



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der Stress-reduzierenden Wirkung eines Subtyp-selektiven GABA_A Rezeptor Modulators und Derivate

Verfasserin

Claudia Reisinger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Univ. Prof. Dr. sc. Med. Steffen Hering

Inhaltsverzeichnis:

Danksagung:	4
Zusammenfassung:	5
Abstract:	6
1. Einleitung:	7
1.1 GABA:.....	7
1.2 Synthese und Freisetzung von GABA:.....	7
1.3 Aufbau des GABA _A Rezeptors:.....	8
1.4 Die GABA Bindungstasche:.....	11
1.5 Zelluläre Wirkung von GABA:.....	13
1.6 Gating:.....	13
1.7 Phasische und tonische Inhibition:.....	15
1.8 Vorkommen und Funktionen einzelner GABA _A Rezeptor Untereinheiten:.....	15
1.8.1 α -Untereinheiten:.....	17
1.8.2 β -Untereinheiten:.....	18
1.8.3 γ -Untereinheiten:.....	19
1.8.4 ρ -Untereinheiten:.....	20
1.8.5 δ -Untereinheit:.....	20
1.9 GABA _B -Rezeptor:.....	22
1.10 Modulation von GABA _A Rezeptoren:.....	24
1.10.1 Neurosteroid:.....	25
1.10.2 Benzodiazepine:.....	27
1.10.3 Anästhetika:.....	30
1.10.4 Ethanol:.....	33
1.10.5 Barbiturate:.....	34
1.10.6 Furosemid:.....	36
1.10.7 Loreclezol:.....	37
1.11 ZNS-Erkrankungen.....	38
1.11.1 Angststörungen und Depressionen:.....	38
1.11.2 Epilepsie:.....	39
1.11.3 Schizophrenie:.....	42
1.11.4 Schlafstörungen:.....	42
2. Problemstellung und Zielsetzung:	44
3. Material und Methoden:	45
3.1 Tiere:.....	45

3.2 Injektionslösungen:	46
3.3 Open-Field-Test (OF):.....	46
3.4 Stress-Induced Hyperthermia-Test (SIH):	47
3.5 Statistische Analyse:	48
4. Ergebnisse:	49
4.1 SIH-Test:.....	49
4.1.1 Effekt von Diazepam (DZP) auf Stress-induzierte Hyperthermie:.....	49
4.1.2 Effekt von CR-0 auf Stress-induzierte Hyperthermie:.....	49
4.1.3 Effekt von CR-1 auf Stress-induzierte Hyperthermie:.....	50
4.4.4 Effekt von CR-2 auf Stress-induzierte Hyperthermie:.....	51
4.4.5 Effekt von CR-3 auf Stress-induzierte Hyperthermie:.....	51
4.4.6 Effekt von CR-4 auf Stress-induzierte Hyperthermie:.....	52
4.2 OF-Test:	53
4.2.1 Totalstrecke:.....	53
4.2.2 Rearings:.....	54
4.2.3 Strecke im Zentrum:	55
4.2.4 Zeit im Zentrum:	56
5. Diskussion:	57
6. Quellenverzeichnis:	59
7. Lebenslauf:	65

Danksagung:

Zu Beginn bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Univ. Prof. Dr. sc. Med. Steffen Hering für die Bereitstellung meines Diplomarbeitsplatzes, die Zuteilung des interessanten Themas und für die ermöglichte Einsicht in einen Teilbereich der pharmakologischen Forschung.

Besonders gilt mein Dank Frau Mag. Dr. Sophia Khom für ihre fachlich kompetente Betreuung, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Außerdem bedanke ich mich bei Tsvetelina Yotova, die mich tatkräftig bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche unterstützt hat.

Zuletzt spreche ich meinen Eltern und meinem Bruder großen Dank aus. Ohne ihre finanzielle Unterstützung und ihren moralischen Beistand hätte ich mein Studium nicht so problemlos abschließen können.

Zusammenfassung:

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren (Owens und Kriegstein, 2002; Connolly und Wafford, 2004; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012) und reguliert somit die neuronale Erregbarkeit (Möhler, 2006). Der GABA Typ A ($GABA_A$) Rezeptor setzt sich aus fünf Untereinheiten zusammen, die einen zentralen Chloridionenkanal bilden (Connolly und Wafford, 2004; Möhler, 2006; Rudolph und Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2009). $GABA_A$ Rezeptoren werden von zahlreichen chemisch diversen Substanzen positiv moduliert (Sigel und Steinmann, 2012), wodurch es unter anderem zu Sedierung, Anxiolyse oder Muskelrelaxierung kommt. Daher sind $GABA_A$ Rezeptoren ein wichtiger molekularer Angriffspunkt in der Therapie von Angst- und Schlafstörungen oder Epilepsie (Möhler, 2006a).

$GABA_A$ Rezeptor Modulatoren, wie beispielsweise Benzodiazepine, weisen aber neben den erwünschten Effekten zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen auf, was auf ihre unspezifische Interaktion mit den verschiedenen $GABA_A$ Rezeptor Isoformen zurückzuführen ist (Connolly und Wafford, 2004). Durch die Entwicklung selektiver Arzneistoffe erhofft man sich eine Verminderung dieser Nebeneffekte (Möhler et al., 2002). Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte ich den Effekt eines Subtyp-selektiven $GABA_A$ Rezeptor Modulators und ausgewählter Derivate (CR-0; CR-1-4) auf Stress und Motoraktivität von C57BL/6/N Mäusen mittels Stress-induced Hyperthermia- (SIH) und Open Field (OF)-Test untersuchen und mit dem Effekt von Diazepam vergleichen.

Meine Untersuchungen zeigten, dass CR-0 und seine Derivate CR-1, CR-2, CR-3 und CR-4 zu signifikanter Stressreduktion führen. Die stärksten Effekte wurden dabei für die Substanzen CR-2 und CR-3 beobachtet, deren Wirkung mit der von Diazepam vergleichbar war. Daneben zeigte CR-1 anxiolytische Wirkung vergleichbar mit Diazepam, jedoch weniger sedierende Nebeneffekte.

Abstract:

γ -aminobutyric acid (GABA) is the most important inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS) (Owens und Kriegstein, 2002; Connolly und Wafford, 2004; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012) and plays therefore an important role in the control of the brain`s excitability (Möhler, 2006a). GABA type A (GABA_A) receptors are composed of five subunits that form a central chloride ion channel (Connolly und Wafford, 2004; Möhler, 2006; Rudolph und Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2009). GABA_A receptor modulators enhance GABA-induced chloride currents (Sigel und Steinmann, 2012), causing thus sedation, anxiolysis or muscle relaxation. Therefore, GABA_A receptors represent an important drug target in the therapy of anxiety, sleep disorders or epilepsy (Möhler, 2006a).

