

Neurologische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Conrad)

Expression der GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen

Stefan Claus Platzer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Th.R. Tölle
2. Univ.-Prof. Dr. B. Conrad

Die Dissertation wurde am 11.01.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.06.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Grundzüge der GABAergen Transmission im Nervensystem	1
1.1.1. γ -Aminobuttersäure (GABA) als Neurotransmitter.....	1
1.2. GABA _A und GABA _C Rezeptoren.....	4
1.3. GABA _B Rezeptoren.....	5
1.3.1. Struktur und Diversität der GABA _B Rezeptoren	5
1.3.2. Funktion der GABA _B Rezeptoren.....	9
1.3.3. Die Rolle von GABA _B Rezeptoren in der Pathophysiologie des Nervensystems.....	11
2. Aufgabenstellung	14
3. Methoden	16
3.1. Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials.....	16
3.1.1. Gewinnung des Gehirngewebes	16
3.1.2. Anfertigen von Gefrierschnitten	16
3.2. <i>In situ</i> Hybridisierung.....	17
3.2.1. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide	20
3.2.2. Fixierung der Gewebeschnitte.....	21
3.2.3. Ablauf der <i>In situ</i> Hybridisierung	21
3.2.4. Semiquantitative Film-Autoradiografie.....	22
3.2.5. Semiquantitative Emulsions-Autoradiografie	23
3.3. Revers transkribierte Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	24
3.3.1. Isolation von Gesamt-RNA.....	24
3.3.2. Reverse Transkription (RT).....	25
3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.3.4. Gelelektrophorese.....	26
3.4. Auswahlkriterien für Oligonukleotid-Sonden und Primer	26
3.5. Immunohistochemie.....	30
3.5.1. Fixierung der Gewebeschnitte.....	30
3.5.2. Ablauf der Immunohistochemie	30
3.5.3. Auswertung der Immunohistochemie.....	31
3.6. Agonisten-stimulierter [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsassay	31
3.6.1. Durchführung der Agonisten-stimulierten [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsassays	33
3.6.2. Quantitative Film-Autoradiografie des GTP γ S-Assays	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Expression von GABA _{B1} und GABA _{B2} Rezeptor mRNA.....	34
4.1.1. Semiquantitative Autoradiografie der GABA _{B1} und GABA _{B2} Rezeptor mRNA.....	34
4.1.2. Zelluläre Expression der GABA _{B1} und GABA _{B2} Rezeptor mRNA.....	44
4.2. Expression der mRNA von Splice-Varianten der GABA _B Rezeptoren.....	54
4.2.1. Semiquantitative Autoradiografie der GABA _{B1} Rezeptor mRNA Splice-Varianten	54
4.2.2. Zelluläre Expression der GABA _{B1} Rezeptor mRNA Splice-Varianten.....	63
4.2.3. RT-PCR von ausgewählten GABA _B Rezeptor mRNA Splice-Varianten	73
4.3. GABA _{B1} und GABA _{B2} Rezeptor-Immunoreaktivität.....	75
4.4. [³⁵ S]GTP γ S-Bindung an GABA _B Rezeptoren	81

5. Diskussion	85
5.1. GABA _B Rezeptoren im Gehirn des Menschen - Lokalisation, funktionelle Aspekte und pathophysiologische Bedeutung.....	86
5.1.1. Cerebraler (präfrontaler und anteriorer cingulärer) Cortex	86
5.1.2. Hippocampale Formation	88
5.1.3. Basalganglien	90
5.1.4. Thalamus	94
5.1.5. Cerebellum	95
5.1.6. Gliale Expression.....	97
5.2. Diversität der GABA _B Rezeptoren.....	98
5.2.1. Splice-Varianten der GABA _{B1} Rezeptor mRNA.....	98
5.2.2. Splice-Varianten der GABA _{B2} Rezeptor mRNA.....	101
5.2.3. Hinweise auf alternative G-Protein Kopplung von GABA _B Rezeptoren in bestimmten Hirnregionen.....	102
5.3. Bestehen Spezies-Differenzen in der Expression von GABA _B Rezeptoren?.....	103
5.4. Ausblick	105
6. Zusammenfassung	107
7. Anhang	I
7.1. Chemikalien und Reagenzien.....	I
7.2. Literaturverzeichnis	V

Verwendete Abkürzungen:

A	Adenosin
ATP	Adenosin-Triphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
bp	Basenpaare
BDNF	brain derived neurotrophic factor
C	Cytidin
¹⁴ C	Kohlenstoff-14
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclo-Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CGRP	calcitonin-gene related peptide
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dATP _α S	Desoxyadenosin-5'-(α-Thio-)Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DNA	Desoxy-Nukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleinsäure-Triphosphat-Gemisch
dT	Desoxy-Thymidin
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
G	Guanosin
g	Gramm bzw. Gravitationskraft
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GDP	Guanosin-Diphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosin-Triphosphat
GTP _γ S	Guanosin-5'-(γ-Thio-)Triphosphat
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kDa	Kilodalton
L.	Lamina
l	Liter
M	molar
MG	Molekulargewicht
mGluR	metabotrope Glutamat Rezeptoren
Min.	Minute(n)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Hydrochlorid
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nucl.	Nucleus
PBS	phosphate buffered saline solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
³⁵ S	Schwefel-35
Sek.	Sekunde(n)
SSC	standard saline citrate solution
T	Thymidin
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TLE	Temporallappen-Epilepsie

Abkürzungen anatomischer Strukturen sind in den jeweiligen Legenden zu den Abbildungen erläutert.

Die anatomische Terminologie und Schreibweise entspricht der Nomina anatomica.

1. Einleitung

1.1. Grundzüge der GABAergen Transmission im Nervensystem

Über 40 Jahre sind vergangen, seit γ -Aminobuttersäure (GABA), welche bereits als Aminosäure bekannt war, zum ersten Mal als inhibitorischer Neurotransmitter identifiziert wurde (Dudel und Kuffler 1961).

Heute sind etliche Moleküle, wie die Monoamine, Acetylcholin, Aminosäuren und Peptide in ihrer Funktion als Neurotransmitter bekannt. Zu Beginn der 1970er Jahre war zunächst die Ansicht weit verbreitet, dass die Neurotransmission hauptsächlich durch das monoaminerge und das cholinerge System kontrolliert wird. Später schenkte man den Aminosäuren Glutamat und GABA als Überträgerstoffe im ZNS verstärkte Aufmerksamkeit. Mit der Entdeckung von zahlreichen Neuropeptiden in den späten 1970er Jahren nahm dann das Interesse an den Neurotransmittern Glutamat und GABA stetig ab. Dies änderte sich wieder, als Anfang der neunziger Jahre die Aufklärung der Nukleinsäure- und Proteinsequenzen von zahlreichen Glutamat- und GABA Rezeptoren gelang (Watanabe et al. 2002).

1.1.1. γ -Aminobuttersäure (GABA) als Neurotransmitter

GABA ist neben Glycin der wichtigste inhibitorische Botenstoff im ZNS von Säugetieren. Sie wird in den sogenannten GABAergen Neuronen durch das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) aus Glutamat gebildet. Dieses Glutamat stammt zum überwiegenden Teil vom α -Ketoglutarat aus dem Citratzyklus der Astroglia ab. GAD liegt bei Säugetieren in zwei Isoformen von unterschiedlichem Molekulargewicht vor: GAD67 (66,6 kDa) und GAD65 (65,4 kDa). Sie stellen das Produkt von zwei verschiedenen Genen dar, die sich auf Chromosom 10 bzw. 2 befinden (Erlander et al. 1991). Die Existenz von zwei, auf unterschiedlichen Genloci kodierten Synthesenzymen unterscheidet GABA von anderen Neurotransmittern wie Acetylcholin, Katecholaminen oder 5-Hydroxytryptamin, deren Synthese-Schlüsselenzyme nur von jeweils einem Gen kodiert werden.

Im Gehirn produziert GAD67 mehr als 90% der GABA, wohingegen z.B. in den Inselzellen des Pankreas GABA zum Großteil von GAD65 gebildet wird (Christgau et al. 1992). Frühe Untersuchungen zeigten eine Konzentration von GAD67 im Zellsoma, wohingegen GAD65 in den Nervenendigungen lokalisiert wurde (Kaufman et al. 1991), woraus man schlussfolgerte, dass die GAD65 die Neurotransmittersynthese und die GAD67 den metabolischen Umsatz von GABA in der Zelle bewirken (Martin und Rimvall 1993). Dies lässt sich inzwischen nicht mehr halten. Dagegen sprechen zum Beispiel Untersuchungen, in denen GAD67 auch in den Terminalen und synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden konnte (Erlander et al. 1991; Esclapez et al. 1994; Sloviter et al. 1996). Ebenfalls gegen eine strikte Zuordnung der jeweiligen GAD Isoform zu einem bestimmten Stoffwechselweg oder einer bestimmten Funktion sprechen Befunde an GAD-

knockout Mäusen. Während in den GAD65-defizienten Mäusen ($GAD65^{-/-}$) der GABA-Gehalt insgesamt im Gehirn nur unwesentlich verändert war, zeigten die $GAD67^{-/-}$ Mausmutanten einen massiv verringerten GABA-Gehalt von nur noch 7% (Asada et al. 1996, 1997). GAD67 scheint demnach das Schlüsselenzym der GABA-Synthese im ZNS zu sein.

Die Bildung von GABA kann kurzfristig über eine Erhöhung der GAD Aktivität oder längerfristig über eine gesteigerte Expression der GAD reguliert werden. Es zeigten sich auch hier Unterschiede zwischen beiden Isoformen. So wird die GAD65 zum Großteil über eine Veränderung der Bindung an ihren Kofaktor Pyridoxalphosphat kontrolliert, während die GAD67 hauptsächlich durch vermehrte Expression reguliert wird (Szabo et al. 1996; Pinal et al. 1997; Yanagawa et al. 1997).

Der Neurotransmitter GABA wird dann durch den Vesikulären-Neurotransmitter-Transporter (VGAT) in präsynaptische Vesikel verpackt und gespeichert (Fon und Edwards 2001). Das in diesen Vesikeln enthaltene GABA wird nach Eintreffen eines Aktionspotentials kalziumabhängig in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Alternativ kann GABA auch direkt, d.h. ohne zuvor vesikulär gespeichert worden zu sein, freigesetzt werden. Dies scheint insbesondere während der Entwicklungsphase des Nervensystems von Bedeutung zu sein (Taylor und Gordon-Weeks 1991; Attwell et al. 1993).

Das in den synaptischen Spalt ausgeschüttete GABA kann drei verschiedene Klassen von GABA Rezeptoren stimulieren. Hier werden $GABA_A$ und $GABA_C$ sowie $GABA_B$ Rezeptoren voneinander unterschieden (Abb. 1.1.).

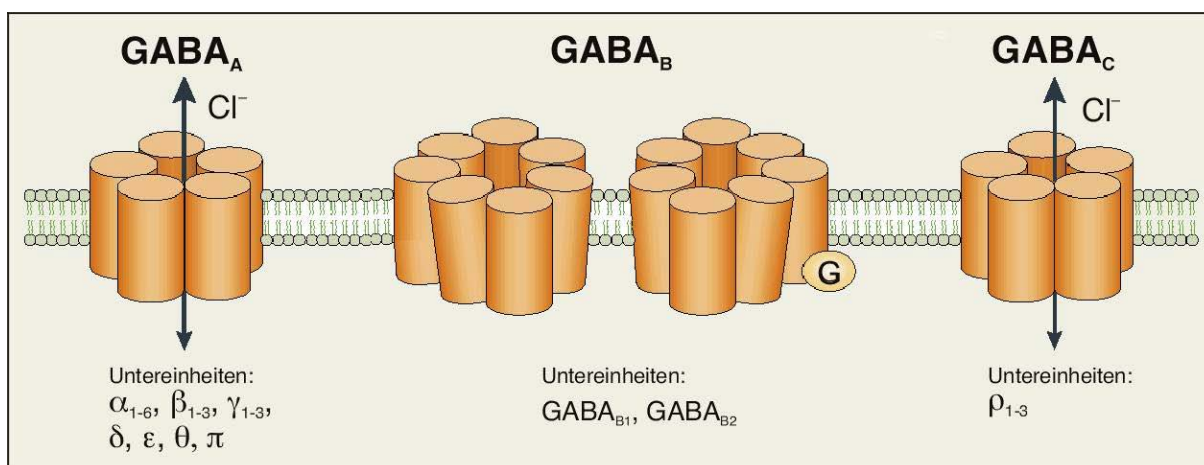


Abb. 1.1. Die verschiedenen Arten von GABA Rezeptoren. $GABA_A$ und $GABA_C$ Rezeptoren bilden Cl^- -Kanäle. Die $GABA_B$ Rezeptoren aktivieren G-Proteine (modifiziert nach Owens und Kriegstein 2002).

Die ionotropen GABA_A und GABA_C Rezeptoren bestehen aus mehreren Untereinheiten, welche bei Aktivierung eine Kanalpore für Cl⁻-Ionen öffnen. Die metabotropen GABA_B Rezeptoren hingegen bewirken die Signaltransduktion über G-Proteine. Die GABA Rezeptoren können sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein.

Die GABAerge Signalübertragung wird durch die Wiederaufnahme der GABA in Nervenendigungen oder in die umgebenden Gliazellen beendet. Dies geschieht durch die membranständigen GABA-Transporter (GAT); daran anschließend wird GABA dann intrazellulär durch die GABA-Transaminase metabolisiert.

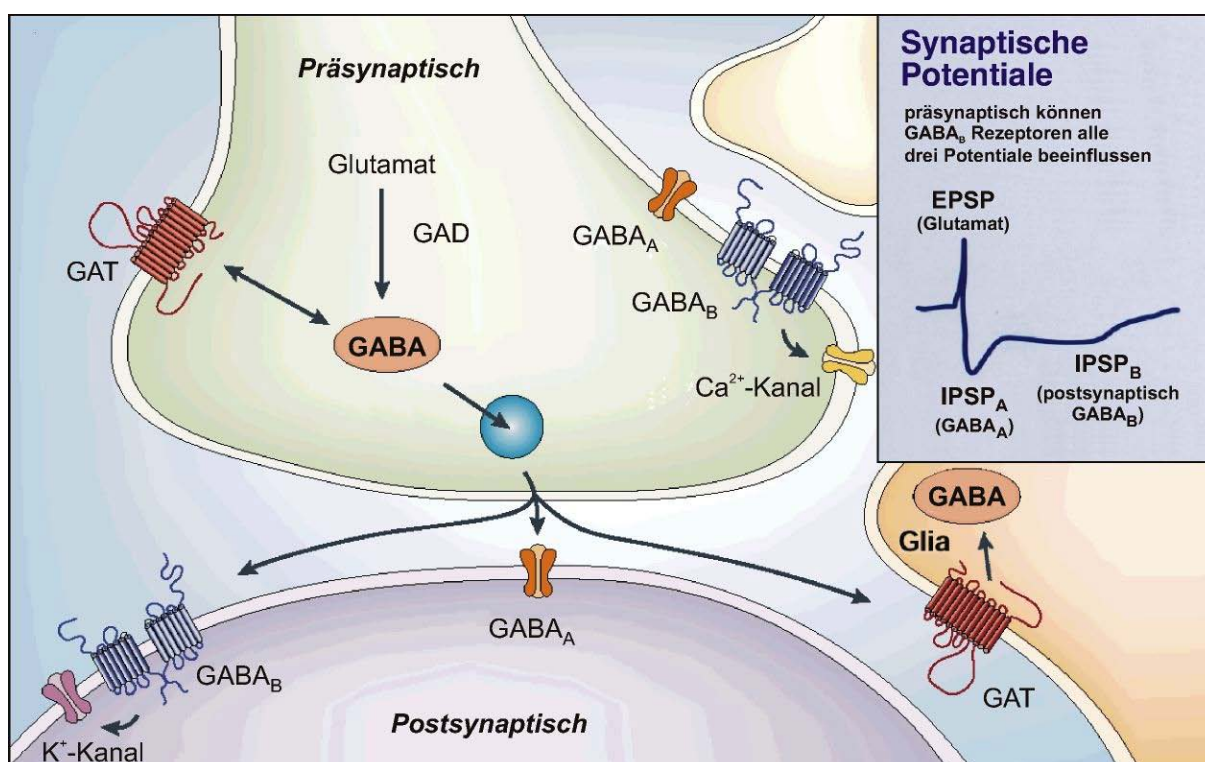


Abb 1.2. Schematische Darstellung der GABAergen Transmission. GABA wird durch die GAD aus Glutamat gebildet und in Vesikeln gespeichert. Diese werden bei präsynaptischer Erregung ausgeschüttet und das so freigesetzte GABA bindet post- wie auch präsynaptisch an GABA_A und GABA_B Rezeptoren. Nachdem GABA wieder von den Bindungsstellen freigesetzt worden ist, erfolgt die Wiederaufnahme in Glia oder neuronale Termini durch die GABA-Transporter (GAT). Im Einschub sind in vereinfachter Form die anteiligen Wirkungen von Glutamat und GABA auf ihre jeweiligen Rezeptoren an der Entstehung eines synaptisches Potentials wiedergegeben (modifiziert nach Owens und Kriegstein 2002).

1.2. GABA_A und GABA_C Rezeptoren

Der Ionenkanal der GABA_A wie auch der GABA_C Rezeptoren ist im Ruhezustand geschlossen und wird nach Bindung von GABA-Molekülen durch eine Konformationsänderung geöffnet. Im Innern des Kanals befinden sich an exponierter Stelle positiv geladene Aminosäurereste, die als Filter dienen und nur die einfach negativ geladenen Chloridionen (und in geringerem Ausmaß Bicarbonationen) passieren lassen (Bormann et al. 1991; Kaila et al. 1994; Sieghart 1995). Der GABA_A-Rezeptor ist also ein liganden-aktivierter Cl⁻-Kanal. Die Kopplung von Rezeptor und Kanal in einem Protein ermöglicht eine schnelle Auslösung des inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) nach der Neurotransmitterausschüttung.

Der GABA_A Rezeptor ist ein Heteromer aus fünf Polypeptid-Untereinheiten, die zusammen die Kanalpore für Cl⁻-Anionen bilden. Jede dieser Untereinheiten weist einen längeren extrazellulären N-Terminus, vier transmembranäre Domänen mit einer intrazellulären Schleife zwischen der ersten und zweiten sowie der dritten und vierten dieser Domänen und ein kurzes C-terminales extrazelluläres Ende auf. Die Ionenpore wird von den jeweils zweiten transmembranären Domänen der Untereinheiten des GABA_A Rezeptors gebildet (Möhler et al. 1997).

Bei den Säugern liegen die GABA_A Rezeptoren in den unterschiedlichsten Formen vor. Dies ist bedingt durch den Umstand, dass bisher 19 verschiedene Untereinheiten kloniert worden sind, die in unterschiedlicher Zusammensetzung das GABA Rezeptor-Pentamer bilden. Im Einzelnen existieren acht strukturell verwandte Untergruppen dieser Untereinheiten (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, ϵ , δ , θ , π und ρ 1-3). Die am weitesten verbreitetste Stöchiometrie des GABA_A Rezeptors besteht in zwei α -, zwei β - und einer γ - oder δ - bzw. ϵ -Untereinheit (Farrar et al. 1999). Zur weiteren Diversität dieses Rezeptors trägt die Existenz von jeweils zwei Splice-Varianten der β 2- und γ 2-Untereinheit bei. Derartige Splice-Varianten können auch funktionell zu unterschiedlichen GABA_A Rezeptoren führen, wie sich am Beispiel der γ 2-Untereinheiten zeigt, deren längere Form die Ethanol-Sensitivität des GABA_A Rezeptors bestimmt (Wafford et al. 1991). Auch die θ -Untereinheit, welche zuerst im Striatum der Ratte entdeckt wurde, vermag mit α 2, β 1 und γ 1 einen Rezeptor zu bilden (Bonnert et al. 1999). Die Zusammensetzung aus spezifischen Untereinheiten bestimmt auch die pharmakologisch sehr bedeutenden Bindungsstellen der GABA_A Rezeptoren für Substanzen wie Benzodiazepine, Barbiturate oder Anästhetika. So ist die Verstärkung der GABA_A Rezeptor-vermittelten Hemmung durch Benzodiazepine von der Anwesenheit einer α 1-, α 2-, α 3- oder α 5- und einer γ 2- oder γ 3-Untereinheit abhängig (Macdonald und Olson 1994; McKernan et al. 2000).

Auch für die ρ -Untereinheiten, die vor allem in der Retina aber auch in Cortex, Hippocampus und mesencephalen Hirnstrukturen identifiziert werden konnten (Enz und Cutting 1999), wurde gezeigt, dass sie einen funktionellen Rezeptor bilden können. Dieser für GABA hoch affine, jedoch gegenüber dem klassischen GABA_A Rezeptor-Antagonisten Bicullin insensitive Rezeptor wird als GABA_C Rezeptor bezeichnet (Bormann et al. 2000).

1.3. GABA_B Rezeptoren

Nachdem Bicullin, ein spezifischer Antagonist für die ionotropen GABA_A Rezeptoren, in Bindungsstudien nur einen Teil der GABA-Bindung zu blockieren vermochte, war es schon sehr früh klar, dass neben den GABA-bindenden Ionenkanälen noch weitere GABA-bindende Rezeptoren existieren müssen. Als ein solcher wurde 1981 ein Rezeptor beschrieben, der im Gegensatz zu GABA_A Rezeptoren Bicullin-insensitiv ist und, im Gegensatz zu GABA_A und GABA_C Rezeptoren, von Baclofen aktiviert wird. Dieser Rezeptor, der im ZNS weit verbreitet exprimiert ist, wurde als GABA_B Rezeptor bezeichnet (Hill und Bowery 1981). Obwohl bereits in diesen ersten Arbeiten Baclofen, welches bereits seit 1972 zur Therapie der Spastik eingesetzt wird, als spezifischer Agonist des GABA_B Rezeptors erkannt wurde, gelang die Entdeckung eines spezifischen Antagonisten, des Phaclofens, erst sechs Jahre später (Kerr et al. 1987). Diese Substanz und die Identifizierung weiterer Agonisten und Antagonisten beförderten die Erforschung der GABA_B Rezeptoren in den darauffolgenden Jahren.

1.3.1. Struktur und Diversität der GABA_B Rezeptoren

Obwohl größte Anstrengungen unternommen wurden, war der GABA_B Rezeptor der letzte der Rezeptoren bisher bekannter und wesentlicher Neurotransmitter, dessen Nukleotidsequenz aufgeklärt werden konnte. Der erste GABA_B Rezeptor wurde 1997 von Bettler und Mitarbeitern kloniert (Kaupmann et al. 1997). Hierzu wurde die Methode der Expressionsklonierung angewendet, bei der Gruppen von Proteinen unbekannter Funktion in *Xenopus*-Oocyten exprimiert werden, um aus diesen durch pharmakologische Stimulation das entsprechende Rezeptor-Protein zu identifizieren und zu isolieren. Diese Methode war bereits erfolgreich bei der Identifizierung des ersten metabotropen Glutamat Rezeptors (Masu et al. 1991), führte jedoch mit dem zunächst zur Verfügung stehenden Agonisten Baclofen nicht zum Erfolg. Erst durch Modifikationen der Methode und nachdem ein neuer hochaffiner Antagonist (CGP 64213) zur Verfügung stand, gelang es, den sogenannten GABA_{B1A} Rezeptor zu klonieren (Kaupmann et al. 1997).

Durch ein sogenanntes Homologie-Screening gelang die Identifizierung eines weiteren, in der Sequenz ähnlichen Rezeptors, des sogenannten GABA_{B1B} Rezeptors. Dieser stellt eine Variante mit kürzerem N-Terminus dar.

Wie bereits vor seiner schließlichen Klonierung vermutet wurde, zählt der GABA_{B1} Rezeptor zur Familie der 7-transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) der Klasse 3, mit struktureller Ähnlichkeit zu den metabotropen Glutamat Rezeptoren (mGluR), den Ca²⁺-sensitiven und den Vomeronasalen Rezeptoren. Unter den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) heben sich die GABA_B Rezeptoren dadurch hervor, dass sie ungewöhnlich lange N-terminale Abschnitte besitzen, welche für die Bindung des Liganden verantwortlich sind (Malitschek et al. 1999).

Obwohl die Nukleotidsequenz von zwei GABA_B Rezeptoren nun bekannt war und diese Rezeptoren auch die Fähigkeit besitzen, spezifische Agonisten und Antagonisten zu binden,

stellte sich heraus, dass sie in Expressionsmodellen nicht funktionell auf Effektorkanäle wirken konnten. Es zeigte sich, dass die GABA_{B1} Rezeptoren zwar vollständig in transfizierten Zellen synthetisiert werden, nicht jedoch aus dem endoplasmatischen Retikulum heraus zur Membranoberfläche transportiert werden können (Couve et al. 1998). Hieraus schloss man auf die Existenz von weiteren, akzessorischen Proteinen, welche erst die funktionelle Expression der GABA_{B1} Rezeptoren ermöglichen würden.

Weitere Bemühungen führten im darauffolgenden Jahr zur Entdeckung eines zweiten metabotropen GABA_B Rezeptor-Proteins, dem GABA_{B2} Rezeptor. Dieser, mit dem ersten eng verwandte Rezeptor, zählt ebenfalls zu den 7-transmembranären-GPCR der Klasse 3, wies aber keine Affinität zu den bekannten GABA_B Antagonisten auf. Auch dieser stellt für sich allein ebenfalls keinen funktionellen Rezeptor dar. Im Gegensatz zu den GABA_{B1} Rezeptoren vermag der GABA_{B2} Rezeptor jedoch nach seiner Translation die Zelloberfläche der transfizierten Zellen zu erreichen und sich dort zu verankern (Marshall et al. 1999).

Zeitgleich wurde mit Hilfe des sogenannten Yeast two-hybrid-Ansatzes nach den vermuteten Partnern der GABA_{B1} Rezeptoren gesucht, welche diesen Funktionalität verleihen könnten (White et al. 1998). Es gelang, ein mit dem GABA_{B1}-Rezeptor assoziiertes Proteinfsegment zu isolieren. Zur Überraschung aller beteiligten Forschergruppen handelte es sich bei diesem um den C-Terminus der GABA_{B2} Rezeptoren (Kuner et al. 1999; Martin et al. 1999; Ng et al. 1999a).

Erstmals konnte so gezeigt werden, dass metabotrope G-Protein gekoppelte Rezeptoren einen Komplex bilden können (Dimerisierung), welcher aus den unterschiedlichen Subtypen einer Familie besteht (Heterodimerisierung). Diese Art der Interaktion war bis dato für GPCR unbekannt. Im folgenden wurde zahlreiche Heterodimere zwischen verschiedenen GPCR, wie z.B. den κ - mit δ -Opiatrezeptoren, den μ - mit δ -Opiatrezeptoren, den β_2 -Adrenozeptoren mit δ -Opiatrezeptoren oder den Adenosin₁ Rezeptoren mit metabotropen Glutamat Rezeptoren ausgemacht (Übersicht bei Devi 2001). Während die Heterodimerisierung von GABA_B Rezeptoren entscheidende Voraussetzung ist, überhaupt einen funktionellen Rezeptor bilden zu können, sind die funktionellen Konsequenzen der Heterodimerisierung anderer GPCR bisher noch weitgehend unerforscht.

Durch Koexpression von GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren glückte also schließlich die Expression eines funktionellen, d.h. stimulierbaren und weitere elektrophysiologische Effekte auslösenden GABA_B Rezeptors (Marshall et al. 1999).

Dieses Dimer aus GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren verhielt sich *in vitro* pharmakologisch nun wesentlich ähnlicher zu den *in vivo* vorhandenen GABA_B Rezeptoren (Jones et al. 1998; Kaupmann et al. 1998a; Kuner et al. 1999; White et al. 1998), als dies bei einer alleinigen Expression von GABA_{B1} Rezeptoren zuvor der Fall war (Kaupmann et al. 1997).

Dass dieses Rezeptor-Dimer nicht nur artifizieller Natur ist, sondern auch *in situ* vorkommt, wurde mittels Immunokopräzipitation aus Gehirngewebe der Ratte nachgewiesen (Kaupmann et al. 1998a).

Gleich zu Beginn der Aufklärung der Nukleotidsequenzen dieser Rezeptoren wurden bereits zwei Splice-Varianten des GABA_{B1} Rezeptors entdeckt. Der GABA_{B1A} unterscheidet sich vom GABA_{B1B} Rezeptor an seinem N-terminalen Abschnitt. Dieser wird beim GABA_{B1A} Rezeptor von 147

Aminosäuren und beim GABA_{B1B} Rezeptor von 18 Aminosäuren gebildet. Dieses, beim GABA_{B1B} Rezeptor fehlende Proteinfsegment ist von Interesse, da es zwei Complement-bindende Motive, die sogenannten Sushi-Domänen bildet (Hawrot et al. 1998). Deren Bedeutung in der Erkennung von Liganden bzw. bei der Modulation an der Bindungsstelle wurde anfänglich diskutiert; es konnten jedoch durch Stimulation mit dem GABA_B-Agonisten Baclofen keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Splice-Varianten gemessen werden (Kaupmann et al. 1998b). Man geht jetzt davon aus, dass es sich bei den Sushi-Domänen, die auch bei anderen Proteinen zur Verankerung in der extrazellulären Matrix beobachtet wurden (Rauch et al. 1992), um Strukturelemente handelt, welche beim Transport des GABA_{B1A} Rezeptor-Proteins und seinem Anteil an der Synaptogenese von Bedeutung sind (Billinton et al. 2001c).

Im Folgenden wurden weitere Varianten des GABA_{B1B} Rezeptors der Ratte entdeckt. Einerseits eine Splice-Variante mit einer Insertion von 31 Aminosäuren zwischen der fünften transmembranären Domäne und der zweiten intrazellulären Schleife (GABA_{B1C} der Ratte). Zudem eine Variante (GABA_{B1D} der Ratte) mit einer 566 Basenpaaren-Insertion, welche über die Veränderung des Ableserahmens zu einem frühen Abbruch und so nur zu einem in 25 Aminosäuren abweichenden C-Terminus führt (Isomoto et al. 1998). Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es zu zeigen, dass die GABA_{B1C} Insertion der Ratte nicht nur bei der GABA_{B1A}, sondern auch bei der GABA_{B1B} Rezeptor-Transkription eingespliced werden kann und diese Varianten in Koexpression mit dem GABA_{B2} Rezeptor in Xenopus-Oocyten funktionell an K⁺-Kanäle koppeln (Pfaff et al. 1999).

Weder die GABA_{B1C} noch die GABA_{B1D} Variante konnten bisher in humaner mRNA detektiert werden, jedoch wurde für den humanen GABA_{B1A} Rezeptor eine Splice-Variante mit einer N-terminalen Deletion beschrieben, welche unglücklicherweise ebenfalls „GABA_{B1C}“ Variante genannt wurde, obwohl sie strukturell von der Splice-Variante der Ratte abweicht. Aus diesem Grund wird diese humane Variante hier im Weiteren als GABA_{B1C-hum} bezeichnet. Dieser GABA_{B1C-hum} Rezeptor ist durch eine Deletion von 62 Aminosäuren aus dem N-Terminus des humanen GABA_{B1A} Rezeptors gekennzeichnet, wodurch er nur eine Sushi-Domäne besitzt. Schließlich wurde für die humanen GABA_{B1} Rezeptoren, wie auch für die der Ratte eine weitere, die GABA_{B1E} Rezeptor-Variante aufgedeckt. Bei ihr wird das gesamte Exon 10 der GABA_{B1A} Sequenz herausgespliced, weshalb durch den veränderten Ableserahmen in Exon 11 bereits ein Abbruch der Translation stattfindet, da hier nun ein Stoppcodon entstanden ist. Der GABA_{B1E} Rezeptor liegt dadurch nur in dieser trunkeierten Form als N-Terminus ohne transmembranäre Domänen vor (Schwarz et al. 2000). Trotz dieser unvollständigen Ausbildung weist die GABA_{B1E} Variante interessante Eigenschaften auf. Zwar bindet sie den GABA_B-Antagonisten CGP54626A nicht, vermag aber im Gegensatz zu den anderen vollständigen GABA_{B1} Rezeptor-Varianten ohne Mitwirkung von GABA_{B2} Rezeptoren die Zellmembran zu erreichen. Dies ist möglich, da den GABA_{B1E} Rezeptoren der C-Terminus fehlt, der bei den anderen bisher bekannten GABA_{B1} Rezeptoren ein Retentions- (Zurückhalte-) Motiv enthält, das deren Transport als Monomer (d.h. ohne GABA_{B2}, s.o.) zur Zelloberfläche verhindert (Margeta-Mitrovic et al. 2000).

Pharmakologisch bedeutend ist jedoch die Beobachtung, dass GABA_{B1E} sehr wohl mit GABA_{B2} heterodimerisieren kann. Auch wenn diese Heterodimere nicht funktionelle GABA_B Rezeptoren

bilden können, so tritt doch GABA_{B1E} in Konkurrenz mit den anderen GABA_{B1} Rezeptoren um diesen wichtigen Partner. Deswegen wird der GABA_{B1E} Variante eine Rolle in der Regulation und Verfügbarkeit von funktionellen GABA_B Rezeptoren zugeschrieben (Billinton et al. 2001c).

Für den humanen GABA_{B2} Rezeptor wurden drei Splice-Varianten beschrieben (Clark et al. 2000). GABA_{B2A} besitzt C-terminal 26 Aminosäuren mehr als die GABA_{B2B} Variante, endet jedoch mit der gleichen Sequenz. GABA_{B2C} dagegen bildet ein eigenes 42 Aminosäuren langes C-terminales Ende in Anschluss an die im GABA_{B2B} deletierte Sequenz.

Die Suche nach weiteren Splice-Varianten schreitet fort; insbesondere für die GABA_{B1} Rezeptoren gibt es erste Hinweise, dass weitere davon existieren (Ekstrand et al. 1999). Diese Suche ist hauptsächlich dadurch motiviert, dass man sich von N-terminal-abweichenden Rezeptoren andere und ggf. auch therapeutisch wirksame Agonisten-Bindungsstellen verspricht. Bei den C-terminal differierenden Rezeptor-Proteinen sind andere Heterodimere (auch mit bereits bekannten GPCR) oder veränderte G-Protein-Kopplungen denkbar.

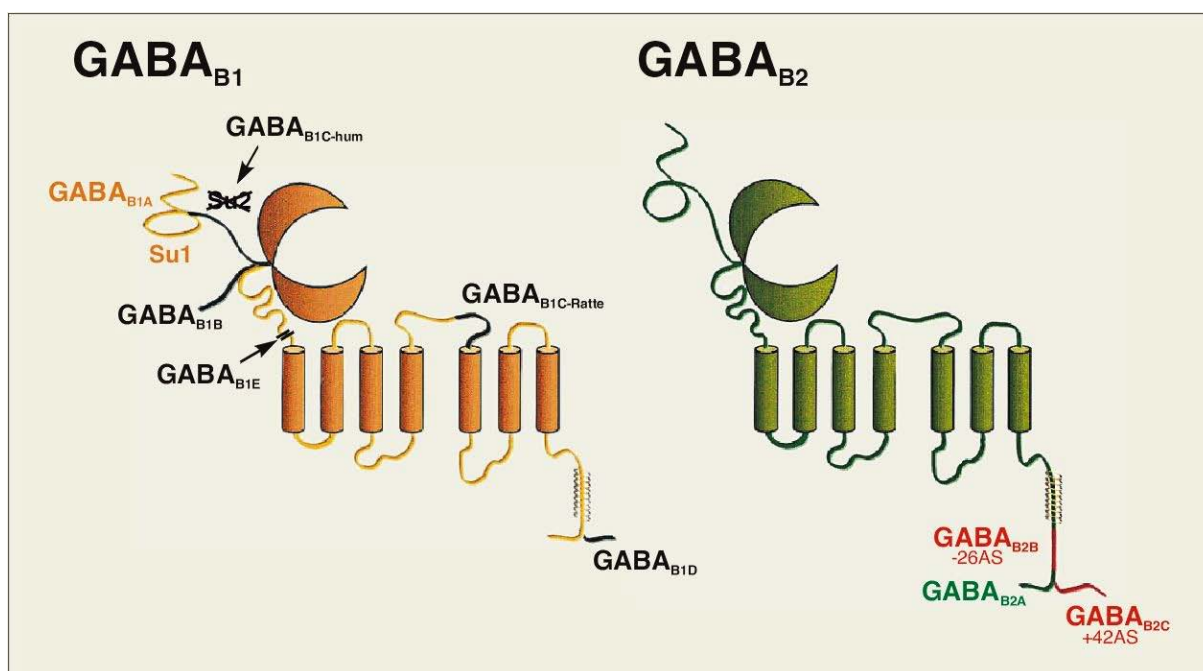


Abb 1.3. Schematische Darstellung der beim Menschen und in der Ratte bekannten GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor Splice-Varianten. Für die GABA_{B1} Rezeptoren sind N- wie auch C-terminale, für den GABA_{B2} Rezeptor nur C-terminale Splice-Varianten bekannt. Su1 und Su2 stellen die Sushi-Domänen dar. Die Varianten GABA_{B1C-Ratte} und GABA_{B1D} sind nur für die Ratte und die Varianten der GABA_{B2} Rezeptoren nur für den Menschen beschrieben.

Die GABA_{B1B} Rezeptor-Variante besitzt im Vergleich zu GABA_{B1A}, GABA_{B1C-hum} und GABA_{B1E} Rezeptoren ein abweichendes N-terminales Ende. Bei den GABA_{B1C-hum} Rezeptoren fehlt der Abschnitt der GABA_{B1A} Rezeptoren, welcher die zweite Sushi-Domäne bildet. Der GABA_{B1E} Rezeptor ist inkomplett ausgebildet; er besteht nur aus dem N-Terminus des GABA_{B1A} Rezeptors.

Die GABA_{B2B} Rezeptoren entstehen durch Deletion aus dem C-terminalen Abschnitt der GABA_{B2A} Rezeptoren und die GABA_{B2C} Rezeptoren weisen einen zu den anderen beiden GABA_{B2} Rezeptor-Varianten alternativen C-Terminus auf (s. auch Abb. 3.3., 3.4.; modifiziert nach Calver et al. 2000).

1.3.2. Funktion der GABA_B Rezeptoren

Abgeleitet von elektrophysiologischen *in vivo* Beobachtungen an GABA_B Rezeptoren können diese in postsynaptische Rezeptoren, welche die postsynaptische Erregbarkeit kontrollieren und präsynaptische Rezeptoren, welche die Neurotransmitterausschüttung regulieren, eingeteilt werden.

Viele der physiologischen Effekte von GABA_B Rezeptoren lassen sich auf die G-Protein-induzierte Öffnung von Ca²⁺ und K⁺-Kanälen zurückführen (Lüscher et al. 1997; Poncer et al. 1997; Slesinger et al. 1997; Wu und Saggau 1995). Demzufolge beeinflussen präsynaptische GABA_B Rezeptoren, wahrscheinlich über eine Verminderung der Ca²⁺-Leitfähigkeit, die Neurotransmission über die Unterdrückung von Neurotransmitter- und Neuropeptidausschüttung. Postsynaptische GABA_B Rezeptoren hyperpolarisieren Neuronen durch Aktivierung von auswärts gerichteten K⁺-Strömen, welche dem späten inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (IPSP) zugrunde liegen. Typischerweise setzt das späte IPSP im Vergleich zum schnellen IPSP (durch GABA_A Rezeptoren ausgelöst) mit Verzögerung ein, ist aber von längerer Dauer (Einschub in Abb. 1.2.). Bei den postsynaptisch angesteuerten K⁺-Kanälen handelt es sich um K⁺-Kanäle vom Kir3-Typ, da an Kir3-knockout Mäusen durch Baclofen-Gabe kein nennenswertes spätes IPSP mehr auslösbar war (Lüscher et al. 1997) und weil bei den *weaver* Mausmutanten, bei denen die Ionenpore des Kir3.2-Kanals verändert ist, der GABA_B Rezeptor-bedingte K⁺-Strom stark verändert ist (Slesinger et al. 1997). Die relativ hohe Geschwindigkeit der GABA_B/K⁺-Kanal- oder auch der GABA_B/Ca²⁺-Kanal-Interaktion ist durch die Signalübertragung mittels der βγ-Untereinheiten der G-Proteine erklärbar (Mintz und Bean 1993; Kaupmann et al. 1998b).

Außer über die Modulation von Ionenkanälen können GABA_B Rezeptoren noch über die Hemmung von Adenylatcyclasen und dadurch bedingte Abnahme der Synthese von cAMP wirken (Wojcik und Neff 1984).

Betrachtet man die pharmakologischen und elektrophysiologischen Wirkungen an prä- und postsynaptischen GABA_B Rezeptoren, so fällt die Heterogenität der präsynaptischen Antworten auf, die sich zudem von den postsynaptischen unterscheiden (Cunningham und Enna 1996; Bonanno et al. 1997; Deiß et al. 1997; Zhang et al. 1997). Eine mögliche Ursache hierfür stellen prä- bzw. postsynaptisch unterschiedlich gekoppelte G-Proteine dar. So sind die präsynaptischen Rezeptoren durch Pertussis-Toxin oder N-Ethylmaleinimid blockierbar, was stark auf eine Kopplung an G_{α_{i/o}}-Proteine hinweist, wogegen die präsynaptischen Rezeptoren zumindest teilweise nicht auf diese Substanzen reagieren (Dutar und Nicoll 1988; Phelan 1999).

Je nach prä- und postsynaptischer Expression können GABA_B Rezeptoren entweder einen Anstieg oder eine Abnahme der generellen Erregbarkeit in einem neuronalen Netzwerk bewirken. Dies ist abhängig vom Ausmaß und der zeitlichen und räumlichen Dimension der Aktivierung von GABA_B Rezeptoren und der Koexpression anderer Rezeptorsysteme.

Dies zeigt sich besonders eindrücklich an dem Einfluss der prä- bzw. postsynaptischen Aktivierung von GABA_B Rezeptoren auf die Langzeitpotenzierung (LTP), einem klassischen Beispiel neuronaler Plastizität. Während angenommen wird, dass die Stimulation von postsynaptischen GABA_B Rezeptoren auf Neuronen erster Ordnung die LTP hemmt (Olpe et al.

1993; Davies und Collingridge 1996), führt die Aktivierung von präsynaptischen Rezeptoren über eine Kontrolle der GABA-Ausschüttung von Interneuronen zu einer Verstärkung der LTP (Davies et al. 1991; Mott et al. 1991).

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse überrascht es nicht, dass GABA_B Rezeptoren an der Entstehung bzw. Ausprägung von Erkrankungen, bei denen die synaptische Reorganisation und Plastizität verändert ist, beteiligt sein können.

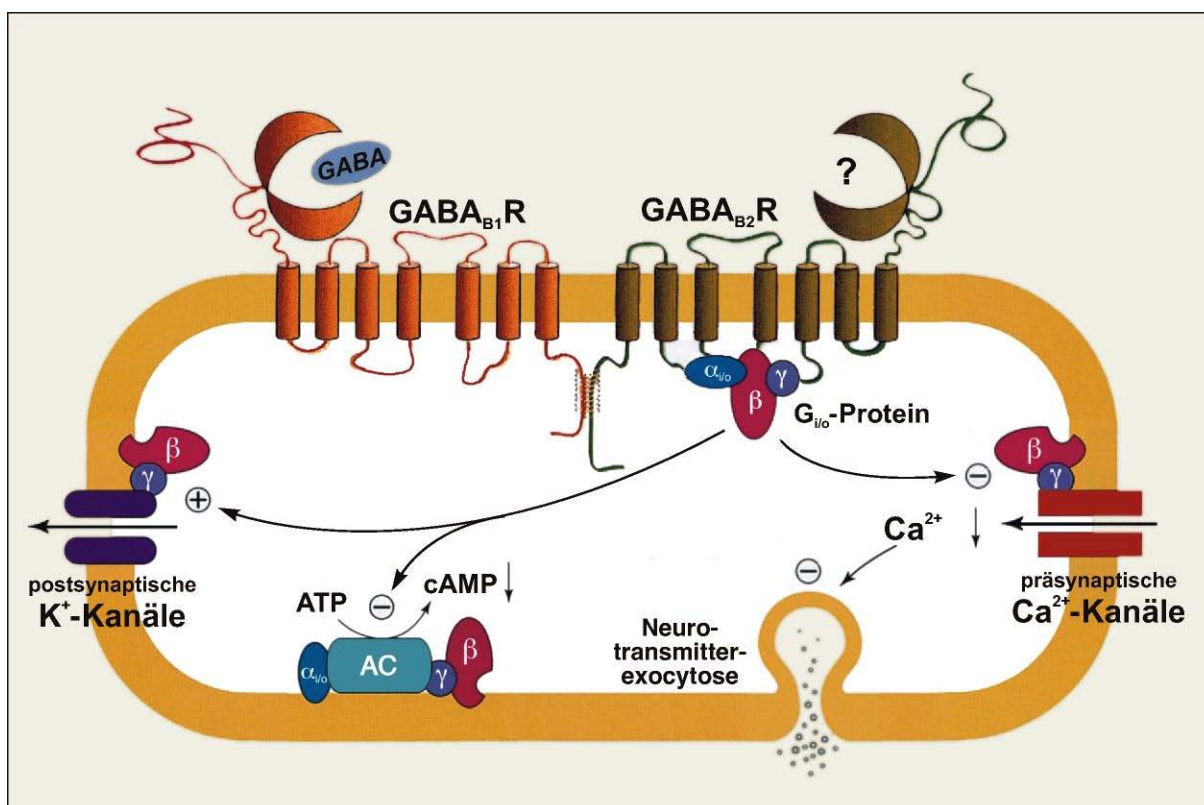


Abb. 1.4. Übersicht der intrazellulären Signalkaskade bei der GABA_B Rezeptor Aktivierung.

Die Aktivierung eines GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimers durch GABA an der Bindungsstelle auf der extrazellulären Domäne des GABA_{B1} Rezeptors bewirkt intrazellulär den Zerfall des am GABA_{B2} Rezeptor gebundenen G_{i/o}-Proteins in $\alpha_{i/o}$ - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten (Margeta-Mitrovic et al. 2000).

Im Weiteren können die freigestzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten bei postsynaptisch lokalisierten GABA_B Rezeptoren K⁺-Kanäle aktivieren oder bei einer präsynaptischen Lokalisation Ca²⁺-Kanäle hemmen, wodurch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration sinkt und so die Exocytose von Neurotransmittern gehemmt werden kann (Lüscher et al. 1997; Poncer et al. 1997; Slesinger et al. 1997; Wu und Saggau 1995).

$\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten vermitteln eine Hemmung der Aktivität von Adenylatcyclasen (AC), wodurch weniger cAMP synthetisiert wird (Wojcik und Neff 1984).

Bislang ungeklärt ist, ob endogene Liganden auch an GABA_{B2} Rezeptoren binden können (?). Es wird angenommen, dass die Wirkung von (exogenen) Modulatoren an GABA_B Rezeptoren über diese Bindungsstelle vermittelt wird (Urwyler et al. 2003).

1.3.3. Die Rolle von GABA_B Rezeptoren in der Pathophysiologie des Nervensystems

Genetische Hinweise

Die chromosomale Lokalisation des Gens der *GABA_{B1} Rezeptoren* auf 6p21.3 und seine Lage in einigen Suszeptibilitätsloci lassen es als potentiell Kandidatengen für Erkrankungen wie idiopathische generalisierte Epilepsien, Schizophrenie, Multipler Sklerose und Dyslexie erscheinen (Goei et al. 1998; Grifa et al. 1998; Kaupmann et al. 1998a).

Mit dem Genlocus des *GABA_{B2} Rezeptors* im chromosomalen Abschnitt 9q22.2-22.3 (Martin et al. 1999; Ng et al. 1999b) wird eine Assoziation zum Risikogen der hereditären sensorischen Neuropathie Typ 1 diskutiert (Nicholson et al. 1996; Ng et al. 1999b).

Nozizeption und Schmerz

Der Rolle von GABA bei der Nozizeption wurde in den letzten Jahrzehnten große Aufmerksamkeit geschenkt. Aus immunohistochemischen und autoradiografischen Untersuchungen im Rückenmark der Ratte ist bekannt, dass in den oberflächlichen Laminae des Hinterhorns eine hohe Dichte an GABAergen Terminalen und Interneuronen vorhanden ist. Gleiches gilt für die an der Nozizeption beteiligten supraspinalen Regionen (Bowery et al. 1984; Price et al. 1984). Auch die Betrachtung der mRNA bzw. Rezeptor-Proteine der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren im Rückenmark, Hinterwurzelganglien und des Gehirns zeigt an den Schaltstellen der Nozizeption deutliche Expressionsniveaus auf (Margeta-Mitrovic et al. 1999; Calver et al. 2000).

Baclofen weist antinociceptive Wirkung auf der spinalen wie auch supraspinalen Ebene auf (Dirig und Yaksh 1995; Hammond und Washington 1993; Levy und Proudfit 1979; Liebman und Pastor 1980). Diese Wirkung wird, zumindest teilweise, auf die präsynaptische Verminderung der Ausschüttung von Substanz P (Malcangio und Bowery 1993, 1996), Glutamat (Kangrga et al. 1991) und CGRP, wie auch eine postsynaptische Inhibition zurückgeführt (Malcangio und Bowery 1995).

Die antinozizeptive Potenz von Baclofen wurde auch in Tiermodellen des akuten und des chronischen Schmerzes untersucht. Obwohl bei Baclofen die analgetische Dosis deutlich niedriger als die relaxierende ist, muss bei der Wertung von verhaltenspharmakologischen Untersuchungen beachtet werden, dass eine beginnende Relaxierung der Versuchstiere im Schmerzmodell das Ergebnis verfälschen kann (Castro-Lopes 2000). Baclofen wirkt in akuten Schmerzmodellen ausgeprägt analgetisch bei Ratten (Hammond und Washington 1993; Levy und Proudfit 1977; Malcangio et al. 1991) und Primaten (Yaksh und Reddy 1981). Für den chronischen Schmerz ergibt die Datenlage kein einheitliches Bild; es wurden nur teilweise analgetische Effekte erzielt (Dirig und Yaksh 1995; Shafizadeh et al. 1997; Sharma et al. 1993). Ursächlich hierfür könnte das unter Umständen bereits endogen maximal aktivierte GABAerge Systems als Reaktion auf den chronischen Schmerz sein (Malcangio und Bowery 1995).

Wenngleich Baclofen bei diabetischen Neuropathien oder postherpetischer Neuralgie keinen Benefit erzielte, kann es z.B. bei der Trigeminusneuralgie mit Erfolg eingesetzt werden. In Kombination mit Antikonvulsiva ist eine analgetische Wirkung bei attackenförmigen Schmerzen möglich (Fromm et al. 1984, 1992). Zudem kann in Kombination mit Morphin die analgetische Potenz gesteigert werden (Fromm 1994).

Depression

Frühe Studien ließen bereits einen Zusammenhang zwischen dem noradrenergen und dem GABAergen System vermuten. So kann durch Gabe von Imipramin, aber auch Baclofen die Steigerung von β -adrenergen Bindungsstellen nach Dauerapplikation von Reserpin, einem Wiederaufnahmehemmstoff von Monoaminen, verhindert werden (Suzdak und Gianutsos 1985, 1986). Auch durch primäre Gabe von Baclofen kann eine Abnahme von β -adrenergen Rezeptoren erreicht werden, ein Umstand, der eine direkte Verbindung des β -adrenergen Systems mit GABA_B Rezeptoren anzeigt (Bowery et al. 1993). Auch vermag Baclofen die Serotoninausschüttung im Raphekern und mit ihm assoziierten Arealen zu steigern (Abellan et al. 2000). Im Tierversuch konnte durch die Langzeittherapie mit verschiedenen Antidepressiva die GABA_B Rezeptor-Dichte gesteigert werden, wohingegen sie bei Applikation von Haloperidol oder Diazepam unverändert blieb (Lloyd et al. 1985; Motohashi et al. 1989, 1992).

Nur wenige klinische Untersuchungen liegen zur Wirkung von Baclofen bei affektiven Störungen vor und zeigen zudem keine einheitliche Tendenz. Lediglich bei Patienten mit Panikattacken konnte eine Reduktion der Anfallsfrequenz erreicht werden (Kerr und Ong 1995; Lloyd et al. 1989; Monteleone et al. 1990; Post et al. 1991)

Suchterkrankungen

Die inhibitorische Wirkung von γ -Hydroxybutyrat (GHB, „liquid extasy“) kann durch GABA_B Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden (Xie und Smart 1992). GHB selbst weist einen, wenngleich schwach ausgeprägten, Agonismus an GABA_B Rezeptoren auf (Lingenhoehl et al. 1999; Snead 1996a). Abgeleitet von Beobachtungen, dass GHB die Alkoholabstinenz befördern (Addolorato et al. 1999) und den Alkoholentzug mildern kann (Fadda et al. 1989; Gallimberti et al. 2000), kann angenommen werden, dass GABA_B-Agonisten bei der Therapie der Alkoholsucht von Nutzen sein können. Dies wird durch Befunde an alkoholpreferierenden Ratten erhärtet, da Baclofen hier einige Symptome der Alkoholsucht und des -entzugs mildern konnte (Colombo et al. 2000; Daoust et al. 1987). Der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings unklar, da der GABA_B Rezeptor selbst gegenüber Ethanol insensitiv zu sein scheint (Frye und Fincher 1996). Auch bei anderen Drogen, wie z.B. Kokain und Heroin vermochte Baclofen bei Ratten das suchtspezifische Verhalten und die konsumierte Dosis der Suchtmittel zu verringern (Brebner et al. 1999; Roberts und Andrews 1997; Shoab et al. 1998; Xi und Stein 1999). Auch in einer klinischen Studie mit Baclofen bei kokainabhängigen Patienten bestätigten sich die abstinenzfördernde Wirkung (Ling et al. 1998).

Epilepsien

Die Wirkung von GABA_B Rezeptor-Agonisten ist in Tierversuchen sowohl als prokonvulsiv (Mott et al. 1989), als auch antikonvulsiv (Ault und Nadler 1983; Morrisett et al. 1993) beschrieben worden. Bei Patienten mit generalisierten Krampfanfällen zeigte sich jedoch unter Gabe des GABA_B Rezeptor-Agonisten R-Baclofen weder eine Häufung, noch eine Verringerung der Anfallsfrequenz (Terrence et al. 1983).

