

Den røde fluesvamp i medicinalkemisk og klinisk belysning

Et mangeårigt projekt om »tæmning« af giftstoffet muscimol fra rød fluesvamp til forbindelsen THIP har givet nye spændende resultater. Kliniske forsøg med forbindelsen viser en helt ny farmakologisk profil, en ny type sovemiddel, som forbedrer søvnens kvalitet. Dyreforsøg har vist, at stoffet hverken skaber afhængighed eller medfører abstinenser, og nye forsøg med ældre mennesker tegner lovende

Af Povl Krosgaard-Larsen (ano@dfh.dk), Lotte Brehm, Tommy Liljefors, Institut for Medicinalkemi, Danmarks Farmaceutiske Højskole og Bjarke Ebert, Molekylærfarmakologisk Afdeling, H. Lundbeck A/S



Figur 1. Den røde fluesvamp, *Amanita muscaria* (Foto Per Mølgaard).

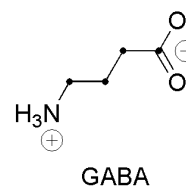
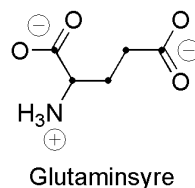
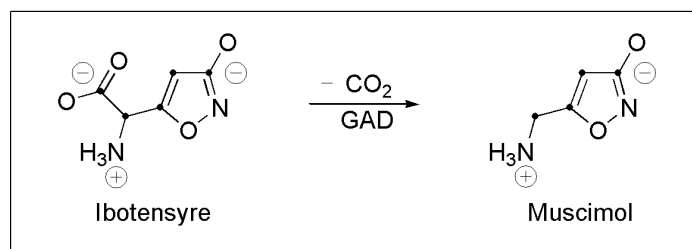
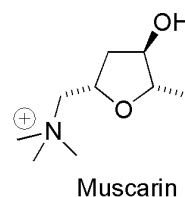
Den røde fluesvamp (figur 1) indeholder forbindelser som er toksiske i dyr og mennesker [1,2]. Toksiciteten afspejler, at de pågældende stoffer påvirker fysiologiske mekanismer, som er af vital betydning. Fluesvampen syntetiserer flere strukturelt særegne stoffer, hvoraf nogle påvirker det perifere nervesystem, mens andre udøver deres effekt på det centrale nervesystem (hjernen og rygmargen).

Muscarin

Muscarin er en muscarin-agonist, hvilket betyder, at det kan aktivere den undergruppe af receptorer for signalstoffet acetylcholin, der betegnes muscarine receptorer. Muscarin indeholder en kvarternær ammoniumgruppe (figur 2) og kan derfor ikke trænge gennem den lipofile blod-hjerne-barriere. Muscarin aktiverer således kun de muscarine receptorer i det perifere nervesystem, bl.a. i hjertemuskulaturen. Det er primært denne effekt, der ligger til grund for alvorlige forgiftninger, evt. med dødeligt forløb som følge af indtagelse af større mængder af tørret fluesvamp.

Ibotensyre

Den røde fluesvamp biosyntetiserer også aminosyren ibotensyre, som indeholder en 3-hydroxyisoxazolgruppe. Hydroxygruppen på isoxazolringen har karakter af omtrent samme styrke som en carboxylgruppe. Ibotensyre er en strukturanalog af glutaminsyre med 3-hydroxyisoxazolgruppen som en bioisoster af glutaminsyrens terminale carboxylgruppe (figur 2). En bioisoster er en gruppe/forbindelse, der har lignende biologiske egenskaber, som den gruppe/forbindelse



Figur 2. De vigtigste farmakologisk aktive indholdsstoffer i den røde fluesvamp er muscarin, ibotensyre og muscimol. Figuren illustrerer den strukturelle lighed mellem ibotensyre og muscimol og hjernens signalstoffer glutaminsyre og GABA.

den erstatter. Ibotensyre er i stand til at aktivere receptorerne for signalstoffet glutaminsyre.

