



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„*In vivo* Untersuchung ausgewählter GABA_A-Liganden
auf das Verhalten von c57Bl/6N-Mäusen“

Verfasserin

Sandra Maurer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie, sowie für die Bereitstellung dieses interessanten Themas bedanken.

Ein Dankeschön gilt auch Mag. Dr. Sophia Khom für die hilfreichen und kompetenten Ratschläge zum Anfertigen dieser Arbeit.

Herzlicher Dank gilt vor allem Mag. Juliane Hintersteiner, die mich bei allen praktischen Arbeiten begleitet, all meine Fragen geduldig beantwortet und mich mit großem Engagement unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich weiters bei Mag. Barbara Strommer, die sich für mich eingesetzt hat, diesen Diplomarbeitsplatz zu bekommen.

Auch bei meiner Familie möchte ich mich recht herzlich bedanken, dass sie mir das Studium der Pharmazie ermöglichten und mich auch in schwierigen Phasen des Studiums immer unterstützten. Besonderer Dank gilt auch meinem Freund Christoph, der immer an meiner Seite ist.

INHALT

A) ALLGEMEINER TEIL.....	1
1. DAS GABAerge SYSTEM	1
1.1. Die Rolle der γ -Aminobuttersäure im zentralen Nervensystem	1
1.2. Bereitstellung von GABA	1
1.3. Neurotransmission	2
1.3.1. Inhibitorische Neurotransmission durch GABA	3
1.4. Inaktivierung von GABA	4
2. DER GABA _B -REZEPTOR.....	5
3. IONOTROPE REZEPTOREN	7
4. DER GABA _A -REZEPTOR.....	9
4.1. Die Rolle des GABA _A -Rezeptors im zentralen Nervensystem	9
4.2. Funktion von GABA _A -Rezeptoren	10
4.3. Struktur von GABA _A -Rezeptoren	11
4.4. Diversität von GABA _A -Rezeptoren.....	12
4.5. Untereinheiten der GABA _A -Rezeptoren und deren Lokalisation	13
4.6. Unterschiede des GABA _A -Rezeptors zum GABA _C -Rezeptor	15
4.7. Der Lebenszyklus des GABA _A -Rezeptors	16
4.7.1. Assemblierung von GABA _A -Rezeptoren	17
4.7.2. Trafficking.....	18
4.7.3. Clusterbildung von GABA _A -Rezeptoren an Synapsen	21
4.7.4. Endocytose von GABA _A -Rezeptoren	21
4.8. Funktionen der GABA _A -Rezeptor-Subtypen.....	22
4.8.1. α -Rezeptor-Subtypen	22
4.8.1.1. Effekte, die durch α 1-Rezeptor-Subtypen auftreten	23
4.8.1.2. Effekte, die durch α 2-Rezeptor-Subtypen auftreten	23
4.8.1.3. Effekte, die durch α 3-Rezeptor-Subtypen auftreten	23
4.8.1.4. Effekte, die durch α 5-Rezeptor-Subtypen vermittelt werden	23
4.8.2. β -Rezeptor-Subtypen	24
4.8.2.1. Effekte, die durch β 2-Rezeptor-Subtypen auftreten	24

4.8.2.2.	Effekte, die durch β_3 -Rezeptor-Subtypen auftreten	24
4.9.	Pharmakologie der GABA _A -Rezeptoren	25
4.10.	Agonisten, Antagonisten und inverse Agonisten an GABA _A -Rezeptoren	25
4.10.1.	Die GABA-Bindungstasche.....	26
4.10.2.	Interaktion von Benzodiazepinen mit GABA _A -Rezeptoren	27
4.10.3.	Effekte von Barbituraten an GABA _A -Rezeptoren	29
4.10.4.	Interaktion von Anästhetika mit GABA _A -Rezeptoren.....	29
4.10.5.	Interaktion von Steroiden mit GABA _A -Rezeptoren	30
4.10.6.	Die Bindungsstelle von TBPS (t-Butylbicyclophosphorothionat)	31
4.11.	Ethanol	32
4.12.	Andere Substanzklassen, die Interaktionen mit GABA _A -Rezeptoren eingehen... 32	
4.12.1.	Substanzen mit Affinität zu α -enthaltenden Rezeptoren	32
4.12.1.1.	Diuretika	32
4.12.1.2.	γ -Butyrolactone	33
4.12.1.3.	Antibiotika	33
4.12.2.	Substanzen mit Affinität zu β -enthaltenden Rezeptoren	33
4.12.2.1.	Loreclezol, Etomidat, DMCM, Furosemid	33
4.12.2.2.	NSAR	34
4.13.	Liganden pflanzlichen Ursprungs	34
4.13.1.	Flavonoide	35
4.13.2.	Phenolische Substanzen	36
4.13.3.	Terpenoide	37
4.13.3.1.	Valerensäure	37
4.14.	Gating-Mechanismus von GABA _A -Rezeptoren.....	38
4.15.	Involvierung des GABAergen Systems in der Pathogenese diverser Krankheitsbilder	40
4.15.1.	Angst und Depressionen	40
4.15.2.	Epilepsie	42
4.15.3.	Die Rolle von GABA bei Schizophrenie.....	43
4.15.4.	Schlafstörungen.....	44
4.15.5.	Involvierung des GABA-Systems bei Alkoholismus	45

B) PRAKTISCHER TEIL	46
5. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	46
6. METHODEN	48
6.1. Verwendete Versuchstiere	48
6.2. Herstellung der Injektionslösungen	49
6.3. Formen von Verhaltenstests an Mäusen	49
6.4. Im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführte Verhaltenstests	50
6.4.1. Elevated-Plus-Maze Test (EPM-Test)	50
6.4.1.1. Durchführung des EPM-Tests	51
6.4.1.2. Erfasste Parameter	51
6.4.2. Light/Dark-Choice Test	51
6.4.2.1. Durchführung des Light/Dark-Choice Tests	52
6.4.2.2. Erfasste Parameter	52
6.4.2.3. Bedeutung des Light/Dark-Choice Tests	53
7. ERGEBNISSE	53
7.1. Ergebnisse von Derivat A im EPM-Test	53
7.2. Ergebnisse von Derivat A im Light/Dark-Choice Test	55
7.3. Ergebnisse von Derivat B im EPM-Test	57
7.4. Ergebnisse von Derivat B im Light/Dark-Choice Test	58
8. DISKUSSION	60
9. ZUSAMMENFASSUNG	63
10. ABSTRACT	64
11. QUELLENVERZEICHNIS	65
12. CURRICULUM VITAE	80

A) ALLGEMEINER TEIL

1. DAS GABAerge SYSTEM

1.1. Die Rolle der γ -Aminobuttersäure im zentralen Nervensystem

GABA (γ -Aminobuttersäure) stellt den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem von Säugetieren dar. Ungefähr 17-20 % aller Neuronen im Gehirn sind GABAerg (Somogyi et al., 1998). Die γ -Aminobuttersäure ist ein äußerst flexibles Molekül, das in der Lage ist, in mehreren energiearmen Konformationen zu existieren (Chebib et al., 1999; Johnston, 1996). GABA ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die aus vier Kohlenstoffatomen besteht. Diese kommt in nahezu allen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen vor (Bown et al.; 1997).

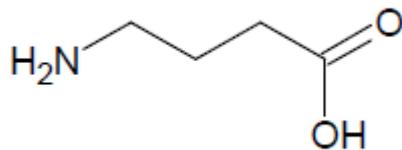


Abb. Nr. 1: Strukturformel von GABA

1.2. Bereitstellung von GABA

Gebildet wird GABA aus Glutamat unter Katalyse durch die Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) (Hevers et al., 1998). Aus einem exzitatorischen (erregenden) Transmitter wird somit ein inhibitorischer (hemmender) Transmitter synthetisiert. Das Enzym GAD wird im ZNS nur in GABAergen-Neuronen exprimiert. Freigesetzte GABA gelangt teilweise in Gliazellen (Astrozyten), wo sie durch die GABA-Transaminase in Glutamin (GLN) umgewandelt wird. Dieses wird darauf folgend in die GABAergen Nervenendigungen aufgenommen. Glutamin wird durch die Glutaminase zu Glutamat hydrolysiert. Aus Glutamat kann anschließend wieder durch Decarboxylierung GABA synthetisiert werden, welches in der Folge aus dem Axoplasma in die Speichervesikel aufgenommen wird (Aktories et al., 2009).

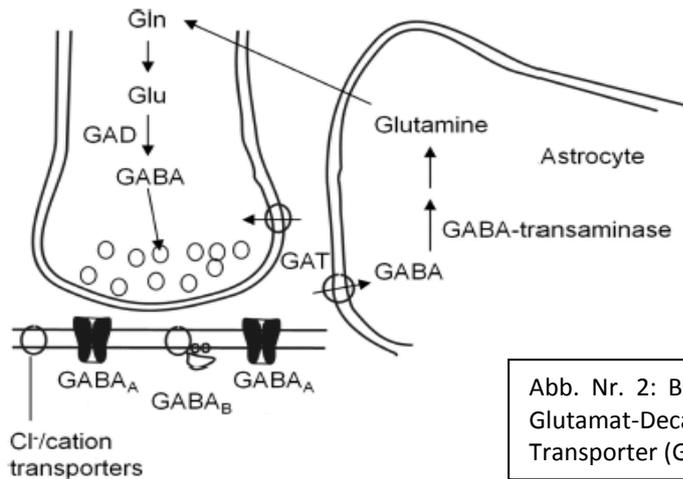


Abb. Nr. 2: Bildung von GABA: Glutamat (Glu), Glutamat-Decarboxylase (GAD), GABA-Transporter (GAT) (Uusi-Oukari et al., 2010).

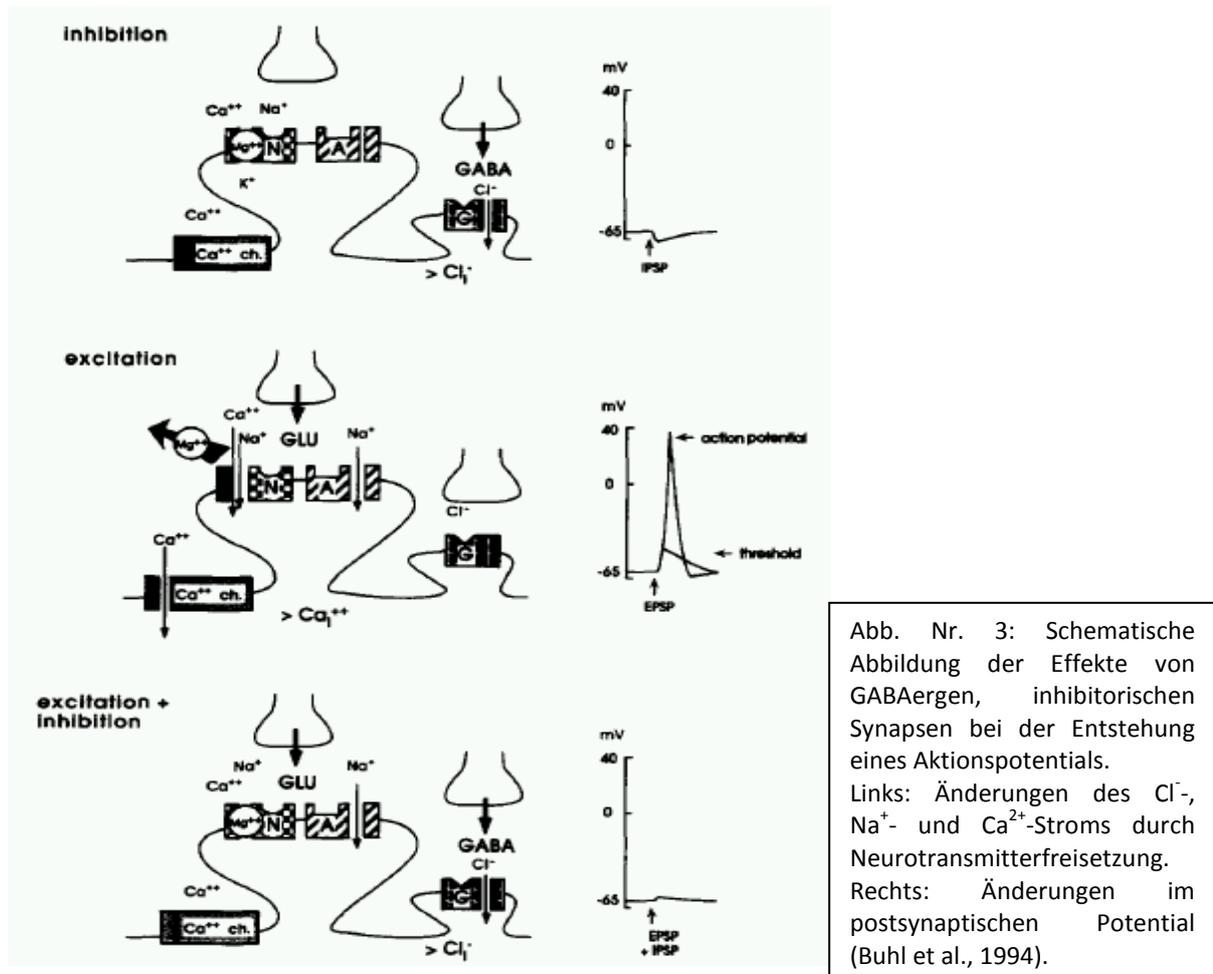
1.3. Neurotransmission

Glutamat steuert eine Reihe von exzitatorischen Kanälen (AMPA-, Kainat- und NMDA-Kanäle), welche unterschiedliche funktionelle und strukturelle Eigenschaften aufweisen (Roche et al., 1994). Ihrer Funktion im Gehirn wird durch GABA-aktivierte-Anionenkanäle entgegengewirkt. Die Freisetzung von GABA aus Präsynapsen induziert einen Chloridstrom (durch GABA_A-Rezeptoren) entlang eines Konzentrationsgradienten aus dem synaptischen Spalt in die Zelle. Dieser Chlorid-Einstrom hyperpolarisiert die postsynaptische Membran. Es resultiert eine Steigerung des Ruhemembranpotentials von -65 auf -70 mV. Dies führt zu einem inhibitorischen, postsynaptischen Potential (IPSP) (siehe Abb. Nr. 3, Oben).

Glutamat wird ebenfalls aus Präsynapsen freigesetzt. Es induziert eine Depolarisation der postsynaptischen Membran, wodurch AMPA-Rezeptoren (A) aktiviert werden. Diese Depolarisation geht in ein exzitatorisches, postsynaptisches Potential (EPSP) über. Eine hinreichend starke bzw. wiederholte Glutamat-Stimulierung induziert ein Aktionspotential, wenn die Depolarisation einen Schwellenwert von -55 mV erreicht. Solch starke Depolarisation bewirkt die Freisetzung von Mg²⁺. Dieses blockt NMDA-Rezeptoren (N) und öffnet spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle. Beides führt dazu, dass Ca²⁺ in die Zelle strömt, wodurch eine Reihe zell-spezifischer Antworten ausgelöst wird (z.B. Aktivierung der Proteinkinase C oder Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Prozesse) (siehe Abb. Nr. 3, Mitte).

Gleichzeitige Freisetzung von GABA und Glutamat aus Präsynapsen bewirkt eine Öffnung von GABA_A- und AMPA-Rezeptoren. Die dadurch entstehende Depolarisation ist jedoch für eine Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle oder eine Freisetzung von Mg²⁺ aus NMDA-

Rezeptoren nicht ausreichend. EPSP und IPSP verhindern in diesem Fall gemeinsam die Entstehung eines Aktionspotentials in den Postsynapsen. Die Konsequenzen der Aktivierung von GABAergen-Chloridkanälen hängen einerseits von der Lokalisation der Synapsen an den Neuronen (dendritische, axonische oder somatische) ab, andererseits von der Verzweigung der Präsynapsen (siehe Abb. Nr. 3, Unten) (Lüddens et al., 1995).



1.3.1. Inhibitorische Neurotransmission durch GABA

Die wichtigste Funktion GABAerger Inhibition ist das Auslösen von schneller, synaptischer (phasischer) Neurotransmission. Neben dieser Aktion sind GABA_A-Rezeptortypen auch an tonischer Inhibition beteiligt, welche durch kontinuierliche Aktivierung extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren bewirkt wird (Semyanov et al., 2004). Die Abgrenzung zwischen phasischer und tonischer Inhibition ist jedoch unscharf; es wurde festgestellt, dass phasische, „langsame“ Inhibition durch ein Übergreifen von Transmitter an ‚perisynaptischen‘ und

extrasynaptischen Rezeptoren erfolgen kann. Dieses Phänomen wird durch ein „Spillover“ des Transmitters erzeugt (Nusser et al., 1998; Wei et al., 2003).

GABA-vermittelte phasische Transmission wird bei hohen GABA-Konzentrationen (0,3-1,0 mM) erzeugt (Mody et al., 1994; Gaiarsa et al., 2002). Diese Menge an GABA verbleibt dabei nur sehr kurz im synaptischen Spalt (<1 ms) (Nusser et al., 2001; Mozrzymas et al., 2003). Freigesetzte GABA kann mit postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren interagieren. Durch das Koppeln von GABA mit den Rezeptoren werden diese in den aktiven Zustand versetzt, wodurch eine inhibitorische, postsynaptische Strömung (IPSC) auftritt (Chen et al., 2000). Perisynaptische GABA_A-Rezeptoren werden in der Folge durch „Transmitter-Spillover“ aktiviert (Wei et al., 2003). Daraus resultiert, dass phasische GABA-Freisetzung nicht nur synaptische GABA_A-Rezeptoren aktiviert.

Viele Zellen werden durch tonische Strömungen aktiviert. Diese werden durch mikromolare GABA-Konzentrationen erzeugt. Solch niedrige GABA-Konzentrationen sind jederzeit im Extrazellulärraum vorzufinden (Tossman et al., 1986). Die Ladung, die bei tonischer Aktivierung der Rezeptoren auftritt ist dreimal stärker als bei phasischer Inhibition, obwohl die Frequenz von phasischen Ereignissen viel größer ist (Nusser et al., 2002; Semyanov et al., 2003; Rossi et al., 2003).

1.4. Inaktivierung von GABA

Durch eine carriervermittelte Aufnahme wird freigesetzte GABA inaktiviert. Sie wird entweder zurück in die GABA-Axone oder in Gliazellen (Astrozyten) transportiert. Wird GABA mit Hilfe von Carrier aufgenommen, kann sie erneut in den Vesikeln gespeichert werden.

Der Abbau erfolgt durch das Enzym GABA-Transaminase. Dieses katalysiert die Umwandlung von 4-Aminobuttersäure und 2-Oxoglutarat zu Succinatsemialdehyd und Glutamat. Succinatsemialdehyd wird anschließend durch die Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase zu Bernsteinsäure oxidiert, welche in den Citratcyclus eintritt und somit als wichtige Energiequelle zur Verfügung steht (Bown et al., 1997; Aktories et al., 2009).

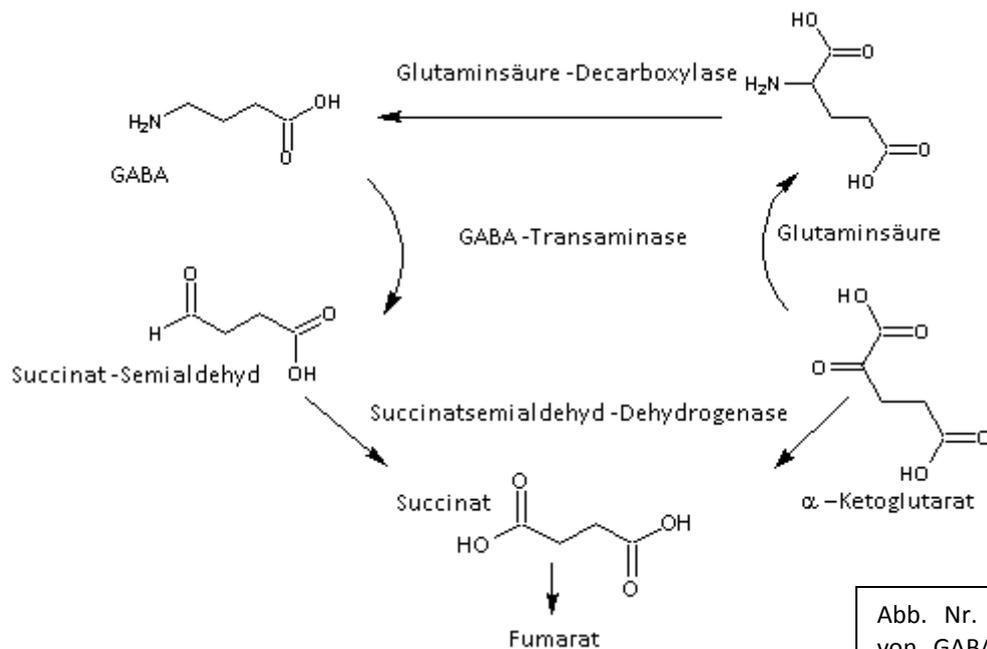


Abb. Nr. 4: Inaktivierung von GABA (Schema nach Bown et al., 1997).

Der Einsatz von GABA-Analoga hat es ermöglicht drei wichtige GABA-Rezeptoren zu identifizieren:

- GABA_A-Rezeptoren
- GABA_B-Rezeptoren
- GABA_C-Rezeptoren

(Chebib et al., 1999; Johnston, 1996).

2. DER GABA_B-REZEPTOR

Dieser Rezeptortyp steht nicht im direkten Zusammenhang mit dieser Arbeit, deshalb wird er zur Vervollständigung im Folgenden nur kurz beschrieben. Alle weiteren Kapitel legen das Hauptaugenmerk auf GABA_A-Rezeptoren sowie deren Stellung im ZNS.

GABA_B-Rezeptoren zählen zur Familie der metabotropen (heptahelikalen) Rezeptoren. Diese kommen im ZNS von Säugetieren in Thalamus, Cerebellum, in der Großhirnrinde und dem Rückenmark vor (Bowery et al., 1987; Chu et al., 1990).

Als Agonisten an GABA_B-Rezeptoren agieren GABA, (R)-(-)-Baclofen, ein Spasmolytikum und ein Phosphinsäure-Analogon von GABA. Bei diesem Analogon handelt es sich um (3-amino-propyl)phosphinsäure, das auch als CGP27492 bezeichnet wird. Die Phosphon- und Sulfonsäureanaloga von (R)-(-)-Baclofen, Phaclofen und Saclofen agieren als Antagonisten an diesen Rezeptoren (Kerr et al., 1995).

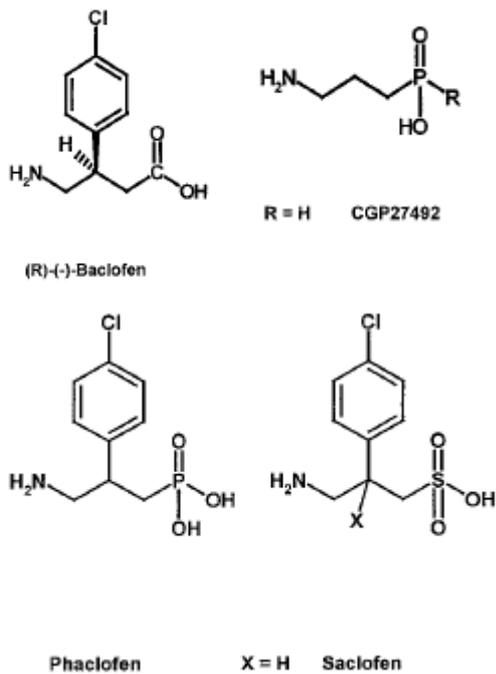


Abb. Nr. 5: Strukturformeln der Agonisten und Antagonisten am GABA_B-Rezeptor (Bowery et al., 2002).

GABA_B-Rezeptor-Agonisten zeigen eine Reihe von pharmakologischen Effekten:

- Muskelrelaxierung
- antitussive Effekte
- Bronchorelaxierung
- verstärkte gastrointestinale Motilität
- Epileptogenese
- Antinociception
- Hypotension
- kognitive Beeinträchtigungen
- Hemmung der Magensäuresekretion
- Hemmung der Freisetzung von Hormonen

GABA_B-Rezeptor-Antagonisten können hingegen abhängig von der verabreichten Dosis die Entstehung von Krämpfen hemmen (Bowery et al., 2002).

Auf den GABA_B-Rezeptor haben die typischen GABA_A-Rezeptor-Liganden, wie Bicucullin oder Picrotoxin, keinen Einfluss. GABA_B-Rezeptoren interagieren mit mehreren unterschiedlichen Effektorsystemen. Sie koppeln mit G_i/G_o-Proteinen, weshalb sie auch als G-Proteingekoppelte Rezeptoren bezeichnet werden. Ihre Aufgabe besteht in der Aktivierung einwärts, gleichgerichteter K⁺-Kanäle (K_{ir}) und der Hemmung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (Bowery et al., 2002; Bettler et al., 2004).

GABA_B-Rezeptoren können auch als Heterodimere, mit den Untereinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2} vorkommen. GABA_{B1} scheint für die Rezeptoraktivierung von Bedeutung zu sein. Agonisten binden an eine Untereinheit von GABA_{B1}, wodurch eine Konformationsänderung im Proteinkomplex resultiert. Dadurch wird GABA_{B2} dazu veranlasst, die G-Protein-Signalkaskade zu aktivieren. GABA_{B2} stellt jene Komponente des Rezeptors dar, die mit G-Proteinen (GTP-hydrolysierenden Proteinen) verlinkt ist (Bowery et al., 2002).

3. IONOTROPE REZEPTOREN

Ionotrope Rezeptoren sind Ionenkanäle, die durch Liganden beeinflusst werden, weswegen man sie auch oft als ligandengesteuerte Ionenkanäle bezeichnet. Das Öffnen und Schließen dieser Rezeptoren wird durch das Andocken von Hormonen und Neurotransmittern gesteuert (Aktories et al. 2009).

Zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (LGIC), die aus Pentameren aufgebaut sind (siehe Abb. Nr. 6), zählen:

- GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren
- nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)
- Glycin-Rezeptoren (GlyR)
- 5-HT₃-Rezeptoren
- Zn²⁺-aktivierte Ionenkanäle

(Corringer et al., 2000; Lukas et al., 2006; Breitinger et al., 2002; Davies et al., 1999; Thompson et al., 2006; Davies et al., 2003).