In einem Tiermodell für Absence-Epilepsien provoziert Baclofen einen nichtkonvulsiven Status (Marescaux et al. 1992; Snead 1996b; Vergnes et al. 1997). Die GABAerge Transmission in thalamokortikalen Verbindungen spielt bei der Entstehung von Absence-Epilepsien eine zentrale Rolle (Liu et al. 1991; Vergnes et al. 1997). In diesen Regionen konnten in dem genannten Tiermodell vermehrt GABA_B-Bindungsstellen (Hosford et al. 1992) und eine erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von GABA nachgewiesen werden (Richards et al. 1995). Hierin begründete sich die Hoffnung auf therapeutisch wirksame GABA_B-Antagonisten für dieses Krankheitsbild, wobei bislang keine GABA_B-Antagonisten als Pharmaka zugelassen worden sind.

Neuroprotektion

Abgeleitet von der GABA_B-vermittelten Reduktion der präsynaptischen Glutamatausschüttung lassen sich neuroprotektive Effekte von GABA_B-Agonisten vermuten. Die Ergebnisse von Versuchen mit Nagetieren in Ischämie-Modellen erbrachten jedoch bezüglich der Neuroprotektion mittels Stimulation von GABA_B Rezeptoren kein einheitliches Bild (Rosenbaum et al. 1990; Lal et al. 1995).

Überraschenderweise konnte dagegen gezeigt werden, dass geringe Dosen von GABA_B-Antagonisten eine steigernde Wirkung auf die Expression der neuroprotektiven Wachstumsfaktoren NGF und BDNF haben (Heese et al. 2000).

Kognitive Störungen

Der Blockade von GABA_B Rezeptoren werden kognitionssteigernde Effekte zugeschrieben, welche über eine Verstärkung von cholinergen und/oder glutamatergen Mechanismen vermittelt sein sollen (Mondadori et al. 1993, 1994, 1996a, 1996b). In Übereinstimmung hiermit befinden sich Resultate aus Verhaltensexperimenten mit Ratten, bei denen GABA_B-Antagonisten positive kognitive Effekte auslösen konnten, welche durch den GABA_B-Agonisten R-Baclofen wieder nivelliert wurden (DeSousa et al. 1994; Bianchi und Panerai 1993; Getova et al. 1997; Getova und Bowery 1998).

In Hinblick auf die Entwicklung neuer GABA_B-Agonisten zur Demenzbehandlung wurde vorgeschlagen, selektiv die postsynaptischen GABA_B Rezeptoren zu blockieren, da eine gleichzeitige Blockade der präsynaptischen GABA_B Rezeptoren über eine verstärkte GABA-Ausschüttung den Antagonismus an postsynaptischen GABA_B Rezeptoren wieder abschwächen oder aufheben würde (Stäubli et al. 1999).

2. Aufgabenstellung

Moderne molekularbiologische Methoden erlauben es, Rezeptorsysteme in unterschiedlichen Regionen des Gehirns darzustellen. Die Beschreibung der Rezeptorexpression in den verschiedenen funktionell-anatomischen ZNS-Regionen ist Voraussetzung dafür, Ergebnisse zur Funktionalität dieser Rezeptoren, die aus biochemischen Untersuchungen oder Präparationen des einzelnen Rezeptors stammen, auf physiologische Bedingungen zu übertragen und zu interpretieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expressionsmuster der GABA_B Rezeptoren in ausgewählten Regionen des menschlichen Gehirns *post mortem* darzustellen. Durch die kürzlich erfolgte Klonierung dieser Rezeptoren ist es möglich geworden, die Expression bis hin zur molekularen Ebene zu charakterisieren.

Angestrebt wird hierbei ein möglichst umfassendes Bild, das sowohl die mRNA- als auch die Proteinebene einschließt. Hierbei soll nicht nur der Nachweis von auf der Zelloberfläche exprimierten Proteinen, sondern auch die Darstellung von funktionellen (d.h. an G-Proteine gekoppelte) GABA_B Rezeptoren erfolgen.

Als Mitglieder der GABA_B Rezeptor-Familie sind bisher die sogenannten GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren bekannt.

Neben dem makroskopischen Nachweis der jeweiligen mRNA-Expression soll auf mikroskopischer Ebene die mRNA-Expression in spezifischen Zellpopulationen des humanen ZNS untersucht werden.

Im weiteren wird der Nachweis und die Darstellung der Verteilung von mRNA-Splice-Varianten der beiden GABA_B Rezeptoren angestrebt.

Schließlich wird der Versuch unternommen, die Expression von funktionell aktiven GABA_B Rezeptor-Dimeren neurochemisch darzustellen und zu quantifizieren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an humanem Hirngewebe durchgeführt, das von Menschen ohne bekannte neurologische oder psychiatrische Erkrankung stammt. Das Ziel der Arbeit ist es also, die normale (=physiologische) Expression der GABA_B Rezeptoren zu beschreiben.

Methodisch vergleichbare Untersuchungen sind zwar schon im ZNS von anderen Spezies, vor allem in Nagetieren, durchgeführt worden. Es ist jedoch trotzdem notwendig, ergänzende und vergleichende Untersuchungen wie diese an humanem Gewebe durchzuführen, weil:

- zum einen bestimmte Subtypen von Rezeptoren bisher nur in bestimmten Spezies nachzuweisen waren. Dies ist bei den GABA_B Rezeptoren der Fall: Bestimmte Subtypen des Rezeptors sind bisher nur in der Ratte nachgewiesen worden, andere wiederum dagegen nur im Menschen. Es ist daher zu klären, ob dies tatsächlich auf Spezies-spezifische

Expressionsmuster zurückzuführen ist oder nur auf dem Mangel an systematischen Expressionsuntersuchungen beruht

- andererseits auch bei entwicklungsgeschichtlich so alten Rezeptoren wie den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (viele davon finden sich bereits bei *Drosophila melanogaster*) nicht grundsätzlich von einer phylogenetischen Konservierung der Expressionsmuster und Funktion auszugehen ist. Beispielhaft sei hier nur auf die grundsätzliche Differenz zwischen Mensch und Ratte bei der Repräsentation von μ -Opiatrezeptoren im Kleinhirn verwiesen. Die Ratte weist keinerlei cerebelläre Expression von μ -Opiatrezeptoren auf, wohingegen das menschliche Cerebellum diesen Rezeptor stark exprimiert (Schadrack et al. 1999).

Bei der Übertragung und Wertung von physiologischen und verhaltensbiologischen Untersuchungen aus Versuchstieren, aber auch der Suche nach pharmakologisch nutzbaren Substanzen sind daher Expressionsstudien im humanen ZNS unverzichtbar, da diese eine Übertragbarkeit auf den Menschen entweder untermauern oder von vornherein als fraglich erscheinen lassen können.

3. Methoden

3.1. Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

3.1.1. Gewinnung des Gehirngewebes

Im Rahmen von pathologischen bzw. rechtsmedizinischen Sektionen wurden von 5 Patienten Gewebeproben aus verschiedenen Hirnregionen entnommen. Die Gewebelöcke wurden nach Präparation möglichst zeitnah auf Trockeneis (festes CO₂) eingefroren und in einem Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert. Sie stammten von Personen bei denen keine neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen bekannt waren und deren neuropathologische Evaluation des Gehirns auch keinen pathologischen Befund ergeben hatte. Es handelte sich um männliche Personen mit einem Durchschnittsalter von 60,4 (56-67) Jahren. Zwischen deren Tod und dem Einfrieren der Gewebe (*post mortem* Intervall) sind im Mittel 16,7 (6,0-29,5) Stunden vergangen. Vier Personen verstarben an Herz-Kreislaufversagen als Folge ihrer Grunderkrankungen (Pankreatitis, Kardiomyopathie, Rectum-Karzinom und Myokardinfarkt). Eine Person ist durch eine akut aufgetretene Hypoglykämie mit Bewusstseinsverlust (bei insulinpflichtigem Diabetes mellitus) ertrunken.

3.1.2. Anfertigen von Gefrierschnitten

Die in den tiefgefrorenen Gewebelöcken enthaltenen Hirnstrukturen wurden zunächst makroskopisch unter Zuhilfenahme von neuroanatomischen Standardwerken näher identifiziert. Anschließend wurden die einzelnen Gewebelöcke in einem Kryostaten (Frigocut, Fa. Reichert-Jung) bei -25°C in anatomisch-coronarer Schnittebene aufgeblockt, angeschnitten und nach Erreichen einer glatten Schnittebene in der Position feinadjustiert.

Zuvor geputzte und heissluftsterilisierte Objektträger wurden mit 0,01% Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet. Auf die so vorbereiteten Objektträger werden nun Gefrierschnitte von 20µm Dicke aufgenommen. Im Einzelnen werden so von jedem Gewebelöcke bis zu 100 Schnitte angefertigt, die jeweils den präfrontalen Cortex, den anterioren cingulären Cortex, die Basalganglien, dem mittleren Thalamus, die hippocampale Formation bzw. das Cerebellum enthielten.

Nach einer etwa halbstündigen Trocknungszeit bei Raumtemperatur wurden die Gewebsschnitte in luftdicht schließenden Plastikdosen bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bzw. Fixierung gelagert.

Während des Schneidens wurde nach jeweils 20 wie eben geschildert einzulagernden Schnitten ein zusätzlicher Schnitt zur histologischen Beurteilung angefertigt, welcher nicht eingefroren, sondern luftgetrocknet und später mit Thioninblau gefärbt wurde.

Außerdem wurden nach der Anfertigung jeder Schnittserie jeweils etwa 20-40 Schnitte in ein steriles Gefäß aufgenommen und ebenfalls bei -80°C tiefgefroren. Dieses Schnittmaterial wurde

dann weiter homogenisiert und die darin enthaltene mRNA isoliert.

Dieses Verfahren zur mRNA-Gewinnung bietet zwei Vorteile: Zum einen ist genau bekannt, aus welcher anatomischen Struktur die mRNA gewonnen wird, zum anderen liegt das Hirngewebe in dünnen Schnitten vor. Dieses lässt sich leicht homogenisieren und aufschließen, so dass die mRNA-Isolation eine höhere Ausbeute mit besserer Reinheit ergibt.

3.2. *In situ* Hybridisierung

Zum Nachweis von mRNA stehen mit dem Northern Blotting, der *in situ* Hybridisierung (ISH) und der RT-PCR drei Verfahren zur Verfügung. Die RT-PCR hat unter diesen Verfahren die höchste Sensitivität. Northern-Blotting und RT-PCR gelten auch als spezifischer als die ISH. Die *in situ* Hybridisierung (ISH) bietet jedoch insofern einen großen Vorteil, als sich Nukleinsäuren direkt in den zu untersuchenden Geweben nachweisen lassen, wodurch sie gegenüber den anderen mRNA-Nachweisverfahren wie dem Northern-Blotting oder der RT-PCR die anatomische und histologische Zuordnung der mRNA-Expression ermöglicht.

Alle mRNA-Nachweisverfahren beruhen auf der Bildung von Doppelsträngen komplementärer Abschnitte von Nukleinsäuren. Bei der ISH wird eine markierte einzelsträngige Nukleinsäuresequenz, auch Probe oder Sonde genannt, zur Hybridisation direkt mit dem zu untersuchenden Gewebe in Kontakt gebracht. Dort bildet die Probe mit der nachzuweisenden komplementären mRNA-Sequenz der Zelle durch Basenpaarung doppelsträngige Hybride, die durch eine radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung der Sonde sichtbar gemacht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine ISH mit Oligonukleotid-Proben und radioaktiver Markierung angewendet. Oligonukleotid-Proben sind sehr vielseitig und eignen sich insbesondere auch zum Nachweis von mRNA Splice-Varianten. Die radioaktive Markierung bietet unter den zur Verfügung stehenden Markierungsmethoden die höchste Sensitivität.

Bei der ISH wird die markierte Sonde zunächst in einem Hybridisierungspuffer auf die fixierten Schnitte aufgebracht und inkubiert. In einem anschließenden Waschschritt wird nicht oder unspezifisch gebundene Probe entfernt und anschließend die Hybride detektiert.

Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers, wie auch die Hybridisierungstemperatur und -dauer ermöglichen bei möglichst optimaler Zusammensetzung und Auswahl die maximale Ausbeute an RNA-Oligonukleotid-Hybriden.

Zur Wahl der Hybridisierungstemperatur und -dauer bei ISH-Experimenten existiert eine umfangreiche Literatur. Insbesondere kann man auf theoretische Erwägungen und experimentelle Untersuchungen zurückgreifen, die Dynamik und Kinetik der ISH allgemein beschreiben.

So finden sich in der Literatur unterschiedliche Näherungsformeln zur Berechnung des Schmelzpunkts von RNA-Oligonukleotid-Hybriden (T_m) unter den gegebenen Bedingungen, wobei die folgende für die ISH mit Oligonukleotiden in bester Näherung anzuwenden ist:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times \log [I^+] + 0,41 \times (\%GC) - (600/L) - 0,63 \times (\%Form.) \quad (\text{Formel 1})$$

diese Formel gilt für Oligonukleotide einer Länge (L) von 14 bis 70 Basen; $[I^+]$, Konzentration an einwertigen Ionen; %GC, GC-Gehalt des Oligonukleotids; %Form., prozentualer Gehalt an Formamid im Hybridisierungspuffer (Sambrook et al. 1989).

Für den hier verwendeten Hybridisierungspuffer gilt somit:

$$T_m = 47,32 + 0,41 \times (\%GC) - (600/L) \quad (\text{Formel 2})$$

für $[I^+] = 0,69M$ und $(\%Form.) = 50\%$

Es ist jedoch zu beachten, dass diese Formel den Schmelzpunkt (T_m) der Hybride angibt, d.h. bei dieser Temperatur liegen mRNA und Oligonukleotide zu gleichen Teilen als Einzelstränge und als Hybride aus beiden vor.

Auch zum Zeitpunkt, an dem der größtmögliche Anteil an Hybriden entstanden ist, gibt es theoretisch-mathematische Überlegungen. Hierbei handelt es sich jedoch um Formeln, die ihre Gültigkeit nur für kleine Volumina, wässrige Medien und ein homogenes Reaktionskompartiment haben (Meinkoth und Wahl 1984). Die bei der ISH vonstatten gehende Hybridisierung erfolgt jedoch im Gewebe mit vielen, ganz unterschiedlichen und nicht vorhersagbaren Kompartimenten. Zudem ist der in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gebrachte Hybridisierungspuffer nicht wässrig.

Es hat sich daher in der Praxis der ISH bewährt, die zur Verfügung stehenden Formeln zur Hybridisierungstemperatur und -dauer als Anhaltspunkt zu beachten, bei der Hybridisierung selbst die Bedingungen jedoch empirisch zu optimieren und dann für die verschiedenen Oligonukleotide möglichst konstant zu halten.

Der verwendete Hybridisierungspuffer besteht im wesentlichen aus einer 50%igen Formamid-Lösung, der langkettiges Dextran (10%) zugesetzt wird. Salzgehalt und Pufferkapazität sind auf SSC und Natriumphosphat-Puffer (gesamt $[Na^+] = 0,69 M$) zurückzuführen. Wie sich bereits in Formel 1 zeigt, beeinflussen der Formamidgehalt und die Na^+ -Konzentration des Puffers die theoretische Hybridisierungstemperatur wesentlich mit. Das zugefügte Dextran ermöglicht durch die Viskositätserhöhung einen praktikableren Umgang auf den Schnitten und verringert das Reaktionsvolumen, ohne dabei selbst zu reagieren. Auch ein positiver Einfluss auf die Penetration des Gewebes durch hochmolekulares Dextran wird diskutiert.

Als weitere Hilfsstoffe, die sich empirisch bewährt haben, unspezifisches Hintergrundsignals zu reduzieren, sind Natriumpyrophosphat, Poly-Adenylat, Denhardt's Lösung sowie hydrolysierte DNA-Fragmente dem Hybridisierungspuffer zugefügt. Poly-Adenylat wird zugegeben, um unspezifische Interaktionen der Poly-A-Ketten der markierten Oligonukleotid-Proben zu verhindern. Die einzelsträngigen DNA-Fragmente und die Denhardt'sche Lösung minimieren die unerwünschte Hybridbildung mit genomischer DNA. Das Natriumpyrophosphat besetzt

Bindungsstellen von nach der Aufreinigung der radioaktiv-markierten Proben ggf. verbliebenen Mononukleotiden (Wisden und Morris 2002).

Nach der eigentlichen Hybridisierung werden durch Waschen der Gewebsschnitte unspezifisch oder unvollständig hybridisierte Oligonukleotide entfernt. Dies erfolgt in Waschlösungen aus SSC; zunächst mit einer mäßig über jener der Hybridisierung liegenden Temperatur, gefolgt von Waschungen bei Raumtemperatur und absteigender Ionenstärke (sog. stringentes Waschen).

Zur Optimierung der Hybridisierungstemperatur und -dauer sowie des Signal- zu Hintergrundverhältnisses wurde im Vorfeld dieser Untersuchungen Vorversuche durchgeführt. Hierdurch ließen sich durch Zusatz von DTT (10mM) zum Hybridisierungsansatz, einer Hybridisierungstemperatur von 42°C und einer Hybridisierungszeit von 48 Stunden optimale Ergebnisse erzielen.

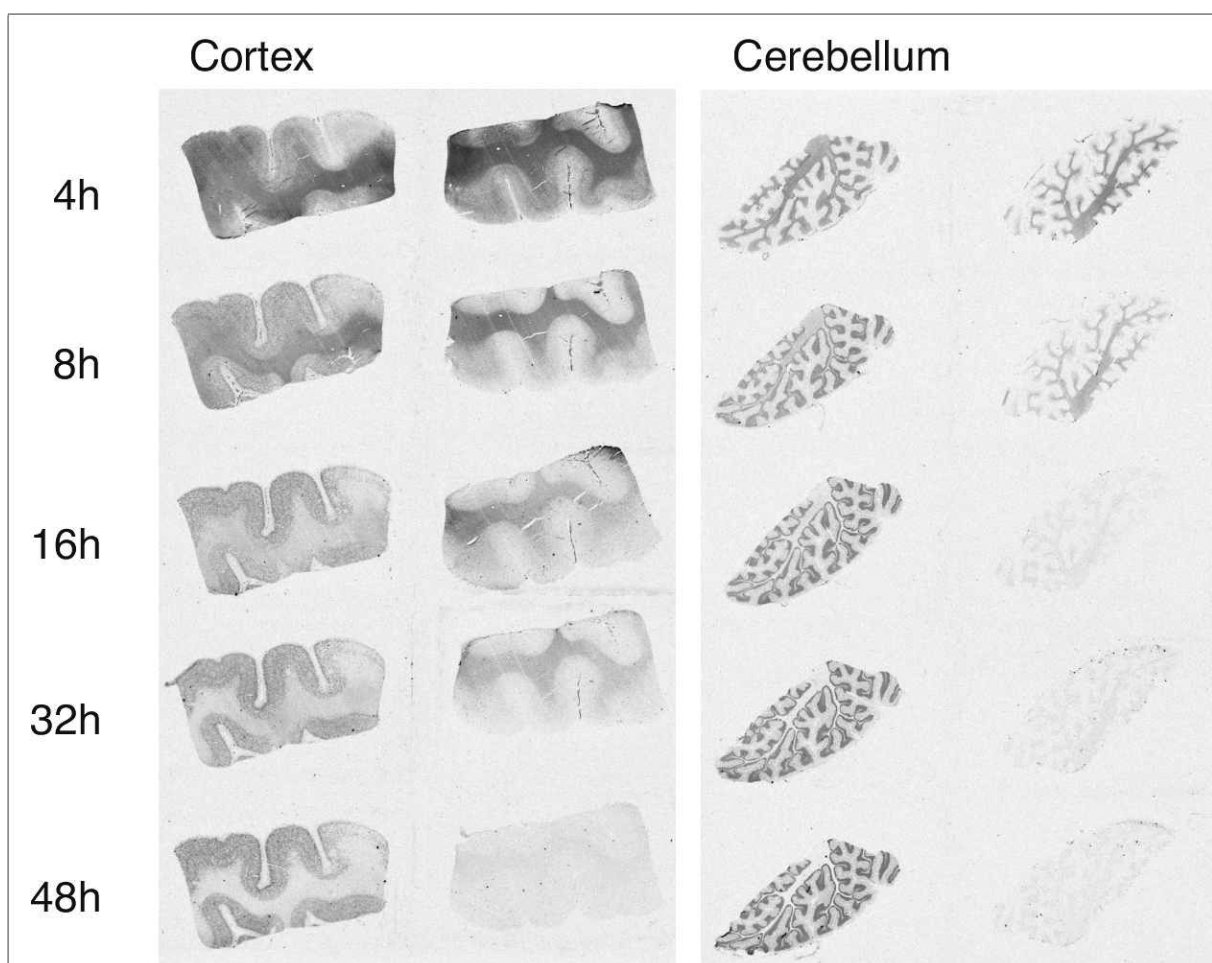


Abb. 3.1. Dargestellt ist der Einfluss der Hybridisierungszeit (4-48 Stunden) auf das Verhältnis aus Signal (jeweils linke Reihe) und unspezifischem Hintergrund (jeweils rechte Reihe; Negativ-Kontrolle mit Zusatz unmarkierter Probe im Überschuss) bei einer ISH in Cortex- und Kleinhirnpräparaten. Deutlich ist eine Abnahme des unspezifischen Signals (v.a. in der weißen Substanz) und die Zunahme des spezifischen Signals mit ansteigender Hybridisierungsdauer festzustellen. Bei den nachgewiesenen Transkripten handelt es sich um mGluR5 (Cortex) und mGluR1 (Cerebellum; genauere Angaben zur Expression dieser Rezeptoren bei Berthele et al. 1999)

Als Negativ-Kontrolle, also zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der Oligonukleotid-Probe im Gewebe, sind zwei Verfahren gebräuchlich. Es können entweder parallel zur eigentlichen Hybridisierung Gewebeschnitte mit RNase vorbehandelt werden oder dem Hybridisierungsansatz neben den markierten Oligonukleotiden noch unmarkierte Probe im mehrfachen Überschuss zugegeben werden. Der letzteren Variante ist der Vorzug zu geben, da ein Arbeiten mit RNase die erhebliche Gefahr der Kreuzkontamination und somit einer Degradation der RNA auch in den eigentlich zu untersuchenden Schnitten in sich birgt. Auch entfällt die Optimierung des RNase-Verdau, der in den unterschiedlichen Geweben einen gleichmäßigen und vollständigen Abbau der RNA gewährleisten muss.

Bei den hier durchgeführten Kontrollexperimenten wurde ein 100facher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden verwendet. Bei der spezifischen Hybridbildung mit zellulärer Ziel-mRNA treten dabei unmarkierte und markierte Oligonukleotide in Konkurrenz. Aufgrund der Konzentrationsverhältnisse wird die markierte Probe durch die unmarkierte Probe aus ihrer Bindung an die Ziel-mRNA verdrängt und kann so nach dem Waschschrift der ISH kein Signal mehr geben. Als sogenannter Hintergrund zeigt sich bei diesen Kontrollexperimenten nur eine geringe unspezifische Anlagerung von Oligonukleotid-Probe an Gewebsbestandteile (überwiegend nicht neuronal), welche durch die Poly-[³⁵S]dATP α S-Markierung der Proben bedingt ist.

3.2.1. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Proben werden mittels Terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) und [³⁵S]dATP α S (spezifische Aktivität ca. 1250 Ci/mmol) radioaktiv 3'-endmarkiert. Bei Verwendung des mitgelieferten arsenhaltigen Reaktionspuffers und in Anwesenheit von Co²⁺-Ionen bildet die TdT fast ausschließlich eine Kette aus [³⁵S]dATP α S am 3'-Ende der Oligonukleotide. Die Markierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

- 1) 8,0 μ l TdT-Puffer (5x),
2,4 μ l CoCl₂ (25 mM),
22,6 μ l H₂O_{DEPC},
2,0 μ l des jeweiligen Oligonukleotids (0,36 pmol/ μ l)
3,0 μ l [³⁵S]dATP α S
werden angesetzt und kurz gemischt.
- 2) 2,0 μ l TdT (50 U) werden zugegeben und nur durch leichtes Umrühren vermischt. Es dürfen keine Luftbläschen im Ansatz verbleiben, da diese die Reaktion der TdT hemmen.
- 3) Inkubation für 30 Min. bei 38°C unter leichter Bewegung.
- 4) die Reaktion wird durch Zugabe von 60,0 μ l TNES-Puffer gestoppt und kurz auf Eis gekühlt.
- 5) Während der Inkubation wird aus Chromatographie-Säulen der Lagerungspuffer durch Zentrifugation mit 1000g für 2 Min. bei 4°C entfernt.
- 6) Der Markierungsansatz (100 μ l) wird vollständig auf die Säule gegeben und nach einer etwa 2 minütigen Einwirkzeit mit 1000g für 4 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Polyacrylamid-Gel dieser Säulen ist so beschaffen, dass Nukleotide einer Länge von weniger als 5 Basen zurückgehalten, die markierten längeren Oligonukleotide dagegen eluiert werden.

- 7) 2,0 μl der aufgereinigten markierten Oligonukleotide werden in 3,0 ml eines Szintillations-Cocktails in einem β -Counter (Fa. Wallac NEN) gemessen. Bei den hier markierten Sonden konnten spezifische Aktivitäten von $0,68\text{-}1,22 \times 10^6$ cpm/ μl erzielt werden.
- 8) Um Oxydation und somit Abspaltung der Schwefelgruppen zu vermeiden, wird den einzelnen Markierungsansätzen abschließend 4 μl DTT-Lösung (1M) zugesetzt. Hiernach werden sie bis zur Hybridisierung bei -25°C tiefgefroren.

3.2.2. Fixierung der Gewebeschnitte

Die für die ISH vorgesehenen Kryostatschnitte der einzelnen Gewebsregionen werden aus der Tiefkühltruhe (-80°C) in Raumluft überführt. Nach 30 Min. sind diese aufgetaut und getrocknet. Sie werden nun in Paraformaldehyd fixiert und in Ethanol dehydriert und gelagert:

- 1) Fixierung in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C für 5 Min.
- 2) Waschen der Schnitte in 1x PBS bei Raumtemperatur für 1 Min.
- 3) Dehydrieren der Schnitte in 70% und darauffolgend in 96% Ethanol bei Raumtemperatur für jeweils 5 Min.
- 4) Bis zur Hybridisierung werden die Schnitte in 96% Ethanol bei 4°C gelagert.

3.2.3. Ablauf der *In situ* Hybridisierung

Die markierten Oligonukleotid-Proben werden im Verhältnis 1:100 mit Hybridisierungspuffer verdünnt. Dieser Hybridisierungsansatz wird nach Zugabe von DTT-Lösung (Endkonzentration: 10mM) ausgiebig gemischt. Die Ansätze zur Durchführung der Konrollexperimente (zur Bestimmung unspezifischer Signale, s.o.) enthalten zusätzlich noch das jeweilige unmarkierte Oligonukleotid (0,72 pmol/100 μl Ansatz).

- 1) Auf die Objektträger von unterschiedlicher Größe (je nach Gewebsregion) werden 9,0 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ des Hybridisierungsansatzes pipettiert. Die aufgebrachte Lösung wird durch Auflage von passenden Parafilmstreifen verteilt. Diese verbleiben während der Hybridisierung als Abdeckung auf den Schnitten.
- 2) Die Objektträger werden in Petrischalen gelegt. In diesen befinden sich zusätzlich feuchte Papierknäuel (getränkt mit einer 50% Formamid / 4x SSC Lösung), die das Eintrocknen der Schnitte verhindern.
- 3) Hybridisierung für 48 Stunden bei 42°C in einem Umluftofen.
- 4) Abziehen der Parafilmstreifen und Waschen der Schnitte:
 - i) in 1x SSC für 30 Min. bei 56°C (konstant temperiert im Wasserbad),
 - ii) in 1x SSC für 3 Min. bei Raumtemperatur,
 - iii) in 0,1x SSC für 3 Min. bei Raumtemperatur.
- 5) Dehydrieren der Schnitte:
 - i) in 70% Ethanol für 3 Min. bei Raumtemperatur,
 - ii) in 96% Ethanol für 3 Min. bei Raumtemperatur.
- 6) Trocknen der Schnitte für etwa 30 Min. bei Raumtemperatur.

3.2.4. Semiquantitative Film-Autoradiografie

Exposition und Entwicklung

Die hybridisierten und getrockneten Gewebsschnitte werden auf vorgeschchnittene Pappen mit Klebeband fixiert und zusammen mit einem ^{14}C -Polymer-Standard in Röntgenfilmkassetten gegen Biomax MR[®]-Film exponiert. Nach 28 Tagen werden die Filme bei Raumtemperatur in Entwicklerlösung GBX für 3 Min. entwickelt, kurz (ca. 30 Sek.) in Stopppad getaucht, für 3 Min. in Fixiererlösung GBX fixiert und in entsalztem Wasser für 5 Min. gewässert bevor sie zum Trocknen aufgehängt werden.

^{35}S -spezifische Kalibration

Die verwendeten ^{14}C -Polymer-Standards eignen sich für eine direkte Kalibration von Autoradiografien des Isotops ^{35}S nur bedingt, werden jedoch häufig dafür verwendet, da ^{14}C im Gegensatz zu ^{35}S -Verbindungen eine sehr lange Halbwertszeit (5730 Jahre vs. 87,4 Tage) aufweist und in Polymeren eingeschlossen auch langfristig nicht flüchtig ist.

Hierdurch können mit ^{14}C -Polymer-Standards zwar sehr konstante Werte erzielt werden, diese stehen jedoch in keiner einfachen d.h. linearen Beziehung zur Aktivität von ^{35}S -markierten Proben (Miller et al. 1988; Miller 1991).

Deshalb wurden hier die ^{14}C -Polymer-Standards ihrerseits unter Zuhilfenahme von ^{35}S -haltigen Gewebeproben geeicht. Hierzu wurde eine geringe Menge kortikalen Gewebes homogenisiert und je 500 mg hiervon mit 15 verschiedenen Konzentrationen eines ^{35}S -haltigen Nukleotids durch intensives Mischen versetzt, in zylindrischer Form eingefroren und im Kryostaten in einer Dicke von 20 μm geschnitten. Die so gewonnenen Schnitte von „Brain Paste“ mit abgestufter ^{35}S -Aktivität wurden für die Dauer der bei der ISH üblichen Film-Expositionszeit (28 Tage) bzw. des [^{35}S]GTP γ S-Assays (68 Stunden) mit den ^{14}C -Polymer-Standards koexponiert. Der optischen Dichte der Autoradiografie eines jeden Feldes des ^{14}C -Standards kann so eine gewebsäquivalente Aktivität gültig für ^{35}S -Isotop markierte Autoradiografien und o.g. Expositionszeiten zugeordnet werden (Abb. 3.2.). Der Vorteil der Methode ist, dass nach einmaliger Kalibrierung der ^{14}C -Polymer-Standards dieser unter Einhaltung identischer Bedingungen nahezu unbegrenzt als ^{35}S -geeichte Standards wieder verwendet werden können.

Auswertung der Film-Autoradiografien

Die Film-Autoradiografien werden mit einem Flachbettscanner mit einer Auflösung von 600 dpi eingelesen. Hierbei wurden konstante Bedingungen (Helligkeit, Kontrast, schwarz/weiß-Gradation) für alle Einzelscans eingehalten. Im Weiteren ist die Auswertung mit der Software Object-Image 2.10 (Vischer 2002) auf einem Apple Computer erfolgt. Dieses Programm stellt eine Weiterentwicklung der zur Densitometrie von Autoradiografien weit verbreiteten NIH-Image-Software dar. Zunächst wurden die Grauwerte der ^{14}C -Standards gemessen, den gewebsäquivalenten und ^{35}S -spezifischen Aktivitäten zugeordnet und dann die Autoradiogramme

mit der Rodbard-Funktion kalibriert. Die anschließenden Messungen der einzelnen anatomischen Regionen ergeben dann direkt die Aktivität bezogen auf das Gewebsgewicht (nCi/g).

Bei der hier dargestellte Auswertung wurden auch die Autoradiografien der Kontrollexperimente ausgemessen. Das, wenn auch niedrige Signal der unspezifischen Bindung wurde von den Messwerten der anderen Experimente subtrahiert.

3.2.5. Semiquantitative Emulsions-Autoradiografie

Exposition, Entwicklung und Gegenfärbung

Parallel zu den Schnitten für die Film-Autoradiografie wurden für alle Hirne und Regionen Gewebsschnitte für die Emulsions-Autoradiografie hybridisiert. Bei diesem Verfahren entstehen über den einzelnen signaltragenden histologischen Strukturen kleine Silberkörnchen (Grains), welche mikroskopisch zugeordnet und gemessen werden können.

Unter strikten Dunkelkammerbedingungen mit einer Rotlichtlampe werden die einzelnen hybridisierten Schnitte in bei 43°C im Wasserbad geschmolzene Fotoemulsion getaucht und senkrecht in einem lichtdichten Behältnis zum Trocknen aufgestellt.

Die weitere Exposition erfolgt in lichtdichten Objektträgerkästen bei 4°C für 56 Tage. Hiernach werden die emulsionsbeschichteten Schnitte, wiederum in der Dunkelkammer, bei 17°C für 3 Min. entwickelt (Entwickler D19), für 2 Min. fixiert (Fixierer RT2000) und zweifach für 10 Min. gewässert. Die Trocknung erfolgt möglichst staubfrei und bei Raumtemperatur. Zur mikroskopischen Identifikation werden die emulsionsbeschichteten Gewebe mit einer modifizierten Nissl-Methode gefärbt:

- 1) Färbung in 0,05% Thioninlösung.
- 2) Differenzierung in
 - i) 70% Ethanol für 1 Min. 30 Sek.,
 - ii) 96% Ethanol für 30 Sek.,
 - iii) zweimalig 100% Ethanol für 1 Min.
- 3) Überführung in Xylolersatz für 5 Min.
- 4) Eindecken der gefärbten Emulsions-Autoradiografien.

Auswertung der Emulsions-Autoradiografie

Zur Quantifizierung werden die einzelnen Zellpopulationen der jeweiligen Hirnregionen mikroskopisch bei 500facher Vergrößerung identifiziert und mit einer Videokamera parallel im Hellfeld und im Dunkelfeld aufgezeichnet. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme der Software Optimas 5.0, welche im Weiteren die manuelle Definition der Zellgrenzen und Messung der Zellfläche (im Hellfeldbild) und Bestimmung der Fläche der Grains über den definierten Zellen (im Dunkelfeldbild) erlaubt. Die Ergebnisse repräsentieren die Grainfläche in μm^2 bezogen auf $1000 \mu\text{m}^2$ Zellfläche.

Eine Kalibration dieses Signals mit Isotopen-Standards ist aufgrund seiner mikroskopischen und punktuellen Natur nicht zu bewerkstelligen (eigene Beobachtungen). Damit eignet sich diese

Methode in erster Linie zur qualitativen Beschreibung der zellulären Expression und Identifikation spezifischer Zellpopulationen, welche die mRNA exprimieren. Relative Vergleiche des Expressionsniveaus zwischen Schnitten des gleichen Experiments, die mit dem identischen Oligonukleotid hybridisiert worden sind, sind zwar eingeschränkt möglich, versuchsunabhängige Aussagen über die absolute Höhe der zellulären Signalaktivität dagegen nicht. Auch ist keine Korrektur der Messwerte um einen ggf. unspezifischen Hintergrund durchführbar. Aus Kontrollexperimenten lässt sich jedoch ein empirischer Schwellenwert für das Hintergrundsignal angeben. Dieser liegt bei etwa $10 \mu\text{m}^2$ Grainfläche / $1000 \mu\text{m}^2$ Zellfläche.

3.3. Revers transkribierte Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird mRNA durch eine PCR amplifiziert. Hierzu wird zunächst mRNA revers transkribiert (RT). Die so erhaltene cDNA kann dann in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden. Durch die Auswahl geeigneter PCR-Primer und Einbeziehung von Kontrollreaktionen muss sichergestellt werden, dass die Amplifikate ihren Ursprung aus der mRNA-Expression des untersuchten Gewebes haben und nicht von einer DNA-Kontamination herrühren.

3.3.1. Isolation von Gesamt-RNA

Als erster Schritt der RT-PCR muss eine RNA-Isolation durchgeführt werden. Hierzu stehen Verfahren zur Verfügung, die entweder die Gesamt-RNA oder die mRNA-Fraktion isolieren. Trotz theoretischer Vorteile einer mRNA-Isolation (nur diese RNA-Fraktion soll später revers transkribiert werden), ist die Isolation der Gesamt-RNA das verlässlichere Vorgehen, insbesondere weil hierbei weniger Arbeitsschritte und damit Fehlermöglichkeiten entstehen.

Bei der Isolation von Gesamt-RNA aus Gehirnmaterial haben sich säulenbasierte Extraktionen mit RNA-affinen Harzen als untauglicher gegenüber Verfahren mit Phenol erwiesen. Das lipidreiche Gewebe verstopft in bereits kleiner Menge die Säulen und führt so zu geringerer Ausbeute an RNA. Außerdem kommt es zu ähnlich hohen DNA-Restgehalten wie bei den mit phenolischer Phasentrennung arbeitenden Methoden.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt daher mit einem monophasischen Phenol/Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch (Trizol[®]). Isoliert wird die Gesamt-RNA aus den Homogenaten von präfrontalem Cortex, Basalganglien, Thalamus, Hippocampus und Kleinhirn. Nach der Isolation wurden die Isolate aus verschiedenen Gehirnen, aber identischen Regionen, zu gleichen Teilen gepoolt:

- 1) Zu 300-400mg Gewebe werden 4,0 ml Trizol[®] gegeben und sofort kräftig gemischt.
- 2) Homogenisieren dieser Gewebssuspension von Hand für 2 Min.
- 3) Zentrifugation mit 12.000g für 10 Min. bei 4°C.
- 4) Dekantieren des Überstands und Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 5) Zugabe von 1,6 ml Chloroform und kräftiges Schütteln für 15 Sek.
- 6) Inkubation für 3 Min. bei Raumtemperatur und Zentrifugation mit 12.000g für 15 Min. bei

- 4°C.
- 7) Abpipettieren der oberen wässrigen Phase (welche die RNA enthält) und Fällung der RNA durch Zugabe von 2 ml 100% Isopropanol.
 - 8) Inkubation bei Raumtemperatur für 10min, nachfolgend Zentrifugation mit 12.000g für 10 Min. bei 4°C. Am Boden des Cups ist nun ein zartes RNA-Pellet sichtbar.
 - 9) Waschen des Pellets mit 2 ml 75% Ethanol und Zentrifugation mit 7500g für 5 Min. bei 4°C.
 - 10) Überstand verwerfen und RNA-Pellets bei 70°C trocknen.
 - 11) Lösen der RNA in 100µl H₂O_{PCRgrade} durch wiederholtes Mischen und Inkubation für 10 Min. bei 60°C.
 - 12) Fotometrische Bestimmung der Quantität und Reinheit des RNA-Isolats.
 - 13) Lagerung der Isolate bei -80°C.

3.3.2. Reverse Transkription (RT)

Die über alle Gehirne gepoolten, aber nach Regionen getrennte Gesamt-RNA-Isolate werden in die RT-Reaktion eingesetzt. Die Selektion der mRNA aus der Gesamt-RNA erfolgt durch den Einsatz eines Oligo dT-Primers in der RT-Reaktion.

Es werden von jedem RNA-Pool zwei RT-Reaktionen angesetzt, die sich nur dadurch unterscheiden, dass einmal das Enzym Reverse Transkriptase zugefügt (RT-Ansatz) und einmal durch Wasser ersetzt wird (No-RT-Ansatz als Kontrollreaktion). Im einzelnen erfolgt die Synthese der cDNA durch:

- 1) Auftauen und Verdünnen der RNA auf eine einheitliche Konzentration von 0,2 g/l.
- 2) Zweifacher Ansatz von jeweils:
 - 5.0 µl H₂O_{PCRgrade}
 - 1.0 µl Oligo dT₁₂₋₁₈
 - 1.0 µl dNTP-Mix (10mM)
 - 5.0 µl RNA (0,2 µg/µl; gepoolt)
- 3) Inkubation bei 65°C für 5 Min.
- 4) Zugabe von jeweils:
 - 4,0 µl First-Strand Puffer (5x)
 - 2,0 µl DTT (0,1M)
 - 1,0 µl RNaseOUT (RNase-Inhibitor).
- 5) Inkubation bei 42°C für 2 Min.
- 6) Zugabe von jeweils
 - 1,0 µl Reverse Transkriptase (Superscript II®) im RT-Ansatz oder
 - 1,0 µl H₂O_{PCRgrade} im No-RT-Ansatz.
- 7) Mischen und Inkubation bei 42°C für 50 Min. gefolgt von 70°C für 15 Min.
- 8) Kühlung der cDNA für kurze Zeit bei 4-8°C.

3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR für die hier verwendeten cDNAs wurde empirisch optimiert. In die PCR werden neben der cDNA noch der dazugehörige No-RT-Ansatz und für jedes Primerpaar Wasser zur Negativkontrolle eingesetzt. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass ein Amplifikat aus einer DNA-Kontaminationen (aus dem Gewebe oder der Umgebung) entstanden ist. Zur Reaktion mit einem Primerpaar werden die Reagenzien für die einzelnen Proben insgesamt in einem „Mastermix“ angesetzt, um mögliche Pipettierfehler zu egalisieren:

- 1) PCR-Mastermix (pro Ansatz):
 - 38.0 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCRgrade}}$
 - 5.0 μl PCR-Puffer (10x)
 - 1.5 μl MgCl_2 (50mM)
 - 1.0 μl dNTP-Mix (10mM)
 - 1.0 μl Primer sense (10 μM)
 - 1.0 μl Primer antisense (10 μM)
 - 0.5 μl Taq DNA Polymerase.
- 2) Zugabe und Mischen von jeweils 2,0 μl cDNA (bzw. No-RT-Ansätze oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCRgrade}}$ für Negativ-Kontrollen) in 48,0 μl PCR-Mastermix.
- 3) Überschichten der Ansätze mit 1-2 Tropfen Mineralöl.
- 4) Inkubation im PCR-Block mit folgendem Programmablauf:
 - i) Aufschmelzen bei 94°C für 4 Min.
 - ii) 40 Zyklen mit
 - 94°C für 30 Sek.
 - 56°C für 45 Sek.
 - 70°C für 1 Min.
 - iii) Elongation des Produkts bei 70°C für 10 Min.
- 5) Kühlung bei 4-8°C für 10 Min.

3.3.4. Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden in einem 2%igen Agarosegel bei 130 V und 80 mA in einer Elektrophoreseeinheit für 120 Min. unter TAE-Laufpuffer aufgetrennt.

3.4. Auswahlkriterien für Oligonukleotid-Sonden und Primer

Für die beiden hier zum Nachweis von mRNA verwendeten Methoden in den Gewebsschnitten (ISH) bzw. im Gewebshomogenat (RT-PCR) ist die Auswahl der Sonden von größter Bedeutung. Das Hauptkriterium für die Sondauswahl ist die 100%ige Komplementarität zum nachzuweisenden Transkript ohne an weitere genetische Sequenzen des Menschen in nennenswerter Weise zu binden. Dies wird hier durch ausführliche Datenbank-Recherche sichergestellt (NIH BLAST).

Jedoch sind komplementäre Proben nicht allein für ein Gelingen dieser Methoden ausschlaggebend. So ist die Hybridbildung der Oligonukleotide mit den mRNA-Transkripten (ISH) oder der Primerpaare mit der cDNA (bei der RT-PCR) abhängig von deren Gehalt an Guanin-Cytosin-Brücken (GC-Gehalt). Dieser bestimmt durch die höhere Bindungsenergie (im Vergleich zu Adenin-Thymin-Bindungen) die Anlagerungstemperatur wie auch die Schmelztemperatur der Hybride. Angestrebt wird hier für die Primer zur RT-PCR der Bereich von 40-60% und für die Oligonukleotide von 45-67,5%.

Die Effizienz dieser Methoden kann zudem durch sich wiederholende Strecken von Adenosin oder Thymin in der Sequenz der Sonden (Runs), wie auch deren Bereitschaft, mit sich selbst im Sinne einer Dimerisierung oder eines sogenannten Hairpins (Bindung des 3'-Endes der Probe an ihr 5'-Ende) eine Brückenbindung einzugehen, negativ beeinflusst werden (Breslauer et al. 1986; Freier et al. 1986; Groebe und Uhlenbeck 1988).

Zur Vermeidung dieser Phänomene sind bei der Auswahl der Oligonukleotide die Untersuchungen von Erdtmann-Vourliotis et al. (1999) berücksichtigt worden. Gemäss der dort beschriebenen Kriterien werden hier Oligonukleotide verwendet, welche einen Schmelzpunkt von 48°C bis 60°C (unter den hier verwendeten Hybridisierungsbedingungen), eine freie Energie der Hairpins von 0 bis -4,7kcal/mol und höchstens fünf aufeinanderfolgende identische Basen aufweisen.

Beim Design der Primer zur RT-PCR werden (unter Zuhilfenahme des Programms Primer 5.0) ein Schmelzpunkt der Primer von 51,0°C bis 63,0°C, eine freie Energie bei der Bindung des 3'-Endes der Primer von -6,5 bis -9,0 kcal/mol und Runs und Hairpin-/Dimerbindungen von weniger als 4 Basen als Einschlusskriterien eingehalten.

Bei der Planung der Oligonukleotide der GABA_{B1} Rezeptor Splice-Varianten trat Sequenz-bedingt folgendes Problem auf: Die Varianten GABA_{B1C-hum} und GABA_{B1E} werden durch Deletion zweier verschiedener Abschnitte aus der mRNA der GABA_{B1A} Rezeptoren gebildet (Abb. 3.3.). Ein Oligonukleotid zur Detektion der GABA_{B1A} Rezeptoren-mRNA kann demnach nur so gelegen sein, dass entweder die mRNA der GABA_{B1C-hum} oder jene der GABA_{B1E} Rezeptoren zusätzlich nachgewiesen wird. In Vorversuchen wurden bereits deutlich, dass mRNA der GABA_{B1E} Rezeptoren sehr umschrieben und zugleich sehr niedrig exprimiert wurde, weshalb im Verlauf ein Oligonukleotid verwendet wurde, welches an die mRNA der GABA_{B1A} und zugleich GABA_{B1E} Rezeptor-Subtypen binden kann.

In den folgenden beiden Abbildungen sind die Sequenzen der hier untersuchten GABA_B Rezeptoren und die Lage der zur Detektion der mRNA-Expression verwandten Oligonukleotide und Primerpaare dargestellt (die Sequenzen sind zudem ausführlich im Anhang 7.1. wiedergegeben).

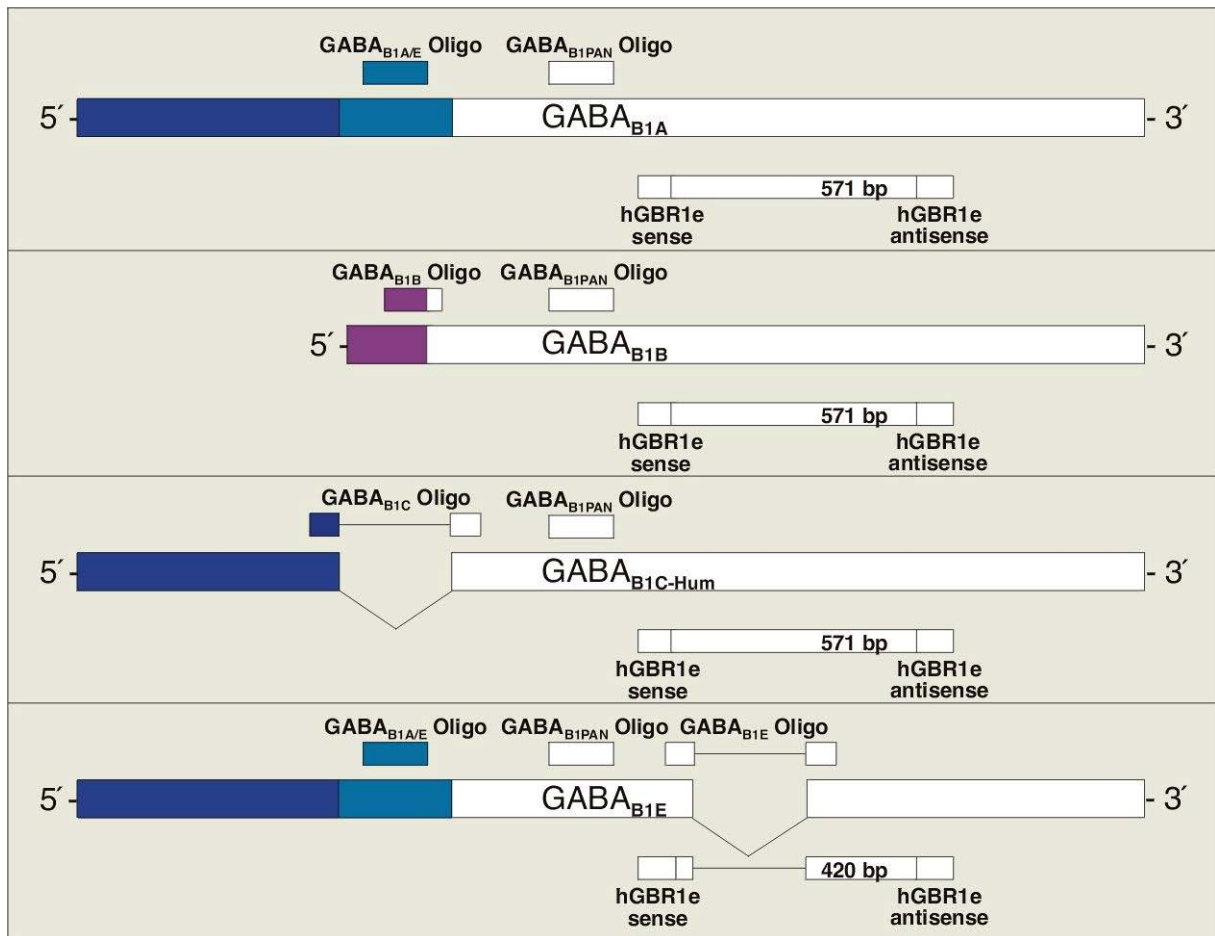


Abb. 3.3. Schematische Darstellung der mRNA-Sequenzen der humanen GABA_{B1} Splice-Varianten 1A, 1B, 1C-hum und 1E.

Zusätzlich sind über den jeweiligen Sequenzen die Positionen der verwendeten Oligonukleotide (zur *in situ* Hybridisierung) und darunter die Lage des Primerpaars (für die RT-PCR) zum Nachweis der GABA_{B1E} Rezeptoren und die Länge der spezifischen Amplifikate dargestellt (identische Sequenzabschnitte sind gleichfarbig dargestellt; nicht maßstabgetreue Darstellung; gezeichnet nach den Angaben in Kaupmann et al. 1997; Clark et al. 2000; Schwarz et al. 2000)

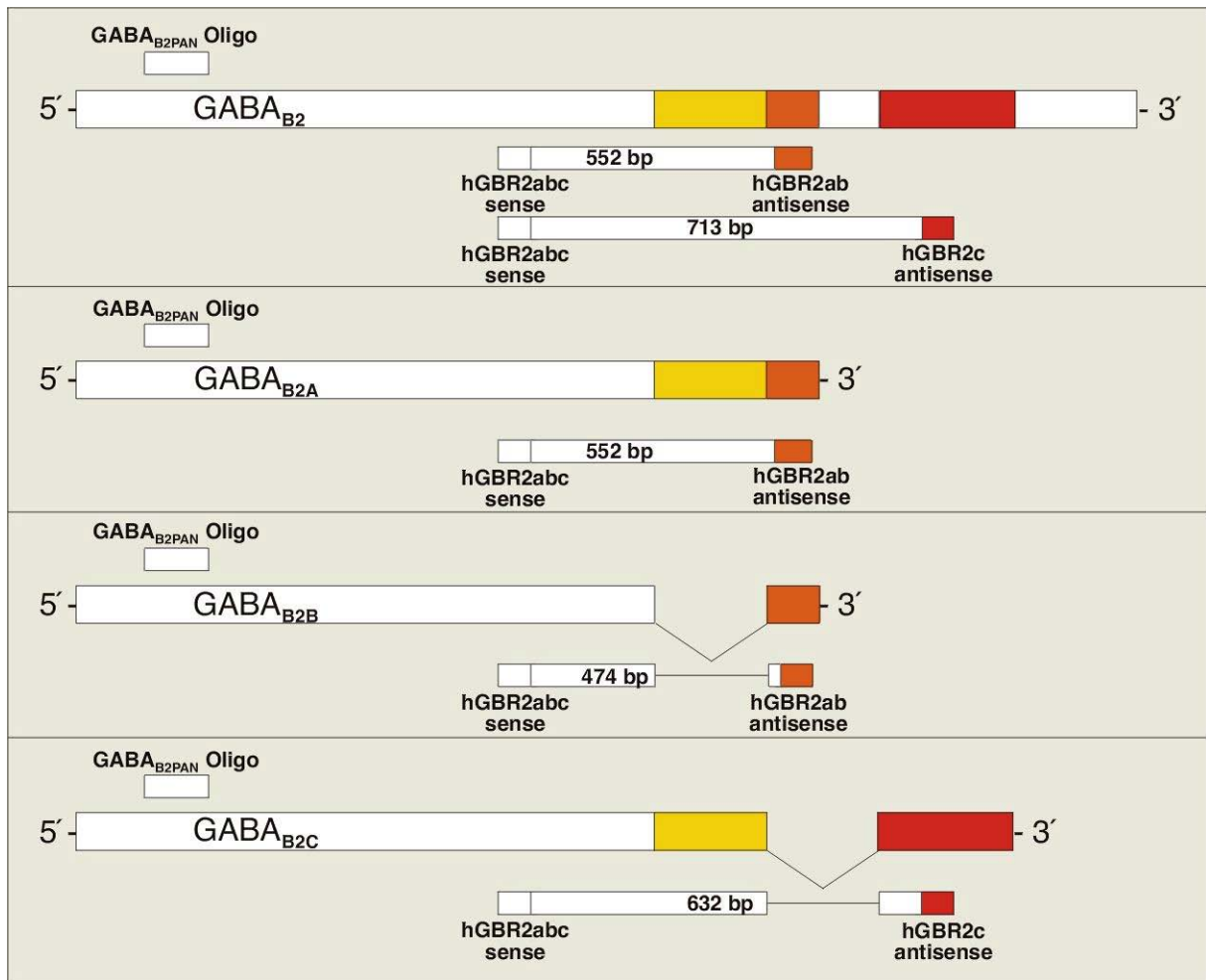


Abb. 3.4. Schematische Darstellung der mRNA-Sequenzen der ursprünglich beschriebenen humanen GABA_{B2} Rezeptor-Sequenz (obenstehend) und der GABA_{B2} Splice-Varianten 2A, 2B, 2C. Zusätzlich sind über den jeweiligen Sequenzen die Positionen des verwendeten Oligonukleotids (zur *in situ* Hybridisierung) und darunter die Lage der Primerpaare (für die RT-PCR) zum Nachweis der GABA_{B2} Splice-Varianten und die Länge der spezifischen Amplifikate dargestellt (identische Sequenzabschnitte sind gleichfarbig dargestellt; nicht maßstabsgetreue Darstellung; gezeichnet nach den Angaben in White et al. 1998; Clark et al. 2000)

3.5. Immunohistochemie

Die immunhistochemischen Reaktionen erfolgen mit primären Antikörpern (aus Meerschweinchen gewonnen) gegen die GABA_{B1} bzw. GABA_{B2} Rezeptor-Proteine. An diese wird ein sekundären Antikörper gegen Meerschweinchen-IgG, welcher mit Biotin versehen ist, gebunden. Dieses Biotin bildet in einer weiteren Reaktion einen makromolekularen Biotin/Avidin-Merettichperoxidase-Komplex (ABC-Komplex). Die Färbung wird schließlich durch einen Peroxidase-vermittelten Umsatz von Diaminobenzidin (DAB) erzielt. Dieses Vorgehen beinhaltet eine Signalverstärkung, da mehrere ABC-Komplexe an einem Zweitantikörper binden, welche ihrerseits viele DAB Moleküle umsetzen können.