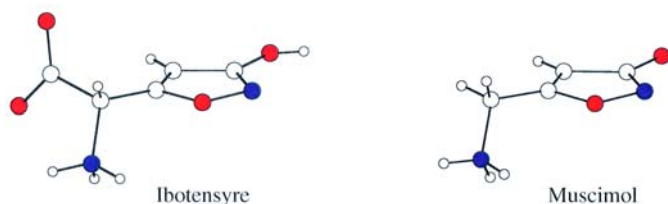
Den tørrede fluesvamp indeholder også forbindelsen muscimol, som er en bioisoster af signalstoffet GABA (figur 2). Svampen biosyntetiserer ikke muscimol; men under tørringsprocessen sker en decarboxylering af ibotensyre. I de områder i verden, hvor fluesvampen anvendes som rusmiddel, er det den tørrede svamp, der indtages. Effekten på centralnervesystemet skyldes primært indholdet af muscimol. De forvirringstilstande (og efter indtagelse af større mængder tørret svamp psykotiske forstyrrelser), der karakteriserer rusen skyldes, at muscimol meget kraftigt aktiverer hjernens receptorer for signalstoffet GABA.

Ibotensyre er bl.a. toksisk over for fluer. Det er næppe

ibotensyren selv, der dræber fluerne, da flere analoger af glutaminsyre, som påvirker glutaminsyre-receptorerne endnu kraftigere end ibotensyre, ikke er toksiske over for fluer. Alle dyrearter indeholder receptorer for GABA, og den toksiske effekt skyldes efter al sandsynlighed, at ibotensyre i dyrene decarboxylerer under dannelse af muscimol, som påvirker GABA-receptorerne. Decarboxyleringen af ibotensyre katalyseres af enzymet GAD (figur 2), som i alle organismer katalyserer dannelsen af GABA ud fra glutaminsyre. Meget tyder altså på, at fluesvampen har fundet det hensigtsmæssigt at danne ibotensyre som »prodrug« af muscimol som forsvar mod forskellige dyrearter. Ibotensyre udgør endvidere en strukturel komponent af svampens røde farvestof.

Strukturen af ibotensyre og muscimol er enestående. Som naturstoffer er der ikke isoleret andre aminosyreanaloger, der indeholder 3-hydroxyisoxazol-ringstrukturen.

Hvorfra ved vi nu med sikkerhed, at disse toksiske, men farmakologisk interessante stoffer har de viste strukturer? Det er naturligvis vigtigt at få besvaret dette spørgsmål, før der igangsættes medicinskemiske projekter. Stoffernes strukturer er blevet entydigt bestemt ved røntgenkrystallografiske strukturbestemmelser. Molekylerne vil normalt have lav-energi konformationer i krystallerne; men de kan meget vel antage andre konformationer, når de binder til receptorer og biologiske systemer. Figur 3 viser strukturen af ibotensyre og muscimol som amfoioner bestemt ved røntgenkrystallografiske strukturbestemmelser [3,4].

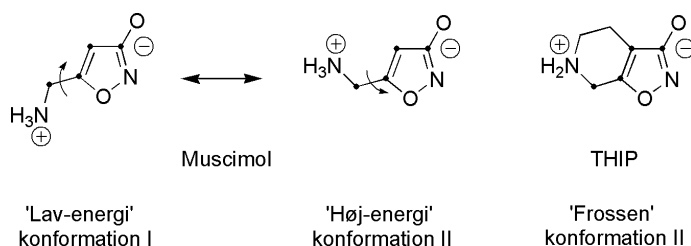


Figur 3. Strukturen af ibotensyre-amfoion og muscimol-amfoion, som entydigt er fastlagt ved røntgenkrystallografiske strukturbestemmelser.

Muscimol som medicinskemisk modelstof [2]

Muscimol har en kraftigt aktiverende effekt på hjernens GABA-receptorer. Det er som GABA-agonist væsentligt mere effektivt end GABA selv, og toksiciteten skyldes sandsynligvis, at det bindes for kraftigt til GABA-receptorerne og dermed på en måde »sætter dem ud af spillet«. Toksiciteten kan også til dels afspejle, at muscimol metaboliseres i hjernen og påvirker andre funktioner i GABA-signalsystemet.