GABA_A receptor modulators such as benzodiazepines have some undesirable side effects due to their non-specific interaction with the various GABA_A receptor isoforms. Development of subtype-selective drugs might thus result in a reduction of these side effects. In my diploma thesis I compared the effects of a subtype-selective GABA_A receptor modulator (CR-0) and selected derivatives (CR-1-4) on stress and motor activity by means of the stress-induced-hyperthermia- (SIH) and open field (OF)-test in C57BL/6/N mice with the effects of diazepam.

My data indicate that CR-0 and its derivatives CR-1, CR-2, CR-3 and CR-4 lead to significantly reduced stress-induced hyperthermia. The strongest effect, which is comparable to the stress-reducing effect of diazepam, was observed for the compounds CR-2 and CR-3. Furthermore, application of CR-1 resulted in a reduction of anxiety-related behavior comparable to diazepam while revealing significantly less pronounced sedation.

1. Einleitung:

1.1 GABA:

γ -Aminobuttersäure (GABA) (siehe Abbildung 1) ist der am häufigsten vorkommende inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren und aktiviert sowohl ionotrope GABA Typ A, als auch metabotrope GABA Typ B (GABA_B) Rezeptoren (Owens und Kriegstein, 2002; Connolly und Wafford, 2004; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012). Allerdings kommt GABA unter physiologischen Bedingungen nicht als Säure vor, sondern als Ion und sollte daher eigentlich als γ -Aminobutyrat bezeichnet werden (Sigel und Steinmann, 2012). GABA wurde erstmals im Jahr 1950 im Gehirn entdeckt und 1967 als inhibitorischer Neurotransmitter identifiziert (Froestl, 2011). 20% bis 30% der Neuronen im ZNS sind GABAerg (Rudolph und Knoflach, 2011).

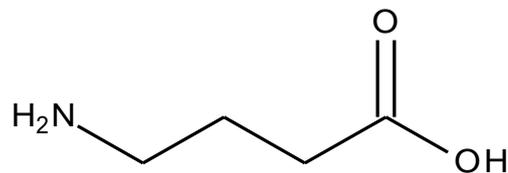


Abbildung 1: Strukturformel GABA

1.2 Synthese und Freisetzung von GABA:

GABA wird in GABAergen Axonterminalen durch Transaminierung von α -Ketoglutarat zu Glutaminsäure (katalysiert durch die Glutamatdehydrogenase (Hou et al., 2011)), welche dann durch die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) zu GABA decarboxyliert wird, hergestellt (Treiman, 2001). Es existieren zwei Formen des GABA synthetisierenden Enzyms: GAD 65 und GAD 67 (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). GABA wird über den vesikulären GABA Transporter (VGAT) in Vesikel aufgenommen und gespeichert (Owens und Kriegstein, 2002).

GABA wird aus den Vesikeln durch Depolarisation nach Calciumeinstrom über Exozytose in die Synapse freigesetzt. Dieser Prozess kann durch das Tetanustoxin gehemmt werden. Neben der vesikulären Freisetzung kann GABA auch direkt aus dem Cytosol infolge Aktivierung von Natriumkanälen (d.h. ohne vorherige vesikuläre Speicherung) in den synaptischen Spalt freigesetzt werden (Treiman, 2001). Freigesetzte GABA aktiviert wie bereits erwähnt entweder GABA_A Rezeptoren an der postsynaptischen Membran oder präsynaptische GABA_B Rezeptoren (Owens und Kriegstein, 2002). Danach wird GABA über den GABA Transporter (GAT) in die Gliazellen und präsynaptischen Nervenendigungen aufgenommen, wo sie durch die GABA-Transaminase zu Succinatsemialdehyd katabolisiert

wird. Über die Succinatsemialdehyddehydrogenase wird GABA zu Bernsteinsäure umgewandelt, welche in den Zitronensäurezyklus übergeht (siehe Abbildung 2) (Treiman, 2001).

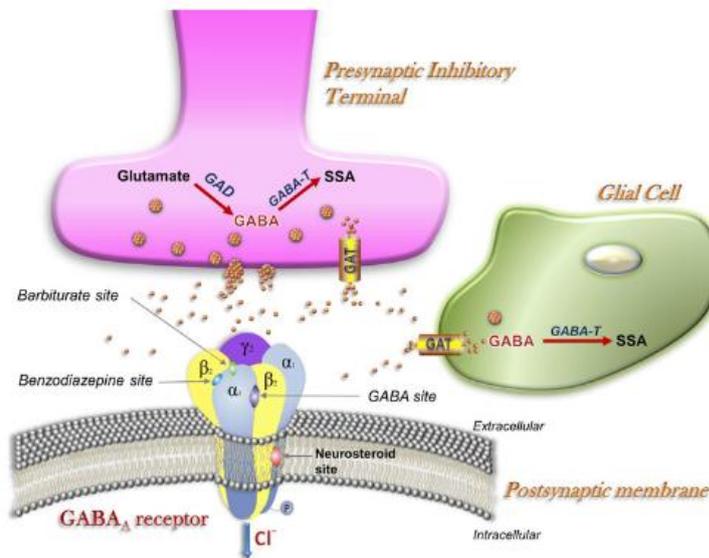


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Synthese, des Transports und Abbaus von GABA (Carver und Reddy, 2013)

1.3 Aufbau des GABA_A Rezeptors:

Der GABA_A Rezeptor ist ein anionenselektiver, Liganden-gesteueter-Ionenkanal (LGIC) (Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2009). Liganden-gesteuerte-Ionenkanäle werden weiters in diese Familien eingeteilt (Olsen und Sieghart, 2009):

- Pentamere Rezeptoren
- Tetramere Glutamat Rezeptoren
- Trimere Purin Rezeptoren

Der GABA_A Rezeptor gehört zur Familie der pentameren Rezeptoren wie unter anderem auch (Connolly und Wafford, 2004; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012):

- Nikotinerge Acetylcholin (nAch) Rezeptoren
- Glycin Rezeptoren
- 5-Hydroxytryptamin Subtyp 3 (5-HT₃) Rezeptoren
- Zn²⁺ aktivierte Ionenkanäle

Charakteristisch für all diese Rezeptoren ist ein loop zwischen zwei Cysteinresten in der N-terminalen Domäne. Daher werden diese Rezeptoren auch als Cys-loop Rezeptoren bezeichnet. Die Sequenzähnlichkeit unter den Mitgliedern der Cys-loop Rezeptoren beträgt etwa 30 %, hinsichtlich Sekundär- und Tertiärstruktur ist die Ähnlichkeit vermutlich sogar noch größer (Olsen und Sieghart, 2009).

