zur Erklärung des GABAergen Tonus bei HE zählen: Eine Erhöhung des GABA-Spiegels durch vermehrte GABA-Aufnahme in das Gehirn auf Grund einer Veränderung der Bluthirnschranke (Schafer & Jones, 1982; Bassett *et al.*, 1990). Außerdem wurden Veränderungen im Expressionsmuster des GABA_A-Rezeptors beschrieben (Song *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005). Darüber hinaus sind ein Anstieg der endogenen GABA_A-Rezeptor-Modulatoren wie Benzodiazepine und Neurosteroide, die den Strom durch GABA_A-Rezeptor-Kanäle erhöhen, sowie die vermehrte Expression des peripheren Benzodiazepin-Rezeptors (PBR) von Bedeutung (Schafer & Jones, 1982; Itzhak *et al.*, 1995; Basile & Jones, 1997; Jones, 2002; Ahboucha & Butterworth, 2004; 2005; Baraldi *et al.*, 2009). Eine wichtige Grundlage für das Verständnis der veränderten GABAergen Transmission im Rahmen der HE ist die Beziehung zwischen dem strukturellem Aufbau und der Funktion des GABA_A-Rezeptors.

1.6.3 Taurin und der GABA_A-Rezeptor

Die Aminosulfonsäure Taurin, ein bedeutender Osmoregulator und Modulator der neuronalen Aktivität, ist ein partieller Agonist an GABA_A-Rezeptoren mit γ -UE und potenziert extrasynaptisch gelegene GABA_A-Rezeptoren (Jia *et al.*, 2008b). Taurin wird sowohl in der Leber als auch im ZNS synthetisiert und spielt eine bedeutende Rolle für das motorische System und die striatale Plastizität (Sergeeva, 2013). Verschiedene Studien zeigten, dass die Taurin-Konzentration im Rahmen der HE modifiziert wird: Als Folge akuter und chronischer Leberzellschädigung kann es zu einem Abfall der Taurinkonzentration im ZNS kommen (Butterworth, 1996), was mit einer reduzierten Sensitivität synaptischer und extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren einhergeht und zur striatalen Disinhibition führt (Sergeeva *et al.*, 2007). Somit könnten motorische Defizite, die im Rahmen einer HE auftreten, eventuell durch eine Taurin-Supplementierung positiv beeinflusst werden (Sergeeva, 2013). Um die Rolle der BZD-Bindungsstelle und der Endodiazepine für die HE zu klären

1. Einleitung und Grundlagen

wäre ein Mausmodell mit „loss of function“ durch eine Punktmutation an der BZD-Bindungsstelle ideal. Allerdings haben wir heraus gefunden, dass die Wirkung von Taurin bei der Mutation γ 2F77I abgeschwächt ist, sodass die mutante Maus als HE-Modell nicht in Frage kommt (Kletke *et al.*, 2013).

1.6.4 Weitere Pathomechanismen der HE

Erhöhte Glutamin- und Histaminspiegel scheinen ebenfalls einen Einfluss auf den GABAergen Tonus im Rahmen einer HE zu haben (Butterworth, 1996; Fogel *et al.*, 2001; Lozeva *et al.*, 2003; Albrecht & Norenberg, 2006).

Folgende Faktoren sind vermutlich darüber hinaus in der Pathogenese von Bedeutung: Modifikationen der Blut-Hirn-Schranke, Manganansammlung in den Basalganglien, ein Serotonindefizit, ein Zinkmangel, die Produktion falscher Neurotransmitter (Cash *et al.*, 2010) und neuronale Inflammation (Cauli *et al.*, 2009b).

1.6.5 Klinik und Therapie der HE

In der Bundesrepublik Deutschland ist eine ethyltoxische Leberzirrhose die häufigste Ursache für eine HE, von der je nach Studienpopulation bis zu 70% der Zirrhotiker betroffen sind (Cash *et al.*, 2010). Faktoren wie Blutungen, Infektionen, eiweißreiche Mahlzeiten, Obstipation, Schock, Elektrolytstörungen und verschiedene Medikamente (Sedativa und Diuretika) können, bei vorher bestehender hepatischer Dysfunktion, eine HE auslösen (Kircheis, 2007).

Das klinische Bild der HE variiert sehr stark von minimaler HE (mHE), die nur mit Hilfe neuropsychologischer und neurophysiologischer Tests diagnostiziert werden kann, bis hin zu ausgeprägten neurologischen Defiziten und tiefem Koma. Die Einteilung des Stadiums der HE erfolgt u.a. durch Bestimmung der kritischen Flicker-Frequenz (Kircheis *et al.*, 2002). Frühe Symptome der HE sind Ataxie, Tremor und Verlangsamung der Fingerbewegungen (Butz *et al.*, 2010). Die HE ist nach Beseitigung der auslösenden Faktoren in jedem Stadium potentiell reversibel (Schliess *et al.*, 2006).

1. Einleitung und Grundlagen

Aus therapeutischer Sicht ist es daher entscheidend, zunächst systematisch nach der Ursache der HE zu suchen, Differentialdiagnosen auszuschließen und potentielle Auslöser der Erkrankung zu beseitigen (Prakash & Mullen, 2010). Lassen sich keine eindeutigen Faktoren zur kausalen Behandlung finden, erfolgt eine symptomatische Therapie. Diese beinhaltet den Einsatz verschiedener pharmakologischer Substanzen, deren Effektivität und klinischer Stellenwert noch nicht abschließend beurteilt werden können. Der Grund dafür ist, dass groß angelegte, randomisierte, kontrollierte doppel-blinde Langzeitstudien fehlen. Etabliert ist aber die orale Gabe von nicht absorbierbaren Disacchariden, die vor allem den Ammoniummetabolismus im Darm beeinflussen sollen. Am gleichen Pathomechanismus greifen empirisch verordnete Antibiotika wie Neomycin und Rifaximin, sowie die Substanzen L-Ornithin-L-Aspartat, L-Carnitin, Natrium-Benzoat und eine Zink-Supplementierung an (Prakash & Mullen, 2010; Bismuth *et al.*, 2011).

Um die Veränderungen auf Neurotransmitterebene im Gehirn zu modifizieren, werden Bromocriptin, L-Dopa und Flumazenil therapeutisch eingesetzt. Bromocriptin und L-Dopa wirken auf extrapyramidal-motorische Symptome bei chronischer HE, denen ein Dopamin-Mangel zu Grunde liegt (Morgan *et al.*, 1980). Der BZD-Rezeptor-Antagonist Flumazenil soll den GABAergen Tonus hemmen und scheint besonders bei schwerer HE einen positiven Effekt auf Verhaltensstörungen auszuüben (Barbaro *et al.*, 1998).

Klinisch erprobt werden außerdem eine diätetische Proteinrestriktion, die Applikation verzweigtkettiger Aminosäuren, Acarbose und probiotische Substanzen (Cash *et al.*, 2010). Bei ausgeprägter Leberzirrhose ist die ultima ratio eine Lebertransplantation (Bismuth *et al.*, 2011).

Im Rahmen einer experimentell induzierten HE an Ratten konnte gezeigt werden, dass der GABA_A-Rezeptor-Antagonist Bicucullin zur Abnahme des GABAergen Tonus und damit zu einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Tiere führt (Cauli *et al.*, 2009a). Eine längerfristige Anwendung von Bicucullin ist aber nicht möglich, da die Substanz Konvulsionen hervorruft.

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf Veränderungen des GABAergen Systems im Rahmen einer HE. Eine erhöhte GABA Produktion unter

Hyperammonämie ist bereits nachgewiesen (Cauli *et al.*, 2009a; Leke *et al.*, 2011). Klinisch relevant ist außerdem die Suche nach natürlichen Substanzen, die den erhöhten GABAergen Tonus vermindern könnten und damit therapeutisch wirksam sind.

1.7 Der Nucleus tuberomamillaris im Hypothalamus

Die Experimente dieser Arbeit wurden ausschließlich an Neuronen des Nucleus tuberomamillaris (TMN) im posterioren Hypothalamus durchgeführt. Dieses Kerngebiet enthält die einzigen histaminergen Neurone im ZNS (Panula *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1984). Die Axone der TMN-Neurone projizieren in viele Regionen des ZNS (u.a. den cerebralen Cortex, die Amygdala, die Substantia nigra, das Striatum, den Hippocampus, den Thalamus und das Rückenmark) (Haas & Panula, 2003) und sind reziprok mit weiteren aminergen Systemen des ZNS verbunden (Kaslin & Panula, 2001). Histaminerge Neurone finden sich vor der Geburt vorübergehend im Hirnstamm, von wo sie bereits weitläufige Projektionen entwickeln und wieder verschwinden; bis zum Ende der zweiten postnatalen Woche entwickeln sie sich dann ausschließlich im tuberomamillaren Kern des hinteren Hypothalamus (Panula *et al.*, 2014). Die Bedeutung dieses Phänomens ist unbekannt; es ist jedoch relevant für die Herstellung von Kulturen aus Gehirnen neugeborener Nager. Wir haben deshalb die Zahl der histaminergen Neurone in den Kulturen stets immunhistochemisch bestimmt und dabei die Neuroneigenschaft mit dem Marker MAP-2 nachgewiesen. Es wurde schon früher gezeigt, dass ca 7% der MAP-2 positiven Zellen in Kulturen von neonatalen Ratten Histamin-positiv sind (Sergeeva *et al.*, 2006).

Sowohl Ericson *et al.* (1991), als auch Airaksinen *et al.* (1992), wiesen GABA im TMN nach und vermuten, dass das GABAerge System von entscheidender Bedeutung für die Funktion des TMN ist. Heute ist bekannt, dass TMN-Neurone neben GABA und Histamin, weitere Transmitter exprimieren bzw. co-exprimieren. Dazu zählen Galanin, Enkephaline, TRH und Substanz P (Lin *et al.*, 2011).

1. Einleitung und Grundlagen

Eine Schlüsselrolle nimmt der TMN in der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus ein. Außerdem beeinflusst er den Energiehaushalt, endokrine Funktionen, die synaptische Plastizität und Lernprozesse (Haas & Panula, 2003).

In der Physiologie des Schlafes kommt dem TMN besondere Bedeutung zu. Die histaminergen Neurone sind tonisch aktiv im Stadium des Wachseins und zeigen keine Aktivität im Schlaf. Die GABA-vermittelte Inhibition des TMN durch die ventrolaterale präoptische Region (VLPO) ist wesentlich für die Schlaf-Generierung (Sherin *et al.*, 1996). Im Zuge des *slow-wave sleep* (SWS) steigt die GABA Freisetzung im posterioren Hypothalamus (Nitz & Siegel, 1996). Die GABAerge Transmission im TMN ist daher von großer Relevanz für die physiologische Kontrolle des Schlaf-Wach-Zyklus. In einer Arbeit von Zecharia *et al.* (2012) wurde ein neues Mausmodell generiert, das nur in histaminergen Neuronen im TMN eine Deletion in der $\gamma 2$ -UE besitzt. Bemerkenswerterweise scheint diese genetische Manipulation keinen Einfluss auf den Schlaf-Wach-Rhythmus zu haben. Die Gruppe schlussfolgerte daraus, dass GABA eine untergeordnete Rolle für die Schlaf-Generierung spielt. Der synaptische I_{GABA} war zwar im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren deutlich reduziert (Zecharia *et al.*, 2012), welche Bedeutung der verbliebene GABAerge Strom haben könnte, wurde aber nicht näher analysiert.

Da es auch im Zuge einer HE zu Veränderungen im Schlaf-Wach-Rhythmus kommen kann (Cordoba *et al.*, 1998) sind der TMN und das GABAerge System von großem Interesse für dieses Krankheitsbild. Auch die Tatsache, dass erhöhte Histamin- und GABA-Spiegel sowohl bei Tieren mit experimentell induzierter HE (Fogel *et al.*, 1991), als auch bei Menschen im hepatischen Koma festgestellt wurden (Borg *et al.*, 1982; Lozeva *et al.*, 2003), bestätigt diese Annahme.

Sergeeva *et al.* (2002), untersuchten mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik, der Einzelzell-RT-PCR und der Immunhistochemie die UE-Zusammensetzung und die Stöchiometrie der GABA_A-Rezeptoren im TMN. Sie stellten fest, dass alle Rezeptoren die $\gamma 2$ -UE, viele auch die $\gamma 1$ -UE aufweisen. Hinsichtlich der β -UE dominiert die $\beta 1$ -UE, obwohl sie nur in geringerem Ausmaß exprimiert ist (Sergeeva *et al.*, 2010; Yanovsky *et al.*, 2012). Von den bisher identifizierten α -

1. Einleitung und Grundlagen

UE werden nur die $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 5$ -UE mit scRT-PCR detektiert. In den meisten TMN-Neuronen sind die GABA_A-Rezeptoren zusammengesetzt aus $\alpha 2$ -, βx -, $\gamma 2$ - bzw. αx -, βx -, $\gamma 1$ -UE (Sergeeva *et al.*, 2002; Sergeeva *et al.*, 2010; Yanovsky *et al.*, 2012).

Bezüglich der Stöchiometrie kommen sowohl Rezeptoren mit zwei als auch mit einer Sorte der α -, β - oder γ -UE vor, was großen Einfluss auf die pharmakologischen Unterschiede zwischen diesen Rezeptortypen zu haben scheint (Sergeeva *et al.*, 2002; Olsen & Sieghart, 2009).

Auch Wisden *et al.* (1992) postulierten das Vorkommen der $\gamma 2$ - und der $\gamma 1$ -UE im Hypothalamus.

Elektrophysiologische Experimente sollten die pharmakologische Identifizierung und Charakterisierung der $\gamma 1$ -UE an der BZD-Bindungsstelle in histaminergen Neuronen ermöglichen. Dazu wurden bekannte Therapeutika wie Zolpidem, Midazolam und Flumazenil, sowie die zu experimentellen Zwecken eingesetzte Substanz DMCM, als Modulatoren der GABA_A-Rezeptoren im TMN getestet.

1.8 Multi-Electrode-Arrays

Die elektrophysiologischen Untersuchungen im TMN wurden mit Hilfe des *Multi-Electrode-Array* (MEA) durchgeführt. Diese bereits Anfang der 70er Jahre von Thomas *et al.* (1972) und Gross *et al.* (1977) beschriebene Methode ermöglichte es, die Entwicklung und Funktion neuronaler Netzwerke *in vitro* zu studieren. Da zahlreiche Experimente auf Einzelzellebene mit der Spannungsklemme bereits wegweisende Ergebnisse hinsichtlich der Eigenschaften der $\gamma 1$ -UE lieferten, stellte sich nun die Frage, in wie weit sich diese auch auf Netzwerkebene bestätigen lassen.

Dabei weist das MEA einige Vorteile gegenüber der klassischen Einzelzelleableitung auf: Dazu zählen der Verzicht auf ein invasives Vorgehen, d.h. es muss kein direkter Kontakt zwischen dem Zellinneren bzw. der Zellmembran und einer Messelektrode hergestellt werden. Weiterhin die Möglichkeit, dissoziierte Neurone direkt auf einem MEA-Chip zu kultivieren und damit über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten. Außerdem ist das

1. Einleitung und Grundlagen

Ableiten elektrischer Feldpotentiale mit mehreren Elektroden gleichzeitig und mit guter zeitlicher und räumlicher Auflösung möglich.

Sowohl die ständigen technischen Verbesserungen als auch die leichte Handhabung der MEAs haben diese zu einem attraktiven System gemacht, um die Effekte pharmakologischer Substanzen auf neuronaler Netzwerkebene *in vitro* zu untersuchen.

1.9 si-RNA

Neben elektrophysiologischen Experimenten kamen in dieser Arbeit auch molekularbiologische Methoden zum Einsatz.

Das Prinzip der kleinen interferierenden RNA-Moleküle (*small interfering RNA* (siRNA)) ist ein etabliertes Verfahren, um möglichst spezifisch die Expression bestimmter Gene zu unterdrücken (Dorsett & Tuschl, 2004). Die Vergabe des Nobelpreises für Medizin und Physiologie im Jahr 2006 an die amerikanischen Wissenschaftler Andrew Z. Fire und Craig C. Mello für die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi), hat international die Bedeutung dieser Methode noch hervorgehoben. Breite Anwendung findet sie aber schon seit Ende der 90er Jahre in biochemischen und zunehmend auch in neurowissenschaftlichen Untersuchungen.

Unter RNA-Interferenz versteht man das selektive, gewebespezifische und zeitlich kontrollierte Herunterregulieren (*knock-down*) der Genexpression (Buckingham *et al.*, 2004). Erstmals wurde die RNAi in der Nematode *C. elegans* von Fire *et al.* (1998), beschrieben; mittlerweile ist aber bekannt, dass RNAi auch in Pflanzen, Pilzen und Vertebraten vorkommt.

Das heute experimentell eingesetzte Verfahren nutzt diesen hoch-konservierten endogenen Mechanismus der RNAi, der das Erbgut z.B. vor doppelsträngiger DNA (dsDNA) aus Viren schützen soll (Waterhouse *et al.*, 2001). Gelangt dsDNA ins Cytoplasma, wird diese zunächst von einer RNase-III in zwei doppelsträngige siRNA-Moleküle geschnitten, die jeweils eine Länge von 21-28 Nucleotiden aufweisen. Anschließend wird eine siRNA von einem Multienzymkomplex, dem sog. RNA-induzierten Proteinkomplex (*RNA-induced*

1. Einleitung und Grundlagen

silencing complex (RISC)) inkorporiert und in einem ATP-abhängigen Prozess entwunden. Nach der darauf folgenden Entfernung des Sense-Stranges der siRNA bindet der aktivierte RISC-siRNA-Komplex an die zum Antisense-Strang komplementäre mRNA und baut diese ab. Alternativ kann die RNAi auch durch das direkte Einbringen von siRNA in die Zelle ausgelöst werden (Whitehead *et al.*, 2009), was in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat.

Auch die klinisch-pharmazeutische Forschung hat großes Interesse an den kleinen RNA-Molekülen, da sie vielversprechende Hoffnungsträger für die Entwicklung neuer Medikamente bei einer Reihe von Erkrankungen sind, z.B. bei Morbus Parkinson (Manfredsson *et al.*, 2006), Macula-Degeneration im Alter (Fattal & Bochot, 2006) und Hepatitis B (Chen *et al.*, 2008).

2. Fragestellung und experimentelles Vorgehen

Die UE-Komposition determiniert die vielfältigen Funktionen und pharmakologischen Eigenschaften des GABA_A-Rezeptors. Von den 19 bisher bekannten UE werden 9 im TMN exprimiert. Neben der dominierenden Rolle der γ 2-UE könnte die bisher wenig untersuchte γ 1-UE einen unterschätzten Effekt auf die BZD-Bindungsstelle haben. Von Interesse ist es daher zum einen zu untersuchen, welche funktionelle Bedeutung das Vorhandensein der jeweiligen γ -UE hat und zum anderen, wie die Interaktion mit den exprimierten α -UE die Pharmakologie der BZD im TMN beeinflusst.

Die γ 1-UE könnte von entscheidender klinischer Relevanz sein, da sie nicht nur im Rahmen einer HE im Tiermodell (nicht publiziert, Sergeeva), sondern auch bei Alkoholabusus (Cagetti *et al.*, 2003) eine bis jetzt vernachlässigte Rolle zu spielen scheint. Da die γ 1-UE nur in wenigen Regionen des Gehirns vorkommt, könnte eine pharmakologische Beeinflussung dieser Rezeptoren eine zielgerichtete Therapie an Erkrankungen ermöglichen, die mit deutlichen Veränderungen im GABAergen System einhergehen, wie beispielsweise die HE oder Epilepsien.

Eine notwendige Voraussetzung zur Beantwortung dieser Fragen ist jedoch das Vorhandensein einer Substanz, die in der Lage ist, die γ 1-UE spezifisch zu detektieren und zu modulieren - eine solche ist bis heute leider nicht verfügbar.

Das Hauptziel der experimentellen Arbeit war es, dieses Problem anzugehen und eine gewisse Vorauswahl an Substanzen (DMCM und Zolpidem) hinsichtlich ihrer Selektivität bzgl. der γ 1-UE zu untersuchen. Dabei wurden DMCM und Zolpidem erstmals auf neuronaler Netzwerkebene im TMN getestet, nachdem sie schon in Einzelzellexperimenten die pharmakologische Differenzierung zwischen der ubiquitär exprimierten γ 2-UE und der seltener exprimierten γ 1-UE ermöglicht hatten.

Vor Beginn der elektrophysiologischen Messungen wurde durch Immunhistochemie verifiziert, ob Histamin-Neurone in - aus dem posterioren Hypothalamus neugeborener Mäuse hergestellten Primärkulturen - vorhanden sind.

2. Fragestellung

Weiterhin wurden in der Studie Substanzen gesucht, die in der Lage sind, den erhöhten GABAergen Tonus im Rahmen einer HE zu modulieren.

Um pharmakologisch die γ 1-UE zu identifizieren und deren Eigenschaften weiter aufklären zu können, wurden Mäuse mit einer Punktmutation in der γ 2-UE des GABA_A-Rezeptors verwendet. Die Kurzschreibweise für diese Punktmutation lautet: γ 2F77I, d.h., sie befindet sich an Position 77 der γ 2-UE, wobei die Aminosäure Phenylalanin (F) durch Isoleucin (I) ersetzt ist. Als Folge der genetischen Manipulation stimmen die Aminosäuresequenzen der γ 2-UE und der γ 1-UE an Position 77 überein.

Die Ergebnisse anderer Gruppen, die den Mäusestamm γ 2F77I ebenfalls zu Studien am GABA_A-Rezeptor einsetzten, zeigen erhebliche Veränderungen in der Wirkung der Substanzen DMCM, Zolpidem, Flumazenil und Midazolam im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Punktmutation (Buhr *et al.*, 1997; Buhr & Sigel, 1997; Wingrove *et al.*, 1997; Cope *et al.*, 2004; Ogris *et al.*, 2004; Cope *et al.*, 2005; Leppa *et al.*, 2005; Ramerstorfer *et al.*, 2010).

DMCM führt in Kontrolltieren zu einer negativen Modulation des GABA_A-Rezeptors über die hoch-affine BZD-Bindungsstelle. Es ist aber auch bekannt, dass DMCM einen positiv modulatorischen Effekt am GABA_A-Rezeptor hat, wobei bisher ungeklärt ist, über welche UE dieser Effekt vermittelt wird. Genetisch veränderte Mäuse mit der Mutation γ 2F77I sollen die Eigenschaft der negativen Modulation nicht mehr besitzen und könnten damit der Aufklärung der Frage dienen, über welchen UE der positiv modulatorische Effekt vermittelt wird. Bisher wurde die Loreclezole-Bindungsstelle im Bereich der β 2- β 3 UE für diesen Effekt von DMCM verantwortlich gemacht (Stevenson *et al.*, 1995). Fraglich ist, ob die γ 1-UE eventuell diesen positiv modulatorischen DMCM-Effekt vermitteln könnte.

Die bisherige Vermutung, dass die Loreclezole Bindungsstelle die strukturelle Grundlage für den positiv modulatorischen Effekt von DMCM ist, wird mit Hilfe eines Mäusestammes mit einer Punktmutation in der β 3-UE (β 3N265M) des GABA_A-Rezeptors überprüft. Bekannt ist, dass der Austausch der Aminosäure Asparagin an Stelle 256 der β 3-UE hin zu Methionin den Rezeptor weniger sensitiv gegenüber dem Anästhetikum Etomidat macht (Jurd *et al.*, 2003;

2. Fragestellung

Forman, 2011). Fraglich ist hingegen die DMCM-Wirkung in $\beta 3N265M$ -Mäusen. Wäre dieser positiv modulatorische Effekt wirklich abhängig von der Loreclezole Bindungsstelle, dann sollte dieser in $\beta 3N265$ -Mäusen nicht mehr vorhanden sein.

Die Wirkung von Zolpidem, die normalerweise über die BZD-Bindungsstelle vermittelt wird, ist in $\gamma 2F77I$ Tieren laut vorangegangener Untersuchungen stark abgeschwächt (Buhr *et al.*, 1997; Wingrove *et al.*, 1997; Cope *et al.*, 2004; Ogris *et al.*, 2004; Cope *et al.*, 2005; Ramerstorfer *et al.*, 2010). Auch hier stellt sich die Frage, wie dieser Effekt zu erklären ist und ob dieser evtl. auf die $\gamma 1$ -UE zurückzuführen ist.

Neben den potentiellen $\gamma 1$ -UE spezifischen Modulatoren DMCM und Zolpidem, wurden in dieser Arbeit auch das klassische BZD Midazolam und der klinisch häufig verwendete BZD-Antagonist Flumazenil auf MEAs von Kontrolltieren (Stamm C57BL/6) und *knock-in*-Tieren ($\gamma 2F77I$) appliziert. Vermutlich ist deren Wirkung abhängig von der exprimierten γ -UE und kann daher vielleicht Aufschluss über die funktionelle Bedeutung dieser UE geben.

Am Ende jeder Messreihe erfolgte die Kontrolle der Expression und Funktionsfähigkeit der $GABA_A$ -Rezeptoren in allen Kulturen mit Hilfe der Substanz Gabazin, einem $GABA_A$ -Rezeptor-Antagonist, dessen Wirkung unabhängig von $\gamma 1/\gamma 2$ -UE bzw. $\beta 2/\beta 3$ -UE sein müsste.

Der gezielte *knock-down* der $\gamma 1$ -UE mit siRNA sollte als Beweis dafür dienen, dass die Effekte von DMCM, Zolpidem, Midazolam und Flumazenil, die in den $\gamma 2F77I$ -Mäusen beobachtet wurden, tatsächlich der $\gamma 1$ -UE zuzuschreiben sind.

Mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen (*quantitative (Real-Time) RT-PCR* und Einzelzell-*RT-PCR*) wurde überprüft, welche γ -UE im TMN grundsätzlich exprimiert werden. Zusätzlich dienten sie dem Nachweis des erfolgreichen siRNA-basierten *knock-downs* der $\gamma 1$ -UE.

3. Material und Methoden

3.1 Organentnahme und Anlage der Zellkulturen

Die Anzahl der verwendeten Mäuse und das Leiden dieser Tiere zu minimieren waren Grundvoraussetzungen für die experimentelle Arbeit. Die Tierversuche wurden alle in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (Aktenzeichen 058/91). Neben Mäusen aus dem Stamm C57BL/6, wurden solche mit einer Punktmutation in der γ 2-UE (γ 2F771) bzw. in der β 3-UE (β 3N265M) des GABA_A-Rezeptors eingesetzt. Details zu den Genotypisierungsprotokollen der γ 2F771-Mäuse finden sich bei (Cope *et al.*, 2004) und der β 3N265M-Mäuse bei (Jurd *et al.*, 2003).

Neugeborene männliche Mäuse aus der Tierversuchsanstalt Düsseldorf wurden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe mit einer Überdosis Isofluran betäubt und danach dekapitiert (Sergeeva, 058/91). Die Gehirne wurden anschließend rasch von mir entnommen und in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Magnesium- und Calciumchlorid) gelegt. Unter binokularer mikroskopischer Kontrolle wurde zunächst das Cerebellum mit einem Schnitt vom Großhirn abgetrennt und anschließend mit einem zweiten Schnitt der posteriore Hypothalamus, der um den gut sichtbaren dritten Ventrikel lokalisiert ist, vom restlichen Gehirngewebe entfernt. Die TMN-Region wurde heraus präpariert, von den Meningen befreit und in eine Petrischale mit PBS gelegt. Dann wurde die PBS-Lösung wieder abpipettiert und das Gewebe mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Nach Zugabe von 1ml Trypsin/EDTA wurden die Gewebefragmente in ein Eppendorf-*tube*, das 1ml fasst, überführt und 5 min in den Heizblock (HLC HTM130) bei 37°C und leichter Schüttelbewegung gestellt, um den Gewebeverband zu lösen. Anschließend wurde der Trypsinüberstand mit einer Pipette abgenommen und mit 1ml PBS gewaschen, was die Trypsin-Reaktion stoppte. Auch das PBS wurde wieder vorsichtig entzogen und durch 1 ml mv10-Medium ersetzt. Nach diesem Waschschrift mit mv10-Medium wurden erneut 500 μ l mv10-Medium zu den Zellen gegeben und die Zellen trituiert, um sie zu vereinzeln. Während einer 3-minütigen Wartezeit sedimentierten ungelöste Gewebestandteile auf den Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand mit den gelösten Zellen wurde in ein neues

3. Material und Methoden

Reaktionsgefäß überführt und 8 Minuten bei 1.600 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5417R von Eppendorf, Hamburg). Im letzten Schritt wurde der Überstand abgenommen und das Pellet erneut in mv10-Medium trituiert, auf die beschichteten Elektrodenfelder der MEAs mit der Dichte $1-2 \times 10^5/\text{cm}^2$ und einem Volumen von 150 μl ausgesät. Anschließend wurden die MEAs im Brutschrank (Binder, Tuttlingen) bei 37°C, relativer Luftfeuchte von 95 % und 5 % CO_2 inkubiert. Alle Schritte der Zellpräparation erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Nach 24 Stunden im Brutschrank hafteten die Zellen bereits gut auf dem Elektrodenfeld an und erhielten angewärmtes Neurobasalmedium (NBM) mit 10% FBS (*fetal bovine serum*), Glutamin (0,5 mM) und Penicillin/Streptomycin (50U/ml); 1,6ml pro MEA. Das FBS-haltige NBM wurde nach 5 Tagen entzogen und durch NBM ohne FBS-Zusatz ersetzt. Das Medium wurde in i.d.R. nur einmal pro Woche erneuert, da zu häufiger Mediumwechsel den Zellen schadet. Zeigte die Indikatorsubstanz im Medium (Phenolrot) einen Farbumschlag von kirschrot nach gelb/orange, was auf einen erniedrigten pH-Wert hindeutet, erhielten die Kulturen frisches Medium, auch wenn der vorherige Mediumwechsel weniger als eine Woche zurück lag.