Die Spezifität der verwendeten Primärantikörper gegen die GABA_{B1} bzw. GABA_{B2} Rezeptoren der Ratte ist mehrfach belegt worden (Yung et al. 1999; Durkin et al. 1999; Jones et al. 1998; Martin et al. 1999). Es handelt sich um polyklonale Antikörper. Die Sequenzen der bei der Herstellung der Antikörper zur Immunisierung verwendeten Proteinfragmente der GABA_{B1} bzw. GABA_{B2} Rezeptoren stimmen für beide Rezeptoren in Mensch und Ratte überein (für den GABA_{B1} Rezeptor aus Exon 18 bzw. für den GABA_{B2} Rezeptor aus dem in beiden Spezies konservierten C-terminalen Ende des Rezeptors; Auskunft der Fa. Chemicon), weshalb auch die Spezifität für die humanen Rezeptoren mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann.

Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen des Zweitantikörpers, des ABC-Komplexes oder der Färbung wurden zusätzliche Gewebeschnitte mit Puffer ohne den primären Antikörper inkubiert und in Folge wie die Schnitte mit einem Primärantikörper behandelt.

3.5.1. Fixierung der Gewebeschnitte

Für den immunhistochemischen Nachweis werden Kryostatschnitte der einzelnen Geweberegionen aufgetaut und an Raumluft für 30 Min. getrocknet.

- 1) Fixierung in 4% Paraformaldehyd/0,4% Pikrinsäure-Lösung bei 4°C für 30 Min.
- 2) Zweifaches Waschen der Schnitte in 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 Min.

3.5.2. Ablauf der Immunohistochemie

Unmittelbar nach der Fixierung der Schnitte wird fortgefahren, wobei ein Eintrocknen der Schnitte unbedingt zu vermeiden ist:

- 1) Inkubation in Blockierungspuffer (PBSTN) für 60 Min. bei Raumtemperatur.
- 2) Inkubation mit den Primärantikörpern (anti-GABA_{B1} 1:500; anti-GABA_{B2} 1:250 in PBSTN; für die Kontrollreaktion PBSTN ohne Antikörper) für 18 Stunden bei 6°C.
- 3) Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1x PBS für je 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 4) Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (1:25 in PBSN) für 60 Min. bei Raumtemperatur.
- 5) Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1x PBS für je 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 6) Inkubation mit ABC-Komplex (1:25 in 1x PBS) für 60 Min. bei Raumtemperatur.

- 7) Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1x PBS für je 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 8) Farbreaktion mit Diaminobenzidin-Lösung für 10 Min. bei Raumtemperatur.
- 9) Waschen der Schnitte in H₂O für 5 Min. bei Raumtemperatur.
- 10) Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) für je 2 Min.
- 11) Überführen in Xylolersatz für 5 Min. und Eindecken der Schnitte.

3.5.3. Auswertung der Immunohistochemie

Die immunohistochemisch gefärbten Gewebeschnitte werden lichtmikroskopisch beurteilt und die Stärke der immunohistochemischen Reaktion durch eine semiquantitative Bewertung in nicht-, schwach-, mittelgradig- oder stark-immunopositiv eingeteilt.

3.6. Agonisten-stimulierter [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay

Mit dieser Methode kann die Aktivierung G $\alpha_{i/o}$ -Protein-gekoppelter Rezeptoren durch den entsprechenden Agonisten in Gewebeschnitten dargestellt werden. Für die GABA_B Rezeptoren wurden hier die Agonisten Baclofen und GABA verwendet.

Im Unterschied zu Rezeptorbindungsstudien, die allein die membranständige Expression des Rezeptor-Proteins aufzeigen, kann mit dieser Methode nachgewiesen und quantifiziert werden, ob der Rezeptor auch an eine intrazelluläre Signalkaskade angekoppelt ist, es sich also tatsächlich um einen funktionellen Rezeptor handelt.

Der hier verwendete [³⁵S]GTP γ S-Assay wurde ursprünglich als sensitive Methode zur Untersuchung der Rezeptorinteraktion mit G-Proteinen in Membranpräparationen entwickelt (Hilf et al. 1989; Traynor und Nahorski 1995). Der [³⁵S]GTP γ S-Assay basiert auf der Tatsache, dass in seiner inaktiven Form die G α -Untereinheiten eine größere Affinität zu GDP im Vergleich zu GTP aufweisen.

Aktiviert nun ein Agonist einen G $\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptor, so verändert sich die Affinität der G α -Untereinheit für GDP zu Gunsten von GTP. Dies wird gefolgt von einer Abspaltung von G α -GTP von der G $\beta\gamma$ -Untereinheit, welche nun beide intrazelluläre Effekte entfalten können. Die Wirkung des G α -GTP wird durch GTPase-katalysierte Hydrolyse beendet, wodurch wieder G α -GDP entsteht, welches dann erneut zur Rekonstitution des an einen Rezeptor gebundenen G-Proteins dient.

Beim [³⁵S]GTP γ S-Assay wird anstelle von GTP das nicht hydrolysierbare [³⁵S]GTP γ S im Überschuss eingesetzt. Dieses blockiert nach Stimulation des Rezeptors das freigesetzte G α -Protein, wodurch dieses sich nicht wieder an einen Rezeptor anlagert. Durch Messung der gebundenen Radioaktivität kann so der Rezeptor-vermittelte, Agonisten-induzierte Umsatz an den G-Proteinen bestimmt werden (Abb. 3.5.).

Diese Methode wurde von Laura J. Sim zur Anwendung auf histologischen Schnitten adaptiert (Sim et al. 1995), weshalb nun die Darstellung und Quantifizierung eines intrazellulären

Signaltransduktionsweges in Gewebeschnitten möglich ist. Die Durchführbarkeit dieser Methode an humanem *post mortem* Hirngewebe konnte bisher für 5-HT₁-, Cannabinoid- und Opioid-Rezeptoren belegt werden (Dupuis et al. 1999; Rodriguez-Puertas et al. 2000; Platzer et al. 2000).

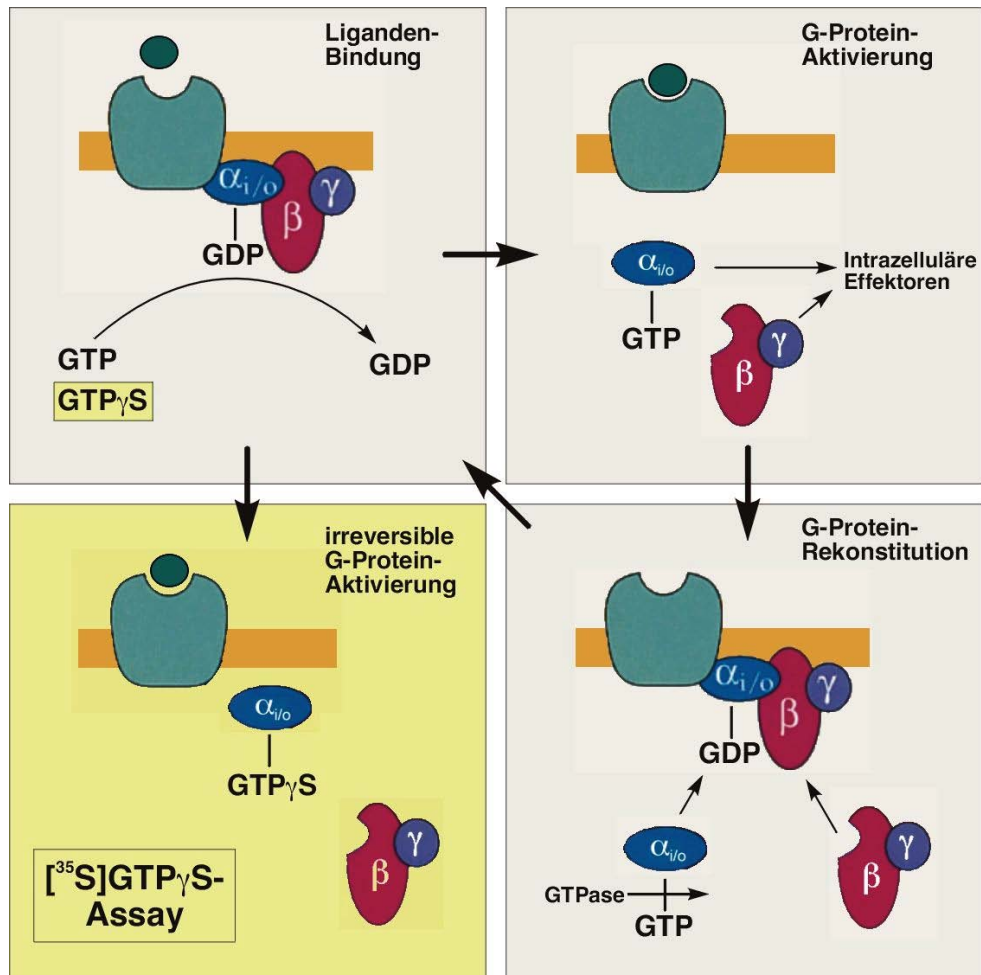


Abb. 3.5. Dargestellt ist die Aktivierung eines G-Proteins nach Stimulation des Rezeptors unter physiologischen Bedingungen (grau unterlegt) und unter den Bedingungen des [³⁵S]GTP_γS-Assays (gelb unterlegt).

3.6.1. Durchführung der Agonisten-stimulierten [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassays

Der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay beginnt mit zwei Prä-Inkubationsschritten. Im ersten Schritt erfolgt die Rehydrierung des Gewebes und die Abspaltung und Auswaschung von endogenem GABA von den GABA_B Rezeptoren. Im zweiten Schritt werden durch GDP im Puffer alle G $\alpha_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren in den Schnitten in einen stabilen und aktivierbaren Zustand überführt, wonach sie während einer Inkubation mit den Agonisten R-Baclofen oder GABA stimuliert werden können und es zur Anlagerung von [³⁵S]GTP γ S an die G $\alpha_{i/o}$ -Proteine der aktivierten Rezeptoren kommt. Da der Basalumsatz der G $\alpha_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren unter den Assay-Bedingungen relativ hoch ist, wird dieser, ebenfalls ermittelt:

- 1) Auftauen und Trocknen der Kryostatschnitte an der Raumluft für 30 Min.
- 2) Präinkubation in Assay-Puffer für 10 Min. bei 25°C.
- 3) Präinkubation in 2,0 mM GDP/Assay-Puffer für 15 Min. bei 25°C.
- 4) Inkubation mit 0,04 nM [³⁵S]GTP γ S in 2,0 mM GDP/Assay-Puffer und 1,0 mM R-Baclofen (Agonisten-Stimulation) oder keinem weiteren Zusatz (Basalumsatz) für 120 Min. bei 25°C.
- 5) Zweimaliges Waschen der Schnitte in Tris-Puffer (50 mM, pH 7,4) für 30 Sek. bei 4°C.
- 6) Kurzes Abspülen in H₂O_{dest.} und Trocknen der Schnitte im Luftstrom bei Raumtemperatur.

3.6.2. Quantitative Film-Autoradiografie des GTP γ S-Assays

Die Durchführung der Autoradiografie erfolgt analog zur Autoradiografie bei der ISH, mit identischem Filmmaterial und Prozeduren. Sie unterscheidet sich jedoch durch eine sehr viel kürzere Expositionszeit von nur 68 Stunden und die Verwendung von ¹⁴C-Standards mit höherer Polymeraktivität. Auch für diese Standards wurde eine gewebsäquivalente und ³⁵S-spezifische Kalibration durchgeführt (s.o.).

Auch die Auswertung der Film-Autoradiografien des [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay folgt dem bereits beschriebenen Ablauf (s. 3.2.4.), wobei die Stimulation als Prozentwert (St%) über dem Basalumsatz ausgedrückt wird:

$$\text{St\%} = [(\text{AgSt}-\text{Basal})/\text{Basal}] \times 100 \quad (\text{Formel 3})$$

(AgSt: die durch Agonisten bedingte Stimulation; Basal: Basalumsatz. Alle Werte in nCi/g)

4. Ergebnisse

4.1. Expression von GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor mRNA

Der Nachweis der Expression der einzelnen GABA_B Rezeptor mRNA erfolgte auf makroskopischer wie auch mikroskopischer Ebene durch semiquantitative Film- und Emulsions-Autoradiografie.

Die Film-Autoradiografie bietet hierbei die Möglichkeit, weite Bereiche der untersuchten Hirnareale zu überblicken und miteinander zu vergleichen, wogegen die Emulsions-Autoradiografie eine Beurteilung und Quantifizierung auf Einzelzellebene zulässt.

Das Signal der Film-Autoradiografie stellt die Summe der Einzelzellexpressionen dar. Hierdurch wird bei hoher Zelldichte, jedoch nur schwacher oder mittelgradiger Expression auf Einzelzellebene (z.B. im Cerebellum) die Expression in der Film-Autoradiografie relativ überschätzt. Analog hierzu kann eine mittlere, jedoch disseminierte Einzelzellexpression unter ungünstigen Umständen zu keinem signifikanten oder nur geringem Messwert in der Film-Autoradiografie führen. Hieraus wird deutlich, dass mRNA-Expression, wenn sie mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen wird, im Idealfall durch die Film- wie auch Emulsions-Autoradiografie detektiert werden muss.

Zur weiteren Differenzierung auf Einzelzellebene wird im folgenden auch auf die Expression des im Gehirn dominierenden GABA-synthetisierenden Enzyms GAD67 eingegangen. Hierdurch soll der Versuch unternommen werden, Neuronen bzw. Interneuronen, welche die unterschiedlichen GABA_B Rezeptoren exprimieren, als GABAerge oder nicht-GABAerge Zellen zu klassifizieren.

4.1.1. Semiquantitative Autoradiografie der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor mRNA

Cerebraler Cortex (PFC und ACC)

Makroskopisch war im präfrontalen (PFC) und anterioren cingulären Cortex (ACC) GABA_{B1pan} mRNA in mittleren bis hohen Mengen über den sechs Schichten des Cortex nachweisbar. Die höchste Expression zeigte sich hier in den oberen Anteilen der Lamina V und VI, aber auch die Lamina II ließ sich deutlich durch ihr höheres Signal von der Lamina I abgrenzen. Zudem zeichnete sich eine mittlere Schicht innerhalb der Lamina III ab (Abb. 4.1.A). Densitometrisch wurden die Laminae I-III, V und VI untersucht. Hier ergab sich für die Lamina I ein deutlich niedrigeres Niveau gegenüber den etwa dreifach höheren Werten in Laminae II, III, V und VI. Über Bereichen der weißen Substanz konnte ein schwacher aber deutlich positiver Messwert detektiert werden (Abb. 4.6.A).

Für die cortikale Expression der GABA_{B2pan} mRNA zeigte sich ein dem der GABA_{B1pan} mRNA ähnliches laminäres Muster bei insgesamt niedrigerer Signalintensität. Die Lamina I wies hier eine schwache und die übrigen Laminae eine mittlere Expression auf (Abb. 4.1.B, 4.6.B).

Für beide GABA_B Rezeptoren zeigten sich zwischen der mRNA-Expression des präfrontalen (PFC) und des anterioren cingulären Cortex (ACC) keine wesentlichen Unterschiede. Lediglich in Lamina I erbrachte die Messungen im ACC ein höheres Signal für die GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor mRNA. (Abb. 4.6.C).

Die GAD67 exprimierenden Zellen erzeugen ein über die gesamte Hirnrinde verteiltes Signal auf den Film-Autoradiografien, welches punktuell mittlere bis hohe Signalstärke aufwies. In Lamina I erschien auch hier das Expressionsniveau deutlich niedriger als in den anderen Schichten (Abb. 4.1.C).

Hippocampale Formation

Die Betrachtung und Auswertung der Film-Autoradiografien für die der GABA_{B1pan} mRNA zeigte ein sehr hohes Signal über dem Stratum granulare des Gyrus dentatus, welches sich deutlich von der inneren polymorphen Schicht und dem Stratum moleculare unterschied. Eine starke Expression erstreckte sich über das Stratum pyramidale aller Abschnitte des Ammonshorns (CA4-CA1). Stratum lacunosum, moleculare und radiatum zeichneten sich durch ein Signal mittlerer Stärke aus. In der Subicularregion (bestehend aus Subiculum, Prä- und Parasubiculum) setzte sich das Signal der Molekularschicht aus dem Stratum moleculare der CA1-Region in gleicher Stärke fort. Die äußere Pyramidenschicht des Subiculus wies eine dem Stratum pyramidale des Ammonshorns vergleichbare Expression auf, wovon sich die innere Pyramidenschicht durch ein mittleres Expressionsniveau abgrenzte. Der auf den Präparaten enthaltene Abschnitt des entorhinalen Cortex war bezüglich seines Expressionsmusters für die GABA_{B1} Rezeptor-Transkripte mit einer Betonung des Signals in den Laminae II, V und VI vergleichbar mit dem präfrontalen Cortex (Abb. 4.2.A, 4.6.A).

In Analogie zur Expression der GABA_{B1} Rezeptoren stellte sich die Expression des GABA_{B2} Rezeptors in der hippocampalen Formation dar: identisches Verteilungsmuster bei insgesamt niedrigerer Signalstärke. So war hier das Stratum granulosum des Gyrus dentatus der Ort stärkerer und das Stratum pyramidale des Ammonshorns, wie das Subiculum die Regionen mittlerer Expression (Abb. 4.2.B, 4.6.B).

Auf den Film-Autoradiografien der mRNA von GAD67 zeigte sich eine einheitliche und zusammenhängende starke Expression im Hippocampus lediglich in dem Band aus Körnerzellen des Gyrus dentatus. Die übrigen hippocampalen Regionen wiesen ein disseminiertes Signal auf, wobei dieses am stärksten in der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus und dem Stratum oriens der CA1-Region ausgeprägt war (Abb. 4.2.C).

Basalganglien

Der Nucleus caudatus wie auch das Putamen zeigte ein mittleres und der Globus pallidus ein deutlich schwächeres Expressionsmuster für die GABA_{B1} Rezeptoren mRNA (Abb. 4.3.A). Eine

mäßige Transkription konnte auch in der Substantia nigra und im Nucleus ruber nachgewiesen werden (Abb. 4.4.A, 4.6.A).

Für die GABA_{B2} Rezeptoren fällt auf den Film-Autoradiogrammen über Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus kein merkliches Signal auf. Densitometrisch konnten hier jedoch schwächste Signalintensitäten (um 4,4 nCi/g über dem unspezifischem Hintergrundsignal) nachgewiesen werden (Abb. 4.3.B, 4.6.B). Etwas deutlicher fiel die Expression in der Substantia nigra und dem Nucleus ruber aus (Abb. 4.4.B, 4.6.B).

Ein im Gegensatz zum Cortex und Hippocampus eher flächiges Signal konnte für die GAD67 mRNA über dem Nucleus caudatus und dem Putamen beobachtet werden, wogegen der Globus pallidus und der Nucleus ruber ein starkes aber vereinzelt und punktförmiges Signal aufwies. Makroskopisch fehlt jeglicher Hinweis auf die Expression von GAD67 in der Substantia nigra (Abb 4.3.C, 4.4.C).

Thalamus

In dieser Region wurden der Nucl. mediodorsalis thal., der Nucl. lateralis posterior thal., die Nuclei ventralis posteriolateralis et posteriomedialis thal., der Nucl. centromedianus thal. sowie der Nucl. reticularis thal. untersucht. Diesen Kerngebieten des Thalamus war insgesamt eine mittlere und dem Nucl. mediodorsalis thal. eine stärkere Expression von GABA_{B1} Rezeptor mRNA zu eigen (Abb. 4.4.A, Abb 4.6.A).

Für die Transkription von GABA_{B2} Rezeptor mRNA konnten im Nucl. centromedianus niedrige und in den übrigen untersuchten Thalamuskernen etwas höhere Werte gemessen werden (Abb. 4.4.B, 4.6.B).

Die GAD67 mRNA Expression erschien als stärkeres Signal aus einzelnen Punkten über dem Thalamus, welche im Nucl. mediodorsalis und Nucl. reticularis dichter und im Nucl. centromedianus seltener vorhanden waren (Abb. 4.4.C).

Cerebellum

Der cerebelläre Cortex exprimiert in seiner Körnerzellschicht den höchsten Wert der densitometrisch untersuchten Regionen für die GABA_{B1} Rezeptor mRNA. Dagegen war die Expression in der Molekularzellschicht und dem Nucl. dentatus von schwacher, aber deutlicher Ausprägung. Auch über der weißen Substanz des Cerebellums war ein niedriges Signal (12,4 nCi/g) nachweisbar (Abb. 4.5.A, 4.6.A).

Die cerebelläre GABA_{B2} Rezeptor mRNA Expression zeigte ebenfalls ihre deutlichste Ausprägung über der Körnerzellschicht und war mit dem Wert von GABA_{B2} für das Stratum granulosum des Gyrus dentatus ebenfalls der für dieses Transkript höchste auf den Film-Autoradiografien gemessene Wert (Abb. 4.5.B, 4.6.B).

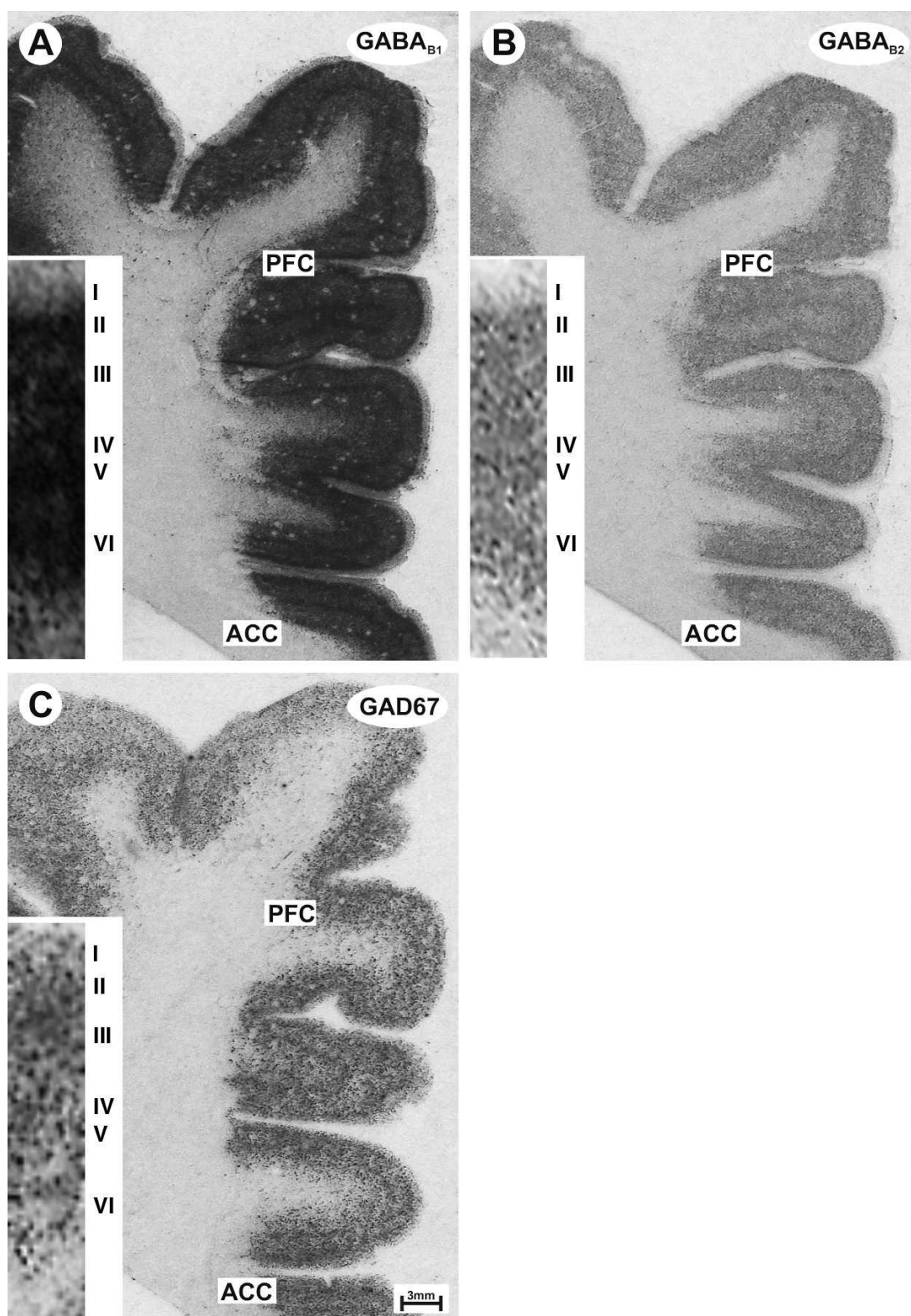


Abb. 4.1. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA im präfrontalen (PFC) und im anterioren cingulären Cortex (ACC). In den jeweiligen Einschüben ist in stärkerer Vergrößerung (10x) die cortikale Schichtung der Hirnrinde des PFC dargestellt.

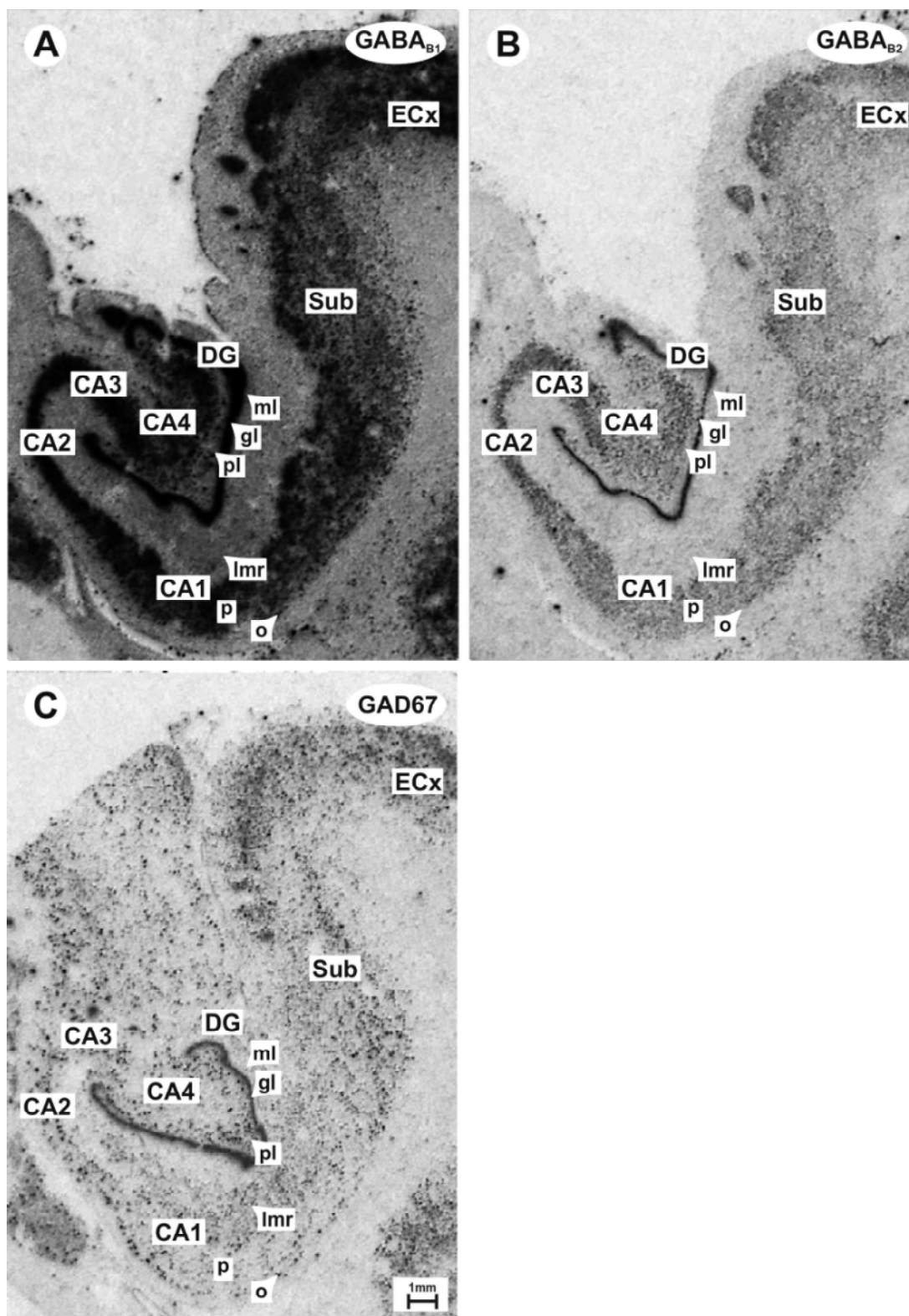


Abb. 4.2. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA im Hippocampus. Dargestellt ist der Gyrus dentatus (DG) mit seinem Stratum granulare (gl), Stratum moleculare (ml) und der polymorphen Hilusregion (pl), das Ammonshorn mit seinen Regionen CA4-CA1, welches sich in Stratum lacunare, moleculare und radiatum (lmr), das Stratum pyramidale (p) und Stratum oriens (o) untergliedert. Daran schließt sich das Subiculum (Sub) und der entorhinale Cortex (ECx) an.

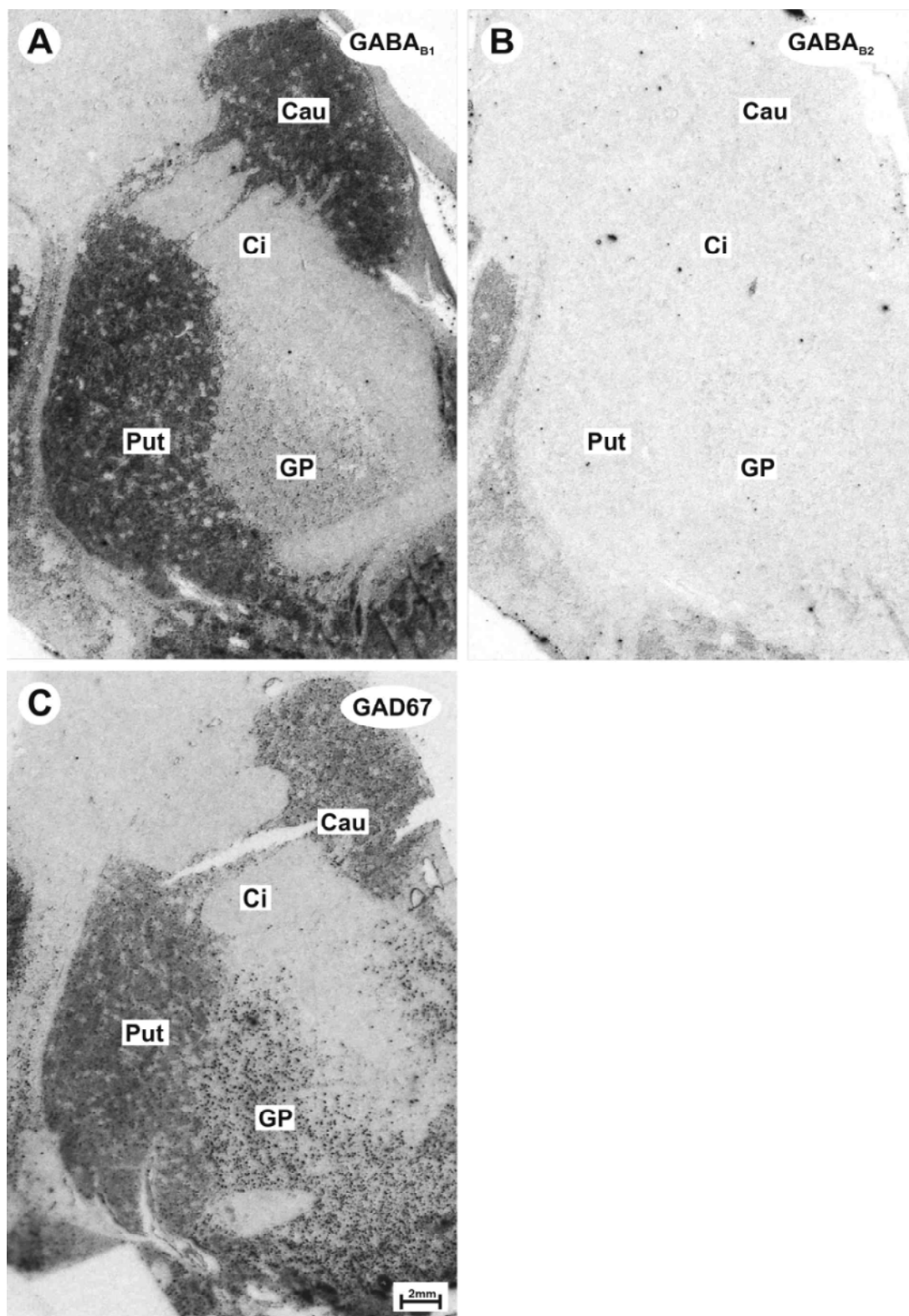


Abb. 4.3. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA in den Basalganglien. Neben dem Nucl. caudatus (Cau) und dem Putamen (Put) ist die Capsula interna (Ci) und der Globus pallidus (GP) abgebildet.

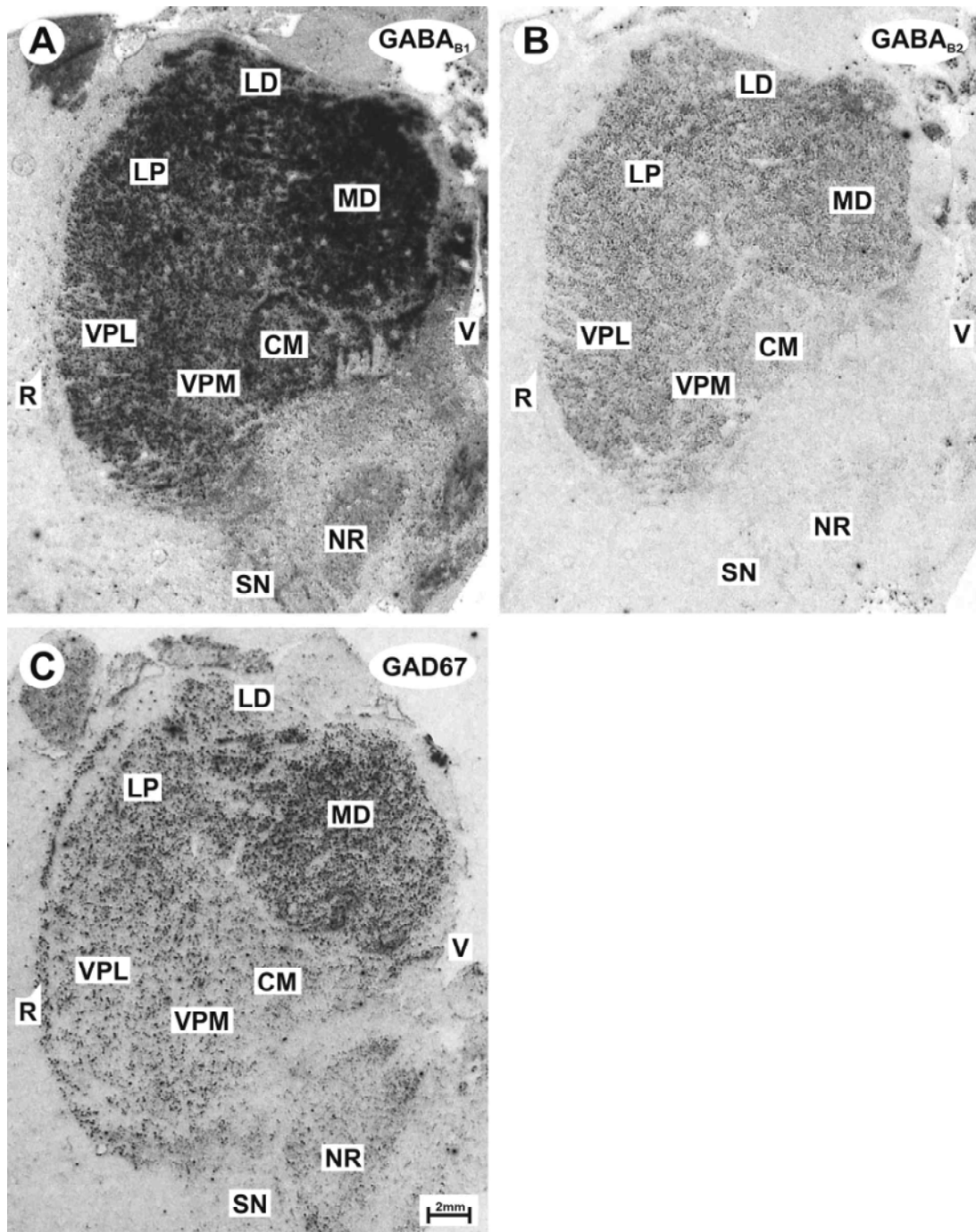


Abb. 4.4. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA im Thalamus und oberen Hirnstamm.

Der Thalamus untergliedert sich in dieser Schnittebene in den Nucl. mediodorsalis thal. (MD), welcher nach medial vom Ventrikel (V) begrenzt ist, den Nucl. lateralis dorsalis thal. (LD), den Nucl. lateralis post. thal. (LP), die Nuclei ventralis posterolateralis (VPL) et posteromedialis thal. (VPM), dem Nucl. centromedianus thal. (CM) sowie dem Nucl. reticularis thal. (R).

Im Anschnitt des oberen Hirnstamms ist der Nucl. ruber (NR) und die Substantia nigra (SN) enthalten.

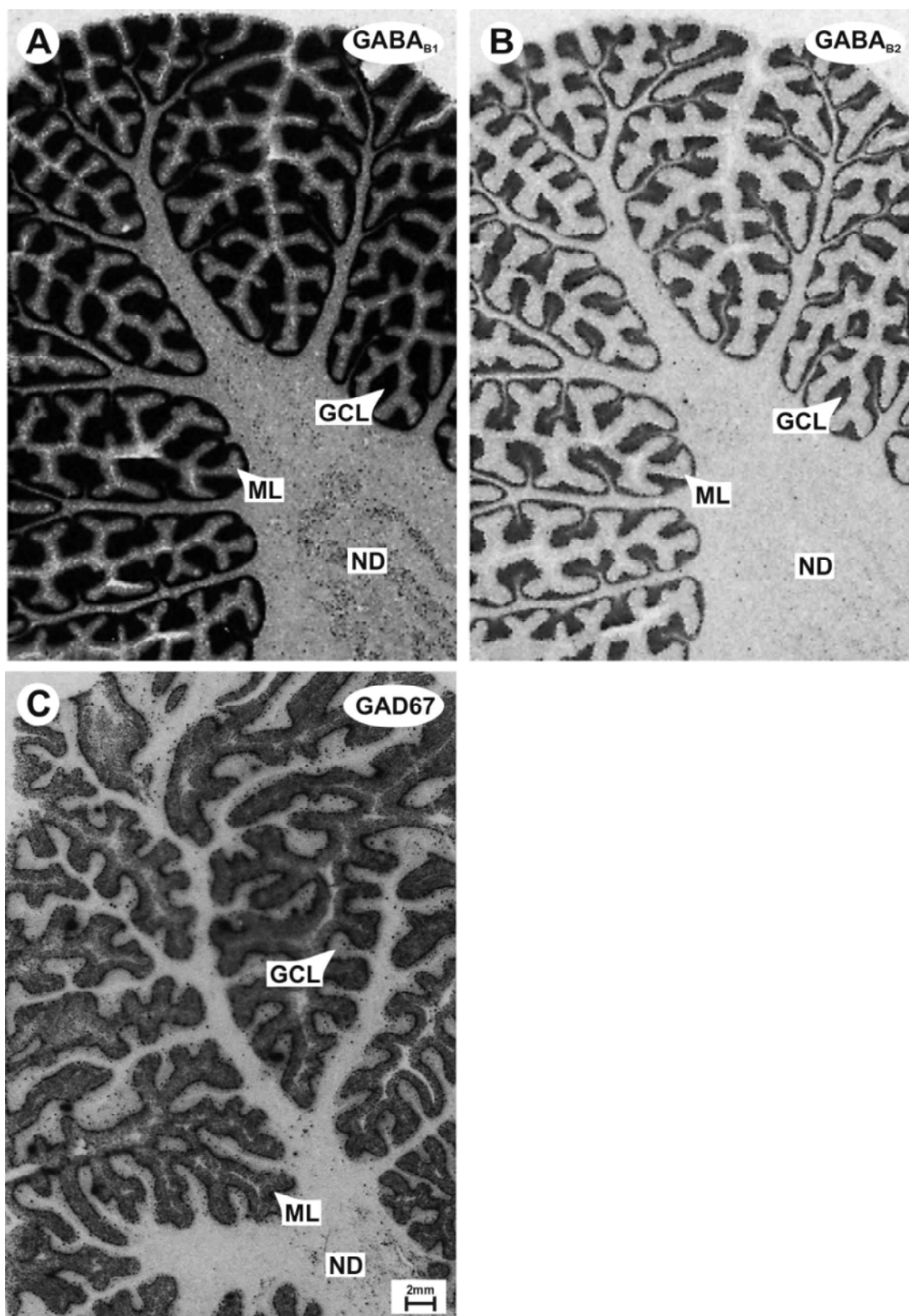


Abb. 4.5. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA im Cerebellum.

Deutlich abgrenzbar ist die Molekularzellschicht (ML) von der Körnerzellschicht (GCL). In der weißen Substanz des Cerebellums ist der Nucl. dentatus (ND) in allen Präparaten angeschnitten.

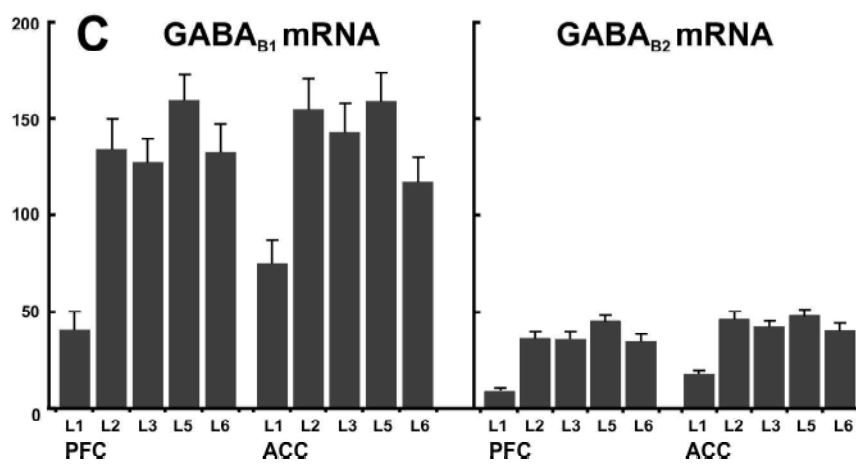
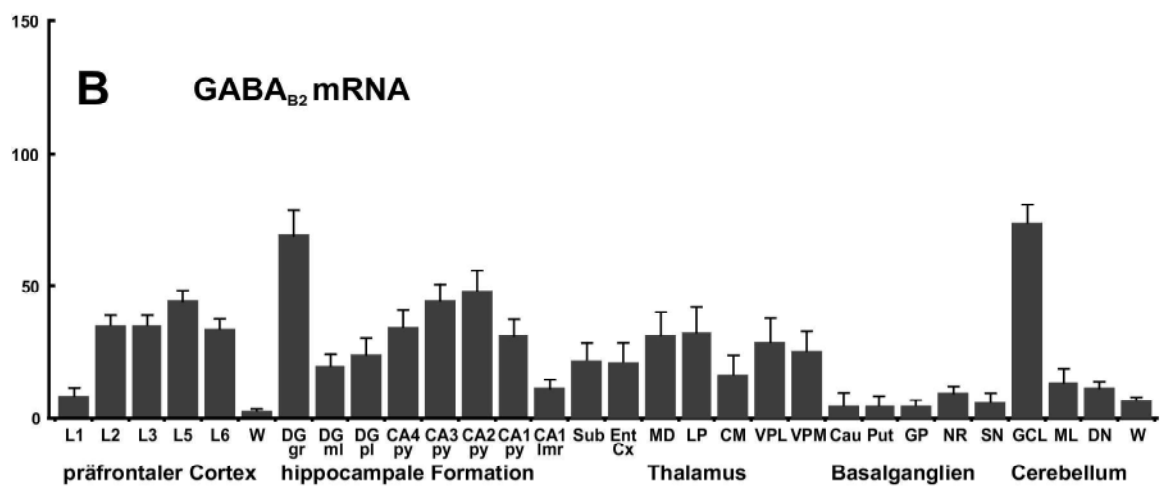
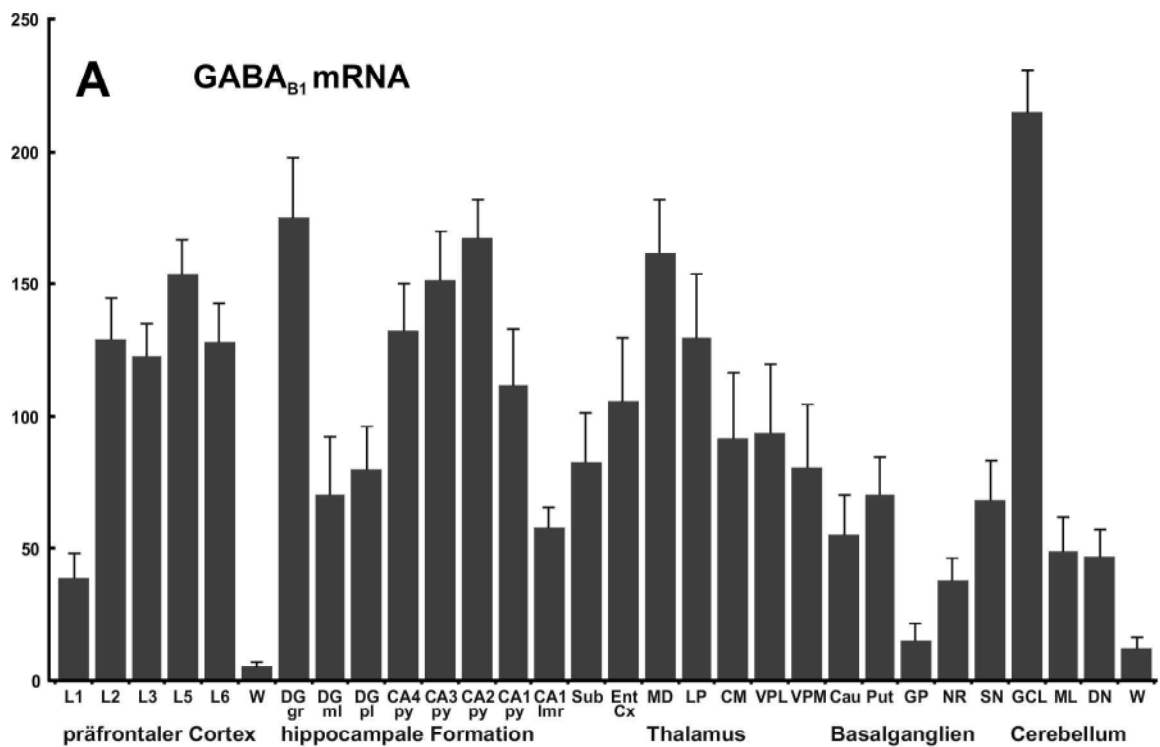




Abb. 4.6. Semiquantitative Bestimmung der Expression von GABA_{B1} (A) und GABA_{B2} (B) Rezeptoren mRNA durch Densitometrie von Film-Autoradiografien. Die Messwerte sind um den unspezifischen Hintergrund korrigiert und in nCi/g \pm SEM dargestellt. In (C) sind die Messwerte im präfrontalen (PFC) und im anterioren cingulären Cortex (ACC) gegenübergestellt welche sich deutlich nur in Lamina I unterscheiden.

Abkürzungen:

LI-LVI: Lamina I-VI; DG: Gyrus dentatus; gr: Stratum granulosum; ml: Stratum moleculare; pl: polymorphes Stratum; CA4-1: Regionen 4-1 des Ammonshorns; py: Stratum pyramidale; lmr: Stratum lacunosum, moleculare et radiatum; Sub: Subiculum; EntCx: entorhinaler Cortex; MD: Nucl. mediodorsalis thal., LP; Nucl. lateralis post. thal., VPL: Nucl. ventralis posteriolateralis; VPM: Nucl. ventralis posteriomedialis thal., CM: Nucl. centromedianus thal.; R: Nucl. reticularis thal.; Cau: Nucl. caudatus; Put: Putamen; GP: Globus pallidus; NR: Nucl. ruber; SN: Substantia nigra; GCL: Körnerzellschicht; ML: Molekularzellschicht; DN: Nucl. dentatus; W: weiße Substanz.

4.1.2. Zelluläre Expression der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor mRNA

Cerebraler Cortex (PFC und ACC)

Im zerebralen Cortex zeigten sich in den Emulsions-Autoradiographien über den kleinen Neuronen der L.I, den Sternzellen der L.IV und den Pyramidenzellen der L.II und III nur geringe Mengen an Silberkörnern (Grains), entsprechend einer schwachen Expression von GABA_{B1pan}. Die Expression von GABA_{B1pan} mRNA in den großen Pyramidenneuronen der L.V und den spindelzelligen Neuronen (L.VI) war dagegen etwas stärker ausgeprägt. Diese bereits genannten Arten von kortikalen Neuronen, die sog. Typ-1 Neuronen (Creutzfeldt 1983) zeigen alle mikroskopisch ein schwaches Niveau von GABA_{B2} mRNA. Die Gruppe der kleineren, rundlichen Typ-2 Neuronen, welche zum überwiegenden Anteil Interneurone darstellen, exprimieren GABA_{B1pan} wie auch GABA_{B2} mRNA auf schwachem, aber deutlichem Niveau. Diese Neuronen konnten nicht zuletzt durch ihre mäßige bis starke Expression von GAD67 mRNA identifiziert werden (dieses Transkript ist nur schwach in den pyramidalen Typ-1 Neuronen oder überhaupt nicht in den Sternzellen (L.IV) exprimiert). Die ebenfalls mit Thionin angefärbten Oligodendrocyten wiesen keine signifikante Markierung auf (Abb. 4.7., Tab. 4.1.).

Hippocampale Formation

Im Gyrus dentatus exprimierten die Körnerzellneurone wie auch die benachbarten Zellen des Stratum moleculare GABA_{B1pan} mRNA in mäßiger Stärke. Die vereinzelt Zellen der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus traten dagegen durch einen höheren Besatz an Grains hervor. Die Pyramidenzellen der Region CA4 sind, bei insgesamt mittlerer GABA_{B1pan} Expression, etwas schwächer als die der Regionen CA3-1 markiert. Auffällig war auch das Signal über den spindelzelligen Interneuronen im Stratum oriens der CA1-Region. Alle nicht-oligodendroglialen Zellen zeigten im Subiculum und Entorhinalen Cortex ein mäßiges und in einzelnen Pyramidenzellen auch stärkeres Niveau an GABA_{B1pan} mRNA.

Über all diesen hippocampalen Zelltypen war ein gleichmäßiger schwacher Gehalt an GABA_{B2} mRNA festzustellen.

GAD67 mRNA konnte im Gyrus dentatus über dem Stratum granulosum in mäßiger und in den polymorphen Neuronen, wie auch in den Interneuronen der CA-Region (Stratum pyramidale und oriens), des Subiculus und des Entorhinalen Cortex in stärkerer Ausprägung beobachtet werden. Die Pyramidenzellen des Cornu ammonis wiesen keinerlei GAD67 mRNA Expression auf.

Basalganglien

Die kleinen (Ø 5-7µm) Zellen des Nucleus caudatus und des Putamens, welche sich durch ihr Färbeverhalten, ihre Größe und Form nicht weiter in Neurone bzw. Interneurone differenzieren ließen, zeigten eine weitgehend homogen schwache GABA_{B1pan} Expression. In den mittelgroßen (Ø 10-15µm) Zellen, welche zum überwiegenden Teil die primären Neurone, aber auch Interneurone

repräsentieren (Wilson 1990) und in den sehr großen Interneuronen (Kölliker-Interneurone) im Putamen fand sich dieses Transkript in mäßiger Menge. Der Globus pallidus wies bezüglich der GABA_{B1pan} mRNA mäßige Signalintensitäten in den kleineren und mittelgroßen Zellen, bei zugleich höheren Werten für die größeren Interneuronen auf. Die melaninhaltigen Neurone der Substantia nigra zeigten eine mittlere und die Neurone des Nucleus ruber eine niedrigere GABA_{B1pan} Expression.

Im Gegensatz hierzu stand das Expressionsniveau für die GABA_{B2} mRNA, welches im Nucl. caudatus und Putamen in nur sehr vereinzelt mittelgroßen Zellen sicher nachweisbar war. Das Signal über den Kölliker-Interneuronen ist als fraglich schwach positiv über dem unspezifischen Hintergrundsignal einzuschätzen. Deutlicher dagegen war die Expression in den mittelgroßen Zellen und den größeren Interneuronen im Globus pallidus und Nucleus ruber bestimmbar. Die Neurone der Substantia nigra exprimieren die GABA_{B2} Transkripte in mittlerer Höhe.