GABA_A Rezeptoren sind über Gephyrin, ein synaptisch verankertes Protein, mit dem neuronalen Cytoskelett verbunden (Möhler, 2006). Alle GABA_A Rezeptoren bestehen aus jeweils fünf verschiedenen Untereinheiten, die einen zentralen Chloridionenkanal bilden (siehe Abbildung 3) (Connolly und Wafford, 2004; Möhler, 2006; Rudolph und Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2009). Man weiß bereits, dass im humanen Genom 19 Gene für GABA_A Rezeptor Untereinheiten vorkommen (Sigel und Steinmann, 2012):

- 6 α -Untereinheiten
- 3 β -Untereinheiten
- 3 γ -Untereinheiten
- 3 ρ -Untereinheiten
- 1 ϵ -Untereinheit
- 1 δ -Untereinheit
- 1 θ -Untereinheit
- 1 π -Untereinheit

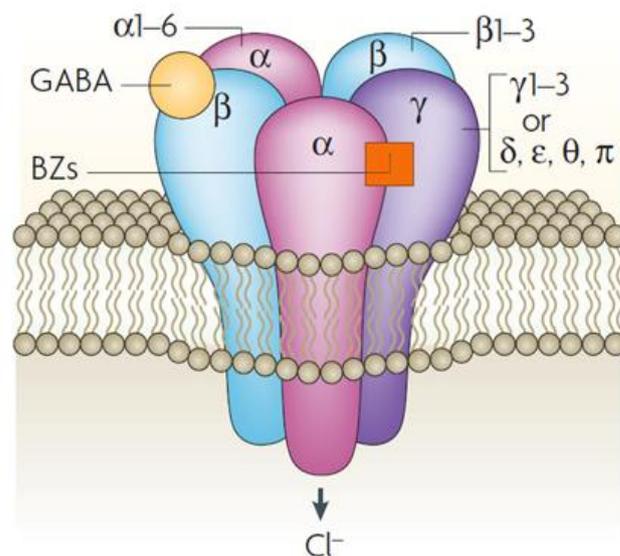


Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des GABA_A Rezeptors in der Membran (Jacob et al., 2008)

Die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors sind von der Zusammensetzung der Untereinheiten abhängig (Sigel und Steinmann, 2012). In vielen Fällen ist noch unklar, welche Untereinheiten, für die 19 Gene existieren, interagieren, um den pentameren Rezeptor zu bilden (Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012). Die meisten GABA_A Rezeptoren setzen sich jedoch aus α_1 -, β_2 - und γ_2 -Untereinheiten zusammen (Uusi-Oukari und Korpi, 2010; Sigel und Steinmann, 2012).

Die genaue Anzahl der Rezeptor Isoformen ist noch nicht bekannt (Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012).

Möglicherweise können in GABA_A Rezeptoren auch zwei verschiedene α - bzw. zwei verschiedene β -Untereinheiten gemeinsam exprimiert werden. Im Gegensatz dazu können wahrscheinlich γ -Untereinheiten nicht mit anderen γ -Untereinheiten bzw. δ -Untereinheiten nicht gemeinsam mit γ -Untereinheiten in einem Rezeptor vorkommen (Olsen und Sieghart, 2009).

Die Sequenz innerhalb einer Art von Untereinheiten ist zu ca. 70% identisch, während zwischen Mitgliedern von verschiedenen Familien ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) nur 20% ige Sequenzidentität herrscht (Olsen und Tobin, 1990; Sigel und Steinmann, 2012).

Die Gene für die GABA_A Rezeptor Untereinheiten zeigen ein Muster von neun codierenden Exons mit acht Introns, abgesehen von zwei Ausnahmen: die δ -Untereinheit hat 8 Exons und die γ_3 -Untereinheit hat 10 Exons (Sigel und Steinmann, 2012). Für manche Untereinheiten existieren Splice Varianten (Möhler, 2006; Sigel und Steinmann, 2012), deren physiologische Bedeutung aber noch nicht gänzlich geklärt ist (Sigel und Steinmann, 2012).

Jede Untereinheit des GABA_A Rezeptors besteht aus ungefähr 450 Aminosäuren (Sigel und Steinmann, 2012). Sie enthält eine lange, hydrophile, extrazelluläre N-terminale Domäne, die den Cys-loop beinhaltet (Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012). Diese extrazellulären N-terminalen Domänen enthalten jeweils zehn β -strands. Die β -strands 1,2,3,5,6, und 8 bilden das innere β -Faltblatt, während die β -strands 4,7,9 und 10 das äußere bilden (siehe Abbildung 4). Das äußere und innere β -Faltblatt interagieren und organisieren sich zu einem sogenannten β -Sandwich (Cederholm et al., 2009). Die meisten Agonisten binden vermutlich an den N-Terminus zwischen zwei Untereinheiten (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Der relativ kurze C-Terminus befindet sich ebenfalls extrazellulär. Vier transmembranäre Sequenzen (α -Helices TM1-TM4) folgen dem N-Terminus. (Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012). An diesen α -Helices können hydrophobe Liganden binden (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). TM2 bildet den Ionenkanal. Zwischen TM3 und TM4 befindet sich eine große intrazelluläre Schleife, mit der viele Proteine interagieren. Diese Proteine sind unter anderem wichtig für die Verankerung des Rezeptors im Cytoskelett oder auch für Phosphorylierungsprozesse (Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012).

Die Pore wird also von fünf nebeneinander liegenden transmembranären Regionen (TM2), die als α -Helices vorliegen, gebildet.

Wahrscheinlich bildet die engste Stelle der Pore den Ionenselektivitätsfilter. Der Selektivitätsfilter erstreckt sich vermutlich von der cytoplasmatischen Seite der Pore bis zur kurzen cytoplasmatischen Schleife (TM1-TM2). Mutationen innerhalb dieser Region können die Ionenselektivität von anionisch auf kationisch, und umgekehrt, ändern (Connolly und Wafford, 2004).