Ikke desto mindre er muscimol et interessant medicinskemisk modelstof til udvikling af lægemidler til behandling af sygdomme, som involverer GABA-systemet. Spørgsmålet er, om vi vil være i stand til at »tæmme« dets effekt og omdanne dette særegne stof til et lægemiddel med en ønsket kontrolleret virkning.



Figur 4. En illustration af to konformationer af muscimol I og II samt strukturen af THIP, som afspejler en »høj-energi« konformation af muscimol.

Hypotese

I den første fase af projektet blev der opstillet en hypotese om

stoffets kraftige GABA-agonist-effekt. Hypotesen er illustreret skematisk i figur 4. Muscimol har pga. det indbyggede ring-system en langt mere fastlåst struktur end GABA, idet der kun er drejelighed af molekylets sidekæde. Selv om den viste konformation I, som muscimol antager i fast fase (figur 3), har lav energi, forestillede vi os, at muscimol ikke nødvendigvis bindes til receptoren i konformation I, men måske i konformation II, som har højere energi og derfor er mindre favorabel. Ifølge hypotesen ville muscimol ved en trinvis binding tilpasse sig receptoren. Først bindes muscimol f.eks. via ammoniumgruppen til receptoren, herefter sker der en konformationsændring fra den mere stabile konformation I til den mindre favorable konformation II. Efter bindingen til receptoren forestillede vi os, at muscimol-molekylet vha. receptoren igen ville ændre konformation fra II henimod den mere stabile konformation I, og at den herved frigjorte energi var tilstrækkelig til at aktivere receptoren.

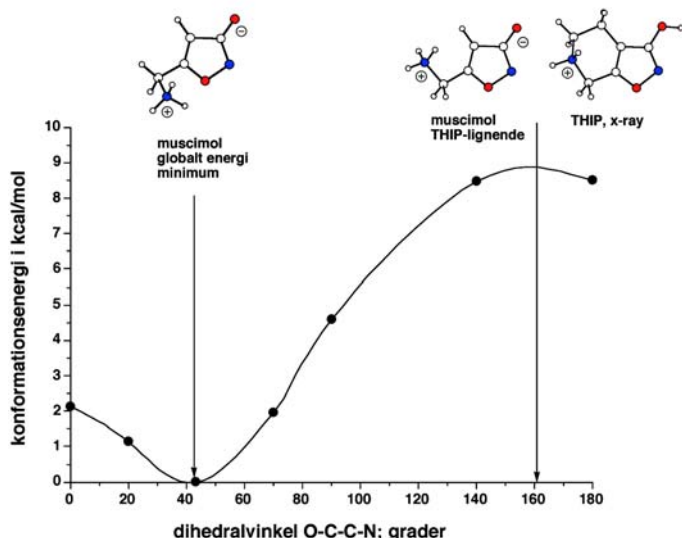
For at underbygge hypotesen blev THIP (figur 4) syntetiseret som modelstof [5]. Her er muscimol fastlåst i den ufavorable konformation II. Pga. den fastlåste konformation ville THIP nok kunne bindes til receptoren, men måske ikke være i stand til at aktivere receptoren.

Det blev vist, at THIP binder næsten lige så effektivt til GABA-receptoren som muscimol. Men til vores overraskelse viste det sig, at THIP også i høj grad var i stand til at aktivere receptoren [6]. Det betød, at den del af hypotesen, der vedrørte aktiveringsmekanismen for GABA-receptoren, var forkert. Det kan ikke kun være den energi, der frigøres ved muscimol-molekylets ændring fra konformation II til I, der aktiverer receptoren. Hvilken mekanisme, der aktiverer GABA-receptoren, er i dag, mange år senere, fortsat uafklaret.

»The right compound for the wrong reason«

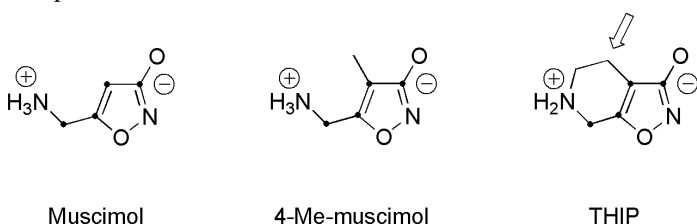
Det skulle vise sig, at vi havde fået »the right compound for the wrong reason«. Gennem flere års studier er det blevet klarlagt, at THIP i modsætning til muscimol er en specifik GABA_A-agonist. Mere præcist aktiverer THIP den undergruppe af GABA-receptorerne, der betegnes GABA_A. Det var lykkedes at »tømme« muscimol, og efter omfattende studier af THIP tonede konturerne af et nyt lægemiddelstof frem.