Die mittelgroßen Zellen im Neostriatum zeigten in Hinblick auf die GAD67 Expression kein einheitliches Bild: prinzipiell existieren stark exprimierende und signalfreie Zellpopulationen; dahingegen zeigten die großen Interneurone des Putamen und des Globus pallidus durchgehend ausgeprägte Expression.

Thalamus

Alle Neurone bzw. Interneurone in den untersuchten thalamischen Kerngebieten wiesen eine deutliche Expression von GABA_{B1pan} mRNA auf. Diese war stark in den kleineren rundlichen und den größeren länglichen Neuronen des Nucl. mediodorsalis und der ventralen Kerne VPM und VPL und in den lateralen Thalamuskernen, dem Nucl. centromedianus und dem Nucl. reticularis von mittlerer Stärke.

Diese Aufteilung spiegelt sich auch im Nachweis der GABA_{B2} mRNA, jedoch auf niedrigerem Niveau wieder: die Neurone des Nucl. mediodorsalis, des VPM und VPL zeigten mittlere und die der übrigen Kerngebiete schwächere Expression.

Die GAD67 mRNA fand sich im Thalamus ausschließlich in kleineren Zellen (Ø 5-7µm) sowie den Neuronen des Nucl. reticularis.

Cerebellum

Die stärkste Expression von GABA_{B1} Transkripten unter allen untersuchten Zellarten im Gehirn des Menschen fand sich in den Purkinjezellen des Kleinhirns. Körnerzellschicht und Golgizellen zeigten hingegen, wie auch die Stern- und Korbzellen der Molekularzellschicht und die Neurone des Nucl. dentatus mittlere Dichten von Silberkörnern.

In der Purkinjezellschicht konnte, insbesondere in Dunkelfeldbeleuchtung, ein durchgehendes Band an Grains beobachtet werden, welches sich nicht bestimmten thioningefärbten Zellen zuordnen lies. Der Ausschluß anderer hier vorkommender Neurone als Quelle dieser Expression und dessen typisches Verteilungsmuster lassen den Schluss zu, dass es sich hierbei um den Nachweis von GABA_{B1pan} mRNA in der Bergmann-Glia handelt. Messungen über der weißen

Substanz ergaben fraglich positive Werte, welche aber nicht oligodendrocytärem Ursprungs waren.

GABA_{B2} mRNA fand sich ebenfalls in starker Ausprägung in den Purkinjezellen. Für die anderen (oben aufgeführten) Neurone und Interneurone des Cerebellums fanden sich niedrige Signalstärken. Eine Expression, die sicher der Bergmann-Glia zuzuordnen wäre, konnte nicht beobachtet werden. Die Graindichte in der weißen Substanz wies jedoch auf eine schwache gliale, wenn auch nicht-oligodendrocytäre Expression von GABA_{B2} mRNA hin.

GAD67 mRNA ließ sich in den Purkinje- und Golgizellen sowie den neuronalen Zellen der Molekularzellschicht deutlichst nachweisen.

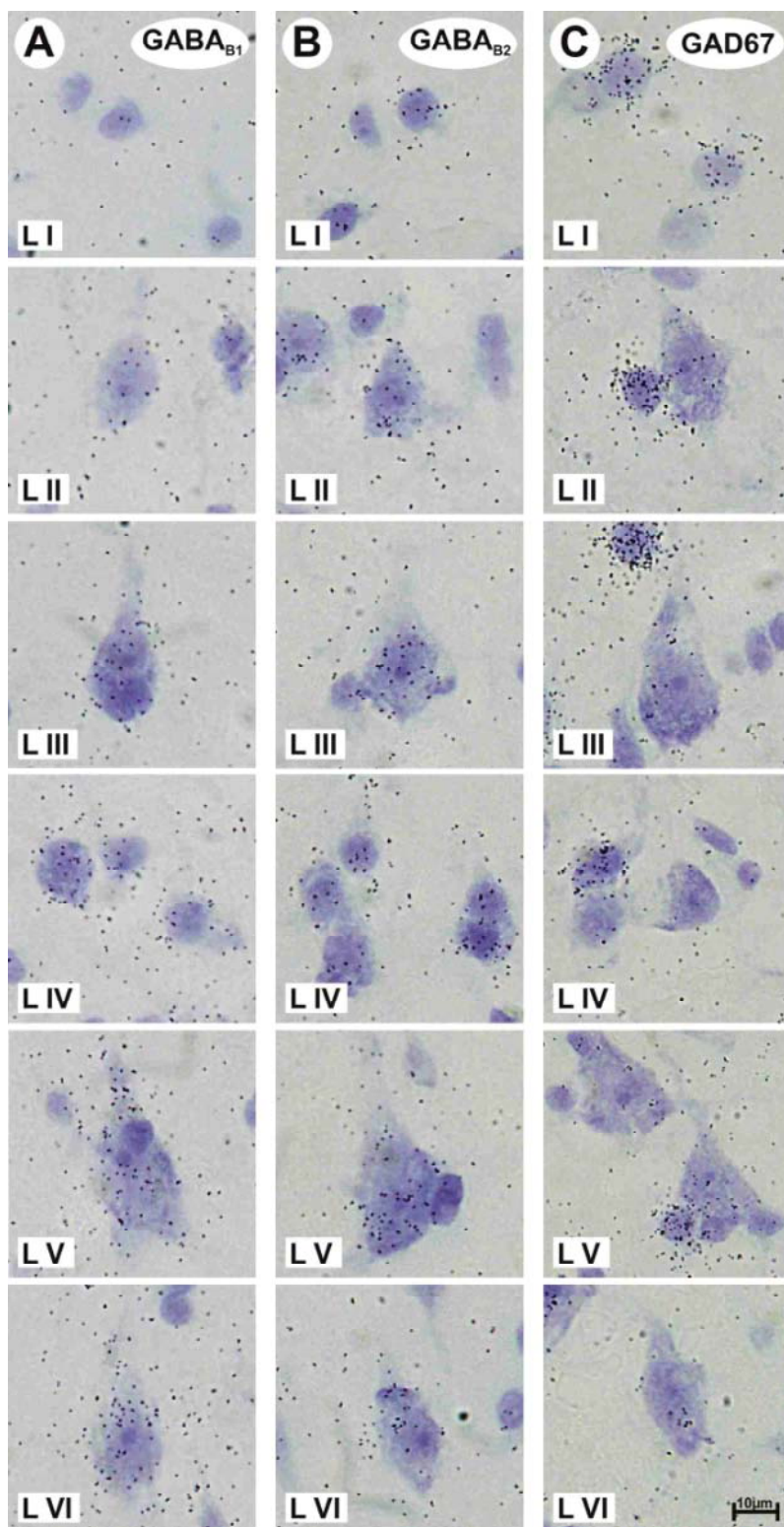


Abb. 4.7. Emulsions-Autoradiografien der Expression von $GABA_{B1}$ (A), $GABA_{B2}$ Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA im präfrontalen Cortex. Die abgebildeten Zellen sind die kleinen Neurone der Lamina I (LI), die Pyramidenneurone der Lamina II, III und V (LII, LIII, LV), die Sternzellen der Lamina IV (LIV) und die spindelzelligen Neurone der Lamina VI (LVI). Zudem sind Interneurone mit abgebildet, welche in (C) durch ihre starke GAD67 Expression auffallen.

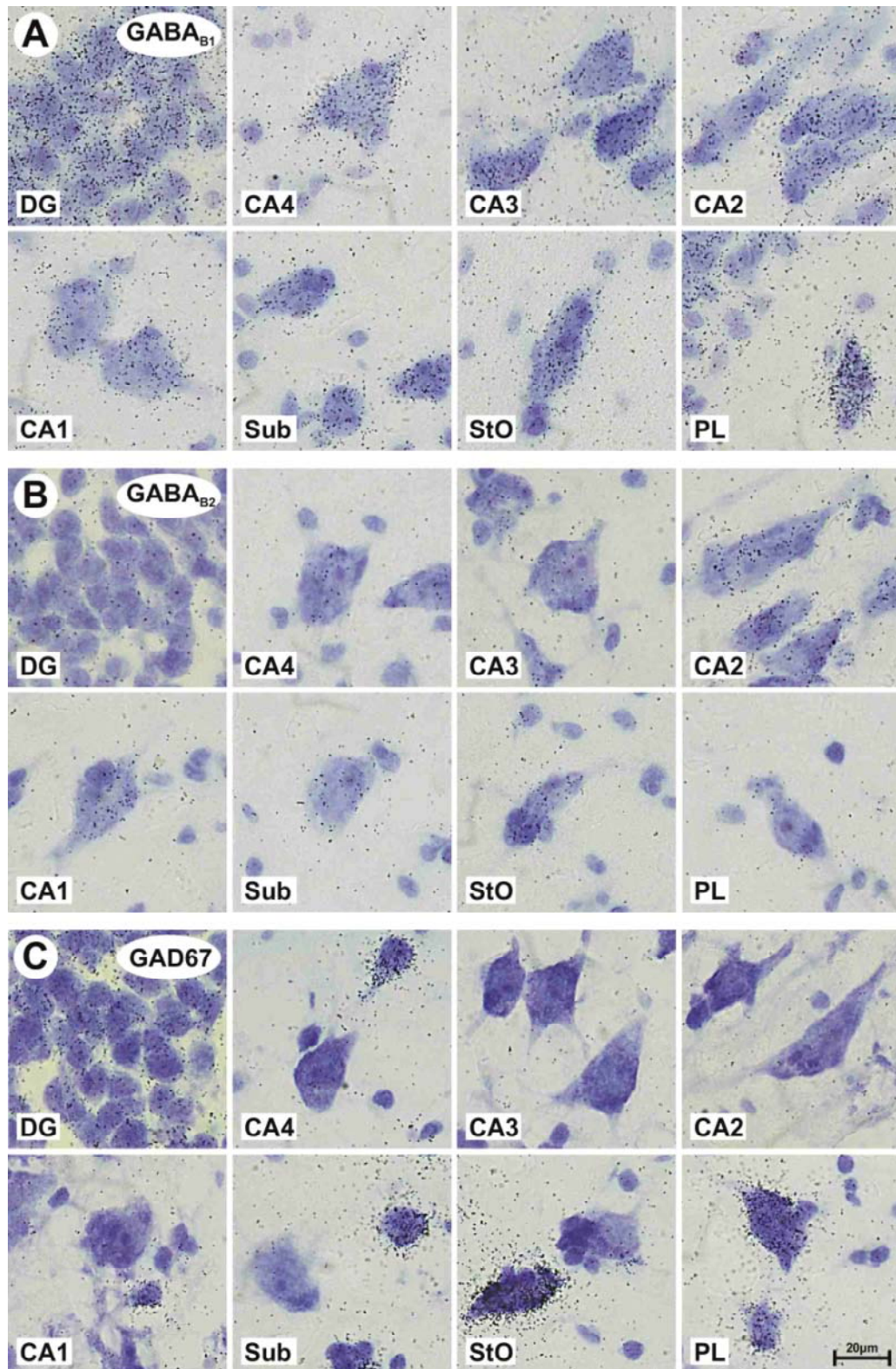


Abb. 4.8. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA im Hippocampus. Dargestellt sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG), Pyramidenzellen der Regionen 4-1 im Ammonshorn (CA4-1), Pyramidenneuronen des Subiculum (Sub), Interneuron des Stratum oriens der CA1-Region (StO) sowie der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus (PL).

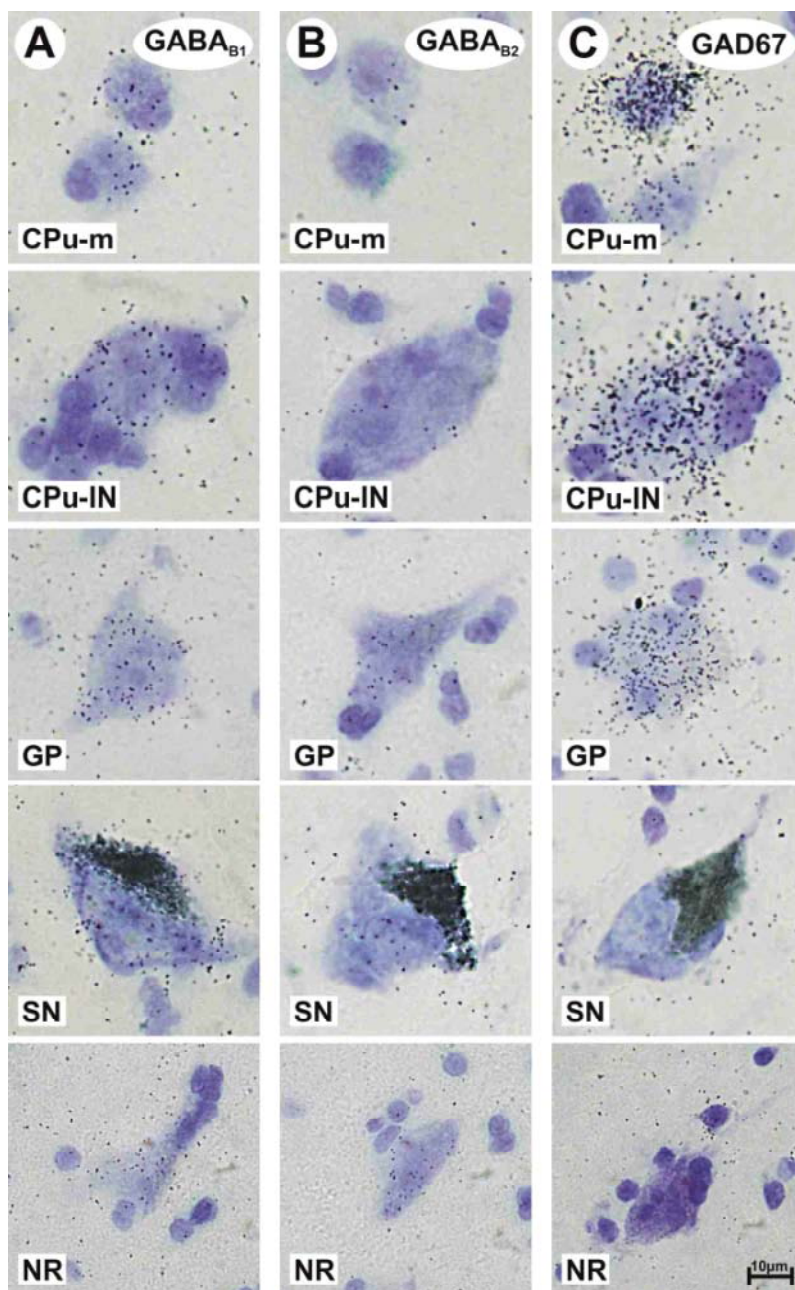


Abb. 4.9. Emulsions-Autoradiografien der Expression von $GABA_{B1}$ (A), $GABA_{B2}$ Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA in den Basalganglien. Abgebildet sind die mittelgroßen Zellen (CPu-m) und die großen Interneurone (CPu-IN) im Putamen, die melaninhaltigen Neurone der Substantia nigra (SN) sowie Neurone des Nucl. ruber (NR).

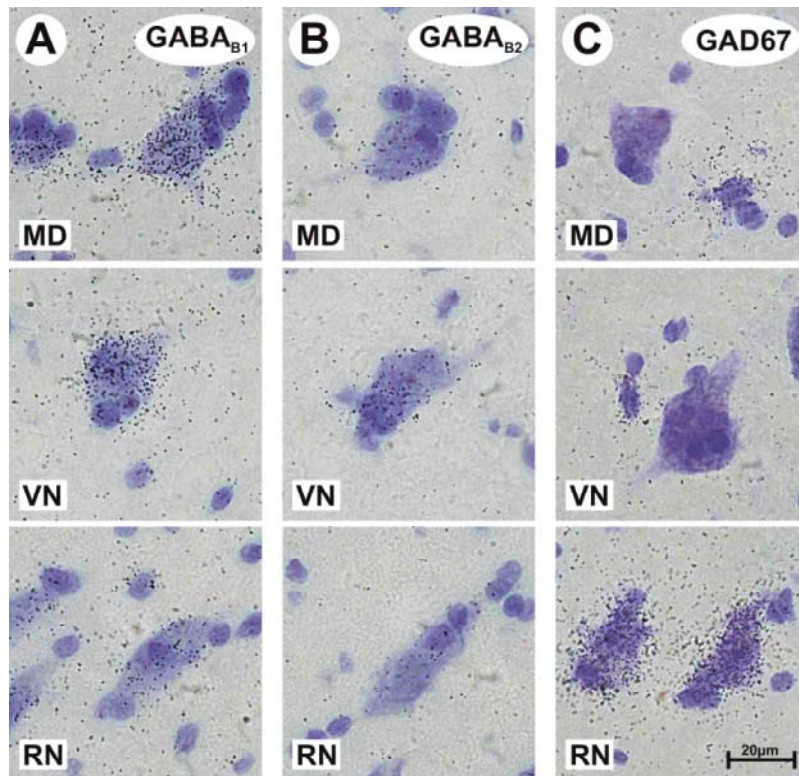


Abb. 4.10. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA in den vorherrschenden Neuronen des Nucl. mediodorsalis (MD), den ventralen Kerngruppen (VN) und des Nucl. reticularis (RN) des Thalamus.

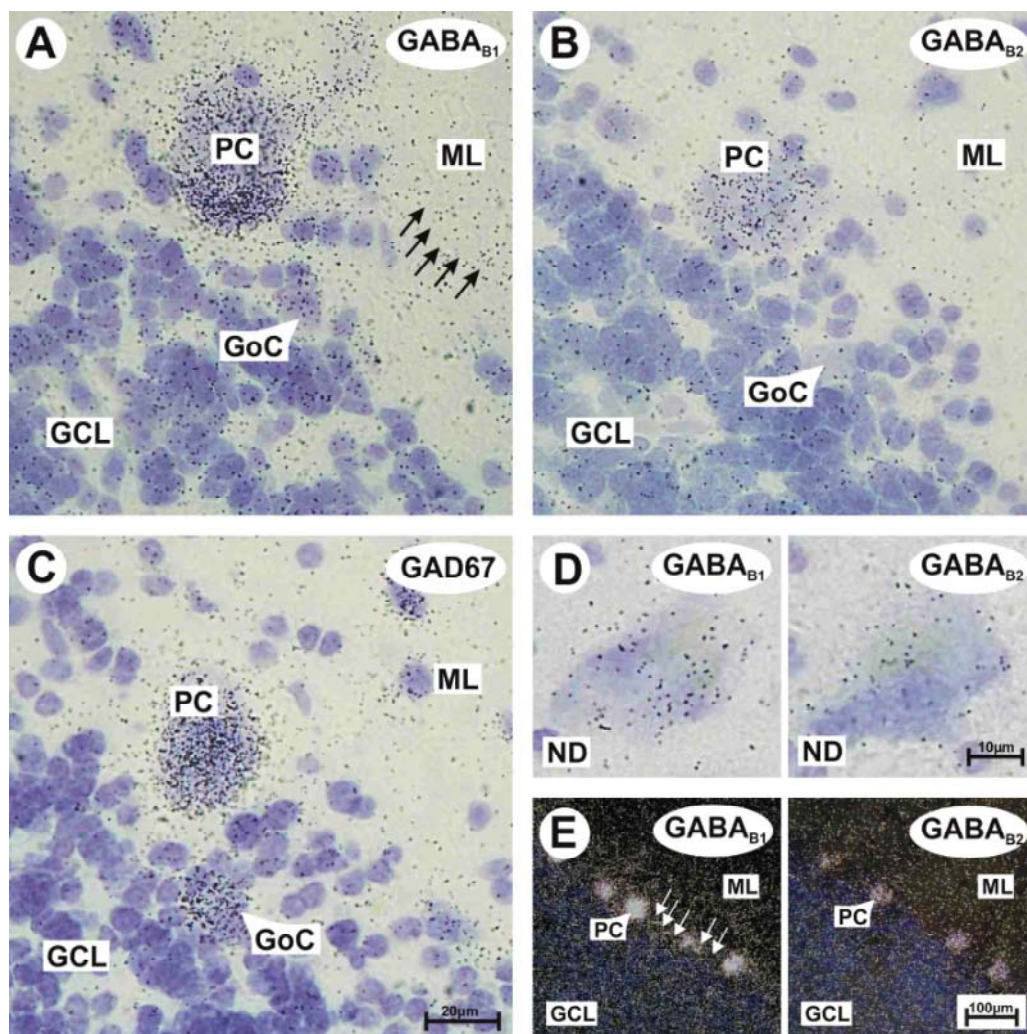


Abb. 4.11. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} Rezeptor (B) und GAD67 (C) mRNA im Cerebellum. Zwischen der Körnerzellschicht (GCL) und der Molekularzellschicht (ML) liegen die Purkinje- (PC) und Golgizellen (GoC).

In (D) sind Neurone des Nucl. dentatus abgebildet. (E) zeigt die Regionen von (A) bzw. (B) in geringerer Vergrößerung und im Dunkelfeld, wodurch die unterschiedlichen Signalintensitäten deutlicher hervortreten.

Die Pfeile in (A) und (E) zeigen auf ein bandförmiges Signal in der Purkinjezellschicht, dem Ort der Bergmann-Glia (welche mit Thionin nicht angefärbt werden kann).

Region	Transkript	GABA _{B1} mRNA	GABA _{B2} mRNA	GAD67 mRNA
Prefrontaler Cortex				
Lamina I		+	+	(+)/0*
Lamina II (Pyramidenzellen)		+	+	+
Lamina III (Pyramidenzellen)		+	+	+
Lamina IV (Sternzellen)		+	+	0
Lamina V (Pyramidenzellen)		++	+	+
Lamina VI (Spindelzellen)		++	+	(+)
weiße Substanz		(+)	0	0
Hippocampale Formation				
Gyrus dentatus (Str. granulare)		++	+	++
CA4 (Str. pyramidale)		+	+	(+)
CA3 (Str. pyramidale)		++	+	0
CA1 (Str. pyramidale)		++	+	0
Subiculum (Pyramidenzellen)		++	+	0
entorhinaler Cortex (Pyramidenzellen)		++/++*	+	0
Basalganglien				
Nucl. caudatus und Putamen				
kleine Zellen ^a		+	0	++++/0*
mittelgroße Zellen ^a		++	(+)	++++/0*
große Interneurone		++	(+)	++++
Globus pallidus				
mittelgroße Zellen ^a		+	+	++++/+++*
große Interneurone		++	+	+++
Substantia nigra ^b		++	++	0
Nucl. ruber		+	+	0
Thalamus (größere Zellen > 15µm)				
Nucl. mediodorsalis		+++	++	0
Nucl. centromedianus		++	+	0
ventrale Nuclei (VPM, VPL)		+++	++	0
Nucl. reticularis		++	+	++++

Region	Transkript	GABA _{B1} mRNA	GABA _{B2} mRNA	GAD67 mRNA
Cerebellum				
	Körnerzellen	++	+	0
	Purkinjezellen	++++	+++	++++
	Golgiezellen	++	+	++++/+++*
	Bergmann-Glia ^c	+	0	0
	Sternzellen	++	+	+++
	Korbzellen	++	+	+++
	Nucl. dentatus	++	+	
	weiße Substanz	+	(+)	0

Tab. 4.1. Semiquantitative Übersicht zur zellulären Expression von GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor sowie GAD67 mRNA in den untersuchten Hirnregionen:

0, nicht nachweisbar, 0-10%; (+) , fraglich schwach, 10-20%; + , schwach, 21-83%;

++ , mäßig 84-155% ; +++ , stark, 156-228%; +++++ , sehr stark >229% der Zellfläche ist von Grains bedeckt.

^a „Zellen“ steht hier für Neuronen/Interneuronen, nicht für Gliazellen.

^b nur über dem melaninfreien Anteil der Neuronen war eine Messung möglich.

^c nicht messbar, da keine Thionin-färbaren Zellkörper vorliegen; Angabe abgeschätzt.

* Subpopulationen mit unterschiedlichem Expressionsniveau.

4.2. Expression der mRNA von Splice-Varianten der GABA_B Rezeptoren

4.2.1. Semiquantitative Autoradiografie der GABA_{B1} Rezeptor mRNA Splice-Varianten

Cerebraler Cortex (PFC und ACC)

Im präfrontalen (PFC) und anterioren cingulären Cortex (ACC) folgte die laminierte Expression von mRNA der Varianten GABA_{B1A}, GABA_{B1B} und GABA_{B1C-hum} im Muster dem Signal der GABA_{B1pan} Sonde, mit einer Betonung der Expression in der Lamina II und den oberen Anteilen der Lamina V und VI.

Das stärkste Signal fand sich in den cortikalen Autoradiografien der GABA_{B1B} mRNA; von mittleren Signalintensitäten waren die Expressionsmuster von GABA_{B1A} mRNA und von schwächerer Ausprägung die der GABA_{B1C-hum} mRNA. Ein sicherer Nachweis über die Existenz der GABA_{B1E} mRNA im humanen Cortex konnte densitometrisch nicht erbracht werden (Abb. 4.12., 4.17.).

Hippocampale Formation

Auch in diesen Strukturen ließen sich mittlere bis hohe Messwerte für die Transkripte von GABA_{B1A}, GABA_{B1B} und GABA_{B1C-hum} mRNA erzielen. Das Stratum granulare des Gyrus dentatus erwies sich für die Varianten GABA_{B1A-C} als Region der jeweils höchsten Expression im Hippocampus. Auch für die GABA_{B1E} Isoform konnte hier ein schwaches Signal detektiert werden. Die Regionen 4-1 des Ammonshorns, das Subiculum und der Entorhinale Cortex wiesen für alle GABA_{B1} Splice-Varianten ein jeweils im Vergleich zur Körnerzellschicht des Gyrus dentatus niedrigeres Hybridisierungssignal auf (Abb. 4.13., 4.17.). Dieses war allerdings für die Variante GABA_{B1E} von einer verhältnismäßig hohen Standardabweichung bei insgesamt äußerst niedrigen Werten gekennzeichnet (z.B. im Stratum pyramidale der CA3-Region 1,94 nCi/g ± 1,62 SD) und ist somit nicht sicher als positiv anzusehen.

Basalganglien

Im Nucleus caudatus und im Putamen ließen sich autoradiografisch mittlere Signalintensitäten für die GABA_{B1B} mRNA und niedrigere für die GABA_{B1A} und GABA_{B1C-hum} mRNA ermitteln. Der Globus pallidus wies lediglich für die GABA_{B1B} mRNA eine deutliche Expression auf (Abb. 4.14., 4.17.). In den Präparaten des oberen Hirnstamms konnte für die Substantia nigra und den Nucl. ruber eine mittlere Expression für GABA_{B1B} sowie eine niedrige für GABA_{B1A} mRNA festgestellt werden. Für die GABA_{B1C-hum} und GABA_{B1E} mRNA Varianten ergab die Densitometrie keinen sicheren Nachweis (Abb. 4.15., 4.17.).

Thalamus

Für die untersuchten thalamischen Kerngebiete zeigte die Expression der GABA_{B1B} mRNA ein analoges Muster zur GABA_{B1pan} Expression, bei um etwa ein Drittel verringerten Mengen. So erzielte auch hier die Messung des Nucl. mediodorsalis thal. die höchsten Werte. Die mRNA-Expression für GABA_{B1A} Rezeptoren war gleichmäßig niedrig über dem Nucl. mediodorsalis thal., dem Nucl. lateralis posterior thal., den Nuclei ventralis posteriolateralis et posteriomedialis thal., dem Nucl. centromedianus thal. und dem Nucl. reticularis thal. verteilt. Die beiden anderen GABA_{B1} Rezeptor Splice-Varianten konnten im Thalamus nicht signifikant nachgewiesen werden (Abb. 4.15., 4.17.).

Cerebellum

Auch für die GABA_{B1A}, GABA_{B1B} und GABA_{B1C-hum} mRNA stellte jeweils der Messwert über der Körnerzellschicht des Kleinhirns das höchste Signal unter den gemessenen Regionen dar. Deutlich schwächer fiel die Expression der GABA_{B1A} und GABA_{B1B} mRNA in der Molekularzellschicht und dem Nucleus dentatus aus. In diesen Regionen waren Transkripte für GABA_{B1C-hum} nicht sicher autoradiografisch detektierbar, wie dies auch für die GABA_{B1E} mRNA im gesamten Cerebellum der Fall war (Abb. 4.16., 4.17.).

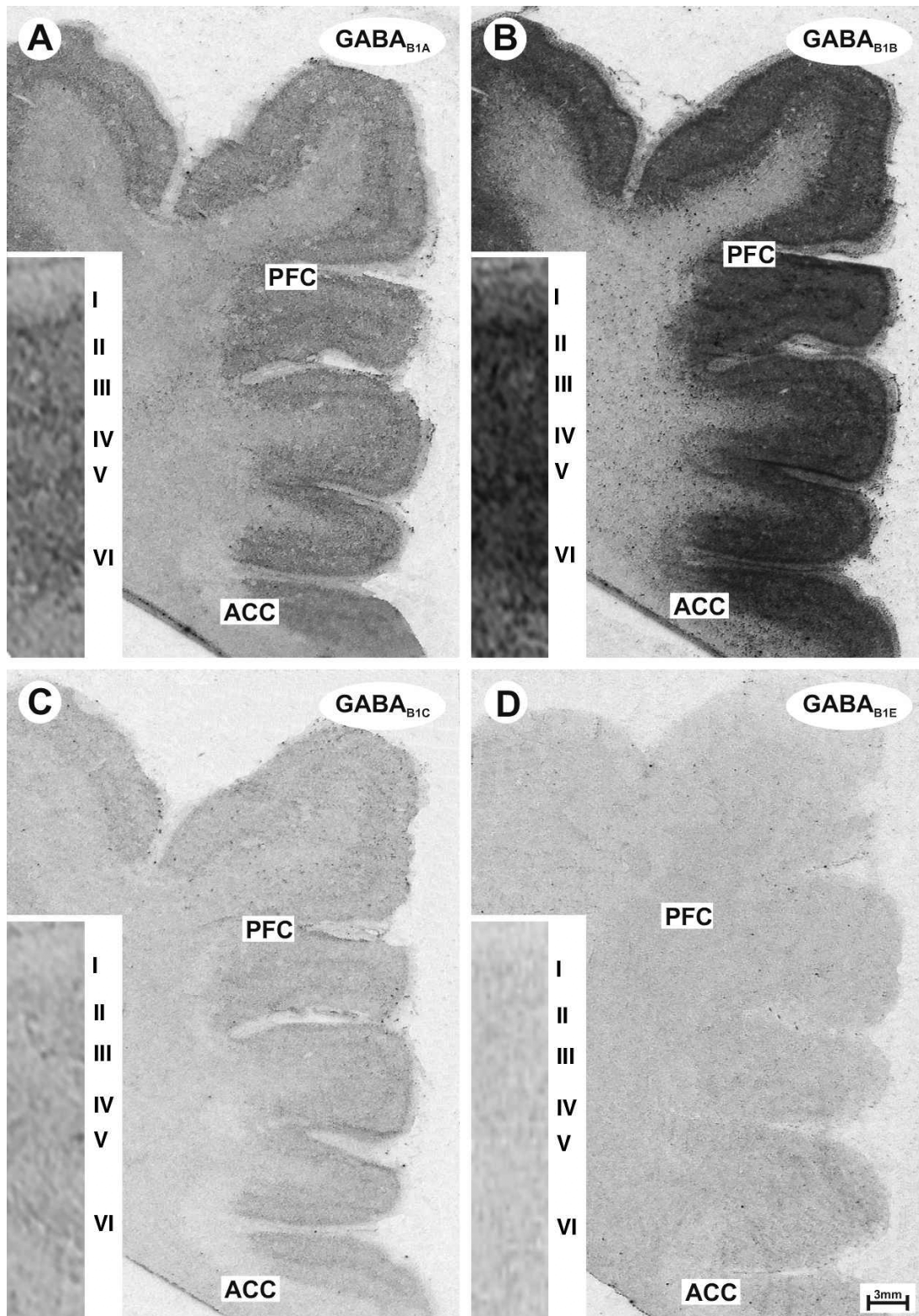


Abb. 4.12. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) im präfrontalen (PFC) und im anterioren cingulären Cortex (ACC). In den jeweiligen Einschüben ist in stärkerer Vergrößerung (10x) die cortikale Schichtung der Hirnrinde des PFC dargestellt.

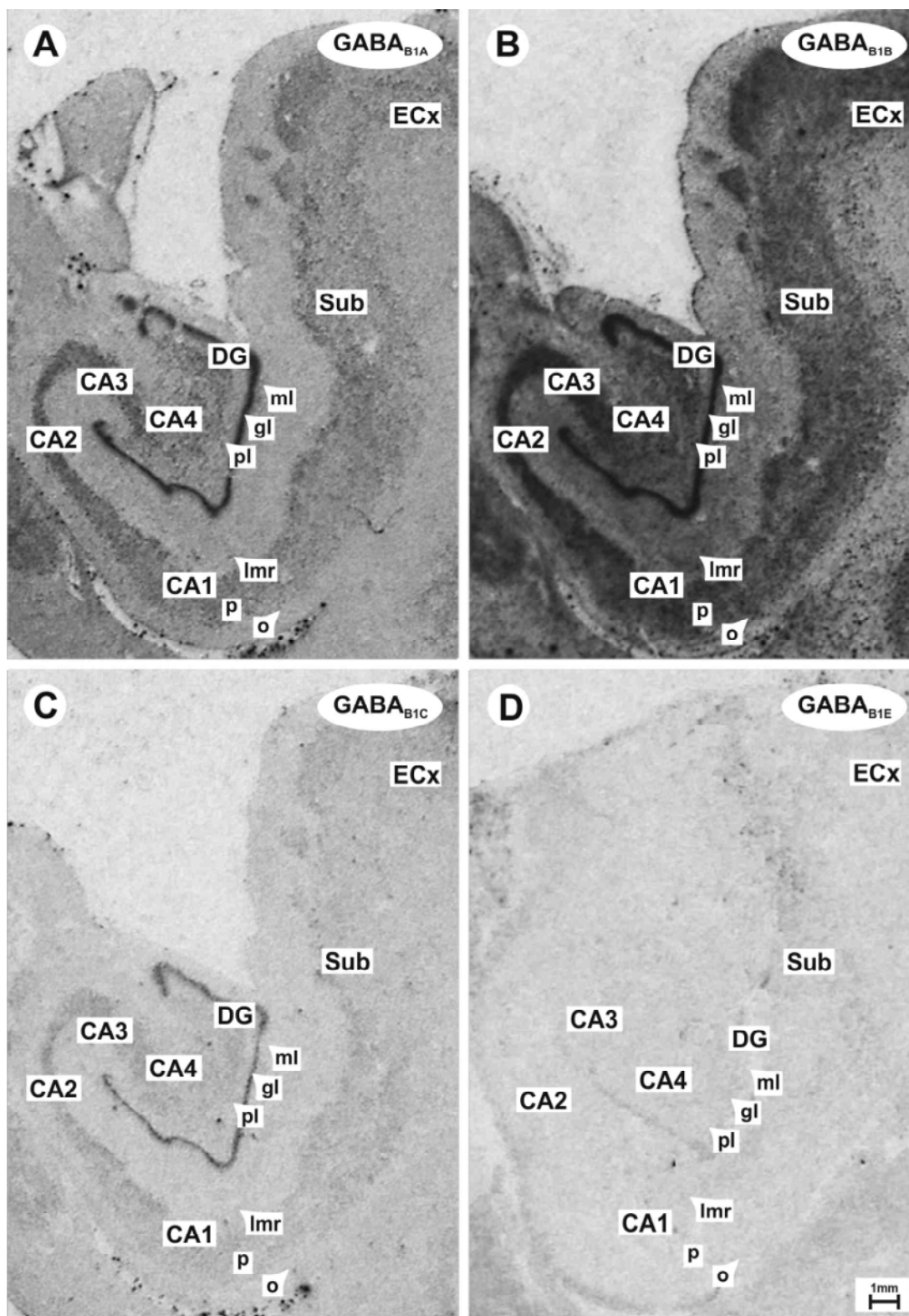


Abb. 4.13. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) im Hippocampus. Dargestellt ist der Gyrus dentatus (DG) mit seinem Stratum granulare (gl), Stratum moleculare (ml) und der polymorphen Hilusregion (pl), das Ammonshorn mit seinen Regionen CA4-CA1, welches sich in Stratum lacunare, moleculare und radiatum (lmr), das Stratum pyramidale (p) und Stratum oriens (o) untergliedert. Daran schließt sich das Subiculum (Sub) und der entorhinale Cortex (ECx) an.

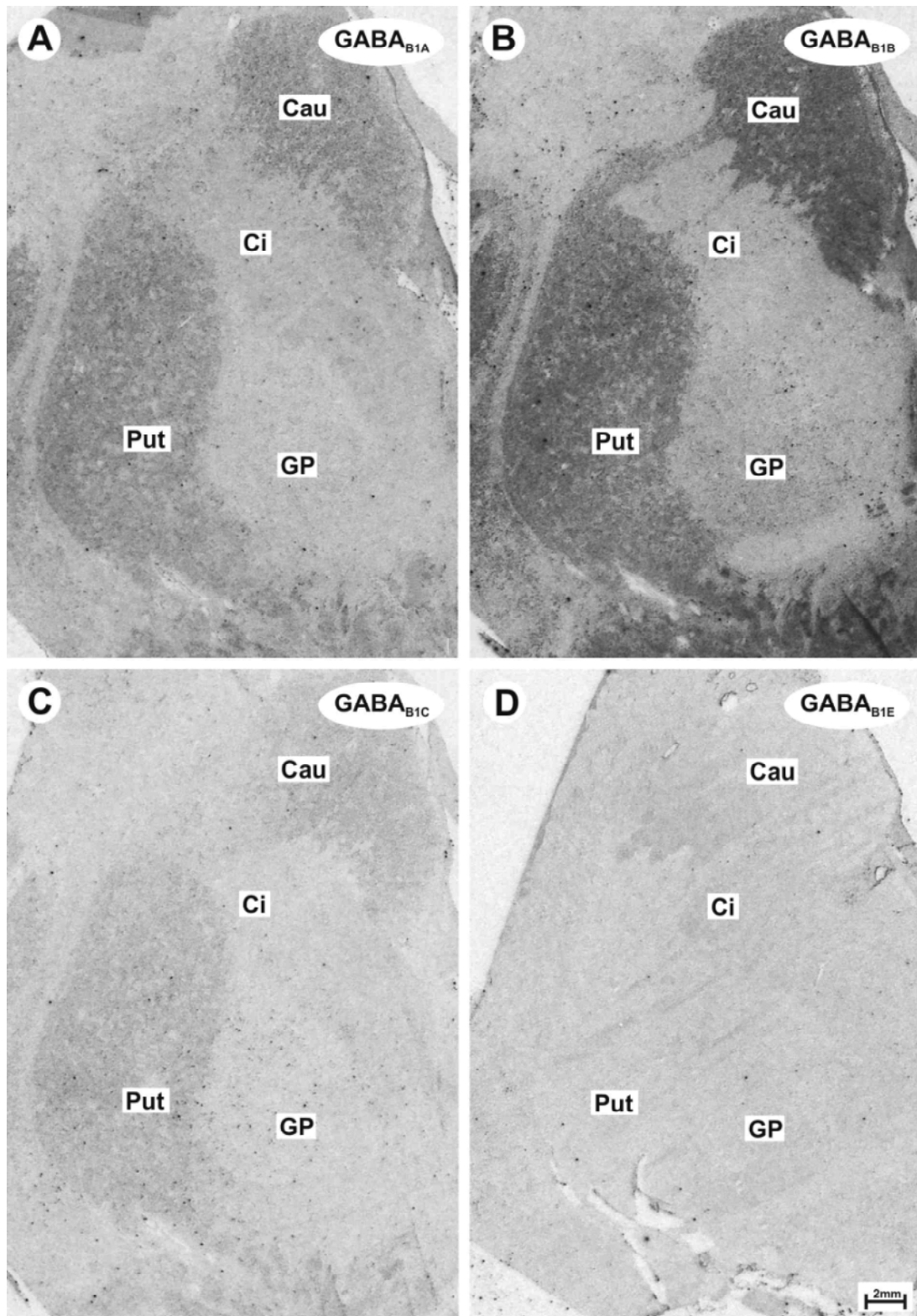


Abb. 4.14. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) in den Basalganglien. Neben dem Nucl. caudatus (Cau) und dem Putamen (Put) ist die Capsula interna (Ci) und der Globus pallidus (GP) abgebildet.

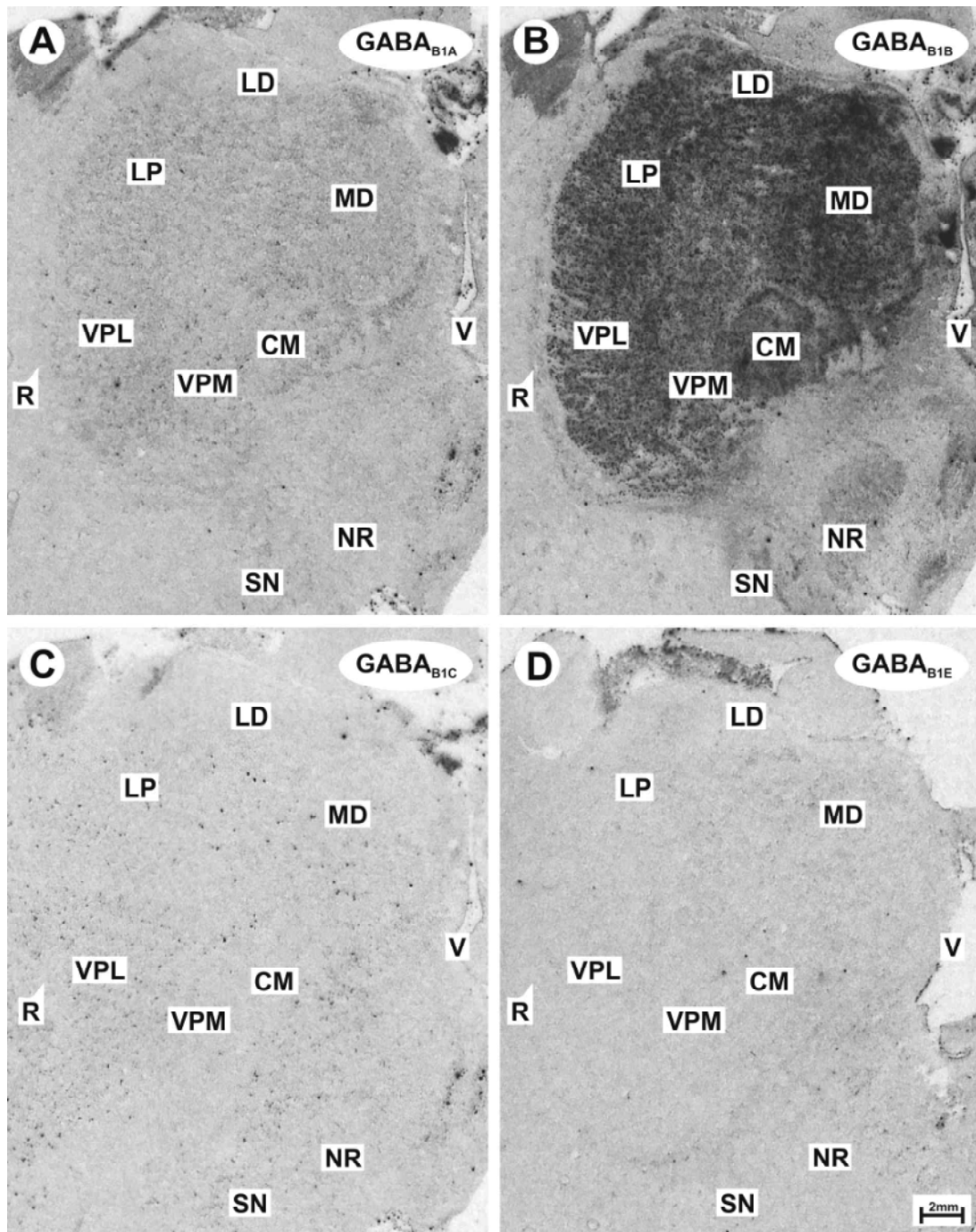


Abb. 4.15. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) im Thalamus und oberen Hirnstamm. Abgebildet sind der Nucl. mediodorsalis thal. (MD), welcher nach medial vom Ventrikel (V) begrenzt ist, der Nucl. lateralis dorsalis thal. (LD), der Nucl. lateralis post. thal. (LP), die Nuclei ventralis posteriolateralis (VPL) et posteriomialis thal. (VPM), der Nucl. centromedianus thal. (CM) sowie der Nucl. reticularis thal. (R). Im Anschnitt des oberen Hirnstammes ist der Nucl. ruber (NR) und die Substantia nigra (SN) enthalten.

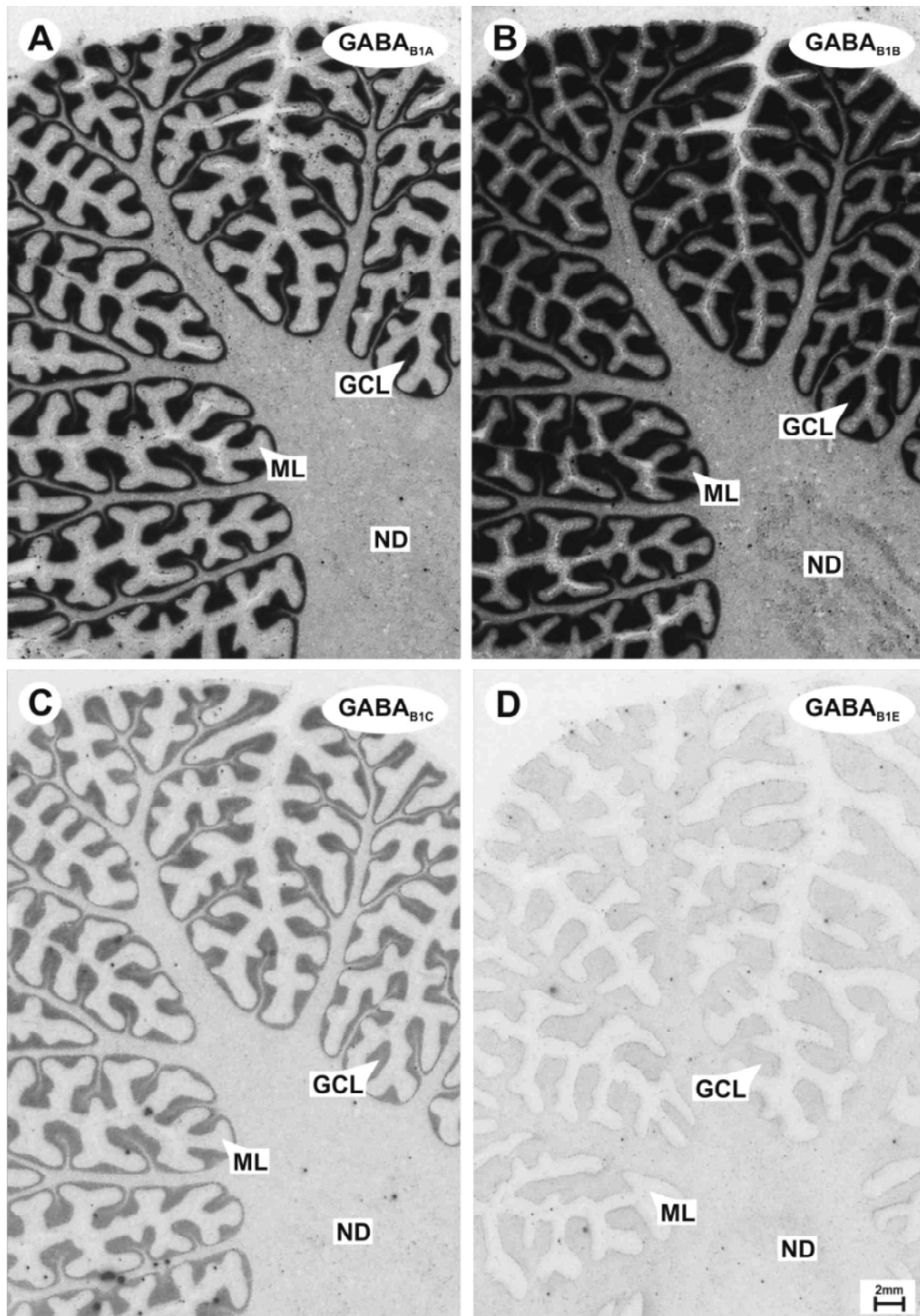
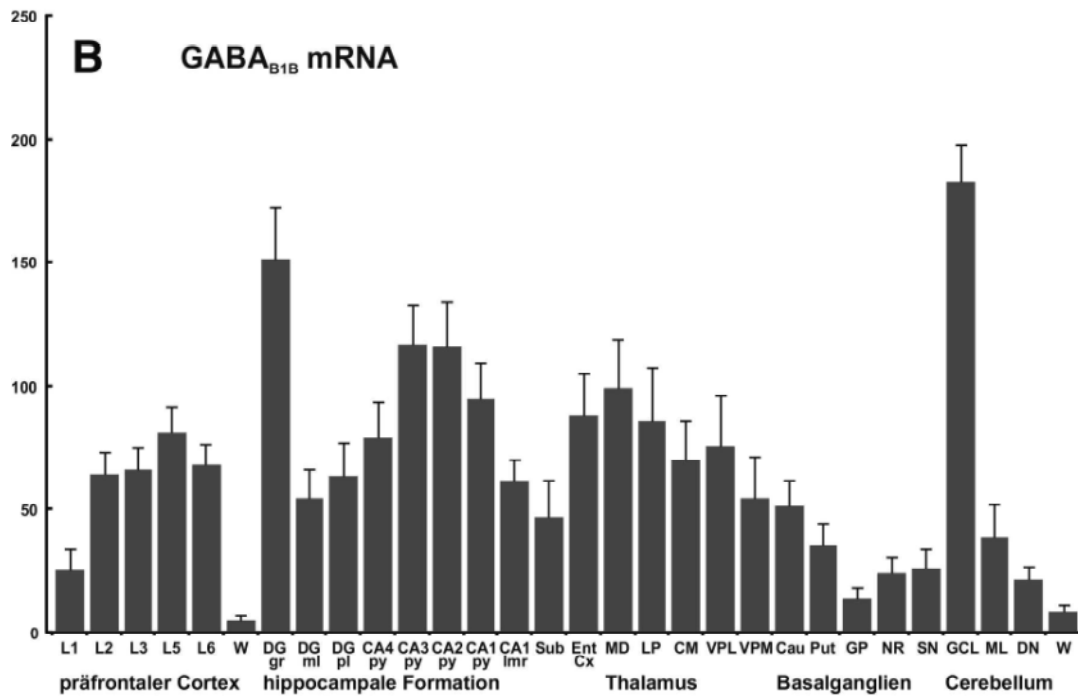
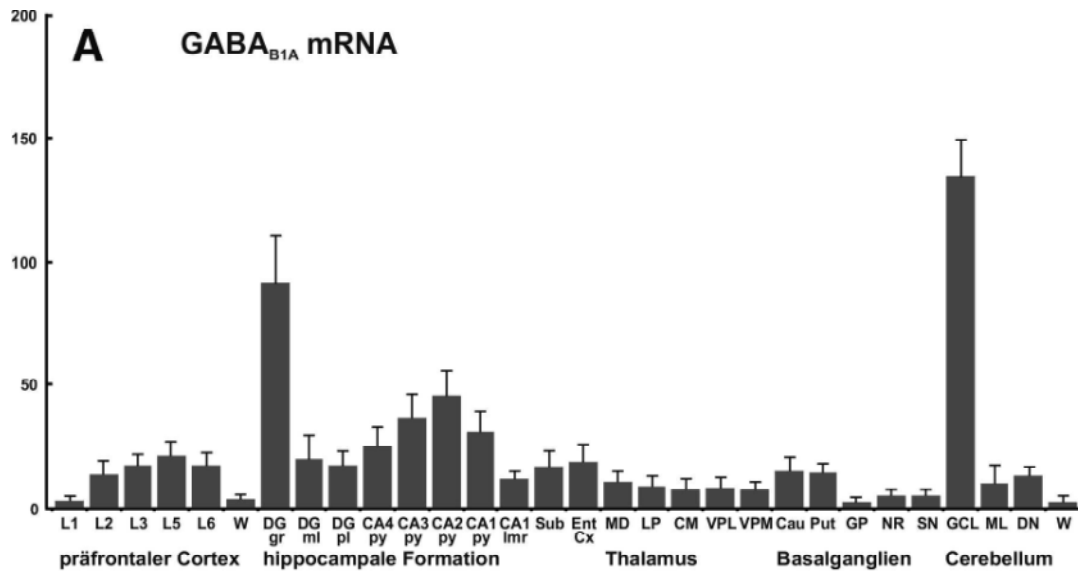


Abb. 4.16. Film-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) im Cerebellum. Deutlich abgrenzbar ist die Molekularzellschicht (ML) von der Körnerzellschicht (GCL). In der weißen Substanz des Cerebellums ist der Nucl. dentatus (ND) in allen Präparaten angeschnitten.



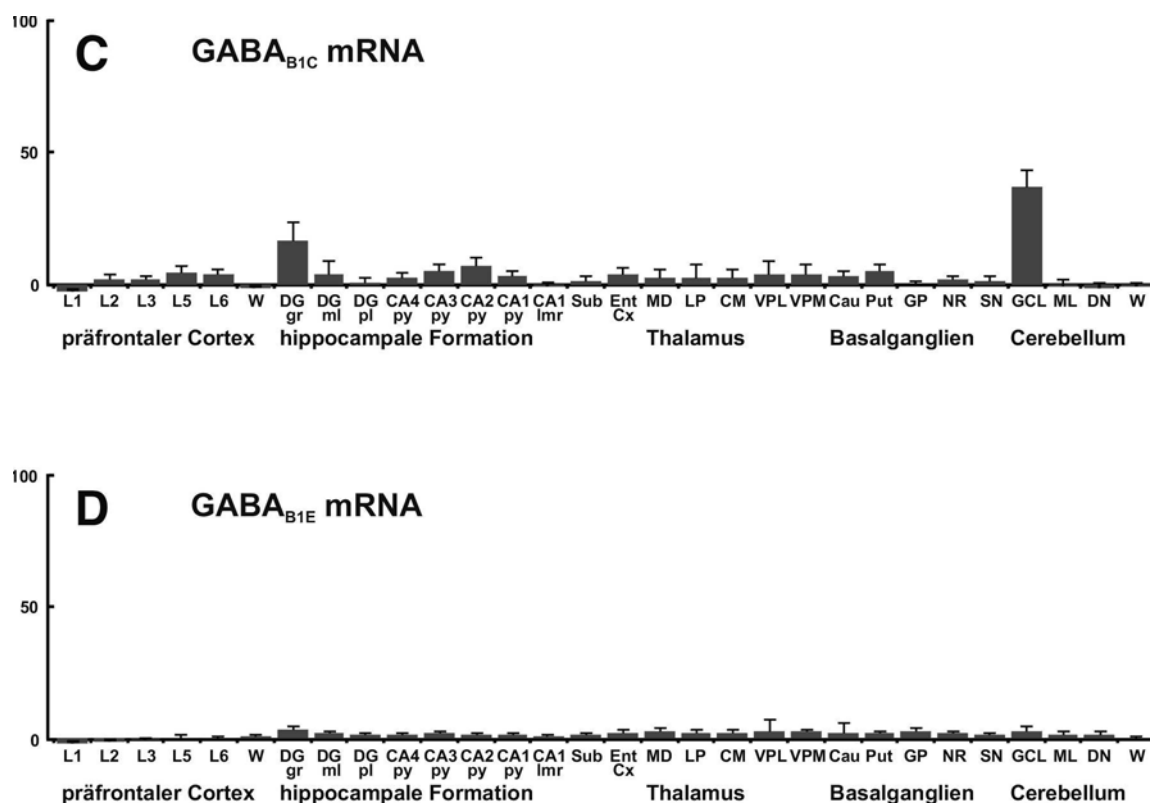


Abb. 4.17. Semiquantitative Bestimmung der Expression der GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) durch Densitometrie der Film-Autoradiografien. Die Messwerte sind um den unspezifischen Hintergrund korrigiert und in nCi/g \pm SEM dargestellt.