3.2 Charakterisierung der Neurone mittels Immunhistochemie

Bevor die elektrophysiologischen Messungen durchgeführt wurden, überprüften wir, ob histaminerge Neurone in den Kulturen vorhanden sind. Neun bis vierzehn Tage nach der Kultivierung (9-14 div) fixierten wir die auf Deckgläschen wachsenden Gewebe in 4% EDAC (1-Ethyl-3-(3Dimethylamino-Propyl)-Carbodiimid) und färbten diese mit den Primärantikörpern chicken-anti-MAP-2-Antikörper (Verdünnung 1:500 in PBS) und rabbit-anti-Histamin-Antikörper (Verdünnung 1:1000 in PBS) über Nacht. Am zweiten Tag wurden die Präparate dreimal in PBS-T gewaschen und für 90 Minuten mit sekundären Antikörpern, donkey-anti-rabbit Cy 3 (Verdünnung 1:250 in PBS) und donkey-anti-chicken-Antikörper AF488 (Verdünnung 1:500), inkubiert. Danach wurden diese dreimal in PBS gewaschen und mit Aqua Poly Mount für eine längere Haltbarkeit und die anschließende mikroskopische Auswertung behandelt. Nach

3. Material und Methoden

dem Ableiten wurden die MEAs zweimal mit dem gleichen Protokoll gefärbt. Allerdings werden die Messelektroden nach der Fixierung mit Paraformaldehyd laut MEA-Hersteller (Multi Channel Systems, Reutlingen) unbrauchbar.

Als Negativkontrolle dienten Färbungen mit Sekundär-, aber ohne Primärantikörper. In keiner der Negativkontrollen waren Neuron-ähnliche Strukturen zu sehen.

Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 Plus, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) oder einem Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510, META, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) analysiert.

Extrazelluläre Potentiale kultivierter TMN-Neurone wurden mit Hilfe von *Multi-Electrode-Arrays* abgeleitet. Es handelt sich dabei um Kulturkammern, in deren Boden als Mikrochip 60 Elektroden integriert sind, die wahlweise für Ableitungen oder Stimulationen genutzt werden können.

3.3 Multi-Electrode-Array

3.3.1 Vorbereitung der MEAs

Vor dem Anlegen einer neuen Zellkultur wurden die MEAs 24 Stunden in dreiprozentiger BM-Lösung gereinigt, damit sich verbliebene Zellreste der vorangegangenen Zell-Kultivierung ablösen. Nach dem Abspülen der BM-Lösung mit destilliertem Wasser wurden die MEAs bei 134°C für 3 Minuten autoklaviert (Autoklav von Systec, Wetztenberg).

Als nächster Schritt erfolgte die Beschichtung der MEAs mit Polyethylenimin (PEI). PEI ist wichtig für das schnelle und dauerhafte Anwachsen der Zellen. Auf den Boden jeder Zellkulturkammer wurde 1 ml PEI (1 mg/ml) pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur auf den MEAs belassen. Am nächsten Tag wurde das überschüssige PEI mit einer Pipette abgenommen und die MEAs dreimal mit jeweils 1 ml destillierten Wasser gewaschen, unter sterilen Bedingungen getrocknet und bis zur Verwendung gelagert.

3.3.2 MEAs und apparative Messvorrichtung

Die eingesetzten MEAs (**Abb. 4**) von Multi Channel Systems, Reutlingen, besitzen 60 Titan/Titannitrid-Elektroden, die in einem quadratischen Feld im Muster 8x8 angeordnet sind, wobei die Eckpositionen elektrodenfrei sind. Der Durchmesser einer Elektrode, die mit Siliciumnitrid isoliert ist, beträgt 30 μm und der Interelektrodenabstand 200 μm .

Die besondere Anordnung des Titannitrids der Einzelelektrode in Form von vielen winzigen Säulen führt zu einer enormen Oberflächenvergrößerung und damit zu einer starken Impedanzverringerung. Die Folgen sind eine gute Auflösung und eine niedrige Rauschamplitude.

Leiterbahnen übertragen das Signal von den Elektroden auf das äußere Ladungsfeld, welches wiederum an ein zweiteiliges Verstärkersystem gekoppelt ist. Über ein Kabel sind die Verstärker mit einer Messkarte (MC-Card, Multi Channel Systems, Reutlingen) verbunden, die an einen PC angeschlossen ist. Die MC-Card kann das Signal von 60 Elektroden simultan bei 25 kHz abtasten und in digitale Datenströme wandeln. Die Visualisierung und Speicherung der Rohdaten erfolgte mit der Software MCRack (Multi Channel Systems, Reutlingen).

Eine regulierte Heizplatte (TC01, Multi Channel Systems, Reutlingen), die in dem Verstärkersystem integriert ist, sorgte für stabile Temperaturverhältnisse während einer Messreihe. Die eingestellte Temperatur betrug konstant 37°C. Die Elektroden sind entsprechend ihrer Lage in der Matrix von 1 bis 60 durchgehend nummeriert und jeweils einem eigenen Kanal zugeordnet. Um das Elektrodenfeld ist ein Glasring von 12 mm Höhe befestigt, der als Reservoir für das Medium oder die Lösung mit der Testsubstanz genutzt werden kann. Das Verstärkersystem mit dem eingespannten MEA wurde auf einem Mikroskop (Labovert FS, Leitz, Wetzlar) gelagert um die Zellen auch optisch zu Beginn jeder Messung hinsichtlich ihrer Morphologie und der Anheftung am Boden der Zellkulturkammer kontrollieren zu können (Hoinkes, 2005; Fleischer, 2006).

3. Material und Methoden

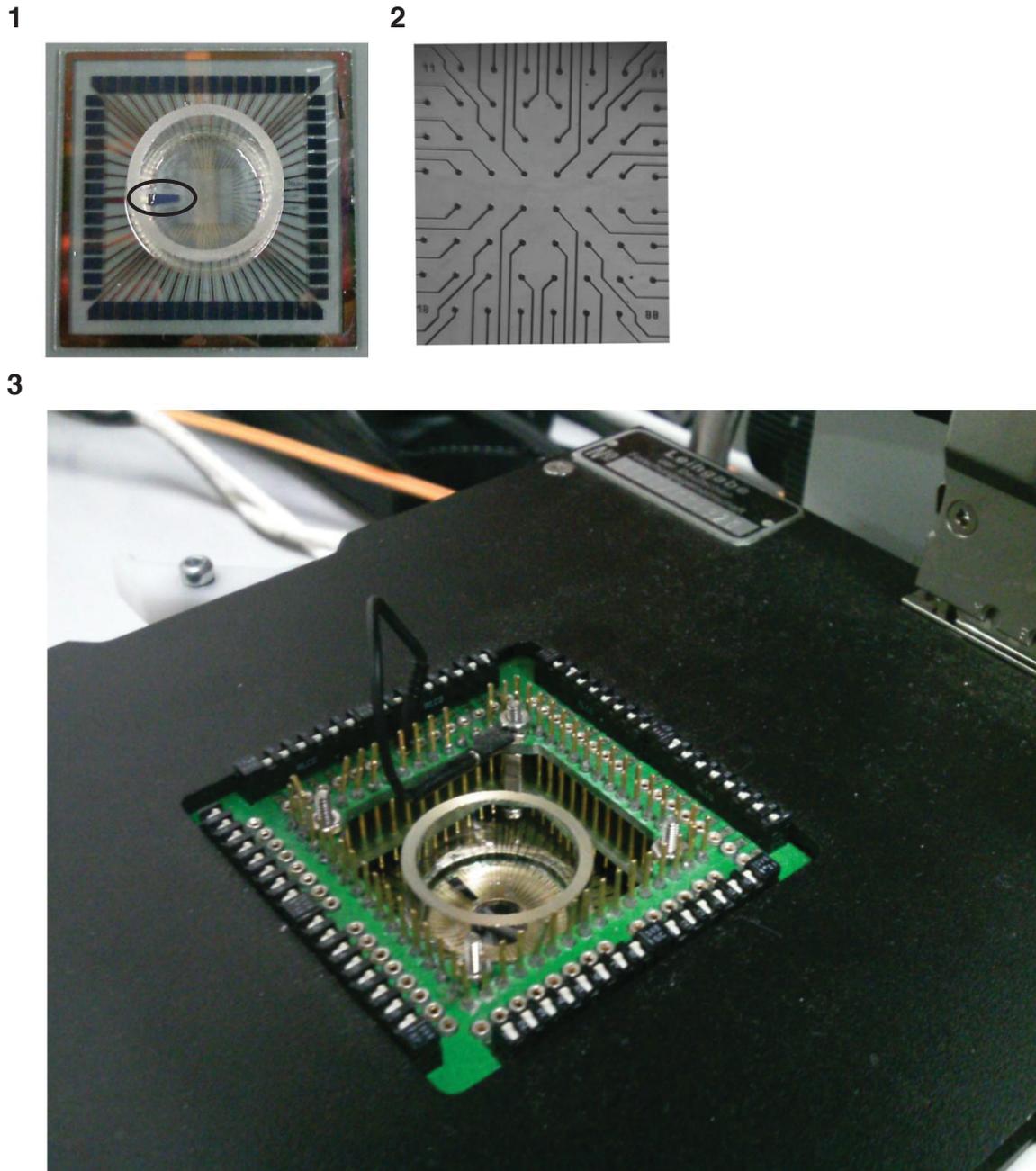


Abb. 4: Multi-Electrode-Array (MEA)

- 1: Abgebildet ist ein MEA-Chip, auf dessen Boden sich das Elektrodenfeld mit 60 Titan/Titannitrid-Elektroden befindet, die über dünne Leiter mit dem Verstärkersystem verbunden sind. Die schwarze Ellipse markiert die Null- bzw. Erdelektrode. Über dem Elektrodenfeld ist ein Glasring befestigt, der als Reservoir für das Kulturmedium bzw. die Messlösung dient.
- 2: Zu sehen ist das vergrößerte Elektrodenfeld, das im Boden des MEA-Chip eingelassen ist. Die 60 Elektroden sind in einem Gitter mit dem Muster 8x8 angeordnet, wobei sich in den vier Ecken keine Elektroden befinden.
- 3: Das Verstärkersystem mit dem eingebauten MEA-Chip.

3.2.3 Datenanalyse

Die Datenakquisition erfolgte offline mit dem Programm SpAnNer (Result, Medizinische Analyseverfahren, Tönisvorst). Das extrazelluläre Korrelat eines Aktionspotentials wurde hierbei als *Spike* bezeichnet. Folgten mehr als drei *Spikes* in zeitlich engem Abstand direkt aufeinander, handelte es sich um einen sog. *Burst*.

Für jeden einzelnen Kanal gab es zu Beginn einer Messung eine zehnprozentige „Lernphase“, in der die Schwelle für die Spikedetektion festgelegt wurde. Der Schwellenwert wurde aus der achtfachen Standardabweichung der mittleren Rauschamplitude in dieser „Lernphase“ berechnet. Eine absolute Refraktärzeit von 4 ms und eine maximale Spikebreite von 2 ms waren Bestandteile des Algorithmus zur Spikedetektion.

Folgende Parameter wurden in den Experimenten zur Datenanalyse herangezogen: Die Anzahl der gemessenen Spikes pro Minute, abgekürzt Spikes/min, und die Anzahl der gemessenen Bursts pro Minute, abgekürzt Bursts/min. Dabei wurden die ermittelten Spike- und Burstraten als Mittelwert über alle Elektroden hinweg angegeben. Als Maß für die Koinzidenz der Feuerraten zweier Elektroden galt der Parameter Cohen's Kappa, der Werte zwischen -1 und 1 annehmen kann. Je größer die Koinzidenz, desto näher liegt der Wert an der oberen Grenze 1. Negative Werte deuten hingegen auf eine noch geringere als die zufällige Koinzidenz hin, die dem Wert 0 entspräche. Ein über alle Elektrodenpaare gemittelter Wert Kappa gibt die Gesamtkoinzidenz innerhalb des Netzwerkes während einer Messung an (Fleischer, 2006).

3.2.4 Messprotokoll

Vor jeder Messung wurde die Grundaktivität der MEAs überprüft. Dazu wurden sie in die dafür vorgesehene Apparatur eingespannt und die spontane Feuerrate der Zellen unter NBM kontrolliert. In die Versuchsreihen wurden nur solche MEAs einbezogen, die auf mindestens 10 Kanälen stabile Aktivität zeigten (mindestens 700 Spikes/min) und die zwischen 6 und 12 Tage *in vitro* (abgekürzt mit *div = days in vitro*) alt waren.

3. Material und Methoden

Zu Beginn einer Messreihe wurde das Kulturmedium mit einer Pipette abgenommen und während der Messung in einem sterilen Eppendorf-Gefäß im Inkubator bei 37°C aufbewahrt. Die Zellen erhielten stattdessen 1 ml auf 37°C angewärmte Standardbadlösung (magnesiumfreie HEPES-gepufferte Ringerlösung, abgekürzt HBS: „Hepes-based solution“). Die Bestandteile sind im Einzelnen: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 3,75 mM KCl und 2 mM CaCl₂. Nach einer Gewöhnungsphase an das neue Medium von 900 s startete die Versuchsreihe mit einer zweimal 120 s dauernden Messung, bei der nur die Ruhe- bzw. Grundaktivität in HBS aufgezeichnet wurde. Danach wurde die reine Standardbadlösung durch das Medium mit Testsubstanz, ebenfalls 1 ml, ersetzt. Auf die Messung einer Testsubstanz, die üblicherweise 120 s dauerte, erfolgten zwei Waschschriffe mit Standardbadlösung. Nach der Messung der letzten Substanz erhielten die Zellen wieder ihr ursprüngliches Kulturmedium (NBM) (**Abb. 5**).

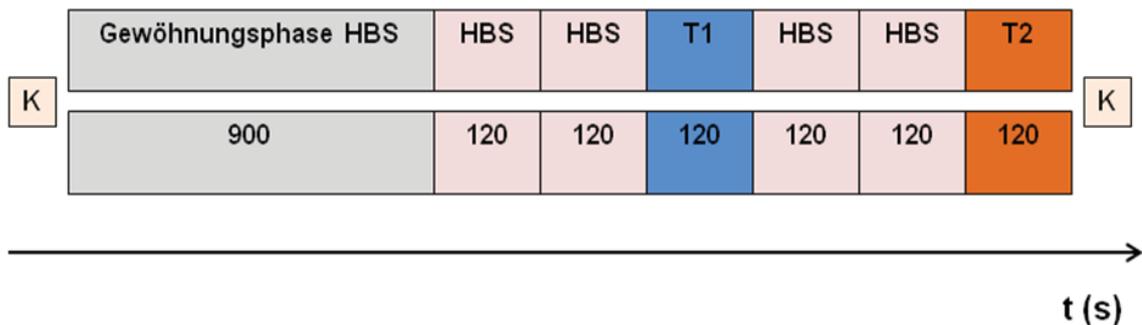


Abb. 5: Versuchsprotokoll einer MEA-Messung

Abkürzungen: MEA: Multi-Electrode-Array K: Kulturmedium; HBS: Standardbadlösung; T1: Messung der Aktivität unter Testsubstanz 1; T2: Messung der Aktivität unter Testsubstanz 2; t(s): Zeit in Sekunden

Vor Beginn der MEA-Messung wurde das Kulturmedium durch die Standardbadlösung ersetzt. Nach einer Gewöhnungsphase von 900 s in Standardbadlösung wurden zwei Kontrollmessungen, ebenfalls in Standardbadlösung, von jeweils 120 s Dauer durchgeführt und die Ruheaktivität der Kultur aufgezeichnet. Anschließend wurde die Standardbadlösung durch die Testsubstanz 1 ersetzt und die 120 s lange Messung nach einer kurzen Pause von 30 s gestartet (T1). Nach Austausch des Mediums und Zugabe der Standardbadlösung erfolgten erneut zwei Messungen der Ruheaktivität. Anschließend wurde die Standardbadlösung abpipettiert, Testsubstanz 2 zur Kultur gegeben und nach 30 s Gewöhnungsphase eine erneute Messung begonnen (T2). Nach Beendigung der Messung erhielten die Zellen wieder das angewärmte Kulturmedium (K).

3. Material und Methoden

Da DMCM eine sehr lipophile, schlecht auszuwaschende Substanz ist, wurde diese entweder als vorletzte auf die Kulturen appliziert oder die Kulturen mehrere Minuten in Standardbadlösung gemessen bis die Ausgangsaktivität wieder erreicht wurde.

Alle Lösungen mit den entsprechenden Testsubstanzen wurden 10 min vor Versuchsbeginn frisch in Standardbadlösung angesetzt und im Inkubator bei 37°C angewärmt.

3.4 siRNA

Der gezielte *knock-down* der γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors erfolgte mit Hilfe von siRNAs. In die Versuchsreihe wurden nur Kulturen einbezogen, die vorab nach dem oben beschriebenen Protokoll gemessen wurden und eine verlässliche Ruheaktivität auf mindestens 10 Kanälen zeigten.

Vor der siRNA-Applikation mussten die Zellen zunächst einen Tag in einem speziellen Transfektionsmedium (Accell-Medium) inkubiert werden. Erst dieses Transfektionsmedium gewährleistet, dass die Permeabilität der Zellmembran für größere, geladene Moleküle erhöht wird und somit die siRNAs überhaupt ins Zytoplasma gelangen. Dazu wurde das ursprüngliche Kulturmedium (NBM) unter sterilen Bedingungen mit einer Pipette entzogen und durch 1 ml Accell-Medium (Thermo Scientific) ersetzt.

Anschließend wurden die Kulturen im Brutschrank bei 37°C, relativer Luftfeuchte von 95 %, aber erhöhtem CO₂ (10 %) inkubiert. Die Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 10 % verhinderte eine zu schnelle und für die Zellen schädliche Alkalisierung des Transfektionsmediums.

Nach 24 h wurden die Kulturen gemäß dem Standardprotokoll abgeleitet, um zu überprüfen, ob der alleinige Mediumwechsel die Netzwerkaktivität beeinflusst. Daraufhin wurde das Accell-Medium mit 4 siRNAs (100µM, Accell SMART pool, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) versetzt, die gegen folgende 4 Zielsequenzen der γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors in der Hausmaus (*Mus musculus*) gerichtet sind (NM_010252.4): GUCUUAUGUUUGAAGUACA;

3. Material und Methoden

CCAAUAUAAUCAGUUGUAU;
UUAGGGAGUUUAGAGGUUU.

GUAGGAUUUAUGAGGUUAUA;

Wie vom Hersteller angegeben, ist die maximale Wirkung der siRNA nach einer Inkubationszeit von mindestens 48 h zu erwarten, d.h., die Expression des γ 1-UE sollte zu diesem Zeitpunkt auf ein Minimum reduziert sein. Aus diesem Grund wurden die Kulturen ab dem zweiten Tag nach der Transfektion erneut mit dem gleichen, bereits beschriebenen Protokoll gemessen. Die Ergebnisse wurden dann mit denen der beiden vorherigen Messungen in (1.) Accell-Medium ohne siRNAs und in (2.) NBM verglichen. Das Ausmaß des *knock-downs* wurde mit Hilfe der quantitativen Echtzeit (Real-time) Reverse-Transkription gefolgt von der Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) bestimmt.

3.5. Quantitative (Real-Time) RT-PCR

3.5.1 Prinzip der qRT-PCR

Für die semiquantitative Analyse der Expression der γ 1- bzw. γ 2-UE des GABA_A-Rezeptors im TMN wurde die etablierte *quantitative RT-PCR* (qRT-PCR) verwendet. Diese Methode ermöglicht die gezielte Quantifizierung von mRNA in Echtzeit, d.h. zu jedem Zeitpunkt des Versuchs kann die Entwicklung in den PCR-*tubes* beobachtet werden. Das Prinzip der Amplifizierung bestimmter Gensequenzen mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen entspricht dem der konventionellen PCR.

Die Quantifizierung des entstehenden PCR-Produkts erfolgt mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes, der an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet und von einer CCD-Kamera im *Thermocycler* (PE Biosystems GeneAmp 5700) detektiert wird. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional zur Anzahl der DNA-Kopien. Der hier verwendete grün fluoreszierende Farbstoff *SYBR® Green* markiert sequenzunabhängig dsDNA (Wang *et al.*, 2006) und zeichnet sich durch eine geringe Hintergrundfluoreszenz in Abwesenheit von dsDNA aus (Biosystems, 1998).

3. Material und Methoden

Die quantitative RT-PCR kann in drei Phasen unterteilt werden: 1. Zu Beginn einer PCR ist die emittierte Fluoreszenz des zu amplifizierenden Abschnitts geringer als das Hintergrundrauschen. 2. Nach weiteren PCR-Zyklen wird ein Schwellenwert überschritten, an dem die Fluoreszenz durch das Amplikon das Hintergrundrauschen übertrifft und nachfolgend für einige Zyklen exponentiell ansteigt. 3. Nach diesem exponentiellen Verlauf wird eine Plateauphase mit maximalem Fluoreszenzsignal erreicht. Eine weitere Amplifizierung wird auf Grund der Akkumulation von Endprodukten, der Abnahme von Substrat und der Zunahme unspezifischer Produkte (Primerartefakte) verhindert (Wang *et al.*, 2006; Mülhardt, 2009)

3.5.2 Versuchsprotokoll

Zunächst wurde die gesamte zelluläre mRNA von WT- und KI (γ 2F77I)-Kulturen aus dem TMN mit Hilfe des „*QuickPrep Micro mRNA Purification Kit*“ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) nach dem entsprechend vorgeschriebenen Protokoll isoliert. Zur Durchführung der reversen Transkription wurden 8 μ l der eluierten mRNA mit 7 μ l des Reagenz gemischt, das zuvor in Übereinstimmung mit dem Protokoll des „*first-strand- cDNA synthesis kit*“ hergestellt wurde (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Nach einer zweistündigen Inkubationsdauer im Heizblock bei 37°C wurde die reverse Transkription durch Abkühlen des Reagenz auf -20°C gestoppt. Eine Bestimmung der mRNA Menge in den einzelnen Reaktionsansätzen erfolgte nicht.

Die PCR wurde in einem „*PE Biosystems GeneAmp 5700*“ Sequenz-Detektion-System durchgeführt unter Verwendung des „*SYBR green Master-Mix Kit*“. Jedes Reagenz für die PCR beinhaltete: 2,5 μ l 10x SYBR® Green Puffer, 200 nM dATP, dGTP und dCTP und 400 nM dUTP, 2mM MgCl₂, 0,25 Einheiten Uracil-N-Glykosylase, 0,625 Einheiten Amplitaq Gold DNA-Polymerase, 10 pM Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 5 μ l der 1:4 verdünnten cDNA und nukleasefreies Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 25 μ l. Die verwendeten Primer sind in **Tabelle 1** aufgelistet.

3. Material und Methoden

$\gamma 2$ up	5'-TAT GT(GAT) AAC AGC ATT GG(TA) CC(TA) GT-3'
$\gamma 2$ lo	5'-ATT CCA AAT TCT CAG CAT-3'
$\gamma 1$ up	5'-TAT GT(GAT) AAC AGC ATT GG(TA) CC(TA) GT-3'
$\gamma 1$ lo	5'-ATC GAA GAG TAT AGA GAA CCC TTC C-3'
β actin up	5'- CGT GAA AAG ATG ACC CAG ATC ATG TT-3'
β actin lo	5' GCT CAT TGC CGA TAG TGA TGA CCT G-3'

Tabelle 1: Eingesetzte Primerpaare

Der Reaktionsansatz wurde in durchsichtige *Micro-Amp optical caps* (Biorad, München) pipettiert und 2 min bei 50°C inkubiert. Während dieses initialen Schrittes wird das Enzym *AmpErase®Uracil-N-Glykosylase* (UNG) aktiviert. Dieses hydrolysiert spezifisch die Uracil-Desoxyribose-Bindung an dU-enhaltender DNA und verhindert damit eine Kontamination durch Reste vorheriger PCR-Reaktionen (Biosystems, 1998). RNA oder dT-DNA wird hingegen nicht durch UNG manipuliert (Longo *et al.*, 1990).

Der sich anschließende „*hot start*“ für 10 min bei 95°C inaktiviert die UNG und aktiviert gleichzeitig die *AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase*. Die hohe Temperatur zu Beginn gewährleistet, dass die DNA vollständig denaturiert vorliegt (Biosystems, 1998). Danach folgten 40 Zyklen à je 15 s bei 95°C und ein kombinierter *annealing*- und Elongationsschritt für 1 min bei 60°C.

Nach dem letzten Zyklus wurde der Reaktionsansatz durch Erhöhung der Temperatur um 0,03°C pro Sekunde von 60°C auf 95°C hitzedenaturiert und eine sogenannte Schmelzkurve (PE Biosystems 5700 Software) der amplifizierten Produkte erstellt. Abhängig von der Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden hat jedes PCR-Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur. Je höher die Temperatur im *Thermocycler* ist, desto mehr dsDNA-Moleküle werden getrennt und zerfallen wieder in ihre Einzelstränge. Da der Farbstoff *SYBR® Green* aber ausschließlich mit dsDNA interkaliert, nimmt das detektierte Fluoreszenzsignal

3. Material und Methoden

mit steigender Temperatur ab. Typischerweise erreicht die Fluoreszenz aller PCR-Produkte am Ende des PCR-Laufes eine Plateauphase und damit ein konstant hohes Niveau, sodass die Fluoreszenz bei Temperaturerhöhung zunächst nur langsam abnimmt. Ab einer gewissen Temperatur, der Schmelztemperatur des Amplikons, sinkt die emittierte Fluoreszenz schnell und deutlich ab, sodass nur noch das schon zu Beginn des PCR-Laufes vorhandene typische Hintergrundrauschen erkannt wird. Trägt man nun die Änderung der Fluoreszenz als Funktion der Temperatur auf, erhält man die Schmelzkurve der Messung (**Abb. 6**).

Wenn dementsprechend nur ein PCR-Produkt amplifiziert wurde, so sollte auch die Schmelzkurve nur einen *peak*, an der Stelle der zugehörigen charakteristischen Schmelztemperatur des Amplikons, anzeigen. Somit kann mit Hilfe der Schmelzkurve überprüft werden, ob die PCR spezifisch nur das gewünschte cDNA-Fragment amplifizierte oder ob etwaige Kontaminationen des PCR-Ansatzes vorliegen. In den durchgeführten Versuchen zeigte die Schmelzkurve für jedes Amplikon einen einzelnen *peak*.

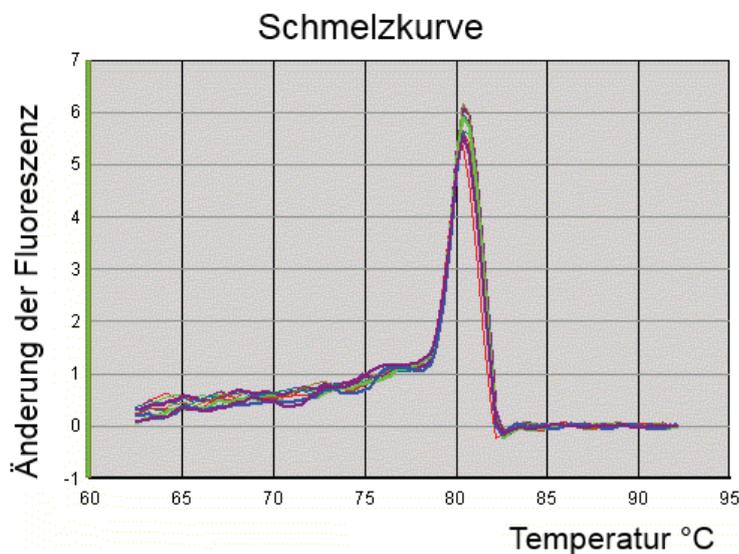


Abb. 6: Beispiel einer Schmelzkurve; Amplifikation der $\gamma 2$ -UE des GABA_A-Rezeptors

Auf der Abszisse ist die Temperatur in Grad Celsius und auf der Ordinate die Änderung der Fluoreszenz pro Zeitintervall aufgetragen. Jede farbige Kurve steht für eine Probe. Alle Proben zeigen nur einen *peak* bei ca. 81°C.