3D-farmakoformodel for GABA_A-agonister



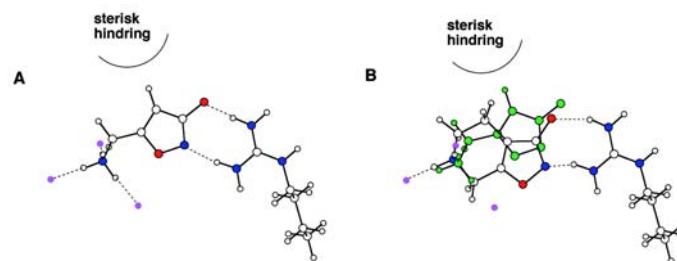
Figur 5. Energikurve for muscimol. Molekylets relative konformationsenergi afbildet som funktion af rotation af sidekæden (O-C-C-N⁺). Desuden er illustreret to beregnede konformationer af muscimol hhv. i det globale energiminimum og i THIP-lignende konformation (angivet ved pile). Røntgenstrukturen af THIP-kation er vist til sammenligning.

I de tidlige studier af sammenhængen mellem kemisk struktur og biologisk aktivitet af GABA_A-agonister var den grundlæggende antagelse, at 3-hydroxyisoxazol-anionerne og ammoniumgrupperne i muscimol og THIP bandt til de samme komplementære områder i GABA_A-receptoren. Antagelsen er imidlertid yderst problematisk af to grunde. For det første indikerer højniveau kvantemekaniske *ab initio* beregninger, at muscimol må antage en høj-energi konformation – 8.9 kcal over det globale minimum – for at kunne binde til receptoren på samme måde som THIP (figur 5) [3]. En så høj energi er ikke i overensstemmelse med muscimols stærke binding til GABA_A-receptoren. For det andet binder muscimol-analogen 4-methyl-muscimol stort set ikke til GABA-receptorerne (figur 6) [8]. Manglen på binding kan forklares ved en sterisk effekt (frastødende vekselvirkning) mellem 4-methylgruppen og receptoren. Hvis 3-hydroxyisoxazol-anionerne og ammoniumgrupperne i muscimol og THIP som først antaget binder til de samme områder i receptoren, vil methylgruppen i THIP markeret med en pil i figur 6 optage det samme område i receptorens bindingslomme som 4-methylgruppen i 4-methyl-muscimol. Dvs. THIP skulle ikke kunne binde sig til GABA_A-receptoren.



Figur 6. Strukturer af muscimol, 4-methyl-muscimol og THIP.

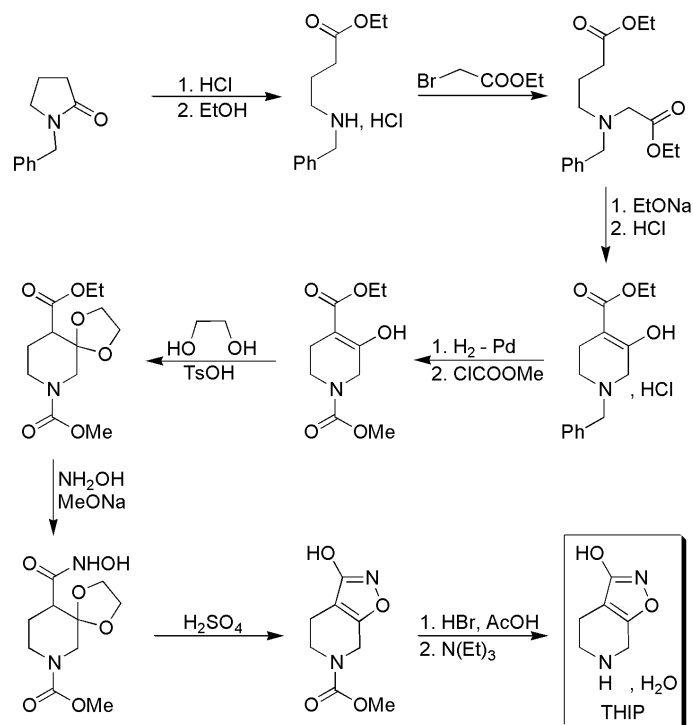
I et forsøg på at belyse de skitserede problemer er der udviklet en farmakoformodel for GABA_A-agonister [9]. Modellen er udviklet på basis af konformationsanalyser af forskellige klasser af GABA_A-agonister, molekylære overlejningsstudier og analyser af receptorbindingsdata. THIP var ikke inkluderet i udviklingen af farmakoformodellen.