Abkürzungen:

LI-LVI: Lamina I-VI; DG: Gyrus dentatus; gr: Stratum granulosum; ml: Stratum moleculare; pl: polymorphes Stratum; CA4-1: Regionen 4-1 des Ammonshorns; py: Stratum pyramidale; lmr: Stratum lacunosum, moleculare et radiatum; Sub: Subiculum; EntCx: entorhinaler Cortex; MD: Nucl. mediodorsalis thal., LP: Nucl. lateralis post. thal., VPL: Nucl. ventralis posteriolateralis; VPM: Nucl. ventralis posteriomedialis thal., CM: Nucl. centromedianus thal.; R: Nucl. reticularis thal.; Cau: Nucl. caudatus; Put: Putamen; GP: Globus pallidus; NR: Nucl. ruber; SN: Substantia nigra; GCL: Körnerzellschicht; ML: Molekularzellschicht; DN: Nucl. dentatus; W: weiße Substanz.

4.2.2. Zelluläre Expression der GABA_{B1} Rezeptor mRNA Splice-Varianten

Cerebraler Cortex (PFC und ACC)

Die jeweils vorherrschenden Neurone der cortikalen Schichten (Typ-1) exprimierten auf niedrigem Niveau GABA_{B1A} und GABA_{B1B} mRNA, wobei für die letztere Variante die Werte etwas höher lagen, aber immer noch als schwache Expression anzusehen sind. GABA_{B1C-hum} mRNA lies sich nur in den Pyramidenzellen der L.II und den Spindelzellen der L.VI zweifelsfrei detektieren. Der zellulärer Nachweis von GABA_{B1E} mRNA gelang im Cortex nicht. Die nicht-pyramidalen kleineren Interneurone der Schichten II-VI zeigten für die Splice-Varianten der GABA_{B1A} und GABA_{B1B} Rezeptoren ein schwaches Signal. Messungen über dem cortikalen Marklager ergaben für diese beiden Transkripte keine sicher positiven Werte (Abb. 4.18., Tab. 4.2.).

Hippocampale Formation

Die Körnerzellen des Gyrus dentatus wie auch die Pyramidenneuronen der Regionen CA3-1 zeichneten sich, für die GABA_{B1A} mRNA durch schwächere und für die GABA_{B1B} mRNA durch mittlere Signalstärken aus. Noch über der Nachweisgrenze lagen die Messwerte für die Transkription der GABA_{B1C-hum} Variante in den Pyramidenneuronen von Ammonshorn, Subiculum und Entorhinalen Cortex und dem Stratum granulosum des Gyrus dentatus. In den Körnerzellen des Gyrus dentatus gelang auch als einziges der spezifische Nachweis von GABA_{B1E} mRNA im Hippocampus (Abb. 4.19., Tab. 4.2.).

Basalganglien

Im Nucleus caudatus und Putamen waren die kleineren und mittelgroßen Zellen für die GABA_{B1B} mRNA am deutlichsten markiert, aber auch Transkripte der GABA_{B1A} und GABA_{B1C-hum} Rezeptoren ließen sich in den größeren Zellen nachweisen. Für die Interneurone konnte ein schwaches Signal mit der GABA_{B1A} Sonde und ein mittleres mit der GABA_{B1B} Sonde erzielt werden. Die Neurone der Substantia nigra exprimieren die Varianten GABA_{B1A} und GABA_{B1B}, die des Nucleus ruber zudem noch die GABA_{B1C-hum} mRNA (Abb. 4.20., Tab. 4.2.).

Thalamus

Für GABA_{B1A} und GABA_{B1B} mRNA ergaben sich in den Neuronen und Interneuronen in den untersuchten thalamischen Kerngebieten zumindest schwache Werte. Abweichend hiervon exprimierten die mittelgroßen und größeren Zellen im Nucl. mediodorsalis (MD) und den ventralen Kernen in starkem Ausmaß GABA_{B1B} mRNA. Ebenfalls in Neuronen des MD konnte auf schwachem Niveau GABA_{B1C-hum} mRNA dargestellt werden. GABA_{B1E} mRNA fand sich in keinen Zellen des Thalamus (Abb. 4.21., Tab. 4.2.).

Cerebellum

In den Purkinjezellen zeigt sich am deutlichsten der Unterschied in der Expression der einzelnen GABA_{B1} Splice-Varianten: einem schwachen Signal für GABA_{B1A} und fraglich niedrigen Werten für die GABA_{B1C-hum} und GABA_{B1E} mRNA steht eine sehr starke Expression von GABA_{B1B} mRNA gegenüber. Ansonsten unterscheidet sich die cerebelläre Verteilung der GABA_{B1A} und GABA_{B1B} mRNA nur noch durch die etwas höhere Werte von GABA_{B1B} in den Golgizellen und das ebenfalls bei diesem Transkript auftretende typische Bandmuster für die Bergmann Glia. Ein Nachweis der GABA_{B1C-hum} mRNA gelang in den Körnerzellen, den Golgizellen wie den Korbzellen, in welchen auch alleinig GABA_{B1E} mRNA sicher zu identifizieren war (Abb. 4.22., Tab. 4.2.).

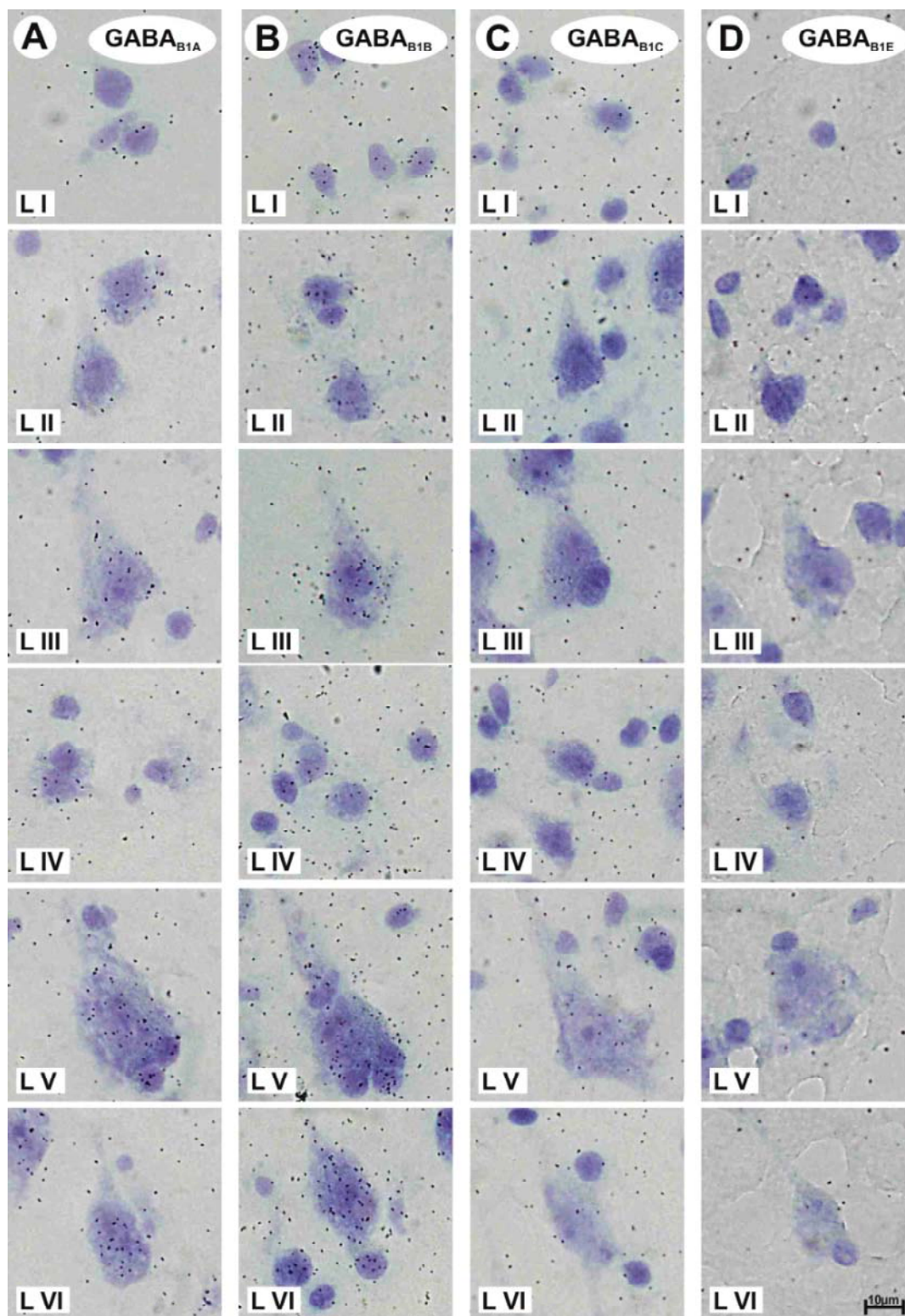


Abb. 4.18. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) im präfrontalen Cortex. Die abgebildeten Zellen sind die kleinen Neurone der Lamina I (LI), die Pyramidenneurone der Lamina II, III und V (LII, LIII, LV), die Sternzellen der Lamina IV (LIV) und die spindelzelligen Neurone der Lamina VI (LVI).

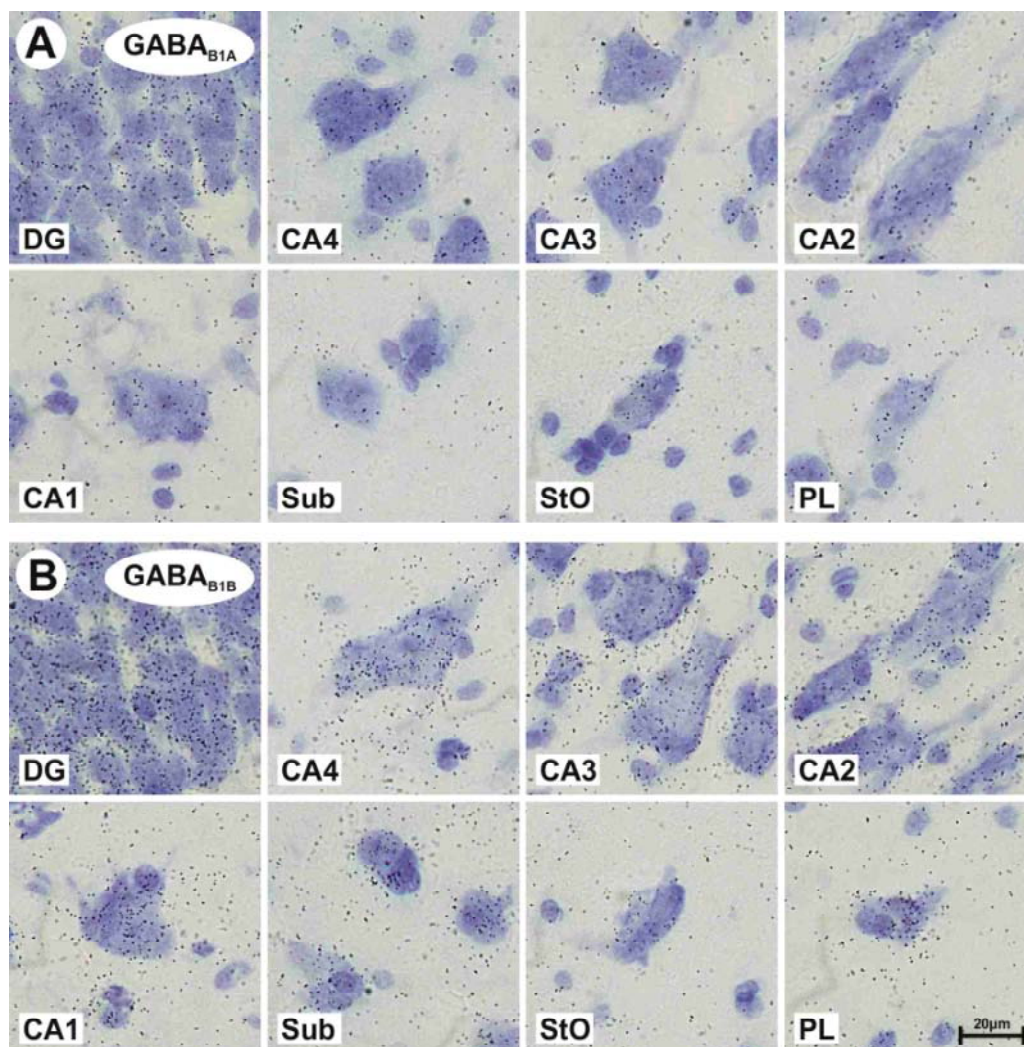


Abb. 4.19. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) im Hippocampus. Dargestellt sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG), Pyramidenzellen der Regionen 4-1 im Ammonshorn (CA4-1), Pyramidenneurone des Subiculum (Sub), Interneurone des Stratum oriens der CA1-Region (StO) sowie der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus (PL).

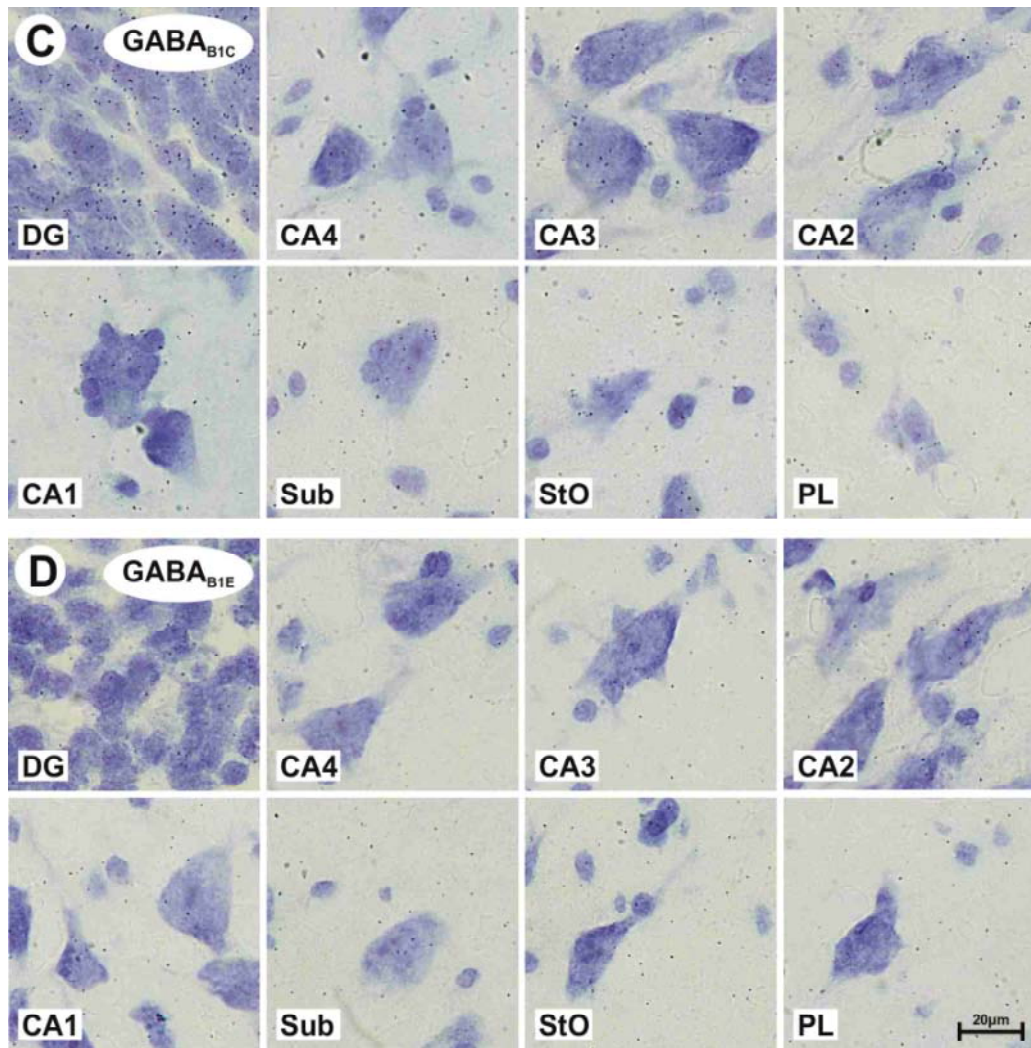


Abb. 4.19. (Fortsetzung)

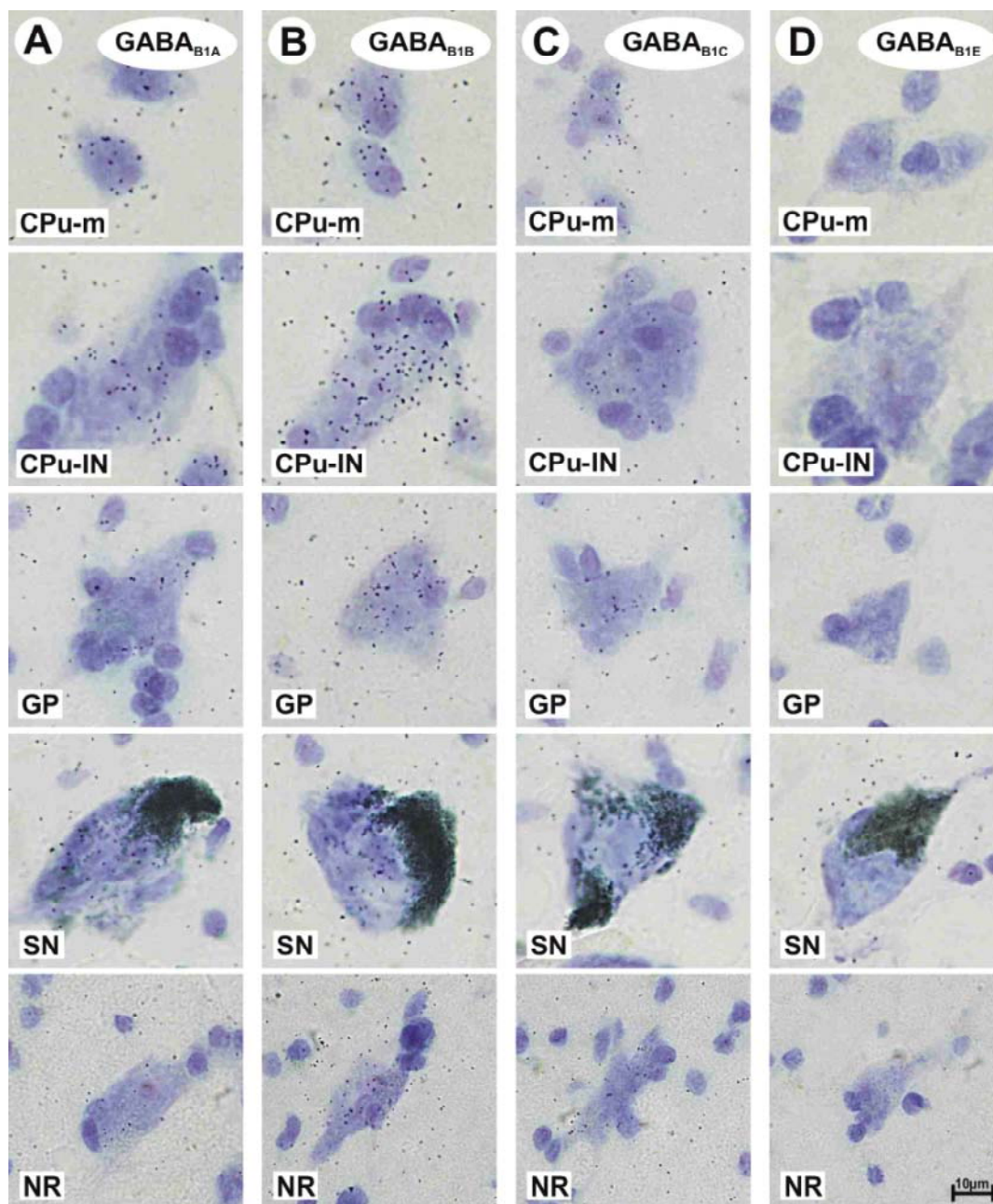


Abb. 4.20. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) in den Basalganglien. Abgebildet sind die mittelgroßen Zellen (CPu-m) und die großen Interneurone (CPu-IN) im Putamen, die melaninhaltigen Neurone der Substantia nigra (SN) sowie Neurone des Nucl. ruber (NR).

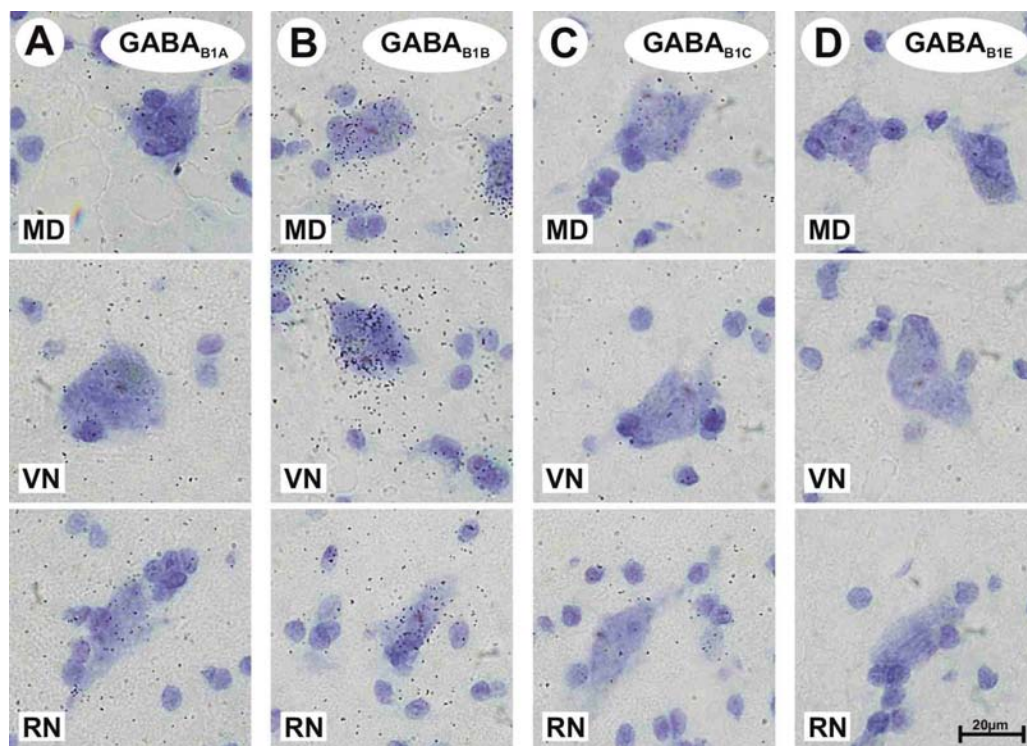


Abb. 4.21. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) in den vorherrschenden Neuronen des Nucl. mediodorsalis (MD), der ventralen Kerngruppen (VN) und des Nucl. reticularis (RN) des Thalamus.

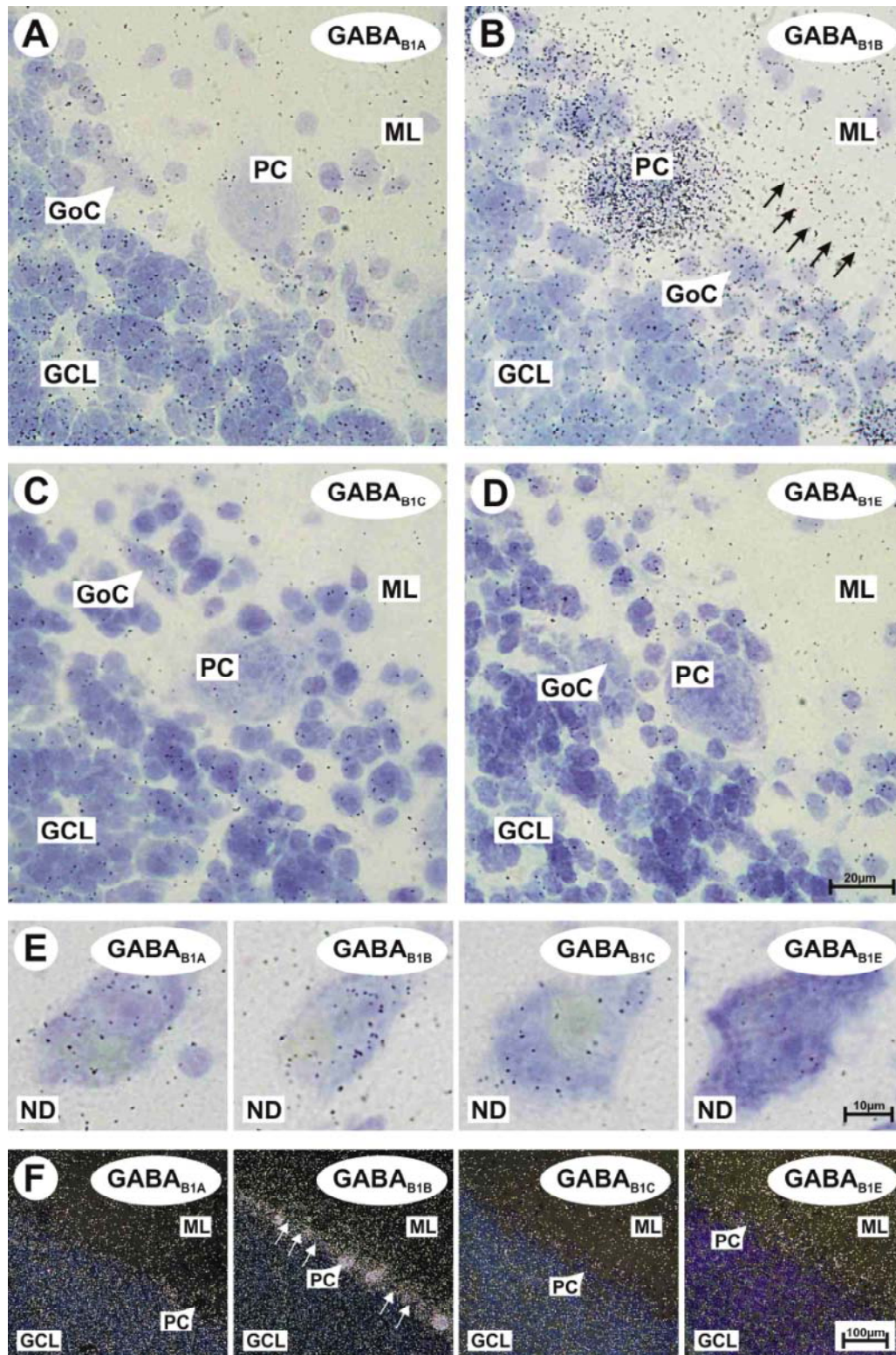


Abb. 4.22. Emulsions-Autoradiografien der Expression von GABA_{B1} Splice-Varianten mRNA (A-D) im Cerebellum. Zwischen der Körnerzellschicht (GCL) und der Molekularzellschicht (ML) liegen die Purkinje- (PC) und Golgizellen (GoC). In (D) sind Neurone des Nucl. dentatus abgebildet. (E) zeigt die Regionen von (A) bzw. (B) in geringerer Vergrößerung und im Dunkelfeld, wodurch die unterschiedlichen Signalintensitäten deutlicher hervortreten. Die Pfeile in (B) und (F) zeigen auf ein bandförmiges Signal in der Purkinjezellschicht, dem Ort der Bergmann-Glia (welche mit Thionin nicht anfärbt werden kann).

Region	Transkript	GABA _{B1A} mRNA	GABA _{B1B} mRNA	GABA _{B1C} mRNA	GABA _{B1E} mRNA
Prefrontaler Cortex					
Lamina I		+	+	(+)	0
Lamina II (Pyramidenzellen)		+	+	+	0
Lamina III (Pyramidenzellen)		+	+	(+)	0
Lamina IV (Sternzellen)		+	+	0	0
Lamina V (Pyramidenzellen)		+	+	(+)	0
Lamina VI (Spindelzellen)		+	+	+	0
weiße Substanz		(+)	(+)	0	0
Hippocampale Formation					
Gyrus dentatus (Str. granulare)		+	++	+	+
CA4 (Str. pyramidale)		+	+	(+)	0
CA3 (Str. pyramidale)		+	++	+	(+)
CA1 (Str. pyramidale)		+	++	+	(+)
Subiculum (Pyramidenzellen)		+	++	+	0
entorhinaler Cortex (Pyramidenzellen)		+	++	+	0
Basalganglien					
Nucl. caudatus und Putamen					
kleine Zellen ^a		(+)	+	(+)	0
mittelgroße Zellen ^a		+	+	+	0
große Interneurone		+	++	(+)	0
Globus pallidus					
mittelgroße Zellen ^a		+	+	0	0
große Interneurone		+	+	(+)	0
Substantia nigra ^b		+	+	0	0
Nucl. ruber		+	+	+	0
Thalamus (größere Zellen > 15µm)					
Nucl. mediodorsalis		+	+++	+	0
Nucl. centromedianus		+	+	0	0
ventrale Nuclei (VPM, VPL)		+	+++	(+)	0
Nucl. reticularis		+	+	(+)	0

Region	Transkript	GABA _{B1A} mRNA	GABA _{B1B} mRNA	GABA _{B1C} mRNA	GABA _{B1E} mRNA
Cerebellum					
Körnerzellen		+	+	+	(+)
Purkinjezellen		+	++++	(+)	(+)
Golgizellen		+	++	+	0
Bergmann-Glia ^c		0	+	0	0
Sternzellen		+	+	(+)	0
Korbzellen		+	+	+	+
Nucl. dentatus		+	+	(+)	0
weiße Substanz		(+)	(+)	(+)	0

Tab. 4.2. Semiquantitative Übersicht der zellulären Expression von GABA_{B1} Rezeptor Splice-Varianten mRNA in den untersuchten Hirnregionen:

0, nicht nachweisbar, 0-10%; (+) , fraglich schwach, 10-20%; + , schwach, 21-83%;

++ , mäßig, 84-155% ; +++ , stark, 156-228%; +++++ , sehr stark >229% der Zellfläche ist von Grains bedeckt;

^a „Zellen“ steht hier für Neuronen/Interneuronen, nicht für Gliazellen.

^b nur über dem melaninfreien Anteil der Neuronen war eine Messung möglich.

^c nicht messbar, da keine Thionin-färbbaren Zellkörper vorliegen; Angabe abgeschätzt.

4.2.3. RT-PCR von ausgewählten GABA_B Rezeptor mRNA Splice-Varianten

Diese Experimente wurden durchgeführt, um die mit der *in situ* Hybridisierung nur spärlich nachzuweisende GABA_{B1E} mRNA Expression durch eine zweite Methode zu validieren. Zudem ergibt sich durch die RT-PCR eine alternative Möglichkeit zu überprüfen, ob die beschriebenen GABA_{B2} mRNA Splice-Varianten im humanen ZNS vorkommen. Dies war von Bedeutung, da sich das Design von Oligonukleotiden für eine *in situ* Hybridisierungsstudie zur Expression der GABA_{B2} Splice-Varianten als schwierig erwies. Hierbei kam es durch die weitgehend homologen Sequenzen dieser Varianten stets zu Kreuzhybridisierungen, da sich die Sonden teilweise nur in wenigen Basenpaaren voneinander unterscheiden.

Mit den in der RT-Reaktionen gewonnenen cDNA-Proben aus den verschiedenen Hirnregionen wurde zuerst eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, welches in der Lage ist, unter geeigneten Bedingungen anhand der Länge des Amplikons zwischen einer Expression von GABA_{B1A}, GABA_{B1B} und GABA_{B1C-hum} Rezeptor mRNA (571bp) und der von GABA_{B1E} Rezeptor mRNA (420bp) zu unterscheiden (vgl. Abb. 3.3.).

Eine Bande von etwa 570bp war in allen eingesetzten cDNA-Pools deutlich, eine etwa 420bp lange Bande war schwach für das hippocampale und cerebelläre RNA-Isolat zu erkennen (Abb. 4.23.A).

In einer zweiten Versuchsserie wurde eine PCR mit dem Primerpaar „hGBR2abc sense/hGBR2ab antisense“ angesetzt, welches unter Annahme der Existenz der drei beschriebenen GABA_{B2} mRNA Splice-Varianten zwei Banden von 552bp für die GABA_{B2A} mRNA und von 474bp für die GABA_{B2B} mRNA erbringen müsste. Für einen weiteren Ansatz mit dem Primerpaar „hGB2abc sense/hGB2c antisense“ würde eine Bande von 632bp die Existenz einer GABA_{B2C} mRNA Variante nahelegen (vgl. Abb. 3.4.)

Für das erste Primerpaar wurde eine starke Bande (für alle Hirnregionen) von etwa 550bp Länge erzeugt, was für die Expression von GABA_{B2A} und gegen die von GABA_{B2B} mRNA sprach (Abb. 4.23.B). Die PCR mit dem zweiten Primerpaar ergab eine starke Bande von ca. 710bp Länge. Eine für GABA_{B2C} spezifische Bande konnte (632bp) nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.23.C).

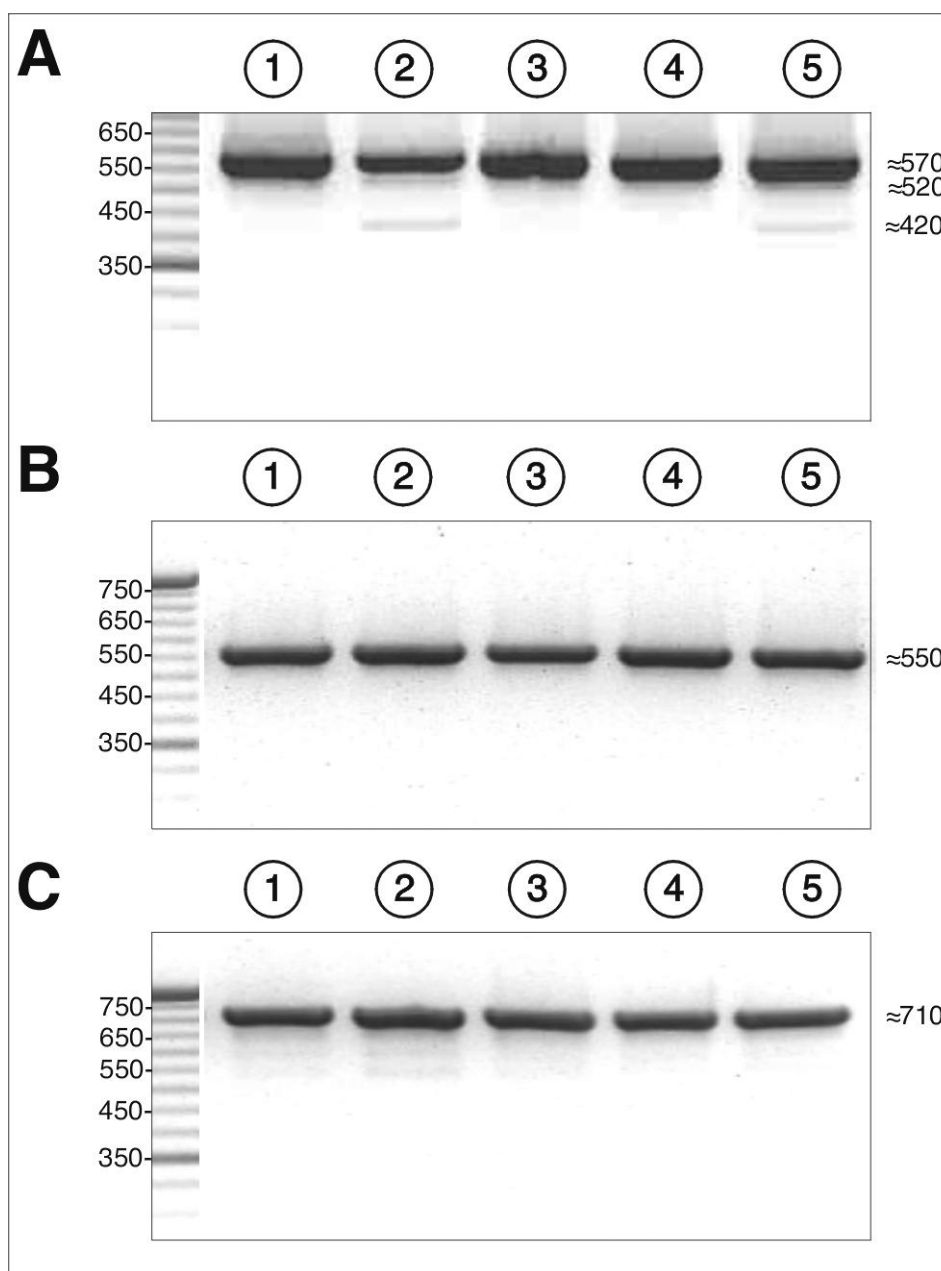


Abb. 4.23. RT-PCR von RNA-Isolaten aus Cortex- (1), Hippocampus- (2), Basalganglien- (3), Thalamus- (4) und Kleinhirn- (5) Präparaten für den Nachweis der GABA_{B1A} und GABA_{B1E} mRNA (A) GABA_{B2A} bzw. GABA_{B2B} mRNA (B) und GABA_{B2C} mRNA (C).

4.3. GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-Immunoreaktivität

Cerebraler Cortex

Starke Immunoreaktivität für GABA_{B1} Rezeptoren konnte in vereinzelt kleineren Zellen der Lamina I-VI beobachtet werden. Eine mittlere Anfärbung wiesen die Pyramidenneurone der Laminae II, III und V, die Sternzellen (L.IV) und die fusiformen Neurone der Schicht VI auf. Die Pyramiden der Lamina II und V waren hierbei nicht einheitlich immunoreaktiv, vielmehr konnten eher apikale cytoplasmatische Bereiche von stärkerer Farbintensität beobachtet werden. Das cortikale Neuropil war von schwächerer Antigenität für GABA_{B1}, wobei in Lamina I sich Fasern äußerst stark anfärben ließen.

In mit Antikörpern gegen GABA_{B2} Rezeptoren inkubierten cortikalen Gewebeschnitten ließen sich die kleineren Zellen in allen Laminae, die Pyramiden der LII und V sowie die Neurone der Lamina VI stark anfärben. Dagegen war die Immunoreaktivität für die Sternzellen und Pyramidenzellen der III. Schicht von mittlerer Stärke. Etwas heller zeichnete sich das Neuropil ab, welches jedoch in den unteren beiden Schichten von kleinscholligeren, stärkeren Anfärbungen und in den oberen beiden Laminae zudem noch mit dünnen stark gefärbten Fasern durchzogen war (Abb. 4.24.).

Hippocampale Formation

In den Körnerzellen des Gyrus dentatus lag die, an den Nachweis von GABA_{B1}-Immunoreaktivität gekoppelte Farbreaktion in geringer Ausprägung vor. Die Pyramidenneurone des Ammonshorns wie des Subiculus ließen sich mäßig anfärben. Die diese Zellen direkt umschließende Matrix war schwach, das Neuropil des Stratum moleculare des Gyrus dentatus wie auch des Stratum lacunosum und moleculare der CA-Regionen erschien etwas deutlicher reaktiv. Der Entorhinale Cortex ist bestimmt von schwach-immunoreaktiven Faserbereichen, von denen sich stärker gefärbte Pyramidenneuron abheben (Abb. 4.25.A).

Deutlich stärker stellte sich die Farbintensitäten für den Nachweis von GABA_{B2} Rezeptor-Proteinen dar. Hier wiesen alle Körnerzellen des Gyrus dentatus und die Pyramidenzellen der hippocampalen Formation starke Anfärbbarkeit auf. Vereinzelt zeichneten sich kleinere stärker immunoreaktive Neuronen vom ebenfalls mäßig reaktiven Neuropil ab (Abb. 4.25.B). Im Stratum moleculare der CA1-Region zeichneten sich stark GABA_{B1}- wie auch GABA_{B2}-immunoreaktive weitverzweigte große Astrocyten ab. (Abb. 4.25.C)

Basalganglien

GABA_{B1}-Immunoreaktivität konnte in schwacher Form für die kleineren und in mittlerer Stärke vereinzelt in mittelgroßen Zellen des Nucleus caudatus und des Putamen dargestellt werden. Ebenso mittelgradig angefärbt imponierten die großen Interneurone des Putamen und des Globus

pallidus. In diesem Kern konnten mittelgroße gefärbte Neurone beobachtet werden, welche in etwa einem Drittel der Fälle ein Netz aus stark immunoreaktiven Pünktchen umgibt.

Im Gegensatz zur GABA_{B1}-Immunoreaktivität konnten mit dem Antikörper gegen GABA_{B2} Rezeptoren im Nucleus caudatus und Putamen nur die großen Interneurone angefärbt werden.

Der von Zellkörpern freie Bereich ist im Striatum nur schwach immunoreaktiv für die GABA_{B1} wie auch die GABA_{B2}-Proteine. Von starker Ausprägung für beide Rezeptoren war die Immunoreaktivität der Neurone in der Substantia nigra und in mäßiger Form im Nucleus ruber (Abb. 4.26.).

Thalamus

Zellen mittlerer Größe zeigten eine einheitliche mittlere und die größeren Neurone des Thalamus in allen mikroskopierten Arealen starke GABA_{B1}-Proteinexpression. Diese war an der Zellmembran betont und erstreckte sich oft auch in erste dendritische Ausläufer. Einschränkend sei hierzu bemerkt, dass die spindelförmigen Neurone des Nucleus reticularis deutlich schwächer anfärbbar waren. Das Neuropil erwies sich in der Fläche als nur schwach immunoreaktiv für die GABA_{B1} Rezeptoren, bildete aber vor allen im Nucleus mediodorsalis feine, stark reaktive Netze um die größeren Neurone. Von gleicher Stärke und in identischen Zellpopulationen stellte sich der immunhistochemische Nachweis der GABA_{B2} Rezeptor dar, wobei die Neurone des Nucl. reticularis hier starkes Färbeverhalten zeigten (Abb. 4.27.).

Cerebellum

Die Antikörper für die Detektion der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-Proteine erbrachten in beiden Fällen stärkste Farbreaktionen in den Purkinjezellen, wobei die im Schnitt noch enthaltenen Anteile des Dendritenbaums dieser Zellen sich ebenso stark reaktiv zeigten. Die Körnerzellschicht stellte sich im Vergleich hierzu schwächer, aber immer noch mäßig färbbar, dar. Für die GABA_{B1}-Immunoreaktivität soll noch erwähnt werden, dass hier verteilte Cluster von Körnerzellen stärker als die sie umgebenden Zellen gleicher Art hervortraten. Etwas dunkler, d.h. reaktiver, konnten Golgizellen identifiziert werden. Die Zellen der Molekularzellschicht konnten nur aufgrund ihrer Form, nicht aber durch Kontrastierung gegen das durchaus kräftig gefärbte Neuropil identifiziert werden. In der Purkinje- und der Molekularzellschicht konnte unter Verwendung des GABA_{B1}-Antikörpers stark gefärbte Fasern beobachtet werden. Diese umspinnen entweder das Purkinjellsoma oder durchziehen die Molekularzellschicht. Auch in Nachbarschaft zu den Purkinjezellen konnten GABA_{B1}-immunoreaktive kleinste (2-4 µm) Zellkörper ausgemacht werden, welche der Bergmann-Glia zuzuordnen sind.

Die Neurone des Nucleus dentatus exprimieren beide GABA_B Rezeptoren in deutlicher Form. In Anlehnung an die Beobachtungen im Hippocampus konnten im Kleinhirn vereinzelt kleinere, für beide Rezeptoren positive Astroglia sowie GABA_{B1}-immunoreaktive Bergmann-Glia identifiziert werden.

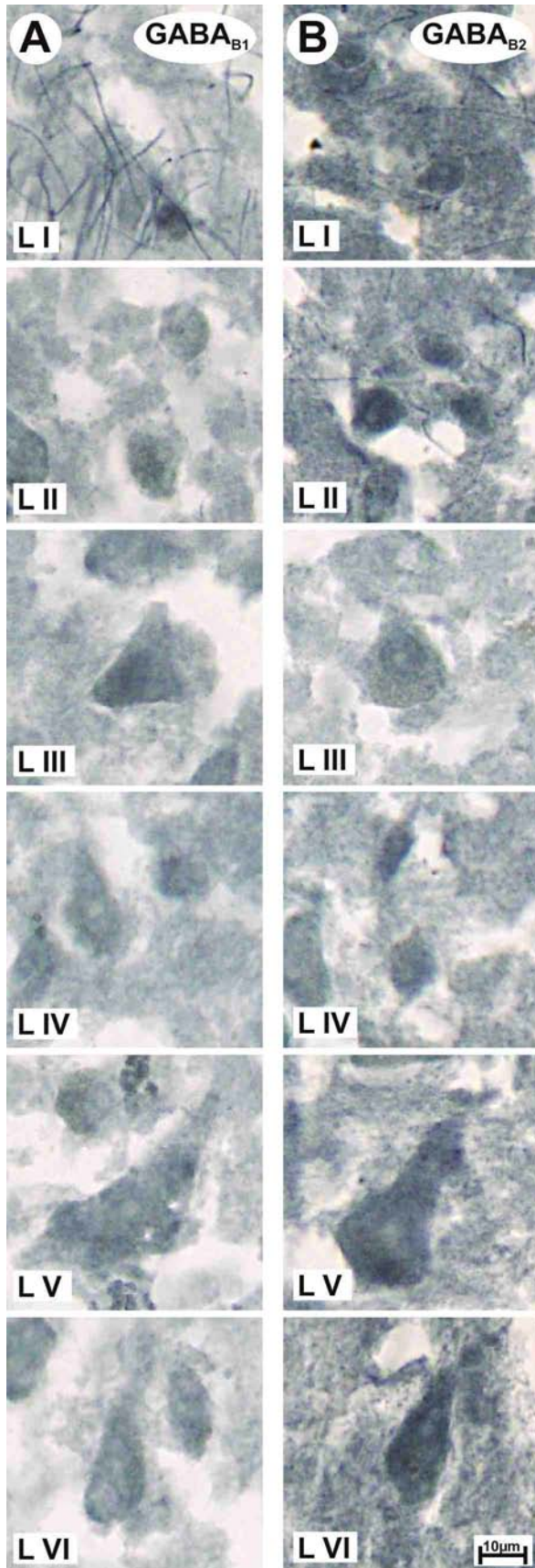


Abb. 4.24. Nachweis von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} (B) Rezeptor-Immunoreaktivität (grau-schwarz) im präfrontalen Cortex. Die primären Neuronen aller sechs Schichten des PFC weisen für beide Antikörper eine mittlere bis stärkere Färbung auf.

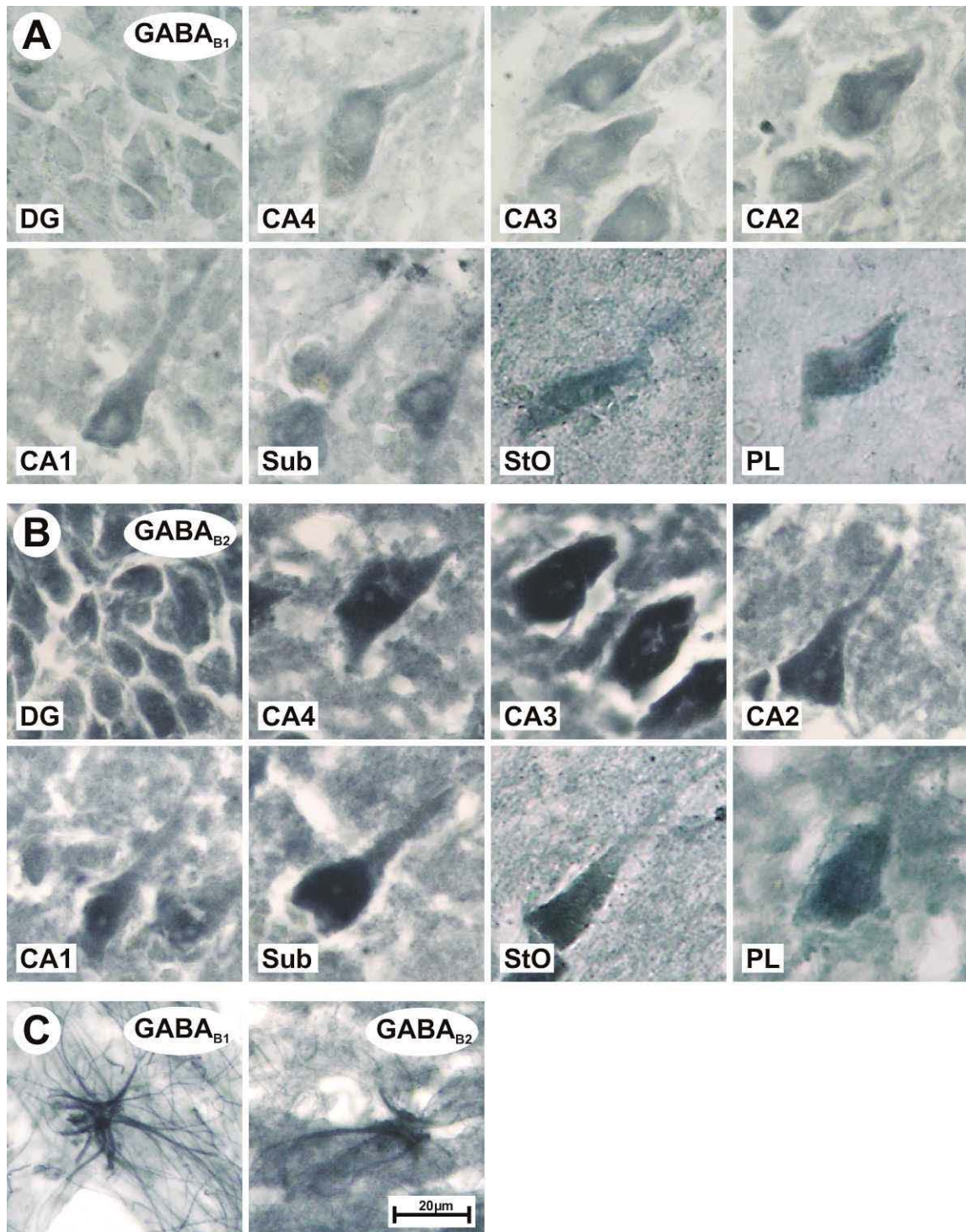


Abb. 4.25. Nachweis von GABA_{B1} (A) und GABA_{B2} (B) Rezeptor-Immunoreaktivität (grau-schwarz) im Hippocampus. Abgebildet sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG), Pyramidenzellen der Regionen 4-1 im Ammonshorn (CA4-1), Pyramidenneurone des Subiculums (Sub), Interneurone des Stratum oriens der CA1-Region (StO) sowie der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus (PL). Auch in der Astroglia konnte starke Immunoreaktivität gegen GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-Proteine beobachtet werden (C).

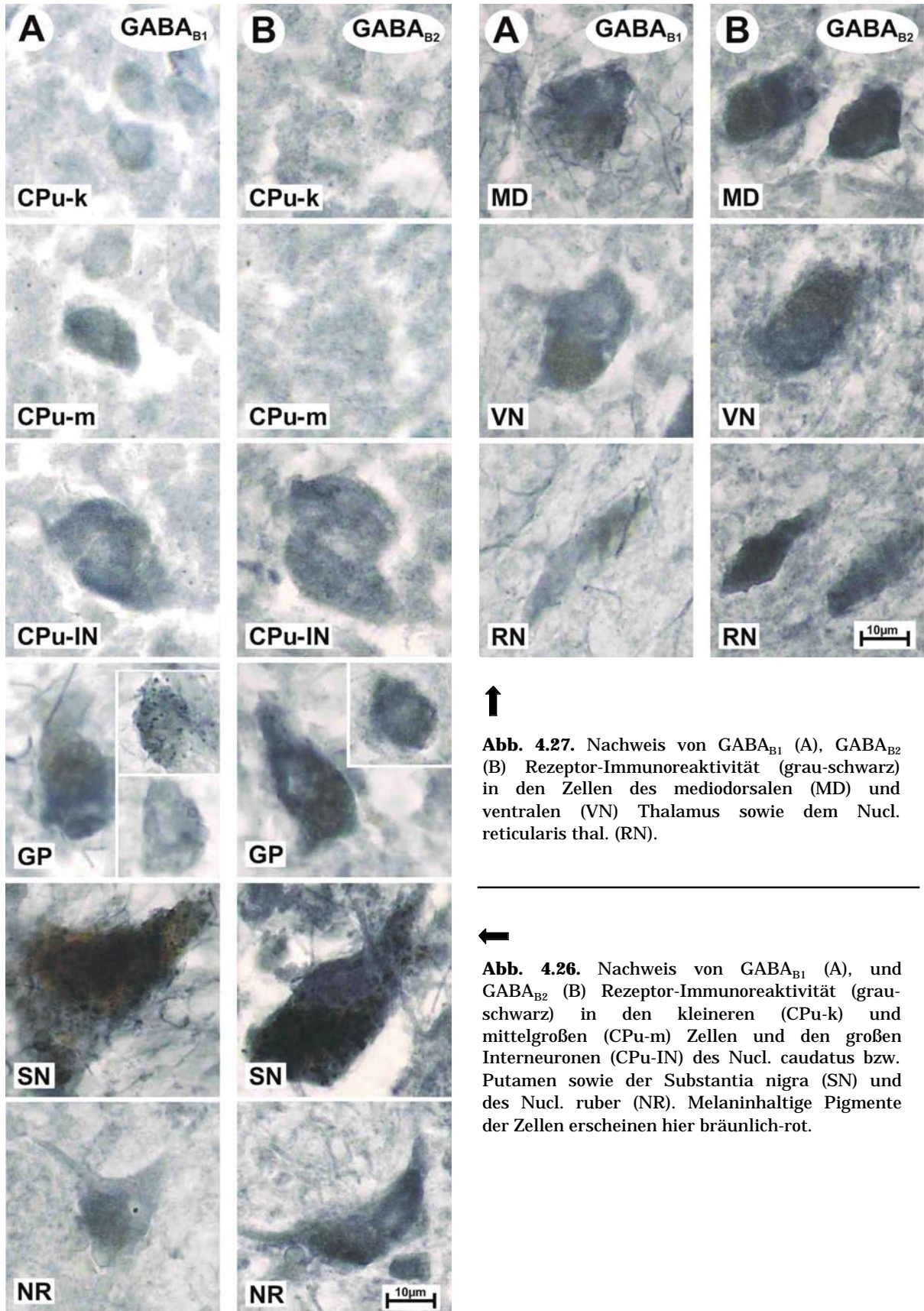


Abb. 4.27. Nachweis von GABA_{B1} (A), GABA_{B2} (B) Rezeptor-Immunoreaktivität (grau-schwarz) in den Zellen des mediodorsalen (MD) und ventralen (VN) Thalamus sowie dem Nucl. reticularis thal. (RN).