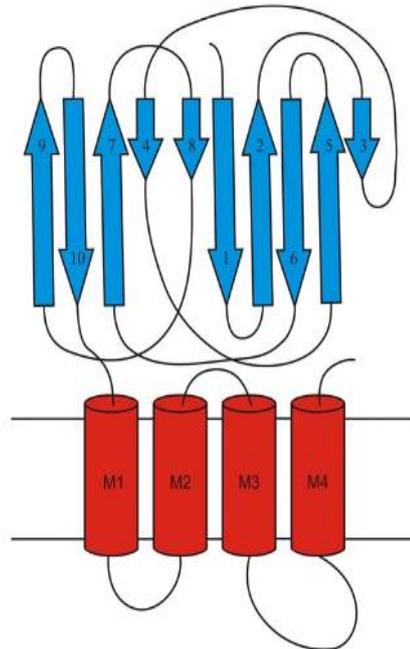


Abbildung 4 zeigt eine graphische Darstellung einer Cys-loop Rezeptor Untereinheit. Die extrazelluläre Domäne mit ihren β -strands ist hier blau, die transmembranäre Domäne mit den vier α -Helices rot dargestellt (Cederholm et al., 2009).

1.4 Die GABA Bindungstasche:

GABA_A Rezeptoren besitzen generell zwei Bindungsstellen für GABA, die sich zwischen β - und α -Untereinheiten befinden, während die Bindungstasche für Benzodiazepine zwischen der α -Untereinheit und der γ -Untereinheit lokalisiert ist (siehe Abbildung 5) (Kloda und Czajkowski, 2007; Olsen und Sieghart, 2009).

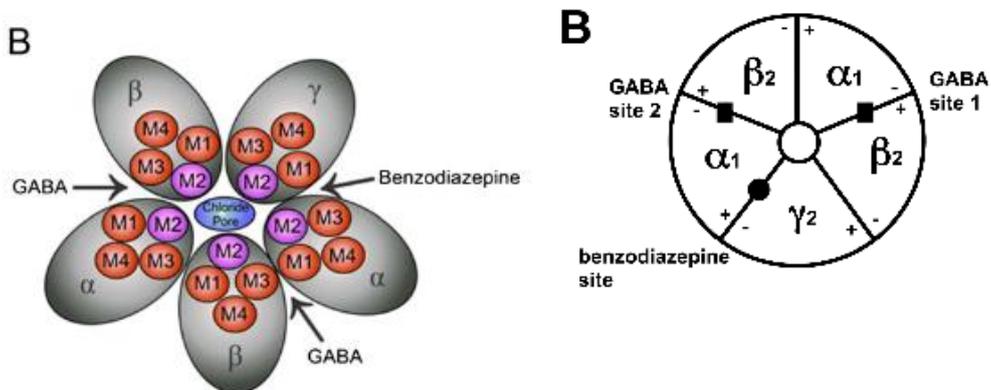


Abbildung 5 zeigt schematische Darstellungen einer GABA_A Rezeptor Isoform von oben (Sigel und Steinmann, 2012; Carver und Reddy, 2013)

Die GABA Bindungstasche wird von sechs loops, den loops A, B, und C der β - (Plus) Seite und den loops D, E und F der α - (Minus) Seite gebildet (Olsen und Sieghart, 2009).

Jene Aminosäuren, die für die Bindung von GABA eine wichtige Rolle spielen, könnten direkt mit dem Liganden interagieren, wichtig für die Struktur der Bindungstasche sein oder Konformationsveränderungen vermitteln (siehe Abbildung 6). Man fand heraus, dass sich die Bindungstasche aus den aromatischen Aminosäuren α_1 Phe64, β_2 Tyr97, β_2 Tyr157, β_2 Tyr205, den hydroxylierten Aminosäuren β_2 Thr160, β_2 Thr202, β_2 Ser204, β_2 Ser209 und den geladenen Aminosäuren α_1 Arg66 und β_2 Arg207 zusammensetzt (Newell und Czajkowski, 2003).

- Die Aminosäuresequenz von Trp92 bis Asp101 bildet den loop A der β -Untereinheit, wobei in dieser Region die Aminosäuren Leu99 und Tyr97 essentiell sind.
- Im Loop B sind Tyr157 und Thr160 der β -Untereinheit die wesentlichen Aminosäuren für die Interaktion mit GABA (Boileau et al., 2002).
- Im loop C der β -Untereinheit bilden Ser204, Tyr205, Arg207 und Ser209 einen Teil der Bindungstasche (Wagner und Czajkowski, 2001).
- Im loop D der α -Untereinheit sind dafür diese Reste verantwortlich: Phe64, Arg66 und Ser68 (Boileau et al., 1999; Wagner und Czajkowski, 2001).
- Im loop E der α -Untereinheit bilden folgende Aminosäuren einen Teil der GABA Bindungsstelle: Asn115, Leu117, Thr129 und Arg131. Leu117 und Arg131 bilden die Rückseite der Bindungstasche (Kloda und Czajkowski, 2007).
- In der F Schleife der α -Untereinheit legen wahrscheinlich Val178, Val180 und Asp183 einen Teil der Bindungsstelle aus (Newell und Czajkowski, 2003).

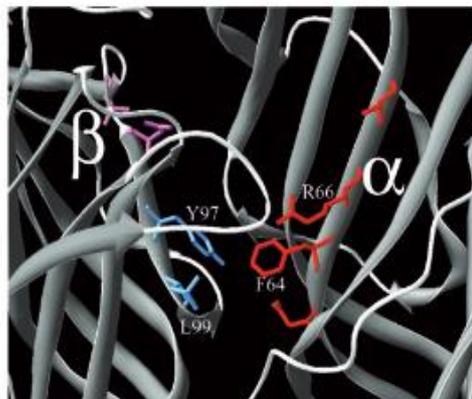


Abbildung 6 zeigt die Kristallstruktur zweier Untereinheiten des Acetylcholin bindenden Proteins, welche dem N-Terminus der Cys-loop Rezeptoren homolog sind. Man erkennt die β -strands (grau) und wichtige Aminosäuren der GABA Bindungstasche (blau, rot) (Boileau et al.,2002).

GABA_A Rezeptoren beinhalten nicht nur diese fünf Bindungstaschen zwischen den Untereinheiten auf der extrazellulären Seite, sondern auch davon getrennte Bindungstaschen in der transmembranären Domäne. Es wurden also auch Bindungstaschen gefunden, die sich im Inneren jeder Untereinheit befinden und von den vier transmembranären α -Helices umgeben sind. Wahrscheinlich dienen all diese verschiedenen Bindungstaschen als Bindungsstellen für Arzneistoffe (Olsen und Sieghart, 2009).