Figur 7. A. Illustration af bindingen af den bioaktive konformation af muscimol til et udsnit af farmakoformodellen for GABA_A-agonister. Hydrogenbindinger til receptoren er vist med brudte linier. B. Overlejring af THIP og muscimol (vist i grønt) i farmakoformodellen. Hydrogenbindinger mellem THIP og receptoren er vist med brudte linier.

Figur 7A illustrerer bindingen af den foreslåede bioaktive konformation af muscimol til receptormodellen. Ammoniumgruppen binder til receptoren *via* tre hydrogenbindinger. 3-hydroxyisoxazol-anionen binder *via* to hydrogenbindinger til guanidingruppen i en argininrest. At netop en argininrest er involveret i bindingen af muscimol er underbygget af punktmutationsstudier [10]. Ved »dockning« (indpasning) af THIP til receptormodellen under anvendelse af en energi-minimeringsmetode viste det sig, at THIP foretrak en anden bindingsmåde end muscimol (figur 7B). Hverken 3-hydroxyisoxazol-anionen af muscimol hhv. THIP, eller methylgruppen i THIP (figur 6 markeret med en pil) hhv. 4-methylgruppen i 4-methyl-muscimol var overlejrede.

Denne farmakoformodel er af stor værdi ved strukturaktivitetsstudier af GABA_A-agonister og for design af nye GABA_A-receptorligander [11,12].



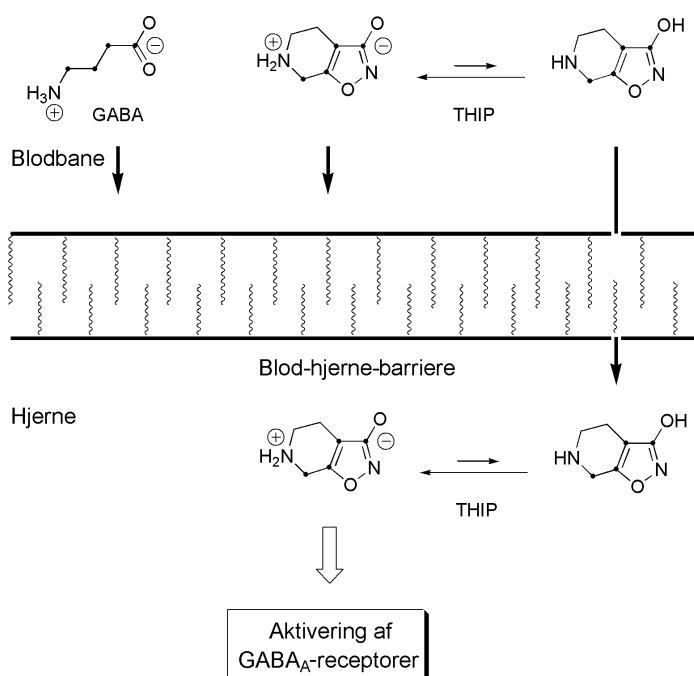
Figur 8. En skematisk illustration af syntesen af THIP.

THIP i kemisk og farmakologisk belysning [6]

Ønsker man at trænge ind på nye farmakologiske og terapeutiske områder, er det selvsagt nødvendigt med nye stoffer, der hverken kan købes eller på anden måde erhverves.