3.4.3 Auswertung

Die Quantifizierung der Expression des jeweiligen Gens kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: die absolute und die relative Quantifizierung. Beiden Methoden gemein ist, dass nur die exponentiellen Phasen des Fluoreszenzanstieges betrachtet werden. Entscheidend ist dafür der sogenannte C_T -Wert (*cycle threshold*), der definiert ist als der PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz durch das Amplikon einen willkürlich gewählten Fluoreszenzschwellenwert schneidet. Als Schwellenwert dient in der Regel der Wert innerhalb des linearen Bereichs der Fluoreszenz, der gerade das Hintergrundrauschen übersteigt. Der C_T -Wert korreliert dabei umgekehrt proportional mit der Ausgangs-Menge des DNA-Fragments (Schmittgen & Livak, 2008).

Mit Hilfe der absoluten Quantifizierung kann die Anzahl der Kopien des Templates zu Beginn der Reaktion bestimmt werden. Dazu wird in einem ersten Schritt eine Kalibrierkurve (Standardkurve) erstellt. Diese wird generiert, indem die C_T -Werte der amplifizierten Produkte gegen den Logarithmus der bekannten Konzentration einer sequentiellen Verdünnungsreihe an Ausgangs-DNA aufgetragen werden. Nach Ermittlung der Geradengleichung kann die gesuchte DNA-Menge durch Einsetzen des ermittelten C_T -Wertes in die Formel berechnet werden.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde nur die Methode der relativen Quantifizierung verwendet. Für die relative Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens mit einem internen Standard, einem „*housekeeping-Gen*“ (HKG) verglichen. HKG sind konservierte Proteine, die in allen kernhaltigen Zellen vorhanden sind, konstitutiv exprimiert werden und wichtig für die Funktion und Struktur der Zelle sind (Thellin *et al.*, 1999). In diesem Fall wurde β -Actin als HKG verwendet und die Ergebnisse der Expression der α - bzw. γ -UE des GABA_A-Rezeptors auf die Expression von β -Actin bezogen bzw. normiert. Auf Grund der Normierung fallen Unterschiede hinsichtlich der Mengen an Ausgangs-cDNA nicht ins Gewicht. Auch in diesem Fall wird eine Standardkurve erstellt, indem die Ausgangs-cDNA-Menge bis zu einer gewissen angegebenen Konzentration verdünnt und der Logarithmus dieser Konzentrationen gegen die gemessenen C_T -Werte aufgetragen wurde (**Abb. 7**).

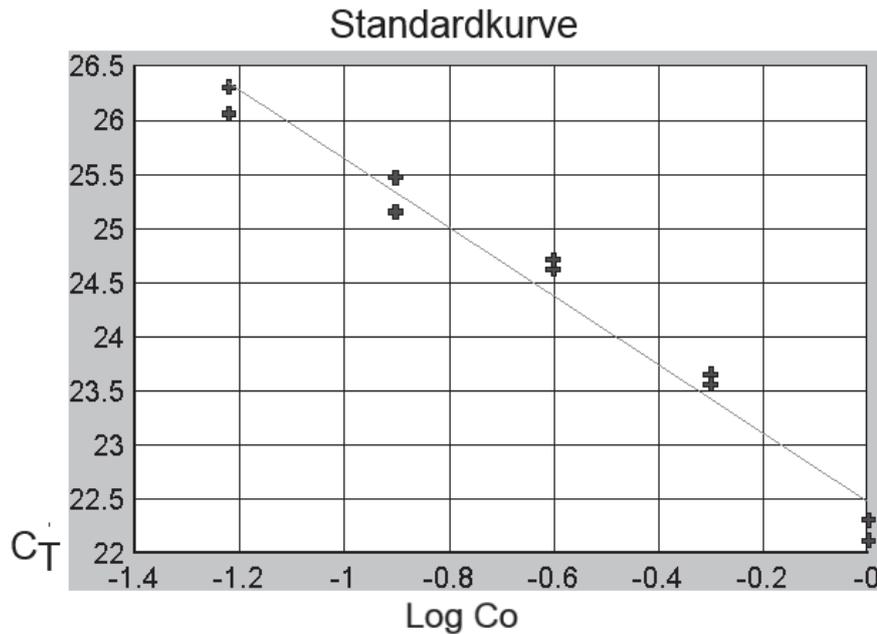


Abb. 7: Standardkurve der $\gamma 1$ -UE des GABA_A-Rezeptors

Auf der Abszisse ist der Logarithmus der Ausgangskonzentration und auf der Ordinate der entsprechende C_T-Wert einer stufenweise verdünnten Probe aufgetragen. Korrelationskoeffizient -0,986, Steigung -3,16, Effizienz 2,07.

Die Standardkurven zeigten einen optimalen Verlauf und einen Korrelationskoeffizienten >0,95. Zur Berechnung der relativen cDNA-Menge diente dabei das mathematische Modell der „komparativen C_T-Methode“, die auch als $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode bezeichnet wird:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = (C_{T\text{-Zielgen}} - C_{T\text{-Refrenzgen}})_{\text{ProbeA}} - (C_{T\text{-Zielgen}} - C_{T\text{-Refrenzgen}})_{\text{ProbeB}}$$

Diese Methode setzt allerdings voraus, dass die Effizienz der Amplifikation sowohl des Zielgens als auch des Referenzgens annähernd gleich ist (Livak & Schmittgen, 2001). Die Effizienz kann mit Hilfe folgender Formel berechnet werden: $E = 10^{(-1/m)}$, wobei m die Steigung der Standardkurve ist (Pfaffl, 2001).

3.6 Einzel-Zell-RT-PCR

Die Einzel-Zell-RT-PCR (*single-cell-RT-PCR*) ermöglicht die Bestimmung und Amplifizierung der Gene einer einzelnen Zelle. Die dafür ausgewählten Zellen wurden zuvor mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Methode von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe elektrophysiologisch gemessen und der Zellinhalt anschließend

3. Material und Methoden

in die Messkapillare gesaugt. In einem nächsten Schritt wurde die mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.

Im Unterschied zur konventionellen PCR werden zwei PCR-Zyklen nacheinander mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt. In einer ersten Runde wurde ein degeneriertes Primerpaar eingesetzt, das spezifisch die Amplifizierung einer bestimmten UE-Familie des GABA_A-Rezeptors ermöglicht. Gefolgt von einer zweiten Runde mit einem anderen Primerpaar, mit dessen Hilfe eine bestimmte UE innerhalb einer UE-Familie spezifisch vervielfältigt werden soll (Sergeeva *et al.*, 2010). Die degenerierten (Dg) Primer für die γ -UE-Familie sind (**Tabelle 2**):

<i>Dg up</i>	5'-TAT GT(GAT) AAC AGC ATT GG(TA) CC(TA) GT-3'
<i>Dg lo1</i>	5'-CAG- GA (AG) TGT TCA TCC AT (AT) GG (AG) AA (AG) T-3'
<i>Dg lo2</i>	5'- CAG GCA TGC GCA TCC AT (AG) GGG AAG T-3'

Tabelle 2: Eingesetzte degenerierte Primer für alle drei γ -UE in der sc-RT-PCR

In der zweiten Amplifizierungsrunde wurden die degenerierten „*Dg up-Primer*“ aus der ersten Runde mit folgenden γ -UE-spezifischen Primern zusammen verwendet (**Tabelle 3**):

<i>Dg up</i>	5'-TAT GT(GAT) AAC AGC ATT GG(TA) CC(TA) GT-3'	
$\gamma1 lo$	5'-ATC GAA GAG TAT AGA GAA CCC TTC C-3'	Produkt: 262 bp
$\gamma2 lo$	5'-ATT CCA AAT TCT CAG CAT-3'	Produkt: 234 bp
$\gamma3 lo$	5'-TAA TGT GTA AAG GAT TTT CCC-3'	Produkt: 258 bp

Tabelle 3: Eingesetzte Primer der zweiten Amplifizierungsrunde der sc-RT-PCR

3. Material und Methoden

Der PCR-Ansatz beinhaltete: cDNA (1 μ l), 10xPCR-Puffer, 10 pM des jeweiligen Vorwärts (*up*) und Rückwärts (*lo*)-Primers, 200 μ M von jeden dNTP, 2,5 Units Taq-Polymerase und nukleasefreies Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 10 μ l. Die Magnesium-Konzentration betrug 2,5 mM. Alle Amplifikationen wurden in einem *Thermocycler* (Mastercycler, Eppendorf) durchgeführt. Das Protokoll sah dabei zwei Amplifikationsrunden nacheinander vor. Jede dieser Runden umfasste 35 Zyklen mit folgendem Ablauf: Denaturierung des Doppelstranges bei 94°C für 48 s („*hot start*“), Anlagerung der Primer bei 50°C für 48 s und Elongation der Primer bei 72°C für 1 min. Als *template* für die zweite Runde diente 1 μ l des Ansatzes des PCR-Produktes der ersten Runde.

Zur Analyse der Ergebnisse wurden die Produkte der zweiten Runde mit Ethidiumbromid oder *Gel Red* (Invitrogen) markiert und mit Hilfe eines 2 %-Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Randomisiert ausgewählte PCR-Produkte wurden zunächst in Wasser aufgereinigt. Vor der eigentlichen Sequenzierung wurde die Menge der cDNA mit einem Nanodrop Gerät gemessen und bis zur Konzentration 10-25 ng pro Mikroliter verdünnt. Die Sequenzierung erfolgt durch das BMFZ DNA-Analyse Labor (bio-medizinisches Forschungszentrum, HHU, Düsseldorf). Die analysierten Sequenzen stimmten mit den bekannten Gensequenzen der Maus überein (GenbankTM-Nummer: γ 1 (AK162884), γ 2 (M86572), γ 3 (NM_008074)).

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten *Student's t*-Test oder dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.8 Erläuterungen zu den Abbildungen

In den Abbildungen im Ergebnisteil wird das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen oberhalb der Balken im Diagramm angegeben (n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$). Sterne innerhalb der Balken zeigen an, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der elektrischen Aktivität vor Zugabe (Grundlinie 100 %) und in Anwesenheit des Modulators besteht (n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$). Die Parameter für die Aktivität bzw. die Feuerrate der Kultur sind Spikes/min und Bursts/min. Die Netzwerksynchronisation zeigt der Parameter Cohen's Kappa an.

Verwendete Abkürzungen in den Abbildungen: WT: Wildtyp-Kulturen; KI: *knock-in*-Kulturen ($\gamma 2F77I$ bzw. $\beta 3N265M$); WT CO: Messung der Wildtyp-Kultur unter Standardbadlösung; WT DMCM: Messung der Wildtyp-Kultur unter DMCM 10 μM ; KI CO: Messung der $\gamma 2F77I$ -*knock-in*-Kultur unter Standardbadlösung; KI DMCM: Messung der $\gamma 2F77I$ -*knock-in*-Kultur unter DMCM 10 μM ; siRNA: *small interfering RNA*= kleine interferierende RNA; KI+siRNA, *knock-in*-Kulturen, die mit $\gamma 1$ siRNA behandelt wurden n: Anzahl der gemessenen Kulturen; WT+KI: *gepoolte* Daten von WT und KI-Messungen; % des Kontrollwertes: Mittelwert der prozentualen Veränderungen der einzelnen Messungen unter der entsprechend verwendeten Substanz bezogen auf die vorherige Messung in HBS; Spikes/min: Anzahl der Spikes in einer Minute; Bursts/min: Anzahl der Bursts in einer Minute; U [μV]; Spannung in Mikrovolt; t(s) Zeit in Sekunden; div x: *days in vitro*, d.h. x. Tag nach Anlage der Zellkultur; NBM: Neurobasalmedium; HBS: Standardbadlösung; Accell: Accell-Medium; b.p.: Basenpaare; M: Marker; pc: Positivkontrolle; nc: Negativkontrolle.

3. Material und Methoden

3.9 Material

3.9.1 Hersteller

Biomed, Oberschleißheim, Deutschland:	3 % BM-Lösung
Biotrend, Köln, Deutschland:	Etomidat, DMCM, Zolpidem
DeltaSelect, München, Deutschland:	Isofluran
Fluka, Buchs, Schweiz:	L-Glutamin
GIBCO invitrogen, Darmstadt, Deutschland:	DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered saline</i>), FBS, Trypsin/EDTA, B27, Pen/Strep 5000, NBM
Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA:	donkey-anti-rabbit-Antikörper Cy3
Life-Technologies, Carlsbad, CA, USA:	AF488-labelled goat-anti-chicken-Antikörper (A-11039)
Millipore, Temecula, CA, USA:	rabbit-anti-Histamin-Antikörper (AB5885), chicken-anti-MAP-2-Antikörper (AB15452)
Merck, Darmstadt, Deutschland:	D+ Glucose Monohydrat
Polysciences, Warrington, Großbritannien:	Aqua Poly Mount
Promega, Mannheim, Deutschland:	nukleasefreies Waaser
Qiagen, Erkrath, Deutschland:	Taq-Polymerase, PCR-Puffer ; Magnesium, dNTPs
Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA:	Insulin bovin, <i>Hepes hemisodium salt</i> , Polyethylenimin, Gabazin (SR95531)

3. Material und Methoden

3.9.2 Kulturmedium: mv10

<i>Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle`s Salzen ohne L-Glutamin</i>
+ 10 % fetal bovine serum (FBS)
+ 0,025 mg/ml Insulin
+ 2 mM L-Glutamin
+ 10 mM HEPES
+ 0,6% D+ Glucose Monohydrat

3.9.3 Nährmedium

Neurobasalmedium
+ B27 Supplement,
+ 0,5 mM L- Glutamin
+ 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin

3.9.4 Standardbadlösung (magnesiumfreie Hapes-Buffered Solution)

150 mM NaCl
10 mM HEPES
3,75 mM KCl
2 mM CaCl ₂
10 mM Glucose

3. Material und Methoden

3.9.5 PCR-Mastermix

2,5 µl 10x SYBR® Green Puffer
200 nM dATP, dGTP und dCTP und 400 nM dUTP
2 mM MgCl ₂
0,25 Einheiten Uracil-N-Glykosylase
0,625 Einheiten AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase
10 pM Vorwärts- und Rückwärts-Primer
5 µl der 1:4 verdünnten cDNA
H ₂ O bis zu einer Gesamtmenge von 25 µl

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Charakterisierung der TMN Neurone

Bevor die elektrophysiologischen und molekularbiologischen Experimente durchgeführt wurden, erfolgte der Nachweis der histaminergen Neurone im TMN mittels Immunhistochemie. Mit Hilfe der eingesetzten Antikörper konnte zum einen überprüft werden, ob Neurone auf den MEAs wachsen (anti-MAP-2-Antikörper) und zum anderen, ob diese auch tatsächlich Histamin-positiv sind (anti-Histamin-Antikörper). Die Untersuchung diente als Beweis dafür, dass die richtige Hirnregion (TMN) für die Anlage der neuronalen Kulturen präpariert wurde (**Abb. 8 und Abb. 9**). In **Abb. 8** ist ein MEA-Chip zu sehen, auf dessen Boden die blau leuchtenden Elektroden (blauer Pfeil) durchscheinen. Darauf sind, neben mehreren grün gefärbten Neuronen (weiße Pfeile), drei rot-fluoreszierende Neurone (markiert mit Sternen) zu erkennen. Histaminerge Neurone repräsentieren in alle gezählten Feldern 6,3% aller Neurone (insgesamt 390 Neurone in 3 Kulturen, div12-20).

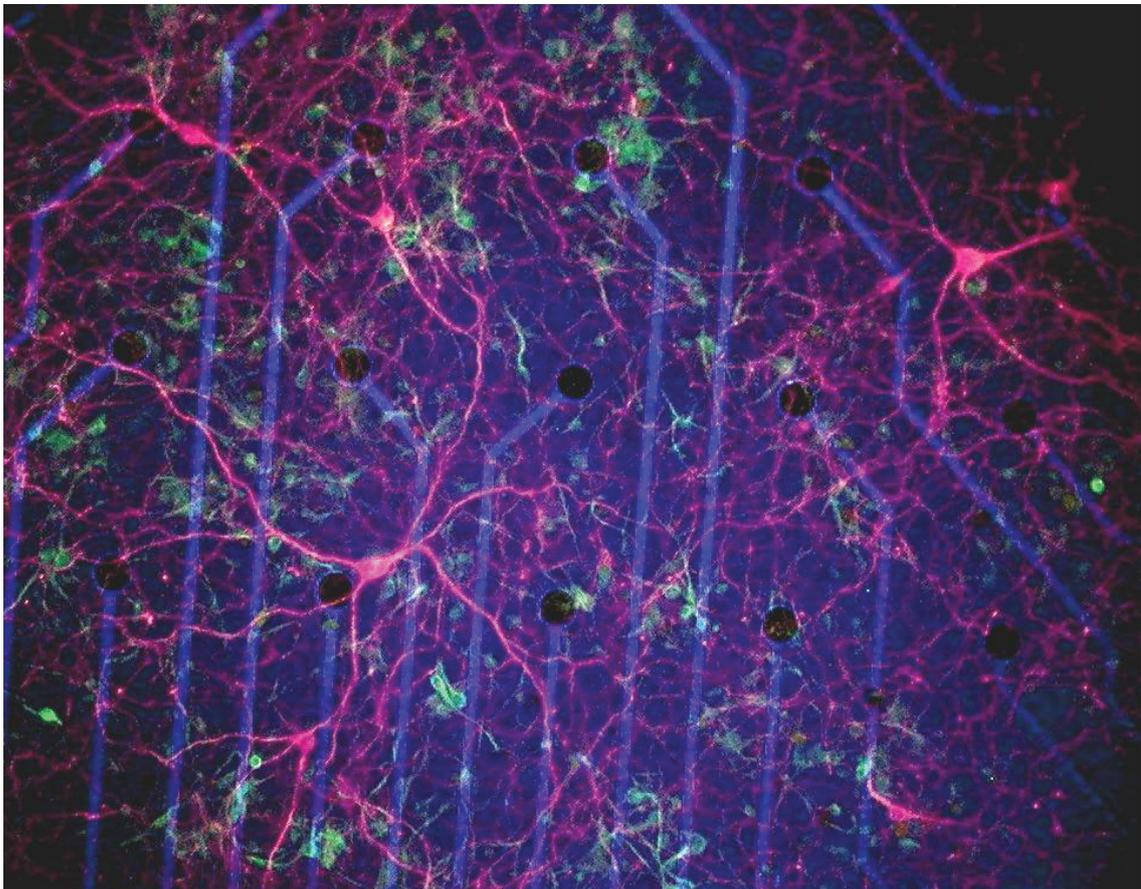


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung eines MEA mit anti-MAP-2-Antikörpern und anti-Histamin-Antikörpern nach Erstellung der TMN-Kultur.

4. Ergebnisse

Auf dem Boden des MEA-Chips sind die blau aufleuchtenden Elektroden sichtbar. Darüber befinden sich die für MAP-2 immunoreaktiven Neurone (MAP2+, grün visualisiert mit AF488-markiertem goat-anti-chicken IgG), sowie acht für Histamin immunreaktive Neurone (MAP2/HA, visualisiert mit rot-fluoreszierendem donkey-anti-rabbit-cy3 IgG).

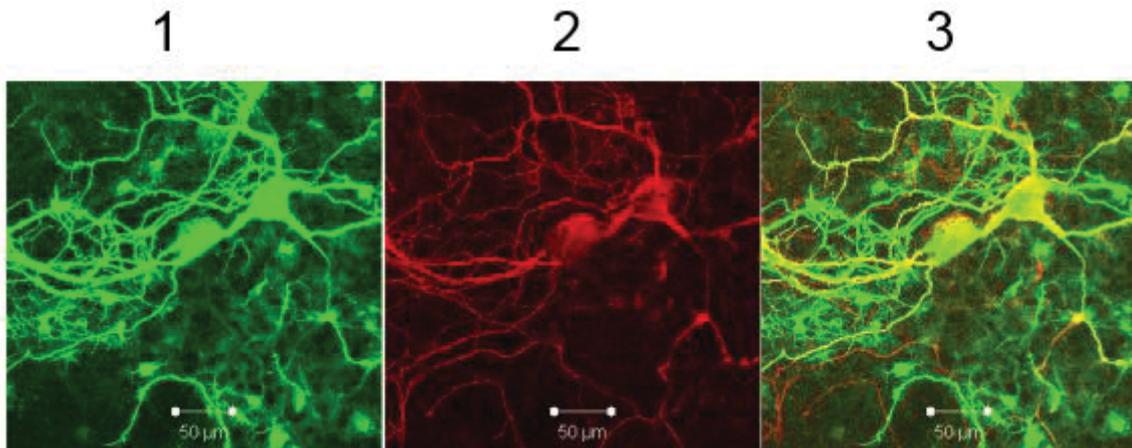


Abb. 9: Aufnahme der TMN-Neurone mit dem konfokalen Mikroskop nach immunhistochemischer Färbung mit anti-MAP-2-Antikörper und anti-Histamin-Antikörper.

- 1: Grüne Fluoreszenz erzeugt durch Argon 2 Laser (Anregungswellenlänge 458-514nm). Emission durch MAP-2-immunopositive Zellen, welche sekundäre AF488-markierte goat-anti-chicken IgG gebunden haben.
- 2: Rote Fluoreszenz erzeugt durch HeNe1 Laser (Anregungswellenlänge 543nm). Emission durch by Histamin-immunopositive Zellen, welche sekundäre cy3-markierte donkey-anti-rabbit Antikörper gebunden haben. Gleiches Feld wie in **Abb. 9, 1**.
- 3: Die Überlappung der Bilder zeigt die Kolokalisation roter und grüner Fluoreszenz (gelbe Farbe). Neben den zwei großen histaminergen Neuronen, die sowohl MAP-2 als auch Histamin-positiv sind, erkennt man zahlreiche, grün angefärbte (anti-MAP-2-Antikörper), kleine Somata von Zellen, die kein Histamin produzieren.

4.2 Identifizierung γ 1-UE exprimierender GABA_A-Rezeptoren

4.2.1 Testung von DMCM

Zur Überprüfung der Hypothese, dass DMCM zur Identifikation γ 1-UE exprimierender GABA_A-Rezeptoren herangezogen werden könnte, wurde die Substanz in der Konzentration 10 μ M sowohl auf Wildtyp-Kulturen (WT, C57/Black6-Mäuse) als auch auf Kulturen von *knock-in*-Mäusen (KI, γ 2F771-Mäuse) appliziert. Die Aktivität und Synchronisation des Netzwerkes wurde mit Hilfe des Multi-Electrode-Array gemessen und zwischen WT- und KI-Kulturen verglichen. Die Mittelwerte der Messungen von 18 WT- und 11 KI-Kulturen unter DMCM 10 μ M sind in **Abb. 10** dargestellt.

4. Ergebnisse

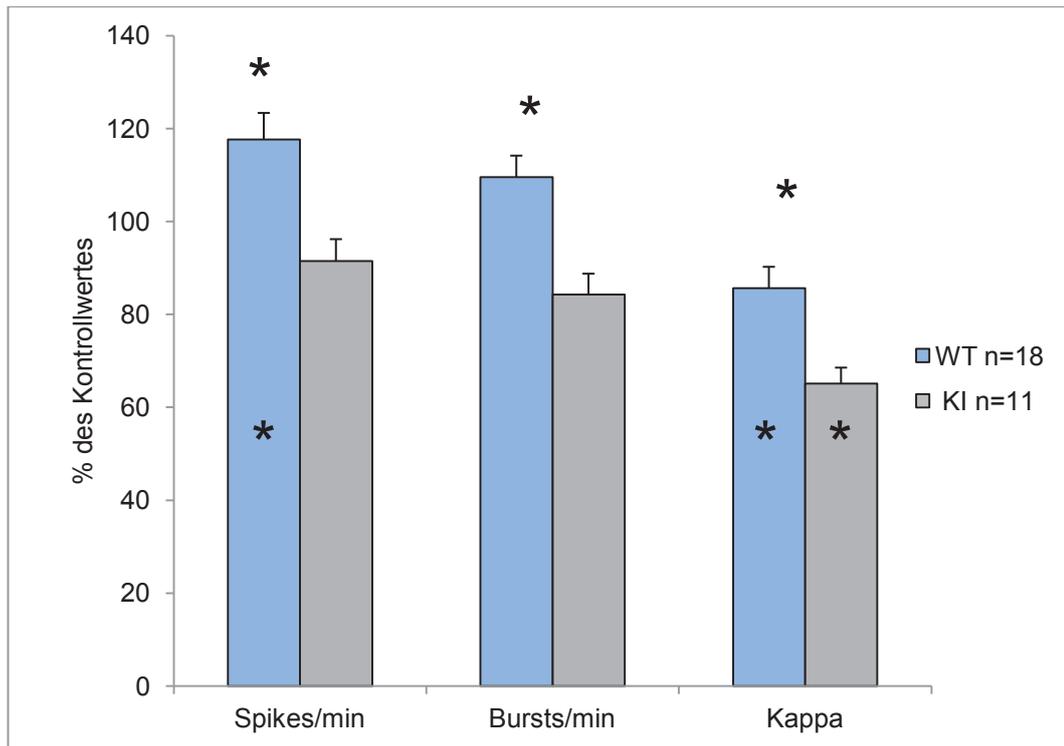


Abb. 10: Geringer Anstieg der Feuerrate in WT-Kulturen. Abnahme der Synchronisation der Netzwerke (Cohen's Kappa) sowohl in WT- als auch in KI-Kulturen unter DMCM 10 μ M.

Die Aktivität des Netzwerkes bzw. die Feuerrate der Neurone steigt unter DMCM 10 μ M im Vergleich zur Messung in Standardbadlösung in den meisten WT-Kulturen an, sinkt hingegen signifikant in den KI-Kulturen. Die Synchronisation des Netzwerkes nimmt sowohl in WT-Kulturen als auch in höherem Ausmaß in KI-Kulturen ab, wobei der Unterschied zwischen den WT- und den KI-Kulturen signifikant ist ($p < 0.05$).

Die Originaldaten einer MEA-Messung einer ausgewählten Kontrollkultur (**Abb. 11**) und einer KI-Kultur (**Abb. 12**) veranschaulichen **Abb. 11 und Abb. 12**. Im Vergleich jeweils die Ableitungen von 2 Kanälen in Standardbadlösung (CO) und während der Messung der Testsubstanz DMCM 10 μ M. Auf der Abszisse ist die Spannung in μ V und auf der Ordinate die Zeit in s aufgetragen. Es sind jeweils die Sekunde 91 bis 103 der Messung dargestellt (**Abb. 11, 1**). Ein Spike steht für ein Aktionspotential, während mehr als drei rasch aufeinander folgende Spikes als Burst bezeichnet werden. Rechts neben der Originalmessung sind

4. Ergebnisse

die Veränderungen der Spikerate der beiden Kanäle zusätzlich als Balkendiagramm dargestellt (**Abb. 11, 2**).

Wenn diese Effekte in den KI-Kulturen tatsächlich der γ 1-UE zuzuschreiben sind und die γ 1-UE in diesen Kulturen wirklich stärker exprimiert ist als in den WT-Kulturen, dann könnte DMCM in der Konzentration 10 μ M zur Erkennung der γ 1-UE in GABA_A-Rezeptoren dienen.

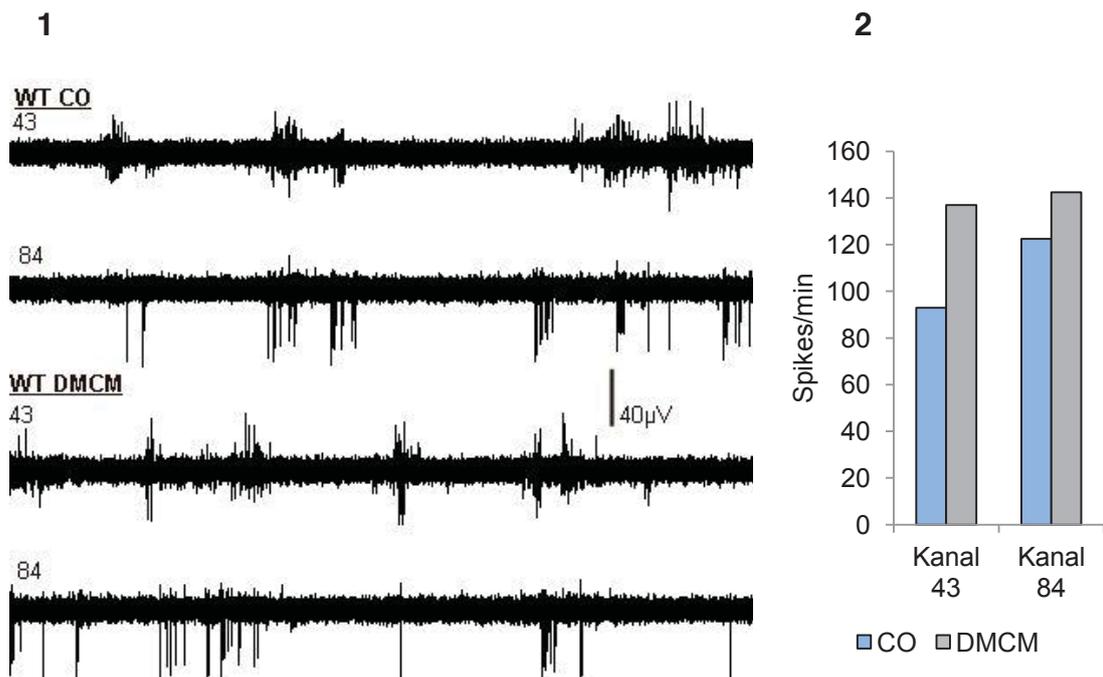


Abb. 11: Zunahme der Feuerrate unter DMCM 10 μ M in einer Originalmessung zweier Kanäle einer WT-Kultur (div 7).