Leider gibt es noch keine hochauflösende Struktur des GABA_A Rezeptors. Zwar wurden bereits bakterielle Cys-loop Rezeptoren und ein Acetylcholin bindendes Protein kristallisiert, jedoch sind diese Kristalle nur dem N-terminalen extrazellulären Segment der Cys-loop Rezeptoren homolog. Mit diesen Modellen konnte also nur der extrazelluläre Bereich des GABA_A Rezeptors dargestellt werden. Daher ähneln diese Homologiemodelle dem GABA_A Rezeptor nur wenig. Es existiert also noch keine Vorlage für die transmembranären und intrazellulären Bereiche des GABA_A Rezeptors (Sigel und Steinmann, 2012).

1.5 Zelluläre Wirkung von GABA:

Während excitatorische Neurotransmitter die Kationen Leitfähigkeit erhöhen und dadurch zu einer Depolarisation der Membran führen, steigern inhibitorische Neurotransmitter, wie GABA, die Leitfähigkeit von Anionen, was eine Hyperpolarisation bewirkt. GABA bewirkt nach Bindung an GABA_A Rezeptoren einen Einstrom von Chloridionen in die Zelle. Dadurch wird die Zelle weniger erregbar (Sigel und Steinmann, 2012).

Wenn jedoch aufgrund einer Downregulation des Kalium-Chloridionen-cotransporters KCC2 der Chloridionen-Gradient sinkt, könnte eine GABA_A Rezeptoraktivierung zu einem Ausströmen der Anionen aus der Zelle und damit zu einer Depolarisation führen (Sigel und Steinmann, 2012). Diese GABA-medierte Exzitation, welche sogar ein Aktionspotential auslösen kann, kann unter anderem während der Entwicklung von Neuronen beobachtet werden (Owens und Kriegstein, 2002).

1.6 Gating:

Der Agonist GABA bindet an den GABA_A Rezeptor, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit steigt (Connolly und Wafford, 2004). Wie schon erwähnt, sind GABA_A Rezeptoren selektiv für Chloridionen durchlässig. Daneben können jedoch auch Bicarbonatanionen den Kanal passieren (Connolly und Wafford, 2004; Sigel und Steinmann, 2012).

Der Agonist GABA bindet also an seine zwei Bindungsstellen, die sich extrazellulär zwischen der α - und der β -Untereinheit befinden. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, die den Agonisten in die Bindungstasche einschließt. Das Protein verändert seine Konformation und geht eine oder mehrere geschlossene Zustände ein, die als „flipped states“ bezeichnet werden. Weitere Konformationsänderungen führen zur Öffnung der Ionenpore (Sigel und Steinmann, 2012).

Wie das Binden von Agonisten in einer Öffnung des Kanals resultiert, ist noch nicht genau bekannt (Cederholm et al., 2009; Sigel und Steinmann, 2012). Der Loop 2, der Cys-loop, die pre-TM1 Region, und der loop zwischen TM2 und TM3 sollen hierbei eine wichtige Rolle spielen.

Die „conformational change wave“ Hypothese besagt, dass es durch die Bindung des Liganden zu einer Rotation des inneren β -Faltblatts um die eigene Achse kommt. Dadurch werden der Cys-loop und der loop 2 verschoben. Folglich verdreht die Bewegung des loops zwischen TM2 und TM3 die TM2 Domäne, was zu einer Trennung der Helices und zu einer Öffnung der Pore führt (Cederholm et al., 2009).

Eine Konformationsänderung des loops C, welcher zwischen den β -strands 9 und 10 liegt, soll ein entscheidender Schritt für den Start des Gatings sein. Loop C bewirkt wahrscheinlich über den β -strand 10 die Rotation der TM1 und TM2 Domäne (Cederholm et al., 2009; Miller und Smart, 2010). Dabei spielt wahrscheinlich die pre-TM1 Region der α_1 -Untereinheit eine Rolle. Sie verbindet den β -strand 10 des C loops mit der TM1 Domäne und dadurch die extrazelluläre Domäne mit der transmembranären Domäne (siehe Abbildung 7) (Keramidas et al., 2006; Cederholm et al., 2009). Somit ist Loop C für die Schließung der Bindungstasche und für das Einschließen des Agonisten verantwortlich (Miller und Smart, 2010).

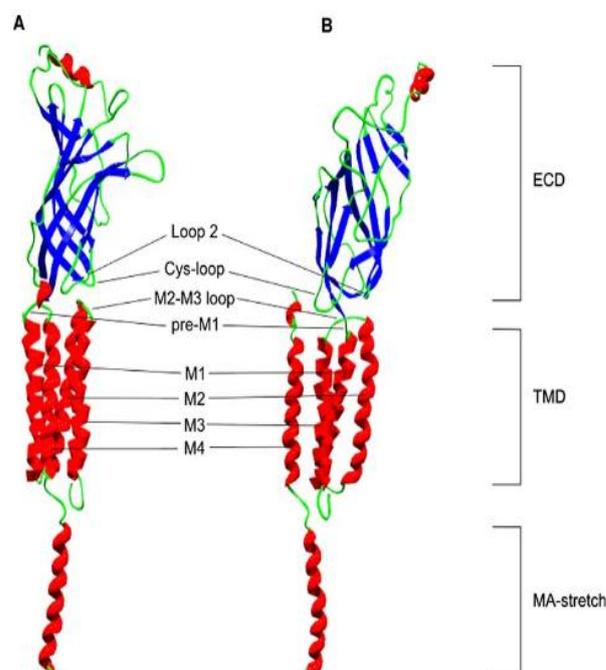


Abbildung 7 zeigt eine schematische α -Untereinheit des nACh-Rezeptors. Die β -strands, welche das β -Sandwich bilden, sind blau dargestellt. Die transmembranären α -Helices sind in dieser Darstellung rot abgebildet (Cederholm et al., 2009)

1.7 Phasische und tonische Inhibition:

Lange Zeit dachte man, dass GABA_A Rezeptoren im Hirn nur an postsynaptischen Membranen exprimiert werden. Heute weiß man, dass auch außerhalb der Synapsen GABA_A Rezeptoren (peri- und extrasynaptisch) existieren.

Jene GABA_A Rezeptoren, die in der postsynaptischen Membran lokalisiert sind, vermitteln neuronale Inhibition im Millisekunden Zeitbereich, was der klassischen phasischen Inhibition entspricht (Sigel und Steinmann, 2012). Im Gegensatz dazu führen jene Rezeptoren, die sich extrasynaptisch befinden, zu einer tonischen Inhibition (Möhler et al., 2002; Möhler, 2006; Sigel und Steinmann, 2012). GABA bewirkt hier schon in geringerer Konzentration eine Aktivierung des Rezeptors (Sigel und Steinmann, 2012). Extrasynaptische GABA_A Rezeptoren werden entweder durch einen GABA-Überschuss oder durch nichtvesikuläre Freisetzung von GABA aktiviert (Möhler, 2006).