Nye stoffer må syntetiseres, og i mange tilfælde er synteserne vanskelige og særdeles tidsrøvende. Det gælder også for THIP [5]. Det tog mere end et år at syntetisere de første 50 mg af stoffet, og yderligere adskillige måneder før metoden var videreudviklet til at fremstille THIP i gramskala. H. Lundbeck A/S har nu stoffet i udvikling og har efter års intens forskning formået at udvikle syntesemetoden til produktion af THIP i stor skala.

Fremstillingen af THIP sker gennem en mangetrinssyntese, som skitseret i figur 8. Strategien har været først at opbygge 6-ringen i THIP med funktionelle grupper, som muliggjorde en cyklisering, der kunne føre til dannelsen af 3-hydroxyisoxazolgruppen i THIP.



Figur 9. En illustration af det forhold, at THIP i modsætning til GABA er i stand til at trænge gennem blod-hjerne-barrieren.

GABA-molekylet er så godt som 100% på amfoionform, og pga. den ladede struktur er det ikke i stand til at trænge gennem blod-hjerne-barrieren (figur 9). Ligesom muscimol er THIP overvejende på amfoionform; men for begge stoffer gælder, at omkring 0,1% af molekylerne i vandig opløsning er uladede. Denne form er langt mindre polær end amfoionformen og kan penetrere blod-hjerne-barrieren (figur 9). Inde i hjernevævet, på den anden side af barrieren, indstiller ligevægten sig igen med 99,9% af stoffet THIP på amfoionform, og det er denne form, der binder til og aktiverer GABA_A-receptorerne.

I modsætning til muscimol viser THIP meget ringe toksicitet i dyr og mennesker. Det skyldes muligvis, at aminogruppen i THIP er indbygget i en ring og dermed beskyttet mod den enzymatiske proces, der nedbryder sidekæden i muscimol.

Tilsammen har alle disse forhold vedrørende THIP banet vejen for undersøgelser af stoffet i klinikken. Tidlige patientundersøgelser har vist, at det besidder en meget kraftig smertestillende effekt. Det skelsættende er, at den smertestillende effekt er uafhængig af hjernens opiatsystem, dvs. det system, der medierer morfins effekt på smerter. Vi har altså et smertestillende stof, hvis effekt ikke ledsages af morfinpræparaternes

bivirkningsmønstre. Dertil kommer, at det er blevet vist, at THIP har meget interessante effekter på søvnmekanismerne i mennesker. Det er en spændende kombination af kliniske effekter.

Søvn og søvnbehandling

Alle har prøvet at ligge søvnløs om natten og opdaget, at den følgende dag har været præget af irritation og trang til en lille lur. Men for en stor del af befolkningen er søvnløshed mere end blot en enkel nats venden og drejen i sengen; for dem er det en langvarig tilstand, der opfattes og er ligeså invaliderende som smerter og depression. Faktisk resulterer søvnløshed ofte i depressive tilstande, så for den søvnløse patient bliver den manglende søvn endnu en del af en meget svær hverdag.

Brugen af sovemidler er i dag primært begrænset til benzodiazepiner og på samme måde som ethanol, fjerner sovemidler som Rohypnol og andre lignende stoffer (der under et kaldes benzodiazepiner eller benzodiazepin-lignende stoffer) overgangene mellem de forskellige søvntilstande (figur 10, side 32). Det betyder, at man, selv om man har sovet dybt hele natten, stadigvæk kan være søvngig og uoplagt den følgende dag. Ud over at søvnkvaliteten falder, er der også en mængde andre bivirkninger. Den væsentligste er nok, at man allerede efter kort tid kan blive afhængig af sovemidlet.

Løsningen på disse problemer er at udvikle nye sovemidler, der får hjernen til at falde i søvn, og samtidig øger søvnkvaliteten, uden at det gør hjernen afhængig. Men kan man

Specielle opgaver kræver specielle sensorer

**Induktive aftastere:**

- Omgivelsestemp. fra -60°C....+250°C
- Tæthedegrad op til IP69K
- Materiale AISI 316 Ti / PTFE
- Tatseafstand fra 0.5....170mm
- AC / DC udførelse
- Udgang relæ / PNP / NPN
- Analog 4...20mA / 0...10V
- Klimafaste udførelser
- Kundespecifikke udførelser