- 1: Dargestellt sind die Ableitungen von Kanal 43 und 84 über eine Zeitspanne von 12 Sekunden. Unter DMCM 10 μ M kommt es zu einem geringen Anstieg der Spike- und der Burstrate.
- 2: Das Balkendiagramm zeigt den Anstieg der Spikerate während der gesamten Messung unter DMCM 10 μ M (DMCM) im Vergleich zur vorherigen Messung unter Standardbadlösung (CO) in Kanal 43 und 84.

4. Ergebnisse

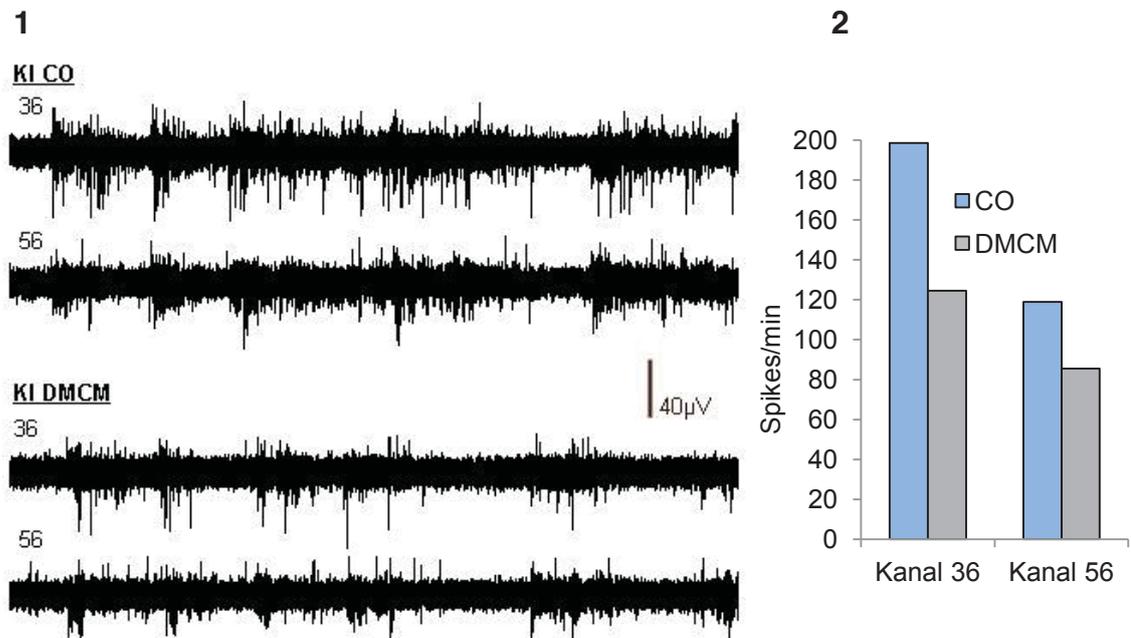


Abb. 12: Abnahme der Feuerrate unter DMCM 10 μM in einer Originalmessung zweier Kanäle einer KI-Kultur (div 9).

- 1: Dargestellt sind die Ableitungen von Kanal 36 und 56 über eine Zeitspanne von 12 Sekunden. Unter DMCM 10 μM kommt es zu einem deutlichen Abfall der Spike- und der Burstrate.
- 2: Das Balkendiagramm zeigt den Abfall der Spikerate während der gesamten Messung unter DMCM 10 μM (DMCM) im Vergleich zur vorherigen Messung unter Standardbadlösung (CO) in Kanal 36 und 56.

Den Unterschied des Parameters Cohen's Kappa zwischen den WT- und den KI-Kulturen verdeutlicht **Abb: 13**. Bereits in den Ausgangsmessungen unter Standardbadlösung ist Cohen's Kappa sowohl in der abgebildeten WT-Kultur als auch in der KI-Kultur etwa gleich niedrig (WT: 0,19 zu KI: 0,18), sinkt dann unter DMCM 10 μM in der KI-Kultur signifikant stärker als in der WT-Kultur. Damit könnte die Änderung von Cohen's Kappa nach DMCM-Gabe in der Konzentration 10 μM die Unterscheidung zwischen WT-Kulturen und KI-Kulturen ermöglichen, wohingegen die Feuerrate (Spikes/min und Bursts/min) als Unterscheidungskriterium nicht ausreichend zuverlässig ist.

4. Ergebnisse

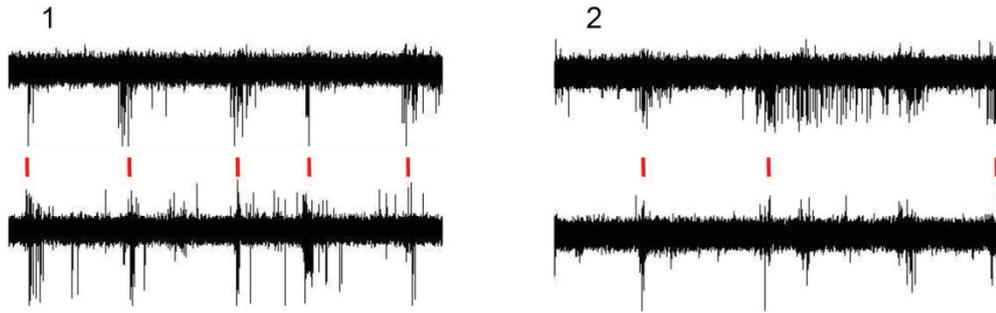


Abb. 13: Cohen's Kappa sinkt nach DMCM 10 μ M in signifikant höherem Ausmaß in einer KI-Kultur (2) im Vergleich zur WT-Kultur (1).

- 1: Ausschnitt aus der identischen WT- Kultur und den gleichen Kanälen wie in **Abb. 9** unter DMCM 10 μ M. Die roten Balken markieren die zeitgleich auftretenden Bursts in den benachbarten Kanälen. Insgesamt feuern die Neurone in dieser WT-Kultur schon weitgehend unabhängig voneinander. Cohen's Kappa sinkt unter DMCM 10 μ M im Vergleich zur vorangegangenen Messung in Standardbadlösung auf 85 %.
- 2: Ausschnitt aus der identischen KI-Kultur und den gleichen Kanälen wie in **Abb: 10** unter DMCM 10 μ M. Die roten Balken markieren die zeitgleich auftretenden Bursts in den benachbarten Kanälen. Cohen's Kappa sinkt unter DMCM 10 μ M im Vergleich zur vorangegangenen Messung in Standardbadlösung auf 50 %. Die Feuerrate ist noch signifikant weniger synchron als in der WT-Kultur.

4.2.2 Testung von Zolpidem

Neben DMCM wurde Zolpidem in der Konzentration 1 μ M hinsichtlich seiner γ 1-UE-Selektivität getestet. Wie in den vorangegangenen MEA-Experimenten waren die Veränderungen der Feuerrate (Spikes/min und Bursts/min) der Neurone und des Parameter Cohen's Kappa zwischen WT-Kulturen und KI-Kulturen von Interesse.

Die Ergebnisse der Zolpidem-Messreihe sind analog zu den Ergebnissen der DMCM-Messungen in **Abb. 14** zusammengefasst.

4. Ergebnisse

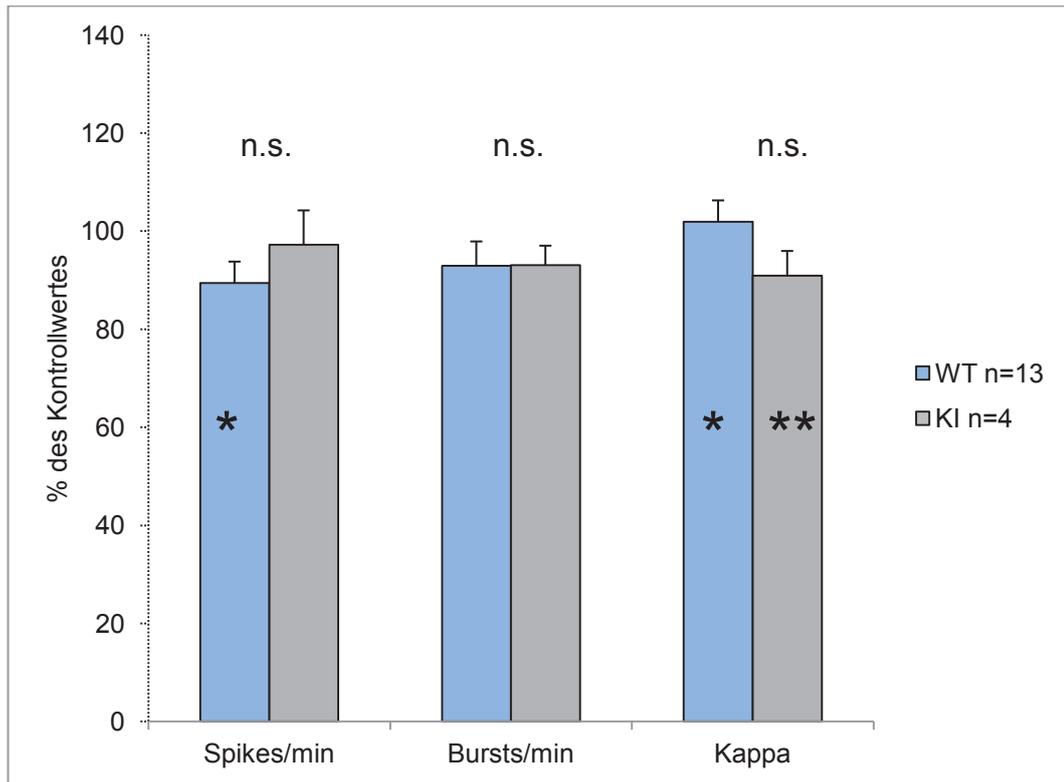


Abb. 14: Abnahme der Feuerrate in WT-Kulturen. Abnahme der Synchronisation der Netzwerke (Cohen's Kappa) in KI-Kulturen unter Zolpidem 1 μ M.

Die Applikation von Zolpidem 1 μ M führt im Vergleich zur vorherigen Messung unter Standardbadlösung in den WT-Kulturen zu einem minimalen Abfall der Spikes und der Bursts in einer Minute, wobei die Aktivität der KI-Kulturen etwa gleich bleibt. Da der Unterschied zwischen WT- und KI-Kulturen hinsichtlich der Feuerrate nur sehr gering ausgeprägt ist, eignet sich dieses Merkmal nicht als sicheres Kriterium zur Identifikation der γ 1-UE der KI-Kulturen.

Erstaunlicherweise ist der Effekt auf die Netzwerksynchronisation nach Zolpidem 1 μ M in den KI-Kulturen sehr ähnlich dem nach DMCM 10 μ M in KI-Kulturen, wenn auch in etwas geringerem Umfang. Die KI-Neurone feuern unabhängiger voneinander als in Standardbadlösung (Cohen's Kappa fällt auf 90 % ab), wohingegen die Netzwerksynchronisation der WT-Kulturen weitgehend unbeeinflusst von der Zolpidem-Lösung bleibt.

4.2.3 Testung von Flumazenil

Da Flumazenil bereits therapeutisch im Rahmen einer HE eingesetzt wird, stellte sich die Frage, ob diese Substanz in besonderem Ausmaß mit der vermuteten γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors interagiert. Aus diesem Grund wurde auch Flumazenil 10 μ M sowohl auf WT-Kulturen als auch auf KI-Kulturen

4. Ergebnisse

appliziert und der gleiche Versuchsaufbau und die gleichen Parameter zur Analyse wie schon zuvor in den Versuchsreihen mit DMCM und Zolpidem verwendet. In den WT-Kulturen führte Flumazenil 10 μM zu einem geringen Anstieg der Feuerrate und zu einem Abfall von Cohen's Kappa. Bemerkenswert ist, dass diese beiden Effekte in den KI-Kulturen nicht mehr vorhanden sind. Damit beeinflusst Flumazenil 10 μM weder die Aktivität noch die Synchronisation der KI-Kulturen. Da die Unterschiede zwischen WT- und KI-Kulturen darüber hinaus hinsichtlich keines Parameters ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreichen, scheidet Flumazenil in der Konzentration 10 μM als spezifischer Modulator der $\gamma 1$ -UE des GABA_A -Rezeptors eher aus. Eine Übersicht über die kumulierten Ergebnisse der Flumazenil-Messungen findet sich in **Abb. 15**.

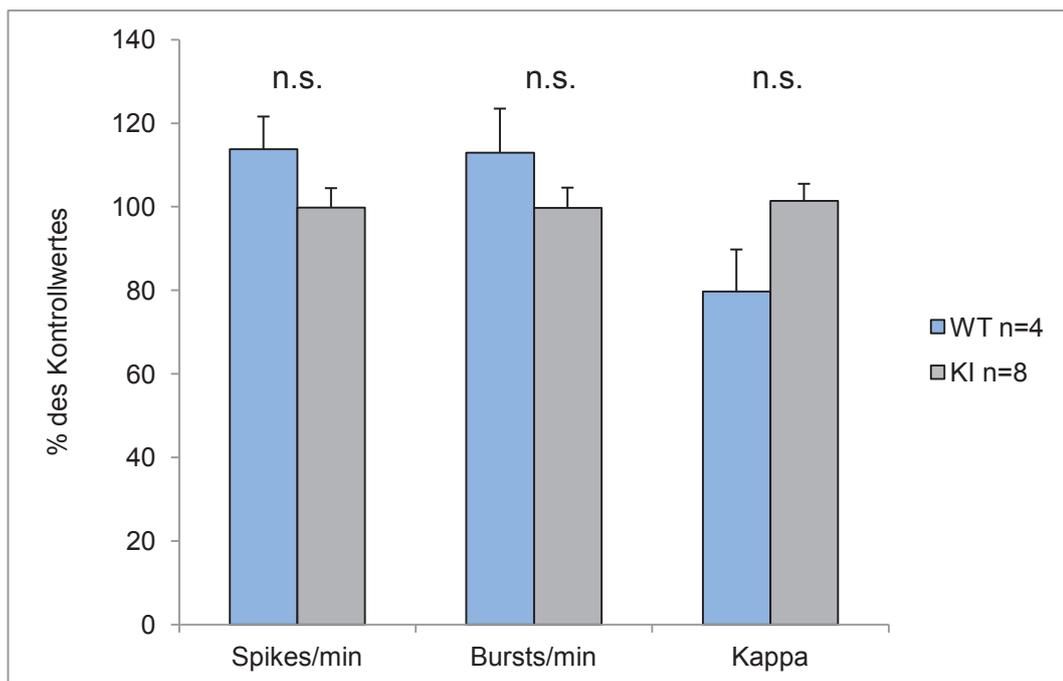


Abb. 15: Veränderungen unter Flumazenil 10 μM : Steigerung der Aktivität und Abnahme der Synchronisation (Cohen's Kappa) der WT-Kulturen. Keine Veränderungen in KI-Kulturen.

Von den drei getesteten Substanzen (DMCM 10 μM , Zolpidem 1 μM und Flumazenil 10 μM) eignet sich am ehesten DMCM 10 μM um selektiv die $\gamma 1$ -UE des GABA_A -Rezeptors zu detektieren. Dafür gibt es mehrere Gründe: Zum einen ermöglicht DMCM 10 μM hinsichtlich des Parameters Cohen's Kappa

4. Ergebnisse

eine deutliche und reproduzierbare Differenzierung zwischen WT-Kulturen und KI-Kulturen. Zum anderen bestätigt sich die von anderen Gruppen (u.a. Leppä et al., 2004) bereits beschriebene Beobachtung, dass DMCM einen positiv modulatorischen Effekt am BZD-Rezeptor besitzt.

4.3 Vermittlung des DMCM-Effektes über die γ 1-UE oder die β 2/3-UE

Um der Frage nachzugehen, ob für die beobachtete Desynchronisation des Netzwerkes unter DMCM 10 μ M die vermehrte Expression der γ 1-UE oder der β 2/3-UE des GABA_A-Rezeptors von Bedeutung ist, wurde DMCM auch auf Kulturen mit einer Mutation der β 3-UE (N265M, Asparagin ersetzt durch Methionin) appliziert. Diese Mutation macht die β 3-UE unempfindlich gegenüber Loreclezole, einem Antikonvulsivum und Etomidat, einem im Klinikalltag weit verbreiteten und häufig angewendetem Anästhetikum. Laut vorangegangener Studien soll die Aminosäure Asparagin an Position 265 der β 3-UE auch die Stelle sein, die den positiv modulatorischen Effekt von DMCM am GABA_A-Rezeptor vermittelt (Stevenson *et al.*, 1995).

Auffällig ist, dass es keinen Unterschied macht, ob die genannte Mutation der β 3-UE vorhanden ist oder nicht. Eine bedeutende Differenz zwischen den WT-, HT- und KI- Kulturen hinsichtlich der Aktivität und Synchronisation des Netzwerkes lässt sich nicht feststellen. Lediglich KI-Kulturen, die die Mutation γ 2F77I tragen, zeichnen sich durch eine signifikante Abnahme der Netzwerksynchronisation aus (Cohen's Kappa sinkt auf 62 % ab) (**Abb. 14**).

4. Ergebnisse

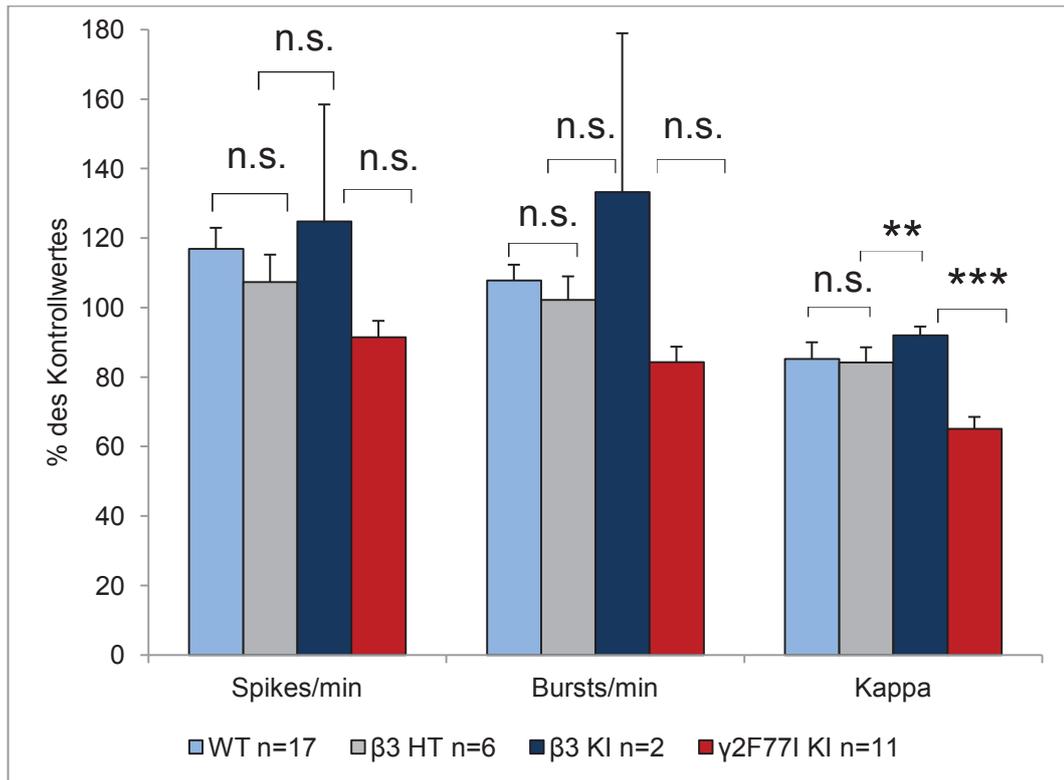


Abb. 16: Veränderungen unter DMCM 10 μ M in WT (hellblau), β 3-HT (hellgrau), β 3-KI (dunkelblau) und γ 2-KI-Kulturen (rot). Die Feuerrate zeigt in β 3-HT und β 3-KI keinen deutlichen Unterschied zu γ 2-KI-Kulturen. Die Netzwerksynchronisation nimmt im Vergleich zu WT-, β 3-HT- und β 3-KI- in γ 2-KI-Kulturen signifikant ab.

Dass die Mutation β 3N265M in den einzelnen Zellreihen auch wirklich vorhanden ist, wurde mit Hilfe der Substanz Etomidat überprüft. (Jurd *et al.*, 2003) und (Desai *et al.*, 2009) stellten fest, dass eine Punktmutation in der Transmembrandomäne 2 der β 2- β 3-UE auf Position N265M, zu einer verminderten Etomidat-Sensitivität führt. Dieser Effekt wurde sowohl auf elektrophysiologischer Ebene (Verlust der Potenzierung des GABA_A-Rezeptors) als auch auf Verhaltensebene (Verlust des *righting reflex*) beschrieben. Die Wirkung von Etomidat erfordert damit vermutlich das Vorhandensein der intakten β 3-UE des GABA_A-Rezeptors. Wenn die Mutation β 3N265M in den kultivierten Zellen vorliegt, sollte Etomidat seinen positiv modulatorischen Effekt und damit seine sedierende Wirkung einbüßen.

4. Ergebnisse

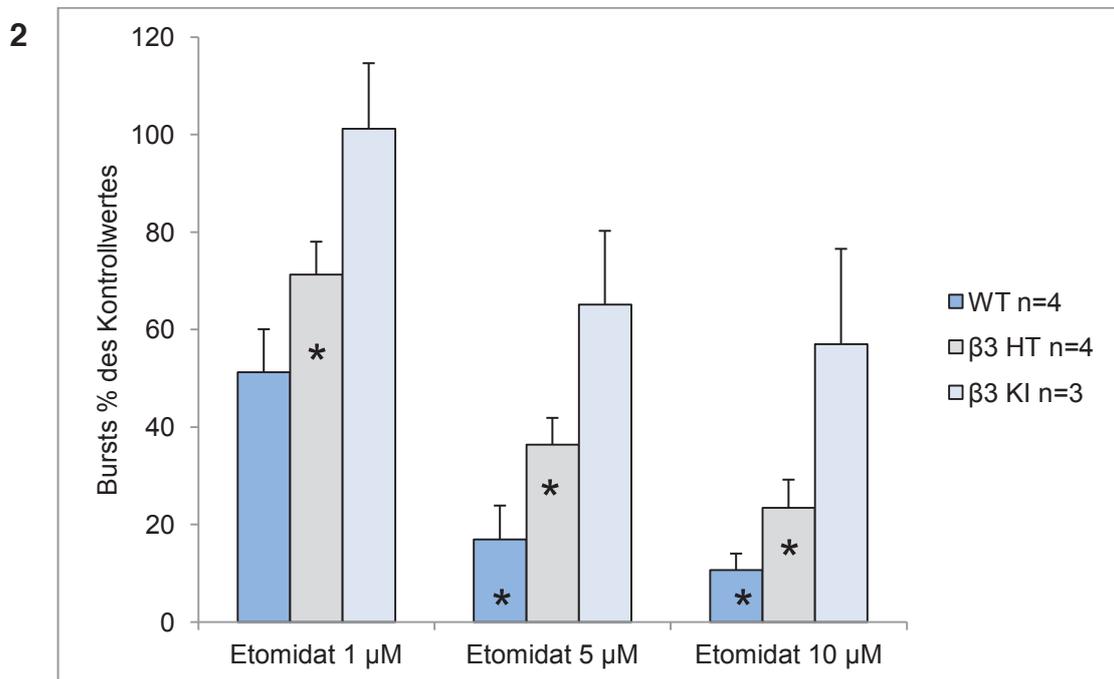
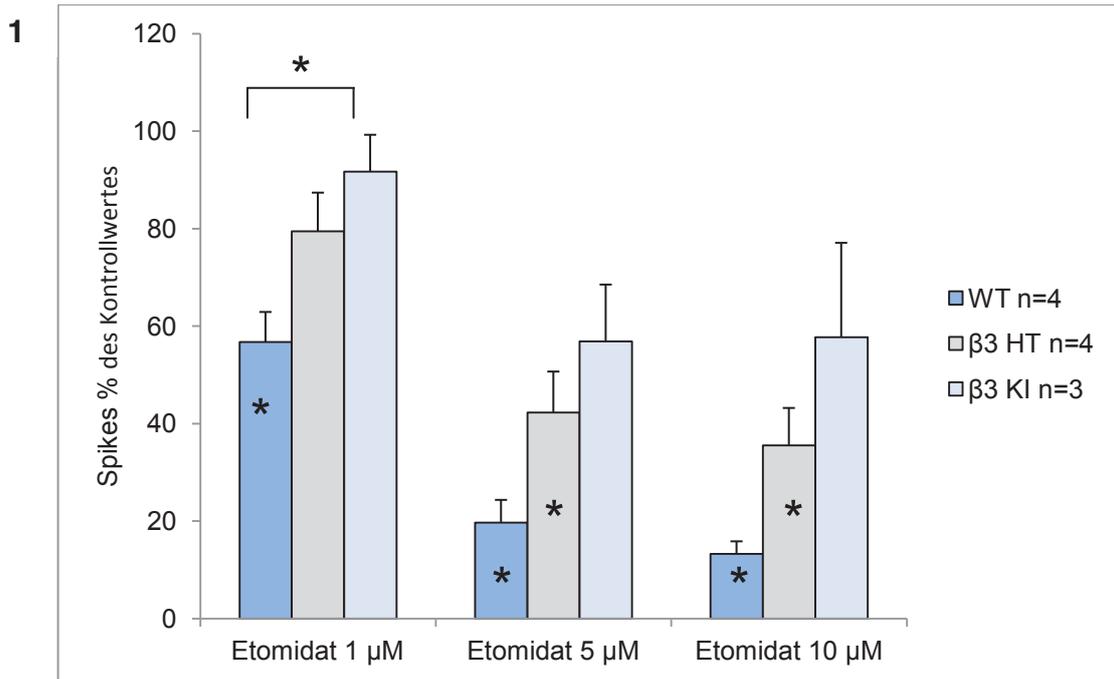


Abb. 17: Etomidat führt in aufsteigender Konzentration zu einer Hemmung der Spike-(1) und Burstrate (2) der WT- Kulturen. Dieser Effekt ist in den $\beta 3$ -HT-Kulturen deutlich reduziert und in den $\beta 3$ -KI-Kulturen nur noch gering ausgeprägt.

Abb. 17 zeigt deutlich, dass Etomidat in aufsteigender Konzentration (1 μ M, 5 μ M und 10 μ M) zu einer Abnahme der Feuerrate der WT-Kulturen führt. Die $\beta 3$ -

4. Ergebnisse

HT-Kulturen sprechen wesentlich geringer auf Etomidat an und in den β 3-KI-Kulturen ist dieser Effekt weiter abgeschwächt. Diese Versuche bestätigen nicht nur, dass die β 3-UE des GABA_A-Rezeptors ein entscheidender Angriffsort für das Anästhetikum Etomidat ist, sondern auch, dass die Mutation (β 3N265M-HT-Kulturen oder β 3N265M-KI-Kulturen) tatsächlich vorhanden ist. Andererseits spielt die β 1-UE in hypothalamischen Neuronen eine große Rolle und ist nicht sensitiv gegenüber Etomidat (Sergeeva *et al.*, 2010; Yanovsky *et al.*, 2012) was höchstwahrscheinlich für die signifikanten Unterschiede zwischen WT und β 3N265M Kulturen unter 1 μ M Etomidat verantwortlich ist. Deshalb wirkt DMCM nicht über die Bindung an Asparagin 265 an der β 3-UE (β 3N265) sondern über Bindung an die γ 1-UE.

4.4 siRNA-Versuche

4.4.1 DMCM

Ob die beobachteten Veränderungen in den γ 2F771-Kulturen unter DMCM 10 μ M auch wirklich auf eine Modulation der γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors zurückzuführen sind, sollte mit Hilfe der γ 1-siRNA untersucht werden, die den gezielten *knock-down* der γ 1-UE ermöglicht. Da die Zellmembran eine physiologische Barriere für die siRNA darstellt, musste diese zunächst mit Hilfe des Transfektionsmediums Accell so verändert werden, dass eine Penetration der siRNA ins Zytosol erfolgen konnte. Dazu wurde die Standardbadlösung abgenommen und vorsichtig durch das Transfektionsmedium Accel ersetzt. Nach einer 24-stündigen Einwirkzeit des Accell-Mediums erhielten die Kulturen zusätzlich die γ 1-siRNA, die nach Angaben des Herstellers nach 48-72 Stunden ihre maximale Wirkung entfaltet.