In zahlreichen Zellpopulationen spielt die tonische Inhibition eine bedeutendere Rolle als die phasische Hemmung. Tonische Inhibition kommt hauptsächlich durch die Aktivierung von Rezeptoren bestehend aus $\alpha_6\beta\delta$ oder $\alpha_4\beta\delta$ Untereinheiten zusammen (Olsen und Sieghart, 2009). Weiters können auch GABA_A Rezeptoren, die eine α_5 -Untereinheit enthalten, tonische Inhibition medieren (Lee und Maguire, 2014). Eventuell kann tonische Inhibition auch durch δ -Untereinheiten enthaltende Rezeptoren ausgelöst werden (Olsen und Sieghart, 2009). Abnorme tonische Inhibition hängt wahrscheinlich mit der Entstehung des fragilen X Syndroms, Stress, Zyklusstörungen und bestimmten Formen der Epilepsie zusammen (Belelli et al., 2009). Bei chronischer Epilepsie wurde eine Downregulation von GABA_A Rezeptoren mit α_5 - und δ -Untereinheiten beobachtet, was zu einer verminderten tonischen Inhibition führt (Lee und Maguire, 2014).

1.8 Vorkommen und Funktionen einzelner GABA_A Rezeptor Untereinheiten:

Wie schon bereits erwähnt, sind 20 bis 30% der Neuronen im ZNS GABAerg. Außerhalb des ZNS wurden GABA_A Rezeptoren in der Leber, der glatten Muskulatur der Lunge und in verschiedenen Typen von Immunzellen gefunden (Rudolph und Knoflach, 2011).

Wie bereits beschrieben, gibt es 19 verschiedene GABA_A Rezeptor Untereinheiten, die eine Vielzahl an GABA_A Rezeptor Subtypen bilden können. Aus der Vielfalt der möglichen GABA_A Rezeptor Subtypen begründet sich die komplexe Pharmakologie dieser Rezeptoren (siehe Abbildung 8 und Tabelle 1) (Sigel und Steinmann, 2012). Die Rolle und Distribution der verschiedenen Rezeptor Untereinheiten ist relevant für die Pharmakotherapie bestimmter neurologischer bzw. psychiatrischer Erkrankungen, wie Schlafstörungen, Angstzustände, Schizophrenie und Gedächtnisstörungen (Rudolph et al., 1999; Möhler, 2006).

Die Funktion der einzelnen Untereinheiten des GABA_A Rezeptors wurde mittels Verwendung von Knock-in Mäusen untersucht. Durch Austausch eines Histidin Restes durch Arginin in der Benzodiazepinbindungsstelle des Rezeptors (α_1 His101Arg bzw. homologer Mutationen in α_2 , α_3 und α_5) konnte die Funktion einzelner Untereinheiten aufgeklärt werden, da diese Mutation den resultierenden Rezeptor Benzodiazepin-insensitiv macht. In Verhaltensexperimenten wurde getestet, welche Effekte der Benzodiazepine in den mutierten Mäusen fehlten. Durch diese Versuche war es möglich, einzelne Untereinheiten mit physiologischen/pharmakologischen Effekten zu assoziieren (Rudolph et al., 1999; Möhler et al., 2002; Möhler, 2011; Sigel und Steinmann, 2012).

So konnte man schlussfolgern, dass GABA_A Rezeptoren, die eine α_1 -Untereinheit enthalten, eine Rolle bei sedierend-hypnotischen Effekten spielen, $\alpha_{2/3}$ -Untereinheiten enthaltende Rezeptoren zur Anxiolyse beitragen und Hemmung von α_5 -Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren zu einer Steigerung kognitiver Fähigkeiten führen könnte. Dies gilt jedoch vor allem für die Wirkungen der Benzodiazepine. Ocaniplon beispielsweise stimuliert α_x ($x=1, 2, 3$ oder 5) Rezeptoren ohne jegliche Untereinheiten Präferenz und wirkt trotzdem als nicht-sedierendes Anxiolytikum. Das Pyrazolopyrimidin DOV-51892 bindet hingegen spezifisch an α_1 -Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren. Es induziert jedoch keine Sedierung, sondern weist nur anxiolytische Eigenschaften auf (Sigel und Steinmann, 2012).

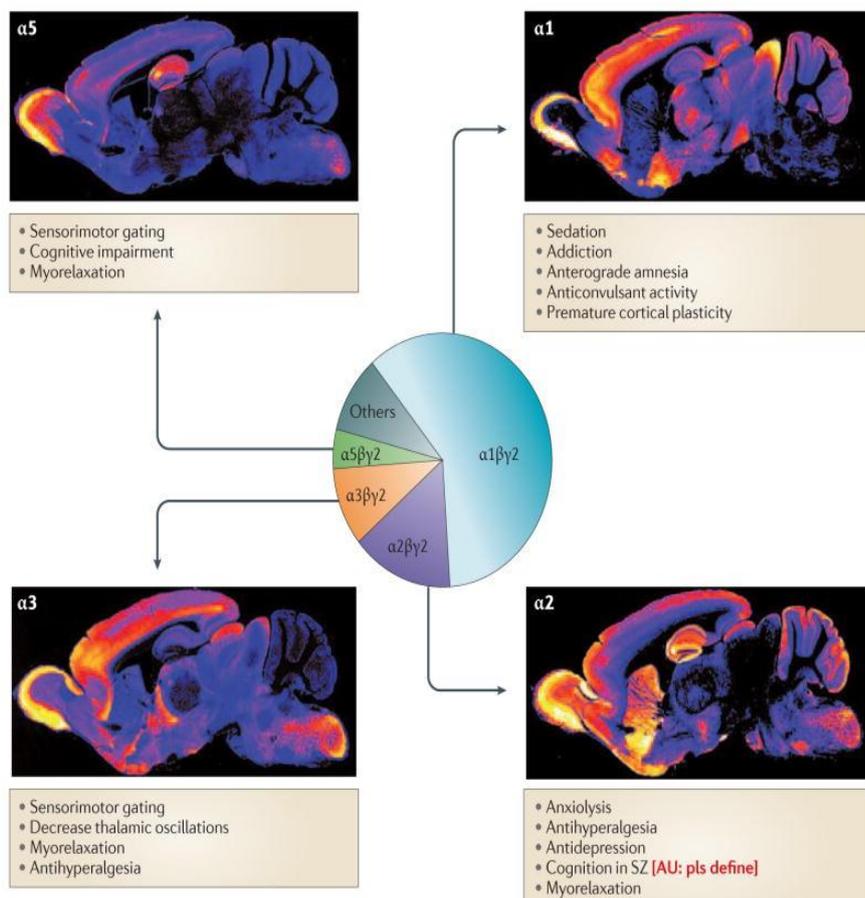


Abbildung 8: Pharmakologische Effekte und Verteilung der GABA_A Rezeptor α -Untereinheiten im Gehirn einer Maus (Rudolph und Knoflach, 2011)