Abb. 4.26. Nachweis von GABA_{B1} (A), und GABA_{B2} (B) Rezeptor-Immunoreaktivität (grau-schwarz) in den kleineren (CPu-k) und mittelgroßen (CPu-m) Zellen und den großen Interneuronen (CPu-IN) des Nucl. caudatus bzw. Putamen sowie der Substantia nigra (SN) und des Nucl. ruber (NR). Melaninhaltige Pigmente der Zellen erscheinen hier bräunlich-rot.

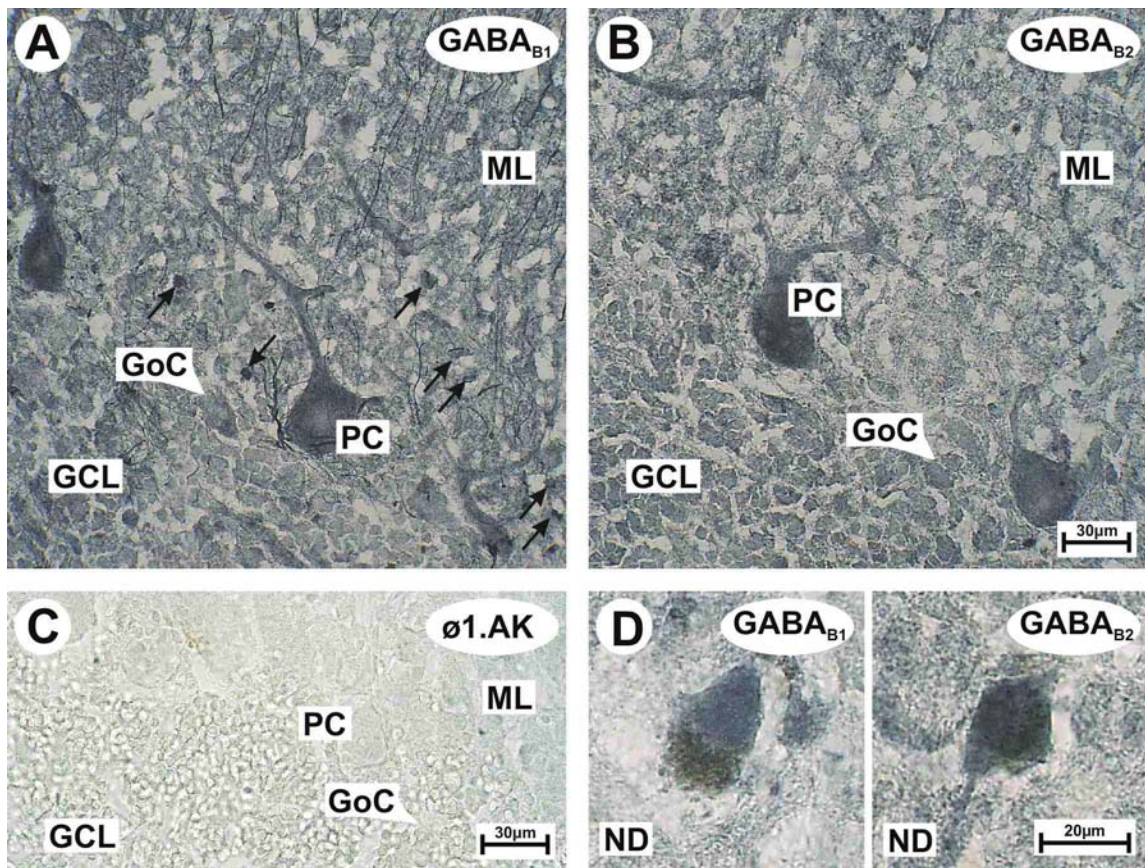


Abb 4.28. Nachweis von GABA_{B1} (A) und GABA_{B2} (B) Rezeptor-Immunoreaktivität (grau-schwarz) im Cerebellum. Zwischen Körnerzellschicht (GCL) und Molekularzellschicht (ML) befinden sich die Purkinjezellen (PC) und Golgizellen (GoC). Die GABA_{B1} Rezeptor-immunoreaktive Bergmann-Glia ist mit Pfeilen gekennzeichnet (A).

In (C) ist ein Kontrollschnitt ohne Zugabe eines primären Antikörpers abgebildet, was zu einer nur sehr schwachen unspezifischen Farbreaktion führte. In (D) sind immunreaktive Neurone im Nucl. dentatus (ND) des Kleinhirns für GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren dargestellt.

4.4. [³⁵S]GTP γ S-Bindung an GABA_B Rezeptoren

Diese Experimente wurden durchgeführt um die Existenz funktionell gekoppelte Dimere von GABA_B Rezeptoren nachzuweisen. Dies ist, bedingt durch die Methode nur möglich wenn der relativ hohe unspezifische Spontanumsatz an G $\alpha_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren in die Berechnung des Ergebnisses einfließt. Wie in den Einschüben in Abb. 4.29.A-E deutlich zu erkennen ist, sind diese unspezifischen, d.h. nicht an eine spezifische Rezeptorstimulation gebundenen Basalsignale je nach Hirnregion stark unterschiedlich ausgeprägt. So zeigen kortikale und hippocampale Strukturen im Vergleich zu den anderen untersuchten Hirnregionen einen wesentlich höheren Basalwert. Wie bereits unter 3.6. erläutert wurde, werden deshalb die Ergebnisse von [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassays als %Stimulation über der Basalaktivität dargestellt. Aus der Literatur (Sim und Childers 1997; Happe et al. 2000) und eigenen Beobachtungen kann eine Abweichung von mehr als 10% unter den gegebenen Versuchsbedingungen als sicher spezifischer Umsatz an G $\alpha_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren angesehen werden.

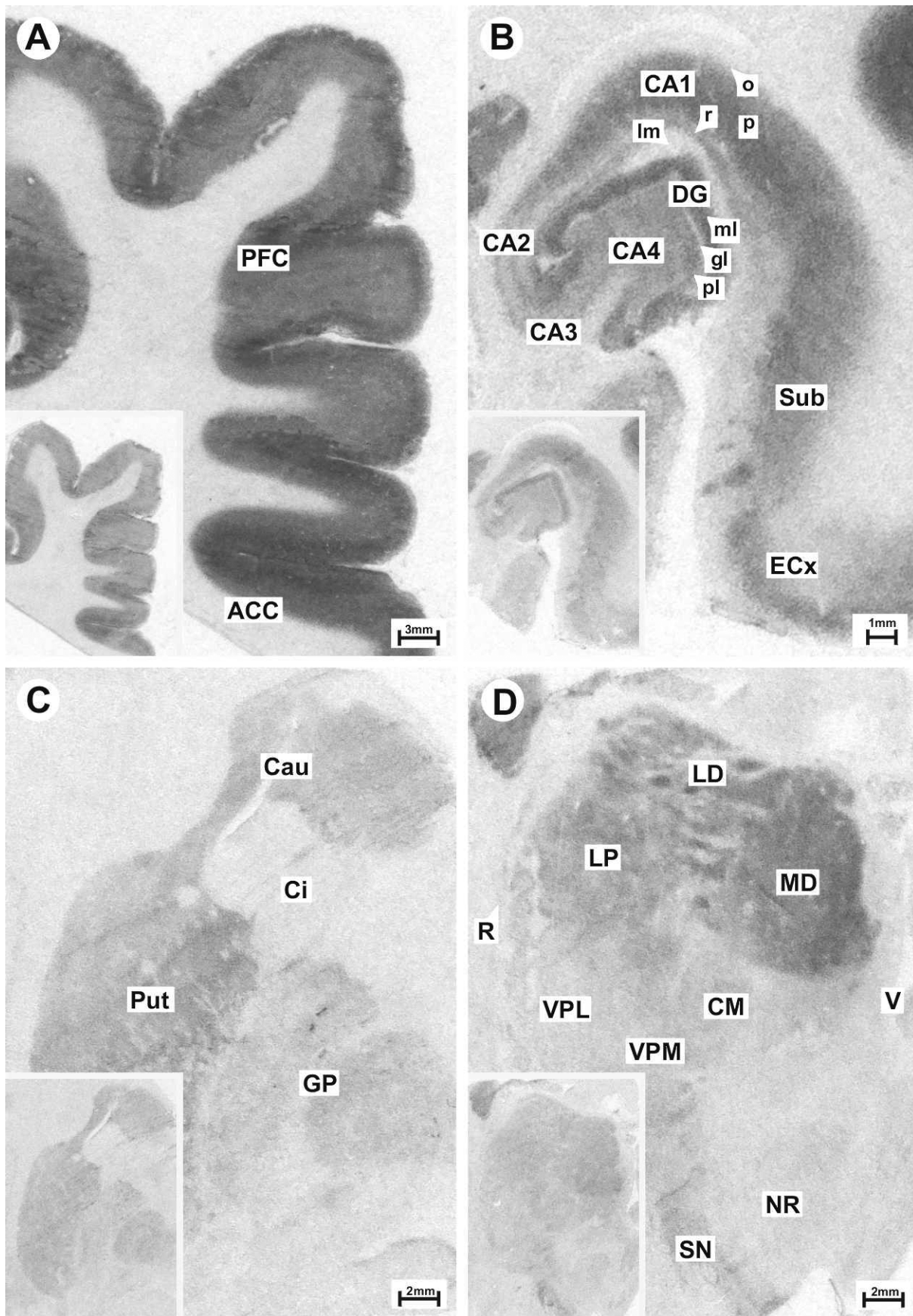
Über allen Laminae des präfrontalen Cortex konnten robuste Stimulationen an GABA_B Rezeptoren erzeugt werden. Hierbei ist diese deutlicher in der II. und III. Schicht nachweisbar. Der anteriore cinguläre Cortex unterschied sich vom präfrontalen Cortex nicht wesentlich in seiner [³⁵S]GTP γ S-Bindung.

Interessanterweise konnten im Hippocampus die höchsten Werte über dem relativ zellarmen Stratum moleculare des Gyrus dentatus gemessen werden. Die zellreicheren Bereiche des Stratum granulosum und der Pyramidenzellen des Ammonshorns und des Subiculum zeigten hingegen einen niedrigeren, aber immer noch deutlichen G $\alpha_{i/o}$ -Protein-Umsatz. Der Entorhinale Cortex konnte durch R-Baclofen stärker, d.h. zu annähernd 100% über den Basalwert stimuliert werden.

Im Thalamus konnte eine deutliche funktionelle Kopplung an GABA_B Rezeptoren nur im Nucl. mediodorsalis und schwächer ausgeprägt im Nucl. lateralis post. gemessen werden. Der centromediane Nucleus und die ventralen Nuclei zeigten keine Kopplung.

Ähnlich stellten sich die Ergebnisse in den untersuchten Bereichen der Basalganglien dar, deren Stimulation den 10%-Unschärfbereich nicht überschreiten konnte.

Im Cerebellum schließlich konnte mit dem [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassays in der Körnerzellschicht eine schwache und über der Molekularzellschicht eine sehr hohe Stimulation (160%) erzeugt werden. Die Messung über dem Nucleus dentatus ergab keine und über mehreren Feldern der kortikalen und cerebellären weißen Substanz einen grenzwertig positiven Befund (Abb. 4.29., 4.30.).



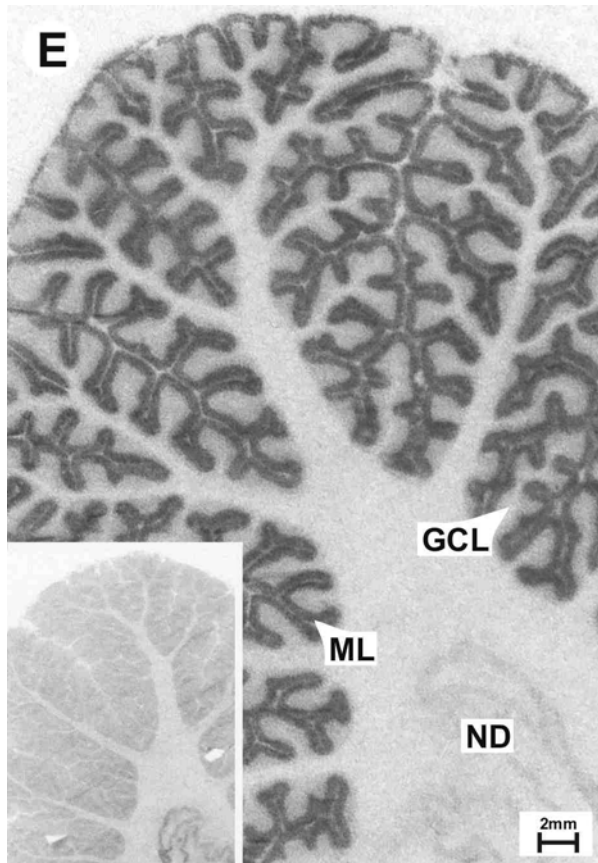


Abb. 4.29. Durch R-Baclofen (1mM) stimulierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung an GABA_B Rezeptoren

(A) im präfrontalen (PFC) und anterioren cingulären Cortex (ACC),

(B) in der hippocampalen Formation mit Gyrus dentatus (DG) und seinem Stratum granulare (gl), Stratum moleculare (ml) und der polymorphen Hilusregion (pl), dem Ammonshorn mit seinen Regionen CA4-CA1, welches sich in Stratum lacunare und moleculare (lm) und Stratum radiatum (r), das Stratum pyramidale (p) und Stratum oriens (o) untergliedert, dem Subiculum (Sub) und dem entorhinalen Cortex (ECx),

(C) im Striatum mit Nucl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Capsula interna (Ci) und Globus pallidus (GP),

(D) im Thalamus mit Nucl. mediodorsalis thal. (MD), Nucl. lateralis dorsalis thal. (LD), Nucl. lateralis post. thal. (LP), Nuclei ventralis posteriolateralis (VPL) et posteriomedialis thal. (VPM), Nucl. centromedianus thal. (CM) und Nucl. reticularis thal. (R)

und oberen Hirnstamm mit Nucl. ruber (NR) und Substantia nigra (SN),

(E) im Kleinhirn mit Molekularzellschicht (ML), Körnerzellschicht (GCL) und dem Nucl. dentatus (ND).

Die Einschübe in (A-E) zeigen einen Schnitt unter basalen Versuchsbedingungen (d.h. ohne Zugabe eines Agonisten).

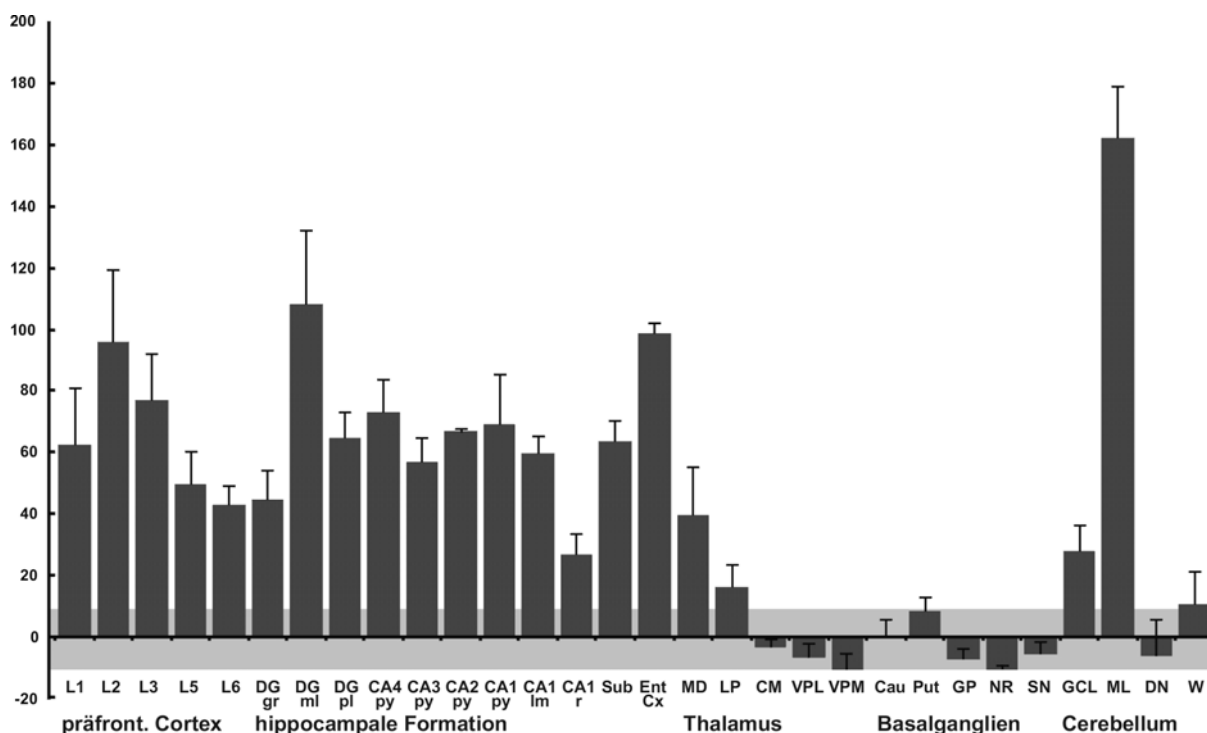


Abb. 4.30. Quantitative Bestimmung der [35 S]GTP γ S-Bindung an GABA $_B$ Rezeptoren durch Densitometrie von den Film-Autoradiografien. Die Stimulation wurde mit 1,0 mM R-Baclofen durchgeführt. Die Messwerte sind als Abweichung vom Basalwert in % dargestellt (\pm SEM). Grau unterlegt ist der $\pm 10\%$ Bereich.

Abkürzungen:

LI-LVI: Lamina I-VI; DG: Gyrus dentatus; gr: Stratum granulosum; ml: Stratum moleculare; pl: polymorphes Stratum; CA4-1: Regionen 4-1 des Ammonshorns; py: Stratum pyramidale; lm: Stratum lacunosum et moleculare; r: Stratum radiatum; Sub: Subiculum; EntCx: entorhinaler Cortex; MD: Nucl. mediodorsalis thal., LP: Nucl. lateralis post. thal., VPL: Nucl. ventralis posteriolateralis; VPM: Nucl. ventralis posteriomedialis thal., CM: Nucl. centromedianus thal.; R: Nucl. reticularis thal.; Cau: Nucl. caudatus; Put: Putamen; GP: Globus pallidus; NR: Nucl. ruber; SN: Substantia nigra; GCL: Körnerzellschicht; ML: Molekularzellschicht; DN: Nucl. dentatus; W: weiße Substanz.

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die mRNA- und Protein-Expression von GABA_B Rezeptoren in humanem Gehirngewebe auf der makroskopischen wie auch der mikroskopischen Ebene untersucht. Im Einzelnen erstreckte sich dies auf den qualitativen und semiquantitativen Nachweis von mRNA der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren und deren Splice-Varianten durch *in situ* Hybridisierung und bei ausgewählten Fragestellungen durch RT-PCR sowie dem immunhistochemischen Nachweis der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-Proteine.

Die Bildung eines funktionellen GABA_B Rezeptors setzt die Koexpression und Dimerisierung eines GABA_{B1} Rezeptors mit einem GABA_{B2} Rezeptor voraus (s. 1.3.), weshalb zur Lokalisation dieser funktionellen Rezeptor-Dimere zusätzlich ein autoradiografischer [³⁵S]GTPγS-Bindungsassay zur Anwendung kam. Mit diesem Verfahren wird nicht nur die Bindung eines GABA_B Rezeptor-Agonisten an seine Bindungsstelle, sondern auch deren Vorliegen als Gα_{i/o}-gekoppeltes GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimer nachgewiesen. Der [³⁵S]GTPγS-Bindungsassay ist in seiner autoradiografischen Form (unter den hierzu nötigen Versuchsbedingungen) bislang nur zum Nachweis von Gα_{i/o}-gekoppelten Rezeptoren einsetzbar. Da andere G-Proteine, z.B. Gα_s im Vergleich zu Gα_i- oder Gα_o- Proteinen unter den hier verwendeten Assay-Bedingungen eine wesentlich geringeren GTPase-Aktivität besitzen unterbleibt hier größtenteils eine Reaktion mit [³⁵S]GTPγS (Sim und Childers 1997).

Jenseits der hier präsentierten Daten liegt im Sinne einer die Gehirnregionen übergreifenden Übersicht nur eine Publikation zur Verteilung der GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen vor. In dieser wurde immunhistochemisch die Expression der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-Proteine untersucht (Billinton et al. 2000a). Bei dieser Untersuchung konnte GABA_{B1} Rezeptor-Immunoreaktivität nur in Neuronen des Thalamus, des Hippocampus, dem Globus pallidus und den kortikalen Laminae III und IV nachgewiesen werden, wobei in der hier vorliegenden Arbeit darüberhinaus auch die übrigen kortikalen Pyramidenzellen und die Neurone des Striatums anfärbbar waren. Noch seltener wurden bei Billinton et al. (2000a) GABA_{B2} Rezeptor-immunopositive Zellen beobachtet. Es konnte, im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen, die Expression von GABA_{B2} Rezeptor-Protein weder in den kortikalen Pyramidenzellen, noch in den Neuronen des Nucl. mediodorsalis thal. und den gesamten Basalganglien belegt werden. Das Cerebellum zeigte in der erwähnten Publikation ähnliche, aber dennoch deutlich schwächere Immunoreaktivität für beide GABA_B Rezeptoren, als dies hier beobachtet werden konnte. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dem hier durchgeführten immunhistochemischen Nachweis und den bisher publizierten Daten bestehen demnach in einer generell schwächeren oder keiner immunoreaktiven Anfärbbarkeit von Neuronen bei Billinton et al. (2000a). Diese geringere Sensitivität könnte in einer stärkeren Fixierung des Gewebes (Perfusionsfixation) bei gleichzeitiger Verwendung von niedrigen Antikörperkonzentrationen durch Billinton et al. (2000a) begründet sein.

5.1. GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen - Lokalisation, funktionelle Aspekte und pathophysiologische Bedeutung

5.1.1. Cerebraler (präfrontaler und anteriorer cingulärer) Cortex

Verteilung und funktionelle Aspekte der GABA_B Rezeptoren im cerebralen Cortex

Cortikale Afferenzen sind hauptsächlich glutamaterger Natur, während in den intracortikalen Bahnsystemen GABA der vorherrschende Botenstoff ist.

GABAerge cortikale Transmission an GABA_B Rezeptoren findet postsynaptisch durch eine Steigerung der K⁺-Leitfähigkeit statt und führt zur Bildung der langsamen postsynaptischen inhibitorischen Potentiale (IPSP_B; Übersichten in Misgeld et al. 1995; Deiß 1997). Diese postsynaptische Inhibition konnte jüngst an den Synapsen von Neurogliaformzellen (Interneuronen in der L.III) mit Dendriten von Pyramidenneuronen durch Einzellableitungen belegt werden (Tamás et al. 2003).

Aktivierung von präsynaptischen GABA_B Rezeptoren führt im Sinne einer negativen Rückkopplung zur verminderten präsynaptischen GABA-Ausschüttung; dies stellt sich elektrophysiologisch in Form der Paired-Pulse-Depression (PPD) dar (Deiß und Prince 1989; Davies und Collingridge 1993; Pitler und Alger 1994a, 1994b).

Betrachtet man die Expressionsmuster der mRNA und immunoreaktiven Proteine der GABA_B Rezeptoren im humanen präfrontalen wie auch im anterior-cingulären Cortex so fällt eine homogene Verteilung der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren in den Neuronen der einzelnen Schichten auf. Dies ist unabhängig davon ob diese Zellen eine starke GAD67-Expression aufwiesen und somit GABAerg sind, wie die verschiedenen Klassen von cortikalen Interneuronen (Korbzellen, Neurogliaformzellen, Kandellaberzellen), oder nur schwach bzw. keine GAD67 mRNA-Expression aufwiesen, wie die Pyramiden- (Lamina II, III, V), Stern- (Lamina IV) und Spindelzellen (Lamina VI). Ein quantitativer Unterschied zwischen dem neocortikalen präfrontalen und dem periarchicortikalen cingulären Cortex konnte bezüglich der mRNA-Distribution beider GABA_B Rezeptoren nicht gezeigt werden.

In der R-Baclofen-induzierten Stimulation konnte eine deutliche [³⁵S]GTPγS-Bindung in allen cortikalen Laminae gemessen werden, wodurch eine weitgehende Kollokalisierung von GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren und deren intrazelluläre Kopplung an G_{α₁₀}-Proteine anzunehmen ist.

Pathophysiologische Bedeutung der GABA_B Rezeptoren im cerebralen Cortex

Kommt es im komplexen inhibitorischen System bei der Regulation der GABA-Ausschüttung bzw. -Wiederaufnahme und bei den GABA-vermittelten Effekten an den GABA Rezeptoren zu einem Ungleichgewicht und somit zur Störung der tonischen Inhibition, so kann dies zur Bildung oder verstärkten Ausbreitung von Krampfpotentialen führen (Treiman 2001).

Während GABA_B Rezeptoren postsynaptisch inhibitorisch wirken, terminiert deren präsynaptische autorezeptive Wirkung die Ausschüttung von GABA und somit die Inhibition. Es

kann demnach bei GABA_B Rezeptor-vermittelten Mechanismen nicht generell von einer pro- oder antikonvulsiven Wirkung gesprochen werden, vielmehr ist die Rezeptorlokalisierung von entscheidender Bedeutung (Sutor und Luhmann 1998). Dies zeigte sich auch in Ratten nach Applikation von GABA_B Rezeptor-Antagonisten, wodurch Krämpfe in cortikalen und limbischen Strukturen ausgelöst, jedoch (thalamische) Absence-Anfälle unterdrückt wurden (Vergnes et al. 1997).

Durch elektrophysiologische Untersuchungen an epilepsiechirurgisch entnommenen humanen cortikalen Operationspräparaten konnte Deiß (1999) zeigen, dass im Vergleich zu Slice-Präparationen aus Rattenhirnen die meisten Neuronen einen Verlust an prä-, wie auch postsynaptischer Aktivität der GABA_B Rezeptoren aufwiesen. Demzufolge ist das epileptogene Substrat auf Seiten der Pyramidenneuronen zu vermuten, da es hier zur merklichen Verringerung des späten inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP_B) kommt, wogegen GABAerge Interneuronen durch stärkere (präsynaptische) GABA-Ausschüttung dieser Disinhibition entgegenwirken.

Weitere Evidenz für eine pathogenetische Bedeutung von GABA_B Rezeptoren in der Epileptogenese erbrachten Untersuchungen an Knockout-Mäusen, denen das *GABA_{B1} Rezeptor*-Gen fehlt (Prosser et al. 2001; Schuler et al. 2001). Diese zeigten täglich mehrmals Episoden von klonischen Krämpfen, seltener tonisch-klonische oder Absence-Anfälle.

Erst kürzlich wurde der Zusammenhang zwischen einem *GABA_{B1} Rezeptor*-Polymorphismus (G1465A auf Exon 7) mit EEG-Veränderungen bei gesunden Probanden (Winterer et al. 2003) und eine signifikante Häufung dieses *GABA_{B1} Rezeptor*-Polymorphismus in einem Kollektiv von Patienten mit Temporallappen-Epilepsie (TLE) festgestellt (Gambardella et al. 2003). Da dieser Polymorphismus zu einer abweichenden Aminosäure in der extrazellulären Domäne des GABA_{B1} Rezeptor-Proteins führt, wodurch die GABA-Bindungsstelle verändert sein könnte, erscheint eine Beteiligung dieser *GABA_{B1} Rezeptor*-Variante an der Pathogenese der TLE plausibel.

Während der anti-spastische Wirkmechanismus des GABA_B Rezeptor-Agonisten Baclofen (Ochs et al. 1989, 1999; Campbell et al. 1995; Dressnandt und Conrad 1996; Dressnandt et al. 1997; Krach 2001) im Rückenmark lokalisiert ist (Orsnes et al. 2000), trifft dies für die antinociceptive Wirkung nur zum Teil zu. Tierversuche zeigten, dass die Baclofen-induzierte Antinociception auf spinaler und supraspinaler Ebene vermittelt wird (Übersicht in Bowery et al. 2002; Balerio und Rubio 2002). Da sich Schmerzempfinden aus einer sensorischen (spinal und supraspinal) und affektiven Komponente zusammensetzt (supraspinal) stellt sich die Frage, ob GABA_B Rezeptoren auch an der supraspinalen affektiven Modulation der Analgesie mitwirken. Dies konnte jüngst bestätigt werden, indem gezeigt wurde, dass die selektive Antagonisierung von GABA_B Rezeptoren im rostralen agranulären Inselcortex über Projektionen in die Amygdala Hyperalgesie bewirkt (Jasmin et al. 2003).

Auch im GABAergen System im Gehirn von schizophrenen und bipolar-depressiven Patienten konnten Veränderungen festgestellt werden. Deutliche Verringerung der GAD67-Expression im prefrontalen Cortex zeigten sich in beiden Erkrankungen (Akbarian et al. 1995; Guidotti et al. 2000; Volk et al. 2000). Es wird angenommen, dass diese Veränderungen nicht pathogenetisch

bedeutsam für beide Erkrankungen ist (Kalkman und Loetscher 2003), jedoch scheint die niedrigere GAD67-Expression im Zusammenhang mit der psychotischen Komponente zu stehen, da sie bei manisch-depressiven, nicht jedoch bei unipolar-depressiv Erkrankten zu beobachten war (Guidotti et al. 2000). Bisher ist nur eine Studie zur GABA_B Rezeptor-Expression im Gehirn von Patienten, welche an Schizophrenie litten, publiziert worden. Hier wurde eine Abnahme der GABA_{B1} Rezeptor-Immunoreaktivität im entorhinalen Cortex und der Lamina V des temporalen Cortex beschrieben (Mizukami et al. 2002). Anzumerken ist hierbei jedoch, dass dieser Befund auch in einem generellen Zellverlust begründet sein könnte, welcher im Hippocampus von schizophrenen Patienten beobachtet wurde (Benes 1999).

5.1.2. Hippocampale Formation

Verteilung und funktionelle Aspekte der GABA_B Rezeptoren im Hippocampus

Die Mechanismen der Lern- und Gedächtnisbildung im Hippocampus beruhen in erster Linie auf glutamaterger Erregungsübertragung und Langzeitpotenzierung (Übersicht in Martin und Morris 2002). Diese findet in den Prinzipalneuronen der hippocampalen Formation (Körnerzellen des Gyrus dentatus und Pyramidenzellen des Ammonshorns) statt, die während des Lernens, nach einer initialen starken Erregung im Verlauf abnehmende Aktivität zeigen. Dies wird auf eine zunehmende Inhibition durch GABAerge Interneurone zurückgeführt, an deren Ausprägung neben den GABA_A Rezeptoren auch die GABA_B Rezeptoren maßgeblich mitwirken (Austin et al. 1989; Moser et al. 1994, 1996; Vizi und Kiss 1998).

In der hippocampalen Formation des Menschen sind GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren weitverbreitet. Die Expression von mRNA und immunoreaktivem Protein der GABA_B Rezeptoren konnte hier in nahezu allen Prinzipalneuronen des Gyrus dentatus, des Ammonshorns, des Subiculus und in zahlreichen Interneuronen belegt werden. Am deutlichsten exprimierten die Interneuronen vom horizontalen Typ im Stratum oriens der CA-Regionen und jene der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus die mRNA und die Proteine der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren.

Diese Interneurone vermitteln ihre Inhibition auf ein Prinzipalneuron, von dem sie selbst aktiviert worden sind (Rückwärtshemmung) über Synapsen im Stratum moleculare des Gyrus dentatus bzw. im Stratum moleculare et lacunosum des Ammonshorns (Baude et al. 1993; Freund und Buzsáki 1996). Andere, den Prinzipalneuronen unmittelbar benachbarte Interneurone, inhibieren jene Prinzipalneuronen bereits vor deren Erregung (Vorwärtshemmung; Halasy und Somogyi 1993; Buhl et al. 1994).

Vergleicht man die Ergebnisse der Film-Autoradiografien für den Nachweis der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-mRNA mit denen des [³⁵S]GTPγS-Assays im Gyrus dentatus und im Ammonshorn, so fällt ein „inverses“ Muster auf: Die mRNA-Expression ist in den Schichten der Prinzipalneuronen vergleichsweise höher als im Stratum moleculare bzw. Stratum moleculare et lacunosum, wohingegen sich dies für die Höhe der [³⁵S]GTPγS-Bindung nach Baclofen-Stimulation umgekehrt verhält. Der Umsatz an funktionellen (Gα_{i/o}-gekoppelten) GABA_B

Rezeptoren und ihr inhibitorischer Einfluss ist demnach an den Orten der Rückwärtsinhibition höher.

Da sich die Rückwärtsinhibition stärker auf die Langzeitpotenzierung auswirkt als die Vorwärtshemmung (Davies et al. 1991; Miles et al. 1996; Tsubokawa und Ross 1996), wird hierdurch ein Einfluss der GABA_B Rezeptoren auf dieses elektrophysiologische Korrelat von Lernen und Gedächtnisbildung unterstrichen.

Der Effekt von GABA_B Rezeptor- Stimulation auf Lernen und Gedächtnis wurde an Tiermodellen untersucht und führte zu unterschiedlichen Ergebnissen; so konnten Gedächtniseinbußen (Swartzwelder et al. 1987; Castellano et al. 1989; Castellano und McGaugh 1991; Stackman und Walsh 1994; McNamara und Skelton 1996), aber auch Steigerung der Gedächtnisleistung beobachtet werden (Georgiev et al. 1988; Saha et al. 1993). Für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten differierende Applikationsorte und Dosen verantwortlich sein.

Elektrophysiologische Messungen und verhaltenspharmakologische Beobachtungen konnten zeigen, dass die Langzeitpotenzierung im Hippocampus und die Lernleistung der Versuchstiere von einer niedrigeren bis mittleren Dosis eines GABA_B Rezeptor-Antagonisten (CGP35348) profitieren. Bei diesen Dosen werden präferenziell die postsynaptischen Rezeptoren besetzt, wobei weiterhin GABA präsynaptisch wirken kann und somit die weitere GABA-Ausschüttung limitiert. Hierdurch wird eine die Langzeitpotenzierung fördernde Hemmung der Inhibition bewirkt (Stäubli et al. 1999).

Pathophysiologische Bedeutung der GABA_B Rezeptoren im Hippocampus

Untersuchungen an *post mortem* Hirngewebe von Demenzkranken vom Alzheimer-Typ ergaben Abnahmen von GABA_B Rezeptor-Bindungsstellen, bei erhaltener Affinität der verbliebenen Rezeptoren im frontalen Cortex, Stratum moleculare des Gyrus dentatus und Stratum pyramidale und moleculare et lacunosum der CA1-Region (Chu et al. 1987a, 1987b). Diese Ergebnisse fügen sich in die oben bereits beschriebene besondere Rolle von GABA_B Rezeptoren in der Molekularzellschicht des Hippocampus bei der Gedächtnisbildung ein.

In Ergänzung zu den bereits oben dargestellten Pathomechanismen der Epilepsie sollen hierzu noch die Befunde im Hippocampus erwähnt sein. So war im Hippocampus von Patienten mit Temporallappen-Epilepsie ein Anstieg der Expression von GABA_{B1} Rezeptor mRNA und -Bindungsstellen in den CA-Regionen und im Gyrus dentatus feststellbar (Billinton et al. 2001a, 2001b; Princivale et al. 2002). Diese Befunde stellen wahrscheinlich die Reaktion auf die kontinuierliche epileptiforme Aktivität in dieser Hirnregion dar, da sich ähnliche Änderungen in Ratten nach intrahippocampaler Stimulation wie auch extracranial applizierten Elektroschocks bezüglich der mRNA-Expression und GABA_{B1} Rezeptor-Bindungsstellen einstellten (Billinton et al. 2000b; Francis et al. 2001).

5.1.3. Basalganglien

Verteilung und funktionelle Aspekte der GABA_B Rezeptoren in den Basalganglien

Glutamat ist der vorherrschende Neurotransmitter der cortico- und thalamo-striatalen Afferenzen, wohingegen GABA die intrastriatale und die striatal-efferente Neurotransmission dominiert (Parent und Hazrati 1995a, 1995b; Smith et al. 1998).

Während die Verteilung der GABA_A Rezeptor-Untereinheiten ausführlich charakterisiert ist (Waldvogel et al. 1999; Krampfl 2000; Petri et al. 2002), lag bis zu den hier durchgeführten Untersuchungen nur die bereits erwähnte immunhistochemische Studie (Billinton et al. 2000a) zur Verteilung der GABA_B Rezeptoren in den humanen Basalganglien vor.

Die deutlichsten Unterschiede zwischen der Expression von GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor mRNA in allen hier untersuchten Hirnregionen zeigten sich bei der Auswertung der Film-Autoradiografien des humanen Striatums (Nucl. caudatus und Putamen).

In dieser Region war die GABA_{B1} mRNA insgesamt in mittlerer Ausprägung nachweisbar. Zellulär stellte sich die striatale GABA_{B1} mRNA Expression in der überwiegenden neuronalen Zellpopulation dar. Morphologisch konnten die kleineren und mittelgroßen Zellen im Striatum jenseits dieser groben Klassifikation nicht weiter unterteilt werden. Jedoch war festzustellen, dass gekennzeichnet durch ihre GAD67 Expression kleine und mittelgroße Zellen in eine GABAerge, wie auch eine kleinere nicht-GABA produzierende Population unterschieden werden konnten. Eine ebensolche Aufteilung konnte bezüglich der GABA_{B1} mRNA Expression nicht beobachtet werden, woraus sich ergibt, dass die kleineren und mittleren Neurone bzw. Interneurone des Striatums GABA_{B1} Rezeptoren exprimieren, unabhängig davon ob diese selbst GABAerg sind. Im Einklang hierzu befinden sich die Ergebnisse der immunhistochemischen Versuche, welche zellulär die Proteine der GABA_{B1} Rezeptoren in beinahe allen striatalen Neuronen aufzeigen konnte. Dieser Befund einer nahezu ubiquitären GABA_{B1} Rezeptorexpression (80-90%), konnte auch im Striatum der Ratte durch immunhistochemischen Nachweis erbracht werden (Yung et al. 1999).

Gänzlich anders stellten sich die Ergebnisse zur GABA_{B2} Rezeptor mRNA Expression im humanen Striatum dar. Die gerade noch densitometrisch auf den Film-Autoradiografien über dem Hintergrundsignal erfassbare Expression im Nucleus caudatus und Putamen konnte durch die mikroskopische Auswertung auf eine relativ niedrige zelluläre Expression der GABA_{B2} Rezeptor mRNA in zudem nur sehr vereinzelt mittelgroßen Neuronen und in den sehr viel seltener vorkommenden großen cholinergen Interneuronen zurückgeführt werden. Dies unterstützten auch die immunhistochemische Untersuchung, welche zellulär die Existenz von GABA_{B2} Rezeptor-Proteinen nur in einem Bruchteil der mittelgrossen Zellpopulation belegen konnte.

Eine Koexpression von GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren ist für die Bildung eines funktionellen GABA_B Rezeptors unabdingbar. GABA_{B1} Rezeptoren allein sind nicht in der Lage, über G-Proteine eine Wirkung auf K⁺- oder Ca²⁺-Kanäle bzw. Adenylatcyclasen zu entfalten (Jones et al. 1998; Kaupmann et al. 1998a; Kuner et al. 1999; Martin et al. 1999; Filippov et al. 2000). Für die Basalganglien des Menschen ist anzunehmen, dass im Striatum eine kleinere Population von

Neuronen existieren könnte, welche neben GABA_{B1} auch GABA_{B2} Rezeptoren exprimiert und so prinzipiell in der Lage wäre, ein funktionelles GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimer an der synaptischen Membran auszubilden.

Da sich, neben den zellulären Befunden, eine deutliche immunhistochemische Reaktion für beide GABA_B Rezeptoren im Neuropil der humanen Basalganglien zeigte, wie dies auch in der Ratte der Fall ist (Benke et al. 1999; Ng et al. 2001; Kulik et al. 2002), wäre auch die Bildung von funktionellen präsynaptischen GABA_B Rezeptoren im Striatum möglich.

Die Resultate des hier durchgeführten [³⁵S]GTPγS-Assays erbrachten jedoch im Striatum des Menschen keine Hinweise auf die Existenz von funktionellen, an G_{α_{4/6}}-Protein-gekoppelte GABA_B Rezeptoren. Da im Striatum der Ratte jedoch durch elektrophysiologische Messungen der Nachweis von funktionellen präsynaptischen (Calabresi et al. 1991; Nisenbaum et al. 1993) und in zumindest einer neuronalen Subpopulation von postsynaptischen GABA_B Rezeptoren erbracht werden konnte (Seabrook et al. 1991) ist denkbar, dass anstelle von GABA_{B2} Rezeptoren im Striatum als Partner der GABA_{B1} Rezeptoren zur Formation eines funktionellen Rezeptors andere Rezeptoren (Balasubramanian et al. 2002) oder Transkriptionsfaktoren beitragen (Nehring et al. 2000; White et al. 2000; Billinton et al. 2001c). Auch wäre denkbar, dass diese Rezeptoren an andere G-Proteine gekoppelt sind oder ihre Wirkung ohne diese vermitteln (Heuss und Gerber 2000). Hierdurch lässt sich die fehlende Stimulation durch R-Baclofen in dem hier durchgeführten [³⁵S]GTPγS-Assay erklären. Für eine alternativen G-Protein-Kopplung von GABA_B Rezeptoren im Striatum der Ratte sprechen zudem Bindungsstudien (Knott et al. 1993a, 1993b) und eine elektrophysiologische Studie (Phelan 1999) welche GABA_B Rezeptoren in dieser Region als Pertussis-Toxin-insensitiv (d.h. nicht an G_{α_{4/6}}-Proteine gekoppelt) charakterisiert haben.

Die Neurone des humanen Globus pallidus zeigten im Vergleich mit dem Striatum eine gleichmäßige und niedrige mRNA- und Protein-Expression beider GABA_B Rezeptoren in den mittelgroßen Neuronen, während die Transkripte der GABA_{B1} Rezeptoren in den großen Interneuronen stärker als jene der GABA_{B2} Rezeptor mRNA exprimiert war.

Eine Untergruppe von mittelgroßen Neuronen des Globus pallidus wies neben der bei diesen Zellen üblicherweise beobachteten mäßigen GABA_{B1} Protein-Expression eine starke und punktförmig konzentrierte Immunoreaktivität für GABA_{B1} Rezeptoren am Perykaryon auf. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um massive postsynaptische Ansammlungen des GABA_{B1} Rezeptors an symmetrischen Synapsen auf proximalen Dendriten, welche von GABAergen Endigungen aus dem Striatum gebildet werden. Diese Lokalisation konnte zumindest für beide GABA_B Rezeptoren durch elektronenmikroskopische Untersuchungen im Globus pallidus des Rhesusaffen belegt werden (Charara et al. 2000). Ebenfalls im Affen zeigten sich präsynaptische GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren an asymmetrischen Synapsen der glutamatergen Endigungen aus dem Nucl. subthalamicus (Charara et al. 2000), welche einen Teil der hier aufgezeigten Immunoreaktivitäten für beide GABA_B Rezeptoren im Neuropil des humanen Globus pallidus ausmachen dürfte.

Alle in den jeweiligen Schnitten enthaltenen Projektionsneurone der Substantia nigra pars compacta und des Nucl. ruber zeigten eine Expression von mRNA und Protein beider GABA_B

Rezeptoren, wobei die Expression in den melatoninhaltigen Neuronen der Substantia nigra deutlich höher lag.

Im Globus pallidus, der Substantia nigra und dem Nucl. ruber wäre als Schlussfolgerung aus den hier vorgestellten Befunden theoretisch die Koexpression und somit die Bildung funktioneller Rezeptoren zu erwarten. Für den Globus pallidus konnte dies im Gehirn des Affen durch immunhistochemische Doppelfärbung beider GABA_B Rezeptoren belegt werden (Medd et al. 2001).

Jedoch konnte auch in diesen Regionen der Basalganglien des Menschen im [³⁵S]GTPγS-Assay unter Stimulation mit R-Baclofen kein Umsatz an Gα_{i/o}-Proteinen festgestellt werden, so dass auch hier eine andersartige G-Protein-Kopplung oder Baclofen-Insensitivität der GABA_B Rezeptoren vorliegt.

In zahlreichen Publikationen wurden Eigenschaften einer atypischer Signaltransduktion von GABA_B Rezeptoren, wie Baclofen-Insensitivität (z.B. Raiteri et al. 1992; Bonnano und Raiteri 1993a, 1993b; Lanza et al. 1993) oder eine Kopplung an G-Proteine jenseits der Klasse Gα_{i/o} (Colmers und Williams 1988; Dutar und Nicoll 1988; Phelan 1999) Subtypen von präsynaptischen GABA_B Rezeptoren zugeschrieben.

Aus den hier im Globus pallidus, in der Substantia nigra und im Nucl. ruber des Menschen vorgestellten Daten von insgesamt vergleichsweise niedriger mRNA-Expression beider GABA_B Rezeptoren, bei dennoch deutlichem Nachweis der Rezeptor-Proteine und zugleich fehlender Stimulierbarkeit dieser Rezeptoren durch R-Baclofen im [³⁵S]GTPγS-Assay und demnach atypischer Signaltransduktion ist anzunehmen, dass die GABA_B Rezeptoren in dieser Region des Gehirns weit überwiegend präsynaptisch lokalisiert sind.

Pathophysiologische Bedeutung der GABA_B Rezeptoren in den Basalganglien

Die pathophysiologische Bedeutung von Veränderungen der GABA_B Rezeptoren in den Basalganglien ist durch Untersuchungen an Tiermodellen des Morbus Parkinson und in einer humanen *post mortem* Studie erhärtet worden (deGroote et al. 1999; Calon et al. 2000, 2001, 2003; Johnston und Duty 2003).

Die Degeneration der dopaminergen nigrostriatalen Bahnen führt beim M. Parkinson, neben dem striatalen Dopaminmangel, zu Veränderungen der vernetzten GABAergen und glutamatergen Bahnen des thalamocortikalen motorischen Netzwerks der Basalganglien (Blandini et al. 2000). So führt ein Verlust an Dopamin₁ Rezeptor-Aktivierung im direkten Bahnsystem zur verminderten GABAergen Innervation der Substantia nigra pars reticularis und des Globus pallidus medialis – den efferenten Gebieten der Basalganglien. Zugleich bedingt die Verringerung der durch Dopamin₂ Rezeptoren vermittelten Aktivität im indirekten Bahnsystem eine Disinhibition GABAerger striatopallidaler Efferenzen. Hieraus entsteht eine Unteraktivität im Globus pallidus lateralis, welche wiederum über eine Enthemmung der glutamatergen Efferenzen des Nucl. subthalamicus zu einer erhöhten glutamatergen Innervation der Substantia nigra und des Globus pallidus medialis führt. Zusammengefasst bewirken diese Veränderungen im direkten und indirekten Bahnsystem eine verstärkte GABAerge Inhibition in der thalamocortikalen

Rückmeldung, welche schließlich zu Symptomen wie Tremor, Rigidität und Bewegungsverlangsamung führen (Obeso et al. 2000).

GABA_B Rezeptoren hemmen unter physiologischen Bedingungen präsynaptisch als Autorezeptor die GABA-Ausschüttung und als Heterorezeptor die Glutamat-Ausschüttung. Von Bedeutung ist daher insbesondere die Abnahme von präsynaptischer GABA_B Rezeptor-Aktivität, die zum Anstieg GABAerger wie auch glutamaterger Innervation führt, wie dies den (oben kurz erwähnten) pathophysiologischen Beobachtungen beim Untergang dopaminergener nigraler Bahnen entspricht.

In den einzelnen Kerngebieten der Basalganglien sind GABA_{B1} Rezeptor-Bindungsstellen beim Affen in mäßiger Menge vorzufinden (Ambardekar et al. 1999; Bowery et al. 1999a), was sich in Übereinstimmung mit der hier im Menschen nachgewiesenen GABA_{B1} Rezeptor mRNA und dem korrespondierenden Rezeptor-Protein befindet.

Nach experimentell-verursachtem Untergang der dopaminergen nigrostriatalen Bahnen durch MPTP steigt das Niveau der GABA_{B1} Rezeptorbindung im Globus pallidus pars externus (+29%), nicht jedoch im Pars internus, dem Striatum oder der Substantia nigra pars reticularis. Dieser Anstieg im Globus pallidus pars internus ist nicht durch Gabe von Dopamin₁ Rezeptor-Agonisten, jedoch teilweise durch Cabergolin, einem potenten Dopamin₂ Rezeptor-Agonisten, reversibel (Calon et al. 2000).

Ebenfalls in diesem Tiermodell wurde ein deutlicher Abfall von GABA_{B1} Bindungsstellen (-40%), und des mRNA-Gehalts der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren (-69% bzw. -66%) in der Substantia nigra pars compacta nach der MPTP-bedingten Schädigung der dopaminergen Neuronen beobachtet (Calon et al. 2001). Im Putamen zeigten sich hierbei keine signifikanten Änderungen an Bindungsstellen oder der mRNA-Expression der GABA_B Rezeptoren.

In der einzigen bisher durchgeführten GABA_B Rezeptor-Bindungsstudie mit *post mortem* Hirngewebe von Parkinson-Patienten wurden das Striatum und der Globus pallidus untersucht (Calon et al. 2003). Im ventralen Anteil des Globus pallidus pars externus (-13%) und im medialen Putamen (-23%) konnte eine deutliche Verringerung der Bindung eines GABA_{B1} Rezeptor-Antagonisten beobachtet werden.

Eine Verminderung von Bindungsstellen der GABA_{B1} Rezeptoren im Putamen ist bisher in keiner der Untersuchungen an Tiermodellen dopaminergere Depletion der Substantia nigra beschrieben worden (deGroot et al. 1999; Calon et al. 2000, 2001; Johnston und Duty 2003).

Im Vergleich zu den verwendeten Tiermodellen könnte dies auf eine abweichende Regulation von GABA_B Rezeptoren beim idiopathischen Parkinsonsyndrom hinweisen. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Herabregulation der GABA_{B1} Rezeptoren im Putamen von Patienten, welche an M. Parkinson litten, um einen protektiven Mechanismus, da in striatalen Zellkulturen gezeigt werden konnte, dass NMDA-induzierte Neurotoxizität durch GABA_B Rezeptor-Aktivierung deutlich verstärkt wird (Lafon-Cazal et al. 1999).

5.1.4. Thalamus

Verteilung und funktionelle Aspekte der GABA_B Rezeptoren im Thalamus

Die Synchronisierung neuronaler Erregung im cortikothalamischen System erfolgt im Thalamus durch das Zusammenspiel der GABAergen Interneuronen des Nucl. reticularis thalami mit den glutamatergen Relaisneuronen der anderen thalamischen Kerngebiete (Guillery et al. 1998).

Dies stellt sich elektroencephalografisch als oszillierende Erregungen dar. Die Frequenz dieser Oszillationen steht in direktem Zusammenhang mit dem Bewusstseinszustand. Aktivierung von GABA_B Rezeptoren verursacht durch inhibitorische Potentiale (IPSP_B) eine niederfrequente oszillierende Erregung in thalamischen Neuronen (3-4 Hz; Crunelli und Leresche 1991) und führt zur Eintrübung des Bewusstseinszustandes oder Bewusstseinsverlust (Bal et al. 1995; Ulrich und Huguenard 1996a, 1996b; Warren et al. 1997). Die physiologische Bedeutung von GABA_B Rezeptoren bei der Schlafinduktion und beim Schlafen ist nicht völlig geklärt, jedoch zeigten Studien mit GABA_B Rezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten Veränderungen während des Schlafs (Übersicht bei Gottesmann 2002).

In den thalamischen Relaisneuronen, den Interneuronen und den GABAergen Neuronen des Nucl. reticularis war ein hohes Niveau an Expression beider GABA_B Rezeptoren detektierbar. Eine neuronale Zellpopulation ohne Expression konnte nicht explizit ausgemacht werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der weitverbreiteten und stark ausgeprägten Expression von GABA_{B1} Rezeptor mRNA im Thalamus des Affen (Munoz et al. 1998).

Hinweise auf abweichende Merkmale von GABA_{B1} Rezeptoren konnten in den ventralen thalamischen Regionen der Ratte durch elektronenmikroskopische Darstellung gewonnen werden (Kulik et al. 2002). Hierbei war die überwiegende Anzahl dieser Rezeptoren extrasynaptisch lokalisiert, wodurch sie erst durch längere und intensivste GABA-Ausschüttung aus Interneuronen aktiviert werden konnten (Mody et al. 1994; Kim et al. 1997).

Auffällig waren die deutlichen Unterschiede in der [³⁵S]GTPγS-Bindung. Hier konnte durch R-Baclofen im Nucl. mediodorsalis und Nucl. lateralis post. eine robuste Stimulation nachgewiesen werden, wogegen sich in den ventralen Kernen und dem Nucl. centromedianus kein Anhalt für Gα_{v0}-gekoppelte GABA_B Rezeptoren ergab. Da sich GABA_B Rezeptoren im ventralen Thalamus zudem als sehr Baclofen-sensitiv erwiesen haben (Lee et al. 1994), ist zumindest in dieser Region von der Expression funktioneller GABA_B Rezeptor-Dimere auszugehen, wobei diese sehr wahrscheinlich die Signaltransduktion über eine Kopplung an G-Proteine jenseits der Klassen Gα_i oder Gα_o bewerkstelligen.