Zur Dokumentation der Effekte, die allein durch den Mediumwechsel von Standardbadlösung auf Transfektionsmedium Accell und nicht durch die siRNA selbst verursacht wurden, erfolgte eine Messung aller Kulturen in DMCM 10 μ M nach einem Tag Accell-Medium. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen. Bemerkenswert hinsichtlich der Netzwerksynchronisation ist der deutliche Anstieg des Parameters Cohen's Kappa nach der Transfektion mit γ 1-siRNA (**Abb. 18**).

4. Ergebnisse

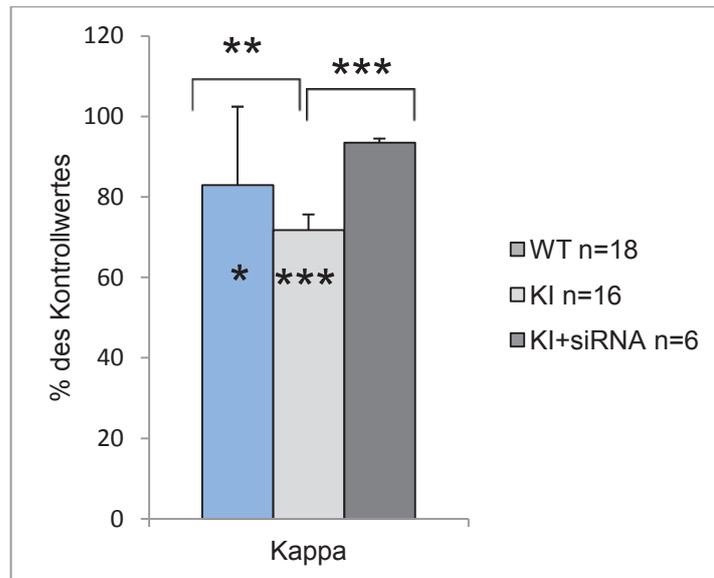


Abb. 18: Signifikanter Anstieg des Parameters Cohen's Kappa nach DMCM 10 μ M in KI-Kulturen, die mit siRNA behandelt wurden.

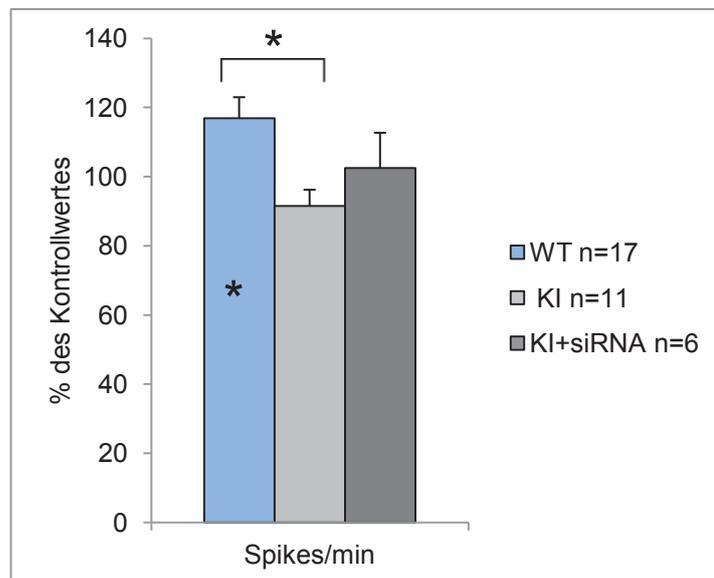


Abb. 19: DMCM 10 μ M erhöht die Feuerrate in WT-Kulturen und unterdrückt sie in KI-Kulturen. Die Transfektion mit γ 1-siRNA schwächt die inhibitorische Aktivität von DMCM 10 μ M ab.

Die Aktivität der WT-Kulturen steigt nach DMCM 10 μ M an, wohingegen sie in KI-Kulturen abfällt. Ein weiterer Effekt, der nach Transfektion der KI-Kulturen mit γ 1-siRNA und Messung mit DMCM 10 μ M beobachtet wurde, ist der leichte Anstieg der Feuerrate im Vergleich zu γ 2F771-Kulturen (KI), die nicht transfiziert

4. Ergebnisse

wurden (**Abb. 19**). Damit verliert DMCM 10 μM seine positiv modulierende Wirkung an KI-Kulturen, die vermutlich die Aminosäure Isoleucin an Position 77 der $\gamma 2$ -UE am GABA_A -Rezeptor erfordert.

4.4.2 Flumazenil

Die Wirkung von Flumazenil in transfizierten $\gamma 2\text{F77I}$ -Kulturen wurde nach dem gleichen Protokoll wie zuvor die DMCM-Messreihe untersucht. Die Veränderungen der Feuerrate und der Netzwerksynchronisation unter Flumazenil 10 μM sind in **Abb. 20** zusammengefasst. Die Feuerrate wird nur geringfügig durch das Accell-Medium und die $\gamma 1$ -siRNA-Behandlung beeinflusst. Auch der Parameter Cohen's Kappa weist keinen signifikanten Unterschied zwischen Neurobasalmedium und Accell-Medium bzw. zwischen Accell-Medium und siRNA auf. Damit scheinen die Effekte von Flumazenil weitgehend unabhängig von dem *knock-down* der $\gamma 1$ -UE des GABA_A -Rezeptors zu sein.

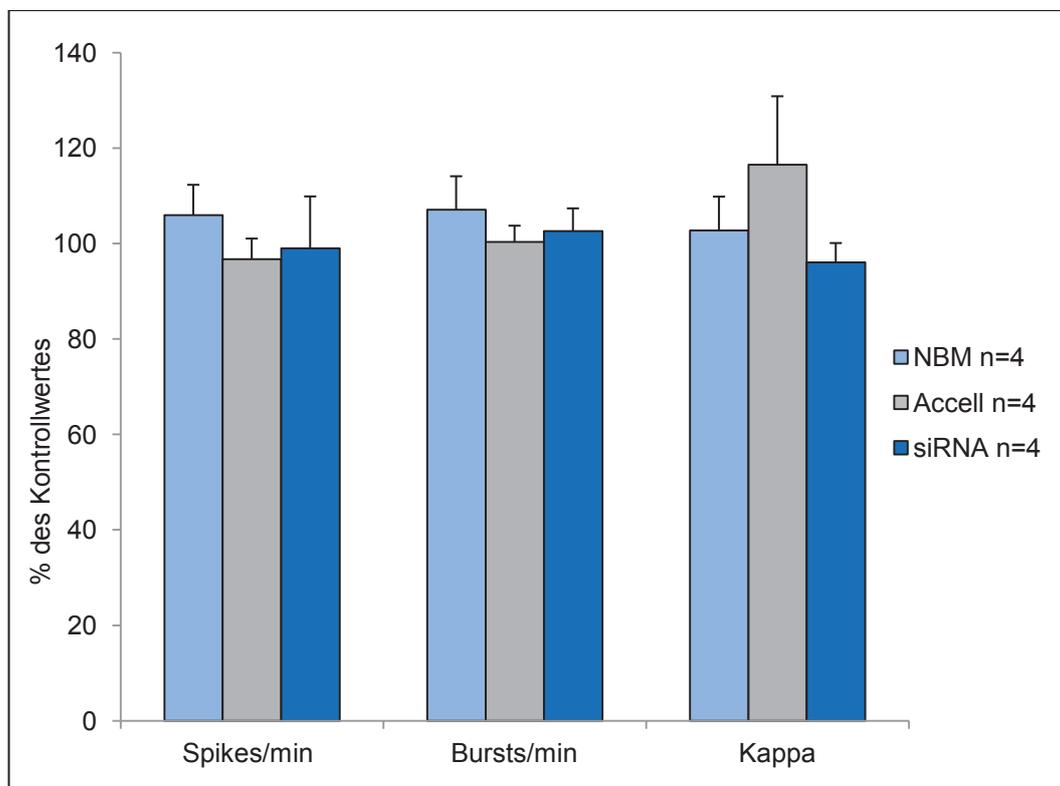


Abb. 20: Keine signifikante Änderung der Feuerrate (Spikes/min und Bursts/min) und des Parameters Cohen's Kappa nach Flumazenil 10 μM in Neurobasalmedium (hellblau) und nach Applikation von Accell-Medium (hellgrau) bzw. $\gamma 1$ -siRNA (dunkelblau) in $\gamma 2\text{F77I}$ -Kulturen.

4. Ergebnisse

4.4.3 Feuerrate der Kulturen

Bemerkenswert ist der deutliche Anstieg der Feuerrate der Kulturen nach Transfektion mit siRNA im Vergleich zu Messungen im Neurobasalmedium. Dieses Phänomen ließ sich reproduzierbar in fast allen Kulturen nach Behandlung mit γ 1-siRNA beobachten (**Abb. 21**). Der genetische Hintergrund der Kultur (WT vs. KI) bzw. die im Vorfeld applizierte Substanz scheinen diese Veränderung des Aktivitätsniveaus daher nicht hervorgerufen zu haben

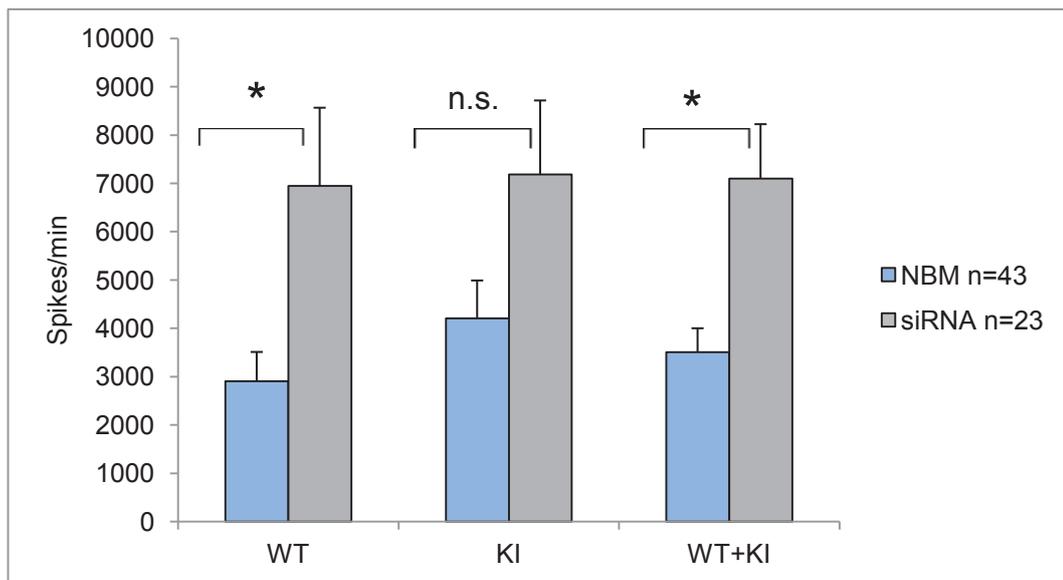


Abb. 21: Anstieg der Spikerate sowohl in WT als auch in KI-Kulturen nach γ 1siRNA-Behandlung der Kulturen im Vergleich zur Messung in Neurobasalmedium.

4.5 PCR-Ergebnisse

Mit Hilfe der *qRT-PCR* wurde untersucht, ob der *knock-down* der γ 1-UE in den transfizierten Kulturen auch wirklich funktionierte. Dazu wurde die mRNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend die Expression der γ 1-UE und der γ 2-UE bestimmt.

Abb. 22 veranschaulicht die Ergebnisse der Versuche. Die mit γ 1-siRNA behandelten Kulturen (γ 1-siRNA) wurden mit Kulturen verglichen, die nur das Transfektionsmedium Accell erhielten (CO), aber keine γ 1-siRNA. Die relative Veränderung der Genexpression der γ 1-UE im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen zeigt einen signifikanten Abfall der Expression der γ 1-UE nach γ 1-

4. Ergebnisse

siRNA. Die Kulturen, die als Kontrolle dazu parallel nur Accell-Medium erhielten, weisen unveränderte Expressionslevel der γ 1-UE auf. Auch die Expression der γ 2-UE bleibt nach Accell-Medium gleich und steigt in γ 1-siRNA transfizierten Kulturen an.

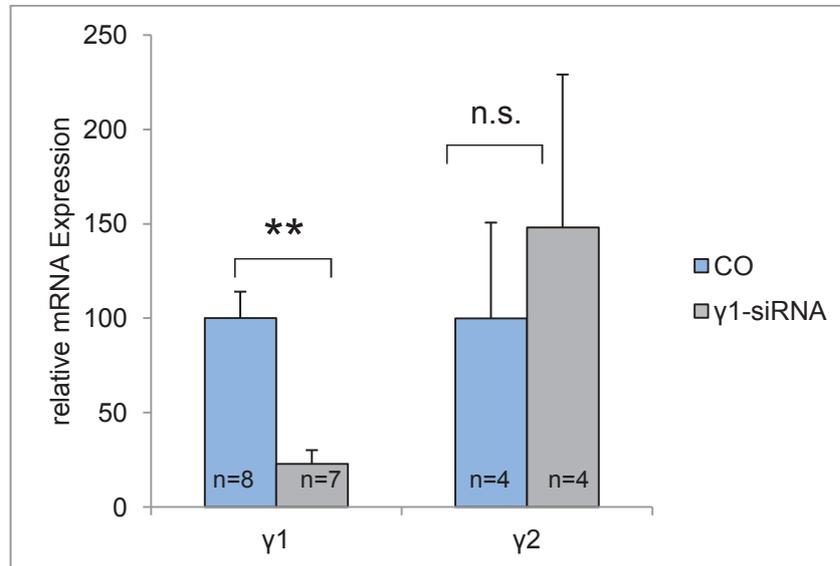


Abb. 22: Geringere Expression der γ 1-UE und Anstieg der Expression der γ 2-UE in Kulturen, die mit γ 1-siRNA behandelt wurden.

Vergleich der relativen mRNA-Expression der γ 1-UE und der γ 2-UE des GABA_A-Rezeptors in Kulturen, die mit γ 1-siRNA behandelt wurden (hellgrau, γ 1-siRNA) und Kontrollen ohne siRNA-Behandlung (dunkelgrau CO). Sowohl die Expression der γ 1 als auch der γ 2-Untereinheit ist unverändert in den Kontrollkulturen.

Abkürzungen: CO: Kontrollkulturen ohne si-RNA-Behandlung; γ 1-siRNA: Kulturen, die mit γ 1-siRNA transfiziert wurden; γ 1: γ 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors; γ 2: γ 2-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors.

In **Abb. 23** sind die einzelnen Schritte eines qRT-PCR-Versuches dargestellt, der es erlaubt, die veränderte Expression der γ 1-UE nach Transfektion einiger Kulturen mit γ 1-siRNA zu messen. Verglichen wurden dazu vier Proben, die als Kontrollen dienten und nur mit Accell-Medium behandelt wurden mit zwei Kulturen, die mit γ 1-siRNA behandelt wurden. Die Kontrollen sind in den **Abb. 23, 1** und **23, 2** mit den Farben türkis, beige, violett und dunkelblau markiert, die transfizierten Kulturen in den Farben hellgrün und rot.

In **Abb. 23, 1** ist auf der x-Achse die Anzahl der PCR-Zyklen und auf der y-Achse die Fluoreszenz des Farbstoffes *Sybr® Green* (Rn steht für *reporter normalization*) aufgetragen. Zu Beginn der Messung sind nur unspezifische Signale detektiert worden. Mit steigender Zykluszahl steigt auch die

4. Ergebnisse

Fluoreszenz der amplifizierten cDNA-Menge in den einzelnen Proben an und erreicht eine exponentielle Phase. Die rote Linie markiert einen Fluoreszenz-Grenzwert (*threshold*), der so gewählt wurde, dass dieser innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikation liegt und das Hintergrundrauschen deutlich übertrifft. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz der einzelnen Proben den Grenzwert schneidet, wird als C_T -Wert (*cycle threshold*) definiert. Die vier Kontrollproben sind durch ähnliche C_T -Werte im Bereich 23-25 gekennzeichnet und erreichen damit früher die exponentielle Phase des Fluoreszenzanstieges als die transfizierten Kulturen (C_T -Werte 32 bzw. 33). Das bedeutet, dass der $\gamma 1$ -cDNA Gehalt in den si-RNA behandelten Kulturen deutlich vermindert ist und somit auch die Expression der $\gamma 1$ -UE.

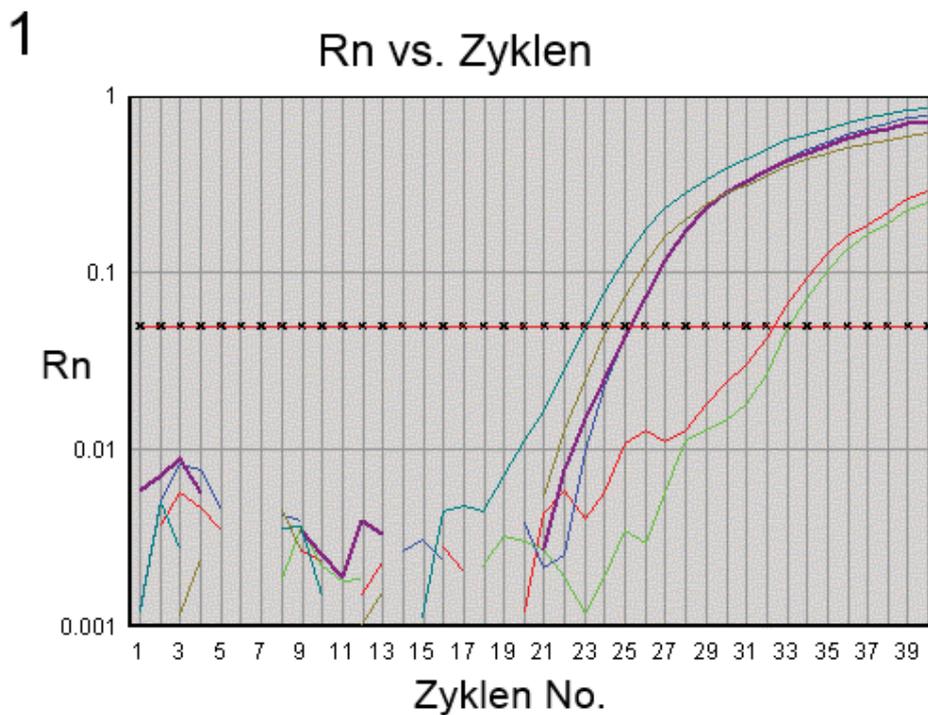


Abb. 23 (1): Originaldaten eines qRT-PCR-Versuchs, indem die relative Expression der $\gamma 1$ -UE nach Transfektion mit $\gamma 1$ -siRNA untersucht wurde.

- 1: Rn-Wert aufgetragen gegen die Anzahl der PCR-Cyclen. Die Kontrollkulturen (farbkodiert: türkis, beige, violett und dunkelblau) zeigen einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz bereits nach 19-24 PCR-Cyclen. Die Kulturen, die mit $\gamma 1$ -siRNA behandelt wurden (farbkodiert: hellgrün und rot), weisen erst später (nach 32 Cyclen) einen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz auf.

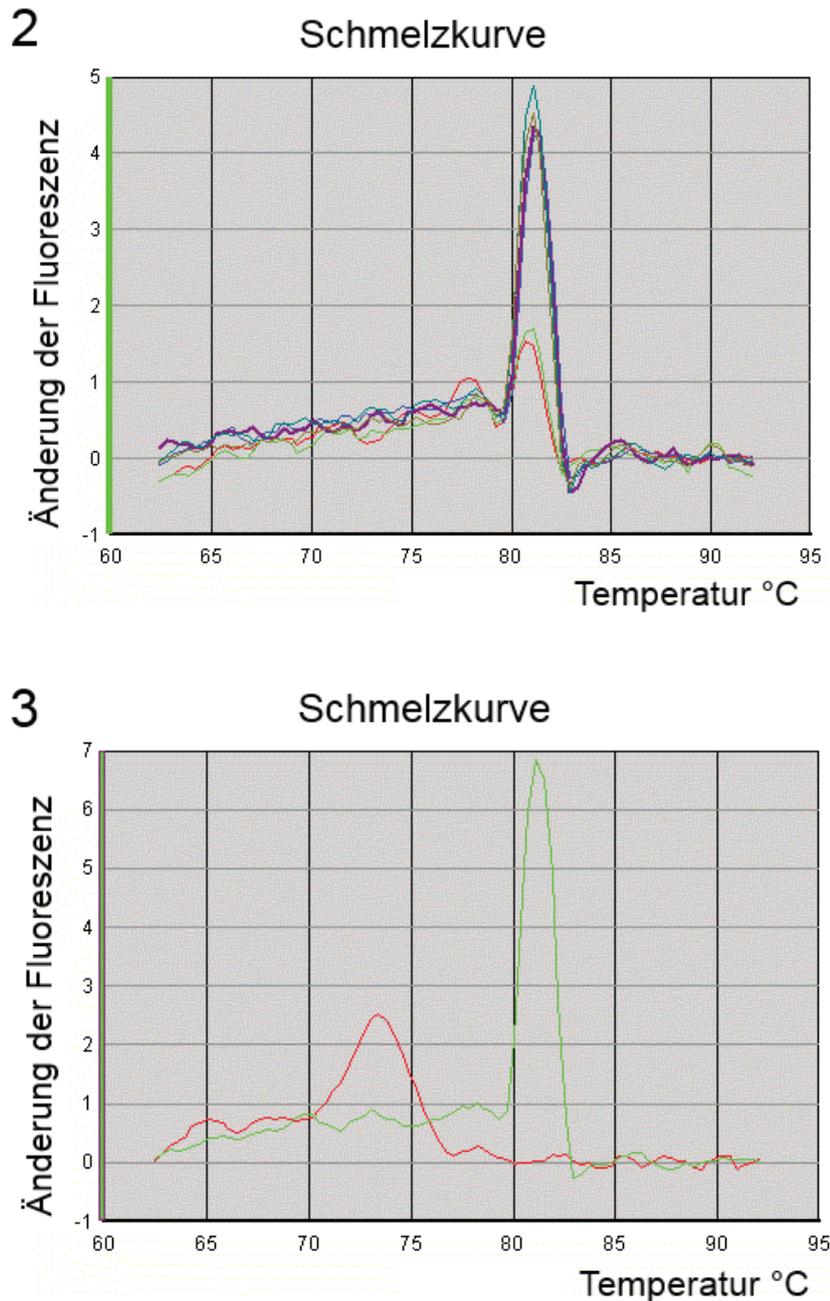


Abb. 23 (2,3): Originaldaten eines qRT-PCR-Versuchs, indem die relative Expression der γ 1-UE nach Transfektion mit γ 1-siRNA untersucht wurde.

- 2:** Schmelzkurve des PCR-Ansatzes. Auf der Abszisse ist die Temperatur in Grad Celsius und auf der Ordinate die Änderung der Fluoreszenz angegeben. Die Schmelzkurve zeigt für alle Proben nur einen *peak*.
- 3:** Schmelzkurve der Negativkontrolle (farbkodiert: rot) und einer Probe mit cDNA (hellgrün). Die Negativkontrolle zeigt einen unspezifischen *peak* (Primerartefakt) bei niedrigeren Temperaturen als die Probe mit cDNA (hellgrün).

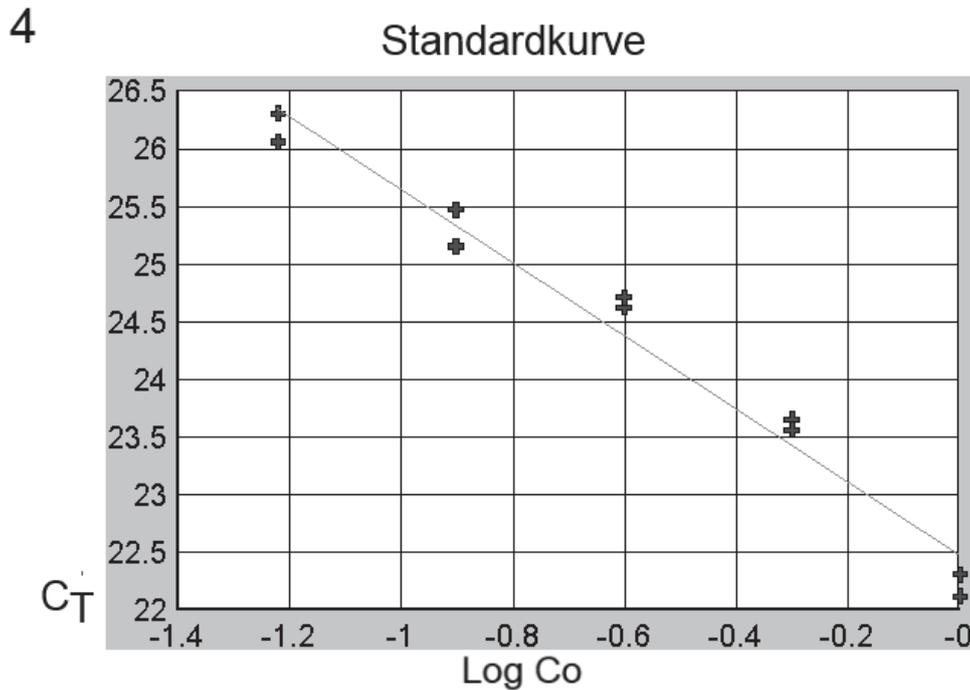


Abb. 23 (4): Originaldaten eines qRT-PCR-Versuchs, indem die relative Expression der γ 1-UE nach Transfektion mit γ 1-siRNA untersucht wurde.

- 4: Standardkurve für die Expression der γ 1-Untereinheit. Auf der x-Achse ist der Logarithmus der verdünnten Konzentration der cDNA und auf der y-Achse die C_T -Werte der jeweiligen Probe aufgetragen. Korrelationskoeffizient -0,986, Steigung -3,16, Effizienz 2,07.

Am Ende jedes PCR-Laufes wurde mit Hilfe einer sogenannten Schmelz- oder Dissoziationskurve überprüft, ob auch nur das zu untersuchende PCR-Produkt amplifiziert wurde. Dazu wurde schrittweise die Temperatur im *Thermocycler* erhöht, sodass die doppelsträngigen DNA wieder in ihre Einzelstränge getrennt wurde. Da der Farbstoff *Sybr® Green* nur dann fluoresziert, wenn er an dsDNA gebunden ist, nimmt damit das Fluoreszenzsignal mit steigender Temperatur kontinuierlich ab. Jedes PCR-Produkt hat eine charakteristische Schmelztemperatur, die in diesem Fall bei ca. 81°C liegt. Die entsprechende Schmelzkurve ist in **Abb. 23, 2** zu sehen und zeigt nur einen Peak für alle Proben. Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine unspezifischen weiteren PCR-Produkte amplifiziert wurden und die Messung nicht verfälscht wurde.

Abb. 23, 3 veranschaulicht neben einer Probe mit Primern und cDNA (grün) eine Negativkontrolle, die nur Primer aber kein *template* beinhaltet (rot). Die Dissoziationskurve dieser beiden Proben zeigt, dass die Negativkontrolle einen

4. Ergebnisse

kleinen *Peak* bei niedrigerer Schmelztemperatur hat und damit nicht das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert. Der *peak* bei ca. 74°C ist am ehesten als Primerartefakt zu deuten.

Zur Bestimmung der relativen Genexpression der γ 1-UE wurde eine Standardkurve erstellt (**Abb. 23, 4**), indem die cDNA sequentiell verdünnt und der Logarithmus dieser Konzentration gegen den entsprechend ermittelten C_T -Wert aufgetragen wurde. Diese hat eine Steigung von -3,16 und einen Korrelationskoeffizient von -0,98. Damit hat das Primerpaar für die γ 1-UE eine Effizienz von $E = 2,07$. Diese Werte wurden auf die Expression des HKG β -Actin bezogen und die relative Expression der mRNA mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode berechnet.

Auch die Expression der γ 2-UE wurde in transfizierten Kulturen und Kontrollen, die nur Accell-Medium erhielten, untersucht. Der Versuchsaufbau und die Vorgehensweise entspricht der Expressionsmessung der γ 1-UE. In **Abb. 24, 1** ist die Schmelzkurve für die γ 2-UE zu sehen, die für alle Proben wiederum nur einen *Peak* bei ca. 80°C hat und damit deutlich macht, dass nur die gewünschte cDNA amplifiziert wurde. Eine Kontamination der Messung durch weitere DNA-Fragmente konnte damit ausgeschlossen werden. Die Standardkurve für die γ 2-UE ist in **Abb. 24, 2** dargestellt und zeigt einen nahezu optimalen Verlauf. Die Steigung der Geraden beträgt -3,62, der Korrelationskoeffizient -0,98 und die draus errechnete Effizienz 1,89. Die relative Expression der γ 2-UE in Bezug auf das HKG β -Actin wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode bestimmt.