1.8.1 α -Untereinheiten:

α_1 -Untereinheit: α_1 enthaltende GABA_A Rezeptoren sind hauptsächlich synaptisch lokalisiert und bilden gemeinsam mit β_2 - und γ_2 -Untereinheiten den am häufigsten vorkommenden GABA_A Rezeptor Subtyp im Gehirn (Möhler, 2006). Rezeptoren mit α_1 -Untereinheiten machen circa 60% aller GABA_A Rezeptoren aus (Rudolph und Möhler, 2006). Sie werden hauptsächlich im Kortex und im Thalamus exprimiert, kommen aber auch im Bulbus olfactorius, Pallidum, Mittelhirn und im Kleinhirn vor (Rudolph et al., 1999).

α_2 -Untereinheit: Diese befindet sich in der Großhirnrinde und in den Pyramidenzellen des Hippocampus in Synapsen des Axon-initialen Segments und in Synapsen, die durch Cholecystinin-positive Korbzellen gebildet werden. Abgesehen vom limbischen System, welches für Emotionen verantwortlich ist, ist diese Untereinheit auch im Rückenmark, im Dorsalhorn und in den Motorneuronen stark vertreten. Sie sind nur postsynaptisch lokalisiert und führen zu schneller Desensibilisierung des Rezeptors.

Rezeptoren, die α_2 -Untereinheiten enthalten, vermitteln angstlösende und muskelrelaxierende Effekte. Für den relaxierenden Effekt auf den Muskeltonus sind jedoch höhere Diazepam Konzentrationen nötig als für den anxiolytischen Effekt (Möhler et al., 2002).

α_3 -Untereinheit: GABA_A Rezeptoren, die diese Untereinheit enthalten, sind die am öftesten exprimierten Subtypen in monoaminergen und cholinergen Zellen des basalen Vorderhirns. Zusätzlich sind diese Subtypen im thalamischen Nucleus reticularis lokalisiert (Rudolph et al., 2001; Möhler, 2006). Sie modulieren dadurch die thalamo-corticale Bahn (Möhler, 2006). Extrasynaptische GABA_A Rezeptoren, die diese Untereinheit enthalten, desensibilisieren nur langsam (Möhler et al., 2002).

Bindet Clonazepam an Rezeptoren, die diese Untereinheit enthalten, kommt es zum Anti-Absencen Effekt (Olsen und Sieghart, 2009).

Für die anxiolytische Wirkung, die wie schon erwähnt durch α_2 -Untereinheiten enthaltende Rezeptoren ausgelöst wird, genügen geringe Dosen von Benzodiazepinen. Zusätzlich fand man heraus, dass inverse selektive Agonisten an GABA_A Rezeptoren mit α_3 -Untereinheiten Angst und Muskelkrämpfe auslösen. Die anxiolytische Wirkung, die also auch über die α_3 -Untereinheit vermittelt wird, ist im Gegensatz zu α_2 -Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren an eine hohe Rezeptorbesetzung gebunden (Rudolph und Möhler, 2006).

α_4 -Untereinheit: GABA_A Rezeptoren, die diese Untereinheit enthalten, kommen nur selten vor und sind, wie die α_6 -Untereinheit, unempfindlich gegenüber den klassischen Benzodiazepinen. Hauptsächlich werden sie im Thalamus und im Gyrus dentatus exprimiert

(Möhler et al., 2002). Man findet sie aber auch im Bulbus olfactorius und in den Basalganglien (Pirker et al., 2000).

α_5 -Untereinheit: Diese Untereinheit kommt im gesamten Gehirn nur in geringer Menge vor. Lediglich im Hippocampus ist sie häufiger, hauptsächlich extrasynaptisch, lokalisiert (Möhler, 2006, 2012). In geringeren Mengen kommt diese Untereinheit auch im Bulbus olfactorius, im Hippocampus und in der Kleinhirnrinde vor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Sie wird oft gemeinsam mit den β_3 - und γ_2 -Untereinheiten exprimiert (Möhler et al., 2002).

α_5 -Untereinheiten sind gemeinsam mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren für Fähigkeiten wie Erinnerungen und räumliches Vorstellungsvermögen essentiell. Mäuse, denen die α_5 -Untereinheit fehlt, zeigen eine bessere räumliche Orientierung (Rudolph und Möhler, 2006; Möhler, 2011). Außerdem verbessern α_5 selektive inverse Partialagonisten die Gedächtnisleistung (Rudolph und Möhler, 2006; Atack, 2011; Möhler, 2011, 2012). α_5 inverse Agonisten können jedoch auch Angst auslösen und Aggressionen dämpfen (Rudolph und Möhler, 2006).

α_6 -Untereinheit: Diese Untereinheit kommt im Kleinhirn sowohl in excitatorischen und inhibitorischen Synapsen der Körnerzellen, als auch extrasynaptisch vor (Möhler et al., 2002). Die Mehrheit der GABA_A Rezeptoren mit einer α_6 -Untereinheit beinhaltet auch die γ_2 -Untereinheit in dieser Kombination: $\alpha_6\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (Möhler, 2006). Außerdem kommt die α_6 -Untereinheit vermutlich oft gemeinsam mit einer δ -Untereinheit in einem Rezeptor vor. Die Funktion dieser Untereinheit ist noch nicht vollständig geklärt (Rudolph et al., 2001).

1.8.2 β -Untereinheiten:

Die β -Untereinheiten sind im Gehirn weit verbreitet. Besonders stark sind sie in der Großhirnrinde exprimiert (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

β_1 -Untereinheit: Die β_1 -Untereinheit wird, wie auch die β_2 - und β_3 -Untereinheit, im Kortex exprimiert (Pirker et al., 2000). Diese Untereinheit kommt jedoch seltener als alle anderen β -Untereinheiten vor (Olsen und Sieghart, 2009). Weiters ist ihre mRNA stark im Hippocampus, in der Amygdala und in den Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert. In Patienten mit neurologischen Erkrankungen, wie bipolaren Störungen, Schizophrenie und Depressionen wurde eine verminderte Expression der β_1 -Untereinheit festgestellt. Außerdem wurden Mutationen in β_1 -Untereinheiten erst kürzlich mit dem Risiko, eine Alkoholabhängigkeit zu entwickeln, assoziiert (Fatemi et al., 2013).

