



Doctoral Thesis

Electrophysiological and pharmacological properties of recombinant GABAA receptors expressed in mammalian cells

Author(s):

Knoflach, Frédéric

Publication Date:

1993

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000888397> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

24. Mai 1993

Thesis ETH Zurich N^o 10100

**Electrophysiological and Pharmacological
Properties of Recombinant GABA_A
Receptors Expressed in Mammalian Cells**

A dissertation submitted to the
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF
TECHNOLOGY ZURICH**
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
FRÉDÉRIC KNOFLACH
Dipl. Elec. Eng. ETH Zurich
born June 7th, 1960
citizen of France and Austria

Accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. Hanns Möhler, examiner
PD Dr. Erwin Sigel, co-examiner

1993



D. Summary

GABA_A receptors mediate inhibitory signals in the central nervous system and are the targets of therapeutically important drugs acting mainly at the benzodiazepine receptor. The extensive heterogeneity of GABA_A receptors that arises from the existence of at least 5 classes of subunits in the brain (α , β , γ , δ , ρ) may contribute to functional differences among receptor subtypes. Receptor heterogeneity is not only considered to provide flexibility in GABA-ergic synaptic transmission in different neuronal circuits but may also lead to the development of benzodiazepine receptor ligands with novel profiles of action.

To analyze the biophysical and pharmacological variability arising from different subunit combinations, an electrophysiological investigation was carried out on recombinant GABA_A receptor subtypes. The cDNAs coding for subunits of the GABA_A receptor of rat brain were expressed in a human embryonic kidney cell line ("293-cells"). Membrane currents were measured using the whole-cell and the outside-out configuration of the patch-clamp technique.

When triple subunit cDNA combinations differing in the type of α and β subunit ($\alpha 3\beta 1\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 5\beta 2\gamma 2$) were transfected into the cells, clear differences were found in the GABA sensitivity of the receptors expressed. These differences were quantified by the GABA concentration eliciting a half maximum current response (EC₅₀) and the Hill coefficient (H) of the GABA dose-response curves. The presence of the $\alpha 5$ subunit conferred a higher GABA sensitivity and cooperativity of GABA in gating the channel as compared to subunit combinations containing the $\alpha 3$ subunit. Receptors containing the $\beta 2$ subunit were slightly more sensitive to GABA than the receptors containing the $\beta 1$ subunit.

The replacement of the $\gamma 2$ subunit cDNA by the $\gamma 3$ subunit cDNA in the $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ combination did not change the EC_{50} and the Hill coefficient.

When single channel currents were recorded from the subunit cDNA combinations $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 5\beta 2\gamma 2$, no differences among the subunit combinations were found. The main conductance state was approximately 26 pS, which corresponds to the value determined in neurons. In addition, no rectification of the I/V relationship was found.

The GABA-induced whole-cell currents were modulated by both full and inverse agonists of the benzodiazepine receptor in a flumazenil-sensitive manner in cells transfected with all subunit cDNA combinations tested, provided they contained the $\gamma 2$ subunit cDNA ($\alpha 3\beta 1\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 5\beta 2\gamma 2$). However, the responsiveness to the ligands differed significantly among the different subunit combinations. In addition, it was shown for the first time that the $\gamma 3$ subunit also confers sensitivity to benzodiazepine receptor ligands when co-expressed with an α and a β subunit as exemplified for the $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ subunit combination.

To test whether benzodiazepine receptor ligands display partial agonism among receptor subtypes, the maximum potentiation of the GABA response by the novel benzodiazepine receptor ligands abecarnil, bretazenil and divaplon was determined and compared to that of the full agonist flunitrazepam. In the $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ combination, flunitrazepam and abecarnil displayed no significant difference in the maximum of the GABA potentiation, while bretazenil and divaplon displayed a significantly reduced potentiation compared to flunitrazepam. In contrast, in the $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ combination, not only bretazenil and divaplon, but also abecarnil was significantly less efficacious than flunitrazepam. These results demonstrate that bretazenil and divaplon act as partial agonists on both

subunit combinations. However, the intrinsic activity of abecarnil appears to depend on the receptor subtype. Thus, subtype-specific variation in intrinsic activity is a novel feature which has to be considered in determining the profile of drug actions elicited at benzodiazepine receptors.