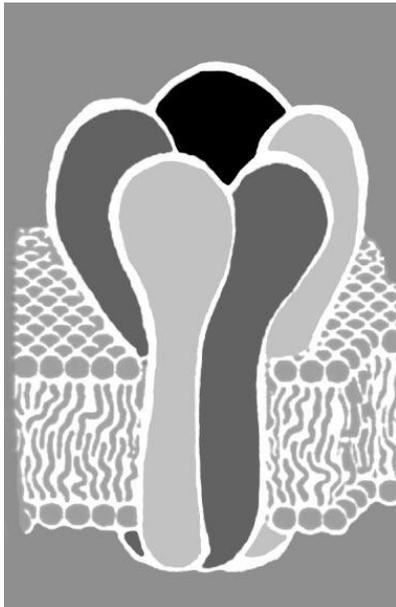


Abb. Nr. 6: Schematische Darstellung eines ligandengesteuerten Ionenkanals (Haefely, 1987).

Obig genannte Rezeptoren unterscheiden sich strukturell von zwei zusätzlichen LGIC-Familien: den tetrameren Glutamat-Rezeptoren (P2X) und den Purin-Rezeptoren, welche Trimere bilden (Chen et al., 2006; Khakh et al., 2001; Khakh et al., 2006).

Es gibt einen weiteren Punkt, durch den sich die Rezeptoren der LGIC-Familie unterscheiden: nACh-Rezeptoren, 5-HT₃-Rezeptoren und die Zn²⁺-aktivierten Ionenkanäle haben die Gemeinsamkeit, dass sie kationenpermeabel sind, wogegen GABA_A-Rezeptoren sowie die Glycin-Rezeptoren Permeabilität für Anionen aufweisen. Solche Rezeptoren sind folglich aus Proteinen aufgebaut, die die Membran fünfmal durchspannen, wobei eine zentrale Pore gebildet wird, durch die Ionen die Membran durchdringen können.

Sie alle weisen ähnliche Sequenzen und funktionelle Domänen auf, mit denen sie sich in der Membran verankern. Weiters verfügen sie über Bindungsstellen für Agonisten, sowie für diverse allosterische Liganden. Jede Untereinheit (siehe Abb. Nr. 7 A und B) besteht aus einer langen N-terminalen, hydrophilen, extrazellulären Region, sowie aus vier transmembranären α -Helices (M) mit einer großen intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4 und endet mit einem relativ kleinen extrazellulären C-Terminus (Corringer et al., 2000; Sine et al., 2006). Es wird angenommen, dass diese interzelluläre Schleife ein Target für Proteinkinasen darstellt. Mit Hilfe dieser Region können sich die Rezeptoren mit dem Cytoskelett verankern. Wie bereits erwähnt, liegen sowohl die C-terminale als auch die N-terminale Region extrazellulär an der Zelloberfläche; ein Teil der Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten liegt innerhalb der N-terminalen Region (Macdonald et al., 1994). Peters et al. haben außerdem herausgefunden, dass eine α -helicale Domäne

innerhalb der cytoplasmatischen Schleife M3-M4 (Abb. Nr. 7A) einen Einfluss auf die Ionenleitung hat (Peters et al., 2005).

M2 bildet die Verkleidung des Ionenkanals, wobei möglicherweise auch M1 beteiligt ist (Corringer et al., 2000; Sine et al., 2006).

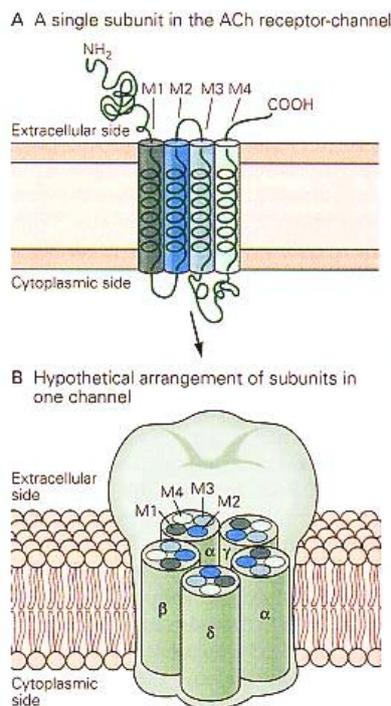


Abb. Nr. 7: A) Darstellung einer Untereinheit B) Anordnung der Untereinheiten im Rezeptor (JM Davies, Uni München).

4. DER GABA_A-REZEPTOR

4.1. Die Rolle des GABA_A-Rezeptors im zentralen Nervensystem

Die meisten physiologischen Tätigkeiten der γ -Aminobuttersäure werden via GABA_A-Rezeptoren generiert. Diese Rezeptoren stellen Cl⁻-Ionen-Kanäle dar. Eine Öffnung kann durch die Bindung von GABA erfolgen, moduliert werden sie jedoch von einer Vielzahl pharmakologisch und klinisch wichtiger Substanzklassen, wie zum Beispiel Benzodiazepinen oder Anästhetika (Sieghart, 1995). Ein Teil der klinisch-relevanten Effekte dieser Substanzen wird erzeugt, indem sie mit verschiedenen allosterischen Bindungsstellen an GABA_A-Rezeptoren Wechselwirkungen eingehen.

Basierend auf der pharmakologischen Wirkung dieser Substanzen hat sich herausgestellt, dass GABA_A-Rezeptoren bei einer Vielzahl von Tätigkeiten involviert sind, dazu zählen:

- Kontrolle der Erregbarkeit im Gehirn

- Regulierung von Angst
- Ess- und Trinkgewohnheiten
- in der zirkadianen Rhythmik
- Wahrnehmung
- Vigilanz
- Erinnerungsvermögen
- Lernen

(Fritschy et al. 1999; Olsen et al., 1997; Nutt et al.; 1990; Pratt et al., 1992; Berridge et al., 1995; Cooper et al., 1989; Turek et al., 1988; Wagner et al., 1997; Izquierdo et al., 1991; Paulsen et al., 1998; Sarter et al., 1988).

4.2. Funktion von GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren sind, neben den obig genannten Tätigkeiten, auch für die Funktion der Basalganglien, der Gewährleistung schneller, synaptischer sowie tonischer, extrasynaptischer Inhibition innerhalb und zwischen den verschiedenen Basalganglien-Kernen essentiell (Smith et al., 1998; Misgeld 2004; Tepper et al., 2004).

Sie sind (gemeinsam mit Glycin-Rezeptoren) im ZNS von Vertebraten auch für das Auftreten der schnellen, inhibitorischen und synaptischen Transmission verantwortlich. GABA_A-Rezeptoren sind nicht nur für Cl⁻, sondern auch für HCO₃⁻ permeabel. Das Permeabilitätsverhältnis von HCO₃⁻/Cl⁻ entspricht ungefähr 0,2:0,4 (Kaila et al., 1997). HCO₃⁻ wandert aus der Zelle heraus und bewirkt eine milde Depolarisation (das Umkehrpotential von HCO₃⁻ beträgt -12 mV). In ausgereiften Zellen tritt Cl⁻ üblicherweise in die Zellen ein und überschreitet diese milde Depolarisation. Es bewirkt eine starke, inhibitorische Hyperpolarisation; das Cl⁻-Umkehrpotential ist 15-20 mV negativer als das Ruhemembranpotential. Der Cl⁻-Gradient wird durch K⁺/Cl⁻-Cotransporter aufrechterhalten. Abhängig von der intrazellulären Cl⁻-Konzentration, kann die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zu einem Cl⁻-Efflux und Depolarisation führen. Dies ist der Fall, wenn K⁺/Cl⁻-Kotransporter nicht in ausreichender Menge vorhanden sind um Cl⁻ effizient aus der Zelle zu transportieren (Rivera et al., 2005).

4.3. Struktur von GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren bestehen, wie bereits erwähnt, aus fünf Untereinheiten, die sich aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne, vier transmembranären Domänen (TM) und einer großen intrazellulären Schleife zwischen TM3 und TM4 zusammensetzen (Abb. Nr. 8) (Nayeem et al., 1994; Schofield et al., 1987; Tretter et al., 1997).

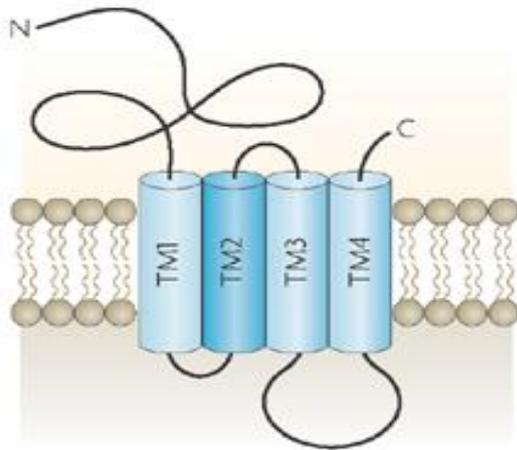


Abb. Nr. 8: Rezeptorstruktur: Darstellung der transmembranären Domänen sowie des extrazellulär befindlichen N- und C-Terminus (Jacob et al., 2009).

Die große extrazelluläre N-terminale Domäne besteht aus ungefähr 200 Aminosäuren, deren Form durch eine Cystein-Disulfidbrücke (so genannte Cys-Loop) beeinflusst wird (Simon et al., 2004). Der Selektivitätsfilter befindet sich am intrazellulären Ende der TM2-Domäne und inkludiert einen Teil des TM1-TM2-Loop. Die Ionenselektivität des Rezeptors wird dabei durch die β -Untereinheiten bestimmt (Jensen et al., 2002). Der TM3-TM4-Loop trägt Kontaktstellen für die Anheftung von regulierenden Proteinen. Diese sind für das Vorhandensein des Rezeptors an Synapsen und die Modulation seiner Aktivität verantwortlich (Kittler et al., 2003).

Modelle von GABA_A-Rezeptoren stimmen nicht vollständig mit experimentellen Daten überein, aber durch sie sind experimentelle Beobachtungen bildlich darstellbar. Dadurch kann beispielsweise die Lokalisation der Liganden-Bindungsstellen anschaulich gemacht werden (Sieghart, 2006).

Im Jahr 2001 wurden durch Röntgenkristallographie die Strukturen der N-terminalen Domäne des nACh-Rezeptors und dem Acetylcholin-bindenden-Protein (AChBP) aufgeklärt (Brejc et al., 2001). Dieses Protein formt homopentamere Kanäle, die der extrazellulären Domäne des nACh-Rezeptors gleichen. Dieses Erkenntnis wurde genutzt um vergleichbare

Modelle der extrazellulären Domäne des GABA_A-Rezeptors zu erstellen (Ernst et al., 2003). Dadurch wird die Annahme bestätigt, dass an GABA_A-Rezeptoren zwei Bindungstaschen für GABA existieren (siehe Abb. Nr. 9). Diese Taschen werden durch sechs, so genannte „Loops“ geformt, die als Loop A, B, C, D, E und F bezeichnet werden. Loop A, B, und C gehören der β -Untereinheit (an der Plus-Seite) an, Loop D, E und F der α -Untereinheit (an der Minus-Seite).

Auch die Bindungstasche für Benzodiazepine wird von diesen Loops umrahmt. Sie besteht aus den Loops A, B und C der α -Untereinheit und den Loops D und E der γ -Untereinheit (Ernst et al., 2003). Die Grenzfläche im Rezeptor-Modell weist zwischen den Untereinheiten der Rezeptorenfamilie noch zusätzlich Aushöhlungen auf, die jenseits der extrazellulär gefundenen Bindungstaschen liegen (Ernst et al., 2005; Sieghart et al., 2005). Diese befinden sich an der Kontaktstelle zwischen der extrazellulären und der transmembranären Domäne (letztere ist nicht vollständig in der Membran inseriert) und reichen bis zur Kontaktstelle der Untereinheiten innerhalb der Lipiddoppelschicht (Ernst et al., 2005).

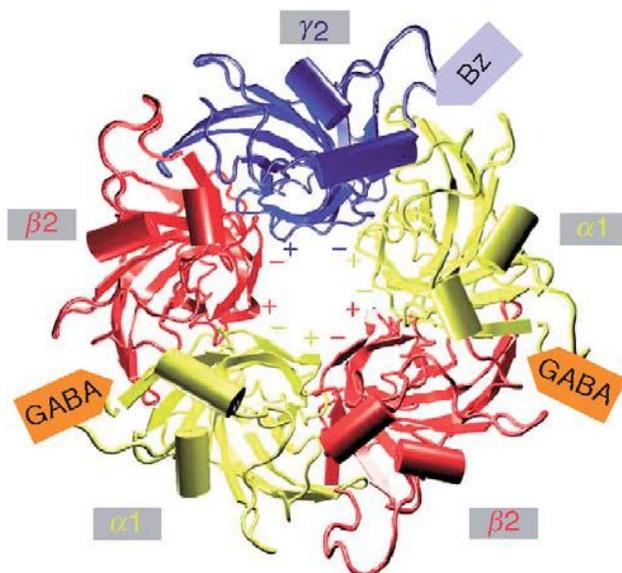


Abb. Nr. 9: Modell der extrazellulären Domänen des GABA_A-Rezeptors; extrazelluläre Ansicht. (Ernst et al., 2003).

4.4. Diversität von GABA_A-Rezeptoren

Wie bereits erwähnt bestehen GABA_A-Rezeptoren aus fünf Untereinheiten. Bis jetzt konnten sechs α , drei β , drei γ , eine δ , eine ζ , eine π , eine θ und drei ρ -Untereinheiten des Rezeptors aus dem Nervensystem von Säugetieren geklont und sequenziert werden. Diese Zusammenstellung von 19 verschiedenen Untereinheiten ist die größte unter den

Ionenkanal-Rezeptoren von Säugetieren (Barnard et al., 1998; Sieghart et al., 2002). Diese Vielfalt an Untereinheiten spricht für eine enorme Heterogenität des Rezeptors (Sieghart et al., 2002).

4.5. Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren und deren Lokalisation

GABA_A-Rezeptoren sind weitläufig im gesamten Gehirn verbreitet. Diverse Studien haben gezeigt, dass jede dieser Untereinheiten eine individuelle, regionale und zelluläre Lokalisation im Gehirn aufweist (Laurie et al., 1992; Persohn et al., 1992; Wisden et al., 1992; Fritschy et al., 1992; Pirker et al., 2000). Rezeptoren, die aus $\alpha(1-3)$ -, β - und γ -Untereinheiten bestehen, kommen direkt an den Synapsen vor. Jene, die sich aus $\alpha(4-6)$ -, β -, γ - bzw. δ -Untereinheiten zusammensetzen treten vorwiegend extrasynaptisch auf (Abb. Nr. 10) (Jacob et al., 2009).

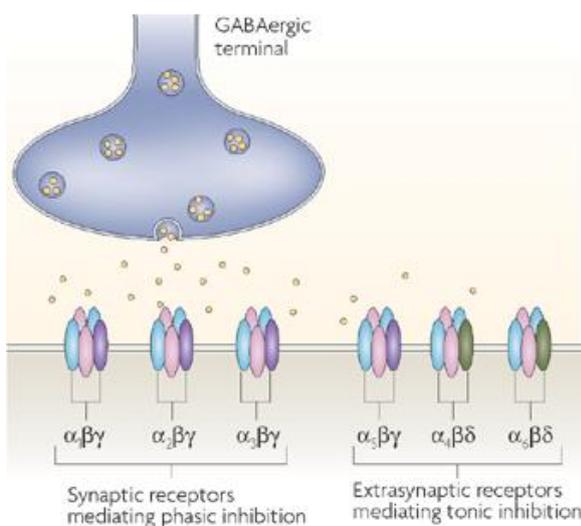


Abb. Nr. 10: Lokalisation der verschiedenen Rezeptor-Subtypen (Jacob et al., 2009).

Manche Typen von Zellen enthalten nur einige wenige GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten, andere hingegen exprimieren viel mehr, wenn nicht sogar alle GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Wenn all diese Untereinheiten wahllos miteinander koassemblieren würden, könnten mehr als 150.000 GABA_A-Rezeptor-Subtypen mit unterschiedlicher Zusammensetzung und Konstellation der Untereinheiten geformt werden (Burt et al., 1991). GABA_A-Rezeptoren können bis zu fünf verschiedene Untereinheiten enthalten. Es muss jedoch angemerkt werden, dass nicht alle Kombinationen der Untereinheiten im Gehirn gebildet werden können. Dennoch wird angenommen, dass möglicherweise mehr als 500

individuelle GABA_A-Rezeptoren im Gehirn existieren (Sieghart et al., 2002). Nur wenige dieser Rezeptoren treten in großer Anzahl auf. Die Mehrheit der nativen Rezeptoren besteht aus α -, β - und γ -Untereinheiten (Abb. Nr. 11). In den weniger bedeutenden Rezeptor-Subtypen scheinen δ -, ζ - und π -Untereinheiten die γ -Untereinheiten zu ersetzen, wohingegen die θ -Untereinheiten möglicherweise die β -Untereinheiten ersetzen (Sieghart et al., 2002).

Rezeptoren, die aus α -, β - und γ -Untereinheiten bestehen, beinhalten meist zwei α -, zwei β - und eine γ -Untereinheit, wobei die vier abwechselnden α - und β -Untereinheiten von der γ -Untereinheit verbunden werden (Baumann et al., 2002; Chang et al., 1996; Ernst et al., 2003; Farrar et al., 1999; Im et al., 1995; Tretter et al., 1997).

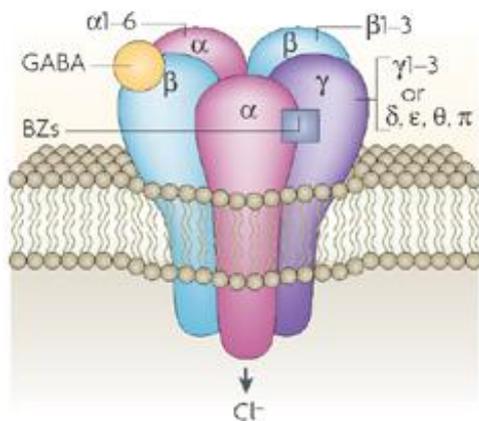


Abb. Nr. 11: Darstellung des am häufigsten exprimierten GABA_A-Rezeptors (Jacob et al., 2009).

Von ρ -Untereinheiten wurde ursprünglich angenommen, dass sie nicht mit anderen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten assemblieren (Cutting et al., 1991; Enz et al., 1998). ρ -Untereinheiten können sowohl homo- als auch heterooligomere Kanäle mit anderen ρ -Untereinheiten bilden, welche die Eigenschaften der GABA_C-Rezeptoren aufweisen (Bormann, 2000). Seit jedoch festgestellt wurde, dass ρ -Untereinheiten strukturell gesehen der Familie der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten angehören, wird vom IUPHAR-Komitee vorgeschlagen, dass Rezeptoren, die ρ -Untereinheiten aufweisen als spezielle Gruppe der GABA_A-Rezeptoren klassifiziert werden sollen (Barnard et al., 1998). Aufgrund dessen sollten GABA_C-Rezeptoren nicht als solche bezeichnet werden. Da jedoch diese Bezeichnung in der Literatur noch stark dominiert, werden sie in Anlehnung daran, in dieser Arbeit ebenfalls mit diesem Terminus versehen.

4.6. Unterschiede des GABA_A-Rezeptors zum GABA_C-Rezeptor

GABA_C-Rezeptoren sind Chlorid-Kanäle, welche rasche synaptische Hemmung vermitteln (Chebib et al., 1999). Sie zählen zwar wie GABA_A-Rezeptoren zu den ionotropen Rezeptoren, unterscheiden sich jedoch von diesen in ihrer Biochemie, Pharmakologie und Physiologie wesentlich (siehe Abb. Nr. 12). Im Gegensatz zu GABA_A-Rezeptoren werden sie weder durch Bicucullin geblockt, noch durch Benzodiazepine, Steroide oder Barbiturate moduliert. Stattdessen werden GABA_C-Rezeptoren durch cis-Aminocrotonsäure (CACA) aktiviert und selektiv durch (1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-methylphosphin-säure (TPMPA) (Abb. Nr. 13) geblockt (Johnston, 1996; Bormann et al., 1995).

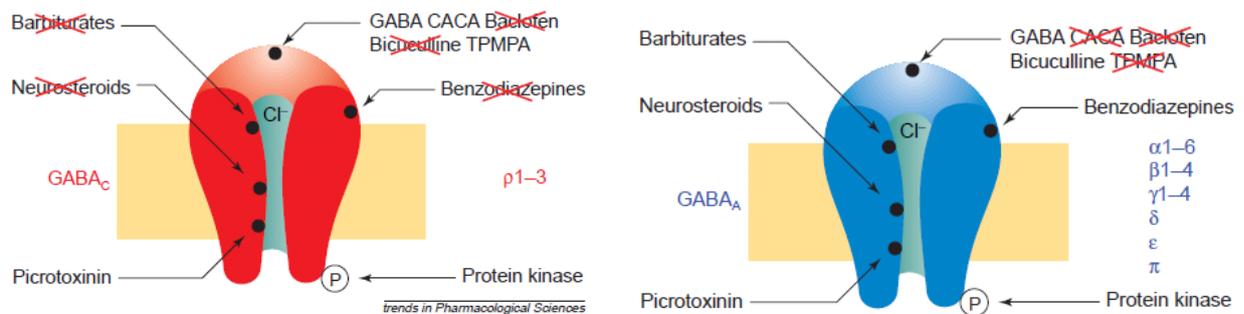


Abb. Nr. 12: Darstellung der Unterschiede zwischen dem GABA_C- und dem GABA_A-Rezeptor (Bormann, 2000).

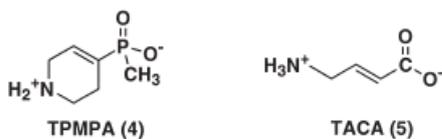


Abb. Nr. 13: Strukturformeln der Liganden am GABA_C-Rezeptor (Chebib et al., 1999).

GABA ist an GABA_A-Rezeptoren weniger wirksam als an GABA_C-Rezeptoren. GABA_C-Rezeptoren sind ca. zehnmal mehr sensitiv für ihren physiologischen Agonisten; die Hill-Slopes von GABA_C-Rezeptoren sind steiler, was möglicherweise für das Vorhandensein von fünf Liganden-Bindungsstellen spricht (Bormann 2000; Feigenspan et al., 1998).

Das Kennzeichen für GABA_C-Rezeptoren ist, dass sie sich aus ρ-Untereinheiten zusammensetzen. Heterolog exprimiert, formen diese Untereinheiten homooligomere

Kanäle mit einer charakteristischen Pharmakologie (Johnston, 1996; Bormann et al. 1995; Cherubini et al., 1997; Feigenspan et al., 1998; Cutting et al., 1991; Enz et al., 1998; Enz et al., 1999). Funktionelle GABA_C-Rezeptoren kommen vorwiegend in Retina, Rückenmark, Colliculi superiores, Hypophysen und Gastrointestinaltrakt vor (Johnston et al., 2003). Da jedoch ρ 1-Untereinheiten hauptsächlich in der Retina exprimiert werden, stellen die GABA_C-Rezeptoren in anderen Regionen des ZNS homooligomere Kanäle aus ρ 2-Untereinheiten dar (Enz et al., 1998; Enz et al. 1999; Wegelius et al., 1998).

Obwohl GABA_C-Rezeptoren weit weniger häufig im ZNS vorkommen als GABA_A-Rezeptoren, stellen sie ein viel selektiveres Target für Pharmaka dar, als GABA_A-Rezeptoren (Johnston et al., 2003). Die Hauptindikationen für Liganden an GABA_C-Rezeptoren sind Seh- und Schlafstörungen, sowie kognitive Defizite. Es wird angenommen, dass Liganden an GABA_C-Rezeptoren auch bei Kurzsichtigkeit eine Wirkung zeigen (Froestl et al., 2004).

4.7. Der Lebenszyklus des GABA_A-Rezeptors

Das Auftreten diverser Erkrankungen im ZNS (z.B. Epilepsie, Angststörungen, Schizophrenie, Depression, etc.) steht unweigerlich mit Störungen in der Expression von GABA_A-Rezeptoren in Zusammenhang. Die Expression unterliegt zellulären Mechanismen, welche die Ansammlung der Rezeptoren an der neuronalen Plasmamembran regeln. Beim Auftreten von ZNS-Erkrankungen ist es daher wichtig zu verstehen, wie die Neuronen die Steuerung von Assemblierung, Trafficking, Akkumulierung und Funktion der verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Subtypen bewerkstelligen. Einen Überblick über den Lebenszyklus von GABA_A-Rezeptoren bietet Abbildung Nr. 14 (nähere Details folgen):

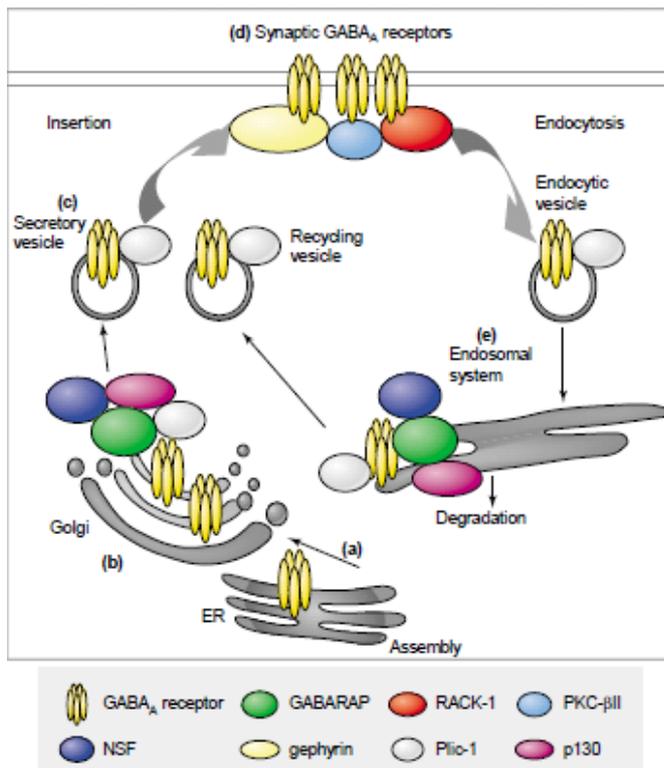


Abb. Nr. 14: Lebenszyklus des GABA_A-Rezeptors (Kittler et al., 2003).

4.7.1. Assemblierung von GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren werden durch die verschiedenen Untereinheiten im endoplasmatischen Retikulum (ER) zusammgebaut. Dieser Prozess ist wichtig für die Bereitstellung der enormen Diversität von GABA_A-Rezeptoren an neuronalen Zelloberflächen. Wie bereits erwähnt sind theoretisch zahlreiche Kombinationen der Untereinheiten möglich, tatsächlich verlässt nur eine begrenzte Anzahl dieser Kombinationen das ER, welche schließlich Zugang zur neuronalen Zelloberfläche erlangen. Die Expression und Assemblierung der Untereinheiten muss im ER sorgfältig geregelt werden. Dies geschieht durch ER-ansässige Chaperone, wie zum Beispiel Calnexin. Fehlerhaft gefaltete Proteine werden jedoch im ER zurückgehalten und letztendlich in Proteasomen abgebaut (Jacob et al., 2009). Dieser ER-assozierte Abbau (ERAD) bewirkt die Anheftung der Ubiquitinkette (dient als Erkennungsmerkmal für den Abbau) und schließlich den Zerfall des Proteins durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Yi et al., 2007).