Diese Zweiteilung der Kerne des Thalamus, in Gα_{v0}- gekoppelte bzw. durch R-Baclofen im [³⁵S]GTPγS-Assay nicht stimulierbare GABA_B Rezeptoren, deckt sich mit anderen Beobachtungen zur Neurochemie und Neuroanatomie des Thalamus. Die Nuclei centromedialis, ventralis posteriomedialis et ventralis posteriolateralis weisen unter den thalamischen Kernen ausschließlich hohe Parvalbumin-Immunreaktivität auf. Diese parvalbuminhaltigen Neurone projizieren in die Schichten III und IV des Cortex in einer sehr geordneten Weise und sind klar den jeweiligen rezeptiven Feldern zuzuordnen. Demgegenüber enden die calbindinhaltigen

Terminalen, welche weitgehend aus dem restlichen Thalamus stammen, in den beiden obersten cortikalen Laminae, ohne hier genau abgrenzbare Felder zu markieren (Übersicht in Jones 1998).

Pathophysiologische Bedeutung der GABA_B Rezeptoren im Thalamus

Es existieren einige Hinweise auf die Beteiligung von GABA_B Rezeptoren am Pathomechanismus der Absence-Epilepsie (Snead 1995; Bowery et al. 1999b; Crunelli und Leresche 2002). So exazerbieren Absence-Anfälle bei Gabe von GABA_B Rezeptor-Agonisten in einigen Tiermodellen dieser Erkrankung, wogegen GABA_B Rezeptor-Agonisten die Anfälle coupieren (Snead et al. 1999). Zudem gelang es zu zeigen, dass in Maus-Mutanten (lethargic; lh/lh), welche gehäuft Absence-Anfälle aufweisen, GABA_B Rezeptor-Bindungsstellen vermehrt exprimiert wurden und dieser Anstieg mit der Anfallshäufigkeit korrelierte (Lin et al. 1993). In einem anderen Tiermodell, den sogenannten GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg), konnte im Vergleich zu nicht-epileptischen Kontrolltieren jedoch keine vermehrten Bindungsstellen nachgewiesen werden, obwohl immunhistochemisch ein höherer Gehalt an GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren im Thalamus und somatosensorischen Cortex zu beobachten war (Princivalle et al. 2003). Derartige Widersprüchlichkeiten sowie elektrophysiologische Untersuchungen, welche die pathophysiologische Beteiligung von GABA_A Rezeptoren favorisieren (Charpier et al. 1999; Staak und Pape 2001), lassen bislang keine eindeutige Beurteilung der pathogenetische Rolle von GABA_B Rezeptoren bei der Absence-Epilepsie zu.

5.1.5. Cerebellum

Verteilung und funktionelle Aspekte der GABA_B Rezeptoren im Cerebellum

Die GABAergen Purkinjezellen bilden die Efferenzen der Kleinhirnrinde. An ihren Dendriten wiederum laufen die Afferenzen des Cerebellums zusammen. Dies geschieht direkt durch exzitatorische Kletterfasern aus dem inneren Olivenkern und modulierende serotoninerge bzw. noradrenerge Fasern aus dem Nucl. raphe und dem Locus coeruleus oder indirekt durch exzitatorische Moosfasern (aus der Pons, dem Tectum, der Formatio reticularis, den Nuclei vestibularis und dem Rückenmark), welche zunächst an den Körnerzellen enden. Von dort wird die Erregung dann über Parallelfasern auf die Purkinjezellendriten übertragen.

Die Interneurone des cerebellären Cortex sind überwiegend den Golgi-, Korb- und Sternzellen zuzuordnen (auf Lugarozellen und die unipolaren Büschelzellen soll hier nicht weiter eingegangen werden). Sie sind GABAerg und werden im Sinne einer Vorwärtshemmung wie die Purkinjeurone von glutamatergen Parallelfasern erregt. Die Sternzellen bilden an den Dendriten und die Korbzellen am Soma und Axon der Purkinjezellen Synapsen aus, wohingegen Golgizellen exklusiv die Körnerzellen inhibieren.

Exzitatorische Kleinhirnafferenzen und inhibitorische Purkinjezellaxone projizieren in die jeweiligen Nuclei cerebellares; für das hier untersuchte Neocerebellum ist dies der Nucl. dentatus (Voogd et al. 1990).

Alle hier beschriebenen Neurone und Interneurone des Kleinhirns wiesen unabhängig davon, ob GABA- oder glutamaterg, mäßige bis sehr starke Expression der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren auf. Diese war von stärkster Ausprägung in den Purkinjezellen und konnte hier immunhistochemisch bis weit in die dendritischen Ausläufer verfolgt werden. Die Molekularzellschicht zeigte im [³⁵S]GTPγS-Assay stärkste Stimulation, wodurch hier eine hohe Dichte an Gα_{i/o}-gekoppelten GABA_B Rezeptoren nachgewiesen wurde. Weitaus geringer fiel dieser Nachweis in der Körnerzellschicht aus und konnte für den Nucleus dentatus nicht erbracht werden.

Überraschenderweise konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Parallelfasern im Kleinhirn der Ratte die überwiegende Anzahl an GABA_B Rezeptoren perisynaptisch an den glutamatergen Synapsen mit distalen Purkinjezeldendriten beobachtet werden, wogegen dies an GAD-immunoreaktiven, d.h. GABAergen synaptischen Membranen, welche von den Interneuronen gebildet werden, nur sehr selten der Fall war (Fritschy et al. 1999; Kulik et al. 2002). Obgleich eine interneuronale GABA_B Rezeptor-Expression demnach deutlich seltener beobachtet wurde, ist deren funktionelle Relevanz bei der Inhibition der Purkinjezellen elektrophysiologisch bewiesen worden (Than und Szabo 2002).

Die physiologische Bedeutung einer präsynaptischen Expression von GABA_B Rezeptoren an glutamatergen Terminalen ist noch unklar, möglicherweise werden diese durch extrasynaptisch freigesetztes GABA aktiviert und hemmen hierdurch die Glutamat-Ausschüttung (Kulik et al. 2002).

Pathophysiologische Bedeutung der GABA_B Rezeptoren im Cerebellum

Primär konnten an GABA_{B1} Rezeptor-defizienten Mäusen keine ataktischen Störungen beobachtet werden (Prosser et al. 2001; Schuler et al. 2001).

Das GABAerge System und somit GABA_A und GABA_B Rezeptoren sind jedoch mittelbar an der Pathogenese einer progressiven cerebellären Ataxie beteiligt, bei der sich GAD-Antikörper im Liquor nachweisen lassen. Hierbei stellen die GAD-Antikörper nicht nur ein Epiphänomen dar, sondern wirken als pathogenes Agens. So konnte elektrophysiologisch an Slice-Präparaten von Rattenkleinhirnen nach Applikation von GAD-Antikörper-haltigem Liquor (welcher von Patienten mit cerebellärer Ataxie stammte) oder aufgereinigten GAD-Antikörpern deutlich veränderte Potentiale an Purkinjezellen abgeleitet werden (Takenoshita et al. 2001; Mitoma et al. 2003).

Bedingt durch die verringerte GABA-Synthese und -Ausschüttung kam es zur Reduktion der interneuronalen Inhibition an den GABA_A Rezeptoren der Purkinjezellen (IPSP_A-Reduktion) sowie einer verstärkten Glutamat-Ausschüttung an den Synapsen der Parallelfasern mit Purkinjezeldendriten (EPSP-Anstieg). Letztgenannter Effekt wird durch eine verminderte Aktivität an GABA_B Rezeptoren ausgelöst, welche unter physiologischen Bedingungen an den Parallelfasern der Körnerzellen die Glutamat-Ausschüttung verringert (Mitoma et al. 2003).

Die Erregbarkeit der Purkinjezellen ist für eine derartige Reduktion der GABAergen Inhibition im Vergleich zu kortikalen Pyramidenzellen sehr vulnerabel. Dies liegt vor allem an deren interneuronaler Verschaltung, welche nur eine Vorwärts- nicht aber eine Rückwärtsinhibition

ermöglicht, d.h. Purkinjezellen selbst erregen keine cerebellären Interneurone, wie dies bei Pyramidenneuronen des Cortex oder Hippocampus der Fall ist (De Schutter 1995). Dies mag auch der Grund dafür sein, weshalb sich eine globale Reduktion des GABAergen Tonus (hier bedingt durch GAD-Antikörper) vor allem und zuerst in einer cerebellären Dysfunktion ausdrückt.

5.1.6. Gliale Expression

In den vorliegenden Publikationen zur zellulären GABA_B Rezeptor-Expression im ZNS der Ratte ist bisher wenig über Gliazellen berichtet worden: Clark et al. (2000) beschrieben die Expression von vereinzelt GABA_{B1} Rezeptor-immunoreaktiven Gliazellen im Gehirn und Rückenmark der Ratte, ohne jedoch GABA_{B2} Rezeptoren nachweisen zu können. In einer Studie konnten in Astrocyten des Hippocampus der Ratte durch immunhistochemische Färbungen GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-Protein-Expression belegt werden (Charles et al. 2001).

Andere Autoren untersuchten ebenfalls Rattengehirne ausführlich bezüglich der Expression von GABA_B Rezeptoren, ohne dabei gliales Vorkommen zu beschreiben (z.B. Kaupmann et al. 1997; Margeta-Mitrovic et al. 1999; Bischoff et al. 1999; Liang et al. 2000). Explizit bezweifelt wurde die Existenz von GABA_B Rezeptoren in der Glia des menschlichen Gehirns (Billinton et al. 2001a, 2001b).

Im Gehirn des Menschen gelang hier nun durch Messungen auf den Film-Autoradiografien von weißer Substanz des cerebralen Cortex und des Cerebellums der Nachweis einer niedrigen Expression für GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptor-mRNA. Dies bestätigte sich bei der zellulären Auswertung, da auch hier die Transkripte beider GABA_B Rezeptoren in der weißen Substanz des Cerebellums und der mRNA von GABA_{B1} Rezeptoren im cortikalen Mark messbar waren. Hierbei konnte dieses Signal jedoch nicht auf Expression in thioningefärbten Gliazellen (Oligodendrocyten) zurückgeführt werden. Immunhistochemisch zeigte sich dann, dass diese Expressionsmuster astrocytären Ursprungs sind. Beide GABA_B Rezeptor-Proteine traten vereinzelt in Astroglia des Cortex und gehäuft in der des Hippocampus und des Cerebellums auf. In letzterem fand sich auch mRNA und Immunoreaktivität für GABA_{B1} Rezeptoren in einer cerebellären Sonderform von Astrocyten, der Bergmann-Glia. Gerade noch nachweisbar war schließlich eine Stimulation mit R-Baclofen im [³⁵S]GTP_γS-Assay über Faserzügen der weißen Substanz, wodurch eine G_{α_{i/o}}-Protein-Kopplung der astrocytären GABA_B Rezeptoren vermutet werden darf.

5.2. Diversität der GABA_B Rezeptoren

Prinzipiell kann die Ausprägung von Rezeptor-Diversität durch zahlreiche Faktoren bestimmt sein:

Pharmakogenomische Diversität: im Rezeptor-Gen interindividuell abweichende DNA-Sequenzen (Polymorphismen) können voneinander verschiedene Rezeptor-Proteine determinieren, welche sich dann in ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden (Johnson und Lima 2003).

Molekularbiologische Diversität: die RNA-Transkription erfolgt gewebspezifisch und kann während der Transkription durch sogenanntes Splicing oder posttranskriptional durch RNA-Editing bei der Transkription desselben Gens zur Ausprägung von unterschiedlichen mRNA-Varianten und schließlich verschiedenen Rezeptor-Proteinen führen (Tamura et al. 1996).

Pharmakologische Diversität: posttranslationale Prozesse, wie der Transport der Rezeptor-Proteine zur Zellmembran und die dortige Ausbildung von Rezeptor-Dimeren bzw. -polymeren tragen maßgeblich zur Bereitstellung von Rezeptoren bei. Diese können nun mit unterschiedliche intrazelluläre Effektoren (bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren z.B. verschiedene G-Proteine, Phosphokinasen oder Adenylatcyclasen) interagieren. Auch können Modifikationen wie die Phosphorylierung eine Desensitivierung und Internalisierung von Rezeptoren verursachen. Diese Mechanismen prägen insgesamt die Quantität und Qualität der Signaltransduktion an einem Rezeptor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Diversität der GABA_B Rezeptoren auf der molekularbiologischen Ebene (Splice-Varianten der mRNA der GABA_{B1} bzw. GABA_{B2} Rezeptoren) und in pharmakologisch-neurochemischer Hinsicht (G-Protein-Kopplung der GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimere) untersucht.

5.2.1. Splice-Varianten der GABA_{B1} Rezeptor mRNA

Der direkte Vergleich der autoradiografisch bestimmten Expressionsmengen der vier GABA_{B1} Rezeptor Splice-Varianten (GABA_{B1A,1B,1C,1E}) ist methodisch bedingt nur unter Vorbehalt möglich, da die jeweilige Hybridisierungskinetik der verwendeten Oligonukleotide unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht bekannt ist. In den hier durchgeführten *in situ* Hybridisierungsstudien wurden bei der Auswahl der Oligonukleotide beachtet, dass Parameter, welche die Kinetik der Nachweisreaktion beeinflussen können möglichst konstant eingehalten wurden (s. 3.4.).

Um sicher zu stellen, dass diese Einflussfaktoren die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen nicht maßgeblich verändern, wurden die gemessenen Expressionsmengen der GABA_{B1} Rezeptor Splice-Varianten auf die Werte der Region der größten Expression (Körnerzellschicht des Kleinhirns) normalisiert.

Bei Betrachtung dieser normalisierten Expressionswerte fiel auf, dass im Vergleich zur GABA_{B1B} Rezeptor Splice-Variante eine geringere Expression von GABA_{B1A} Rezeptoren in allen untersuchten Gehirnregionen beobachtet werden konnte, was wiederum auch die Verhältnisse der nicht-normalisierten Werte widerspiegelt. Die Differenz der relativen Expression dieser beiden Rezeptor-Varianten war am größten im Thalamus ausgeprägt und lag noch deutlich über der in Cortex, Ammonshorn und Striatum, wohingegen im Gyrus dentatus des Hippocampus (Pyramidalzellschicht) die mRNA der GABA_{B1A} und der GABA_{B1B} Rezeptoren relativ betrachtet zu etwa gleichen Teilen vorlag.

In der cerebellären Molekularzellschicht und im Gyrus dentatus des Hippocampus konnte auch die Variante GABA_{B1C-hum} in mäßiger Ausprägung auf den Film-Autoradiografien detektiert werden, wobei zellulär diese Variante auch in einzelnen Zellen des Cortex, des Striatums und des Thalamus zu beobachten war. Auch nach der Normalisierung zeigte sich, dass die mRNA-Expression von GABA_{B1C-hum} Rezeptoren im Vergleich zu den GABA_{B1A} Rezeptoren in allen Regionen geringer war.

Durch die relativen Betrachtung der normalisierten Werte lässt sich schließen, dass in fast allen untersuchten Gehirnregionen der GABA_{B1B} Rezeptor die dominierende Splice-Variante darstellt, lediglich im hippocampalen Gyrus dentatus sind GABA_{B1A} und GABA_{B1B} Rezeptoren annähernd gleich stark exprimiert.

Geradezu rudimentär nahm sich die Expression der GABA_{B1E} Rezeptor Splice-Variante aus. Sie war nur in einzelnen Zellen des Gyrus dentatus und in den Korbzellen des Cerebellums vertreten. Zur Absicherung dieses Befundes der *in situ* Hybridisierung wurde eine RT-PCR durchgeführt, welche die Existenz dieses GABA_{B1} Rezeptor-Typs im Hippocampus und Kleinhirn ebenfalls bestätigte.

Bereits in der Erstbeschreibung der Sequenzen des GABA_{B1} Rezeptors wurden die Splice-Varianten GABA_{B1A} und GABA_{B1B} beschrieben und pharmakologisch charakterisiert (Kaupmann et al. 1997). Es konnte kein nennenswerter Affinitätsunterschied zwischen den Varianten GABA_{B1A} und GABA_{B1B} festgestellt werden, wobei es sich jedoch um Untersuchungen an nicht-funktionellen Rezeptor-Monomeren handelte, da die zur Bildung von funktionellen GABA_B Rezeptor-Dimeren benötigten GABA_{B2} Rezeptoren noch nicht entdeckt waren (Couve et al. 1998; Kaupmann et al. 1998a; Margeta-Mitrovic et al. 2000; Calver et al. 2001; Pagano et al. 2001).

Nachdem auch die rekombinante Expression von funktionellen GABA_B Rezeptor-Dimeren möglich war, zeigten funktionelle Assays und Bindungsstudien mit hochaffinen GABA_B Rezeptor-Liganden ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen GABA_{B1A}/GABA_{B2} und GABA_{B1B}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimeren (Bräuner-Osborne und Krogsgaard-Larsen 1999; Green et al. 2000).

Von Ng et al. (2001) wurde eine Bindung des Wirkstoffs Gabapentin an rekombinante GABA_{B1A}/GABA_{B2}, nicht aber an GABA_{B1B}/GABA_{B2} oder GABA_{B1C-Ratte}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimere beschrieben. Dies überrascht umso mehr, da die Wirkweise von Gabapentin bisher auf seine Bindung an $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten des L-Typ Kalziumkanals zurückgeführt wird (Gee et al. 1996; Brown und Gee 1998; Marais et al. 2001). Obwohl Untersuchungen hierzu von derselben Arbeitsgruppe auch an nativen GABA_B Rezeptoren in einer Präparation des Hippocampus der

Ratte durchgeführt wurden und zu ähnlichen Ergebnissen kam (Bertrand et al. 2001), ist dieses Bindungsverhalten von Gabapentin an GABA_{B1A}/GABA_{B2} Rezeptoren durch mehrere nachfolgende *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen (Lanneau et al. 2001; Patel et al. 2001; Jensen et al. 2002) und eigene Beobachtungen zur (nicht nachweisbaren) Stimulation durch Gabapentin in der [³⁵S]GTPγS-Autoradiografie im Gehirn der Ratte (Platzer et al. 2002) in Frage gestellt worden und gilt als umstritten (Bowery et al. 2002).

Jenseits möglicher pharmakologischer Unterschiede zwischen GABA_{B1A} und GABA_{B1B} Rezeptoren wurde bereits kurz nach deren Sequenzaufklärung für die GABA_{B1A} Rezeptoren eine ausschließlich präsynaptische bzw. für die GABA_{B1B} Rezeptoren postsynaptische Verteilung diskutiert (Kaupmann et al. 1998b). Diese Hypothese wurden durch Untersuchungen am Cerebellum gewonnen und konnte durch einige Studien für weitere Regionen des ZNS der Ratte bestätigt werden (Billinton et al. 1999; Bischoff et al. 1999; Fritschy et al. 1999), wohingegen andere publizierte Daten auf eine überwiegend postsynaptische GABA_{B1A} Rezeptor- bzw. präsynaptische GABA_{B1B} Rezeptor-Lokalisation hinwiesen (Benke et al. 1999; Poorkhalkali et al. 2000).

Die hier vorgestellten mRNA-Expressionsmuster der bisher bekannten vier GABA_{B1} Rezeptor Splice-Varianten im humanen Gehirn erlauben keine direkten Aussagen über eine prä- oder postsynaptische Lokalisation. Folgt man jedoch der Argumentation für die vorherrschende Präsenz von präsynaptischen GABA_{B1A} und postsynaptischen GABA_{B1B} Rezeptoren in der bereits erwähnten *in situ* Hybridisierungsstudie von Bischoff et al. (1999) am Beispiel des Kleinhirns der Ratte, welche auf einer weit überwiegenden Expression von GABA_{B1B} Rezeptoren in den Purkinjezellen und dessen fehlender Expression in den Interneuronen der Molekularzellschicht gründet, so konnten diese Schlussfolgerungen für das menschliche Kleinhirn nicht nachvollzogen werden, da hier GABA_{B1A} wie auch GABA_{B1B} Rezeptor mRNA in beiden Zellarten sicher nachgewiesen wurden. Vielmehr ist durch das Fehlen von funktionellen GABA_B Rezeptoren im Nucl. dentatus, dem alleinigen Projektionsgebiet der Purkinjezellen, anzunehmen, dass im humanen Kleinhirn beide GABA_B Rezeptor Subtypen auf den Purkinjezeldendriten präsynaptisch exprimiert werden. Dies konnte inzwischen immunhistochemisch auch im Cerebellum der Ratte unter Verwendung von subtypenspezifischen Antisera bestätigt werden (Charles et al. 2001).

Zu den im menschlichen Gehirn sehr umschrieben exprimierten GABA_{B1C-hum} und GABA_{B1E} Rezeptoren liegen im Gegensatz zu den beiden anderen Splice-Varianten der GABA_{B1} Rezeptoren nur sehr begrenzt publizierte Daten vor.

Die GABA_{B1C-hum} Rezeptoren sind bisher nicht pharmakologisch untersucht worden; aus einer semiquantitativen RT-PCR Untersuchung ist aber bekannt, dass diese Variante im humanen fetalen Gehirn stark exprimiert ist. Im Vergleich hierzu geringer nahm sich das Expressionsniveau im Striatum, dem frontalen Cortex, Hippocampus und Cerebellum des erwachsenen Menschen aus (Calver et al. 2000). Dies ist annähernd vergleichbar mit dem hier beschriebenen makroskopischen und mikroskopischen Expressionsmuster der GABA_{B1C-hum} Rezeptoren.

Auch die GABA_{B1E} Rezeptoren sind im fetalen Gehirn stärker als im adulten exprimiert. Dieser Rezeptor kommt jedoch auch im Rückenmark und in Organen des Gastrointestinaltrakts, der Niere, dem Hoden, der Plazenta und der Skelettmuskulatur des erwachsenen Menschen vor. Von der GABA_{B1E} Rezeptor Variante ist bekannt, dass sie keinen funktionellen GABA_B Rezeptor bildet, obgleich sie mit GABA_{B2} Rezeptoren dimerisieren kann. Durch diese Dimerisierung ist der GABA_{B1E} Rezeptor in der Lage, bestehende funktionelle GABA_{B1A}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimere zu zerstören und hierdurch die Bereitstellung von funktionellen GABA_B Rezeptoren zu verringern (Schwarz et al. 2000). Dies ermöglicht an den Orten der GABA_{B1E} Rezeptor Expression, dem Gyrus dentatus des Hippocampus und den Korbzellen des Kleinhirns, eine Herabregulation von funktionellen GABA_B Rezeptoren. In den Körnerzellen des Gyrus dentatus würde dies, bedingt durch die postsynaptische Lokalisation, eine Abschwächung der Inhibition bewirken, wogegen an den Korbzellen des Kleinhirns die Verminderung von präsynaptischen Autorezeptoren zur verstärkten Inhibition der Purkinjezellen führen würde.

5.2.2. Splice-Varianten der GABA_{B2} Rezeptor mRNA

Basierend auf der Sequenz des humanen GABA_{B2} Rezeptors (White et al. 1998; Kuner et al. 1999; Martin et al. 1999; Ng et al. 1999a) wurden drei Splice-Varianten beschrieben (Clark et al. 2000). Dies erschien in Hinblick auf die Entstehung von pharmakologischen Subtypen ebenso interessant wie die Splice-Varianten des GABA_{B1} Rezeptors, da der GABA_{B2} Rezeptor erst die Bildung von funktionellen GABA_B Rezeptor-Dimeren ermöglicht und zudem das G-Protein bindet, über welches der Rezeptor seinen Effekt intrazellulär vermittelt.

Zum Nachweis der GABA_{B2} Rezeptor Splice-Varianten wurden hier Untersuchungen mittels RT-PCR durchgeführt. Die cDNA hierfür stammte aus Isolaten von Cortex, Hippocampus, Basalganglien, Thalamus und Kleinhirn.

Ein erstes Primerpaar sollte entsprechend den jeweiligen Sequenzen zwei unterschiedlich lange PCR-Produkte für die GABA_{B2A} (552bp) und die GABA_{B2B} Splice-Variante (474bp) erbringen. Tatsächlich konnte nur eine etwa 550bp lange Bande im Gel beobachtet werden, was gegen die Expression von GABA_{B2B} mRNA sprach.

Das zweite Primerpaar war zum Nachweis von GABA_{B2C} Rezeptor mRNA bestimmt. Bei dieser RT-PCR konnte eine starke Bande von ca. 710bp Länge erzielt werden, welche nicht vereinbar ist mit der errechneten Länge (632bp) eines für GABA_{B2C} Rezeptor mRNA spezifischen Amplifikats (vgl. hierzu Abb. 3.4.) Nimmt man nun die Existenz von nur einer Form von GABA_{B2} Rezeptor mRNA auf der Basis der ursprünglich beschriebenen Sequenz an, so ergibt sich für das 1. Primerpaar eine zu erwartende Bande von 552bp und für das 2. Primerpaar eine von 713bp Länge. Da sich dies im Einklang mit den beobachteten Bandenlängen befand, konnte durch diese Experimente nur die Expression der ursprünglich beschriebenen GABA_{B2} Rezeptor mRNA (Kuner et al. 1999; Martin et al. 1999; Ng et al. 1999a), nicht jedoch der drei beschriebenen GABA_{B2} Rezeptor mRNA Splice-Varianten (Clark et al. 2000) im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit der Arbeit von Martin et al. (2001), welche zeigen konnte, dass das humane *GABA_{B2} Rezeptor*-Gen im fraglichen Abschnitt keine Donor- oder Akzeptor-Sequenzen für ein eventuelles Splicing aufweist.

Auf weiterführende *in situ* Hybridisierungsstudien zur Lokalisation der (nicht existenten) *GABA_{B2} Rezeptor* Subtypen mRNA wurde deshalb verzichtet.

5.2.3. Hinweise auf alternative G-Protein Kopplung von *GABA_B* Rezeptoren in bestimmten Hirnregionen

Der Nachweis von $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten *GABA_B* Rezeptoren und somit von funktionellen *GABA_{B1}/GABA_{B2}* Rezeptor-Dimeren gelang in der Mehrzahl der untersuchten Regionen des menschlichen Gehirns durch die Stimulierbarkeit mit R-Baclofen im [³⁵S]GTP γ S-Assay. Auch in diesen Regionen ist eine unbestimmte Menge von nicht an $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren nicht auszuschließen, da diese durch Signal von stimulierbaren *GABA_B* Rezeptoren überdeckt sein könnte.

Keine nennenswerte Stimulation konnte in den Basalganglien, dem Nucl. centromedianus und den ventralen Thalamuskernen sowie dem Nucl. dentatus des Kleinhirns festgestellt werden. In diesen Regionen konnten, mit Ausnahme des Striatums, nennenswerte Mengen von *GABA_{B1}* und *GABA_{B2}* Rezeptor-Expression in sehr vielen Neuronen beobachtet werden, wobei das Expressionsmuster deren Koexpression nahelegt. Derartige Kolokalisation konnten durch immunhistochemische Doppelfärbungen in einzelnen Regionen des Gehirns der Ratte oder des Affen zum Teil erhärtet werden (s. im Einzelnen 5.1.).

Aber auch Rezeptorbindungsstudien weisen indirekt auf eine derartige Kolokalisation und somit die Expression funktioneller *GABA_B* Rezeptoren hin. Der Nachweis von *GABA_B* Rezeptor-Bindungsstellen mit hoher Affinität und in nennenswerter Menge ist nur möglich, wenn *GABA_{B1}* Rezeptoren, auf denen sich die Bindungsstelle befindet, zur Zellmembran transportiert und dort verankert worden sind. Dieser Vorgang setzt *in vivo* eine Kolokalisation und Dimerisierung von *GABA_{B1}* mit *GABA_{B2}* Rezeptoren voraus (Couve et al. 1998; Kaupmann et al. 1998a; White et al. 1998).

Vergleicht man die in klassischen Liganden-Bindungsexperimenten erzielten publizierten Werte zur Anzahl der *GABA_{B1}* Rezeptor-Bindungsstellen und deren Affinität im Gehirn des Rhesusaffen, so zeigen Regionen wie die cerebelläre Molekularzellschicht und der Nucl. mediodorsalis thal. eine hohe Dichte an Bindungsstellen mit starker Affinität (Ambardekar et al. 1999; Bowery et al. 1999a). Auch in dem hier beim Menschen durchgeführten [³⁵S]GTP γ S-Assay konnten *GABA_B* Rezeptoren in diesen Arealen durch R-Baclofen merklich stimuliert werden.

Beim Affen sind die ventralen Thalamuskern und der Nucl. centromedianus bezüglich ihres Besatzes an Bindungsstellen und Bindungsaffinitäten mit dem Nucl. mediodorsalis durchaus vergleichbar (Ambardekar et al. 1999; Bowery et al. 1999a). Obwohl anzunehmen ist, dass diese Bindungsverhältnisse auch auf den humanen Thalamus übertragbar sind, waren in dem hier mit humanem Gehirngewebe durchgeführten [³⁵S]GTP γ S-Assay die *GABA_B* Rezeptoren des ventralen Thalamus und des Nucl. centromedianus nicht stimulierbar.

Demnach und aus den vorgelegten Daten zur Expression der GABA_B Rezeptoren, kann der Schluss gezogen werden, dass im ventralen und centromedianen Thalamus zwar GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimere vorliegen, aber deren Kopplung an G-Proteine jenseits des G α_1 - oder G α_o -Typs angenommen werden muss.

5.3. Bestehen Spezies-Differenzen in der Expression von GABA_B Rezeptoren?

Die bisher umfangreichsten Untersuchungen zur Expression der GABA_B Rezeptoren im ZNS eines Säugetiers wurden an Ratten durchgeführt, weshalb die hier vorgestellten Daten zur Expression der GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen mit publizierten Ergebnissen aus Untersuchungen an Ratten verglichen werden.

Trotz der Vielzahl an Publikationen zur Expression der GABA_B Rezeptoren im Gehirn der Ratte liegen nur einige wenige Studien vor, welche weite Teile des Gehirns im Überblick beschreiben. Es ist beim Vergleichen mit den hier im Gehirn des Menschen erhobenen Daten zudem unerlässlich, nur Studien heranzuziehen, welche insgesamt die hier untersuchten Regionen ebenfalls zum Gegenstand hatten, da bereits zwischen den einzelnen Arbeiten zur Expression in der Ratte zahlreiche Widersprüchlichkeiten zu Tage traten. Dies trifft vor allem für immunhistochemische Untersuchungen zu, bei denen abweichende Ergebnisse durch zahlreiche methodische Faktoren, wie unterschiedliche Fixation des Gewebes, andere Antikörper und differierende Konzentrationen und Inkubationszeiten bedingt sein können. Auch kamen Arbeiten, welche sich methodisch deutlich unterscheiden, für einen Vergleich nicht in Frage, wie dies z.B. für die *in situ* Hybridisierung mit nicht-radioaktiv-markierten Proben zutrifft (Liang et al. 2000). Zum Vergleich herangezogen wurden schließlich je eine Studie für den immunhistochemischen Nachweis der GABA_{B1} (Margeta-Mitrovic et al. 1999) und GABA_{B2} Rezeptor-Proteine (Charles et al. 2001) sowie *in situ* Hybridisierungsstudien zur GABA_{B1} Rezeptor mRNA Expression, einschließlich der Splice-Varianten GABA_{B1A} und GABA_{B1B} (Bischoff et al. 1999), und zur Detektion der GABA_{B2} Rezeptor mRNA (Durkin et al. 1999; Clark et al. 2000).

Vergleicht man die GABA_{B1} Rezeptor mRNA Expression auf zellulärer Ebene im Gehirn der Ratte (Bischoff et al. 1999) mit der im Gehirn des Menschen, so deckt sich diese weitestgehend im cerebellären Cortex. Normalisiert man nun, ausgehend von dieser Übereinstimmung die Expressionswerte der untersuchten Zellen auf die Werte der Purkinjezellen so zeigte sich, dass im humanen Thalamus die Expression von GABA_{B1} Rezeptor mRNA bereits merklich schwächer und in allen weiteren untersuchten Regionen des humanen Nervensystems um ein vielfaches niedriger ausfällt als dies in der Ratte der Fall ist.

Auch hinsichtlich des Verhältnisses der Splice-Varianten des GABA_{B1A} und GABA_{B1B} Rezeptors zueinander unterscheidet sich die Expression im Menschen von der in der Ratte. Dominiert beim Menschen die Expression der GABA_{B1B} Rezeptor mRNA in allen Gehirnregionen, so ist bei der

Ratte dieses Transkript im Cortex und Hippocampus in ähnlicher Menge wie die GABA_{B1A} Rezeptor Variante vertreten. Die relative Expression dieser beiden Splice-Varianten ist im Thalamus des Menschen und der Ratte (bei hier höheren absoluten Werten) ähnlich, verhält sich jedoch in den Basalganglien und Teilen des Cerebellums grundsätzlich unterschiedlich. War im Kleinhirn beim Vergleich von Untersuchungen mit Sonden, welche die Gesamtheit der mRNA aller GABA_{B1} Rezeptoren nachwies, kein Unterschied aufgefallen, so überwog die Expression der GABA_{B1A} Rezeptor mRNA in der Körner- und Molekularzellschicht der Ratte bei weitem die der GABA_{B1B} Rezeptor mRNA, was im deutlichen Kontrast zur etwa gleichhohen Expression beim Menschen steht.

Generell war festzustellen, dass mRNA der GABA_{B1A} Rezeptor Variante im Gehirn der Ratte im Vergleich zum Menschen einen höheren Anteil an den GABA_{B1} Rezeptoren insgesamt ausmachte.

Dieser phylogenetische Unterschied ist auch deswegen bemerkenswert, da beim Menschen während der fetalen Gehirnentwicklung eine höhere Expression von GABA_{B1A} Rezeptoren im Vergleich zum adulten Gehirn nachgewiesen werden konnte (Calver et al. 2000). Von der Tendenz her betrachtet spiegelt die ontogenetische Entwicklung der GABA_{B1A} Rezeptor mRNA Expression demnach den phylogenetische Expressionsunterschied wieder.

Auch der Vergleich des relativen Expressionsniveaus der GABA_{B2} Rezeptor mRNA im menschlichen Gehirn mit Veröffentlichungen im ZNS der Ratte (Durkin et al. 1999; Clark et al. 2000) zeigte ausgehend von einer ähnlich starken Expression im Cerebellum ebenso vergleichbar hohe Expressionswerte im Thalamus und einer gemeinsamen sehr niedrigen Ausprägung von GABA_{B2} Rezeptor mRNA Expression im Striatum und Globus pallidus beider Spezies. Unterschiedlich war hingegen die Expression im Cortex und Hippocampus, welche beim Menschen ein niedrigeres Niveau aufwies.

Die Immunoreaktivität für GABA_{B1} Rezeptor Protein fiel im Gehirn der Ratte in der CA2- und CA3-Region des Ammonshorns, im Nucl. caudatus, im Putamen und im Globus pallidus deutlich niedriger aus (Margeta-Mitrovic et al. 1999), als dies im menschlichen Gehirn beobachtet werden konnte. Die quantitativen Unterschiede im Kleinhirn bezüglich der GABA_{B1} Rezeptor-Immunoreaktivität beruhen auf einem im Cerebellum der Ratte beobachteten sektoral-differenzierten Muster (Margeta-Mitrovic et al. 1999; Fritschy et al. 1999). Das humane Cerebellum weist eine derartige Aufteilung nicht auf und exprimiert in den untersuchten cerebellär-hemishäralen Querschnitten dieses Rezeptor-Protein in gleichbleibender Ausprägung.

Wesentlich ähnlicher erscheint die Expression von GABA_{B2} Rezeptor-Protein im Gehirn des Menschen und der Ratte. Hier konnte im Vergleich nur eine etwas schwächere Ausprägung in den thalamischen Kernen und der Lamina III des präfrontalen Cortex sowie ein Fehlen von GABA_{B2} Rezeptor-Immunoreaktivität in den großen cholinergen Interneuronen des Striatums und Globus pallidus bei der Ratte (Charles et al. 2001) bei sonst identischem Expressionsmuster festgestellt werden.

Nicht nur in der neuronalen Expression von GABA_B Rezeptoren zeigen sich Unterschiede zwischen Ratte und Mensch, auch in der Astroglia des Menschen konnte in deutlich stärkerem Maße und wesentlich häufiger Transkripte bzw. Rezeptor-Proteine beider GABA_B Rezeptoren

nachgewiesen werden. Besonders zeigte sich dies am Beispiel der Bergmann-Glia des humanen Kleinhirns, in welcher GABA_{B1} Rezeptoren deutlich nachweisbar waren, wohingegen diese Rezeptoren in der Ratte dort nicht exprimiert werden (Bischoff et al. 1999; Margeta-Mitrovic et al. 1999; Charles et al. 2001).

Zusammenfassend ist, trotz einer weitverbreiteten Expression der GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen wie auch der Ratte von unterschiedlichen Expressionsstärken im Cortex, Hippocampus und den Basalganglien auszugehen. Dies trifft in besonderem Maße für die Expression von mRNA der GABA_{B1} Rezeptor Splice-Varianten zu.

Dieser Umstand sollte bei der Interpretation von Ergebnissen aus Versuchen an Ratten zur humanen Neuropathologie und -pathophysiologie beachtet werden. Nötigenfalls müssen die Befunde aus derartigen Tiermodellen durch Versuche an Primaten und vor allem durch *post mortem* Untersuchungen an Gehirnen von Erkrankten erhärtet werden, wie dies beispielsweise zur Aufklärung der Rolle von GABA_B Rezeptoren beim Morbus Parkinson geschehen ist (Versuche an Ratten: de Groote et al. 1999; Johnston und Duty 2003; Versuche an Primaten: Calon et al. 2000, 2001; humane *post mortem* Untersuchung: Calon et al. 2003).

5.4. Ausblick

Durch die fortschreitende Aufklärung der molekularen Struktur und Funktion der GABA_B Rezeptoren ist die Forschung auf diesem Gebiet beflügelt worden. Dies äußert sich nicht zuletzt in der steigenden Zahl an Publikationen zu Tiermodellen und vereinzelt human-pathologischen Untersuchungen zu bestimmten neurologischen Erkrankungen. Ein Schwerpunkt liegt hier in der weiteren Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung von GABA_B Rezeptoren bei den verschiedenen Formen der Epilepsie und neurodegenerativer Erkrankungen.

Die weite Verbreitung der GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen, bei unterschiedlicher und zum Teil auch entgegengesetzter Funktionsweise verdeutlicht die Notwendigkeit, zukünftig bei der Durchführung von Experimenten zur Pathophysiologie vermehrt den pharmakologischen und molekularbiologischen Subtypen der GABA_B Rezeptoren Aufmerksamkeit zu schenken.

Dies würde nicht nur zum besseren Verständnis von pathophysiologischen Prozessen beitragen, sondern auch die Möglichkeit eröffnen, pharmazeutische Angriffspunkte klarer zu definieren, um eventuell in der Zukunft durch GABA_B Rezeptor-wirksame Substanzen eine vergleichsweise größere Wirkung bei reduziertem Nebenwirkungsprofil zu erzielen.

Bislang wurden große Anstrengungen unternommen, die unterschiedlichen pharmakologischen Befunde an GABA_B Rezeptoren auf die molekularbiologische Subtypen dieser Rezeptoren (z.B. Splice-Varianten) zurückzuführen. Es ist jedoch noch nicht gelungen GABA_B Rezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten zu synthetisieren, welche spezifisch nur an prä- bzw. postsynaptisch lokalisierten GABA_B Rezeptoren binden oder überwiegende Affinität zu GABA_B Rezeptor-Dimeren besitzen, welche nur von bestimmten Splice-Varianten gebildet werden.

Ein weiterer pharmazeutischer Ansatz besteht in der Entwicklung von allosterischen Modulatoren der physiologischen Stimulation von GABA_B Rezeptoren. Erste Studien mit derartigen Modulatoren aus den Substanzklassen der Phenylamine und der Nitropyrimidine zeigten bereits eine bis zu 200%ige Steigerung der Stimulierbarkeit von GABA_B Rezeptoren (Kerr et al. 2002; Urwyler et al. 2003). Dieser Effekt scheint bei einigen dieser Substanzen hauptsächlich an präsynaptischen GABA_B Rezeptoren aufzutreten, wodurch gegenüber dem Baclofen eine selektivere Wirkung erzielt werden könnte.

Modulatorisch wirkende Substanzen sind für die GABA_A Rezeptoren bereits seit Langem bekannt und stellen in Form von Benzodiazepinen, Barbituraten und volatilen Anästhetika hochpotente Arzneimittel dar, wodurch die Hoffnung verstärkt wird, dass auch Modulatoren an GABA_B Rezeptoren pharmazeutisch von Nutzen sein könnten.

6. Zusammenfassung

Funktionelle GABA_B Rezeptoren bestehen aus einem GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimer. Diese können sowohl prä- wie auch postsynaptisch lokalisiert sein, wobei sie auch unterschiedliche intrazelluläre Effekte bedingen. Postsynaptische GABA_B Rezeptoren bewirken die späte inhibitorische postsynaptische Inhibition. Präsynaptisch kann dieser Rezeptortyp die Ausschüttung von Neurotransmittern (wie Glutamat oder GABA) hemmen. Hierdurch wird, abhängig davon welcher Botenstoff präsynaptisch vermindert freigesetzt wird, ein inhibitorischer oder exzitatorischer Effekt vermittelt.

In den hier vorgelegten Untersuchungen wurden die Verteilungsmuster der mRNA-Transkripte durch *in situ* Hybridisierung sowie der Rezeptor-Proteine durch Immunohistochemie von GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren im menschlichen Gehirn semiquantitativ beschrieben. Beide GABA_B Rezeptoren werden in weiten Teilen des Gehirns neuronal exprimiert. Eine deutliche Diskrepanz zwischen der Expression der GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren zeigte sich im Striatum. Hier waren GABA_{B2} Rezeptoren nur in einer Subpopulation der Neurone nachweisbar, weshalb im Striatum nur in geringem Ausmaß von der Bildung typischer, d.h. aus einem GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimer bestehenden GABA_B Rezeptoren auszugehen ist.

Für die mRNA der humanen GABA_{B1} Rezeptoren sind bislang vier und für die GABA_{B2} Rezeptoren drei Splice-Varianten beschrieben worden.

Die Expression der mRNA-Splice-Varianten des GABA_{B1} Rezeptors (1A, 1B, 1C-hum und 1E) wurde hier erstmals gemeinsam in den verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns auf makroskopischer und zellulärer Ebene nachgewiesen. Im Vergleich der relativen Expressionsmengen ergab sich, dass unter den mRNA-Splice-Varianten des GABA_{B1} Rezeptors die GABA_{B1B} Rezeptoren überwiegend exprimiert wurden. GABA_{B1A} Rezeptor mRNA war ebenso weitverbreitet, aber in geringerer Menge nachweisbar. Die Lokalisation der Transkripte von GABA_{B1C-hum} und GABA_{B1E} Rezeptoren hingegen war umschriebener und lag in niedrigen Mengen vor.

Für den GABA_{B2} Rezeptor konnte durch RT-PCR die Existenz der mRNA-Splice-Varianten (2A, 2B und 2C) im Gehirn des Menschen nicht nachvollzogen werden.

Durch den Baclofen-stimulierten [³⁵S]GTPγS-Bindungsassay wurde schließlich gezeigt, dass in den meisten humanen Gehirnregionen, in denen GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren exprimiert werden, diese auch funktionelle und an G_{α_{i/o}}-Proteine gekoppelte GABA_{B1}/GABA_{B2} Rezeptor-Dimere bilden konnten. Keine Stimulierbarkeit zeigte sich in den Basalganglien und den zentralen und ventralen Anteilen des Thalamus, weshalb hier die abweichenden Zusammensetzung des GABA_B Rezeptor-Dimers oder einer Kopplung an andere G-Proteine diskutiert werden muss.

Die hier vorgestellten Daten zur Expression der GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen weichen teilweise von den für die Ratte publizierten ab. Dies trifft insbesondere für die Expressionsstärke der GABA_{B1A} und GABA_{B1B} Rezeptor Splice-Varianten zu.

7. Anhang

7.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien ohne Herstellerangabe wurden von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen.

H ₂ O _{dest} :	AMPUWA® (Fa. Fresenius)
H ₂ O _{DEPC} :	H ₂ O _{dest} wird mit 0,1%v/v DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt und ca. 12 Std. gerührt, bevor es autoklaviert wird
H ₂ O _{PCRgrade} :	hochreines H ₂ O; auf RNase- und DNase-Freiheit getestet

7.1.1. Anfertigen der Gefrierschnitte / Histologie

Poly-L-Lysin-Lösung:	0,01%w/v Poly-L-Lysin in H ₂ O _{DEPC}
Thioninlösung:	0,05%w/v Thioninblau; gelöst in einem Puffer aus 0,1 M Essigsäure und 0,1 M Natriumacetat

7.1.2. *In situ* Hybridisierung

10x PBS (RNA):	1,3 M NaCl, 70 mM Na ₂ HPO ₄ , 30 mM NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O _{DEPC}
20x SSC:	3,0 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0
TdT:	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (aus Kalbsthymus, 25U/μl; Fa. Roche Diagnostika) Kit enthält auch den TdT-Puffer und CoCl ₂ (25 mM)
[³⁵ S]dATP _α S:	[³⁵ S]-Desoxyadenosin-5'-(α-Thio-)Triphosphat (Fa. NEN Perkin Elmer)
TNES-Puffer:	140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,1% SDS
Polyacrylamid-Säulen:	Bio-Spin 6 Chromatography Columns (Fa. Bio-Rad)
DTT-Lösung:	1,0 M Dithiotreitol in H ₂ O _{DEPC}
Paraformaldehyd-Lsg.:	4%w/v Paraformaldehyd (Merck) wird in 1xPBS (RNA) für ca. 15 Min. auf 60°C erhitzt und nach der Klärung der Lösung (was durch Zugabe von wenigen Tropfen 1M NaOH katalysiert wird) filtriert und abgekühlt
Hybridisierungspuffer:	50%v/v Formamide (Fa. Fluka), 10%w/v Dextran (MG>350.000g/mol; Fa. Fluka); 5x Denhardts Lösung (Fa. Fluka), 0,6 M NaCl, 60mM Na-Citrat, 25 mM Na ₃ PO ₄ , 1 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 200 mg/l Einzelstrang-DNA (hydrolysiert aus Lachs-Sperma), 100 mg/l Poly-Adenylat; pH 7,0
Ethanol:	zur Fixierung und Lagerung der Gewebeschnitte (70 bzw. 96%) wird 100% Ethanol (unvergällt, p.A., Fa. Merck) mit H ₂ O _{DEPC} verdünnt

7.1.3. RT-PCR

Trizol®:	Phenol/ Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch (Invitrogen)
Chloroform:	(für die Molekularbiologie; Fa. Fluka)
Isopropanol 100%:	(für die Molekularbiologie)
Oligo dT ₁₂₋₁₈ :	Oligonukleotid aus 12-18 Desoxy-Thymidinbasen (500µg/ml; Fa. Invitrogen)
dNTP-Mix:	gleichteiliges Gemisch aus dATP, dTTP, dGTP und dCTP (10mM; Fa. Invitrogen)
RNase-Inhibitor:	RNaseOUT® (Fa. Invitrogen)
Reverse Transkriptase:	Superscript II® (Fa. Invitrogen), der Kit enthält auch 5x First-Strand Puffer und die zur RT verwendete DTT-Lösung (0,1M)
Taq DNA Polymerase:	Platinum® Taq DNA Polymerase (Fa. Invitrogen), der Kit enthält auch 10x PCR-Puffer und MgCl ₂ -Lösung (50mM)
TAE-Laufpuffer:	0,4 M Tris-Base, 0,2 M Essigsäure, 10 mM EDTA in H ₂ O _{dest}
Agarosegel:	2%w/v Agarose werden in TAE-Laufpuffer aufgekocht, mit 1,0 µl/100ml Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) versetzt, in die Gelkammer gegossen und nach dem Erkalten bei Raumtemperatur verwendet

7.1.4. Oligonukleotide und Primer***Oligonukleotide zur in situ Hybridisierung von***

GABA_{B1} Rezeptor mRNA (detektiert alle vier Splice-Varianten des GABA_{B1} Rezeptors)

5'-TGC TGT CAT AGT AGC CAA TCT TCT TGT AGC TGC CAC CCT G-3'

Länge: 40mer GC-Gehalt: 50,0% T_m¹: 52,8°C

GABA_{B1A} und GABA_{B1E} Rezeptor mRNA

5'-GGC CCT GAC TAC AGA TGC TCC GGG AGC TGC CCA CCA GAT G-3'

Länge: 40mer GC-Gehalt: 65,0% T_m¹: 59,0°C

GABA_{B1B} Rezeptor mRNA

5'-ATG TAC ACT GCG CGC CGT TCT GAG GAG GGG TGC GGG GGG A-3'

Länge: 40mer GC-Gehalt: 67,5% T_m¹: 60,0°C

GABA_{B1C-hum} Rezeptor mRNA

5'-CGT TCT GAG TGT GGC GTT CGA TTC ACA CAG CGG CTG GGT G-3'

Länge: 40mer GC-Gehalt: 60% T_m¹: 56,9°C

GABA_{B1E} Rezeptor mRNA

5'-GGT TGG GCT GTG AGT TCT GGA TAT AAC AAT CCA TTT ATC T-3'

Länge: 40mer GC-Gehalt: 40% T_m¹: 48,7°CGABA_{B2} Rezeptor mRNA

5'-ACC TCC TTG GTG AGC GGC ATG AGG CCC ATG ATG GAG AGC G-3'

Länge: 40mer GC-Gehalt: 62,5% T_m¹: 57,9°C

Glutamat-Decarboxylase 67 (GAD67) mRNA

5'-CCT GCA CAC ATC TGG TTG CAT CCT TGG AGT ATA CCC TTT TCC TTG-3'

Länge: 45mer GC-Gehalt: 48,9% T_m¹: 54,0°C**Primer zur RT-PCR von**GABA_{B1A} und GABA_{B1E} Rezeptor mRNA

hGBR1e sense

5'-AAC ATG ACA TCC CAG GAA TTT G-3'

Länge: 22mer GC-Gehalt: 40,9% T_m²: 58,9°C

hGBR1e antisense

5'-TCA GGT TGG GCT GTG AGT TC-3'

Länge: 20mer GC-Gehalt: 55,0% T_m²: 58,0°CGABA_{B2A} und GABA_{B2B} Rezeptor mRNA

hGBR2abc sense

5'-CAG CAA CGC AGA ACA GGC-3'

Länge: 18mer GC-Gehalt: 61,1% T_m²: 58,0°C

hGBR2ab antisense

5'-TGA CTC GGA AGG AGG GTG-3'

Länge: 18mer GC-Gehalt: 61,1% T_m²: 55,7°CGABA_{B2C} Rezeptor mRNA

hGBR2abc sense

5'-CAG CAA CGC AGA ACA GGC-3'

Länge: 18mer GC-Gehalt: 61,1% T_m²: 58,0°C

hGBR2c antisense

5'-CCT GAG TGC CAT CCG AG-3'

Länge: 17mer GC-Gehalt: 64,7% T_m²: 54,1°C¹ berechnet für die Bedingungen der ISH (nach Formel 2) für die Oligonukleotide und die² Bedingungen der PCR (mit Primer 5.0)

7.1.5. Immunohistochemie

10x PBS:	1,3 M NaCl, 70 mM Na ₂ HPO ₄ , 30 mM NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O _{dest}
Fixativ:	4% Paraformaldehyd / 0,4% Pikrinsäure-Lösung Herstellung der Paraformaldehyd-Lösung (4%) wie unter 7.2.2 beschrieben, wobei jedoch kein 1x PBS (RNA), sondern mit H ₂ O _{dest} angesetztes PBS verwendet wird. Nach dem Abkühlen der Paraformaldehyd-Lösung wird gesättigte Pikrinsäure-Lösung (4 ml/l) zugegeben
PBSTN:	1x PBS, 0,3%v/v Triton-X, 2,5%v/v Normalserum der Ziege (Fa. Vector)
PBSN:	1x PBS, 10%v/v Normalserum der Ziege (Fa. Vector)
Primärantikörper:	Meerschweinchen-IgG gegen GABA _{B1} bzw. GABA _{B2} Rezeptor-Protein (Fa. Chemicon)
Sekundärantikörper:	biotinylierter Antikörper gegen IgG des Meerschweinchens (Fa. Vector)
ABC-Komplex:	Avidin-Merettichperoxidase-Komplex (Fa. Vector)
DAB-Lsg.:	Diaminobenzidin-Lösung (4%w/v in 0,06%v/v H ₂ O ₂ ; 0,2%w/v NiCl ₂ ; Fa. Vector)

7.1.6. [³⁵S]GTPγS-Bindungsassay

[³⁵ S]GTPγS:	[³⁵ S]-Guanosin-5´-(γ-Thio-)Triphosphat (Fa. NEN Perkin Elmer)
Assay-Puffer:	50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl ₂ , 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl; pH 7,4
GDP:	Guanosin-Diphosphat
R-Baclofen:	R-Baclofen (100 mM; Fa. Tocris) gelöst in 1 M NaOH

7.1.7. Autoradiografie

¹⁴ C-Polymer-Standards:	Für die kürzeren Expositionszeiten (Stunden/Tage) wurden ¹⁴ C-Standards von 0.1 bis 100 nCi/g (10 Werte) und für die längeren Expositionszeiten (Wochen/Monate) von 30 bis 860 nCi/g (8 Werte) verwendet (Fa. Amersham)
Entwicklerlösung GBX:	1 : 3,75 Verdünnung mit H ₂ O _{dest} (Fa. Kodak)
Fixiererlösung GBX:	1 : 3,75 Verdünnung mit H ₂ O _{dest} (Fa. Kodak)
Entwickler D19:	160 g/l werden mit 37°C warmen H ₂ O _{dest} versetzt und gerührt und danach auf ca. 17°C abgekühlt (Fa. Kodak)
Fixierer RT2000:	1:9 Verdünnung mit H ₂ O _{dest} (Fa. Ilford)

7.2. Literaturverzeichnis

- Abellan MT, Jolas T, Aghajanian GK, Artigas F. Dual control of dorsal raphe serotonergic neurons by GABA_B receptors. Electrophysiological and microdialysis studies. *Synapse*. **36** (2000) 21-34.
- Addolorato G, Balducci G, Capristo E, Attilia ML, Taggi F, Gasbarrini G, Ceccanti M. Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in the treatment of alcohol withdrawal syndrome: a randomized comparative study versus benzodiazepine. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **10** (1999) 1596-1604.
- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WEJ, Jones EG. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry.* **52** (1995) 258-266.
- Ambardekar AV, Ilinsky IA, Froestl W, Bowery NG, Kultas-Ilinsky K. Distribution and properties of GABA_B antagonist [³H]CGP62349 binding in the Rhesus monkey thalamus and basal ganglia and the influence of lesions in the reticular thalamic nucleus. *Neuroscience.* **93** (1999) 1339-1347.
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K. Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229** (1996) 891-895.
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K. Cleft palate and decrease brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** (1997) 6496-6499.
- Attwell D, Barbour B, Szatkowski M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron.* **11** (1993) 401-407.
- Austin KB, Bronzino JD, Morgane PJ. Paired-pulse facilitation and inhibition in the dentate gyrus is dependent on behavioral state. *Exp. Brain Res.* **77** (1989) 594-604
- Ault B, Nadler JV. Effects of baclofen on synaptically induced cell firing in the rat hippocampal slice. *Br. J. Pharmacol.* **80** (1983) 211-219.
- Bal T, von Krosigk M, McCormick DA. Synaptic and membrane mechanisms underlying synchronized oscillations in the ferret lateral geniculate nucleus in vitro. *J. Physiol.* **483** (1995) 641-663.
- Balasubramanian S, Teissère JA, Hall RA. Direct interaction between GABA_A and GABA_B receptors. *Society for Neuroscience. Meeting Abstract* (2002) No. 434.12.
- Balerio GN, Rubio MC. Baclofen analgesia: involvement of the GABAergic system. *Pharmacol. Res.* **46** (2002) 282-286
- Baude A, Nusser Z, Roberts JDB, Mulvihill E, McIlhinney RAJ, Somogyi P. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1a) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron.* **11** (1993) 771-787.
- Benes FM. Evidence for altered trisynaptic circuitry in schizophrenic hippocampus. *Biol. Psychiatry.* **46** (1999) 589-599
- Benke D, Honer M, Michel C, Bettler B, Mohler H. Gamma-aminobutyric acid type B receptor splice variant proteins GBR1a and GBR1b are both associated with GBR2 in situ and display differential regional and subcellular distribution. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 27323-27330.
- Berthele A, Laurie DJ, Platzer S, Zieglgänsberger W, Tölle TR, Sommer B. Differential expression of rat and human type I metabotropic glutamate receptor splice variant messenger RNAs. *Neuroscience.* **85** (1998) 733-749.
- Berthele A, Platzer S, Laurie DJ, Weis S, Sommer B, Zieglgänsberger W, Conrad B, Tölle TR. Expression of metabotropic glutamate receptor subtype mRNA (mGluR1-8) in human cerebellum. *NeuroReport.* **10** (1999) 3861-3867.
- Berthele A, Platzer S, Weis S, Conrad B, Tölle TR. Expression of GABA_{B1} and GABA_{B2} mRNA in the human brain. *NeuroReport.* **12** (2001) 3269-3275.
- Berthele A, Platzer S, Dworzak D, Schadrack J, Mahal B, Büttner A, Assmus HP, Wurster K, Zieglgänsberger W, Conrad B, Tölle TR. [³H]-nociceptin ligand-binding and nociceptin opioid receptor mRNA expression in the human brain. *Neuroscience.* **121** (2003) 629-640.
- Bertrand S, Ng GY, Purisai MG, Wolfe SE, Severidt MW, Nouel D, Robitaille R, Low MJ, O'Neill GP, Metters K, Lacaille JC, Chronwall BM, Morris SJ. The anticonvulsant, antihyperalgesic agent gabapentin is an agonist at brain gamma-aminobutyric acid type B receptors negatively coupled to voltage-dependent calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298** (2001) 15-24.
- Bianchi M, Panerai AE. Reversal of scopolamine-induced amnesia by the GABA_B receptor antagonist CGP 35348 in the mouse. *Cognit. Brain Res.* **1** (1993) 135-136.
- Billinton A, Upton N, Bowery NG. GABA_B receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and postsynaptic elements respectively in rat and human cerebellum. *Br. J. Pharmacol.* **126** (1999) 1387-1392.
- Billinton A, Ige AO, Wise A, White JH, Disney GH, Marshall FH, Waldvogel HJ, Faul RL, Emson PC. GABA_(B) receptor heterodimer-component localisation in human brain. *Mol. Brain Res.* **77** (2000a) 111-124.
- Billinton A, Stean TO, Bowery NG, Upton N. GABA_{B(1)} splice variant mRNAs are differentially affected by electroshock induced seizure in rats. *NeuroReport.* **11** (2000b) 3817-3822.
- Billinton A, Baird VH, Thom M, Duncan JS, Upton N, Bowery NG. GABA_{B(1)} mRNA expression in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Mol. Brain Res.* **86** (2001a) 84-89.
- Billinton A, Baird VH, Thom M, Duncan JS, Upton N, Bowery NG. GABA_B receptor autoradiography in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Br. J. Pharmacol.* **132** (2001b) 475-480.