Omgivelses-
temperatur
-60° C



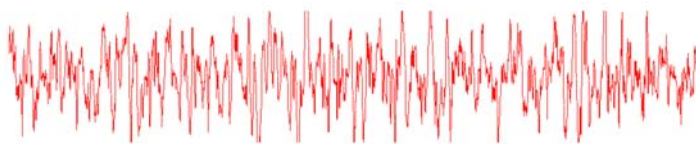
EGE-Elektronik ApS

Forstallé 79 • 6200 Aabenraa • Telefon 70207271 • Telefax 70207272

Normal



Med Benzodiazepin



Figur 10. Øverst ses et elektroencefalogram (EEG), som med blåt viser hjernens elektriske aktivitet under en del af den normale søvn. Her veksler perioder med hektisk aktivitet med rolige perioder med lav aktivitet. Nederst ses med rødt et EEG af en forsøgsperson, der har fået et traditionelt sovemiddel, et benzodiazepin. Her viser hjerneaktiviteten, at forsøgspersonen hele tiden sover dybt og mangler de hektiske perioder med drømme.

det? Ja, meget tyder på det! Men for at forstå mekanismen er det nødvendigt at se nærmere på GABA-systemet.

GABA-systemet

Når en GABA-receptor aktiveres, resulterer det i, at den nervecelle, hvor receptoren er lokaliseret, bliver mindre aktiv – den bremses. GABA-systemet kan derfor opfattes som hjernens overordnede bremse, der forhindrer, at alt løber løbsk. De forskellige typer af GABA-receptorer er placeret forskellige steder i hjernen. En type findes f.eks. i området, der har betydning for søvn, mens andre er lokaliseret i områder, der har betydning for hukommelse, angst eller smerte. Problemet med benzodiazepin-sovemidlerne er, at de påvirker næsten alle typer af GABA-receptorer. Det kan derfor ikke undre, at der er en del bivirkninger forbundet med brugen af disse sovemidler. Målet er at udvikle lægemiddelstoffer, der kun aktiverer de receptorer, der findes i de områder, der er vigtige for søvnens kvalitet.

GABA_A-receptorerne og søvn

For nogle år siden opdagede professor Lancel i Tyskland, at THIP i dyreforsøg var i stand til at forbedre dyrenes søvnkvalitet. Efterfølgende blev det påvist, at længere tids behandling af dyr tilsyneladende heller ikke medførte de kendte problemer med faldende effekt og abstinenser.

For at opnå en dybere forståelse af, hvad det er, som bestemmer THIPs aktivitet, har vi i et samarbejde mellem DFH (Institut for Medicinalkemi og Institut for Farmakologi) og H. Lundbeck A/S (Molekylærfarmakologisk Afdeling og Medicinalkemisk Afdeling) bl.a. undersøgt THIP på forskellige typer af GABA_A-receptorer.

GABA_A-receptorerne er pentamere membranbundne strukturer, som er sammensat af en kombination af flere forskellige proteiner, såkaldte subunits. Disse subunits kan inddeles i grupper, α , β , γ , δ , ϵ og π , som hver især atter kan inddeles i undergrupper. Det giver mulighed for adskillige tusinde forskellige kombinationer af subunits og dermed i princippet receptorer med forskellig farmakologi. I praksis har det vist sig, at langt hovedparten af receptorerne dannes af $\alpha 2$ plus $\beta 2$ samt enten en γ - eller en δ -subunit, hvilket begrænser mulighederne en del. Endvidere har adskillige forsøg vist, at over 98% af de eksisterende GABA_A-receptorer repræsenterer 20 forskellige subunitkombinationer. For stoffet THIP betyder det, at det på en kombination kan være en partiel agonist med relativ lille potens, mens det på andre kombinationer kan fungere som en meget aktiv agonist med en maksimal effekt, der er mere end

dobbelt så stærk som GABAs effekt. Når resultater fra forsøg med THIP i dyr eller mennesker skal tolkes, er det derfor særdeles vigtigt at kende subunitkombinationer i de enkelt hjerneregioner og at kende THIPs farmakologiske profil på disse kombinationer.