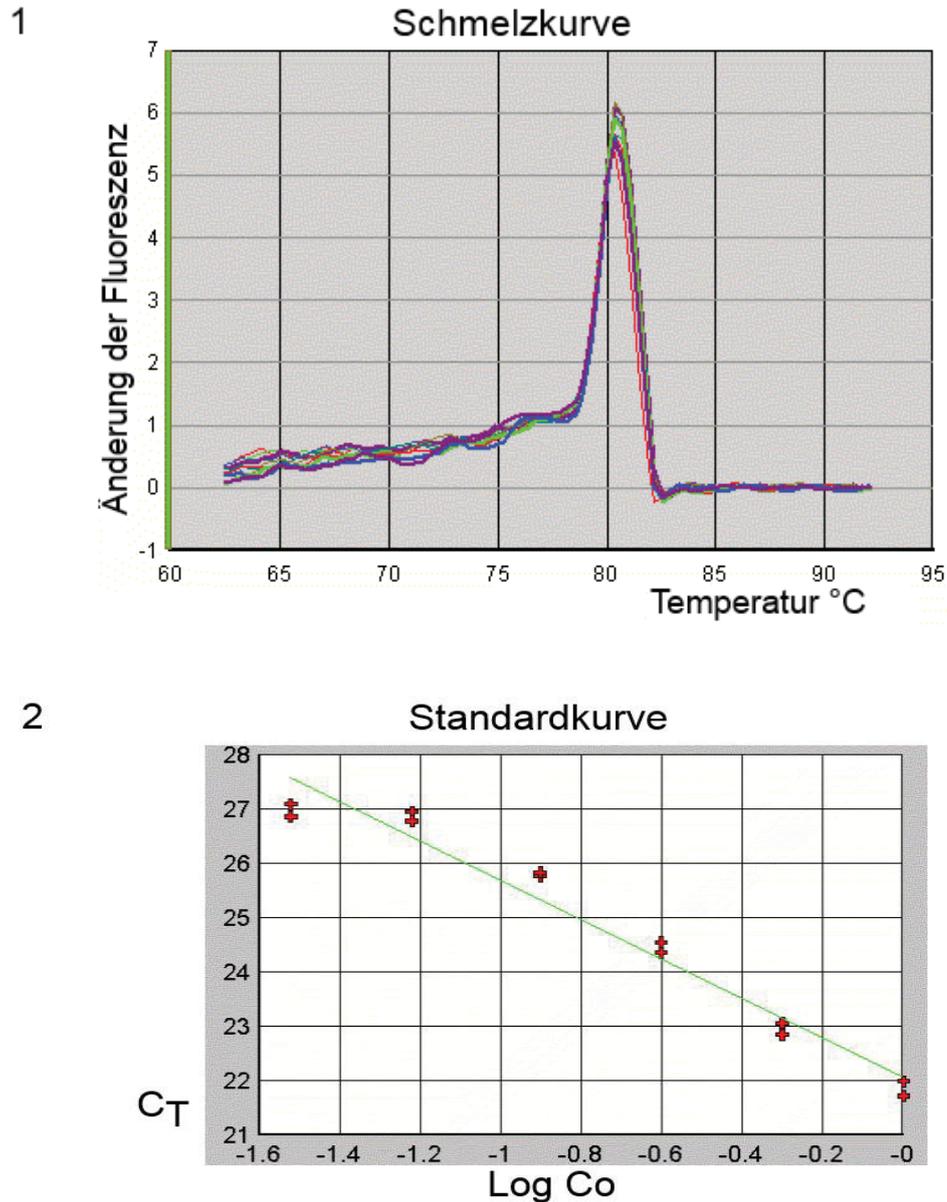


Abb. 24: Originaldaten eines qRT-PCR-Versuchs, indem die relative Expression der γ 2-UE nach Transfektion mit γ 1-siRNA untersucht wurde.

- 1: Schmelzkurve der γ 2-UE. Auf der Abszisse ist die Temperatur in Grad Celsius und auf der Ordinate die Änderung der Fluoreszenz angegeben. Die Schmelzkurve zeigt für alle Proben nur einen *peak*.
- 2: Standardkurve für die Expression der γ 2-Untereinheit. Auf der x-Achse ist der Logarithmus der verdünnten Konzentration der cDNA und auf der y-Achse die C_T -Werte der jeweiligen Probe aufgetragen. Korrelationskoeffizient -0,98, Steigung -3,62, Effizienz 1,89.

Mit Hilfe der *Einzelzell-RT-PCR* wurden einzelne TMN-Zellen untersucht, ob sie die γ 1-UE bzw. die γ 2-UE exprimieren. Dazu wurden die Zellen zunächst mit

4. Ergebnisse

Hilfe der *Patch-Clamp*-Methode gemessen und anschließend in die Messpipette gesaugt. Dann wurde die mRNA der einzelnen Zellen isoliert, in cDNA umgewandelt und eine konventionelle PCR durchgeführt. In einer ersten Runde wurden Primer verwendet, die die γ -UE-Familie detektieren. Das PCR-Produkt der ersten Runde wurde dann erneut eingesetzt und eine zweite PCR-Runde mit UE-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Das finale PCR-Produkt wurde auf 2 % Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. In **Abb. 25** sind jeweils 5 Zellen dargestellt, die in unterschiedlichem Ausmaß die γ 1 bzw γ 2-UE exprimieren. In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen, weist keine der TMN-Zellen die γ 3-UE auf (Sergeeva *et al.*, 2002).

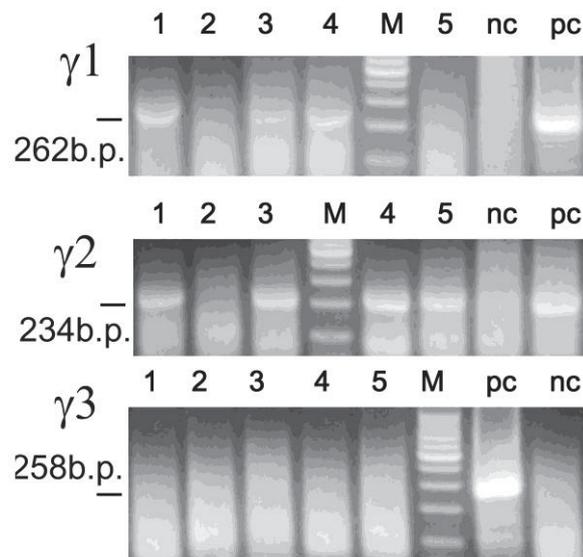


Abb. 25: Untersuchung der Expression der γ 1, γ 2 und γ 3-UE des $GABA_A$ -Rezeptors in 5 Zellen aus dem TMN mittels *single-cell*-PCR und anschließender Gelelektrophorese.

Die Zahlen 1 bis 5 stehen jeweils für eine Zelle mit der Nummer 1 bis 5. M ist die Abkürzung für Marker, der als Standard mitläuft und DNA-Fragmente bekannter Größe enthält. Durch den Vergleich der Laufstrecke der aufgetrennten Banden mit dem Marker kann die Größe des PCR-Produktes der einzelnen Zelle in Basenpaaren abgeschätzt werden. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Gels laufen sowohl eine Positivkontrolle (pc) als auch eine Negativkontrolle (nc) mit.

Die γ 1-UE wird in drei der fünf Zellen, die γ 2-UE in vier der fünf Zellen und die γ 3-UE gar nicht exprimiert.

4. Ergebnisse

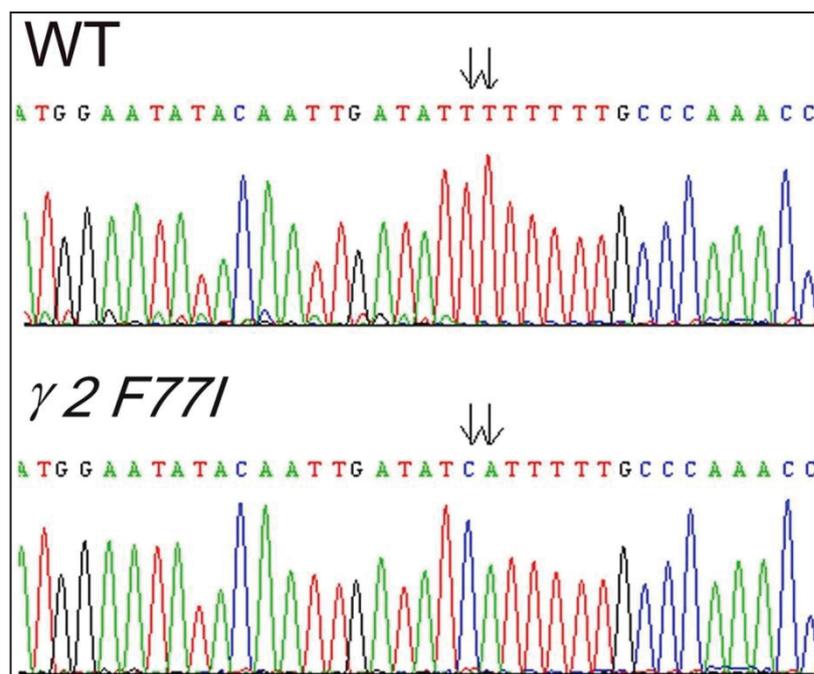
4.6 Sequenzierung der Einzelzell-RT-PCR-Produkte

Die in den elektrophysiologischen Versuchen eingesetzten $\gamma 2 F 7 7 1$ -Kulturen tragen eine Punktmutation an Position 77 der $\gamma 2$ -UE des GABA_A-Rezeptors. Auf Grund dieser gentechnischen Manipulation (Einbau von Isoleucin statt Phenylalanin) sind die Aminosäuresequenzen der $\gamma 2$ -UE und der $\gamma 1$ -UE an Position 77 identisch.

Das genaue Genotypisierungsprotokoll der $\gamma 2 F 7 7 1$ -Mutation findet sich bei Cope *et al.* (2004).

Das PCR-Produkt mehrerer KI-Zellen und mehrerer WT-Zellen wurde sequenziert um sicher zu gehen, dass die erwartete Punktmutation in den KI-Zellen auch wirklich vorhanden ist. Die Sequenzierung erfolgte im BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum) der Universität Düsseldorf nach der *Cycle-Sequencing*-Methode, die eine Weiterentwicklung des Verfahrens nach Sanger darstellt.

Das Ergebnis der Sequenzierung ist in **Abb. 26** zu sehen. In der Basenabfolge der DNA sind tatsächlich zwei Nukleotide der $\gamma 2$ -UE der KI-Kultur im Vergleich zum WT so verändert (CA statt TT), dass Isoleucin anstelle von Phenylalanin in die Aminosäuresequenz der $\gamma 2$ -UE des GABA_A-Rezeptors eingebaut wird.



4. Ergebnisse

Abb. 26: Vergleich der sequenzierten Fragmente der $\gamma 2$ -UE des $GABA_A$ -Rezeptors der Maus einer WT und einer $\gamma 2F771$ -KI-Zelle.

Abkürzungen: T: Thymin; A: Adenin; G: Guanin; C: Cytosin

Die farblich codierten Buchstaben stehen jeweils für ein Nukleotid. Darunter sind die Originaldaten der Gelelektrophorese abgebildet, wobei ein farbkodierter *peak* jeweils einer Base entspricht.

Auf DNA-Ebene sind zwei Nucleotide (mit Pfeilen markiert) in Exon 4 verändert, sodass die KI-Kultur eine Punktmutation an Position 77 trägt. Dadurch wird anstelle der Aminosäure Phenylalanin (WT) die Aminosäure Isoleucin (KI-Kultur) eingebaut. Diese Mutation führt dazu, dass die Aminosäuresequenzen der $\gamma 2$ -UE und der $\gamma 1$ -UE an Position 77 übereinstimmen.

4.7 Midazolam Effekt

Der Analyse der Wirkung des klassischen BZDs Midazolam in der Konzentration $10 \mu M$ an WT (div $8,8 \pm 1,1$) und $\gamma 2F771$ -KI-Kulturen (div $10,7 \pm 0,8$) bestätigte, dass Midazolam in WT-Kulturen zu einer Hemmung der Netzwerkaktivität führt. Dieser Effekt ist in KI-Kulturen um ca. 20 % reduziert. Die Netzwerksynchronisation zeigt ein erstaunliches Ergebnis in den jeweiligen Zelllinien: Sie sinkt in WT-Kulturen, wohingegen die Neurone der KI-Kulturen nahezu unverändert feuern (**Abb. 27**).

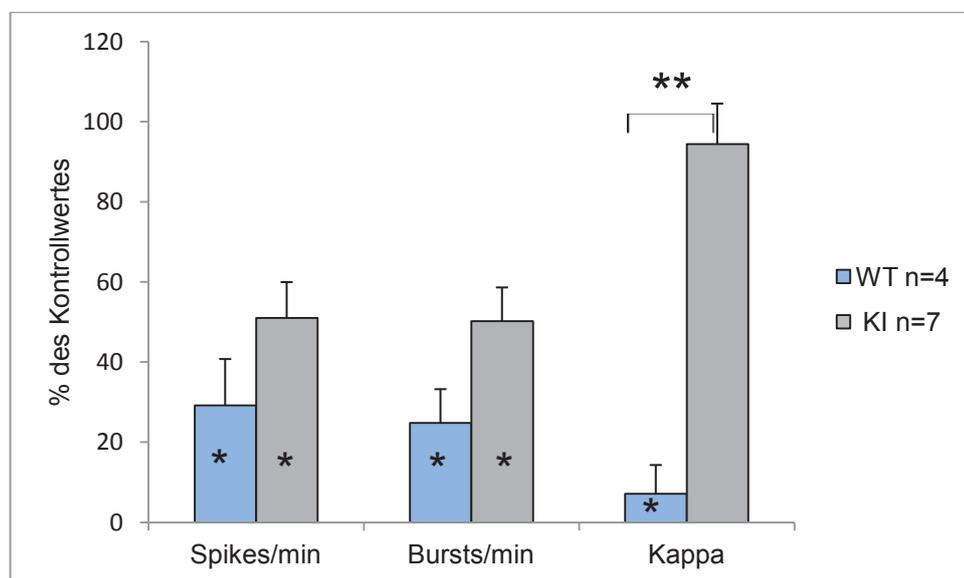


Abb. 27: Midazolam in der Konzentration $10 \mu M$ führt zu einem geringeren Abfall der Feuerrate und verhindert die Desynchronisation des Netzwerkes in $\gamma 2F771$ -KI-Kulturen im Vergleich zu WT-Kulturen.

4.8 Funktionsfähigkeit des GABA_A-Rezeptors in γ 2F77I-Kulturen

Zum Schluss jeder MEA-Messung mit γ 2F77I-Kulturen sollte die Funktionsfähigkeit des GABA_A-Rezeptors überprüft werden. Dazu wurde der GABA_A-Rezeptor-Antagonist Gabazin eingesetzt, der in der hohen Konzentration 10 μ M sowohl die tonische, als auch die phasische GABA-vermittelte Inhibition blockiert (Stell & Mody, 2002). Wenn eine Kultur nicht auf die Wirkung von Gabazin ansprach, d.h. die Feuerrate und Cohen's Kappa nicht deutlich anstiegen, wurde sie auch nicht in die Auswertung des Versuches einbezogen. Das kann der Fall sein, wenn der GABA_A-Rezeptor in der Kultur nicht funktionsfähig ist oder nicht in ausreichendem Maße exprimiert wird. Der Effekt von Gabazin zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Feuerrate und der Netzwerksynchronisation zwischen γ 2F77I-Kulturen und WT-Kulturen (**Abb. 28**).

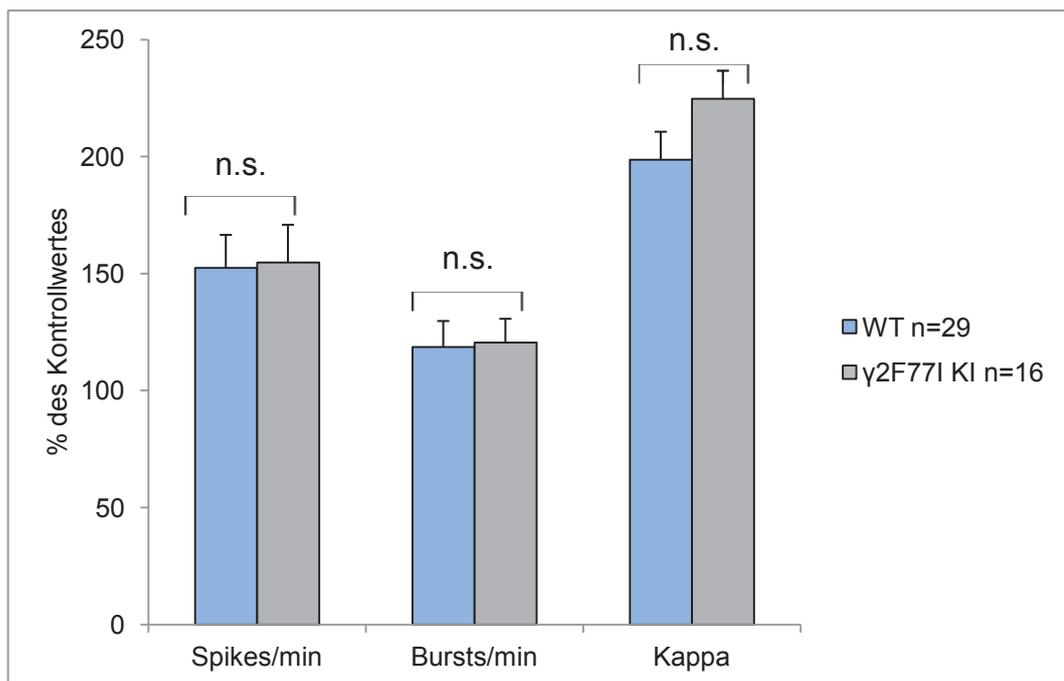


Abb. 28: Gabazin in der Konzentration 10 μ M führt zu einem Anstieg der Feuerrate und zu einer straken Synchronisierung des Netzwerkes sowohl in WT als auch in γ 2F77I-KI-Kulturen.

Wie ausgeprägt der Einfluss von Gabazin auf Netzwerkebene sowohl in WT als auch in γ 2F77I-Kulturen ist, veranschaulicht **Abb. 29**. Abgebildet sind ausschnittsweise jeweils zwei Kanäle der Original-MEA-Ableitungen einer WT (**Abb. 29, 1**) und einer KI-Kultur (**Abb. 29, 2**) zunächst gemessen in

4. Ergebnisse

Standardbadlösung (**WT CO** bzw. **KI CO**) und zum Vergleich nach Applikation von Gabazin 10 μM (**WT GZ** bzw. **KI GZ**). Unter Standardbadlösung feuern die Neurone noch weitgehend unabhängig voneinander, wobei dieser Effekt in den KI-Kulturen noch etwas ausgeprägter erscheint als in den WT-Kulturen. Gabazin 10 μM führt hingegen zu einer beachtlichen Synchronisation der Netzwerke sowohl in WT als auch in KI.-Kulturen. Dieser enorme Anstieg des Parameter Cohen's Kappa wird anhand des *Spike-Raster-Plots* (SPR) einer ausgewählten KI-Kultur nochmals in **Abb. 29, 3 und 4** verdeutlicht. Das unter Standardbadlösung zunächst noch ungeordnete Bild der Spikes (**Abb. 29, 3**), wird nach Gabazin-Applikation (10 μM) völlig homogen und symmetrisch (**Abb. 29, 4**).

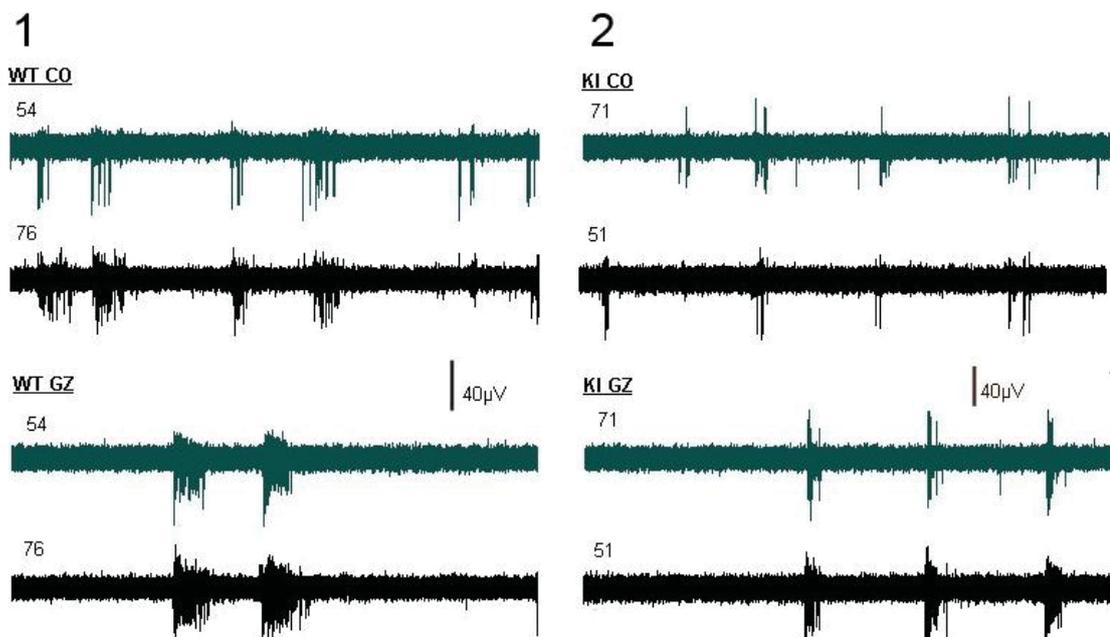
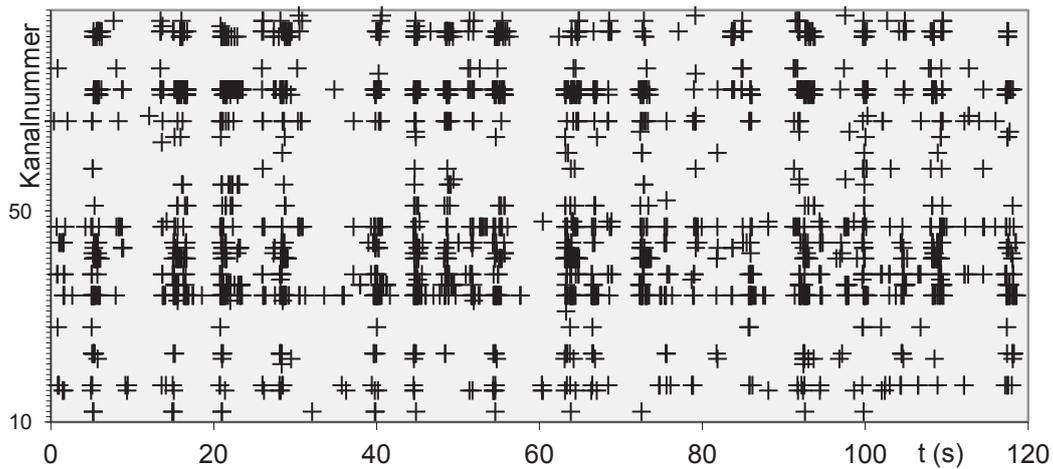


Abb. 29 (1,2): Gabazin 10 μM synchronisiert die Netzwerke sowohl von WT- als auch von KI-Kulturen.

- 1: Kanäle Nr. 54 (grün) und Nr.76 (schwarz) aus einer MEA-Messung einer WT-Kultur (div 8) unter Standardbadlösung (WT CO) und Gabazin 10 μM (GZ) Der Abschnitt umfasst eine Länge von 20 s.
- 2: Kanäle Nr. 71 (grün) und Nr.51 (schwarz) aus einer MEA-Messung einer KI-Kultur (div 8) unter Standardbadlösung (WT CO) und Gabazin 10 μM (GZ) Der Abschnitt umfasst eine Länge von 20 s.

4. Ergebnisse

3



4

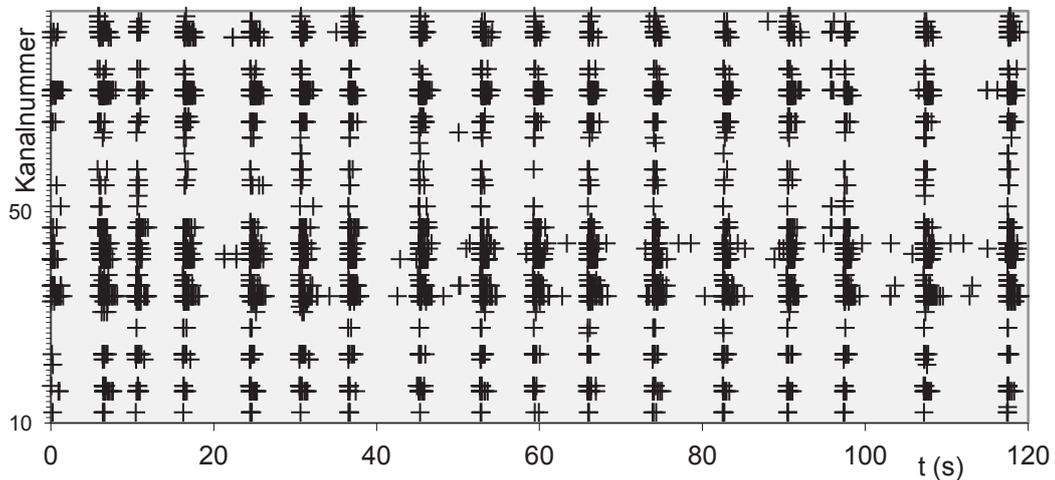


Abb. 29 (3,4): Gabazin 10 µM synchronisiert die Netzwerke sowohl von WT- als auch von KI-Kulturen.

- 3: *Spike-Raster-Plot* (SPR) einer KI-Kultur (div8). Jedes schwarze Kreuz steht dabei für einen Spike, d.h. ein extrazellulär abgeleitetes Aktionspotential. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden und auf der y-Achse die Kanalnummer abgebildet.
- 4: Gabazin in der Konzentration 10 µM führt zu einem Anstieg der Feuerrate und zu einer starken Synchronisierung des Netzwerkes (4) im Vergleich zur Messung unter Standardbadlösung (3).

5. Diskussion

5.1 Pharmakologie der BZD-Bindungsstelle

5.1.1 Überblick

Die BZD-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor erfordert die Interaktion der α - und der γ -UE. Die bisher identifizierten α -UE (α 1-6) und γ -UE (γ 1-3) ermöglichen eine enorme Vielfalt an UE-Kompositionen der BZD-Bindungsstelle. Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnten schon von anderen Arbeitsgruppen bestimmte Aminosäuren identifiziert werden, die eine wichtige Funktion für die BZD-Bindungsstelle haben. Dazu zählen im Bereich der α 1-UE die Aminosäuren H101, Y161, T206 und Y209 und im Bereich der γ 2-UE die Aminosäuren F77 und M130 (Buhr *et al.*, 1996; Sigel, 2002).

Die meisten GABA_A-Rezeptoren im ZNS sind aus folgenden UE aufgebaut: α 1 β 2 γ 2 (Luscher *et al.*, 2011), wohingegen die γ 1-UE nur in einem kleinen Anteil an Rezeptoren (5 %) zu finden ist (Benke *et al.*, 1996).

Besonders der TMN des Hypothalamus weist eine höhere Dichte an γ 1-UE exprimierenden GABA_A-Rezeptoren auf und stand daher im Fokus der Experimente. Die γ 2-UE ist die am häufigsten vorkommende und am besten charakterisierte γ -UE der GABA_A-Rezeptoren im ZNS (Benke *et al.*, 1996). Vorangegangene Studien über die UE-Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren im Hypothalamus ergaben, dass die γ 3-UE hier nicht repräsentiert ist (Sergeeva *et al.*, 2002). Zum gleichen Ergebnis führten die molekularbiologischen Experimente dieser Arbeit.

Da die funktionelle Relevanz der γ 1-UE in bisherigen Studien wenig Beachtung fand und selektive Modulatoren dieser UE nicht verfügbar sind, wurden DMCM, Zolpidem, Flumazenil und Midazolam als bekannte Modulatoren der BZD-Bindungsstelle auf diese Eigenschaft hin getestet. Khom *et al.* (2006) berichteten zwar, dass das Pyrazolopyridin CGS 20625 der effizienteste positive Modulator von γ 1-UE exprimierenden α 1 β 2 γ 1-GABA_A-Rezeptoren ist. Jedoch untersuchte diese Arbeitsgruppe keine Rezeptoren mit β 1-UE, die die dominierende β -UE im TMN ist (Sergeeva *et al.*, 2010). CGS 20625 zeigte an

5. Diskussion

histaminergen Neuronen eine deutlich geringere Wirksamkeit als in rekombinanten $\alpha 1\beta 2\gamma$ -Rezeptoren (May *et al.*, 2013).