Die neuronale Aktivität ist entscheidend für die Regulierung der Ubiquitinierung von GABA_A-Rezeptoren im ER, welche den Abbau durch UPS zur Folge hat. Permanente Hemmung der neuronalen Aktivität bewirkt enorm starke Ubiquitinierung von GABA_A-Rezeptoren innerhalb

des ERs, wodurch deren Insertion in die Plasmamembran stark reduziert wird (Saliba et al., 2007).

Das Schicksal ubiquitiniertes GABA_A-Rezeptoren wird auch durch die Ubiquitin-like Proteine Plic-1 und Plic-2 beeinflusst (siehe Abb. Nr. 15). Diese sind in der Lage den Abbau ubiquitiniertes Substraten zu verhindern. Plic-1 bindet über seine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) an α - und β -Untereinheiten von GABA_A-Rezeptoren. Dadurch kann Plic-1 die Halbwertszeit von GABA_A-Rezeptoren steigern. Das Resultat davon ist, dass die Zahl der Rezeptoren, welche zur Membraninsertion zur Verfügung stehen, stark steigt. Plic-1 hat jedoch keine Auswirkungen auf die Endocytoserate der Rezeptoren. Die Aufgabe dieses Proteins besteht darin, GABA_A-Rezeptoren an inhibitorischen Synapsen anzureichern (Bedford et al., 2001).

4.7.2. Trafficking

Nach der Assemblierung im ER werden die GABA_A-Rezeptoren durch Transporter in den Golgi-Apparat befördert, wo sie separat in Vesikeln gepackt werden. In dieser Form kann Transport und Membraninsertion erfolgen. An diesem Prozess (siehe Abb. Nr. 15) sind eine Menge Rezeptor-assoziiertes Proteine beteiligt (Jacob et al., 2009).

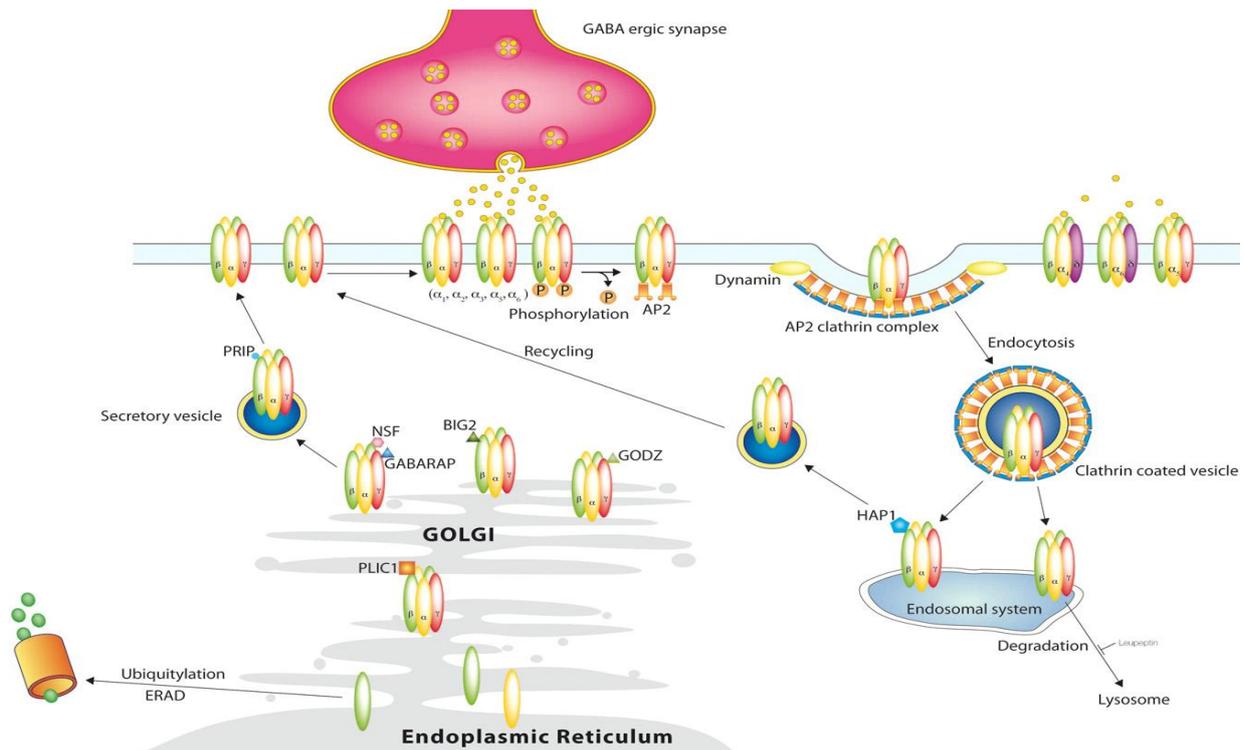


Abb. Nr. 15: Beteiligte Proteine am Trafficking-Prozess der GABA_A-Rezeptoren (Tretter et al., 2008).

Das GABA-Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP) interagiert mit den γ -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors. Es bindet aber auch an Mikrotubuli und den N-Ethylmaleinimid-sensitiven Faktor (NSF) (Kittler et al., 2001; Wang et al., 2000). GABARAP kommt im Golgi-Apparat und in intrazellulären Vesikeln vor, nicht jedoch in GABAergen Synapsen (Kittler et al., 2001; Wang et al., 1999). Dies weist darauf hin, dass seine Aufgabe im intrazellulären Transport von GABA_A-Rezeptoren liegt.

NSF ist ein Protein, das bei der intrazellulären Fusion von Vesikeln beteiligt ist (Zhao et al., 2007). Der NSF kann mit den β -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors koppeln. Man hat herausgefunden, dass eine Überexpression des NSF die Zahl der GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche stark reduziert (Goto et al., 2005).

GABARAP und NSF sind gemeinsam am frühen Trafficking des GABA_A-Rezeptors beteiligt. Jedoch muss ein Gleichgewicht zwischen GABA_A-Rezeptoren und NSF herrschen. Dieses wird gestört, wenn die Lipid-Modifizierung des GABARAP in den Neuronen behindert wird. Dies führt zu einem verminderten Trafficking der Rezeptoren zur Plasmamembran (Chen et al., 2007).

Auch Phospholipase C-verwandte, katalytisch inaktive Proteine (PRIP) spielen beim Trafficking eine Rolle. PRIP sind 1,4,5-Triphosphat-bindende Proteine (Kanematsu et al., 2000). Sie sind in der Lage sowohl an GABARAP, als auch an die intrazellulären Domänen der β -Untereinheiten von GABA_A-Rezeptoren zu binden (Uji et al., 2002). Weiters wurde herausgefunden, dass PRIP-Moleküle als brückenbildende Proteine zwischen GABARAP und γ 2-enthaltenden Rezeptoren fungieren (Mizokami et al., 2007). Deshalb sind PRIP und GABARAP am Trafficking von GABA_A-Rezeptoren zur synaptischen Membran involviert.

PRIP agieren in der Kontrolle der GABA_A-Rezeptor-Funktion. Sie sind an folgenden drei Mechanismen beteiligt:

- dem Trafficking
- der Modulation bei der Phosphorylierung (β -Untereinheiten sind das Target für die Proteinkinase C und die cAMP-abhängige Proteinkinase A)
- der Internalisierung der GABA_A-Rezeptoren

(Kittler et al., 2003).

Palmitoylierung hat eine kovalente Bindung der gesättigten Fettsäure Palmitat zur Folge und spielt eine große Rolle beim Protein-Trafficking an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen (Huang et al., 2005). Cystein-Reste innerhalb der intrazellulären Domänen der γ -Untereinheiten stellen Substrate für die Palmitoylierung dar. Die Palmitoyl-Acyl-Reste werden zu den γ -Untereinheiten durch das Golgi-spezifische-DHHC-Zinkfinger-Protein (GODZ) transferiert. Die Aufgabe von GODZ liegt wahrscheinlich in der Kontrolle des GABA_A-Rezeptor-Trafficking und der Beförderung der Rezeptoren zur Plasmamembran (Keller et al., 2004).

Am Trafficking in intrazellulären Vesikeln sind zwei weitere Proteine beteiligt: GRIF1 und BIG2. GRIF1 (oftmals als TRAK2 bezeichnet) interagiert vor allem mit β 2-Untereinheiten von GABA_A-Rezeptoren (Beck et al., 2002). BIG2 (Brefeldin A-hemmender-GDP/GTP-Austauschfaktor 2) bindet hingegen an die β 3-Untereinheiten des Rezeptors. BIG2 ist im trans-Golgi-Netzwerk in großen Konzentrationen vorhanden (Charych et al., 2004).

4.7.3. Clusterbildung von GABA_A-Rezeptoren an Synapsen

Nach der Wanderung durch den sekretorischen Pathway werden die GABA_A-Rezeptoren in die Plasmamembran inseriert. Sie können nun Zugang zu inhibitorischen, postsynaptischen oder extrasynaptischen Arealen erlangen. Dies hängt von der Zusammensetzung der Untereinheiten ab (Jacob et al., 2009).

Gephyrin ist bei der Regulierung der Clusterbildung von GABA_A-Rezeptoren an inhibitorischen Synapsen von großer Bedeutung. Dabei handelt es sich um ein multifunktionelles Protein, das ursprünglich mit Glycin-Rezeptoren assoziiert wurde (Pfeiffer et al., 1982). Gephyrin ist weiters ein Tubulin-bindendes Protein, welches den GABA_A-Rezeptor mit dem Cytoskelett verknüpft. Es stabilisiert Rezeptoren-Cluster über die α 2- bzw. γ 2-Untereinheiten. Es wird angenommen, dass innerhalb der γ 2-Untereinheit eine Domäne existiert, die für die Ansammlung von GABA_A-Rezeptoren an postsynaptischen Arealen bedeutend ist (Essrich et al., 1998).

Die Clusterbildung der Rezeptoren kann jedoch auch unabhängig von Gephyrin erfolgen.

Es wurde nachgewiesen, dass Radixin, ein Protein der ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-Familie, im Besonderen mit der intrazellulären Domäne von α 5-Untereinheiten interagiert. Durch diese Interaktion wird die α 5-Untereinheit mit dem Actin-Cytoskelett verknüpft (Loebrich et al., 2006).

4.7.4. Endocytose von GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren unterliegen einer sehr umfangreichen Endocytose, wobei Clathrin eine wichtige Rolle spielt (siehe Abb. Nr. 16). Clathrin-abhängige Endocytose ist der wichtigste Internalisierungsmechanismus für neuronale GABA_A-Rezeptoren (Kittler et al., 2000). Die intrazellulären Domänen der β - und γ -Untereinheiten interagieren dabei mit dem Clathrin-Adapter-Protein-2-Komplex (AP2). Die AP2-Bindungsstelle enthält Areale, die von Proteinkinase A und Proteinkinase C phosphoryliert werden können. Durch die Phosphorylierung wird die Bindung der μ 2-Untereinheit von AP2 gehemmt. Sind die Rezeptoren in Clathrin-umhüllte Vesikeln gepackt, können sie sich entweder regenerieren und wieder in die Plasmamembran inseriert werden, oder sie werden zu Lysosomen degradiert. Das Recycling der Rezeptoren wird durch das Huntingtin-assoziierte Protein

(HAP1) bewerkstelligt. Möglicherweise liegt seine Aufgabe auch darin, den lysosomalen Abbau der Rezeptoren zu verhindern (Jacob et al., 2009).

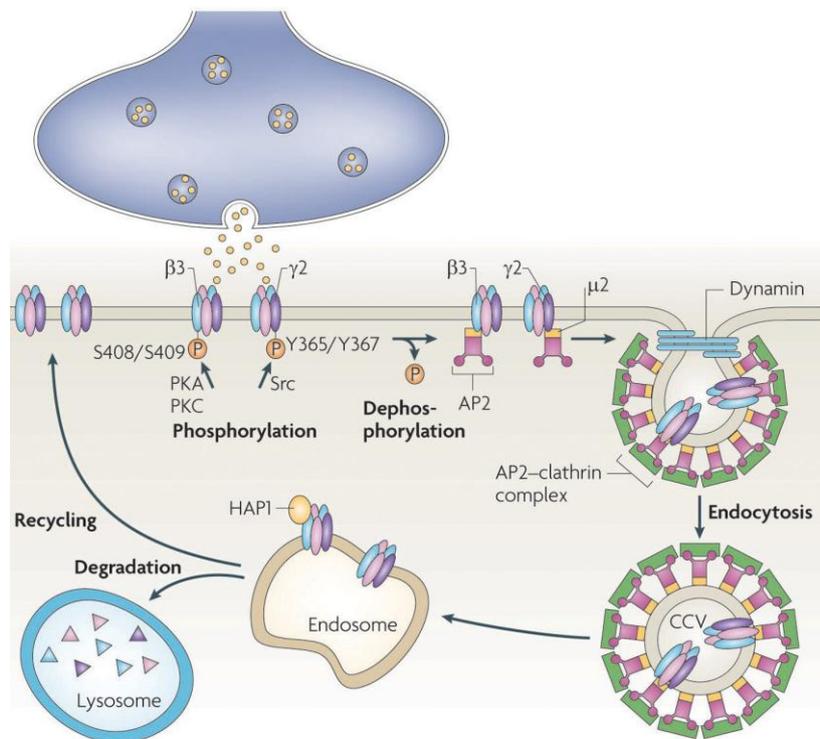


Abb. Nr. 16:
Endozytose/Recycling von
GABA_A-Rezeptoren; CCV –
Clathrin umhülltes Vesikel
(Jacob et al., 2009).

4.8. Funktionen der GABA_A-Rezeptor-Subtypen

4.8.1. α-Rezeptor-Subtypen

Bei der Suche nach Liganden, welche selektive Wirkungen zeigen, und ein geringeres Nebenwirkungs-Profil aufweisen (mit Affinität für die Benzodiazepin-Bindungsstelle), werden GABA_A-Rezeptor-Subtypen schon lange als viel versprechendes Target betrachtet. Hierfür wurden Maus-Linien geschaffen, in denen α1-, α2- oder α3-Rezeptor-Subtypen nicht sensitiv für Diazepam sind (Möhler et al., 2002). In diesen α-Untereinheiten wird eine Punktmutation induziert. Dadurch äußern sich bei den Tieren mit Mutation nicht die klassischen Effekte von Diazepam. Dies wird durch den Vergleich mit Diazepam-behandelten Wild-Typ-Mäusen erkenntlich (Sieghart, 2006).

4.8.1.1. Effekte, die durch α 1-Rezeptor-Subtypen auftreten

Das Anwenden von mutierten Maus-Linien demonstriert, dass durch α 1-enthaltende Rezeptoren Sedierung, anterograde Amnesie und teilweise antikonvulsive Effekte von Diazepam vermittelt werden (Crestani et al., 2000; Löw et al., 2000; McKernan et al., 2000; Rudolph et al., 1999).

4.8.1.2. Effekte, die durch α 2-Rezeptor-Subtypen auftreten

Ähnliche Methoden zeigen, dass Diazepam durch Koppeln an α 2-enthaltende Rezeptoren anxiolytische, muskelrelaxierende und hypnotische Effekte bewirkt (Rudolph et al., 2004; Sieghart et al., 2005). Diese Erkenntnisse konnten durch den Elevated-Plus-Maze-Test und den Light/Dark-Choice-Test gewonnen werden. Die Entwicklung von Anxiolytika, die tagsüber eingenommen werden können und dabei keine Benommenheit bewirken, hat hohe Priorität (Löw et al., 2000).

4.8.1.3. Effekte, die durch α 3-Rezeptor-Subtypen auftreten

GABA_A-Rezeptoren, die sich aus α 3-Untereinheiten zusammensetzen weisen eine schwache Funktion bezüglich der Muskelrelaxation auf (Rudolph et al., 2004; Sieghart et al., 2005). Außerdem gibt es Hinweise für eine Involvierung dieses Rezeptor-Subtyps in der Entstehung von Angst. Inverse Agonisten, die selektiv für α 3-enthaltende Rezeptoren sind, führen Angst herbei (Atack et al., 2005; Wafford et al., 2004; Whiting 2003). Langen et al. hingegen haben festgestellt, dass Agonisten mit möglicher Selektivität für α 3-enthaltende Rezeptoren anxiolytische Effekte hervorrufen (Langen et al., 2005). Zur Klärung dieser Diskrepanz sind daher weitere Experimente nötig.

4.8.1.4. Effekte, die durch α 5-Rezeptor-Subtypen vermittelt werden

Eine Punktmutation, die für eine Blockade der Interaktion von Diazepam mit α 5-Rezeptor-Subtypen sorgt, beseitigt auch die erinnerungsbeeinträchtigen Effekte von Diazepam (Crestani et al., 2002; Yee et al., 2004). In ähnlicher Weise demonstrierten Collinson et al.,

dass Mäuse mit einem Mangel an $\alpha 5$ -Untereinheiten eine gesteigerte Lern- und Erinnerungsfähigkeit aufweisen (Collinson et al., 2002). Außerdem erzielen selektive, partielle, inverse Agonisten an $\alpha 5$ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren wahrnehmungssteigernde Fähigkeiten. Sie bewirken jedoch keine konvulsiven, prokonvulsiven oder anxiogenen Effekte (Chambers et al., 2004).

4.8.2. β -Rezeptor-Subtypen

4.8.2.1. Effekte, die durch $\beta 2$ -Rezeptor-Subtypen auftreten

Für die Erforschung der Funktion der verschiedenen β -Untereinheiten in GABA_A-Rezeptoren wurde eine ähnliche Herangehensweise gewählt, wie für die Untersuchung der α -Untereinheiten. Die Punktmutation $\beta 2(\text{Asn}265\text{Ser})$, die in Gene von $\beta 2$ -Untereinheiten induziert wurde, bewirkt, dass $\beta 2$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren weniger selektiv für das Injektionsnarkotikum Etomidat sind (Belelli et al., 1997; Hill-Venning et al., 1997; Reynolds et al., 2003). Dieser einzelne Aminosäure-Austausch hat keine Auswirkungen auf die normale GABAerge Funktion. Rezeptoren, die jedoch diese Mutation enthalten sind nicht mehr sensitiv für die sedativen, ataktischen und hypothermischen Effekte von Etomidat. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass diese Wirkungen durch $\beta 2$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren vermittelt werden. Diese Punktmutation beeinträchtigt aber nicht die anästhetischen Effekte von Etomidat, was bedeutet, dass diese Effekte durch andere β -Untereinheiten vermittelt werden (Sieghart, 2006).

4.8.2.2. Effekte, die durch $\beta 3$ -Rezeptor-Subtypen auftreten

Für die Untersuchung der Funktionen von $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren, wurde die Mutation $\beta 3(\text{Asn}265\text{Met})$ in $\beta 3$ -Untereinheiten von Mäusen generiert. Experimente zeigen, dass Etomidat und Propofol einen Verlust des Umkehrkorrektur-Reflexes bewirken. Die Dauer des Reflex-Verlustes in den Mutanten-Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den Wild-Typ Mäusen stark reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass $\beta 3$ -Untereinheiten in GABA_A-Rezeptoren die vorrangigen Mediatoren für die anästhetischen Effekte von Etomidat sind (Jurd et al., 2003).

4.9. Pharmakologie der GABA_A-Rezeptoren

Bei GABA_A-Rezeptoren ist nicht nur eine direkte Aktivierung oder Inhibition über die GABA-Bindungstasche möglich, es kann auch passieren, dass sie allosterisch moduliert werden. Im Folgenden sind Substanzklassen aufgezählt, die als solche Modulatoren agieren:

- Benzodiazepine
- Barbiturate
- Steroide
- Anästhetika
- Krampfgifte

Weiters existieren zahlreiche andere Substanzen, die allosterische Liganden an GABA_A-Rezeptoren darstellen (Korpi et al., 2002; Sieghart 1995).

Bisher konnten nur drei individuelle Bindungsstellen an GABA_A-Rezeptoren in Radioliganden-Bindungsstudien gut erforscht werden: die GABA/Muscimol-, die Benzodiazepin-, und die TBPS/Picrotoxinin-Bindungsstelle (Sieghart 1995). In diesen Studien konnte festgestellt werden, dass die Verbindungen mit den radioaktiv markierten Liganden kompetitiv interagieren. Dadurch konnte die Bindung mit den entsprechenden Stellen identifiziert werden. Die Interaktion aller anderen Verbindungen mit GABA_A-Rezeptoren kann nur durch Elektrophysiologie oder dem genauen Studieren der allosterischen Effekte dieser Substanzen, an der [³H]Muscimol-, [³H]Benzodiazepin- oder [³⁵S]TBPS-Bindungsstelle, erforscht werden. Diese Techniken klären jedoch nicht darüber auf, ob die allosterischen Effekte der unterschiedlichen Liganden über gleiche oder separate Bindungsstellen vermittelt werden. Somit weiß man bis dato nicht, wie viele allosterische Bindungsstellen an GABA_A-Rezeptoren tatsächlich existieren (Sieghart, 2006).

4.10. Agonisten, Antagonisten und inverse Agonisten an GABA_A-Rezeptoren

Verbindungen, die die Effekte von GABA verstärken, werden als allosterische Agonisten bezeichnet. Diese Verbindungen vermitteln angstlösende, antikonvulsive, muskelrelaxierende und sedativ-hypnotische Wirkungen. Verbindungen, die den GABA-induzierten Chlorid-Fluss allosterisch reduzieren, werden inverse Agonisten genannt. Diese bewirken genau den gegenteiligen Effekt als ein Agonist. Sie wirken anxiogen, prokonvulsiv

und verbessern Vigilanz, Lernen und Erinnerungsvermögen. Verbindungen, die als Antagonisten fungieren, stabilisieren den Zustand von GABA_A-Rezeptoren. Es kommt zu keiner direkten Änderung des GABA-induzierten Chlorid-Stroms. Antagonisten vermitteln in den meisten Fällen keine eigenen typischen Wirkungen, aber sie verhindern die Interaktion von Agonisten oder inversen Agonisten mit den Rezeptoren (Sieghart, 1995).

Zusätzlich zu vollen Agonisten und inversen Agonisten, die eine maximale Steigerung oder Reduktion von GABAergen Strömen erzeugen, gibt es Verbindungen, die schwächere Effekte vermitteln – diese werden als partielle Agonisten oder partielle, inverse Agonisten bezeichnet. Die Effizienz eines Agonisten oder inversen Agonisten kann an den verschiedenen Rezeptor-Subtypen unterschiedlich stark ausfallen. Eine Verbindung kann an einem Rezeptor-Subtyp als voller Agonist, hingegen an einem anderen Rezeptor-Subtyp als partieller Agonist agieren (Barnard et al., 1998; Hevers et al., 1998; Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993). Genauso besteht die Möglichkeit, dass sich eine Substanz an einem Rezeptor als partieller Agonist, an einem anderen hingegen als Antagonist oder partieller, inverser Agonist verhält (Hevers et al., 1998; Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993).

4.10.1. Die GABA-Bindungstasche

Bisher konnten mehrere Aminosäurereste identifiziert werden, welche für das Koppeln mit GABA oder Muscimol entscheidend sind (Smith et al., 1995). Wie bereits erwähnt befindet sich die GABA-Bindungstasche an der Kontaktstelle einer α - und einer β -Untereinheit. Bisher sind jedoch nur wenige Verbindungsklassen bekannt, die als Liganden an der GABA-Bindungstasche agieren (Frølund et al., 2002).

Studien an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren weisen darauf hin, dass bekannte, volle Agonisten (die eine ähnliche Effizienz wie GABA zeigen) oder Antagonisten keine signifikante Selektivität für die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten an der GABA-Bindungstasche zeigen (Adkins et al., 2001; Ebert et al., 1994; Lüddens et al., 1995). Der Einsatz dieser Substanzen ist mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden. Volle GABA-Agonisten, die die Cl⁻-Kanäle wahllos zum Öffnen bringen, bewirken eine Hemmung vieler neuronaler Systeme, welche mit der Funktion des Gehirns interferieren. GABA-Antagonisten bewirken in diesen Arealen das Auftreten von Angst und Krämpfen (Sieghart, 2006).

4.10.2. Interaktion von Benzodiazepinen mit GABA_A-Rezeptoren

Benzodiazepine wie Diazepam sind die stärksten antikonvulsiven, muskelrelaxierenden, sedativ-hypnotischen und anxiolytischen Verbindungen im klinischen Gebrauch (Woods et al., 1992). Sie steigern die Wirkung von GABA an GABA_A-Rezeptoren in dem sie die GABA induzierte Öffnungszeit von Cl⁻-Kanälen verlängern. Benzodiazepine modulieren diese Rezeptoren allosterisch (Study et al., 1981).

Benzodiazepine und andere Verbindungen, die mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle koppeln sind in der Lage die GABAerge Aktivität kontinuierlich zu regulieren. Diese Verbindungen können jedoch nicht den Influx von Cl⁻-Ionen bei Abwesenheit von GABA hervorrufen (Macdonald et al., 1994; Study et al., 1981). Eine weitere Eigenschaft der Benzodiazepine ist, dass sie einen extrem niedrigen Toxizitätsgrad aufweisen, was einer großen therapeutischen Breite gleichkommt.

Mutagenese-Studien haben auch hier zahlreiche Aminosäurereste an α - und γ 2-Untereinheiten rekombinanter GABA_A-Rezeptoren identifiziert, die für das Andocken von Benzodiazepinen und anderen Verbindungen, die mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle interagieren, wichtig erscheinen. In diesen Studien kam man zu dem Schluss, dass die Benzodiazepin-Bindungsstelle an der Kontaktstelle einer α - und γ 2-Untereinheit lokalisiert sein muss (Sigel, 2002). An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass Liganden existieren, die an die Benzodiazepin-Bindungsstelle andocken, trotzdem in der Lage sind, in Kontakt mit GABA_A-Rezeptoren zu treten, die lediglich aus α und β -Untereinheiten zusammengesetzt sind (Im et al., 1995; Khom et al., 2006; Thomet et al., 1999; Walters et al., 2000).