E. Zusammenfassung

GABA_A-Rezeptoren vermitteln inhibitorische Signale im zentralen Nervensystem und sind die therapeutischen Zielstrukturen für Pharmaka, die am Benzodiazepin-Rezeptor wirken. Die strukturelle Heterogenität des GABA_A-Rezeptors, welche sich aus der Existenz von fünf Gruppen von Untereinheiten herleitet (α , β , γ , δ und ρ), führt zu funktionellen Unterschieden zwischen verschiedenen Rezeptor-Subtypen. Die Rezeptor-Heterogenität kann nicht nur zur Flexibilität des Signals bei der GABAergen synaptische Transmission beitragen, sondern auch zur Entwicklung neuer Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden mit neuen Wirkungsprofilen führen.

Um die biophysikalische und pharmakologische Variabilität, die durch verschiedene Untereinheiten entsteht zu erfassen, wurde eine elektrophysiologische Studie an rekombinierten GABA_A-Rezeptor-Subtypen durchgeführt. Die cDNAs, die für Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors kodieren, wurden in einer menschlichen embryonalen Nieren-Zell-Linie ("293-Zellen") exprimiert. Membran-Ströme wurden mittels der whole-cell- und der outside-out-Konfiguration der patch-clamp-Technik gemessen.

Wenn cDNAs von drei Untereinheiten, die sich im Typ von α - und β -Untereinheit unterschieden ($\alpha 3\beta 1\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 5\beta 2\gamma 2$) in die Zellen transfiziert wurden, wiesen die exprimierten Rezeptoren klare Unterschiede in der Empfindlichkeit zu GABA auf. Diese Unterschiede wurden aus Dosis-Wirkungs-Kurven durch die Konzentration von GABA, die einen halb-maximalen Strom erzeugt (EC₅₀) und dem Hill-Koeffizient (H) quantitativ erfasst. Die $\alpha 5$ -Untereinheit vermittelte eine höhere GABA-Empfindlichkeit verglichen mit Kombinationen, die die $\alpha 3$ -Untereinheit

enthielten. Rezeptoren, die die $\beta 2$ -Untereinheit enthielten, waren empfindlicher gegenüber GABA, als Rezeptoren, die die $\beta 1$ Untereinheit enthielten. Die $\gamma 2$ Untereinheit konnte durch die $\gamma 3$ Untereinheit ersetzt werden, ohne Änderung der EC_{50} -Werte und der Hill-Koeffizienten.

Die Einzelkanäle, die von den Untereinheiten-Kombinationen $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ stammten, zeigten keine Unterschiede in ihren Eigenschaften. Das Hauptleitfähigkeits-Niveau betrug ungefähr 26 pS. Dies entspricht dem Hauptleitfähigkeits-Niveau, das in Neuronen gemessen wurde. Zudem war die Strom/Spannungskennlinie der Einzelkanäle linear.

Die GABA-induzierten Ströme wurden von vollen und inversen Agonisten des Benzodiazepin-Rezeptors in einer Flumazenil-sensitiven Art moduliert, sofern die Untereinheits-Kombinationen die $\gamma 2$ -Untereinheit enthielten ($\alpha 3\beta 1\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ und $\alpha 5\beta 2\gamma 2$). Der Ausmass der Modulation war stark vom Typ der Untereinheits-Kombination abhängig. Zusätzlich, wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die $\gamma 3$ -Untereinheit eine Sensitivität gegenüber Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden verleiht, wenn Sie mit einer α - und einer β -Untereinheit ko-exprimiert ist, wie an der Kombination $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ gezeigt wurde.

Um abzuklären, ob die Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden partiellen Agonismus in Abhängigkeit von der Untereinheitsstruktur von Rezeptoren zeigen, wurde die maximale Potenzierung der GABA-Antwort von den neuen Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden Abecarnil, Bretazenil und Divaplon gemessen und mit derjenigen des vollen Agonisten Flunitrazepam verglichen. In der $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ Kombination zeigten Flunitrazepam und Abecarnil keinen Unterschied in der maximalen GABA Potenzierung, während Bretazenil und Divaplon eine signifikant reduzierte maximale Potenzierung auslösten. Im Gegensatz dazu war Abecarnil signi-

fikant weniger wirksam als Flunitrazepam in der $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ Untereinheits-Kombination. Diese Resultate zeigen, dass Bretazenil und Divaplon an allen getesteten Untereinheits-Kombinationen als Partial-Agonisten wirken. Im Gegensatz dazu ist die intrinsische Aktivität von Abecarnil vom Rezeptor-Subtyp abhängig. Die Subtyp-Abhängigkeit der intrinsischen Aktivität ist ein neues Merkmal, das für das Wirkungsprofil von Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden von pharmakologischer und therapeutischer Bedeutung ist.