Die elektrophysiologischen MEA-Messungen und der Einsatz des Mäusestammes mit der Mutation $\gamma 2F77I$ dienten als Werkzeug für diese Untersuchungen. Die $\gamma 1$ -UE weist andere Aminosäuren (I79 und L132) an der analogen Position F77 und M130 zur $\gamma 2$ -UE auf, was die geringere Modulation durch BZD-Agonisten erklären könnte (May *et al.*, 2013).

Eine entscheidende Rolle für die pharmakologische Modulation der BZD-Bindungsstelle scheint, neben der entsprechenden α -UE, dabei die Aminosäure an Position 77 der $\gamma 2$ -UE zu spielen (Wingrove *et al.*, 1997).

Diese Untersuchung belegt mittels Mausgenetik, elektrophysiologischen Ableitungen von Netzwerkaktivität und Einzelzell-RT-PCR die funktionelle Expression von hypothalamischen GABA_A-Rezeptoren, die die $\gamma 1$ -UE enthalten.

5.1.2 DMCM

In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen an Einzelzellen wirkte DMCM 10 μ M in den durchgeführten Experimenten als positiver Modulator an $\gamma 2F77I$ -Kulturen und als negativer Modulator an WT-Kontrollen. Bemerkenswert ist außerdem die deutliche Desynchronisation des Netzwerkes nach DMCM-Applikation in $\gamma 2F77I$ -Kulturen, die möglicherweise über die $\gamma 1$ -UE vermittelt wird. Diese Vermutung bestätigte sich, da DMCM 10 μ M seine positiv modulatorische Wirkung nach Behandlung der Kulturen mit $\gamma 1$ -siRNA weitgehend einbüßte (May *et al.*, 2013). Diese Schlussfolgerung lässt sich zudem auch aus den Versuchen von Puia *et al.* (1991) ableiten, die feststellten, dass DMCM an $\gamma 1$ -UE exprimierenden GABA_A-Rezeptoren in neugeborenen Ratten ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$ bzw. $\alpha 2\beta 1\gamma 1$) einen positiv modulatorischen Effekt aufweist. Die Experimente dieser Arbeit wurden zwar an Mäusekulturen durchgeführt, da die Gensequenz der $\gamma 1$ -UE aber zu 98 % mit der der Ratte übereinstimmt (Wang *et al.*, 1998), lassen sich die Ergebnisse vergleichen. Auch der Aspekt, dass die Expression der $\gamma 1$ -UE im Hypothalamus höher ist als in anderen Regionen des

5. Diskussion

ZNS (Wisden *et al.*, 1992; Huang & Dillon, 2002; Sergeeva *et al.*, 2002) spricht dafür, dass dieser Effekt von DMCM auf das neuronale Netzwerk evtl. durch das Vorhandensein und die Funktion der γ 1-UE bedingt ist.

Die Quantifizierung der γ 1- und γ 2-UE enkodierender mRNA in WT und KI-Kulturen zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Expressionslevels (May *et al.*, 2013). Diese molekularbiologischen Experimente stellten eine wichtige Voraussetzung dar, um die Ergebnisse der Transfektionsversuche mit γ 1-siRNA richtig interpretieren zu können. Die erfolgreiche Suppression der γ 1-UE nach siRNA-Behandlung wurde mit Hilfe der qRT-PCR gesichert.

Durch den si-RNA basierten *knock-down* der γ 1-UE sollte außerdem überprüft werden, ob die Modulation durch DMCM auch wirklich der γ 1-UE zuzuschreiben ist. Damit ließe sich eine Aussage über die funktionelle Bedeutung der γ 1-UE treffen. Nach Einbringen der γ 1-siRNA nahm die Synchronisation (Anstieg von Cohen's Kappa) in γ 2F77I-Kulturen zu, während diese in Kontrollkulturen, die nur das Transfektionsmedium erhielten, eher abnahm. Diese Versuche weisen auf eine Rolle der γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors für die Netzwerksynchronisation hin. Eine verstärkte Expression der γ 1-UE könnte damit eine Abnahme des gleichgerichteten Feuerns der Neurone bewirken. die Molekularbiologischen Untersuchungen, die die Expression der verschiedenen GABA_A-Rezeptor-UE verglichen, zeigten allerdings keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der γ 2-UE und der γ 1-UE zwischen WT- und KI- (γ 2F77I) Neuronen (Kletke *et al.*, 2013).

Das Transfizieren von neuronalen Primärkulturen stellte eine besondere Herausforderung dar, da die Transfektionsrate von postmitotisch neuronalen Zellen gering ist, das Einbringen eines Transfektionsmediums selbst Wirkungen haben kann und nur ein transienter *knock-down* des Proteins erfolgt (Davidson *et al.*, 2004). Die Kulturen hatten im Transfektionsmedium eine kürzere Lebensdauer als jene im üblichen Kulturmedium. Auch andere Arbeitsgruppen bestätigen die Erfahrung, dass das Transfektionsmedium eine schädliche Wirkung auf die Zellen ausübt (Krichevsky & Kosik, 2002). In unseren Experimenten blieben die auf MEA wachsenden Neuronen im

5. Diskussion

Transfektionsmedium (bis zur 5 Tage Inkubation) erhalten und aktiv, was nur elektrophysiologisch getestet werden kann. Die Aktivitätsänderung im Transfektionsmedium in den durchgeführten Experimenten war minimal und nicht signifikant.

Strittig ist, ob der positiv modulierende Effekt von DMCM tatsächlich über die γ 1-UE vermittelt wird, oder nicht vielmehr über die „Loreclezole-Bindungsstelle“ im Bereich der β 2/ β 3-UE, wie es Stevenson *et al.* (1995) postulierten. Nur eine einzige Aminosäure der β 2 bzw. β 3-UE (β 2: Asn 265, β 3: Asn 265) determiniert die Loreclezole-Bindungsstelle, wohingegen die β 1-UE, die an dieser Stelle Serin aufweist, insensitiv gegenüber Loreclezole ist (Stevenson *et al.*, 1995; Belelli *et al.*, 1997). Auch Etomidat, ein klinisch häufig eingesetztes Hypnotikum, entfaltet seine Wirkung über die Aminosäure Asparagin an Position 265 der β 2/ β 3-UE (Hill-Venning *et al.*, 1997). GABA_A-Rezeptoren von Mäusen mit einer Mutation der β 3-UE (N265M, Asparagin mutiert zu Methionin) werden nicht mehr durch Etomidat potenziert und bieten die Möglichkeit die DMCM-Wirkung in diesem Tierstamm zu testen. Tatsächlich zeigte sich bei diesen Mäusen, dass erst höhere Etomidat-Konzentrationen (5 μ M und 10 μ M) die Feuerrate der Kulturen hemmen. Die Prämisse, dass die Mutation auch wirklich exprimiert ist, wurde damit erfüllt.

Der DMCM-Effekt ließ hinsichtlich der Feuerrate und der Netzwerksynchronisation keinen signifikanten Unterschied zwischen β 3HT- β 3KI-Mäusen und γ 2F77I-Mäusen erkennen. Die Hypothese, dass die Loreclezole-Bindungsstelle für den positiv modulatorischen Effekt von DMCM verantwortlich sein könnte, lässt sich auf Grundlage der durchgeführten Experimente nicht belegen. Stattdessen könnte die γ 1-UE eine bisher wenig beachtete Rolle für die pharmakologischen Eigenschaften des GABA_A-Rezeptors, insbesondere die BZD-Bindungsstelle, spielen. Versuche an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mit α 2-, β 3- und γ 2F77I-UE werden durch DMCM 10 μ M und 100 μ M potenziert (Kletke and Sergeeva, unpublished), wohingegen analoge Rezeptoren mit β 1-UE keine positive Modulation durch DMCM aufweisen. Die Tatsache, dass histaminerge Neurone häufiger die β 1-UE aufweisen als die β 3-UE (Sergeeva *et al.*, 2010; Yanovsky *et al.*, 2012),

5. Diskussion

könnte daher auch das Fehlen des positiv modulatorischen Effekts von DMCM erklären (May *et al.*, 2013).

Interessant und aufschlussreich zur genaueren Klärung der Frage, welche Untereinheiten für den positiv modulatorischen DMCM-Effekt notwendig sind, wären Versuche mit Tieren, die eine doppelte Mutation $\beta 3N265M$ und $\gamma 2F77I$ tragen.

Möglich wäre auch, dass der positiv modulierende Effekt weder auf die $\beta 3N265M$ - noch der $\gamma 2F77I$ Mutation zurückzuführen ist, sondern auf das Vorkommen der $\gamma 3$ -UE. In TMN Neuronen wurde diese UE aber bisher nicht detektiert und scheint daher eine untergeordnete Rolle für die BZD-Bindungsstelle zu spielen (Sergeeva *et al.*, 2010; Kletke *et al.*, 2013).

5.1.3 Zolpidem

Der Effekt von Zolpidem wurde ebenfalls in KI ($\gamma 2F77I$)- und WT-Kulturen untersucht. Bekannt ist, dass die Punktmutation $\gamma 2F77I$ zu einem enormen Affinitätsverlust von Zolpidem am GABA_A-Rezeptor führt (Wingrove *et al.*, 1997; Ogris *et al.*, 2004) bzw. die Zolpidem.-Wirkung in diesen Rezeptoren fast aufgehoben ist (Ramerstorfer *et al.*, 2010). Zolpidem 1 μM senkt in geringem Ausmaß die Feuerrate der WT-Kulturen. Der Unterschied zu den KI-Kulturen ist aber hinsichtlich keines Parameters signifikant.

Die Bedeutung der α -UE für die Zolpidemwirkung ist auch schon in anderen Regionen des ZNS beschrieben und untersucht worden. Experimente an $\alpha 1$ -UE-exprimierenden cerebellären Purkinje-Neuronen ergaben, dass Zolpidem 30 nM diese potenziert, wogegen $\alpha 2$ -UE-exprimierende striatale Neurone, erst ab 200 nM potenziert werden (Itier *et al.*, 1996). Rekombinante Rezeptoren, die aus $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -UE aufgebaut sind, sollen nicht durch Zolpidem moduliert werden (Kletke *et al.*, 2013). Puia *et al.* (1991) stellten jedoch fest, dass Rezeptoren mit $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -UE stärker durch Zolpidem moduliert werden als Rezeptoren mit $\alpha 2$ -UE.

Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass Zolpidem insbesondere $\alpha 1$ -UE tragende Rezeptoren potenziert. Diese $\alpha 1$ -Präferenz von Zolpidem könnte

5. Diskussion

daher auch erklären, warum der hemmende Effekt auf die Feuerrate des Netzwerkes nur minimal ausfällt. Die $\alpha 1$ -UE kommt v.a. an synaptischen GABA_A-Rezeptoren vor und vermittelt die schnelle phasische Inhibition. Vermutlich hat diese aber einen geringeren Einfluss auf die Feuerrate der Neurone als die tonische Inhibition (Farrant & Nusser, 2005). Entscheidend für die tonische Inhibition sind niedrige Konzentrationen an GABA-Molekülen, die in den Extrazellulärraum diffundieren, anstatt rasch in die Präsynapse oder in Astrozyten aufgenommen zu werden. Extrasynaptische Rezeptoren exprimieren hauptsächlich die $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -UE und sind weitgehend insensitive gegenüber Benzodiazepinen (Farrant & Nusser, 2005; Belelli *et al.*, 2009), **Abb. 30**. Im TMN des Hypothalamus kommt die $\alpha 4$ -UE jedoch nicht vor (Sergeeva *et al.*, 2002). Die $\alpha 6$ -UE kommt nur in Körnerzellen des Cerebellums vor, sodass hier der Effekt der tonischen Inhibition allenfalls über die $\alpha 5$ -UE vermittelt werden könnte, die ebenfalls extrasynaptisch lokalisiert ist.

Zolpidem hat bekanntermaßen eine deutlich geringere Affinität zur $\alpha 5$ -UE im Vergleich zu $\alpha 2$ - oder $\alpha 3$ -UE tragenden GABA_A-Rezeptoren (Pritchett & Seeburg, 1990). Eine Modulation dieser extrasynaptischen Rezeptoren durch das Imidazopyridin Zolpidem ist unwahrscheinlich. Daher spielt die $\alpha 5$ -UE vermutlich eine untergeordnete Rolle für die Zolpidemwirkung im posterioren Hypothalamus. Weitere Studien mit Mutation der $\alpha 1$ -UE könnten die Bedeutung dieser UE für die BZD-Bindungsstelle im TMN entschlüsseln.

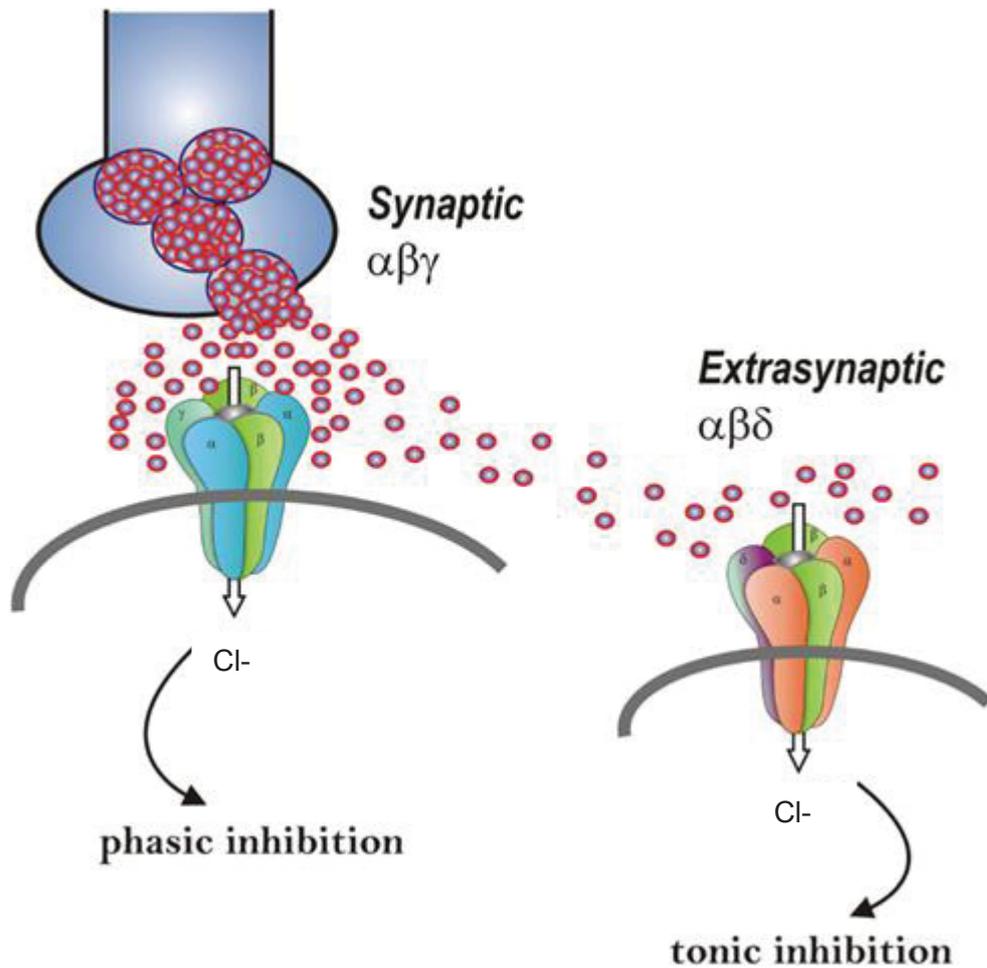


Abb. 30 modifiziert nach (Reddy, 2011) : Aufbau und Aktivierung synaptischer und extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren.

Abkürzungen: UE: Untereinheit

Nach Freisetzung von GABA-Molekülen aus den Vesikeln einer Nervenendigung diffundiert der Transmitter in den synaptischen Spalt. Die synaptischen GABA_A-Rezeptoren vermitteln die schnelle phasische Inhibition und werden durch hohe GABA-Konzentrationen im synaptischen Spalt aktiviert. Sie sind aus α-β-γ-UE aufgebaut, wobei hauptsächlich die α1-UE für die Pharmakologie von Zolpidem im TNM verantwortlich ist. Extrasynaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren vermitteln die tonische Inhibition und werden durch niedrigere GABA-Konzentrationen aktiviert. Sie setzen sich i.d.R. aus α4-UE bzw. α6-UE zusammen. Im TNM kommt stattdessen die α5-UE vor. Die γ-UE ist in extrasynaptischen Rezeptoren durch die δ-UE ersetzt.

Hinsichtlich der drei möglichen γ-UE des GABA_A-Rezeptors, die die Zolpidem Wirkung vermitteln, könnte neben der γ2-UE eventuell die γ3-UE relevant sein. Der Ersatz der γ2-UE bzw. der γ1-UE durch die γ3-UE kann einen Affinitätsverlust der Rezeptoren für Agonisten bewirken, wobei der Effekt von Antagonisten oder negativen Modulatoren erhalten bleibt (Herb *et al.*, 1992). In den untersuchten Einzelzellen wurde die γ3-UE molekularbiologisch jedoch

5. Diskussion

nicht nachgewiesen (Sergeeva *et al.*, 2010; Kletke *et al.*, 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen hingegen vielmehr dafür, dass die γ 1-UE für die Pharmakologie von Zolpidem im TMN wichtig ist.

Einen Einfluss der β 2/ β 3-UE („Lorecelzole-Bindungsstelle“) für die Zolpidem-Wirkung haben verschiedene Gruppen bereits ausgeschlossen (Buhr *et al.*, 1997; Ramerstorfer *et al.*, 2010; Kletke *et al.*, 2013).

Der Effekt von Zolpidem an KI-Neuronen erscheint insgesamt nicht selektiv genug um Zolpidem als pharmakologisches *tool* zur Detektion der γ 1-UE einzusetzen. Im Rahmen einer HE sollte es möglichst sparsam als Medikament eingesetzt werden, da es auf Grund der beschriebenen physiologischen Rezeptoraffinitäten den erhöhten GABAergen Tonus nicht antagonisiert. Stattdessen könnte Zolpidem durch Zunahme der phasischen Inhibition die Symptome dieses Krankheitsbildes sogar noch verstärken, wie in einem Fallbericht beschrieben (da Silva *et al.*, 2008).

Eine bemerkenswerte Beobachtung ist, dass sowohl DMCM als auch Zolpidem zu einer Abnahme der Netzwerksynchronisation der KI-Neurone (γ 2F77I) führen, obwohl sie ansonsten entgegengesetzte Effekte an der WT BZD-Bindungsstelle haben: DMCM, ein inverser Agonist und Zolpidem, ein reiner Agonist an der BZD-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors. DMCM zeigt nach der Mutation γ 2F77I keine negative Modulation mehr, aber eine zolpidemähnliche positive allosterische Modulation des GABA_A-Rezeptors. Das erklärt auch die sedative Wirkung von DMCM in KI-Mäusen im Gegensatz zur prokonvulsiven Wirkung in WT (Leppa *et al.*, 2005).

5.1.4 Flumazenil

Flumazenil, das auf Grund seines Einsatzes als Antagonist an der BZD-Bindungsstelle im Rahmen der HE therapeutisch Anwendung findet, hat keinen Effekt auf die Feuerrate und die Netzwerksynchronisation von γ 2F77I-KI-Kulturen im TMN. Zusätzlich gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und KI-Kulturen. Auch nach Transfektion der Kulturen mit γ 1-siRNA ergeben sich keine Veränderungen zu den Kontrollexperimenten. Bekannt ist,

5. Diskussion

dass Flumazenil $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren (Ramerstorfer *et al.*, 2010), $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ -Rezeptoren (Khom *et al.*, 2006) und $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren (Malherbe *et al.*, 1990) potenziert. Der modulierende Effekt von Flumazenil 10 μM am GABA_A -Rezeptor scheint unabhängig von der $\gamma 2\text{F77I}$ -Mutation sowie der $\gamma 1$ -UE zu sein.

Vielmehr könnte der Effekt durch die jeweils exprimierte α -UE bedingt sein, die zusammen mit der γ -UE die BZD-Bindungsstelle bildet. Im TMN dominieren die $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$ -UE (Sergeeva *et al.*, 2002), wobei die $\alpha 5$ -UE funktionell eine untergeordnete Rolle zu haben scheint. Da alle TMN-Kulturen einen allenfalls geringen Anstieg der Feuerrate nach Flumazenil 10 μM aufweisen, scheint diese Substanz die dort überwiegenden Rezeptoren $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ bzw. $\alpha 2\beta 3\gamma 1$ nur wenig zu modulieren. Ramerstorfer *et al.* (2010) zeigten aber, dass Flumazenil auch $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ -Rezeptoren potenziert (120% im Vergleich zur Kontrolle).

Welche Rezeptoren Flumazenil in höherem Ausmaß potenziert, bleibt weiter ungeklärt. Der Flumazenil-Effekt könnte damit am ehesten über die $\alpha 1$ -UE vermittelt werden bzw. über $\alpha 1\beta 1$ -Rezeptoren (Malherbe *et al.*, 1990).

5.1.5 Midazolam

Das klassische BZD Midazolam potenziert extrasynaptische GABA_A -Rezeptoren im Hippocampus und supprimiert damit die Feuerrate der Neurone (Yeung *et al.*, 2003). Die Experimente an hypothalamischen Neuronen kommen zum gleichen Ergebnis: Die Feuerrate der TMN-Neurone wird in WT-Kulturen durch Midazolam gehemmt. In Kulturen mit der Punktmutation $\gamma 2\text{F77I}$ ist dieser Effekt hingegen deutlich abgeschwächt. Die Wirkung von Midazolam erfordert damit das Vorhandensein der $\gamma 2$ -UE an der BZD-Bindungsstelle. Mäuse, die die Mutation $\gamma 2\text{F77I}$ aufweisen, könnten damit als Modell dienen um die Pathophysiologie der HE unter Midazolamanwendung zu studieren. Als selektiver Modulator der $\gamma 1$ -UE lässt sich Midazolam aber nicht heranziehen.

5.2 Anstieg der Feuerrate nach $\gamma 1$ -siRNA

Eine bemerkenswerte Beobachtung war der vorübergehende signifikante Anstieg der Feuerrate in den mit $\gamma 1$ -si-RNA transfizierten Kulturen. Dieser Befund zeigt, dass $\gamma 1$ -UE enthaltende GABA_AR höchstwahrscheinlich extrasynaptisch lokalisiert sind und das Feuern hypothalamischer Neurone unterdrücken. Ein translationaler Block von $\gamma 1$ vermindert die Zahl dieser Rezeptoren und disinhibiert die Netzwerkaktivität. GABA_AR des $\alpha 1\beta 2$ -Typs dagegen sind eher synaptisch lokalisiert, wo sie die Feuerrate kaum beeinflussen, selbst bei Potenzierung durch Zolpidem (siehe oben). Deshalb verstärkt unter pathologischen Bedingungen wie Alkoholentzug die erhöhte $\gamma 1$ -Expression den GABAergen Tonus (Cagetti *et al.*, 2003).

Da es im Rahmen der HE zu einer Dominanz der inhibierenden Neurotransmitter zu kommen scheint, ist es von klinischer Relevanz, Substanzen zu finden, die dieses Ungleichgewicht aufheben könnten. DMCM, ein potentieller Modulator des GABA_A-Rezeptors, spielt als Therapeutikum keine Rolle. Zum einen auf Grund mangelnder Selektivität, zum anderen, da es die Gefahr birgt, Konvulsionen auszulösen (Petersen, 1983; Maubach, 2003).

5.3 Zellkulturen und MEA-System

Bei allen durchgeführten Experimenten gilt es zu bedenken, dass es sich um *in vitro*-Studien an Zellkulturen von neugeborenen Mäusen handelt, die nur teilweise die humanen physiologischen und pathophysiologischen Gegebenheiten widerspiegeln. Auch wenn die Übertragbarkeit auf den Menschen und dessen komplexes Nervensystem immer begrenzt ist und kritisch beurteilt werden sollte, so hat dieses experimentelle Procedere aus verschiedenen Gründen seine Berechtigung: Zelluläre Grundlagenforschung beim Menschen ist nur sehr beschränkt akzeptabel oder möglich. Die Herstellung neuronaler Primärkulturen von Nagern ist darüber hinaus ein etabliertes, breit angewendetes Verfahren. Das direkte Kultivieren der Zellen auf MEA-Chips erlaubt es außerdem, ohne weitere Manipulation an den vulnerablen Neuronen, deren elektrische Aktivität zu messen. Ein großer Vorteil besteht auch darin, dass extrazelluläre Potentiale mehrerer Zellen gleichzeitig

5. Diskussion

und mit guter zeitlicher und räumlicher Auflösung abgeleitet werden können. Der Einfluss verschiedener pharmakologischer Substanzen auf das Netzwerk kann direkt und im longitudinalen Verlauf beobachtet werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, über einzelne Elektroden gezielt zu stimulieren. In unserer Arbeitsgruppe wurden diese MEA-Ergebnisse durch Versuche an akut isolierten Neuronen aus Nager-Gehirnen (ex vivo) ergänzt.

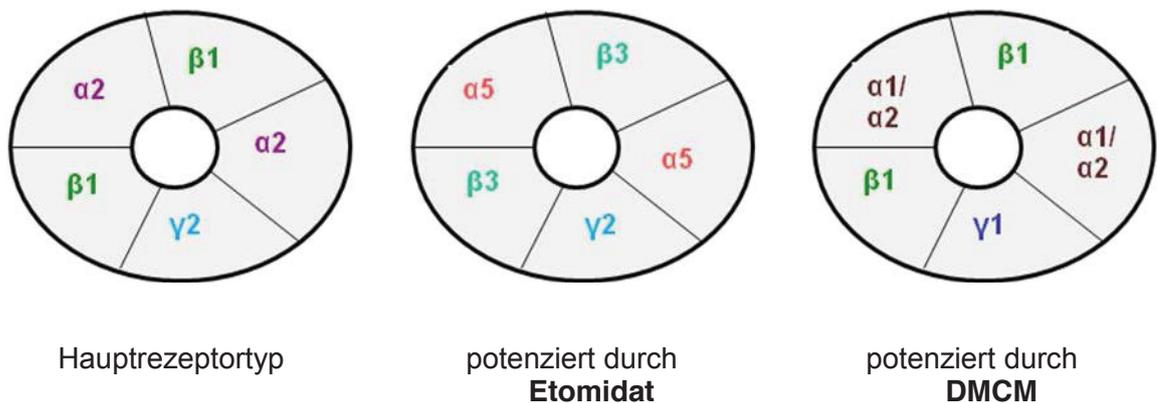


Abb. 31: Vielfalt der GABA_A-Rezeptoren im TMN.

Der am häufigsten exprimierte Rezeptor im TMN enthält die $\alpha 2$ -, $\beta 1$ -, $\gamma 2$ -UE. Etomidat potenziert hauptsächlich Rezeptoren, die die $\alpha 5$ -, $\beta 3$, $\gamma 2$ -UE aufweisen. Der positiv modulatorische Effekt von DMCM erfordert die $\alpha 1/2$ -, $\beta 1$, $\gamma 1$ -UE.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener klinisch relevanter Liganden die BZD-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors im tuberomamillären Kern des hinteren Hypothalamus analysiert. Dieser stellt einen wichtigen Angriffspunkt für zahlreiche Medikamente wie z.B. Anxiolytika, Sedativa und Anästhetika dar. Entscheidend für die Wirkung der Benzodiazepine ist die hochaffine BZD-Bindungsstelle, die neben einer α -UE die Aminosäure an Position 77 der $\gamma 2$ -UE erfordert. Elektrophysiologische und molekularbiologische Studien an hypothalamischen Neuronen sollten diese weiter charakterisieren und den Fokus auf die bisher wenig erforschte $\gamma 1$ -UE lenken.

Eine wichtige Funktion des TMN ist die Steuerung der Vigilanz. Die GABAerge Inhibition vermindert den Tonus der wachaktiven TMN-Neurone und spielt daher eine wichtige Rolle für die Schlaf-Wach-Regulation. Besonderes

5. Diskussion

Interesse galt der bisher wenig erforschten γ 1-UE an der BZD-Bindungsstelle und ihrer Bedeutung für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie, die u.a. durch einen erhöhten GABAergen Tonus gekennzeichnet ist. Ein besonderes Augenmerk lag außerdem auf der Charakterisierung von Substanzen, die die GABAerge Transmission im Zuge dieses Krankheitsbildes beeinflussen können.

DMCM 10 μ M hat in gewissem Umfang einen positiv modulierenden Effekt auf GABA_A-Rezeptoren im TMN. Dieser scheint am ehesten über die γ 1-UE vermittelt zu werden und nicht über die Loreclezole-Bindungsstelle an der β 2/ β 3-UE. Zur pharmakologischen Identifizierung der γ 1-UE kann DMCM begrenzt eingesetzt werden. Als Therapeutikum lässt es sich auf Grund seiner epileptogenen Wirkung aber nicht anwenden.