Die meisten der Rezeptorsubtyp-selektiven Verbindungen, die bisher identifiziert wurden, interagieren mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle von GABA_A-Rezeptoren. Da diese an der Kontaktstelle von α - und γ -Untereinheiten lokalisiert ist, sind die Bindungseigenschaften der Substanzen klarerweise von den Typen der Untereinheiten (α und γ) abhängig. Wie bereits erwähnt existieren im Nervensystem von Säugetieren sechs verschiedene α - und drei verschiedene γ -Untereinheiten, wodurch es möglicherweise 18 unterschiedliche GABA_A-Rezeptor-assoziierte Benzodiazepin-Bindungsstellen gibt. Die meisten Substanzen, die mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle in Kontakt treten, sind entweder inaktiv oder nur schwach aktiv an Rezeptoren, die γ 1-Untereinheiten enthalten (Hevers et al., 1998; Puia et al., 1991). Die gängigen Benzodiazepine (und auch andere Substanzen, die sich strukturell zwar von

Benzodiazepinen unterscheiden, dennoch mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle interagieren) vermitteln ihre Effekte in erster Linie via GABA_A-Rezeptoren, die eine Konstruktion folgender Untereinheiten aufweisen:

- $\alpha 1\beta 2$
- $\alpha 2\beta 2$
- $\alpha 3\beta 2$
- $\alpha 5\beta 2$

Diazepam, Bromazepam, Flunitrazepam oder Clonazepam, die zu den klassischen Benzodiazepinen zählen, koppeln nicht mit Rezeptoren, die die Untereinheiten $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 6\beta 2$ aufweisen (Hevers et al., 1998; Sieghart 1995; Wafford et al., 1996).

Imidazobenzodiazepine, wie z.B. Ro15-4513 oder Flumazenil interagieren dennoch mit GABA_A-Rezeptortypen die aus $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 6\beta 2$ Untereinheiten bestehen und auch mit den vier obig genannten Kompositionen (Huang et al., 2000; Sieghart, 1995; Zhang et al., 1995).

Nur einige Substanzen, die gängig eingesetzt werden, wie beispielsweise das sedativ-hypnotische Zolpidem koppelt bevorzugt an Rezeptoren, die $\alpha 1$ -Untereinheiten besitzen (Hevers et al., 1998). Hingegen ein anderer Ligand an der Benzodiazepin-Bindungsstelle, L-838,417 (triazolo[4,3-b]pyridazin), der als partieller Agonist fungiert, bevorzugt Rezeptoren, die $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Untereinheiten aufweisen. L-838,417 verstärkt also nicht die Antwort von GABA an $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren (McKernan et al., 2000).

Die Substanz SL651.498 bewirkt angstlindernde und muskelrelaxierende Effekte, ähnlich wie die Benzodiazepine, aber sie verursacht deutlich weniger unerwünschte Nebenwirkungen. SL651.498 verhält sich als voller Agonist an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mit $\alpha 2$ - oder $\alpha 3$ -Untereinheiten. An jenen, die $\alpha 1$ - oder $\alpha 5$ -Untereinheiten besitzen, verkörpert SL651.498 jedoch einen partiellen Agonisten (Griebel et al., 2003; Licata et al., 2005).

Wie sich aus den genannten Beispielen erkennen lässt, weisen die Verbindungen eine gewisse Affinität für Rezeptoren mit bestimmter Komposition an Untereinheiten auf bzw. kann eine einzige Substanz, abhängig von der Zusammensetzung der Untereinheiten, unterschiedliche Effekte auslösen.

4.10.3. Effekte von Barbituraten an GABA_A-Rezeptoren

In elektrophysiologischen Studien hat sich herausgestellt, dass Barbiturate, wie Pentobarbital, Phenobarbital oder Secobarbital, die Effekte von GABA steigern, indem sie die durchschnittliche Öffnungszeit des Chloridkanals verlängern. Allerdings haben sie keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit und Öffnungsfrequenz des Kanals (Study et al., 1981). Die Effekte von Barbituraten an GABA_A-Rezeptoren sind wie die der Anästhetika unterschiedlich stark ausgeprägt (Olsen, 1982). Bei größeren Konzentrationen als 50 µM sind Barbiturate sogar bei Abwesenheit von GABA in der Lage, den GABA_A-Rezeptor assoziierten Chloridkanal direkt zum Öffnen zu bringen (Hevers et al., 1998; Korpi et al., 2002; Sieghart 1995). Noch höhere Barbiturat-Konzentrationen führen zu einer Änderung des Desensibilisierungsgrades der Rezeptoren, was auf das Vorhandensein von mehreren Interaktionsstellen für Barbiturate an GABA_A-Rezeptoren deutet (Sieghart, 1995). Aufgrund von Studienergebnissen wird angenommen, dass die Bindungsstelle für sedativ-hypnotische Barbiturate eine andere ist, als jene für GABA, Benzodiazepine oder TBPS.

Barbiturate werden heute aufgrund von Problemen der Sicherheit in der Anwendung (geringe therapeutische Breite, starke Abhängigkeit) nur mehr für sehr spezielle Anwendungen verschrieben. Heutzutage kommen sie hauptsächlich als Sedativa und Antiepileptika, sowie zur Notfallbehandlung von Krampfanfällen, welche in Zusammenhang mit Tetanus oder Eklampsie stehen, zum Einsatz (López-Muñoz et al., 2005).

4.10.4. Interaktion von Anästhetika mit GABA_A-Rezeptoren

Eine Reihe von Anästhetika (Inhalations- und Injektionsnarkotika) aus unterschiedlichen chemischen Klassen modulieren ebenfalls GABA_A-Rezeptoren (Franks et al., 1994; Rudolph et al., 2004; Sieghart 1995). Inhalationsnarkotika, wie Isofluran, Enfluran oder Halothan, bewirken bei hohen mikromolaren bzw. niedrigen millimolaren Konzentrationen GABA-induzierte Chlorid-Ströme. Bei den gebräuchlicheren Anästhetika, wie Chlormethiazol oder Propofol, reichen für diesen Effekt bereits niedrige mikromolare Konzentrationen aus. Bei hohen Konzentrationen dieser Substanzen können sie, ähnlich wie Barbiturate, eine direkte Öffnung des GABA_A-Rezeptor-assoziierten Chloridkanals erzielen. Solch induzierte Chlorid-

Ströme können durch Picrotoxinin und Bicucullin, einem kompetitiven GABA-Antagonisten, aufgehoben werden (Hevers et al., 1998; Sieghart, 1995).

Das Binden von Anästhetika an GABA_A-Rezeptoren scheint von der Anwesenheit von β -Untereinheiten in den Rezeptoren abhängig zu sein. Die Lokalisation der Bindungsstelle konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Außerdem ist unklar, ob die verschiedenen Anästhetika, Barbiturate und Steroide ihre Effekte über dieselbe oder unterschiedliche Bindungsstellen vermitteln. Zusätzlich zu GABA_A-Rezeptoren interagieren Anästhetika auch mit Glutamat- und nACh-Rezeptoren (Franks et al., 1994; Hevers et al., 1998). Jedoch stellen GABA_A-Rezeptoren die wichtigsten Kandidaten für die Vermittlung von anästhetischen Effekten *in vivo* dar (Sieghart 2006).

4.10.5. Interaktion von Steroiden mit GABA_A-Rezeptoren

Verschiedene Steroide, wie das anästhetisch wirkende Alphaxalon, die sedativ-hypnotisch, anxiolytisch und antikonvulsiv wirkenden Metabolite von Progesteron und Desoxycorticosteron, stellen ebenfalls Modulatoren an GABA_A-Rezeptoren dar. Bei nanomolaren Konzentrationen bewirken sie einen GABA-stimulierten Chlorid-Fluss, bei Konzentrationen > 1 μ M erzeugen sie ähnlich wie die Barbiturate eine direkte Öffnung des GABA_A-Rezeptor-assoziierten Chlorid-Kanals. Aufgrund dessen werden zwei verschiedene Steroid-Bindungsstellen an GABA_A-Rezeptoren vermutet (Belelli et al., 2005; Lambert et al., 1995; Lambert et al., 2001; Sieghart 1995). Resultate von diversen Experimenten deuten auf eine separate Bindungsstelle für Steroide hin. Diese entspricht nicht der Bindungsstelle von GABA, Benzodiazepinen, Barbituraten oder TBPS (t-Butylbicyclophosphorothionat) (Belelli et al., 2005; Lambert et al., 2001; Sieghart 1995). Der Ort der Steroid-Bindungsstelle wurde bis jetzt noch nicht identifiziert (Sieghart, 2006).

Steroide, die mit dem Rezeptor interagieren erhöhen sowohl die Frequenz als auch die Dauer der Öffnung des Chlorid-Kanals (Peters et al., 1988).

Zusätzlich zu den obig genannten Steroiden, die die Effekte von GABA an GABA_A-Rezeptoren verstärken, existieren weitere Steroide, wie Pregnenolonsulfat und Dehydroepiandrosteron (DHEA), die an diesen Rezeptoren als nichtkompetitive Antagonisten agieren. Diese Stoffe inhibieren GABA-induzierte Chlorid-Ströme und zeigen exzitatorisches Potential an

Neuronen (Lambert et al., 2001; Sieghart, 1995). Auch in diesem Fall ist unklar, ob diese beiden Substanzen mit der gleichen oder mit unterschiedlichen Bindungsstellen koppeln, als die Steroide, die GABAerge Effekte an den Rezeptoren steigern (Sieghart, 2006). Neuroaktive Steroide sind auch befähigt homooligomere Rezeptoren, die sich aus β -Untereinheiten zusammensetzen, zu modulieren. Es sind weder α - noch γ -Untereinheiten für deren Interaktion mit GABA_A-Rezeptoren erforderlich (Sieghart, 1995). Mit Hilfe elektrophysiologischer Studien konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die Effekte der Neurosteroiden an synaptischen GABA_A-Rezeptoren in den verschiedenen Gehirnregionen relativ unterschiedlich ausfallen. Als Grund für diese verschiedenen Effekte werden mehrere Möglichkeiten diskutiert:

- Expression individueller GABA_A-Rezeptor-Subtypen
- Phosphorylierung
- örtlicher Steroid-Metabolismus

(Belelli et al., 2005; Lambert et al., 2001; Pinna et al., 2000).

In anderen Studien wird die Wichtigkeit von Rezeptoren, die aus δ -Untereinheiten bestehen, betont. In der Untersuchung von Mäusen, bei denen δ -Untereinheiten in den Rezeptoren fehlten, zeigten sich die Wirkungen von Neurosteroiden in drastisch reduziertem Ausmaß (Mihalek et al., 1999). Auch Stell et al. konnten nachweisen, dass Steroide bevorzugt δ -enthaltende-GABA_A-Rezeptoren stimulieren (Stell et al., 2003).

4.10.6. Die Bindungsstelle von TBPS (t-Butylbicyclophosphorothionat)

TBPS und Picrotoxinin sind Konvulsiva, die GABA-induzierten Chlorid-Fluss nicht-kompetitiv hemmen, indem sie an eine oder mehrere Stellen innerhalb oder nahe des Chloridkanals binden (Korpi et al., 2002). Die Bindung von [³⁵S]TBPS kann durch Picrotoxinin, Pentylentetrazol, konvulsive Barbiturate und wahrscheinlich auch durch eine Vielzahl von Insektiziden (z.B. Lindan oder Dieldrin) kompetitiv gehemmt werden (Maksay et al., 1985; Maksay et al., 1985a,b; Korpi et al., 2002). Außerdem kann die Bindung von TBPS allosterisch durch GABA selbst oder andere Agonisten an der GABA-Bindungstasche inhibiert werden. Andererseits wird das Koppeln von TBPS mit GABA_A-Rezeptoren durch die Anwesenheit anderer Konvulsiva, wie z.B. β -Carbolinen, erleichtert (Korpi et al., 2002; Sieghart, 1995).

Diese Ergebnisse stimmen mit der Annahme überein, dass die hochaffine TBPS-Bindungsstelle mit der geschlossenen Konformation des Chloridkanals assoziiert sein muss, was bedeutet, dass TBPS in seiner Bindungstasche eingeklemmt wird (Sieghart, 2006).

4.11. Ethanol

Obwohl Ethanol die meist missbrauchte psychoaktive Droge darstellt, sind seine Effekte auf Gehirnfunktionen wenig erforscht. Eine Vielzahl von Rezeptoren wird durch Ethanol funktionell modifiziert. Dazu gehören Glutamat-, Serotonin-, Glycin- und GABA_A-Rezeptoren, sowie die K⁺_(ir)-Kanäle. Effekte von Ethanol an diesen Targets konnten allerdings nur bei ziemlich hohen Konzentrationen (> 60 mM) registriert werden. Ethanol ist zehnmal mehr effektiv an GABA_A-Rezeptoren der Konstellation $\alpha 4\beta\delta$ bzw. $\alpha 6\beta\delta$, die $\beta 2$ - Untereinheiten anstelle von $\beta 3$ -Untereinheiten aufweisen. Diese Rezeptoren sind wahrscheinlich extrasynaptisch lokalisiert. Es besteht die Möglichkeit, dass Ethanol in niedriger Konzentration primär via extrasynaptische Rezeptoren ($\alpha 4\beta 3\delta$ oder $\alpha 6\beta 3\delta$) tätig ist (Sundstrom-Poromaa et al., 2002; Wallner et al., 2003).

4.12. Andere Substanzklassen, die Interaktionen mit GABA_A-Rezeptoren eingehen

4.12.1. Substanzen mit Affinität zu α -enthaltenden Rezeptoren

4.12.1.1. Diuretika

Manche Substanzklassen, wie beispielsweise Diuretika, interagieren mit neuartigen, bisher nicht identifizierten Bindungsstellen an GABA_A-Rezeptoren, die α -Untereinheiten enthalten. Korpi et al. haben herausgefunden, dass das Schleifendiuretikum Furosemid eine 100-fach höhere Selektivität für $\alpha 6$ - als für $\alpha 1$ - enthaltende Rezeptoren aufweist (Korpi et al., 1995). Diese Substanz hemmt neben $\alpha 6$ - auch $\alpha 4$ -enthaltende Rezeptoren, allerdings in einem geringeren Ausmaß (Knoflach et al., 1996; Korpi et al., 1997).

In ähnlicher Weise agiert auch das kaliumsparende Diuretikum Amilorid mit GABA_A-Rezeptoren, die α -Untereinheiten aufweisen. Es zeigt keine Abhängigkeit von β - oder γ -Untereinheiten (Fisher, 2002).

4.12.1.2. γ -Butyrolactone

γ -Butyrolactone verstärken in $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -transfizierten Zellen und Neuronen des Kleinhirns GABA-Antworten. Diese Effekte zeigten sich jedoch nicht in $\alpha 6\beta 2\gamma 2$ -transfizierten Zellen (Mathews et al., 1994).

4.12.1.3. Antibiotika

Ein Analogon des Antibiotikums Norfloxacin (Abb. Nr. 17) zeigt Effekte an $\alpha 2\beta 2\gamma 2L$ -Untereinheiten, welche in HEK-293-Zellen exprimiert werden. Diese Substanz scheint GABA_A-Rezeptoren über eine unerforschte Bindungsstelle (die nicht der von TBPS, GABA, Benzodiazepinen, Barbituraten, Neurosteroiden, etc. entspricht) zu modulieren. Dieses Norfloxacin-Analogon induziert anxiolytische Effekte mit einer maximalen Effizienz, wie man sie von Diazepam kennt. Anders als Diazepam, erzeugt diese Substanz jedoch keine ZNS-dämpfenden Wirkungen bei mehreren getesteten Dosen (Johnstone et al., 2004).

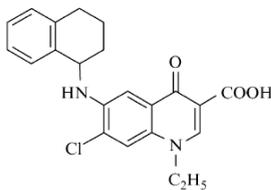


Abb. Nr. 17: Analogon von Norfloxacin (Sieghart, 2006).

4.12.2. Substanzen mit Affinität zu β -enthaltenden Rezeptoren

4.12.2.1. Loreclezol, Etomidat, DMCM, Furosemid

Verschiedene Studien zeigten, dass das Antikonvulsivum Loreclezol, das Hypnotikum Etomidat, das β -Carbolin DMCM (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carbolin-3-carboxylat) und das Diuretikum Furosemid eine höhere Affinität zu $\beta 2$ - bzw. $\beta 3$ -enthaltenden Rezeptoren aufweisen als zu $\beta 1$ -enthaltenden Rezeptoren (Wafford et al., 1994; Beelli et al., 1997).

4.12.2.2. NSAR

Verschiedene nicht-steroidale-antirheumatische Substanzen wie Mefenaminsäure, Flufenaminsäure, Tolfenaminsäure, Nifluminsäure oder Diflunisal, zeigen unterschiedliche Effizienz und Potenz an GABA_A-Rezeptoren, die β 2- oder β 3-Untereinheiten besitzen. An Rezeptoren, bestehend aus β 1-Untereinheiten, agieren diese Substanzen als Antagonisten oder inverse Agonisten (Smith et al., 2004).

Weiters existieren noch andere Substanzen, die mit GABA_A-Rezeptoren interagieren. Da diese nicht in Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen, werden sie hier nur zur Vervollständigung erwähnt und nicht näher beschrieben.

In früheren Studien wurde festgestellt, dass auch Avermectin (Antibiotikum), Melatonin, Polyamine, Antidepressiva, Clozapin (Neuroleptikum), Mutterkornalkaloide und Antiepileptika, wie Carbamazepin oder Phenytoin mit GABA_A-Rezeptoren interagieren (Hevers et al., 1998; Korpi et al., 2002; Sieghart 1995).

Außerdem stellen zweiwertigen Kationen Liganden an diesen Rezeptoren dar: Zn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ und Co²⁺. Für diese wurden mehrere Bindungsstellen an GABA_A-Rezeptoren identifiziert (Fisher et al., 1998; Horenstein et al., 1998; Hosie et al., 2003; Korpi et al., 2002; Sieghart 1995). Auch dreiwertige Kationen wie La³⁺ und Lanthanoide und Anionen wie Cl⁻ sind in der Lage GABA_A-Rezeptoren zu modulieren (Korpi et al., 2002; Sieghart, 1995).

4.13. Liganden pflanzlichen Ursprungs

Viele Substanzen, die primär zur Erforschung von GABA-Rezeptoren eingesetzt wurden, sind pflanzlichen Ursprungs. Dazu zählen beispielsweise die Antagonisten Bicucullin (aus *Dicentra cucullaria* – Kapuzen-Herzblume) und Picrotoxin (aus *Anamirta cocculus* - Scheinmyrte), sowie der Agonist Muscimol (aus *Amanita muscaria* - Fliegenpilz). Mittlerweile ist ein breites Spektrum an Pflanzeninhaltsstoffen bekannt, die ionotrope GABA-Rezeptoren modulieren. Die meisten dieser Substanzen sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wodurch sie Einfluss auf Gehirnfunktionen haben (Johnston et al., 2006). Selbst GABA stellt einen wichtigen Pflanzeninhaltsstoff dar (Bouche et al., 2004).

In der heutigen Gesellschaft ist die Nachfrage für Phytopharmaka und ‚functional food‘ stark gestiegen. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich, dass noch immer die weit verbreitete Meinung existiert, dass „natürliche Substanzen“ grundsätzlich sicherer sind als synthetisch hergestellte Stoffe. Viele toxische Chemikalien sind jedoch pflanzlichen Ursprungs und der Großteil der Therapeutika wird durch chemische Synthese gewonnen. Für den Therapieerfolg ausschlaggebend ist jedoch die molekulare Struktur und die Dosis einer Substanz, nicht ob sie synthetischen oder pflanzlichen Ursprungs ist (Topliss et al., 2002).

4.13.1. Flavonoide

Obst, Gemüse sowie sämtliche Getränke (z.B. Tee und Rotwein) sind Hauptquellen für Flavonoide (Aherne et al., 2002). Viele Flavonoide sind Polyphenole, welche starke Antioxidantien darstellen (Heim et al., 2002). Ursprünglich wurden sie in Verbindung mit GABA_A-Rezeptoren gebracht, als drei Isoflavane eine Hemmung von Diazepam zeigten (Luk et al., 1983). Das potenteste dieser war 3',7-Dihydroxyisoflavan. Daraufhin wurden viele Flavonoide direkt aus Pflanzen isoliert (siehe Abb. Nr. 18), welche die Bindung von Benzodiazepinen an neuronalen Membranen beeinflussen (Marder et al., 2002). Dazu zählen 3',7-Dihydroxyisoflavan, Amentoflavan, Apigenin, 6-Methylapigenin und Oroxylin A.

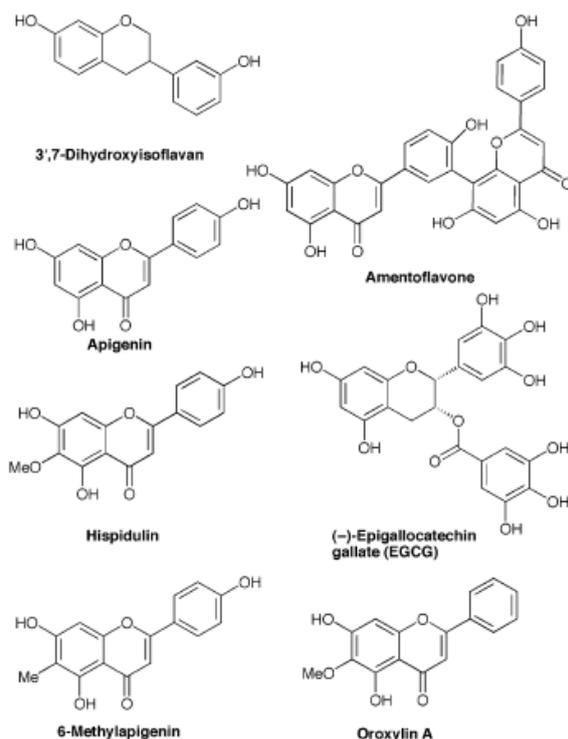


Abb. Nr. 18: Strukturformeln einiger ausgewählter Flavonoide (Johnston et al., 2006).

Amentoflavon und Apigenin agieren als negative Modulatoren, Hispidulin stellt einen positiven Modulator an GABA_A-Rezeptoren dar (Johnston et al., 2006).

Apigenin ist ein Flavonoid, das in zahlreichen Pflanzen vorkommt, beispielsweise in der Kamille (*Matricaria recutita*). Es zeigt bei Mäusen im Elevated-Plus-Maze eindeutig anxiolytische Effekte. Die klassischen Benzodiazepin-Wirkungen, wie Sedierung, Muskelrelaxierung, werden allerdings nicht durch Apigenin vermittelt (Viola et al., 1995).

Hispidulin wurde gemeinsam mit Apigenin aus Salbei (*Salvia officinalis*) isoliert. Es hat einen 30mal stärkeren Effekt als Apigenin (Kavvadias et al., 2003).

4.13.2. Phenolische Substanzen

Die Rinden und Stängel verschiedener Magnolia-Arten werden in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) schon lange zur Behandlung von Erkrankungen, wie Angststörungen, eingesetzt. Die Biphenole Honokiol und dessen Isomer Magnolol (Abb. 19) bewirken im ZNS muskelrelaxierende und sedative Effekte. Von den Substanzen, die aus *Magnolia officinalis* isoliert wurden, erwies sich Honokiol am wirksamsten (Kuribara et al., 1999). Dieses Biphenol ist in der Lage, GABA_A-Rezeptoren *in-vitro* zu modulieren (Ai et al., 2001; Squires et al., 1999). Taferner et al. untersuchten Derivate und Analoga von Honokiol an verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Subtypen, welche in *Xenopus-laevis*-Oozyten exprimiert wurden. Dabei erwiesen sich zwei der untersuchten Verbindungen als stärkere Modulatoren als Honokiol. Außerdem zeigten diese eine Subtyp-Selektivität für $\alpha 2$ - bzw. $\alpha 3$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren (Taferner et al., 2011).

Auch im Elevated-Plus-Maze zeigen sich bei niedriger Honokiol-Dosis anxiolytische Effekte bei Mäusen. Der anxiolytische Effekt wird durch den Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil und den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin aufgehoben. Der Vorteil dieses Biphenols gegenüber Diazepam ist, dass es bei anxiolytischer Dosis weder physische Abhängigkeit, Depressionen noch Amnesie hervorruft (Kuribara et al., 1999).

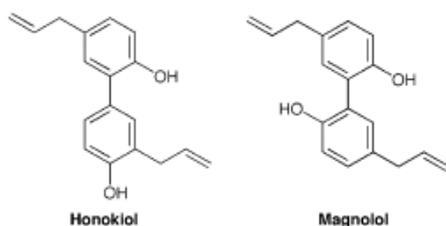
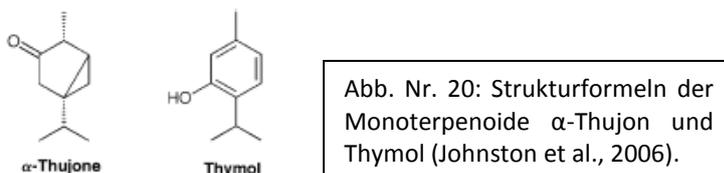


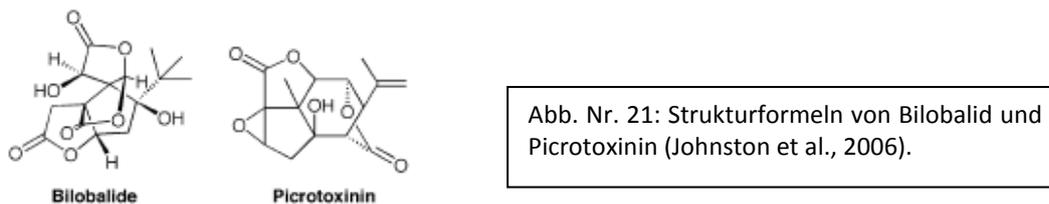
Abb. Nr. 19: Strukturformeln der Biphenole (Johnston et al., 2006).

4.13.3. Terpenoide

Terpenoide kommen sehr häufig in Pflanzen vor, speziell in ätherischen Ölen. Das am häufigsten eingesetzte Terpenoid bei Studien an GABA_A-Rezeptoren ist das Sesquiterpen-Lacton Picrotoxinin. Es stellt einen nicht-kompetitiven Antagonist an GABA_A-Rezeptoren dar (Chebib et al., 2000). α -Thujon (Abb. 20), ein Inhaltsstoff in *Artemisia absinthium*, ist ein Konvulsivum, welches einen negativen, allosterischen Modulator an GABA_A-Rezeptoren darstellt (Hold et al., 2000). Das strukturell ähnliche Thymol (Abb. 20) wirkt hingegen als positiv, allosterischer Modulator (Priestley et al., 2003).