- Billinton A, Ige AO, Bolam PJ, White JH, Marshall FH, Emson PC. Advances in the molecular understanding of GABA_B receptors. *Trends Neurosci.* **24** (2001c) 277-282.
- Bischoff S, Leonhard S, Reymann N, Schuler V, Shigemoto R, Kaupmann K, Bettler B. Spatial distribution of GABA_{BR1} receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **412** (1999) 1-16.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **62** (2000) 63-88.
- Bonanno G, Raiteri M. Multiple GABA_B receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **14** (1993a) 259-261.
- Bonanno G, Raiteri M. Gamma-aminobutyric (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABA_B receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265** (1993b) 765-770.
- Bonanno G, Fassio A, Schmid G, Severi P, Sala R, Raiteri M. Pharmacologically distinct GABA_B receptors that mediate inhibition of GABA and glutamate release in human neocortex. *Br. J. Pharmacol.* **120** (1997) 60-64.
- Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Brown N, Wafford KA, Whiting PJ. θ a novel γ -aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96** (1999) 9891-9896.
- Bormann J. Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABA_A receptors. *Neuropharmacology.* **30** (1991) 1387-1389.
- Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **21** (2000) 16-19.
- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL. Characteristics of GABA_B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br. J. Pharmacol.* **78** (1983) 191-206.
- Bowery NG, Price GW, Hudson AL, Hill DR, Wilkin GP, Turnbull MJ. GABA receptor multiplicity. Visualization of different receptor types in the mammalian CNS. *Neuropharmacology.* **23** (1984) 219-231.
- Bowery NG. GABA_B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33** (1993) 109-147.
- Bowery NG, Parry K, Goodrich G, Ilinsky I, Kultas-Ilinsky K. Distribution of GABA_B binding sites in the thalamus and basal ganglia of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Neuropharmacology.* **38** (1999a) 1675-1682.
- Bowery NG, Parry K, Boehrer A, Mathivet P, Marescaux C, Bernasconi R. Pertussis toxin decreases absence seizures and GABA_B receptor binding in thalamus of a genetically prone rat (GAERS). *Neuropharmacology.* **38** (1999b) 1691-1697.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol. Rev.* **54** (2002) 247-264.
- Brauner-Osborne H, Krosgaard-Larsen P. Functional pharmacology of cloned heterodimeric GABA_B receptors expressed in mammalian cells. *Br. J. Pharmacol.* **128** (1999) 1370-1374.
- Brebner K, Froestl W, Andrews M, Phelan R, Roberts DCS. The GABA_B agonist CGP44532 decreases cocaine self-administration in rats: demonstration using a progressive ratio and a discrete trials procedure. *Neuropharmacology.* **38** (1999) 1797-1804.
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83** (1986) 3746-3750.
- Brown JP, Gee NS. Cloning and deletion mutagenesis of the alpha2 delta calcium channel subunit from porcine cerebral cortex. Expression of a soluble form of the protein that retains [³H]gabapentin binding activity. *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 25458-25465.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature.* **368** (1994) 823-828.
- Calabresi P, Mercuri NB, Demurtas M, Bernardi G. Involvement of GABA systems in feedback regulation of glutamate- and GABA-mediated synaptic potentials in rat neostriatum. *J. Neurophysiol.* **440** (1991) 581-599.
- Calon F, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bedard PJ, Di Paolo T. [¹²⁵I]-CGP64213 binding to GABA_B receptors in the brain of monkeys: effect of MPTP and dopaminomimetic treatments. *Exp. Neurol.* **163** (2000) 191-199.
- Calon F, Lavertu N, Lemieux AM, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bedard PJ, Di Paolo T. Effect of MPTP-induced denervation on basal ganglia GABA_B receptors: Correlation with dopamine concentrations and dopamine transporter. *Synapse.* **40** (2001) 225-234.
- Calon F, Morissette M, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bedard PJ, Di Paolo T. Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Mov. Disord.* **18** (2003) 241-253.
- Calver AR, Medhurst AD, Robbins MJ, Charles KJ, Evans ML, Harrison DC, Stammers M, Hughes SA, Hervieu G, Couve A, Moss SJ, Middlemiss DN, Pangalos MN. The expression of GABA_{B1} and GABA_{B2} receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience.* **100** (2000) 155-170.
- Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, Boyfield I, Wood MD, Russell RB, Price GW, Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. The C-terminal domains of the GABA_B receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *Neuroscience.* **21** (2001) 1203-1210.
- Campbell SK, Almeida GL, Penn RD, Corcos DM. The effects of intrathecally administered baclofen on function in patients with spasticity. *Phys. Ther.* **75** (1995) 352-362.
- Castellano C, Brioni JD, Nagahara AH, McGaugh JL. Posttraining systemic and intra-amygdala administration of the GABA_B agonist baclofen impairs retention. *Behav. Neural. Biol.* **52** (1989) 170-179.

- Castellano C, McGaugh JL. Oxotremorine attenuates retrograde amnesia induced by post-training administration of the GABAergic agonists muscimol and baclofen. *Behav. Neural. Biol.* **56** (1991) 25-31.
- Castro-Lopes JM. Inhibition of nociceptive transmission by baclofen. In *20th European Winter Conference on Brain Research* (2000) 121.
- Charara A, Heilman TC, Levey AI, Smith Y. Pre- and postsynaptic localization of GABA_B receptors in the basal ganglia in monkeys. *Neuroscience.* **95** (2000) 127-140.
- Charles KJ, Evans ML, Robbins MJ, Calver AR, Leslie RA, Pangalos MN. Comparative immunohistochemical localisation of GABA_{B1a}, GABA_{B1b} and GABA_{B2} subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. *Neuroscience.* **106** (2001) 447-467.
- Charpier S, Leresche N, Deniau JM, Mahon S, Hughes SW, Crunelli V. On the putative contribution of GABA_B receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology.* **38** (1999) 1699-1706.
- Christgau S, Aanstoot HJ, Schierbeck H, Begley K, Tullin S, Hejnaes K, Baekkeskov S. Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH₂-terminal domain. *J. Cell Biol.* **118** (1992) 309-320.
- Chu DC, Penney JB Jr, Young AB. Quantitative autoradiography of hippocampal GABA_B and GABA_A receptor changes in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **82** (1987a) 246-252.
- Chu DC, Penney JB Jr, Young AB. Cortical GABA_B and GABA_A receptors in Alzheimer's disease: a quantitative autoradiographic study. *Neurology.* **37** (1987b) 1454-1459.
- Clark JA, Mezey E, Lam AS, Bonner TI. Distribution of the GABA_B receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res.* **860** (2000) 41-52.
- Colmers WF, Williams JT. Pertussis toxin pretreatment discriminates between pre- and postsynaptic actions of baclofen in rat dorsal raphe nucleus in vitro. *Neurosci. Lett.* **93** (1988) 300-306.
- Colombo G, Agabio R, Carai MAM, Lobina C, Pani M, Reali R, Addolorato G, Gessa GL. Ability of baclofen in reducing alcohol intake and withdrawal severity: I—preclinical evidence. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **24** (2000) 58-66.
- Couve A, Filippov AK, Connolly CN, Bettler B, Brown DA, Moss SJ. Intracellular retention of GABA_B receptors. *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 26361-26367.
- Creutzfeldt OD. „Cortex cerebri“. Springer-Verlag, Berlin, 1. Auflage (1983) 45-92.
- Crunelli V, Leresche N. A role for GABA_B receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci.* **14** (1991) 16-21.
- Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat. Rev. Neurosci.* **3** (2002) 371-382.
- Cunningham MD, Enna SJ. Evidence for pharmacologically distinct GABA_B receptors associated with cAMP production in rat brain. *Brain Res.* **720** (1996) 220-224.
- Daoust M, Saligaut C, Lhuître JP, Moore N, Flipo JL, Boismare F. GABA transmission, but not benzodiazepine receptor stimulation, modulates ethanol intake by rats. *Alcohol.* **4** (1987) 469-472.
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL. GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature.* **349** (1991) 609-611.
- Davies CH, Collingridge GL. The physiological regulation of synaptic inhibition by GABA_B autoreceptors in rat hippocampus. *J. Physiol.* **472** (1993) 245-265.
- Davies CH, Collingridge GL. Regulation of EPSPs by the synaptic activation of GABA_B autoreceptors in rat hippocampus. *J. Physiol.* **496** (1996) 451-470.
- de Groote C, Wullner U, Lochmann PA, Luiten PG, Klockgether T. Functional characterization and expression of thalamic GABA_B receptors in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* **38** (1999) 1683-1689.
- Deiß RA, Prince DA. Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by GABA_B receptor feed-back on GABA release. *J. Physiol.* **412** (1989) 513-541.
- Deiß RA, Billard JM, Zieglgänsberger W. Presynaptic and postsynaptic GABA_B receptors of neocortical neurons of the rat in vitro: differences in pharmacology and ionic mechanisms. *Synapse.* **25** (1997) 62-72.
- Deiß RA. GABA_B receptor-mediated effects in human and rat neocortical neurones in vitro. *Neuropharmacology.* **38** (1999) 1755-1766.
- De Schutter E. Cerebellar long-term depression might normalize excitation of Purkinje cells: a hypothesis. *Trends Neurosci.* **18** (1995) 291-295.
- De Sousa NJ, Beninger RJ, Jhamandas K, Boegman RJ. Stimulation of GABA_B receptors in the basal forebrain selectively impairs working memory of rats in the double Y-maze. *Brain Res.* **641** (1994) 29-38.
- Devi LA. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol. Sci.* **22** (2001) 532-537.
- Dirig DM, Yaksh TL. Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275** (1995) 219-227.
- Dressnandt J, Conrad B. Lasting reduction of severe spasticity after ending chronic treatment with intrathecal baclofen. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **2** (1996) 168-173.

- Dressnandt J, Konstanzer A, Weinzierl FX, Pfab R, Klingelhöfer J. Intrathecal baclofen in tetanus: four cases and a review of reported cases. *Intensive Care Med.* **23** (1997) 896-902.
- Dudel J, Kuffler SW. Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J. Physiol.* **155** (1961) 543-562.
- Dupuis DS, Pauwels PJ, Radu D, Hall H. Autoradiographic studies of 5-HT_{1A}-receptor-stimulated [³⁵S]GTPγS-binding responses in the human and monkey brain. *Eur. J. Neurosci.* **11** (1999) 1809-1817.
- Durkin MM, Gunwaldsen CA, Borowsky B, Jones KA, Branchek TA. An in situ hybridization study of the distribution of the GABA_{B2} protein mRNA in the rat CNS. *Mol. Brain Res.* **71** (1999) 185-200.
- Dutar P, Nicoll RA. Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron.* **1** (1988) 585-591.
- Ekstrand J, Nyström S, Emanuelsson A, Nilsson AK, Johansson T, Edlund A. Novel human GABA_B receptor 1 isoforms. In *GABA_B receptors. The Eighth Neuropharmacology. Conference, Miami, USA.* (1999) P3, 87.
- Enz R, Cutting G. GABA_C receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur. J. Neurosci.* **11** (1999) 41-50.
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Handel M, Kriebitzsch J, Holtt V. Rational design of oligonucleotide probes to avoid optimization steps in in situ hybridization. *Brain Res. Protoc.* **4** (1999) 82-91.
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* **7** (1991) 91-100.
- Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J. Neurosci.* **14** (1994) 1834-1855.
- Fadda F, Colombo G, Mosca E, Gessa GL. Suppression by gamma-hydroxybutyric acid of ethanol withdrawal syndrome in rats. *Alcohol. Alcohol.* **24** (1989) 447-451.
- Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM. Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 10100-10104.
- Filippov AK, Couve A, Pangalos MN, Walsh FS, Brown DA, Moss SJ. Heteromeric assembly of GABA_{BR1} and GABA_{BR2} receptor subunits inhibits Ca²⁺ current in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **20** (2000) 2867-2874.
- Fon EA, Edwards RH. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve.* **24** (2001) 581-601.
- Francis J, Jung BP, Zhang G, Ho W, Cheng J, McIntyre Burnham W, Eubanks JH. Perforant pathway kindling transiently induces the mRNA expression of GABA_B receptor subtypes R1A and R2 in the adult rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* **91** (2001) 159-162.
- Freier SM, Kierzek R, Caruthers MH, Neilson T, Turner DH (1986). Free energy contributions of GU and other terminal mismatches to helix stability. *Biochemistry.* **25**: 3209-3213.
- Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* **6** (1996) 347-470.
- Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H. GABA_B-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur. J. Neurosci.* **11** (1999) 761-768.
- Fromm GH, Terrence CF, Chattha AS. Baclofen in the treatment of trigeminal neuralgia: double-blind study and long-term follow-up. *Ann. Neurol.* **15** (1984) 240-244.
- Fromm GH, Sato K, Nakata M. The action of GABA_B antagonists in the trigeminal nucleus of the rat. *Neuropharmacology.* **31** (1992) 475-480.
- Fromm GH. Baclofen as an adjuvant analgesic. *J. Pain Symptom Manage.* **9** (1994) 500-509.
- Frye GD, Fincher A. Sensitivity of postsynaptic GABA_B receptors on hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons to ethanol. *Brain Res.* **735** (1996) 239-248.
- Gallimberti L, Spella MR, Soncini CA, Gessa GL. Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol and heroin dependence. *Alcohol.* **20** (2000) 257-62.
- Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, La Russa A, Serra P, Cittadella R, Bonavita S, Andreoli V, LePiane E, Sasanelli F, Di Costanzo A, Zappia M, Tedeschi G, Aguglia U, Quattrone A. GABA_B receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology.* **60** (2003) 560-563.
- Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the α₂δ subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 5768-5776.
- Georgiev VP, Yonkov DI, Kambourova TS. Interactions between angiotensin II and baclofen in shuttle-box and passive avoidance performance. *Neuropeptides.* **12** (1988) 155-158.
- Getova D, Bowery NG, Spassov V. Effects of GABA_B receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* **320** (1997) 9-13.
- Getova D, Bowery NG. The modulatory effects of high affinity GABA_B receptor antagonists in an active avoidance learning paradigm in rats. *Psychopharmacology.* **137** (1998) 369-373.
- Goei VL, Choi J, Ahn J, Bowlus CL, Raha-Chowdhury R, Gruen JR. Human gamma-aminobutyric acid B receptor gene: complementary DNA cloning, expression, chromosomal location, and genomic organization. *Biol. Psychiatry.* **44** (1998) 659-666.
- Gottesmann C. GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience.* **111** (2002) 231-239.

- Green A, Walls S, Wise A, Green RH, Martin AK, Marshall FH. Characterization of [³H]-CGP54626A binding to heterodimeric GABA_B receptors stably expressed in mammalian cells. *Br. J. Pharmacol.* **131** (2000) 1766-1774.
- Grifa A, Totaro A, Rommens JM, Carella M, Roetto A, Borgato L, Zelante L, Gasparini P. GABA (gamma-amino-butyric acid) neurotransmission: identification and fine mapping of the human GABA_B receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250** (1998) 240-245.
- Groebe DR, Uhlenbeck OC. Characterization of RNA hairpin loop stability. *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 11725-11735.
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E, DiGiorgi Gerevini V. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry.* **57** (2000) 1061-1069.
- Guillery RW, Feig SL, Lozsadi DA. Paying attention to the thalamic reticular nucleus. *Trends Neurosci.* **21** (1998) 28-32.
- Halasy K, Somogyi P. Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **5** (1993) 411-429.
- Hammond DL, Washington JD. Antagonism of L-baclofen-induced antinociception by CGP 35348 in the spinal cord of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **234** (1993) 255-262.
- Happe HK, Bylund DB, Murrin LC. Agonist-stimulated [³⁵S]GTPγS autoradiography: optimization for high sensitivity. *Eur. J. Pharmacol.* **422** (2001) 1-13.
- Hawrot E, Xiao Y, Shi QL, Norman D, Kirkitadze M, Barlow PN. Demonstration of a tandem pair of complement protein modules in GABA_B receptor 1a. *FEBS Lett.* **432** (1998) 103-108.
- Heese K, Otten U, Mathivet P, Raiteri M, Marescaux C, Bernasconi R. GABA_B receptor antagonists elevate both mRNA and protein levels of the neurotrophins nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not neurotrophin-3 (NT-3) in brain and spinal cord of rats. *Neuropharmacology.* **39** (2000) 449-462.
- Heuss C, Gerber U. G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* **23** (2000) 469-475.
- Hilf G, Gierschik P, Jakobs KH. Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes. *Eur. J. Biochem.* **186** (1989) 725-731.
- Hill DR, Bowery NG. ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature.* **290** (1981) 149-152.
- Hosford DA, Clark S, Cao Z, Wilson WA, Lin F, Morrisett RA, Huin A. The role of GABA_B receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. *Science.* **257** (1992) 398-401.
- Isomoto S, Kaibara M, Sakurai-Yamashita Y, Nagayama Y, Uezono Y, Yano K, Taniyama K. Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABA_B receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253** (1998) 10-15.
- Jasmin L, Rabkin SD, Granato A, Boudah A, Ohara PT. Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature.* **424** (2003) 316-320.
- Jensen AA, Mosbacher J, Elg S, Lingenhoehl K, Lohmann T, Johansen TN, Abrahamsen B, Mattsson JP, Lehmann A, Bettler B, Brauner-Osborne H. The anticonvulsant gabapentin (neurontin) does not act through gamma-aminobutyric acid-B receptors. *Mol. Pharmacol.* **61** (2002) 1377-1384.
- Jones EG. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience.* **85** (1998) 331-345.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_B R1 and GABA_B R2. *Nature.* **396** (1998) 674-679.
- Johnson JA, Lima JJ. Drug receptor/effector polymorphisms and pharmacogenetics: current status and challenges. *Pharmacogenetics.* **13** (2003) 525-534.
- Johnston T, Duty S. Changes in GABA_B receptor mRNA expression in the rodent basal ganglia and thalamus following lesion of the nigrostriatal pathway. *Neuroscience.* **120** (2003) 1027-1035.
- Kalkman HO, Loetscher E. GAD(67): the link between the GABA-deficit hypothesis and the dopaminergic- and glutamatergic theories of psychosis. *J. Neural. Transm.* **110** (2003) 803-812.
- Kangrga I, Jiang MC, Randic M. Actions of (-)-baclofen on rat dorsal horn neurons. *Brain Res.* **562** (1991) 265-275.
- Kaila K. Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **42** (1994) 489-537.
- Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem.* **56** (1991) 720-723.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature.* **386** (1997) 239-246.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. GABA_B -receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* **396** (1998a) 683-687.
- Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B. Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** (1998b) 14991-14996.
- Kerr DI, Ong J, Prager RH, Gynther BD, Curtis DR. Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res.* **405** (1987) 150-154.

- Kerr DI, Ong J. GABA_B receptors. *Pharmacol. Ther.* **67** (1995) 187-246.
- Kerr DI, Ong J, Puspawati NM, Prager RH. Arylalkylamines are a novel class of positive allosteric modulators at GABA_(B) receptors in rat neocortex. *Eur. J. Pharmacol.* **451** (2002) 69-77.
- Kim U, Sanchez-Vives MV, McCormick DA. Functional dynamics of GABAergic inhibition in the thalamus. *Science*. **278** (1997) 130-134.
- Knott C, Maguire JJ, Bowery NG. Age-related regional sensitivity to pertussis toxin-mediated reduction in GABA_B receptor binding in rat brain. *Mol. Brain Res.* **18** (1993a) 353-357.
- Knott C, Maguire JJ, Moratalla R, Bowery NG. Regional effects of pertussis toxin in vivo and in vitro on GABA_B receptor binding in rat brain. *Neuroscience*. **52** (1993b) 73-81.
- Krach LE. Pharmacotherapy of spasticity: oral medications and intrathecal baclofen. *J. Child. Neurol.* **16** (2001) 31-36.
- Krampf K. „Die Expression der Transkripte von GABA_A Rezeptor-Untereinheiten und ihren Splice-Varianten in ausgewählten Regionen im Gehirn des Menschen: eine in situ Hybridisierungsstudie“. Dissertation; Technische Universität München (2000) 63-65.
- Kulik A, Nakadate K, Nyiri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R. Distinct localization of GABA_B receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus. *Eur. J. Neurosci.* **15** (2002) 291-307.
- Kuner R, Köhr G, Grünwald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science*. **283** (1999) 74-77.
- Lafon-Cazal M, Viennois G, Kuhn R, Malitschek B, Pin JP, Shigemoto R, Bockaert J (1999). mGluR7-like receptor and GABA_B receptor activation enhance neurotoxic effects of N-methyl-D-aspartate in cultured mouse striatal GABAergic neurones. *Neuropharmacology*. **38**: 1631-1640.
- Lal S, Shuaib A, Ijaz S. Baclofen is cytoprotective to cerebral ischemia in gerbils. *Neurochem. Res.* **20** (1995) 115-119.
- Lanneau C, Green A, Hirst WD, Wise A, Brown J, Donnier E, Charles KJ, Wood M, Davies CH, Pangalos MN. Gabapentin is not a GABA_B receptor agonist. *Neuropharmacology*. **41** (2001) 965-975.
- Lanza M, Fassio A, Gemignani A, Bonanno G, Raiteri M. CGP52432: a novel potent and selective GABA_B autoreceptor antagonist in rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **237** (1993) 191-195.
- Lee SM, Friedberg MH, Ebner FF. The role of GABA-mediated inhibition in the rat ventral posterior medial thalamus. II. Differential effects of GABA_A and GABA_B receptor antagonists on responses of VPM neurons. *J. Neurophysiol.* **71** (1994) 1716-1726.
- Levy RA, Proudfit HK. The analgesic action of baclofen [beta-(4-chlorophenyl)-gamma-aminobutyric acid]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **202** (1977) 437-445.
- Levy RA, Proudfit HK. Analgesia produced by microinjection of baclofen and morphine at brain stem sites. *Eur. J. Pharmacol.* **57** (1979) 43-55.
- Liang F, Hatanaka Y, Saito H, Yamamori T, Hashikawa T. Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **416** (2000) 475-495.
- Liebman JM, Pastor G. Antinociceptive effects of baclofen and muscimol upon intraventricular administration. *Eur. J. Pharmacol.* **61** (1980) 225-230.
- Lin FH, Cao Z, Hosford DA. Increased number of GABA_B receptors in the lethargic (lh/lh) mouse model of absence epilepsy. *Brain Res.* **608** (1993)101-106.
- Ling W, Shoptaw S, Majewska D. Baclofen as a cocaine anti-craving medication: a preliminary clinical study. *Neuropsychopharmacology*. **18** (1998) 403-404.
- Lingenhoehl K, Brom R, Heid J, Beck P, Froestl W, Kaupmann K, Bettler B, Mosbacher J. Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA_B receptors. *Neuropharmacology*. **38** (1999) 1667-1673.
- Liu Z, Vergnes M, Depaulis A, Marescaux C. Evidence for a critical role of GABAergic transmission within the thalamus in the genesis and control of absence seizures in the rat. *Brain Res.* **545** (1991) 1-7.
- Lloyd KG, Thuret F, Pilc A. Upregulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) B binding sites in rat frontal cortex: a common action of repeated administration of different classes of antidepressants and electroshock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **235** (1985) 191-199.
- Lloyd KG, Zivkovic B, Scatton B, Morselli PL, Bartholini G. The gabaergic hypothesis of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. **13** (1989) 341-351.
- Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*. **19** (1997) 687-695.
- Macdonald RL, Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **17** (1994) 569-602.
- Malcangio M, Ghelardini C, Giotti A, Malmberg-Aiello P, Bartolini A. CGP 35348, a new GABA_B antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect induced by baclofen. *Br. J. Pharmacol.* **103** (1991) 1303-1308.
- Malcangio M, Bowery NG. Gamma-aminobutyric acidB, but not gamma-aminobutyric acidA receptor activation, inhibits electrically evoked substance P-like immunoreactivity release from the rat spinal cord in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266** (1993) 1490-1496.
- Malcangio M, Bowery NG. Possible therapeutic application of GABA_B receptor agonists and antagonists. *Clin. Neuropharmacol.* **18** (1995) 285-305.
- Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol. Sci.* **17** (1996) 457-462.

- Malitschek B, Schweizer C, Keir M, Heid J, Froestl W, Mosbacher J, Kuhn R, Henley J, Joly C, Pin JP, Kaupmann K, Bettler B. The N-terminal domain of gamma-aminobutyric Acid(B) receptors is sufficient to specify agonist and antagonist binding. *Mol. Pharmacol.* **56** (1999) 448-454.
- Marais E, Klugbauer N, Hofmann F. Calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits - structure and Gabapentin binding. *Mol. Pharmacol.* **59** (2001) 1243-1248.
- Marescaux C, Vergnes M, Bernasconi R. GABA_B receptor antagonists: potential new anti-absence drugs. *J. Neural. Transm.* **35** (1992) 179-188.
- Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI. Immunohistochemical localization of GABA_B receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **405** (1999) 299-321.
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA_B receptor heterodimerization. *Neuron.* **27** (2000) 97-106.
- Marshall FH, White J, Main M, Green A, Wise A. GABA_B receptors function as heterodimers. *Biochem. Soc. Trans.* **27** (1999b) 530-535.
- Martin DL, Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* **60** (1993) 395-407.
- Martin SC, Russek SJ, Farb DH. Molecular identification of the human GABA_BR2: cell surface expression and coupling to adenylyl cyclase in the absence of GABA_BR1. *Mol. Cell Neurosci.* **13** (1999) 180-191.
- Martin SC, Russek SJ, Farb DH. Human GABA_BR genomic structure: evidence for splice variants in GABA_BR1 but not GABA_BR2. *Gene.* **278** (2001) 63-79.
- Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus.* **12** (2002) 609-636.
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature.* **349** (1991) 760-765.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor $\alpha 1$ subtype. *Nat. Neurosci.* **3** (2000) 587-592.
- McNamara RK, Skelton RW. Baclofen, a selective GABA_B receptor agonist, dose-dependently impairs spatial learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **53** (1996) 303-308.
- Medd AM, Maier DL, Ding M, Fieles WE, Widzowski DV, Ekstrand J, Wood MW, Cross AJ, Mrzljak L. Distribution of GABA_BR1 and GABA_BR2 receptor proteins in the macaque monkey brain. *Society for Neuroscience Meeting Abstract* (2001) No. 706.15.
- Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* **138** (1984) 267-284.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron.* **16** (1996) 815-823.
- Miller JA, Hoffer BJ, Zahniser NR. An improved calibration procedure for computer-based quantitative autoradiography utilizing a mathematical model for the non-linear response of camera and film. *J. Neurosci. Methods.* **22** (1988) 233-238.
- Miller JA. The calibration of ³⁵S or ³²P with ¹⁴C-labeled brain paste or ¹⁴C-plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrafilm or Amersham Hyperfilm. *Neurosci. Lett.* **121** (1991) 211-214.
- Mintz IM, Bean BP. GABA_B receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron.* **10** (1993) 889-898.
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **46** (1995) 423-462.
- Mitoma H, Ishida K, Shizuka-Ikeda M, Mizusawa H. Dual impairment of GABA_A - and GABA_B-receptor-mediated synaptic responses by autoantibodies to glutamic acid decarboxylase. *J. Neurol. Sci.* **208** (2003) 51-56.
- Mizukami K, Ishikawa M, Hidaka S, Iwakiri M, Sasaki M, Iritani S. Immunohistochemical localization of GABA_B receptor in the entorhinal cortex and inferior temporal cortex of schizophrenic brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **26** (2002) 393-396.
- Mody I, DeKoninck Y, Otis TS, Soltesz I. Bridging the cleft at GABA Synapses in the brain. *Trends Neurosci.* **17** (1994) 517-525.
- Möhler H, Benke D, Benson J, Lüscher B, Rudolph U, Fritschy JM. Diversity in structure, pharmacology and regulation of GABA_A receptors. In „The GABA Receptors“, Enna SJ, Bowery NG (Eds.), Humana Press, Totowa New Jersey (1997) 2. edition, 11-36.
- Mondadori C, Jaekel J, Preiswerk G. CGP36742: the first orally active GABA_B blocker improves the cognitive performance of mice, rats and rhesus monkeys. *Behav. Neural. Biol.* **60** (1993) 62-68.
- Mondadori C, Hengerer B, Ducret T, Borkowski J. Delayed emergence of effects on memory-enhancing drugs: implications for the dynamics of long-term memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91** (1994) 2041-2045.
- Mondadori C, Moebius HJ, Borkowski J. The GABA_B receptor antagonist CGP36742 and the nootropic oxiracetam facilitate the formation of long-term memory. *Behav. Brain Res.* **77**(1996a) 223-225.
- Mondadori C, Moebius HJ, Zingg M. CGP36742, an orally active GABA_B receptor antagonist, facilitates memory in a social recognition test in rats. *Behav. Brain Res.* **77** (1996b) 227-229.
- Monteleone P, Maj M, Iovino M, Steardo L. GABA, depression and the mechanism of action of antidepressant drugs: a neuroendocrine approach. *J. Affect. Disord.* **20** (1990) 1-5.

- Morrisett RA, Lewis DV, Swartzwelder HS, Wilson WA. Antiepileptic effects of GABA_B receptor activation in area CA3 of rat hippocampus. *Brain Res.* **600** (1993) 235-242.
- Moser EI, Moser MB, Andersen P. Potentiation of dentate Synapse.s initiated by exploratory learning in rats: dissociation from brain temperature, motor activity, and arousal. *Learn. Mem.* **1** (1994) 55-73.
- Moser, EI. Altered inhibition of dentate granule cells during spatial learning in an exploration task. *J. Neurosci.* **16** (1996) 1247-1259.
- Motohashi N, Ikawa K, Kariya T. GABA_B receptors are upregulated by chronic treatment with lithium or carbamazepine. GABA hypothesis of affective disorders? *Eur. J. Pharmacol.* **166** (1989) 95-99.
- Motohashi N. GABA receptor alterations after chronic lithium administration. Comparison with carbamazepine and sodium valproate. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **16** (1992) 571-579.
- Mott DD, Bragdon AC, Lewis DV, Wilson WA. Baclofen has a proepileptic effect in the rat dentate gyrus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249** (1989) 721-725.
- Mott DD, Lewis DV. Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA_B receptors. *Science.* **252** (1991) 1718-1720.
- Munoz A, Huntsman MM, Jones EG. GABA_B receptor gene expression in monkey thalamus. *J. Comp. Neurol.* **394** (1998) 118-126.
- Nehring RB, Horikawa HPM, El Far O, Kneussel M, Brandstätter JH, Stamm S, Wischmeyer E, Betz H, Karschin A. The metabotropic GABA_B receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 35185-35191.
- Ng GY, Clark J, Coulombe N, Ethier N, Hebert TE, Sullivan R, Kargman S, Chateaufneuf A, Tsukamoto N, McDonald T, Whiting P, Mezey E, Johnson MP, Liu Q, Kolakowski LF Jr, Evans JF, Bonner TI, O'Neill GP. Identification of a GABA_B receptor subunit, gb2, required for functional GABA_B receptor activity. *J. Biol. Chem.* **274** (1999a) 7607-7610.
- Ng GY, McDonald T, Bonnert T, Rigby M, Heavens R, Whiting P, Chateaufneuf A, Coulombe N, Kargman S, Caskey T, Evans J, O'Neill GP, Liu Q. Cloning of a novel G-protein-coupled receptor GPR 51 resembling GABA_B receptors expressed predominantly in nervous tissues and mapped proximal to the hereditary sensory neuropathy type 1 locus on chromosome 9. *Genomics.* **56** (1999b) 288-295.
- Ng GY, Bertrand S, Sullivan R, Ethier N, Wang J, Yergey J, Belley M, Trimble L, Bateman K, Alder L, Smith A, McKernan R, Metters K, O'Neill GP, Lacaille JC, Hebert TE. Gamma-aminobutyric acid type B receptors with specific heterodimer composition and postsynaptic actions in hippocampal neurons are targets of anticonvulsant gabapentin action. *Mol. Pharmacol.* **59** (2001) 144-152.
- Nicholson GA, Dawkins JL, Blair IP, Kennerson ML, Gordon MJ, Cherryson AK, Nash J, Bananis T. The gene for hereditary sensory neuropathy type I (HSN-I) maps to chromosome 9q22.1-q22.3. *Nat. Genet.* **13** (1996) 101-104.
- Nisenbaum ES, Berger TW, Grace AA. Depression of glutamatergic and GABAergic synaptic responses in striatal spiny neurons by stimulation of presynaptic GABA_B receptors. *Synapse.* **14** (1993) 221-242.
- Ochs G, Struppler A, Meyerson BA, Linderoth G, Gybels J, Gardner BP, Teddy P, Jamous A, Weinmann P. Intrathecal baclofen for long-term treatment of spasticity: a multi-centre study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **52** (1989) 933-939.
- Ochs G, Naumann C, Dimitrijevic M, Sindou M. Intrathecal baclofen therapy for spinal origin spasticity: spinal cord injury, spinal cord disease and multiple sclerosis. *Neuromodulation.* **2** (1999) 108-119.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **23** (2000) S8-19.
- Olpe HR, Woerner W, Ferrat T. Stimulation parameter determine role of GABA_B receptors in long-term potentiation. *Experientia.* **49** (1993) 542-546.
- Orsnes G, Crone C, Krarup C, Petersen N, Nielsen J. The effect of baclofen on the transmission in spinal pathways in spastic multiple sclerosis patients. *Clin. Neurophysiol.* **111** (2000) 1372-1379.
- Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* **3** (2002) 715-727.
- Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prezeau L, Blahos J, Pin J, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B. C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA_B receptors. *J. Neurosci.* **21** (2001) 1189-1202.
- Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* **20** (1995a) 91-127.
- Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res. Rev.* **20** (1995b) 128-154.
- Patel S, Naeem S, Kesingland A, Froestl W, Capogna M, Urban L, Fox A. The effects of GABA_B agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Pain.* **90** (2001) 217-226.
- Petri S, Krampfl K, Dengler R, Bufler J, Weindl A, Arzberger T. Human GABA_A receptors on dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra. *J. Comp. Neurol.* **452** (2002) 360-366.
- Pfaff T, Malitschek B, Kaupmann K, Prezeau L, Pin JP, Bettler B, Karschin A. Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA_BR1 receptor. *Eur. J. Neurosci.* **11** (1999) 2874-2882.
- Phelan KD. N-Ethylmaleimide selectively blocks presynaptic GABA_B autoreceptor but not heteroreceptor-mediated inhibition in adult rat striatal slices. *Brain Res.* **847** (1999) 308-313.
- Pinal CS, Cortessis V, Tobin AJ. Multiple elements regulate GAD65 transcription. *Dev. Neurosci.* **19** (1997) 465-475.

- Pitler TA, Alger BE. Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron*. **13** (1994a) 1447-1455.
- Pitler TA, Alger BE. Differences between presynaptic and postsynaptic GABA_B mechanisms in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* **72** (1994b) 2317-2327.
- Platzer S, Winkler A, Schadrack J, Dworzak D, Tölle TR, Zieglgänsberger W, Spanagel R. Autoradiographic distribution of μ -, δ - and κ 1-opioid stimulated [³⁵S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in human frontal cortex and cerebellum. *Neurosci. Lett.* **283** (2000) 213-216.
- Platzer S, Berthele A, Conrad B, Tölle TR. Gabapentin ist kein Agonist an G_{16o}-Protein gekoppelten Rezeptoren im Gehirn der Ratte. *Akt. Neurol.* **29** (2002) S115.
- Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM. Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory Synapse.s. *Neuron*. **18** (1997) 463-472.
- Poorkhalkali N, Juneblad K, Jönsson AC, Lindberg M, Karlsson O, Wallbrandt P, Ekstrand J, Lehmann A. Immunocytochemical distribution of the GABA_B receptor splice variants GABA_BR1a and R1b in the rat CNS and dorsal root ganglia. *Anat. Embryol.* **201** (2000) 1-13.
- Post RM, Ketter TA, Joffe RT, Kramlinger KL. Lack of beneficial effects of l-baclofen in affective disorder. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **6** (1991) 197-207.
- Princivalle AP, Duncan JS, Thom M, Bowery NG. Studies of GABA_B receptors labelled with [³H]-CGP62349 in hippocampus resected from patients with temporal lobe epilepsy. *Br. J. Pharmacol.* **136** (2002) 1099-1106.
- Princivalle AP, Richards DA, Duncan JS, Spreafico R, Bowery NG. Modification of GABA_(B1) and GABA_(B2) receptor subunits in the somatosensory cerebral cortex and thalamus of rats with absence seizures (GAERS). *Epilepsy Res.* **55** (2003) 39-51.
- Prosser HM, Gill CH, Hirst WD, Grau E, Robbins M, Calver A, Soffin EM, Farmer CE, Lanneau C, Gray J, Schenck E, Warmerdam BS, Clapham C, Reavill C, Rogers DC, Stean T, Upton N, Humphreys K, Randall A, Geppert M, Davies CH, Pangalos MN. Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA_{B1}-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* **10** (2001) 1-10.
- Raiteri M, Bonanno G, Gemignani A, Pende M, Vellebuona F, Lanza M. Pharmacologically distinct GABA_B receptor subtypes modulate neurotransmitter release in the rat brain cortex. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **47** (1992) 205-216.
- Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 19536-19547.
- Richards DA, Lemos T, Whitton PS, Bowery NG. Extracellular GABA in the ventrolateral thalamus of rats exhibiting spontaneous absence epilepsy: a microdialysis study. *J. Neurochem.* **65** (1995) 1674-1680.
- Roberts DCS, Andrews MM. Baclofen suppression of cocaine self-administration: demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology.* **131** (1997) 271-277.
- Rodriguez-Puertas R, Gonzalez-Maeso J, Meana JJ, Pazos A. Autoradiography of receptor-activated G-proteins in post mortem human brain. *Neuroscience.* **96** (2000) 169-180.
- Rosenbaum DM, Grotta JC, Pettigrew LC, Ostrow P, Strong R, Rhoades H, Picone CM, Grotta AT. Baclofen does not protect against cerebral ischemia in rats. *Stroke.* **21** (1990) 138-140.
- Saha N, Chugh Y, Sankaranaryanan A, Sharma PL. Effects of post-training administration of (-)-baclofen and chlordiazepoxide on memory retention in ICRC Swiss mice: interactions with GABA_A and GABA_B receptor antagonists. *Pharmacol. Toxicol.* **72** (1993) 159-162.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. „Molecular cloning: a laboratory manual“. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989) 2. ed.: 5.68-5.72, 11.28, B13.
- Sander T, Peters C, Kammer G, Samochowiec J, Zirra M, Mischke D, Ziegler A, Kaupmann K, Bettler B, Epplen JT, Riess O. Association analysis of exonic variants of the gene encoding the GABA_B receptor and idiopathic generalized epilepsy. *Am. J. Med. Genet.* **88** (1999) 305-310.
- Schadrack J, Willoch F, Platzer S, Bartenstein P, Mahal B, Dworzak D, Wester HJ, Zieglgänsberger W, Tölle TR. Opioid receptors in the human cerebellum: evidence from [¹¹C]diprenorphine PET, mRNA expression and autoradiography. *NeuroReport.* **10** (1999) 619-624.
- Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Spooren W, Jatou AL, Vigouret J, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Kaslin E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H, Bettler B. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory and loss of pre- and postsynaptic GABA_B responses in mice lacking GABA_{B1}. *Neuron.* **31** (2001) 47-58.
- Schwarz DA, Barry G, Eliasof SD, Petroski RE, Conlon PJ, Maki RA. Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABA_{B1c}, a GABA_{B1} splice variant encoding a truncated receptor. *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 32174-32181.
- Seabrook GR, Howson W, Lacey MG. Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABA_B receptors in rat brain slices. *Br. J. Pharmacol.* **101** (1990) 949-957.
- Shafizadeh M, Semnani S, Zarrindast MR, Hashemi B. Involvement of GABA_B receptors in the antinociception induced by baclofen in the formalin test. *Gen. Pharmacol.* **28** (1997) 611-615.
- Sharma AC, Kulkarni SK. (-)Baclofen sensitive scopolamine-induced short-term memory deficits in mice. *Indian J. Exp. Biol.* **31** (1993) 348-352.

- Shoaib M, Swanner LS, Beyer CE, Goldberg SR, Schindler CW. The GABA_B agonist baclofen modifies cocaine self-administration in rats. *Behav. Pharmacol.* **9** (1998) 195-206.
- Sieghart W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* **47** (1995) 181-234.
- Sim LJ, Selley DE, Childers SR. In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-³⁵S]thio]-triphosphate binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (1995) 7242-7246.
- Sim LJ, Selley DE, Childers SR. Autoradiographic visualization in brain of receptor-G protein coupling using [³⁵S]GTPγS binding. *Methods Mol. Biol.* **83** (1997) 117-132.
- Slesinger PA, Stoffel M, Jan YN, Jan LY. Defective gamma-aminobutyric acid type B receptor-activated inwardly rectifying K⁺ currents in cerebellar granule cells isolated from weaver and Girk2 null mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** (1997) 12210-12217.
- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL. Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **373** (1996) 593-618.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* **86** (1998) 353-387.
- Snead OC. Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann. Neurol.* **37** (1995) 146-157.
- Snead OC. Relation of the [³H] gamma-hydroxybutyric acid (GHB) binding site to the gamma-aminobutyric acidB (GABA_B). *Biochem. Pharmacol.* **52** (1996a) 1235-1243.
- Snead OC. Presynaptic GABA_B- and gamma-hydroxybutyric acid-mediated mechanisms in generalized absence seizures. *Neuropharmacology.* **35** (1996b) 359-367.
- Snead OC, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. Absence epilepsy: advances in experimental animal models. In „Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies“. Delgado-Escueta AV, Wilson W, Olsen RW, Porter RJ (Eds.). Raven Press, New York (1999) 3. edition, 253-278.
- Staak R, Pape HC. Contribution of GABA_A and GABA_B receptors to thalamic neuronal activity during spontaneous absence seizures in rats. *J. Neurosci.* **21** (2001) 1378-1384.
- Stackman RW, Walsh TJ. Baclofen produces dose-related working memory impairments after intraseptal injection. *Behav. Neural. Biol.* **61** (1994) 181-185.
- Stäubli U, Scafidi J, Chun D. GABA_B receptor antagonism: facilitatory effects on memory parallel those on LTP induced by TBS but not HFS. *J. Neurosci.* **19** (1999) 4609-4615.
- Sutor B, Luhmann HJ. Involvement of GABA_B receptors in convulsant-induced epileptiform activity in rat neocortex in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **10** (1998) 3417-3427.
- Suzdak PD, Gianutsos G. GABAergic effects of reserpine following chronic treatment. *Psychopharmacology.* **87** (1985) 157-160.
- Suzdak PD, Gianutsos G. Effect of chronic imipramine or baclofen on GABA_B binding and cyclic AMP production in cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **131** (1986) 129-133.
- Swartzwelder HS, Tilson HA, McLamb RL, Wilson WA. Baclofen disrupts passive avoidance retention in rats. *Psychopharmacology.* **92** (1987) 398-401.
- Szabo G, Katarova Z, Kortvely E, Greenspan RJ, Urban Z. Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67-kD form of glutamic acid decarboxylase. *DNA Cell Biol.* **15** (1996) 1081-1091.
- Takenoshita H, Shizuka-Ikeda M, Mitoma H, Song S, Harigaya Y, Igeta Y, Yaguchi M, Ishida K, Shoji M, Tanaka M, Mizusawa H, Okamoto K. Presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission by glutamate decarboxylase autoantibodies in progressive cerebellar ataxia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **70** (2001) 386-389.
- Tamas G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J. Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science.* **299** (2003) 1902-1905.
- Tamura T, Konishi Y, Makino Y, Mikoshiba K. Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression. *Neurochem. Int.* **29** (1996) 573-581.
- Taylor J, Gordon-Weeks PR. Calcium-independent γ-aminobutyric acid release from growth cones: role of γ-aminobutyric acid transport. *J. Neurochem.* **56** (1991) 273-280.
- Terrence CF, Fromm GH, Roussan MS. Baclofen. Its effect on seizure frequency. *Arch. Neurol.* **40** (1983) 28-29.
- Than M, Szabo B. Analysis of the function of GABA_B receptors on inhibitory afferent neurons of Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *Eur. J. Neurosci.* **15** (2002) 1575-1584.
- Traynor JR, Nahorski SR. Modulation by μ-opioid agonists of guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* **47** (1995) 848-854.
- Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia.* **42 Suppl 3** (2001) 8-12.
- Tsubokawa H, Ross WN. IPSPs modulate spike backpropagation and associated [Ca²⁺]_i changes in the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **76** (1996) 2896-2906.
- Ulrich D, Huguenard JR. Gamma-aminobutyric acid type B receptor-dependent burst-firing in thalamic neurons: a dynamic clamp study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** (1996a) 13245-13249.
- Ulrich D, Huguenard JR. GABA_B receptor-mediated responses in GABAergic projection neurones of rat nucleus reticularis thalami in vitro. *J. Physiol.* **493** (1996b) 845-854.

- Urwyler S, Pozza MF, Lingenhoehl K, Mosbacher J, Lampert C, Froestl W, Koller M, Kaupmann K. N,N'-Dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine (GS39783) and structurally related compounds: novel allosteric enhancers of gamma-aminobutyric acid B receptor function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307** (2003) 322-30.
- Vergnes M, Boehrer A, Simler S, Bernasconi R, Marescaux C. Opposite effects of GABA_B receptor antagonists on absences and convulsive seizures. *Eur. J. Pharmacol.* **332** (1997) 245-255.
- Vizi ES, Kiss SP. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and non-synaptic interactions. *Hippocampus.* **8** (1998) 566-607.
- Vischer N. *Object-Image 2.10* (Software und Dokumentation). Online unter <http://simon.bio.uva.nl/www/object-image.html> (2002).
- Volk DW, Austin MC, Pierri JN, Sampson AR, Lewis DA. Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* **57** (2000) 237-245.
- Voogd J, Feirabend HKP, Schoen JHR. Cerebellum and precerebellar nuclei. In „*The human nervous system*“. Paxinos G (Ed.). Academic Press, New York (1990) 1. edition: 321-387.
- Wafford KA, Burnett DM, Leidenheimer NJ, Burt DR, Wang JB, Kofuji P, Dunwiddie TV, Harris RA, Sikela JM. Ethanol sensitivity of the GABA_A receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit. *Neuron.* **7** (1991) 27-33.
- Waldvogel HJ, Kubota Y, Fritschy J, Mohler H, Faull RL. Regional and cellular localisation of GABA_A receptor subunits in the human basal ganglia: An autoradiographic and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* **415** (1999) 313-340.
- Warren RA, Golshani P, Jones EG. GABA_B-receptor-mediated inhibition in developing mouse ventral posterior thalamic nucleus. *J. Neurophysiol.* **78** (1997) 550-553.
- Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* **213** (2002) 1-47.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature.* **396** (1998) 679-682.
- White JH, McIlhinney RAJ, Wise A, Ciruela F, Chan WY, Emson PC, Billinton A, Marshall FH. The GABA_B receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97** (2000) 13967-13972.
- Wilson CJ. Basal ganglia. In „*The synaptic organisation of the brain*“. Shepherd GM (Ed.). Oxford University Press, New York (1990) 3. edition, 279-316.
- Winterer G, Smolka M, Samochowiec J, Ziller M, Mahlberg R, Gallinat J, Rommelspacher HP, Herrmann WM, Sander T. Association of EEG coherence and an exonic GABA_BR1 gene polymorphism. *Am. J. Med. Genet.* **117B** (2003) 51-56.
- Wisden W, Morris BJ. In situ hybridization with oligonucleotide probes. *Int. Rev. Neurobiol.* **47** (2002) 3-59.
- Wojcik WJ, Neff NH. Gamma-aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol. Pharmacol.* **25** (1984) 24-28.
- Wu LG, Saggau P. GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca²⁺ influx. *J. Physiol.* **485** (1995) 649-657.
- Xi ZX, Stein EA. Baclofen inhibits heroin self-administration behavior and mesolimbic dopamine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290** (1999) 1369-1374.
- Xie X, Smart TG. Gamma-hydroxybutyrate hyperpolarizes hippocampal neurones by activating GABA_B receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **212** (1992) 291-294.
- Yaksh TL, Reddy SV. Studies in the primate on the analgetic effects associated with intrathecal actions of opiates, alpha-adrenergic agonists and baclofen. *Anesthesiology.* **54** (1981) 451-467.
- Yanagawa Y, Kobayashi T, Kamei T, Ishii K, Nishijima M, Takaku A, Tamura S. Structure and alternative promoters of the mouse glutamic acid decarboxylase 67 gene. *Biochem. J.* **326** (1997) 573-578.
- Yung KK, Ng TK, Wong CK. Subpopulations of neurons in the rat neostriatum display GABA_BR1 receptor immunoreactivity. *Brain Res.* **830** (1999) 345-352.
- Zhang J, Shen W, Slaughter MM. Two metabotropic gamma-aminobutyric acid receptors differentially modulate calcium currents in retinal ganglion cells. *J. Gen. Physiol.* **110** (1997) 45-58.

Danksagung:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Tölle für die Überlassung des Themas und die umfassende Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Conrad möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Für die hervorragende Betreuung und Anleitung sowie die stete Bereitschaft zur Diskussion zu methodischen und wissenschaftlichen Fragestellungen schulde ich Herrn Dr. Berthele großen Dank.

Für die technische Assistenz bei den Laborarbeiten möchte ich mich bei Frau Nathmann ganz herzlich bedanken.

Im Besonderen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken die mir Ausbildung, Studium und diese Promotion erst ermöglicht haben.