Et af de meget interessante resultater, man har fundet, er, at THIP tilsyneladende virker ekstra stærkt på en gruppe af receptorer, der indeholder $\alpha 4$ - og δ -subunits, der er lokaliseret i områder, som er særligt involveret i søvnregulation og angst [13]. Meget peger derfor på, at THIP vil kunne spille en væsentlig rolle i behandlingen af disse tilstande. THIP er stort set det eneste stof, som virker på netop denne kategori af receptorer, og vi tror, at vi er ved at forstå baggrunden for THIPs effekt på søvnen. Professor Lancel har for nyligt vist, at ældre mennesker med søvnbesvær sover fastere og er væsentligt mere veludhvilede, når de har fået THIP, som nu bærer firmanavnet gaboxadol. Det er spændende, at vi tilsyneladende står med en hel ny type sovemedicin, der forbedrer kvaliteten af søvnen uden de bivirkninger, som man normalt ser ved brug af sovemidler.

Referencer

1. Eugster, C. H. Chemie der Wirkstoffe aus dem Fliegenpilz. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 1969, 27, 261-321.
2. Krogsgaard-Larsen, P.; Brehm, L.; Schaumburg, K. Muscimol, a psychoactive constituent of *Amanita Muscaria* as a medicinal chemical model structure. *Acta Chem. Scand.* 1981, B35, 311-324.
3. Brehm, L.; Frydenvang, K.; Hansen, L. M.; Norrby, P.-O.; Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T. Structural features of muscimol, a potent GABA_A receptor agonist. Crystal structure and quantum chemical ab initio calculations. *Struct. Chem.*, 1997, 9, 443-451.
4. Brehm, L.; Frydenvang, K.; Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T. Crystal structure and quantum chemical ab initio calculations of ibotenic acid, an excitatory amino acid receptor agonist. *Struct. Chem.* 1998, 9, 149-155.
5. Krogsgaard-Larsen, P. Muscimol Analogues. II. Synthesis of some bicyclic 3-isoxazolol zwitterions. *Acta Chem. Scand.* 1977, B31, 584-588.
6. Krogsgaard-Larsen, P.; Falch, E.; Christensen, V. Chemistry and pharmacology of the GABA agonists THIP (gaboxadol) and isoguvacine. *Drugs of the Future* 1984, 9, 597-618.
7. Lipkowitz, K. B.; Gilardi, R. D.; Aprison, M. H. Electronic and structural features of γ -aminobutyric acid (GABA) and four of its direct agonists. *J. Mol. Struct.* 1989, 195, 65-77.
8. Krogsgaard-Larsen, P.; Johnston, G. A. R. Structure-activity studies on the inhibition of GABA binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds. *J. Neurochem.* 1978, 30, 1377-1382.
9. Tagmose, L. A pharmacophore model for GABA_A receptor agonists. Ph.d. thesis, Royal Danish School of Pharmacy, Copenhagen, 2000.
10. Westh-Hansen, S. E.; Witt, M. R.; Dekermendjian, K.; Liljefors, T.; Rasmussen, P. B.; Nielsen, M. Arginine residue 120 of the human GABA_A receptor $\alpha 1$ subunit is essential for GABA binding and chloride current gating. *Neuroreport* 1999, 10, 2417-2421.
11. Frølund, B.; Tagmose, L.; Liljefors, T.; Stensbøl, T. B.; Engholm, C.; Kristansen, U.; Krogsgaard-Larsen, P. A novel class of potent 3 isoxazolol GABA_A antagonists: Design, synthesis and pharmacology. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4930-4933.
12. Frølund, B.; Jørgensen, A. T.; Tagmose, L.; Stensbøl, T. B.; Vestergaard, H. T.; Engblom, C.; Kristiansen, U.; Sanchez, C.; Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T. A novel class of potent 3-isoxazolol GABA_A antagonists: synthesis, pharmacology and molecular modeling. *J. Med. Chem.* 2002, in press.
13. Adkins, C. E.; Pillai, G. V.; Kerby, J.; Bonnert, T. P.; Haldon, C.; McKernan, R. M.; Gonzalez, J. E.; Oades, K.; Whiting, P. J.; Simpson, P. B. $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA_A receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 38934-38939.