Bilobalid, ein Sesquiterpen-Lacton aus *Ginkgo biloba*, weist strukturelle Ähnlichkeiten zu Picrotoxinin auf. Es agiert als Antagonist an GABA_A-Rezeptoren. Sowohl Bilobalid, als auch Picrotoxinin (Abb. Nr. 21) scheinen innerhalb des Chloridkanals mit dem Rezeptor zu koppeln, weshalb sie negative, allosterische Modulatoren darstellen (Huang et al., 2003). Picrotoxinin ist ein Konvulsivum, Bilobalid hingegen ein Antikonvulsivum (Sasaki et al., 1999a). Bilobalid wirkt wahrscheinlich wegen der Hemmung der Glutamat-Freisetzung antikonvulsiv. Das Fehlen der konvulsiven Wirkung einer Substanz, scheint für die Verbesserung der Gedächtnisleistung sehr wichtig zu sein (Jones et al., 2002).



4.13.3.1. Valerensäure

Valerensäure (VA) (Abb. 22), ein Sesquiterpen, wirkt an GABA_A-Rezeptoren als partieller Agonist (Yuan et al., 2004). Sie wird als die am stärksten wirksame Komponente von Baldrianextrakten in der Pflanzenheilkunde betrachtet. *In vivo* reduziert sie

nachgewiesenermaßen ängstliches Verhalten (Benke et al., 2009). VA kommt nur in *Valeriana officinalis* vor. In den häufiger verbreiteten Spezies *Valeriana wallichii* und *Valeriana edulis* ist sie nicht vorhanden (Fernandez et al., 2004).

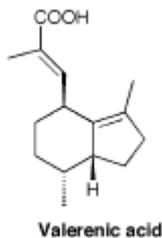


Abb. Nr. 22: Strukturformel der Valerensäure (Johnston et al., 2006).

Valerensäure stellt einen Untereinheit-selektiven Modulator an GABA_A -Rezeptoren, welche β 2- bzw. β 3-Untereinheiten besitzen, dar. An β 1-enthaltenden Rezeptoren hat sie jedoch, außer bei sehr hohen Konzentrationen, keinen signifikanten Effekt auf GABA-induzierte Chloridströme (Khom et al., 2007). Khom et al. synthetisierten zehn Valerensäurederivate, wobei die Carboxylgruppe der VA modifiziert wurde. Diese Derivate wurden anschließend sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Valerensäure wurde mit verschiedenen Amiden unterschiedlicher Lipophilie und Sperrigkeit, konjugiert. Alle diese Derivate bewirkten eine Steigerung des GABA-induzierten Chloridstroms. *In vitro* bewirken jedoch kurzkettige, aliphatische VA-Amide, wie VA-Methylamid und VA-Ethylamid, einen stärkeren GABA-induzierten Chloridstrom als Valerensäure selbst.

Das unsubstituierte VA-Amid stellte sich als effektivste Substanz *in vitro* heraus. Auch *in vivo* (bei Mäusen im Elevated Plus Maze) zeigte es die stärkste anxiolytische Wirkung (Khom et al., 2010).

4.14. Gating-Mechanismus von GABA_A -Rezeptoren

Wie alle Liganden-gesteuerten Ionenkanäle wandeln auch GABA_A -Rezeptoren chemische in elektrische Signale um. In weniger als einer Millisekunde wird durch das Andocken von zwei winzigen GABA-Molekülen, zwischen den α - und den β -Untereinheiten eine Konformationsänderung im oligomeren Rezeptor induziert. Aufgrund dessen resultiert eine Öffnung der zentralen Pore des Ionenkanals (Baumann et al., 2003). Dieser bemerkenswerte Prozess wird als „Gating“ bezeichnet (Xiu et al., 2005).

Die Basis für ein Modell wie Gating funktioniert ist, dass spezifische Ionenpaare präzise Kontrolle über den Gating-Mechanismus ausüben (Kash et al., 2003; Xiu et al., 2005). Im Fall von GABA_A-Rezeptoren sind an diesem Mechanismus zwei flexible Loops in Membrannähe, Loop 2 und Loop 7 (=Cys-Loop), involviert. Kash et al. kreierten ein „Ionenpaar-Modell“, welches durch spezifische Mutagenese in der α 1-Untereinheit von GABA_A-Rezeptoren entdeckt wurde. Es wurde herausgefunden, dass für optimales Gating elektrostatische Interaktionen zwischen negativ geladenen Resten in Loop 2 und 7 (Asp57 und Asp149) und einem positiv geladenen Rest in der Region, die TM2 und TM3 (Lys279) verlinkt, nötig sind. In der β 2-Untereinheit von GABA_A-Rezeptoren sind Interaktionen zwischen einem sauren Rest in Loop 7 (Asp146) und einem basischen Rest in der Pre-Transmembran-Domäne-1 (Lys215) von Bedeutung. Sie verhelfen dem Agonisten zum Koppeln mit dem Rezeptor (Kash et al., 2004).

Xiu et al. sind jedoch der Ansicht, dass kein spezifisches Ionenpaar das Gating beeinflusst, sondern dass eine Gruppierung von Ladungen entscheidend für das Funktionieren von Gating ist (Xiu et al., 2005).

Es wurde auch angenommen, dass beim Gating eines Liganden an GABA_A-Rezeptoren, eine so genannte „Pin-into-socket“-Interaktion auftritt. Diese Annahme entstand, als die Struktur des ACh-Rezeptors von *T. marmorata* publiziert wurde (Miyazawa et al. 2003). Die „Pin-into-socket“-Interaktion beeinflusst das Gating beim ACh-Rezeptor. Die Autoren suggerieren, dass sich Loop 2 in einer Position befindet, die es ihm ermöglicht an eine hydrophobe Stelle zu docken, welche durch die End-Reste (Ser269–Pro272 in der α -Untereinheit) der M2-Domäne gebildet wird. Dieser „Pin-into-socket“-Mechanismus wurde auch an Glycin- und GABA_A-Rezeptoren untersucht. Der „Pin“ in ACh-Rezeptoren stellt Val46 in Loop 2 der α -Untereinheit dar. Weitere Untersuchungen zeigen jedoch, dass äquivalente „Pin“-Reste in GABA_A- und Glycin-Rezeptoren keine ausschlaggebenden Faktoren im Gating-Prozess darstellen (Cederholm et al., 2009).

4.15. Involvierung des GABAergen Systems in der Pathogenese diverser Krankheitsbilder

Die Funktion des ZNS basiert auf einer ausgewogenen Balance zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission. Wie bereits erwähnt, sind hauptsächlich GABAerge Neurone für die inhibitorische Kontrolle verantwortlich. Wenn jedoch diese Balance zugunsten der GABAergen Transmission nicht aufrechterhalten werden kann, kommt es zum Auftreten von Anxiolyse, Sedierung, Amnesie, Ataxie und zum Verlust des Bewusstseins. Andererseits kommt es bei Dämpfung des GABAergen Systems zu Erregungs-, Angst- und Unruhezuständen, Schlaflosigkeit, gesteigerter Reaktivität oder auch zu epileptischen Anfällen. Diese pharmakologischen Erscheinungen deuten darauf hin, dass die inhibitorische Neurotransmission bei Erkrankungen des ZNS involviert ist. Ein GABAerges Defizit ist sehr wahrscheinlich die Ursache für Insomnie, Angststörungen, Epilepsie und Schizophrenie (Möhler, 2002; Möhler et al., 2005; Olsen et al., 1999). Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass auch eine genetische Prädisposition, neben einem Defizit an GABA_A-Rezeptoren, das Auftreten von Angst- und Panikzuständen, Insomnie, sozialen Störungen, Depressionen, affektiven Störungen und Alkoholabhängigkeit begünstigt (Feusner et al., 2001; Loh et al., 2000; Parsian et al., 1999; Taylor et al., 2003).

4.15.1. Angst und Depressionen

Angst und Depression sind sowohl bei Menschen, als auch bei Tieren das Resultat von periodisch wiederkehrendem Stress. Der Mechanismus für die Entstehung von Angst ist dazu gedacht, unseren Fokus schnell auf eine drohende Gefahr zu lenken. Außerdem wird durch diesen Mechanismus unser Verhalten so beeinflusst, dass wir uns unverzüglich dieser Bedrohung abwenden. Die Emotion Angst veranlasst zur Risikoabwägung bei auftretender Gefahr. Aufgrund der Ungewissheit über die Konsequenzen der Gefahr, werden wir in einen zerstreuten Zustand versetzt, was zu Übererregbarkeit führt (Baldwin et al., 2005; Baldwin et al., 2010). In Studien wurde außerdem erkannt, dass ängstliche Individuen dazu neigen, emotional unklare Impulse als Bedrohung zu interpretieren (Bishop, 2007).

Angststörungen lassen sich in fünf Typen kategorisieren:

- Generalisierte Angststörungen
- Panikstörungen
- Zwangsneurosen
- Soziale Phobien
- Posttraumatische Psychosen

Spezifische Phobien werden gesondert betrachtet (American Psychiatry Association, 1994).

Manische Depressionen sind komplexe, weitläufige Erkrankungen, welche ein breites Spektrum an Anomalien inkludieren, wie zum Beispiel, gedrückte Stimmung, Anhedonie, Schlafstörungen, Abgeschlagenheit, Verlust der Selbstschätzung, negatives Denken oder Selbstmordgefährdung (Anderson et al., 2008). Angststörungen und Depressionen überlappen sich und treten häufig gemeinsam auf; es liegt eine hohe Co-Morbidität vor (Roy et al., 1995). Bemerkenswert ist, dass sowohl die Symptome von Angst, als auch von Depression durch die selbe Therapie (z.B. durch SSRIs, Benzodiazepine) gelindert werden können (Baldwin et al., 2005; Anderson et al., 2008). Dies weist darauf hin, dass gemeinsame neurobiologische Dysfunktionen bei der Entstehung beider Krankheitsbilder involviert sind. Störungen im GABAergen System spielen hierbei eine wichtige Rolle (Möhler, 2012).

Das GABAerge System ist bei der Entstehung von Angstzuständen stark integriert. Die Wirkung von Pentylentetrazol beruht auf einer Hemmung der Funktion von GABA_A-Rezeptoren. Durch dessen Anwendung werden extreme Angstzustände sowie traumatische Erinnerungen hervorgerufen (Kalueff et al., 1997). Hingegen führt eine Steigerung der GABAergen Transmission (z.B. durch Benzodiazepine) zu einer Hemmung der Angstentstehung (Möhler, 2006).

Bei vielen Patienten mit Angststörungen wurde ein Mangel an GABA_A-Rezeptoren festgestellt. Diese Tatsache wurde in einem Tiermodell reproduziert. Die γ 2-Untereinheit ist dafür verantwortlich, dass die GABA_A-Rezeptoren in der subsynaptischen Membran verankert werden. Als man bei Mäusen die Menge an Genen für die γ 2-Untereinheit reduzierte, konnte festgestellt werden, dass sich deutlich weniger GABA_A-Rezeptoren an den

neuronalen Membranen angesammelt hatten. Ein solches Rezeptor-Defizit konnte auch in anderen Gehirnregionen (Großhirnrinde, Corpus amygdaloideum und Hippocampus), die bei Angstprozessen involviert sind, festgestellt werden. Der Corpus amygdaloideum besteht vorwiegend aus GABA-Neuronen. Riorelli et al. stellten fest, dass $\alpha 3$ -Knockout-Mäuse depressives Verhalten äußerten (Riorelli et al., 2008). GABAerge Inhibierung wird hauptsächlich über $\alpha 2$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren bewirkt. Wie bereits erwähnt, wird durch diesen Rezeptortyp Anxiolyse vermittelt. Aufgrund dessen, stellt der Corpus amygdaloideum ein wesentliches Ziel für Benzodiazepin-induzierte Anxiolyse dar (Marowsky et al., 2004; Löw et al., 2000). Das GABAerge System bietet also sowohl für Angststörungen, als auch für Depressionen neue therapeutische Möglichkeiten, welche auf selektiven $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -GABA_A-Rezeptor-Modulatoren basieren (Möhler 2012). Durch deren Einsatz ließen sich die üblichen Nebenwirkungen der klassischen Benzodiazepine, wie Sedierung und Abhängigkeit, vermeiden (Anderson et al., 2008).

4.15.2. Epilepsie

Epileptische Anfälle können als krampfartige, stark synchrone, elektrische Entladungen im Gehirn beschrieben werden. Diese sind die Folge von starker Erregung oder zu geringer Inhibition in der Region, der eine solch krankhafte Entladung entspringt.

Klinische Untersuchungen weisen darauf hin, dass GABA sowohl bei der Pathogenese als auch bei der Therapie von Epilepsie eine wichtige Rolle spielt. Diese Tatsache beruht auf folgenden Erkenntnissen:

- In Tiermodellen mit genetisch bedingter als auch erworbener Epilepsie, konnten Anomalien in GABAerger Funktion festgestellt werden.
- Bei Epilepsie liegt nachgewiesenermaßen eine herabgesetzte GABA-vermittelte Inhibierung und reduzierte Glutamat-Decarboxylase-Aktivität vor; folglich konnten nur geringe GABA-Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit gefunden werden.
- GABA-Agonisten unterdrücken Krämpfe, GABA-Antagonisten verursachen sie.
- Pharmaka, die die Synthese von GABA hemmen, bewirken ebenfalls Krämpfe.
- Effektive Antikonvulsiva, wie Benzodiazepine oder Barbiturate, steigern GABA-vermittelte Inhibierung (Treiman, 2001).

During et al. haben herausgefunden, dass auch die Zahl der GABA-Transporter im Hippocampus von Epileptikern stark reduziert ist, sodass die nicht-vesikuläre GABA-Freisetzung im Hippocampus von Epileptikern nicht so kräftig ausfällt als bei Gesunden. Die unzureichenden Mengen an GABA führen in der Folge zum Auftreten von Krämpfen (During et al., 1995).

Bei der Therapie der Epilepsie kommen, neben klassischen Antiepileptika, auch Vigabatrin und Tiagabin zum Einsatz. Diese wurden speziell dazu entwickelt, um die synaptische GABA-Konzentration zu erhöhen und somit die Entstehung von Krämpfen zu vermeiden.

Vigabatrin ist ein irreversibler Inhibitor der GABA-Transaminase, welche für den Abbau von GABA zu Succinatsemialdehyd zuständig ist. Tiagabin bewirkt hingegen die Reuptake-Hemmung von GABA in die Neuronen und Gliazellen. Obwohl sich diese beiden Pharmaka im Wirkungsmechanismus (Abb. Nr. 23) unterscheiden, bewirken sie beide auf unterschiedliche Art und Weise einen Anstieg der GABA-Konzentration im Gehirn (Treiman, 2001).

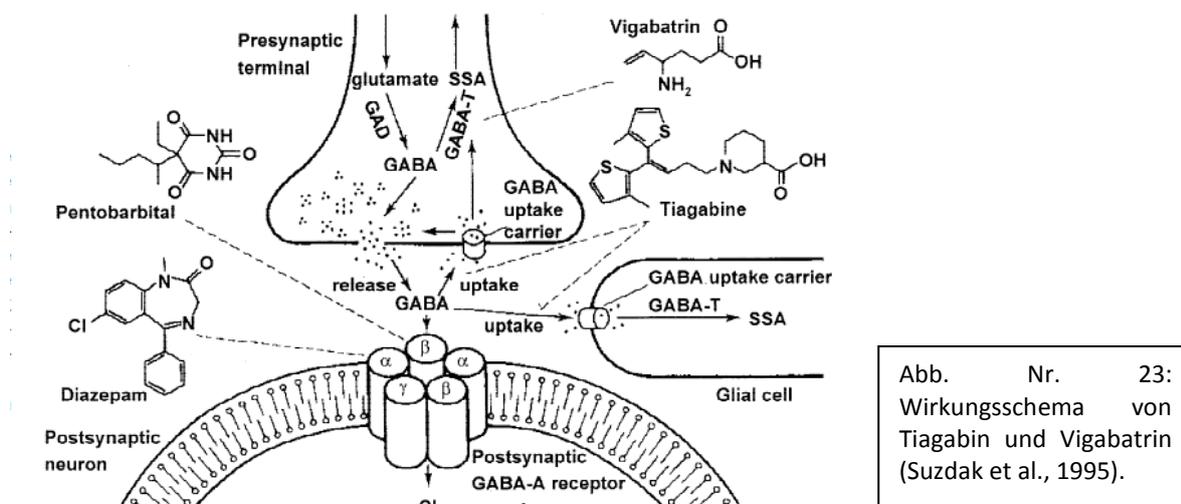


Abb. Nr. 23:
Wirkungsschema von
Tiagabin und Vigabatrin
(Suzdak et al., 1995).

4.15.3. Die Rolle von GABA bei Schizophrenie

Allgemein kann man Schizophrenie als eine krankhafte, kognitive Störung bezeichnen, die ca. bei 1% der Bevölkerung vorkommt. Zum Auftreten des Krankheitsbildes kommt es meist in der späten Jugend bzw. im frühen Erwachsenenalter. Bisher gibt es keine Beweise, dass Schizophrenie aufgrund von Kindheitstraumen oder Stress auftritt. Vielmehr scheinen fundamentale Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen (Hall, 1998).

Die neuronalen Mechanismen, die bei Schizophrenie stattfinden, sind derzeit noch unbekannt. Eine Hypothese besagt jedoch, dass sich eine verringerte neuronale GABA-Konzentration und reduzierte Neurotransmission in kognitiven Beeinträchtigungen niederschlagen, wie sie bei Schizophrenie der Fall sind. Diese Hypothese wurde in zahlreichen *in vivo* Studien untersucht, wobei Vergleiche mit gesunden Probanden durchgeführt wurden. Yoon et al. haben festgestellt, dass Schizophrene um ca. 10% geringere GABA-Konzentrationen aufweisen, als Gesunde. Die Folge davon ist eine reduzierte neokortikale GABA-Transmission, welche eine Beeinträchtigung von kognitiven Prozessen bewirkt. Aufgrund dessen existiert eine direkte Verknüpfung zwischen Störungen des GABA-Systems und kognitiven Defiziten bei Schizophrenen (Yoon et al., 2010).

4.15.4. Schlafstörungen

Eine störungsfreie GABAerge Transmission im thalamokortikalen Kreislauf ist die Voraussetzung für die Generierung von Tiefschlafphasen, welche ein Merkmal für physiologischen Schlaf darstellen. Hingegen ist ein GABAerges Defizit mit Insomnie verknüpft. Dies wurde bei einem Patienten mit heterozygoter Mutation der $\beta 3$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors festgestellt (Buhr et al., 2002). Rekombinante, humane $\alpha 1\beta 3(R192H)\gamma 2S$ -GABA_A-Rezeptoren zeigten in Untersuchungen eine langsamere Desensibilisierungsphase als $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren. Außerdem fand die Deaktivierung in mutierten Rezeptoren schneller statt. Diese Befunde sprechen für eine eventuell verringerte GABAerge Inhibierung, welche zur Insomnie beiträgt (Möhler, 2006).

Dass GABAerge Inhibierung in Zusammenhang mit Schlaf steht, wird weiters dadurch bestätigt, weil durch die Gabe von Liganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle störungsfreier Schlaf ermöglicht wird. Klassische Hypnotika bewirken eine Unterdrückung der REM-Phase und Frequenzänderungen im EEG (Reduzierung der Tiefschlafphasen). Dieser Effekt wird durch GABA_A-Rezeptoren, bei denen die $\alpha 1$ -Untereinheit fehlen, vermittelt (Tobler et al., 2001).

Für die Behandlung von Insomnie wurde nach Substanzen gesucht, welche vergleichbare EEG-Muster erzeugen, wie sie bei physiologischem Schlaf der Fall sind. Benzodiazepine sind für die Therapie der Insomnie ungeeignet, da sie starke Veränderungen im EEG induzieren. Man ist jedoch auf das GABA-Mimetikum Gaboxadol (THIP - 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo-

[5,4-c]pyridin-3-ol) gestoßen, das *in vitro* bevorzugt mit $\alpha 4\beta 3\delta$ -GABA_A-Rezeptoren interagiert und *in vivo* das Auftreten von Tiefschlafphasen begünstigt (Brown et al., 2002; Lancel et al., 1999; Stornstovu et al., 2003).

4.15.5. Involvierung des GABA-Systems bei Alkoholismus

Übermäßiger Alkoholkonsum kann unterschiedliche Verhaltensmuster zur Folge haben, wie zum Beispiel kognitive Beeinträchtigungen, Koordinationsschwierigkeiten, Toleranz und Abhängigkeit. Diese Effekte treten aufgrund komplexer Aktionen im Gehirn auf, an denen zahlreiche Proteine beteiligt sind (Davies, 2003; Follesa et al., 2006; Harris 1999; Krystal et al., 2006). Ein bevorzugtes Target von Ethanol stellt der GABA_A-Rezeptor dar (Barnard et al., 1998).

Bei der „Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism“ (COGA) wurden humane Allel-Variationen untersucht, sowie morphologische, physiologische und psychologische Daten von Alkoholikern gesammelt, um Gene zu identifizieren, die das Risiko für Alkoholismus erhöhen. Dabei wurden mehrere Cluster von GABA_A-Rezeptoren identifiziert, die im Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit stehen: Es wurde eine Region auf Chromosom 4p mit Alkoholismus assoziiert. Diese enthält Gene, welche für die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\gamma 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ und $\beta 1$ codieren (Reich et al., 1996; Reich et al., 1998). Weiters wurden Gen-Cluster für GABA_A-Rezeptoren an Chromosom 5 und Chromosom 15q gefunden, die ebenfalls mit Alkoholismus assoziiert werden (Dick et al., 2004).

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass das GABA-System möglicherweise an der Regulierung des Alkoholkonsumverhaltens und der Entstehung von Abhängigkeit beteiligt ist. Aufgrund dessen, könnte in Zukunft der GABA_A-Rezeptor als Target für die Therapie von Alkoholismus betrachtet werden (Lobo et al., 2008).

B) PRAKTISCHER TEIL

5. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Angst- und Schlafstörungen werden heutzutage sowohl in den USA als auch in Europa zu den am häufigsten auftretenden neuropsychiatrischen Erkrankungen gezählt (Andlin-Sobocki et al., 2005; Kessler et al., 2005). Solch seelische Erkrankungen stellen einige der großen Gesundheitsprobleme in der westlichen Welt dar, welche nicht nur enorme Kosten im Gesundheitswesen verursachen, sondern in vielen Fällen auch zu Arbeitsunfähigkeit bis hin zu frühzeitiger Mortalität beitragen (WHO Report, 2004).

Wie bereits erwähnt, stehen zur Behandlung von Angst- und Schlafstörungen, sowie Depressionen zahlreiche anxiolytisch-wirksame Substanzen zur Verfügung. Benzodiazepine und SSRIs (Selektive Serotonin Reuptake Inhibitoren) zählen zu den Substanzklassen, welche am häufigsten in Arztpraxen verschrieben werden. Allerdings sind diese Substanzklassen in vielerlei Hinsicht suboptimal: die Einnahme von SSRIs hat einen stark verspäteten Wirkungseintritt zur Folge, weiters zeichnet sich nach Beendigung der Medikation eine beachtlich hohe Rezidivrate ab. Außerdem führen sie häufig starke, unerwünschte Wirkungen hervor. Benzodiazepine wirken hingegen sedierend und bergen ein großes Risiko für Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung, wodurch sie sich nicht zur Dauertherapie eignen. Daher wird bereits seit 20 Jahren an der Entwicklung neuer Anxiolytika gearbeitet (Cryan et al., 2011; Plag et al., 2009; Ravindran et al., 2010).

Auch am Department für Pharmakologie und Toxikologie wird seit einigen Jahren mit großen Bemühungen und Erfolg nach selektiveren Substanzen gesucht, welche Liganden am GABA_A-Rezeptor darstellen, ein geringes Nebenwirkungsprofil aufweisen und daher den üblicherweise verschriebenen Arzneimitteln in der Behandlung von Angst- oder Schlafstörungen überlegen sein könnten.

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist daher, das Wirkungsprofil kürzlich identifizierter GABA_A-Rezeptor-Liganden (SM-1) bezüglich Anxiolyse und Sedierung mit Hilfe eines Tiermodells zu untersuchen.

Im Zuge der Wirkstoffentwicklung werden anxiolytische Eigenschaften von Substanzen in der Anfangsphase hauptsächlich mit Hilfe verhaltenspharmakologischer Tests an Nagetieren nachgewiesen (Steckler et al., 2008). Nagetiere spielten immer schon eine zentrale Rolle in der neuropsychiatrischen Forschung. Vor allem Ratten stellten lange Zeit die Spezies der Wahl für viele Versuche dar. In den letzten beiden Jahrzehnten wurden jedoch immer häufiger Mäuse als Versuchsobjekte eingesetzt, da sie vielerlei Vorteile gegenüber Ratten aufweisen, wie zum Beispiel die geringere Körpergröße (wichtig für die Dosierung) und minimale Ansprüche an Platz und Futter (Cryan et al., 2005).

In der Angstregulierung weisen Menschen und Mäuse evolutionär bedingt viele neuroanatomische, neurochemische und verhaltensbezogene Gemeinsamkeiten auf. Sowohl beim Mensch, als auch bei der Maus ist das Gehirn in cerebrale Hemisphären mit Vorderhirn (Prosencephalon), Zwischenhirn (Diencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon), Rautenhirn (Rhombencephalon) und Kleinhirn (Cerebellum) gegliedert (Tecott, 2003).

Obwohl das menschliche Gehirn 2.700-fach größer ist als das murine Gehirn und die humane, extensive Großhirnrinde äußerst komplex gefaltet erscheint, sind die subkortikalen Strukturen, wie Mandelkern, Hippocampus, Thalamus und Hypothalamus bei beiden Spezies gleichermaßen in der Abwicklung von Angstprozessen beteiligt (siehe Abb. Nr. 24) (Cryan et al., 2005; Jones, 2009). Sämtliche Gehirnregionen von Mensch und Maus sind demnach phylogenetisch verwandt (Belzung et al., 2007; Pine, 2009).

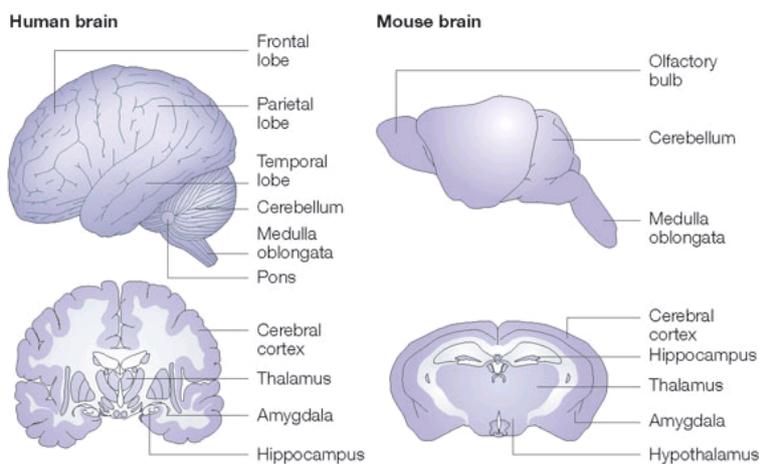


Abb. Nr. 24: Vergleich humaner mit murinen Gehirnstrukturen (Cryan et al., 2005).

Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Ebenfalls äußern sich bei Angstzuständen bei beiden Spezies typische Anzeichen, wie Kampf- und Fluchtreaktionen, Abwendung, Schreckstarre, Harnabgang/Defäkation, Aufmerksamkeit/Wachsamkeit, Übererregbarkeit und Muskelanspannung (Sartori et al., 2011).

6. METHODEN

6.1. Verwendete Versuchstiere

Um potentiell anxiolytische bzw. sedierende Effekte der im Rahmen dieser Diplomarbeit zu untersuchenden Derivate festzustellen, wurde das Mausmodell c57Bl/6N (bezogen von Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Beim c57Bl/6N-Stamm handelt es sich um die bekannteste und meist eingesetzte Maus-Linie in der Angstforschung (Bouwknicht et al., 2008). Der Einsatz von c57Bl/6N-Mäusen ermöglicht es, Substanzeffekte durch deren Verhaltensweise eindeutig zu erkennen. Dies ist auf das mäßige, natürlicherweise vorhandene Angstverhalten der Tiere zurückzuführen (Crawley et al., 1982; Crawley, 2008).

Die Durchführung der Versuche wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung unter Befolgung der europäischen Konvention für den Schutz von experimentelle oder für andere wissenschaftliche Zwecke verwendete Wirbeltiere ETS no.: 123 genehmigt (Khom et al., 2010).

Alle in dieser Diplomarbeit beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Mag. Juliane Hintersteiner durchgeführt.

Verwendet wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von drei bis sieben Monaten. Das Geschlecht spielt eine große Rolle, da der Östrogen-Zyklus weiblicher Tiere und die damit verbundenen Schwankungen der Östrogen- und Gestagenspiegel einen Einfluss auf das Angstverhalten haben (Walf et al., 2007).

Die Mäuse wurden jeweils zu fünft in einem Käfig mit freiem Zugang zu Futter und Wasser, unter Einhaltung eines genauen Licht/Dunkel-Rhythmus (Beleuchtung von 07:00 bis 19:00 Uhr) bei ca. 23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 40 +/- 20 % gehalten.

Jeweils am Tag vor dem Versuch wurde das Gewicht der Tiere bestimmt, anhand dessen die zu untersuchende Dosis berechnet wurde (Abstimmung auf das Körpergewicht). Am Tag des Versuchs wurden die verdünnten Substanzen bzw. Kochsalzlösung (Kontrolle) exakt 30 Minuten vor der Platzierung der Maus in die Versuchsanordnung intraperitoneal (i.p.) appliziert.

6.2. Herstellung der Injektionslösungen

Die untersuchten Substanzen wurden von der Technischen Universität Wien (Institut für angewandte Synthesechemie, Prof. Mihovilovic) synthetisiert. Die Derivate sollten in fünf Dosen *in vivo* untersucht werden: 0,3/ 1/ 3/ 10 und 30 mg/kg Körpergewicht. Um die entsprechenden Konzentrationen zu erhalten wurde mit 0,9 % Kochsalzlösung verdünnt. Um vollständige Löslichkeit der Substanz zu gewährleisten, wurde in jedem Fall 3 % Polysorbat80 und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) beigemischt. Das Injektionsvolumen (in µl) wurde für jede Maus mit Körpergewicht in Gramm x 10 errechnet. Die benötigten Injektionslösungen wurden an jedem Versuchstag frisch bereitet.

6.3. Formen von Verhaltenstests an Mäusen

Angstbezogene Verhaltenstests können grob in zwei Klassen eingeteilt werden:

- Unkonditionierte Tests (ethologisch basierte Handlungsweisen)
- Konditionierte Tests (erlernte Handlungsweisen)

Während ein unkonditionierter Test das natürliche und instinktive Verhalten der Maus ausnützt und sie mit angeborenem, aversivem Verhalten reagiert (wie z.B. Abwendung von großen, hell beleuchteten Flächen), setzt ein konditionierter Test Lernperioden voraus, in denen belohnende Stimuli mit aversiven, leicht schmerzenden Stimuli kombiniert werden (Sartori et al., 2011).

In dieser Arbeit wird der Fokus ausschließlich auf unkonditionierte Verhaltenstests gelegt, wie den Elevated-Plus-Maze Test und den Light/Dark-Choice Test. Bei diesen handelt es sich um wissenschaftlich anerkannte Tests, die dazu dienen sollen, potentielle anxiolytische Eigenschaften von Substanzen aufzudecken.

6.4. Im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführte Verhaltenstests

6.4.1. Elevated-Plus-Maze Test (EPM-Test)

Der Elevated-Plus-Maze Test ist der am häufigsten verwendete Verhaltenstest an Nagetieren. Er dient der Beurteilung anxiolytischer sowie anxiogener Effekte von Pharmaka oder Steroidhormonen, wird aber auch zur Erfassung von angstbezogenem Verhalten und der dadurch auftretenden Mechanismen in den verschiedenen Gehirnregionen eingesetzt. Der EPM-Test basiert auf der natürlichen Antipathie der Mäuse für offene Flächen und Höhe und deren Vorliebe für umschlossene Areale (Lister 1987; Walf et al., 2007).

Die Versuchsanordnung besteht aus einem erhöhten Labyrinth (ein Meter über dem Boden, gefertigt aus grauem Kunststoff), welches ein Plus formt und daher vier Arme aufweist. Von diesen Armen sind zwei als offene und zwei als umschlossene Flächen arrangiert. Offene und geschlossene Arme liegen dabei jeweils gegenüber (siehe Abb. Nr. 25). Jeder dieser Arme ist 30 cm lang und 5 cm breit. Die Wandhöhe der umschlossenen Arme beträgt 15 cm. Die Lichtquelle über der Versuchsanordnung wird auf 180 Lux mit Hilfe eines Luxmeters eingestellt.

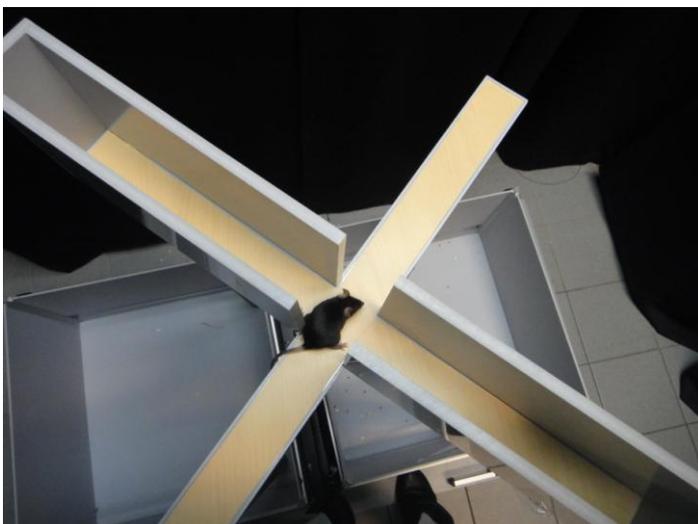


Abb. Nr. 25: Foto der Versuchsanordnung

6.4.1.1. Durchführung des EPM-Tests

Dieser Verhaltensassay wird folgendermaßen durchgeführt: Die Versuchsanordnung wird zuerst gründlich mit Alkohol 30 % gereinigt, anschließend wird die Maus im Zentrum des Labyrinths (neutrales Areal) platziert, sodass sie ihr Gesicht dem offenem Arm zuwendet (dies sollte bei jedem Versuch derselbe Arm sein). Das Verhalten des Tieres wird anschließend fünf Minuten lang durch ein Videoüberwachungssystem (Video-Mot 2) aufgezeichnet.

Diese Zeitspanne wird deshalb gewählt, da bereits bei den Erstdurchführungen des Tests erkannt wurde, dass Nagetier die stärkste Abscheu für die offenen Arme vorwiegend in den ersten fünf Minuten nach Platzierung in der Anordnung zeigten (Walf et al., 2007).

6.4.1.2. Erfasste Parameter

Registriert wird beim EPM-Test sowohl die verbrachte Zeit (ausgedrückt in %; „Time in open/closed arms in % of total Time“) im jeweiligen Arm, als auch die Anzahl der Eintritte von der Maus in offene bzw. umschlossene Arme („Entries“). Ebenso ist die Erfassung der zurückgelegten Laufstrecke über die gesamte Versuchsdauer (ausgedrückt in cm; „Distance total“) bedeutend für die Bewertung von Substanzeffekten.

6.4.2. Light/Dark-Choice Test

Der Light/Dark-Choice Test basiert einerseits auf der angeborenen Aversion von Nagetieren für hell-beleuchtete Areale, andererseits auf deren instinktiven, explorativen Verhalten in einer neuartigen Umwelt, welche in Fall dieser Versuchsanordnung stark beleuchtet ist.

Wie beim EPM-Test tritt auch bei diesem Test für das Tier eine natürliche Konfliktsituation auf, da es einer unvertrauten, fremdartigen Umgebung ausgesetzt ist. Der Konflikt besteht zwischen der Neigung zu explorieren und der anfänglichen Tendenz das Unbekannte zu meiden. In diesem Verhaltenstest wird die Erkundungstätigkeit sowohl durch beide Tendenzen (Neugier an neuer Umgebung und Abneigung gegenüber dieser) reflektiert (Crawley et al., 1980).

Der Light/Dark-Choice Test besteht aus einer Glasbox (50 x 50 cm Fläche), welche zu zwei Drittel hell beleuchtet ist (400 Lux – Kontrolle mit Luxmeter), wobei das verbleibende Drittel aus einer schwarzen Box besteht. Diese weist eine Öffnung auf, durch welche sich die Maus vom hellen zum dunklen Kompartiment (und umgekehrt) bewegen kann.

Arzneimittelinduzierter, gesteigerter Aufenthalt im großen, beleuchteten Kompartiment (= aversiver Bereich) ist dabei ein Zeichen von Anxiolyse. Ebenfalls spricht gesteigertes Wechseln zwischen den beiden Kompartimenten, ohne dass sich jedoch eine gesteigerte Bewegungsaktivität bemerkbar macht, für anxiolytisches Potential.

Unbehandelte Mäuse halten sich hingegen bevorzugt in der dunklen Box (= geschützter, sicherer Bereich) auf (Bourin et al., 2003).

6.4.2.1. Durchführung des Light/Dark-Choice Tests

Nach jedem Versuch wird die gesamte Fläche des Testareals gründlich mit Alkohol 30 % gereinigt und eventueller Fäces/Urin entfernt. Der Test wird gestartet, in dem man die Maus ins helle Areal mit Gesicht zur Öffnung der dunklen Box platziert. Infrarot-Sensoren registrieren die Bewegungen des Tieres wodurch zehn Minuten lang entscheidende Parameter zur Bewertung der Anxiolyse erfasst werden.

6.4.2.2. Erfasste Parameter

Üblicherweise wird im Light/Dark-Choice Test die Anzahl der Transitionen von einem ins andere Kompartiment („Entries Light Area/Dark Area“) und die über die Versuchsdauer zurückgelegte Laufstrecke (in cm; „Distance Light Area/Dark Area“) (wie beschrieben in Crawley 1981, 1985; Crawley et al., 1980). Weiters wird die Aufenthaltszeit (ausgedrückt in Sekunden; „Duration Light Area/Dark Area“) im dunklen bzw. beleuchteten Raum gemessen, sowie eventuelle, aufrichtende Körperhaltungen der Mäuse („Rearings“; Indiz für körperliche Aktivität, Exploration) (Walf et al., 2007). Diese Parameter werden computer-kontrolliert mit Hilfe von Infrarotlicht-Sensoren erfasst. Dies bedeutet, dass ein Analyser die Unterbrechungen der Lichtschranken registriert und die Information zu einem Computer (verwendetes System: ActiMot2, TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland) überträgt (wie beschrieben in Young et al., 1991 a,b).

6.4.2.3. Bedeutung des Light/Dark-Choice Tests

Dieser Test kann bei der Bewertung des anxiolytischen Effekts einer Substanz äußerst hilfreich sein. Die Vorteile liegen darin, dass er unkompliziert durchzuführen ist und vor der Durchführung für die Tiere weder Lernperioden noch Futterentzug notwendig sind. Der Versuch bedient sich demnach ausschließlich natürlicher Stimuli (Belzung et al., 1987).

Dieser Verhaltenstest wird jedoch limitiert, da er falsch-positive Ergebnisse liefern kann, wenn eine Substanz zu einer Steigerung der Bewegungsaktivität der Maus führt. Es treten auch Probleme auf, wenn das beleuchtete Kompartiment für die Maus unzureichend aversiv erscheint: die wichtigste Voraussetzung für diesen Versuch ist, dass ein harter Kontrast zwischen den beiden Kompartimenten besteht (Kontrolle der Lux).

Der Light/Dark-Choice Test wurde in den letzten Jahren stark modifiziert (z.B. eine Hälfte der Versuchsanordnung hell-beleuchtet, die andere Hälfte abgedunkelt). Dadurch kommt es auch zu Unterschieden in der Durchführung und Messung in verschiedenen Laboratorien. Unterschiedliche Ergebnisse stellen die Validität einiger präklinischer Untersuchungen in Frage. Die Lösung dieses Problems liegt darin, auch nichtsignifikante Effekte genauer zu betrachten. Es scheint daher schwierig, die Gültigkeit dieses Tests, bezüglich der Stärke von Substanzeffekten beim Vergleich jener in ähnlichen Verhaltenstests, in denen sich die Substanz als effektiv zur Angststörungs-Therapie erweist, abzuschätzen (Bourin, 1997).

7. ERGEBNISSE

7.1. Ergebnisse von Derivat A im EPM-Test

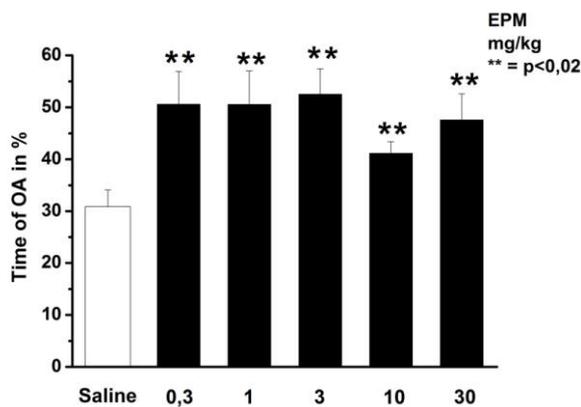
Um herauszufinden, welche Wirkung das Derivat A *in vivo* aufweist, wurde das Verhalten der damit behandelten c57Bl/6N-Mäuse zuerst im Elevated-Plus-Maze Test beobachtet:

Abbildung Nr. 26 A stellt die mittlere Zeit in % dar, welche die Tiere in den offenen Armen der Versuchsanordnung verbracht haben. Bereits nach der niedrigsten verabreichten Dosis zeichnet sich ab, dass die Mäuse weniger Scheu vor offenen Flächen aufwiesen: Bei 0,3/1/3 mg/kg KG hielten sich die Tiere um ca. 20 % länger in den offenen Armen auf.

Diesbezüglich wird bei allen verabreichten Dosen statistische Signifikanz erreicht (im Vergleich zur Saline-Applikation), siehe auch Tabelle 1.

Abbildung Nr. 26 B zeigt die mittlere, zurückgelegte Totallaufstrecke (in cm) über die durchgeführte Versuchszeit von fünf Minuten im EPM-Test nach der jeweils verabreichten Dosis (in mg/kg KG). Es wurde nach allen verabreichten Dosen (auch nach Injektion physiologischer Kochsalzlösung; „Saline“) durchschnittlich eine Totallaufstrecke von 11-13 m zurückgelegt. Wie sich aus Tabelle 1 erkennen lässt, kommt es jedoch nach der Substanzinjektion, im Vergleich zur Saline-Injektion, zu einer leichten, nicht signifikanten Steigerung der zurückgelegten Totallaufstrecke.

A)



B)

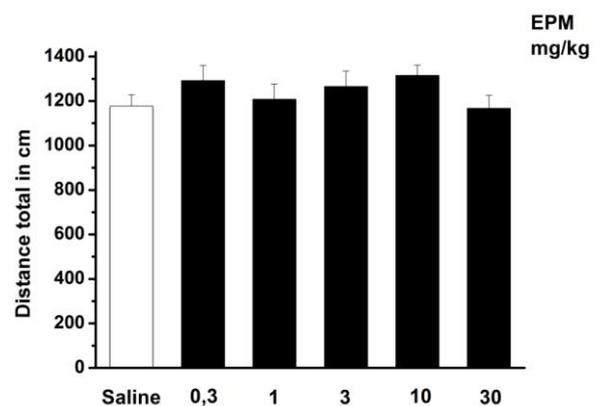


Abb. Nr. 26 A: Effekt von Derivat A auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM-Test: Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltszeit der Mäuse auf den offenen Armen (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen; **=statistisch signifikant ($p < 0,02$).

Abb. Nr. 26 B: Die Balken zeigen die mittleren Totalstrecken der Mäuse (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen.

Dosis (mg/kg KG)	Time of Open Arms (%)	Distance Total (cm)	Anzahl Versuche (n)
SALINE	30,47 ± 3,65	1168,94 ± 59,17	21
0,3	50,56 ± 6,37	1291,14 ± 68,85	9
1	50,53 ± 6,46	1207,64 ± 68,52	12
3	52,51 ± 4,92	1264,93 ± 69,98	12
10	41,14 ± 2,24	1314,73 ± 46,29	10
30	47,55 ± 5,05	1166,48 ± 59,02	10

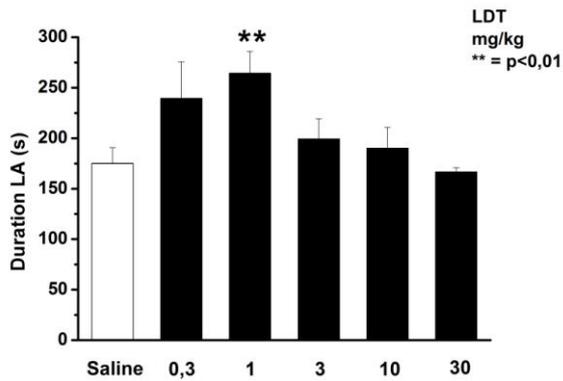
Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse von Derivat A im EPM-Test. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten \pm SEM angegeben.

7.2. Ergebnisse von Derivat A im Light/Dark-Choice Test

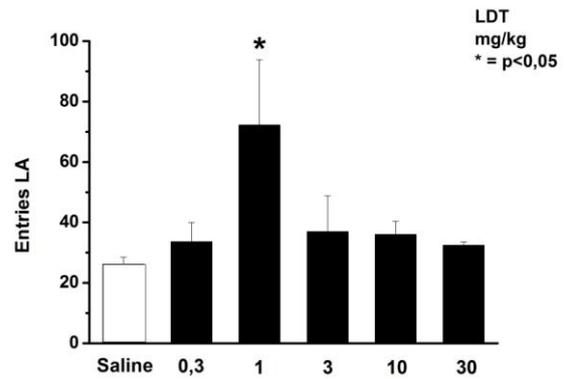
Nach Verabreichung von Derivat A in der niedrigsten zu testenden Dosis (0,3 mg/kg KG) zeigt sich eine verlängerte Aufenthaltszeit im beleuchteten Kompartiment um ca. 36% (siehe Abb. Nr. 27 A). Nach Injektion der nächsthöheren Dosis (1 mg/kg KG) ist die verbrachte Zeit im Hellen, im Vergleich zur Saline-Injektion, sogar signifikant länger. Analog dazu, verbrachten die Tiere weniger Zeit im dunklen Areal (Daten nicht gezeigt). Auch die Zahl der Eintritte ins helle Areal hat sich bereits bei 0,3 mg/kg KG leicht erhöht, bei der Dosis von 1 mg/kg KG liegt eine statistisch signifikante Steigerung ($p < 0,05$) vor. Bei den höheren, verabreichten Dosen nimmt dieser Trend aus unbekannter Ursache ab – diese wird jedoch erforscht.

Nach Injektion von 0,3 und 1 mg/kg KG kam es nicht nur zu einer verlängerten Aufenthaltszeit im Hellen; folglicherweise steigerte sich auch die zurückgelegte Laufstrecke im hellen Areal, wie Abb. Nr. 27 C zeigt. Interessanterweise hat sich jedoch auch die zurückgelegte Totallaufstrecke (Abb. Nr. 27 D) nach den ersten beiden verabreichten Dosen signifikant ($p < 0,01$) erhöht. Dies ist möglicherweise ein Indiz für Hyperaktivität der Tiere. Nach den übrigen getesteten Dosen hatten sich die gemessenen Totallaufstrecken wieder reduziert.

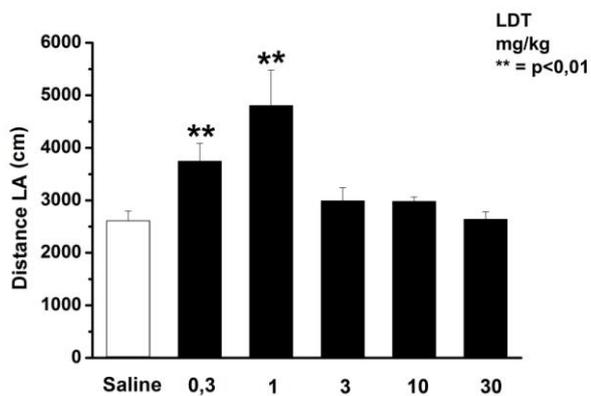
A)



B)



C)



D)

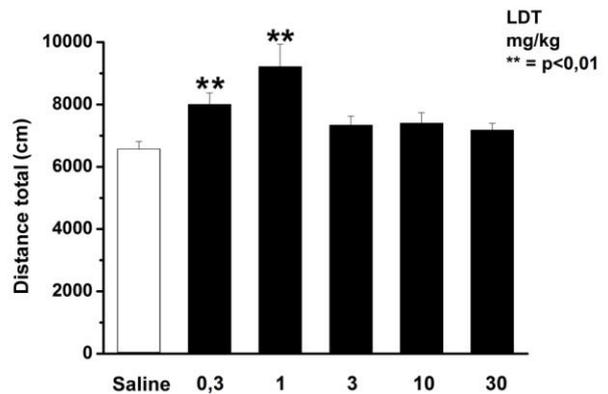


Abb. Nr. 27 A: Effekt von Derivat A auf das Verhalten von C57Bl/6N Mäusen im L/DC-Test: Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltszeit der Mäuse im hellen Areal in Sekunden (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen;
 Abb. Nr. 27 B: Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Eintritte ins helle Areal (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen;
 Abb. Nr. 27 C: Die Balken zeigen die mittleren Laufstrecken der Mäuse im hellen Areal in cm (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen;
 Abb. Nr. 27 D: Mittlere Totallaufstrecken in cm (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen werden gezeigt;
 *=statistisch signifikant ($p < 0,05$); **=statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Dosis (mg/kg KG)	Duration LA (s)	Distance LA (cm)	Distance Total (cm)	Entries LA	Anzahl Versuche (n)
SALINE	175,16 ± 15,48	2609,82 ± 189,41	6568,12 ± 246,85	26,15 ± 2,35	27
0,3	239,51 ± 36,14	3744,28 ± 339,60	8000,58 ± 369,71	33,58 ± 6,36	12
1	264,39 ± 21,67	4805,14 ± 672,37	9210,74 ± 723,59	72,25 ± 21,65	12
3	199,36 ± 19,89	2990,43 ± 250,10	7334,30 ± 292,54	36,92 ± 11,92	12
10	190,22 ± 20,75	2978,55 ± 86,71	7401,02 ± 334,72	36,00 ± 4,35	12
30	166,73 ± 4,23	2639,88 ± 140,89	7178,11 ± 216,56	32,42 ± 1,10	12

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse von Derivat A im L/DC-Test. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten ± SEM angegeben.

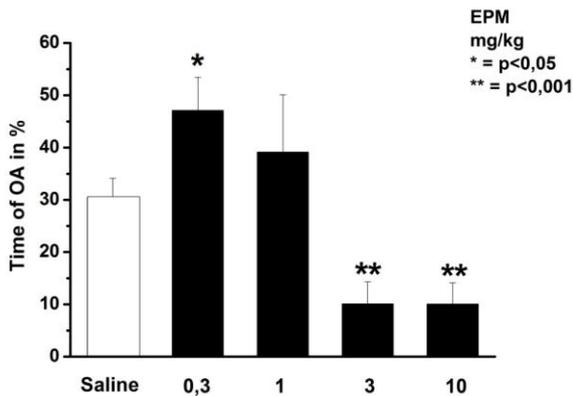
7.3. Ergebnisse von Derivat B im EPM-Test

Derivat B wurde ebenfalls zuerst im EPM-Test, anschließend im Light/Dark-Choice Test untersucht. Im Gegensatz zu Derivat A wurde diese Substanz jedoch nur in vier Dosierungen untersucht.

Bezüglich der Aufenthaltszeit in offenen Armen konnte nach der Gabe von 0,3 mg/kg KG eine deutliche Steigerung erfasst werden (signifikant, $p < 0,05$). Nach Injektion von 3 und 10 mg/kg KG verweilten die Mäuse jedoch nur mehr zu ca. 1/3 der Zeit in den offenen Armen im Vergleich zu den Mäusen, welchen Saline injiziert wurde.

Die zurückgelegte Totallaufstrecke zeigte sich zwar nach der Verabreichung von 0,3 mg/kg KG schwach verlängert (nicht signifikant), nach allen weiteren getesteten Dosen wurde hingegen eine kontinuierlich und signifikant verkürzte Totallaufstrecke registriert. Bei der höchsten verabreichten Dosis explorierten die Tiere gar um 70% weniger als nach Saline-Injektion. Beobachtet werden konnte, dass die körperliche Aktivität der Tiere mit gesteigerter Dosis immer stärker abnahm.