Weder Zolpidem 1 μ M noch Flumazenil 10 μ M zeigen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Feuerrate oder der Synchronisation der Netzwerke zwischen WT- und γ 2F77I- Zellen. Die Modulation durch diese Substanzen scheint damit unabhängig von der Aminosäure F77 der γ 2-UE zu sein. Zolpidem 1 μ M und Flumazenil 10 μ M eignen sich daher nicht zur Detektion der γ 1-UE. Bis dato wurde noch kein ausreichend selektiver Modulator der γ 1-UE gefunden.

Die Midazolam-Wirkung erfordert die hochaffine BZD-Bindungsstelle, da der hemmende Effekt auf die Netzwerkaktivität in γ 2F77I-Neuronen abgeschwächt ist. Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine mit Midazolam durchgeführte Anästhesie die Symptome einer subklinischen bzw. fortgeschrittenen HE verstärken kann (Assy *et al.*, 1999; Haq *et al.*, 2012). Mäuse mit der Mutation γ 2F77I könnten somit zur Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge der HE unter Einsatz von Midazolam herangezogen werden.

Die *knock-down*-Versuche haben eine bisher unerkannte Rolle der γ 1-UE des GABA_A-Rezeptors für die Netzwerksynchronisation und die Feuerrate der Neurone im Hypothalamus aufgezeigt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um genauere Informationen hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung auch in anderen Hirnregionen zu erhalten. Ein *knock-out*-Maus-Modell für die γ 1-UE sollte in Zukunft generiert und untersucht werden. Von

5. Diskussion

pathophysiologischer Bedeutung könnte die γ 1-UE neben der HE auch für die Alkoholkrankheit sein (Cagetti *et al.*, 2003) sein.

Die genaue Aufklärung der pharmakologischen Eigenschaften der hypothalamischen BZD-Bindungsstelle ist notwendig, um in Zukunft metabolische Erkrankungen und Störungen des Schlafverhaltens gezielt zu therapieren.

6. Literaturverzeichnis

- Ahboucha, S. & Butterworth, R.F. (2004) Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint. *Metabolic brain disease*, **19**, 331-343.
- Ahboucha, S. & Butterworth, R.F. (2005) Role of endogenous benzodiazepine ligands and their GABA-A-associated receptors in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, **20**, 425-437.
- Airaksinen, M.S., Alanen, S., Szabat, E., Visser, T.J. & Panula, P. (1992) Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: comparison of rat, mouse, and guinea pig. *The Journal of comparative neurology*, **323**, 103-116.
- Albrecht, J. & Norenberg, M.D. (2006) Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*, **44**, 788-794.
- Als-Nielsen, B., Gluud, L.L. & Gluud, C. (2004) Benzodiazepine receptor antagonists for hepatic encephalopathy. *Cochrane database of systematic reviews*, CD002798.
- Assy, N., Rosser, B.G., Grahame, G.R. & Minuk, G.Y. (1999) Risk of sedation for upper GI endoscopy exacerbating subclinical hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Gastrointestinal endoscopy*, **49**, 690-694.
- Baraldi, M., Avallone, R., Corsi, L., Venturini, I., Baraldi, C. & Zeneroli, M.L. (2009) Natural endogenous ligands for benzodiazepine receptors in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, **24**, 81-93.
- Barbaro, G., Di Lorenzo, G., Soldini, M., Giancaspro, G., Bellomo, G., Belloni, G., Grisorio, B., Annese, M., Bacca, D., Francavilla, R. & Barbarini, G. (1998) Flumazenil for hepatic encephalopathy grade III and IVa in patients with cirrhosis: an Italian multicenter double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Hepatology*, **28**, 374-378.
- Basile, A.S., Gammal, S.H., Mullen, K.D., Jones, E.A. & Skolnick, P. (1988) Differential responsiveness of cerebellar Purkinje neurons to GABA and benzodiazepine receptor ligands in an animal model of hepatic encephalopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **8**, 2414-2421.
- Basile, A.S. & Jones, E.A. (1997) Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, **25**, 1303-1305.
- Bassett, M.L., Mullen, K.D., Scholz, B., Fenstermacher, J.D. & Jones, E.A. (1990) Increased brain uptake of gamma-aminobutyric acid in a rabbit model of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, **98**, 747-757.

6. Literaturverzeichnis

- Baumann, S.W., Baur, R. & Sigel, E. (2002) Forced subunit assembly in $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 46020-46025.
- Beleboni, R.O., Carolino, R.O., Pizzo, A.B., Castellan-Baldan, L., Coutinho-Netto, J., dos Santos, W.F. & Coimbra, N.C. (2004) Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cellular and molecular neurobiology*, **24**, 707-728.
- Belelli, D., Casula, A., Ling, A. & Lambert, J.J. (2002) The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology*, **43**, 651-661.
- Belelli, D., Harrison, N.L., Maguire, J., Macdonald, R.L., Walker, M.C. & Cope, D.W. (2009) Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 12757-12763.
- Belelli, D., Lambert, J.J., Peters, J.A., Wafford, K. & Whiting, P.J. (1997) The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 11031-11036.
- Benke, D., Honer, M., Michel, C. & Mohler, H. (1996) GABAA receptor subtypes differentiated by their gamma-subunit variants: prevalence, pharmacology and subunit architecture. *Neuropharmacology*, **35**, 1413-1423.
- Biosystems, P. (1998) *GeneAmp5700, Sequence Detection System, User's Manual*.
- Bismuth, M., Funakoshi, N., Cadranel, J.F. & Blanc, P. (2011) Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to therapeutic management. *European journal of gastroenterology & hepatology*, **23**, 8-22.
- Borg, J., Warter, J.M., Schlienger, J.L., Imler, M., Marescaux, C. & Mack, G. (1982) Neurotransmitter modifications in human cerebrospinal fluid and serum during hepatic encephalopathy. *Journal of the neurological sciences*, **57**, 343-356.
- Bormann, J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, **21**, 16-19.
- Bormann, J. & Kettenmann, H. (1988) Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 9336-9340.
- Bosoi, C.R. & Rose, C.F. (2009) Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metabolic brain disease*, **24**, 95-102.

6. Literaturverzeichnis

- Bovolin, P., Santi, M.R., Puia, G., Costa, E. & Grayson, D. (1992) Expression patterns of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNAs in primary cultures of granule neurons and astrocytes from neonatal rat cerebella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 9344-9348.
- Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G. & Soares, J.C. (2003) GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular psychiatry*, **8**, 721-737, 715.
- Buckingham, S.D., Esmaeili, B., Wood, M. & Sattelle, D.B. (2004) RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Human molecular genetics*, **13 Spec No 2**, R275-288.
- Buhr, A., Baur, R., Malherbe, P. & Sigel, E. (1996) 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. *Molecular pharmacology*, **49**, 1080-1084.
- Buhr, A., Baur, R. & Sigel, E. (1997) Subtle changes in residue 77 of the gamma subunit of alpha1beta2gamma2 GABAA receptors drastically alter the affinity for ligands of the benzodiazepine binding site. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 11799-11804.
- Buhr, A. & Sigel, E. (1997) A point mutation in the gamma2 subunit of gamma-aminobutyric acid type A receptors results in altered benzodiazepine binding site specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 8824-8829.
- Butterworth, R.F. (1996) Taurine in hepatic encephalopathy. *Advances in experimental medicine and biology*, **403**, 601-606.
- Butz, M., Timmermann, L., Braun, M., Groiss, S.J., Wojtecki, L., Ostrowski, S., Krause, H., Pollok, B., Gross, J., Sudmeyer, M., Kircheis, G., Haussinger, D. & Schnitzler, A. (2010) Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica*, **122**, 27-35.
- Cagetti, E., Liang, J., Spigelman, I. & Olsen, R.W. (2003) Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Molecular pharmacology*, **63**, 53-64.
- Cash, W.J., McConville, P., McDermott, E., McCormick, P.A., Callender, M.E. & McDougall, N.I. (2010) Current concepts in the assessment and treatment of hepatic encephalopathy. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, **103**, 9-16.
- Cauli, O., Mansouri, M.T., Agusti, A. & Felipo, V. (2009a) Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology*, **136**, 1359-1367, e1351-1352.

6. Literaturverzeichnis

- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Llansola, M., Mansouri, M.T. & Felipo, V. (2009b) Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *Journal of neuroscience research*, **87**, 1369-1374.
- Chen, Y., Cheng, G. & Mahato, R.I. (2008) RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharmaceutical research*, **25**, 72-86.
- Cope, D.W., Halbsguth, C., Karayannis, T., Wulff, P., Ferraguti, F., Hoeger, H., Leppa, E., Linden, A.M., Oberto, A., Ogris, W., Korpi, E.R., Sieghart, W., Somogyi, P., Wisden, W. & Capogna, M. (2005) Loss of zolpidem efficacy in the hippocampus of mice with the GABAA receptor gamma2 F771 point mutation. *The European journal of neuroscience*, **21**, 3002-3016.
- Cope, D.W., Wulff, P., Oberto, A., Aller, M.I., Capogna, M., Ferraguti, F., Halbsguth, C., Hoeger, H., Jolin, H.E., Jones, A., McKenzie, A.N., Ogris, W., Poeltl, A., Sinkkonen, S.T., Vekovischeva, O.Y., Korpi, E.R., Sieghart, W., Sigel, E., Somogyi, P. & Wisden, W. (2004) Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Neuropharmacology*, **47**, 17-34.
- Cordoba, J., Cabrera, J., Lataif, L., Penev, P., Zee, P. & Blei, A.T. (1998) High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology*, **27**, 339-345.
- Crestani, F., Low, K., Keist, R., Mandelli, M., Mohler, H. & Rudolph, U. (2001) Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Molecular pharmacology*, **59**, 442-445.
- da Silva, V.C., Bittencourt, P.L., Pinho, S., Cavalcanti, A.R. & Zollinger, C.C. (2008) Delayed-onset hepatic encephalopathy induced by zolpidem: a case report. *Clinics*, **63**, 565-566.
- Davidson, T.J., Harel, S., Arboleda, V.A., Prunell, G.F., Shelanski, M.L., Greene, L.A. & Troy, C.M. (2004) Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 10040-10046.
- Desai, R., Ruesch, D. & Forman, S.A. (2009) Gamma-amino butyric acid type A receptor mutations at beta2N265 alter etomidate efficacy while preserving basal and agonist-dependent activity. *Anesthesiology*, **111**, 774-784.
- Dorsett, Y. & Tuschl, T. (2004) siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, **3**, 318-329.
- Ericson, H., Kohler, C. & Blomqvist, A. (1991) GABA-like immunoreactivity in the tuberomammillary nucleus: an electron microscopic study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **305**, 462-469.

6. Literaturverzeichnis

- Esmaeili, A., Lynch, J.W. & Sah, P. (2009) GABAA receptors containing gamma1 subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. *Journal of neurophysiology*, **101**, 341-349.
- Farrant, M. & Nusser, Z. (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature reviews. Neuroscience*, **6**, 215-229.
- Fattal, E. & Bochot, A. (2006) Antisense oligonucleotides, aptamers and SiRNA: promises for the treatment of ocular diseases. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*, **81**, 3-4, 5-6.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fleischer, W. (2006) Entwicklung von striatalen Neuronen zu funktionellen Netzwerken in vitro. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Fogel, W.A., Andrzejewski, W. & Maslinski, C. (1991) Brain histamine in rats with hepatic encephalopathy. *Journal of neurochemistry*, **56**, 38-43.
- Fogel, W.A., Michelsen, K.A., Panula, P., Sasiak, K. & Andrzejewski, W. (2001) Cerebral and gastric histamine system is altered after portocaval shunt. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, **52**, 657-670.
- Forman, S.A. (2011) Clinical and molecular pharmacology of etomidate. *Anesthesiology*, **114**, 695-707.
- Gerber, T. & Schomerus, H. (2000) Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Drugs*, **60**, 1353-1370.
- Gross, G.W., Rieske, E., Kreuzberg, G.W. & Meyer, A. (1977) A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. *Neuroscience letters*, **6**, 101-105.
- Grunhage, F., Heller, J., Appenrodt, B., Schmitz, V. & Sauerbruch, T. (2007) [Medical therapy of complications in liver cirrhosis]. *Der Internist*, **48**, 1349-1357.
- Haas, H. & Panula, P. (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, **4**, 121-130.
- Haq, M.M., Faisal, N., Khalil, A., Haqqi, S.A., Shaikh, H. & Arain, N. (2012) Midazolam for sedation during diagnostic or therapeutic upper gastrointestinal endoscopy in cirrhotic patients. *European journal of gastroenterology & hepatology*, **24**, 1214-1218.
- Haussinger, D. (2006a) [Hepatic encephalopathy]. *Praxis*, **95**, 1543-1549.

6. Literaturverzeichnis

- Haussinger, D. (2006b) Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, **43**, 1187-1190.
- Haussinger, D. & Schliess, F. (2008) Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut*, **57**, 1156-1165.
- Herb, A., Wisden, W., Luddens, H., Puia, G., Vicini, S. & Seeburg, P.H. (1992) The third gamma subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 1433-1437.
- Hill-Venning, C., Belelli, D., Peters, J.A. & Lambert, J.J. (1997) Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *British journal of pharmacology*, **120**, 749-756.
- Hoinkes, A. (2005) Auswirkung von Homocystein und seinen Metaboliten Homocysteinsäure und Homocysteinsulphinsäure auf die neuronale Netzwerfunktion. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Huang, R.Q. & Dillon, G.H. (2002) Functional characterization of GABA(A) receptors in neonatal hypothalamic brain slice. *Journal of neurophysiology*, **88**, 1655-1663.
- Itier, V., Depoortere, H., Scatton, B. & Avenet, P. (1996) Zolpidem functionally discriminates subtypes of native GABAA receptors in acutely dissociated rat striatal and cerebellar neurons. *Neuropharmacology*, **35**, 137-145.
- Itzhak, Y., Roig-Cantisano, A., Dombro, R.S. & Norenberg, M.D. (1995) Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain research*, **705**, 345-348.
- Jia, F., Yue, M., Chandra, D., Homanics, G.E., Goldstein, P.A. & Harrison, N.L. (2008a) Isoflurane is a potent modulator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **324**, 1127-1135.
- Jia, F., Yue, M., Chandra, D., Keramidas, A., Goldstein, P.A., Homanics, G.E. & Harrison, N.L. (2008b) Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 106-115.
- Jones, E.A. (2002) Ammonia, the GABA neurotransmitter system, and hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, **17**, 275-281.
- Jones, E.A. & Basile, A.S. (1998) Does ammonia contribute to increased GABA-ergic neurotransmission in liver failure? *Metabolic brain disease*, **13**, 351-360.

6. Literaturverzeichnis

- Jones, E.A., Basile, A.S. & Skolnick, P. (1990) Hepatic encephalopathy, GABA-ergic neurotransmission and benzodiazepine receptor ligands. *Advances in experimental medicine and biology*, **272**, 121-134.
- Jurd, R., Arras, M., Lambert, S., Drexler, B., Siegwart, R., Crestani, F., Zaugg, M., Vogt, K.E., 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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**, 250-252.
- Kahlbrock, N., Butz, M., May, E.S., Brenner, M., Kircheis, G., Haussinger, D. & Schnitzler, A. (2012) Lowered frequency and impaired modulation of gamma band oscillations in a bimodal attention task are associated with reduced critical flicker frequency. *NeuroImage*, **61**, 216-227.
- Karow, T. & Lang-Roth, R. (2007) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. [Selbstverl.], Pulheim.
- Kaslin, J. & Panula, P. (2001) Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of comparative neurology*, **440**, 342-377.
- Khom, S., Baburin, I., Timin, E.N., Hohaus, A., Sieghart, W. & Hering, S. (2006) Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits. *Molecular pharmacology*, **69**, 640-649.
- Kircheis, G. (2007) Hepatische Enzephalopathie. *Gastroenterologe*, **2**, 251-260.
- Kircheis, G., Wettstein, M., Timmermann, L., Schnitzler, A. & Haussinger, D. (2002) Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology*, **35**, 357-366.
- Kletke, O., Gisselmann, G., May, A., Hatt, H. & O, A.S. (2013) Partial Agonism of Taurine at Gamma-Containing Native and Recombinant GABAA Receptors. *PloS one*, **8**, e61733.
- Krichevsky, A.M. & Kosik, K.S. (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 11926-11929.
- Leke, R., Bak, L.K., Iversen, P., Sorensen, M., Keiding, S., Vilstrup, H., Ott, P., Portela, L.V., Schousboe, A. & Waagepetersen, H.S. (2011) Synthesis of neurotransmitter GABA via the neuronal tricarboxylic acid cycle is elevated in rats with liver cirrhosis consistent with a high GABAergic tone in chronic hepatic encephalopathy. *Journal of neurochemistry*, **117**, 824-832.
- Leppa, E., Vekovischeva, O.Y., Linden, A.M., Wulff, P., Oberto, A., Wisden, W. & Korpi, E.R. (2005) Agonistic effects of the beta-carboline DMCM revealed in GABA(A) receptor gamma 2 subunit F77I point-mutated mice. *Neuropharmacology*, **48**, 469-478.

6. Literaturverzeichnis

- Li, X.Q., Dong, L., Liu, Z.H. & Luo, J.Y. (2005) Expression of gamma-aminobutyric acid A receptor subunits alpha1, beta1, gamma2 mRNA in rats with hepatic encephalopathy. *World journal of gastroenterology : WJG*, **11**, 3319-3322.
- Lin, J.S., Anaclet, C., Sergeeva, O.A. & Haas, H.L. (2011) The waking brain: an update. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **68**, 2499-2512.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Longo, M.C., Berninger, M.S. & Hartley, J.L. (1990) Use of Uracil DNA Glycosylase to Control Carry-over Contamination in Polymerase Chain-Reactions. *Gene*, **93**, 125-128.
- Low, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brunig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Rulicke, T., Bluethmann, H., Mohler, H. & Rudolph, U. (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*, **290**, 131-134.
- Lozeva, V., Tuomisto, L., Tarhanen, J. & Butterworth, R.F. (2003) Increased concentrations of histamine and its metabolite, tele-methylhistamine and down-regulation of histamine H3 receptor sites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *Journal of hepatology*, **39**, 522-527.
- Luscher, B., Fuchs, T. & Kilpatrick, C.L. (2011) GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron*, **70**, 385-409.
- Malherbe, P., Draguhn, A., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Mohler, H. (1990) GABAA-receptor expressed from rat brain alpha- and beta-subunit cDNAs displays potentiation by benzodiazepine receptor ligands. *Brain research. Molecular brain research*, **8**, 199-208.
- Manfredsson, F.P., Lewin, A.S. & Mandel, R.J. (2006) RNA knockdown as a potential therapeutic strategy in Parkinson's disease. *Gene therapy*, **13**, 517-524.
- Maubach, K. (2003) GABA(A) receptor subtype selective cognition enhancers. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, **2**, 233-239.
- May, A.C., Fleischer, W., Kletke, O., Haas, H.L. & Sergeeva, O.A. (2013) Benzodiazepine-site pharmacology on GABAA receptors in histaminergic neurons. *British journal of pharmacology*, **170**, 222-232.
- McKernan, R.M., Rosahl, T.W., Reynolds, D.S., Sur, C., Wafford, K.A., Atack, J.R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., Garrett, L., Bristow, L., Marshall, G., Macaulay, A., Brown, N., Howell, O., Moore, K.W., Carling, R.W., Street, L.J., Castro, J.L., Ragan, C.I., Dawson, G.R. & Whiting, P.J. (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nature neuroscience*, **3**, 587-592.

6. Literaturverzeichnis

- Mody, I., De Koninck, Y., Otis, T.S. & Soltesz, I. (1994) Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends in neurosciences*, **17**, 517-525.
- Mohler, H. (2006) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell and tissue research*, **326**, 505-516.
- Morgan, M.Y., Jakobovits, A.W., James, I.M. & Sherlock, S. (1980) Successful use of bromocriptine in the treatment of chronic hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, **78**, 663-670.
- Mülhardt, C. (2009) Der Experimentator : Molekularbiologie/Genomics *Experimentator*. Spektrum, Heidelberg.
- Nett, S.T., Jorge-Rivera, J.C., Myers, M., Clark, A.S. & Henderson, L.P. (1999) Properties and sex-specific differences of GABAA receptors in neurons expressing gamma1 subunit mRNA in the preoptic area of the rat. *Journal of neurophysiology*, **81**, 192-203.
- Nitz, D. & Siegel, J.M. (1996) GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *The American journal of physiology*, **271**, R1707-1712.
- Ogris, W., Poltl, A., Hauer, B., Ernst, M., Oberto, A., Wulff, P., Hoger, H., Wisden, W. & Sieghart, W. (2004) Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Biochemical pharmacology*, **68**, 1621-1629.
- Olsen, R.W. & Sieghart, W. (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, **56**, 141-148.
- Panula, P., Sundvik, M. & Karlstedt, K. (2014) Developmental roles of brain histamine. *Trends in neurosciences*, **37**, 159-168.
- Panula, P., Yang, H.Y. & Costa, E. (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 2572-2576.
- Petersen, E.N. (1983) DMCM: a potent convulsive benzodiazepine receptor ligand. *European journal of pharmacology*, **94**, 117-124.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**, e45.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W. & Sperk, G. (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*, **101**, 815-850.
- Prakash, R. & Mullen, K.D. (2010) Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, **7**, 515-525.

6. Literaturverzeichnis

- Pritchett, D.B. & Seeburg, P.H. (1990) Gamma-aminobutyric acid A receptor alpha 5-subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology. *Journal of neurochemistry*, **54**, 1802-1804.
- Puia, G., Vicini, S., Seeburg, P.H. & Costa, E. (1991) Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents. *Molecular pharmacology*, **39**, 691-696.
- Ramerstorfer, J., Furtmüller, R., Vogel, E., Huck, S. & Sieghart, W. (2010) The point mutation gamma 2F77I changes the potency and efficacy of benzodiazepine site ligands in different GABA_A receptor subtypes. *European journal of pharmacology*, **636**, 18-27.
- Reddy, D.S. (2011) Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Frontiers in endocrinology*, **2**, 38.
- Reinehr, R., Gorg, B., Becker, S., Qvarskhava, N., Bidmon, H.J., Selbach, O., Haas, H.L., Schliess, F. & Haussinger, D. (2007) Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia*, **55**, 758-771.
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Martin, J.R., Bluethmann, H. & Mohler, H. (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*, **401**, 796-800.
- Schafer, D.F. & Jones, E.A. (1982) Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet*, **1**, 18-20.
- Schafer, D.F., Pappas, S.C., Brody, L.E., Jacobs, R. & Jones, E.A. (1984) Visual evoked potentials in a rabbit model of hepatic encephalopathy. I. Sequential changes and comparisons with drug-induced comas. *Gastroenterology*, **86**, 540-545.
- Schliess, F., Gorg, B. & Haussinger, D. (2006) Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biological chemistry*, **387**, 1363-1370.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, **3**, 1101-1108.
- Schnitzler, A., Timmermann, L. & Gross, J. (2006) Physiological and pathological oscillatory networks in the human motor system. *Journal of physiology, Paris*, **99**, 3-7.
- Sergeeva, O.A. (2013) GABAergic transmission in hepatic encephalopathy. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Sergeeva, O.A., Eriksson, K.S., Sharonova, I.N., Vorobjev, V.S. & Haas, H.L. (2002) GABA(A) receptor heterogeneity in histaminergic neurons. *The European journal of neuroscience*, **16**, 1472-1482.

6. Literaturverzeichnis

- Sergeeva, O.A., Fleischer, W., Chepkova, A.N., Warskulat, U., Haussinger, D., Siebler, M. & Haas, H.L. (2007) GABAA-receptor modification in taurine transporter knockout mice causes striatal disinhibition. *The Journal of physiology*, **585**, 539-548.
- Sergeeva, O.A., Kletke, O., Kragler, A., Poppek, A., Fleischer, W., Schubring, S.R., Gorg, B., Haas, H.L., Zhu, X.R., Lubbert, H., Gisselmann, G. & Hatt, H. (2010) Fragrant dioxane derivatives identify beta1-subunit-containing GABAA receptors. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 23985-23993.
- Sergeeva, O.A., Klyuch, B.P., Fleischer, W., Eriksson, K.S., Korotkova, T.M., Siebler, M. & Haas, H.L. (2006) P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *The European journal of neuroscience*, **24**, 1413-1426.
- Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, R.W. & Saper, C.B. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, **271**, 216-219.
- Sieghart, W. (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological reviews*, **47**, 181-234.
- Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., Hoger, H. & Adamiker, D. (1999) Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochemistry international*, **34**, 379-385.
- Sigel, E. (2002) Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors. *Current topics in medicinal chemistry*, **2**, 833-839.
- Sigel, E. & Buhr, A. (1997) The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, **18**, 425-429.
- Song, G., Dhodda, V.K., Blei, A.T., Dempsey, R.J. & Rao, V.L. (2002) GeneChip analysis shows altered mRNA expression of transcripts of neurotransmitter and signal transduction pathways in the cerebral cortex of portacaval shunted rats. *Journal of neuroscience research*, **68**, 730-737.
- Stell, B.M. & Mody, I. (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, RC223.
- Stevenson, A., Wingrove, P.B., Whiting, P.J. & Wafford, K.A. (1995) beta-Carboline gamma-aminobutyric acidA receptor inverse agonists modulate gamma-aminobutyric acid via the loreclezole binding site as well as the benzodiazepine site. *Molecular pharmacology*, **48**, 965-969.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology*, **75**, 291-295.

6. Literaturverzeichnis

- Thomas, C.A., Jr., Springer, P.A., Loeb, G.E., Berwald-Netter, Y. & Okun, L.M. (1972) A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental cell research*, **74**, 61-66.
- Timmermann, L., Butz, M., Gross, J., Kircheis, G., Haussinger, D. & Schnitzler, A. (2005) Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, **20**, 337-346.
- Timmermann, L., Gross, J., Butz, M., Kircheis, G., Haussinger, D. & Schnitzler, A. (2003) Mini-asterixis in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. *Neurology*, **61**, 689-692.
- Vaquero, J., Chung, C., Cahill, M.E. & Blei, A.T. (2003) Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Seminars in liver disease*, **23**, 259-269.
- Wafford, K.A., Bain, C.J., Whiting, P.J. & Kemp, J.A. (1993) Functional comparison of the role of gamma subunits in recombinant human gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors. *Molecular pharmacology*, **44**, 437-442.
- Wallner, M., Hancher, H.J. & Olsen, R.W. (2003) Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 15218-15223.
- Wang, J.B., Liu, Z.F., Kofuji, P. & Burt, D.R. (1998) The GABA(A) receptor gamma1-subunit in seizure prone (DBA/2) and resistant (C57BL/6) mice. *Brain research bulletin*, **45**, 421-425.
- Wang, Y., Zhu, W. & Levy, D.E. (2006) Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methods*, **39**, 356-362.
- Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M. & Wada, H. (1984) Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain research*, **295**, 13-25.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B. & Lough, T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**, 834-842.
- Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G. (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug discovery*, **8**, 129-138.
- Wingrove, P.B., Thompson, S.A., Wafford, K.A. & Whiting, P.J. (1997) Key amino acids in the gamma subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site. *Molecular pharmacology*, **52**, 874-881.

6. Literaturverzeichnis

- Wisden, W., Laurie, D.J., Monyer, H. & Seeburg, P.H. (1992) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **12**, 1040-1062.
- Yanovsky, Y., Schubring, S., Fleischer, W., Gisselmann, G., Zhu, X.R., Lubbert, H., Hatt, H., Rudolph, U., Haas, H.L. & Sergeeva, O.A. (2012) GABAA receptors involved in sleep and anaesthesia: beta1- versus beta3-containing assemblies. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **463**, 187-199.
- Yeung, J.Y., Canning, K.J., Zhu, G., Pennefather, P., MacDonald, J.F. & Orser, B.A. (2003) Tonically activated GABAA receptors in hippocampal neurons are high-affinity, low-conductance sensors for extracellular GABA. *Molecular pharmacology*, **63**, 2-8.
- Ymer, S., Draguhn, A., Wisden, W., Werner, P., Keinänen, K., Schofield, P.R., Sprengel, R., Pritchett, D.B. & Seeburg, P.H. (1990) Structural and functional characterization of the gamma 1 subunit of GABAA/benzodiazepine receptors. *The EMBO journal*, **9**, 3261-3267.
- Zecharia, A.Y., Yu, X., Gotz, T., Ye, Z., Carr, D.R., Wulff, P., Bettler, B., Vyssotski, A.L., Brickley, S.G., Franks, N.P. & Wisden, W. (2012) GABAergic inhibition of histaminergic neurons regulates active waking but not the sleep-wake switch or propofol-induced loss of consciousness. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 13062-13075.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Olga Sergeeva, sowie Herrn Prof. Dr. med. Helmut Haas für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Wiebke Fleischer für Ihre Geduld, Ihre ehrliche Kritik und Ihre aufmunternden Worte, sowie bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Neuro- und Sinnesphysiologie für die stete Hilfe während meiner Zeit im Labor.

Ein herzliches Dankeschön richte ich auch an meine liebe Familie und meine guten Freunde, für die großzügige, unermüdbare Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

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