A)



B)

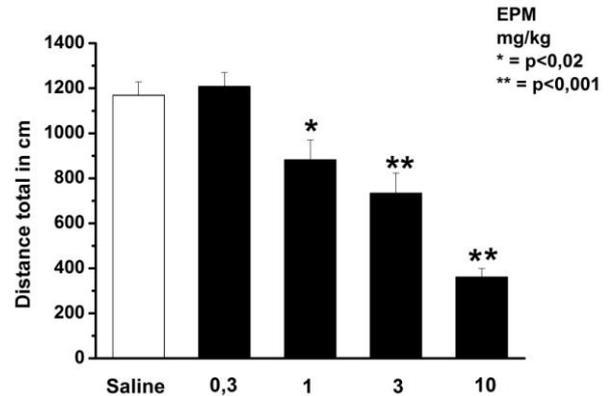


Abb. Nr. 28 A: Effekt von Derivat B auf das Verhalten von C57Bl/6N Mäusen im EPM-Test: Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltszeit der Mäuse in den offenen Armen (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen; *=statistisch signifikant ($p < 0,05$), **=statistisch signifikant ($p < 0,001$)

Abb. Nr. 28 B: Die Balken zeigen die mittleren Totalstrecken der Mäuse (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen; *=statistisch signifikant ($p < 0,02$), **=statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Dosis (mg/kg KG)	Time of Open Arms (%)	Distance Total (cm)	Anzahl Versuche (n)
SALINE	30,47 \pm 3,65	1168,94 \pm 59,17	21
0,3	47,09 \pm 6,38	1208,92 \pm 61,13	12
1	39,13 \pm 10,93	882,69 \pm 87,81	12
3	10,09 \pm 4,21	734,29 \pm 88,99	12
10	10,06 \pm 4,06	361,41 \pm 37,51	12

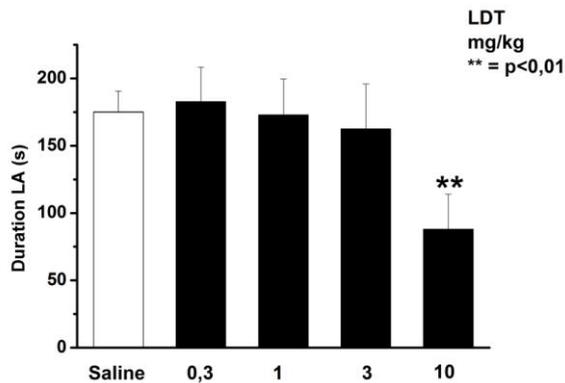
Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse von Derivat B im EPM-Test. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten \pm SEM angegeben.

7.4. Ergebnisse von Derivat B im Light/Dark-Choice Test

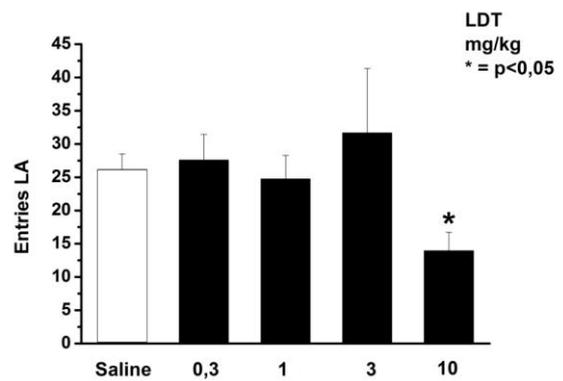
Bei der Durchführung des Light/Dark-Choice Tests konnte nach der Gabe von 0,3 mg/kg KG nicht nur eine etwas längere Aufenthaltszeit im hellen Areal, sondern auch mehr Besuche in diesem registriert werden. Nach den weiteren drei applizierten Dosen kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der verweilten Dauer im Hellen. Die Anzahl der Eintritte ins helle Areal schwankt nach den ersten drei getesteten Dosen; nach Injektion von 10 mg/kg KG besuchten die Mäuse dieses nur mehr halb so oft, als nach Saline-Injektion.

Sowohl die zurückgelegte Totallaufstrecke als auch die Laufstrecke im hellen Kompartiment reduzierte sich nach jeder Dosiserhöhung (nach 10 mg/kg KG signifikant).

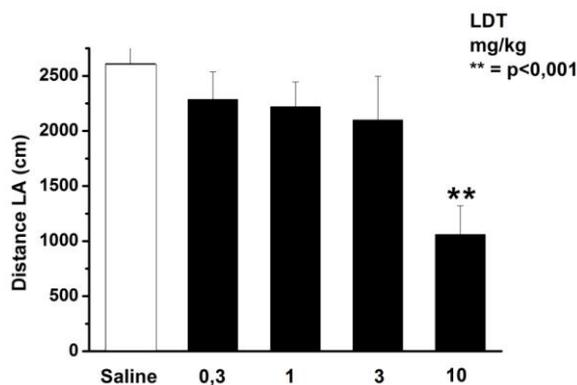
A)



B)



C)



D)

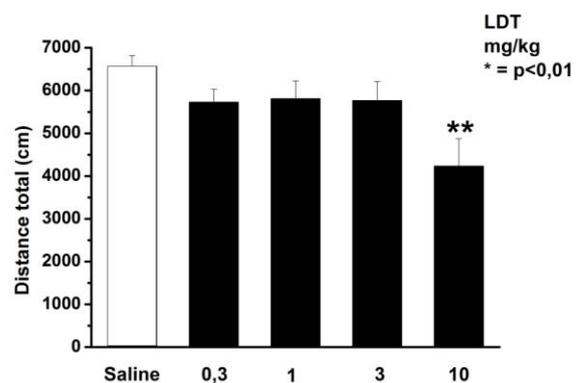


Abb. Nr. 29 A: Effekt von Derivat B auf das Verhalten von C57Bl/6N Mäusen im L/DC-Test: Die Balken zeigen die gemittelte Aufenthaltszeit der Mäuse im hellen Areal in Sekunden (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen; **=statistisch signifikant ($p<0,01$)

Abb. Nr. 29 B: Die Balken zeigen die gemittelte Anzahl der Eintritte ins helle Areal (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen; *=statistisch signifikant ($p<0,05$)

Abb. Nr. 29 C: Die Balken zeigen die gemittelten, zurückgelegten Laufstrecken der Mäuse im hellen Areal in cm (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen; **=statistisch signifikant ($p<0,001$)

Abb. Nr. 29 D: Gemittelte, zurückgelegte Totallaufstrecken in cm (\pm SEM) nach den jeweils verabreichten Dosen werden gezeigt; *=statistisch signifikant ($p<0,01$).

Dosis (mg/kg KG)	Duration LA (s)	Distance LA (cm)	Distance Total (cm)	Entries LA	Anzahl Versuche (n)
SALINE	175,16 ± 15,48	2609,82 ± 189,41	6568,12 ± 246,85	26,15 ± 2,35	27
0,3	182,76 ± 25,58	2284,89 ± 250,67	5729,49 ± 300,07	27,58 ± 3,87	12
1	172,85 ± 26,59	2219,66 ± 224,69	5810,58 ± 416,83	24,75 ± 3,54	12
3	162,52 ± 33,35	2098,92 ± 397,79	5763,19 ± 446,58	31,67 ± 9,69	12
10	87,90 ± 26,17	1059,57 ± 262,37	4233,33 ± 642,58	13,92 ± 2,83	12

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse von Derivat B im L/DC-Test. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten ± SEM angegeben.

8. DISKUSSION

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, *in vivo* Effekte von Derivaten des Naturstoff SM-1, welche am Department für Pharmakologie und Toxikologie als Modulatoren am GABA_A-Rezeptor identifiziert wurden, anhand des Verhaltens von c57Bl/6N-Mäusen, zu untersuchen.

Von GABA_A-Rezeptoren weiß man, dass sie eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Erregbarkeit des ZNS spielen. Kommt es zu Störungen in der Balance zwischen hemmender und erregender Neurotransmission im ZNS, äußern sich typische Krankheitsbilder, wie zum Beispiel Angst- oder Schlafstörungen (Möhler, 2002; Möhler et al., 2005). GABA_A-Rezeptoren stellen zur Therapie solcher Erkrankungen einen wichtiges Target dar. Ein großer Vorteil hierfür wäre der Einsatz selektiverer Substanzen, welche keine schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung, mit sich bringen.

Aufgrund der Subtyp-Selektivität und der anxiolytischen Wirkung *in-vitro* und *in vivo*, stellen die SM-1 und deren Derivate interessante Anwarter für die Entwicklung potentieller Arzneistoffe dar (Khom et al., 2010).

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit untersuchten Substanzen zeigten unterschiedliche Effekte im Tiermodell.

Das Verhalten der Maus im Elevated-Plus-Maze Test (z.B. Aufenthalt in offenen Armen) spiegelt sich in einem Konflikt, zwischen der Vorliebe von Nagern für geschützte Areale (umschlossene Arme) und ihrer angeborenen Motivation neues Terrain zu erkunden, wider. Nicht-ängstliches Verhalten (mehr Eintritte und/oder längerer Aufenthalt in offenen Armen)

kann simultan mit dem Ausmaß an gesteigerter körperlicher Aktivität bewertet werden. Die Anzahl der Eintritte in die Arme ist jedoch kein aussagekräftiger Hinweis auf gesteigerte körperliche Aktivität; hierfür muss auch die gemessene Laufstrecke beachtet werden (Walf et al., 2007).

Die Behandlung der Mäuse mit Derivat A hatte einen deutlich längeren Aufenthalt in den offenen Armen der Versuchsanordnung zur Folge. Die Substanz bewirkte auch eine leicht gesteigerte lokomotorische Aktivität. Dies sind Hinweise darauf, dass die Angst der Nager vor offenen Flächen gemindert wurde, was wiederum bedeutet, dass Derivat A anxiolytisches Potential aufweist. Die Durchführung eines weiteren Verhaltenstests hat diese Vermutung bestätigt: Auch bei der Untersuchung von Derivat A im Light/Dark-Choice Test konnte sowohl eine signifikant längere Aufenthaltszeit im hell-beleuchteten Areal, als auch eine gesteigerte Anzahl von Eintritten in dieses registriert werden. Ebenso konnte nach den ersten beiden getesteten Dosen eine signifikant längere Laufstrecke gemessen werden. Dies könnte einerseits auf Hyperaktivität hindeuten, andererseits auf eine verstärkte Exploration der Tiere in der für sie neuartigen Umgebung, da anxiolytische Substanzen oftmals zu einer Steigerung der Exploration führen können (Hascoët et al., 1998). Um diese Ursache zu klären, ist die Durchführung anderer Tests, welche die Erfassung motorischer Aktivität und Exploration erlauben (z.B. Open-Field Test), vonnöten.

Bei der Testung von Derivat B im EPM-Test, zeichnete sich eine dosisabhängige Reduktion der Totallaufstrecke ab, was bedeutet, dass die motorische Aktivität der Tiere durch die Substanzinjektion gemindert wurde. Ist dies der Fall, spricht man von einer Sedierung. Da die Mäuse jedoch nach Verabreichung von 0,3 und 1 mg/kg KG deutlich mehr Zeit in den offenen Armen verbrachten, kann ein anxiolytischer Effekt von Derivat B nicht ausgeschlossen werden, obwohl die Tiere nach den höheren applizierten Dosen signifikant kürzer in den offenen Armen verweilten (Vgl. Saline-Injektion). Anxiolyse lässt sich nach diesen hohen Dosen aus den Ergebnissen (siehe Kapitel 7.3 und 7.4) nicht mehr erkennen, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit durch den stark sedierenden Effekt maskiert wird. Derivat B bewirkte auch im Light/Dark-Choice Test eine deutlich Reduktion der Laufstrecken (bei 10 mg/kg KG statistisch signifikant), was ebenfalls auf einen sedierenden Effekt hindeutet.

Obwohl sich die Zahl der Besuche im Hellen nach 0,3 und 3 mg/kg KG leicht erhöhte (nicht signifikant), lässt sich bei der Untersuchung von Derivat B in diesem Verhaltensassay eine mögliche Anxiolyse nicht eindeutig erkennen, da sie durch die sedierende Wirkung in diesem Test, ebenso wie im EPM-Test, überdeckt wird. Die Ergebnisse des EPM-Tests deuten jedoch sehr auf ein anxiolytisches Potential von Derivat B hin.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein erster Schritt zur Wirkung dieser Derivate *in vivo* getätigt werden. Es bleiben zum derzeitigen Standpunkt allerdings noch viele Fragen offen, welche in weiteren Untersuchungen geklärt werden müssen. Schließlich ist ungewiss, ob diese Substanzen ebenfalls das Problem der Abhängigkeits- und Toleranzentwicklung mit sich bringen.

Es wäre interessant, wie stark die Substanzeffekte nach peroraler Verabreichung ausfallen, da diese Substanzen im Rahmen dieser Arbeit das Verhalten im Tiermodell nur nach intraperitonealer Applikation untersucht wurden. Bei der durchgeführten Applikationsart wird im Gegensatz zu der für diese Therapeutika üblichen Art der Verabreichung (peroral) der First-Pass-Effekt in der Leber umgangen. Nach peroraler Applikation muss mit extensiver, hepatischer Metabolisierung und in der Folge mit stark aktiven bzw. inaktiven Metaboliten gerechnet werden; durch letztere könnte sich wiederum die Bioverfügbarkeit erheblich verschlechtern. Außerdem müsste nachgewiesen werden, ob diese Derivate die nötigen Eigenschaften (Lipophilie, etc.) mit sich bringen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um in ausreichender Konzentration den Wirkort zu erreichen.

Unklar ist auch, ob die Substanzen ausschließlich über das GABAerge System wirken. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Substanzen auch in andere molekulare Ebenen eingreifen.

Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sich diese Derivate in der Angst- bzw. Schlafstörungstherapie profilieren können. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten GABA_A-Rezeptor-Modulatoren haben sich *in vivo* als sehr erfolgsversprechende Substanzen erwiesen.

9. ZUSAMMENFASSUNG

γ -Aminobuttersäure ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren, welcher mit GABA_A-Rezeptoren interagiert. Fehlfunktionen von GABA_A-Rezeptoren führen zu Erkrankungen wie beispielsweise Insomnie oder Angststörungen. Diese werden üblicherweise mit GABA_A-Rezeptor-Modulatoren therapiert. Allerdings weisen viele dieser Substanzen ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung auf. Daher besteht medizinischer Bedarf für selektive GABA_A-Rezeptor Modulatoren. Solche kommen auch in Pflanzen vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dosisabhängige Effekte auf das angst-assoziierte Verhalten zweier Naturstoffderivate an c57Bl/6N-Mäusen untersucht. Das Verhalten der Tiere wurde 30 Minuten nach intraperitonealer Substanzapplikation anhand des Elevated-Plus-Maze-Tests (EPM-Test) und des Light/Dark-Choice Tests (L/D-Choice-Test) erfasst. Jene Tiere, die mit $\geq 0,3\text{mg/kg}$ Körpergewicht (KG) Derivat A behandelt wurden, verbrachten circa 20 % mehr Zeit in offenen Armen (OA) des EPM als die Kontrollgruppe. Auch im L/D-Choice Test verbrachten die mit Derivat A behandelten Mäuse mehr Zeit im hellen Areal. Außerdem wurde eine gesteigerte Anzahl von Einritten, sowie signifikant längere Laufstrecken im Hellen erfasst, was für anxiolytisches Potential des Derivates A spricht.

Demgegenüber reduzierte sich nach Applikation von Derivat B nach nahezu allen Dosen in beiden Tests die Aktivität, was für eine Sedierung spricht. Nur nach Gabe von $0,3\text{ mg/kg KG}$ verbrachten die Tiere signifikant mehr Zeit in offenen Armen des EPM-Tests. Das lässt vermuten, dass der anxiolytische Effekt möglicherweise durch die starke Sedierung überlagert wird. Aufgrund meiner Ergebnisse stellen die beiden Derivate interessante Anwärter für weitere Untersuchungen dar.

10. ABSTRACT

γ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain interacting with GABA type A (GABA_A) receptors. Dysfunction of GABA_A receptors result in disorders such as insomnia or anxiety which are commonly treated with GABA_A receptor modulators. However, most of these drugs suffer from side effects due to their relatively unspecific action. Therefore, there is a medical need for selective GABA_A receptor ligands. Such selective compounds can be also found in plants.

In this study, the dose-dependent effects of natural compound derivatives on c57Bl/6N mice' anxiety-related behavior were investigated 30 minutes after intraperitoneal application making use of the elevated plus maze test (EPM) and the light/dark/choice test (the L/D-Choice). Animals treated with doses $\geq 0.3\text{mg/kg}$ bodyweight (BW) of derivative A spent approximately 20% more time in the open arms (OA) of the EPM compared to control littermates. Likewise, in the L/D-Choice test, compound-treated mice spent more time in the lit area. Additionally, the number of entries and the distance traveled in the lit area were significantly increased indicating the anxiolytic potential of this compound.

In contrast, application of derivative B significantly reduced overall ambulation at nearly all doses in both tests suggesting sedative effects. Only at $0,3\text{mg/kg}$ BW mice spent significantly more time in the OA of the EPM suggesting that the anxiolytic effects of this compound might be camouflaged by the concomitant sedation. Based on my data, these two derivatives may be promising candidates for further research.

11. QUELLENVERZEICHNIS

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Adkins CE, Pillai GV, Kerby J, Bonnert TP, Haldon C, McKernan RM, Gonzalez JE, Oades K, Whiting PJ, Simpson PB. Alpha4beta3delta GABA_A receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J Biol Chem* (2001); 276:38934-38939

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* (2002); 18:75-81

Ai J, Wang X, Nielsen M. Honokiol and magnolol selectively interact with GABA(A) receptor subtypes in vitro. *Pharmacology* (2001); 63:34-41

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. (2009) Urban und Fischer; 10., überarbeitete Auflage

American Psychiatry Association (1994). DSMIV Diagnostic and Statistical Manual, fourth edition. American Psychiatry Association, Washington DC.

Anderson IM, Ferrier IN, Baldwin RC, Cowen PJ, Howard L, Lewis C, Matthews K, McAllister-Williams RH, Peveler RC, Scott J, Tylee A. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. *J. Psychopharmacol.* XX (2008); 1-54

Andlin-Sobocki P, Jonsson B, Wittchen H, Olesen J. Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol* (2005); 12:1-27

Atack JR, Hutson PH, Collinson N, Marshall G, Bentley G, Moyes C, Cook SM, Collins I, Wafford K, McKernan RM, Dawson GR. Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for alpha3 subunit-containing GABA_A receptors. *Br J Pharmacol* (2005); 144:357-366

Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, Bandelow B, Bond A, Davidson JR, denBoer JA, Finneberg NA, Knapp M, Scott J, Wittchen HU. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol* (2005); 19:567-596

Baldwin DS, Allgulander C, Altamura AC, Angst J, Bandelow B, denBoer J, et al.. Manifesto for a European anxiety disorders research network. *Europ Neuropsychopharm* (2010); 20:426-432

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Möhler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* (1998); 50:291-313

Baumann SW, Baur R, Sigel E. Forced subunit assembly in alpha1beta2-gamma2 GABA_A receptors: Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem* (2002); 277:46020-46025

Baumann SW, Baur R, Sigel E. Individual properties of the two functional agonist sites in GABA_A receptors. *J Neurosci* (2003); 23:11158-11166

Beck M, Brickley K, Wilkinson HL, Sharma S, Smith M, Chazot PL, Pollard S, Stephenson FA. Identification, molecular cloning, and characterization of a novel GABA_A receptor-associated protein, GRIF-1. *J Biol Chem* (2002); 277:30079-30090

Bedford FK, Kittler JT, Muller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG, Moss SJ. GABA_A receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci* (2001); 4:908-916

Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nat Rev Neurosci* (2005); 6:565-575

Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Wafford K, Whiting PJ. The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci. USA.* (1997);94:11031-11036

Belzung C, Misslin R, Vogel E, Dodd RH, Chapouthier G. Anxiogenic effects of methyl-h-carboline-carboxylate in a light/dark choice situation. *Pharmacol Biochem Behav* (1987); 28:29-33

Belzung C, Philippot P. Anxiety from a phylogenetic perspective: is there a qualitative difference between human and animal anxiety? *Neural Plast* (2007); 2007:59676

Benke D, Barberis A, Kopp S, Altmann KH, Schubiger M, Vogt KE et al. GABA_A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerianic acid, a major constituent of valerian root extracts. *Neuropharmacology* (2009); 56:174-81

Berridge KC, Pecina S. Benzodiazepines, appetite, and taste palatability. *Neurosci Biobehav Rev* (1995); 19:121-131

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol Rev* (2004); 84:835-867

Bishop SJ. Neurocognitive mechanism of anxiety: an integrative account. *Trends Cogn Sci* (2007); 11:307-316

Bormann J, Feigenspan A. GABA_C receptors. *Trends Neurosci* (1995); 18:515-19

Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* (2000); 21:16-9

Bouche N, Fromm H. GABA in plants: Just a metabolite? *Trends Plant Sci* (2004); 9:110-115

Bourin M. Animal models of anxiety: are they suitable for predicting drug action in humans? *Pol J Pharmacol* (1997); 49:79-84

Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* (2003); 463:55-65

Bouwknicht JA, Paylor R. Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents. *Behav Pharmacol* (2008); 19:385-402

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallager JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* (2002); 54:247-264

Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* (1987); 20:365-383

Bown AW, Shelp BJ. The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol* (1997); 115:1-5

Breitinger HG, Becker CM. The inhibitory glycine receptor – simple views of a complicated channel. *Chembiochem* (2002); 3:1042-1052.

Brejč K, vanDijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van der Oost J, Smit AB, Sixma TK. Crystal structure of ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* (2001); 411:269-276

Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA_A receptors. *Brit J Pharmacol* (2002); 136:965–974

Buhl EH, Halasy K, Somogy P. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* (1994); 368:823-828

Buhr A, Bianchi V, Boulenger JP, Gallati S, Hinkle DJ, McDonald RL, Sigel E. Functional characterization of the new human GABA receptor missense mutation $\beta 3$ (R192H). *Hum Genet* (2002); 111:154–160

Burt DR, Kamatchi GL. GABA_A receptor subtypes: From pharmacology to molecular biology. *FASEB J* (1991); 5:2916-2923

Cederholm JME, Schofield PR, Lewis TM. Gating mechanisms in Cys-loop receptors. *Eur Biophys J* (2009); 39:37-49

Chambers MS, Atack JR, Carling RW, Collinson N, Cook SM, Dawson GR, Ferris P, Hobbs SC, O'Connor D, Marshall G, Rycroft W, Macleod AM. An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABA_A $\alpha 5$ receptors with cognition enhancing properties. *J Med Chem* (2004); 47:5829-5832

Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS. Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *J Neurosci* (1996); 16:5415-5424

Charych EI, Yu W, Miralles CP, Serwanski DR, Li X, Rubio M, De Blas AL. The brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2, a protein involved in vesicular trafficking, interacts with the β subunits of the GABA_A receptors. *J Neurochem* (2004); 90:173-189

Chebib M, Johnston GAR. GABA-activated ligand gated ion channels: Medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* (2000); 43:1427–1447

Chebib M, Johnston GAR. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (1999); 26:937-940

Chen L, Wang H, Vicini S, Olsen RW. The gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABA_A receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000); 97:11557-11562

Chen PE, Wyllie DJ. Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* (2006); 147:839-853

Chen ZW, Chang CS, Leil TA, Olsen RW. C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA_A receptor trafficking. *J Neurosci* (2007); 27:6655-6663

Cherubini E, Strata F. GABA_C receptors: a novel receptor family with unusual pharmacology. *News Physiol Sci* (1997); 12:136-141

Chu DCM, Albin RL, Young AB, Penney JB. Distribution and kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* (1990); 34:341-357

Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, Smith A, Otu FM, Howell O, Atack JR, McKernan RM, Seabrook GR, et al. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABA_A receptor. *J Neurosci* (2002); 22:5572-5580

- Cooper SJ. Benzodiazepines and appetite: Recent pre-clinical advances and their clinical implications. *Human Psychopharmacol* (1989); 4:81-89
- Corringer PJ, Novère N, Changeaux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2000); 40:431-458
- Crawley JN. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* (2008); 57:809-818
- Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* (1981); 15:695-699
- Crawley JN. Exploratory behaviour models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev* (1985); 9:37-44
- Crawley JN, Davis LG. Baseline exploratory activity predicts anxiolytics responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Res Bull* (1982); 8:609-612
- Crawley JN, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* (1980); 13:167-170
- Crestani F, Martin JR, Möhler H, Rudolph U. Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. *Br J Pharmacol* (2000); 131:1251-1254
- Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Bluthmann H, Möhler H, Rudolph U. Trace fear conditioning involves hippocampal α_5 GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002); 99:8980-8985
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* (2005); 4:775-790
- Cryan JF, Sweeney FF. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *Br J Pharmacol* (2011); 164:1129-61
- Cutting GR et al. Cloning of the GABA ρ_1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991); 88:2673-2677
- Davies M. The role of GABA_A receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* (2003); 28(4):263-74
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin receptor function. *Nature* (1999); 397:359-363
- Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn²⁺. *J Biol Chem* (2003); 278:712-717
- Dick DM, Edenberg HJ, Xuei X, Goate A, Kuperman S, Schuckit M, et al. Association of GABRG3 with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* (2004); 28(1):4-9
- During MJ, Ryder KM, Spencer DD. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature* (1995); 376:174-177
- Ebert B, Wafford KA, Whiting PJ, Krosggaard-Larsen P, Kemp JA. Molecular pharmacology of gamma-aminobutyric acid type A receptor agonists and partial agonists in oocytes injected with different alpha, beta, and gamma receptor subunit combinations. *Mol Pharmacol* (1994); 46:957-963
- Enz R, Cutting GR. Molecular composition of GABA_C receptors. *Vis Res* (1998); 38:1431-1441
- Enz R, Cutting GR. GABA_C receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct properties. *Eur J Neurosci* (1999); 11:41-50

Ernst M, Brauchart D, Boresch S, Sieghart W. Comparative modeling of GABA_A receptors: Limits, insights, future developments. *Neuroscience* (2003); 119:933-943

Ernst M, Bruckner S, Boresch S, Sieghart W. Comparative models of GABA_A receptor extracellular and transmembrane domains: important insights into pharmacology and function. *Mol Pharmacol* (2005); 68:1291-1300

Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Lüscher B. Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* (1998); 1:563-571

Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM. Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem* (1999); 274:10100-10104

Feigenspan A, Bormann J. GABA gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Prog Retinal Eye Res* (1998); 17:99-126

Fernandez S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Sedative and sleepenhancing properties of linarin, a flavonoid - isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Behav* (2004); 77:399-404

Feusner J, Richie T, Lawford B, Young RM, Kann B, Noble EP. GABA_A receptor beta3 subunit gene and psychiatric morbidity in a post-traumatic stress disorder population. *Psychiatry Res* (2001); 104:109-117

Fisher JL. Amiloride inhibition of gamma-aminobutyric acid(A) receptors depends upon the alpha subunit subtype. *Mol Pharmacol* (2002); 61:1322-1328

Fisher JL, Macdonald RL. The role of an alpha subtype M2-M3 His in regulating inhibition of GABA_A receptor current by zinc and other divalent cations. *J Neurosci* (1998); 18:2944-2953

Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, et al. Neurosteroids, GABA_A receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacology (Berl)* (2006);186(3):267-80

Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* (1994); 367:607-614

Fritschy JM, Benke D, Mertens S, Oertel WH, Bachi T, Möhler H. Five subtypes of type A gamma-aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci. USA.* (1992); 89:6726-6730

Fritschy JM, Kiener T, Boulleret V, Loup F. GABAergic neurons and GABA_A-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* (1999); 34:435-445

Froestl W, Markstein R, Schmid KL, Trendelenburg AU. GABA_C antagonists for the treatment of myopia. *PCT Int Appl* (2004); 20030627, 8 pp

Frølund B, Ebert B, Kristiansen U, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. GABA(A) receptor ligands and their therapeutic potentials. *Curr Top Med Chem* (2002); 2:817-32

Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y. Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* (2002); 25:564-570

Goto H, Terunuma M, Kanematsu T, Misumi Y, Moss SJ, Hirata M. Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA_A receptor β subunits. *Mol Cell Neurosci* (2005); 30:197-206

Griebel G, Perrault G, Simiand J, Cohen C, Granger P, Depoortere H, Francon D, Avenet P, Schoemaker H, Evanno Y, Sevrin M, George P, et al. SL651498, a GABA_A receptor agonist with subtype-selective efficacy, as a potential treatment for generalized anxiety disorder and muscle spasms. *CNS Drug Rev* (2003); 9:3-20

Haefely WE. Structure and function of the benzodiazepine receptor. *Chimia* (1987); 41:389-396

- Hall RH. General Characteristics of Schizophrenia. Missouri University of Science and Technology (1998)
- Harris RA. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol Clin Exp Res* (1999); 23(10):1563–70
- Hascoët M, Bourin M. A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav* (1998); 60:645-653
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* (2002); 13:572–584
- Hevers W, Lüddens H. The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol* (1998); 18:35-86
- Hill-Venning C, Belelli D, Peters JA, Lambert JJ. Subunit-dependent interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Br J Pharmacol* (1997); 120:749-756
- Hold KM, Sirisoma NS, Ikeda T, Narahashi T, Casida JE. α -Thujone (the active component of absinthe): γ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000); 97:3826–3831
- Horenstein J, Akabas MH. Location of a high affinity Zn²⁺ binding site in the channel of alpha1beta1 gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol* (1998); 53:870-877
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, Smart TG. Zinc-mediated inhibition of GABA_A receptors: Discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat Neurosci* (2003); 6:362-399
- Huang K, El-Husseini A. Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation. *Curr Opin Neurobiol* (2005); 15:527–535
- Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GAR. Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from *Ginkgo biloba*, is an antagonist at recombinant alpha(1)beta(2)gamma(2L) GABA_A receptors. *Eur J Pharmacol* (2003); 464:1–8
- Huang Q, He X, Ma C, Liu R, Yu S, Dayer CA, Wenger GR, McKernan R, Cook JM. Pharmacophore/receptor models for GABA_A/BzR subtypes (alpha1beta3gamma2, alpha5beta3gamma2, alpha6beta3gamma2) via a comprehensive ligand-mapping approach. *J Med Chem* (2000); 43:71-95
- Im HK, Im WB, Carter DB, McKinley DD. Interaction of beta-carboline inverse agonists for the benzodiazepine site with another site on GABA_A receptors. *Br J Pharmacol* (1995); 114:1040-1044
- Izquierdo I, Medina JH. GABA_A receptor modulation of memory: The role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* (1991); 12:260-265
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* (2009); 9(5):331-343
- Jensen ML, Timmermann DB, Johansen TH, Schousboe A, Varming T, Ahring PK. The β subunit determines the ion selectivity of the GABA_A receptor. *J Biol Chem* (2002); 277:41438-41447
- Johnston GAR. GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* (1996); 69:173-98
- Johnston GAR. GABA_C receptors: Relatively simple transmitter-gated ion-channels? *Trends Pharmacol* (1996); 17:319-23
- Johnston GAR, Chebib M, Hanrahan JR, Mewett KN. GABA_C receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* (2003); 2:260–268

- Johnston GAR, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN. Modulation of ionotropic GABA receptors by Natural Products of Plant Origin. *Adv Pharmacol* (2006); 54:285-316
- Johnstone TB, Hogenkamp DJ, Coyne L, Su J, Halliwell RF, Tran MB, Yoshimura RF, Li WY, Wang J, Gee KW. Modifying quinolone antibiotics yields new anxiolytics. *Nat Med* (2004); 10:31-32
- Jones EG. The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. *Cereb Cortex* (2009); 19:1953-1956
- Jones FA, Chatterjee SS, Davies JA. Effects of bilobalide on amino acid release and electrophysiology of cortical slices. *Amino Acids* (2002); 22:369-379
- Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaugg M, Vogt KE, Ledermann B, Antkowiak B, Rudolph U. General anesthetic acitons in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA_A receptor beta3 subunit. *FASEB J* (2003); 17:250-252
- Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T, Voipio J. Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *J Neurosci* (1997); 17:7662-7672
- Kalueff A, Nutt DJ. Role of GABA in memory and anxiety. *Depress Anxiety* (1997); 4:100-110
- Kanematsu T, Yoshimura K, Hidaka K, Takeuchi H, Katan M, Hirata M. Domain organization of p130, PLC-related catalytically inactive protein, and structural basis for the lack of enzyme activity. *Eur J Biochem* (2000); 267:2731-2737
- Kash TL, Dizon MJ, Trudell JR, Harrison NL. Charged residues in the beta2 subunit involved in GABA_A receptor activation. *J Biol Chem* (2004); 279:4887-4893
- Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, Harrison NL. Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* (2003); 421: 272-275
- Kavvadias D, Monschein V, Sand P, Riederer P, Schreier P. Constituents of sage (*Salvia officinalis* L.) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Planta Med* (2003); 69:113-117
- Keller CA, Yuan X, Panzanelli P, Martin ML, Alldred M, Sassoè-Pognetto M, Lüscher B. The $\gamma 2$ subunit of GABA_A receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci* (2004); 24:5881-5891
- Kerr DIB, Ong J. GABAB receptors. *J.Pharmacol. Ther.* (1995); 67:187-46
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* (2005); 62:593-602
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP. International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* (2001); 53:107-118
- Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensor in health and disease. *Nature* (2006); 442/3:527-532
- Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B et al. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* (2007); 53:178-87
- Khom S, Barburin I, Timin EN, Hohaus A, Sieghart W, Hering S. Pharmacological properties of GABA_A receptors containing gamma1 subunits. *Mol Pharmacol* (2006); 69:640-649

Khom S, Strommer B, Ramharter J, Schwarz T, Schwarzer C, Erker T, Ecker GF, Mulzer J, Hering S. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABA_A receptor ligands – in vitro and in vivo characterization. *Br J Pharmacol* (2010); 161:65-78

Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, Moss SJ. Constitutive endocytosis of GABA_A receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* (2000); 20:7972-7677

Kittler JT, Moss SJ. Modulation of GABA_A receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* (2003); 13:341-347

Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, Moss SJ. The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* (2001); 18:13-25

Knoflach F, Benke D, Wang Y, Scheurer I, Luddens H, Hamilton BJ, Carter DB, Möhler H, Benson JA. Pharmacological modulation of the diazepam insensitive recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors alpha 4 beta 2 gamma 2 and alpha 6 beta 2 gamma 2. *Mol Pharmacol* (1996); 50:1253-1261

Korpi ER, Luddens H. Furosemide interactions with brain GABA_A receptors. *Br J Pharmacol* (1997); 120:741-748

Korpi ER, Kuner T, Seeburg PH, Luddens H. Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Mol Pharmacol* (1995); 47:283-289

Korpi ER, Grunder G, Luddens H. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog Neurobiol* (2002); 67:113-159

Krystal JH, Staley J, Mason G, Petrakis IL, Kaufman J, Harris RA, et al. Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* (2006); 63(9):957–68

Kuribara H, Stavinoha WB, Maruyama Y. Honokiol, a putative anxiolytic agent extracted from magnolia bark, has no diazepam-like side-effects in mice. *J Pharm Pharmacol* (1999); 51:97–103

Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA. Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol Sci* (1995); 16:295-303

Lambert JJ, Harney SC, Belelli D, Peters JA. Neurosteroid modulation of recombinant and synaptic GABA_A receptors. *Int Rev Neurobiol* (2001); 46:177-205

Lancel M, Steiger A. Sleep and its modulation by drugs that affect GABA_A receptor function. *Ang Chem Int Ed* (1999); 111:2852–2864

Langen B, Egerland U, Bernoster K, Dost R, Unverferth K, Rundfeldt C. Characterization in rats of the anxiolytic potential of ELB139 [1-(4-chlorophenyl)-4-piperidin-1-yl-1,5-dihydro-imidazol-2-on], a new agonist at the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor. *J Pharmacol Exp Ther* (2005); 314:717-724

Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* (1992); 12:1063-1076

Licata SC, Platt DM, Cook JM, Sarma PV, Griebel G, Rowlett JK. Contribution of GABA_A receptor subtypes to the anxiolytic-like, motor, and discriminative stimulus effects of benzodiazepines: Studies with the functionally-selective ligand SL651498. *J Pharmacol Exp Ther* (2005); 313:1118-1125

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* (1987); 92:180-185

Lobo IA, Harris RA. GABA_A receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* (2008); 90:90-94

Loebrich S, Bahring R, Katsuno T, Tsukita S, Kneussel M. Activated radixin is essential for GABA_A receptor α 5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *Embo J* (2006); 25:987-999

Loh EW, Ball D. Role of the GABA-A₂ receptor subunit genes cluster in drug responses and the development of alcohol dependence. *Neurochem Int* (2000); 37:413-423

López-Muñoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* (2005); 1(4):329-343

Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüllicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science (Wash DC)* (2000); 290:131-134

Lüddens H, Korpi ER. Biological function of GABA_A/Benzodiazepine receptor heterogeneity. *J Psychiat Res* (1995); 29/2:77-94

Lüddens H, Korpi ER. GABA antagonists differentiate between recombinant GABA_A/benzodiazepine receptor subtypes. *J Neurosci* (1995); 15:6957-6962

Luk KC, Stern L, Weigele M, O'Brien RA, Spirst N. Isolation and identification of "diazepam-like" compounds in bovine brain. *J Nat Prod* (1983); 46:852-861

Lukas RJ, Bencherif M. Recent developments in nicotinic acetylcholine receptor biology. In: Arias HR, editor. *Biological and Biophysical Aspects of ligand-gated Ion Channel Receptor Superfamilies*. Research Signpost; Kerala, India (2006); s. 2-33

Macdonald RL, Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* (1994); 17:569-602

Maksay G, Simonyi M. Benzodiazepine anticonvulsants accelerate and beta-carboline convulsants decelerate the kinetics of [³⁵S]TBPS binding at the chloride ionophore. *Eur J Pharmacol* (1985); 117:275-278

Maksay G, Ticku MK. GABA, depressants and chloride ions affect the rate of dissociation of 35S-t-butylbicyclophosphorothionate binding. *Life Sci* (1985a); 37:2173-2180

Maksay G, Ticku MK. Dissociation of 35S-t-butylbicyclophosphorothionate binding differentiates convulsant and depressant drugs that modulate GABAergic transmission. *J Neurochem* (1985b); 44:480-486

Marder M, Paladini, AC. GABA_A receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Top Med Chem* (2002); 2:853-867

Marowsky A, Fritschy JM, Vogt KE. Functional mapping of GABA-A receptor subtypes in the amygdale. *Eur J Neurosci* (2004); 20:1281-1289

Mathews GC, Bolos-Sy AM, Holland KD, Isenberg KE, Covey DF, Ferrendelli JA, Rothmann SM. Developmental alteration in GABA_A receptors structure and physiological properties in cultured cerebellar granule neurons. *Neuron* (1994); 13:149-158

McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, et al. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* (2000); 3:587-592

Mihalek RM, Banerjee PK, Korpi ER, Quinlan JJ, Firestone LL, Mi ZP, Lagenaur C, Tretter V, Sieghart W, Anagnostaras SG, Sage JR, Fanselow MS et al. Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* (1999); 96:12905-12910

Misgeld U. Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* (2004); 318:107-114

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* (2003); 423:949-955

- Mizokami A, Kanematsu T, Ishibashi H, Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss SJ, Yamamoto T, Nabekura J, Hirata M. Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of $\gamma 2$ subunit-containing GABA_A receptors to the cell surface. *J Neurosci* (2007); 27:1692-1701
- Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* (1994); 17:517-525
- Möhler H. Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: A new benzodiazepine pharmacology. *Dialog Clin Neurosci* (2002); 4:261-269
- Möhler H. GABA_A receptors in central nervous systems disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Receptors and Signal Transduction* (2006); 26:731-740
- Möhler H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential (2012); *Neuropharmacology* (2012); 62:42-53
- Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A new Benzodiazepine Pharmacology. *JPET* (2002); 300:2-8
- Möhler H, Fritschy JM, Vogt K, Crestani F, Rudolph U. Pathophysiology and pharmacology of GABA_A receptors. *Handb Exp Pharmacol* (2005); 169:225-247
- Mozrzymas JW, Zarnowska ED, Pytel M, Mercik K. Modulation of GABA(A) receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process. *J Neurosci* (2003); 23:7981-7992
- Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA. Quaternary structure of the native GABA_A receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* (1994); 62:815-818
- Nusser Z, Mody I. Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* (2002); 87:2624-2628
- Nusser Z, Naylor D, Mody I. Synapse-specific contribution of the variation of transmitter concentration to the decay of inhibitory postsynaptic currents. *Biophys J* (2001); 80:1251-1261
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* (1998); 18:1693-1703
- Nutt DJ, Glue P, Lawson C. The neurochemistry of anxiety: An update. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry* (1990); 14:737-752
- Olsen RW. Drug interactions at the GABA-receptor ionophore complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1982); 22:245-277
- Olsen RW, Avoli M. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* (1997); 38:399-407
- Olsen RW, DeLorey TM, Gordey M, Kang MH. GABA receptor function and epilepsy. *Adv Neurol* (1999); 79:499-510
- Parsian A, Zhang ZH. Human chromosomes 11p15 and 4p12 and alcohol dependence. Possible association with the GABBR1 gene. *Am J Med Genet* (1999); 88:533-538
- Paulsen O, Moser EI. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* (1998); 21:273-278
- Persohn E, Malherbe P, Richards JP. Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABA_A receptor subunits in the rat CNS. *J Comp Neurol* (1992); 326:193-216

- Peters JA, Hales TG, Lambert JJ. Molecular determinants of single-channel conductance and ion selectivity in the Cys-loop family: insights from 5-HT₃ receptor. *Trends Pharmacol Sci* (2005); 26:587-594
- Peters JA, Kirkness EF, Callachan H, Lambert JJ, Turner AJ. Modulation of the GABA_A receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol* (1988); 94:1257-1269
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* (1982); 257:9389-9393
- Pine DS. Integrating research on development and fear learning: a vision for clinical neuroscience? *Depress Anxiety* (2009); 26:775-779
- Pinna G, Uzunova V, Matsumoto K, Puia G, Mienville JM, Costa E, Guidotti A. Brain allopregnanolone regulates the potency of the GABA_A receptor agonist muscimol. *Neuropharmacology* (2000); 39:440-448
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA_A receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* (2000); 101:815-850
- Plag J, Siegmund A, Strohle A. Pharmakotherapie bei Angsterkrankungen. *Z Psychiatr Psychol Psychother* (2009); 57:185-194
- Pratt JA. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther* (1992); 55:149-181
- Priestley CM, Williamson EM, Wafford K, Sattelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA_A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* (2003); 140:1363-1372
- Puia G, Vicini S, Seeburg PH, Costa E. Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents. *Mol Pharmacol* (1991); 39:691-696
- Ravindran LN, Stein MB. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *J Clin Psychiatry* (2010); 71:839-854
- Reich T. A genomic survey of alcohol dependence and related phenotypes: results from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism (COGA). *Alcohol Clin Exp Res* (1996); 20:133A-7A
- Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, et al. Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am J Med Genet* (1998); 81:207-15
- Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwaite A, Newman RJ, Myers J, Sur C, Howell O, Rutter AR, Atack J, Macaulay AJ, et al. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA_A receptor isoforms. *J Neurosci* (2003); 23:8608-8617
- Riorelli R, Rudolph U, Straub C, Feldon J, Yee BK. Affective and cognitive effects of global deletion of alpha3 containing gamma-aminobutyric acid-A receptors. *Behav Pharmacol* (2008); 19:582-596
- Rivera C, Voipio J, Kaila K. Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* (2005); 562:27-36
- Roche KW, Raymond LA, Blackstone C, Hagan RL. Transmembrane topology of the glutamate receptor subunit GluR6. *J Biol Chem* (1994); 269:11679-11682
- Rossi DJ, Hamann M, Attwell D. Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *J Physiol* (2003); 548:97-110
- Roy MA, Neale MC, Pedersen NL, Mathe AA, Kendler KS. A twin study of generalized anxiety disorder and major depression. *Psychol Med* (1995); 25:1037-1049

- Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* (2004); 5:709-720
- Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABA_A receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2004); 44:475-498
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. Benzodiazepines actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* (1999); 401:796-800
- Saliba RS, Michels G, Jacob TC, Pangalos MN, Moss SJ. Activity-dependent ubiquitination of GABA_A receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *J Neurosci* (2007); 27:13341-13351.
- Sarter M, Schneider HH, Stephens DM. Treatment strategies for senile dementia: Antagonist beta-carbolines. *Trends Neurosci* (1988); 11:13-17
- Sartori SB, Landgraf R, Singewald N. The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future Neurol* (2011); 6:531-571
- Sasaki K, Hatta S, Haga M, Ohshika H. Effects of bilobalide on gammaaminobutyric acid levels and glutamic acid decarboxylase in mouse brain. *Eur J Pharmacol* (1999a); 367:165–173
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, Seeburg PH, Barnard EA. Sequence and functional expression of GABA_A receptors shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* (1987); 328:221-227
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM. GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* (2003); 6:484-490
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. Tonic active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* (2004); 27:262-269
- Sieghart W. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* (1995); 47:181-234
- Sieghart W. Structure, Pharmacology, and Function of GABA_A Receptor Subtypes. *Advances in Pharmacology* (2006); 54:231-263
- Sieghart W, Ernst M. Heterogeneity of GABA_A receptors: Revived interest in the development of subtype-selective drugs. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst, Agents* 5 (2005); 217-242
- Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* (2002); 2:795-816
- Sigel E. Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA_A receptors. *Curr Top Med Chem* (2002); 2:833-839
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. Analysis of the set of GABA_A receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* (2004); 279:41422-41435
- Sine S, Engel A. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* (2006); 440:448-455
- Smith AJ, Oxley B, Malpas S, Pillai GV, Simpson PB. Compounds exhibiting selective efficacy for different beta subunits of human recombinant gamma-aminobutyric acid A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* (2004); 311:601-609

- Smith GB, Olsen RW. Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol Sci* (1995); 16:162-168
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* (1998); 86:353-387
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. Salient features of synaptic organisation in cerebral cortex. *Brain Res Rev* (1998); 26:113-135
- Squires RF, Ai J, Witt MR, Kahnberg P, Saederup E, Sterner O, Nielsen M. Honokiol and magnolol increase the number of [3H] muscimol binding sites three-fold in rat forebrain membranes in vitro using a filtration assay, by allosterically increasing the affinities of low-affinity sites. *Neurochem Res* (1999); 24:1593-1602
- Steckler T., Stein MB, Holmes A. Developing Novel Anxiolytics: Improving Preclinical Detection and Clinical Assessment. In: McArthur RA, Borsini F. *Animal and Translational Models for CNS Drug Discovery*. Academic Press; New York, USA (2008).
- Stell BM, Brickley SG, Tang CY, Farrant M, Mody I. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003); 100:14439-14444
- Stornstovu S, Ebert B. Gaboxadol: In vitro interaction studies with benzodiazepines and ethanol suggest functional selectivity. *Eur J Pharmacol* (2003); 467:49-56
- Study RE, Barker JL. Diazepam and (-)-pentobarbital: Fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981); 78:7180-7184
- Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K, Smith SS. Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA_A receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* (2002); 5:721-722
- Suzdak PD, Jansen JA. A review of the preclinical pharmacology of tiagabine: a potent and selective anticonvulsant GABA uptake inhibitor. *Epilepsia* (1995); 36:612-6626
- Taferner B, Schuehly W, Huefner A, Baburin I, Wiesner K, Ecker GF, Hering S. Modulation of GABA_A-receptors by honokiol and derivatives: subtype selectivity and structure-activity relationship. *J Med Chem* (2011); 54(15):5349-5361
- Taylor M, Bhagwagar Z, Cowen PJ, Sharp T. GABA and mood disorders. *Psych Med* (2003); 33:3873-3893
- Tecott LH. The genes and brains of mice and men. *American J Psychiatry* (2003); 160:646-656
- Tepper JM, Bolam JP. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* (2004); 14:685-692
- Thomet U, Baur R, Scholze P, Sieghart W, Sigel E. Dual mode of stimulation by the beta-carboline ZK 91085 of recombinant GABA_A receptor currents: Molecular determinants affecting its action. *Br J Pharmacol* (1999); 127:1231-1239
- Thompson AJ, Lummis SCR. 5-HT₃ receptors. *Curr Pharm Des* (2006); 12:3615-3630
- Tobler I, Kopp C, Deboer T, Rudolph U. Diazepam-induced changes in sleep: Role of the α 1GABA_A receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001); 98:6464-6469
- Topliss JG, Clark AM, Ernst E, Hufford CD, Johnston GAR, Rimoldi, JM, Weimann BJ. Natural and synthetic substances related to human health - (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* (2002); 74:1957-1985

Tossman U, Jonsson G, Ungerstedt U. Regional distribution and extracellular levels of amino acids in rat central nervous system. *Acta Physiol Scand* (1986); 127:533-545

Treiman DM. GABAergic mechanisms in Epilepsy. *Epilepsia* (2001); 42:8-12

Tretter V, Ehya N, Fuchs K, Sieghart W. Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA_A receptor subtype. *J Neurosci* (1997); 2728-2737

Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, Moss SJ. The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* (2008); 28:1356-65

Turek FW, Van Reeth O. Altering the mammalian circadian clock with the short-acting benzodiazepine, triazolam. *Trends Neurosci* (1988); 11:535-541

Uji A, Matsuda M, Kukita T, Maeda K, Kanematsu T, Hirata M. Molecules interacting with PRIP-2, a novel Ins(1,4,5)P3 binding protein type 2: Comparison with PRIP-1. *Life Sci* (2002); 72:443-453

Uusi-Oukari M, Korpi ER. Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev* (2010); 62(1):97-135

Viola H, Wasowski C, Levi de Stein M, Wolfman C, Silvera R, Medina AE, Paladini AC. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med* (1995); 61:213-216

Wafford, KA, Bain CJ, Quirk K, McKernan RM, Wingrove PB, Whiting PJ, Kemp JA. A novel allosteric modulatory site on the GABA_A receptor beta subunit. *Neuron* (1994); 12:775-782

Wafford KA, Bain CJ, Whiting PJ, Kemp JA. Functional comparison of the role of gamma subunits in recombinant human gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors. *Mol Pharmacol* (1993); 44:437-442

Wafford KA, Thompson SA, Thomas D, Sikela J, Wilcox AS, Whiting PJ. Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha 4 subunit. *Mol Pharmacol* (1996); 50:670-678

Wafford KA, Macaulay AJ, Fradley R, O'Meara GF, Reynolds DS, Rosahl TW. Differentiating the role of gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor subtypes. *Biochem Soc Trans* (2004); 32:553-556

Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* (1997); 387:598-603

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* (2007); 2(2):322-328

Wallner M, Hancher HJ, Olsen RW. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003); 100:15218-15223

Walters RJ, Hadley SH, Morris KD, Amin J. Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci* (2000); 3:1274-1281

Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. GABA_A receptor-associated protein links GABA_A receptors and the cytoskeleton. *Nature* (1999); 397:69-72

Wang H, Olsen RW. Binding of the GABA_A receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAP-GABA_A receptor interaction. *J Neurochem* (2000); 75:644-655

- Wegelius K et al. Distribution of GABA receptor ρ subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci* (1998); 10:350-357
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I. Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* (2003); 23:10650-10661
- Whiting PJ. The GABA_A receptor gene family: New opportunities for drug development. *Curr Opin Drug Discov Devel* (2003); 6:648-657
- WHO. Global Burden of Disease Report. WHO Press; Geneva, Switzerland (2004).
- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* (1992); 12:1040-1062
- Woods JH, Katz JL, Winger G. Benzodiazepines: Use, abuse, and consequences. *Pharmacol Rev* (1992); 44:151-347
- Xiu X, Hanek AP, Wang J, Lester HA, Dougherty DA. A unified view of the role of electrostatic interactions in modulating the gating of Cys loop receptors. *J Biol Chem* (2005); 280:41655-41666
- Yee BK, Hauser J, Dolgov VV, Keist R, Möhler H, Rudolph U, Feldon J. GABA receptors containing the alpha5 subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditional fear. *Eur J Neurosci* (2004); 20:1928-1936
- Yi JJ, Ehlers MD. Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev* (2007); 59:14-39
- Yoon JH, Maddock RJ, Rokem A, Silver MA, Minzenberg MJ, Ragland JD, Carter CS. GABA concentration is reduced in visual cortex in Schizophrenia and correlates with orientation-specific surround suppression. *J Neurosci* (2010); 30(10):3777-3781
- Young R, Johnson DN. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* (1991a); 40:739-743
- Young R, Johnson DN. Comparison of routes of administration and time course effects of zacopride and buspirone in mice using an automated light/dark test. *Pharmacol Biochem Behav* (1991b); 40:733-737
- Yuan CS, Mehendale S, Xiao Y, Aung HH, Xie JT, Ang-Lee MK. The gamma-aminobutyric acidergic effects of valerian and valerianic acid on rat brainstem neuronal activity. *Anesth Analg* (2004); 98:353-358
- Zhao C, Slevin JT, Whiteheart SW. Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett* (2007); 581:2140-2149
- Zhang W, Koehler KF, Zhang P, Cook J. Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor. *Drug Des Discov* (1995); 12:193-248

12. CURRICULUM VITAE

Persönliches

Name: Sandra Maurer
Geburtsdatum: 28. April 1987
Geburtsort: Oberpullendorf
Familienstand: ledig
Nationalität: Österreich

Ausbildung

1993-1997 Volksschule Rechnitz
1997-2001 Hauptschule Rechnitz
2001-2006 Handelsakademie Oberwart
2006-Lfd. Diplomstudium der Pharmazie/Universität Wien

Pharmaziebezogene Praktika

August 2009, Juli 2010, Juli 2011 – St. Anna Apotheke, 1120 Wien
(Rezeptur, Warenübernahme, Labor)

Sprachkenntnisse

Deutsch Muttersprache
Englisch Fließend
Französisch Grundkenntnisse