β_2 -Untereinheit: Diese Untereinheit befindet sich in 50% der GABA_A Rezeptoren im ZNS (Reynolds et al., 2003). Sie kommt hauptsächlich im Pallidum und im Thalamus, jedoch auch im Hirnstamm, im Kleinhirn und im Hippocampus vor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

β_3 -Untereinheit: GABA_A Rezeptoren, die eine β_3 -Untereinheit beinhalten, kommen sehr häufig im Striatum, jedoch auch im Kleinhirn, Hippocampus und im Vorderhirn vor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

Homozygote (-/-)- β_3 -Mäuse sterben in der Neonatalperiode oder weisen zumindest massive neurologische Defizite wie epileptische Krampfanfälle auf (Rudolph et al., 2001).

Diese Untereinheit vermittelt auch die Wirkung der Injektionsnarkotika Etomidat und Propofol und teilweise auch die immobilisierende Wirkung der Inhalationsnarkotika Enfluran, Isofluran und Halothan. Die durch Etomidat und Propofol einhergehende Atemdepression wird ebenfalls durch β_3 -Untereinheit enthaltende Rezeptoren vermittelt. Die Verringerung der Herzfrequenz und der hypotherme Effekt, welche von diesen Narkotika hervorgerufen werden können, werden hingegen durch andere Targets vermittelt (Möhler, 2006).

1.8.3 γ -Untereinheiten:

Die γ_1 - und γ_3 -Untereinheiten bilden nur eine kleine Gruppe der Rezeptoruntereinheiten. Ihre pharmakologischen Funktionen sind noch weitgehend ungeklärt (Möhler et al., 2002).

γ_1 -Untereinheit: Diese Untereinheit wird vor allem im Pallidum, in der Substantia nigra, im Septum und in der Amygdala exprimiert (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

γ_2 -Untereinheit: Diese Untereinheit wird im gesamten Gehirn exprimiert. Im Thalamus kommt sie nur in geringen Mengen vor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

Heterozygote (+/-)- γ_2 - Mäuse, denen die γ_{2S} und γ_{2L} (lange und kurze Splice Variante der γ_2 Untereinheit) fehlen, sind nicht Benzodiazepine-sensitiv. Es kommt hauptsächlich im Hippocampus und in der Kleinhirnrinde zu einer verminderten GABA_A Rezeptor-Dichte. Dies führt zu einem Phänotyp, der an Angststörungen erinnert (Möhler, 2006a; 2012). Weiters ist die γ_2 -Untereinheit essentiell für die Verankerung von GABA_A Rezeptoren in der Membran (Möhler, 2006a). Deshalb sterben homozygote (-/-)- γ_2 -Knockout Mäuse perinatal (Rudolph et al., 2001).

γ_3 -Untereinheit: Diese Untereinheit kommt in geringem Ausmaß im gesamten Gehirn vor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

1.8.4 ρ -Untereinheiten:

Diese Untereinheiten (ρ_1 , ρ_2 , ρ_3) sind unempfindlich gegenüber Bicucullin und Baclofen und können weder durch Barbiturate noch durch Benzodiazepine moduliert werden. Deswegen werden Rezeptoren bestehend aus ρ -Untereinheiten manchmal noch als GABA_C Rezeptoren bezeichnet (Möhler et al., 2002; Möhler, 2006). Das Nomenklatur Komitee der IUPHAR (The International Union of Basic and Clinical Pharmacology) spricht sich jedoch gegen die Bezeichnung GABA_C Rezeptoren aus und empfiehlt, Rezeptoren bestehend aus diesen Untereinheiten ebenfalls als GABA_A Rezeptoren zu betrachten.

ρ -Untereinheiten werden hauptsächlich in der Retina exprimiert. Jedoch befindet sich deren mRNA auch in den Colliculi superiores, im dorsalen lateralen Nucleus geniculatus und in den Purkinje Zellen des Kleinhirns (Olsen und Sieghart, 2009).

Diese Untereinheit wird mit Alkoholabhängigkeit in Verbindung gebracht. Die Modulation von Ethanol an GABA_A Rezeptoren die eine ρ_1/ρ_2 -Untereinheit enthalten, könnte für bestimmte Wirkungen von Alkohol verantwortlich sein (Blednov et al., 2014).

1.8.5 δ -Untereinheit:

δ -Untereinheiten sind selten und hauptsächlich im Kleinhirn und Thalamus vertreten (Rudolph et al., 2001). Außerdem kommt diese Untereinheit in der Hirnrinde, im Subiculum und im Striatum vor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Rezeptoren, die eine δ -Untereinheit enthalten, bestehen auch aus einer α_4 - oder α_6 - und aus einer β -Untereinheit.

Rezeptoren mit δ -Untereinheiten werden nur extrasynaptisch exprimiert und sind durch längere Rezeptoröffnungszeiten charakterisiert (Olsen und Sieghart, 2009). Durch diese Eigenschaft kommt es wie bereits erwähnt zur tonischen Inhibition der Zelle (Belelli et al., 2009; Olsen und Sieghart, 2009). Außerdem kommt es zu keiner Desensibilisierung, die normalerweise durch eine verlängerte Anwesenheit von GABA am Rezeptor zustande kommt.

Diese GABA_A Rezeptoren sprechen im Gegensatz zu jenen Rezeptoren, die γ_2 beinhalten, besser auf Anästhetika, Neurosteroiden, GABA Analoga wie Gaboxadol, Taurin und Ethanol an (Olsen und Sieghart, 2009).

Arzneistoffe, die die Aktivität von GABA_A Rezeptoren mit δ -Untereinheiten verstärken, können zur Behandlung von Schlaflosigkeit, Epilepsie und chronischen Schmerzen verwendet werden. Durch die Langzeitbehandlung mit einem Agonisten, der an δ -Untereinheiten enthaltende GABA_A Rezeptoren bindet, wird das Gedächtnis positiv beeinflusst (Whissell et al., 2013).

Table 1 GABA_A-receptor subtypes (compiled from Möhler et al. 2002; Fritschy and Brünig 2003)

Composition	Pharmacological characteristics	Regional and neuronal localisation	Subcellular localization
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	Major subtype (60 % of all GABA _A receptors). Mediates the sedative, amnesic and, to a large extent, the anticonvulsant action of benzodiazepine site agonists. High affinity for classical benzodiazepines, zolpidem and the antagonist flumazenil	Cerebral cortex (layer I–VI, selected interneurons and principal cells); hippocampus (selected interneurons and principal cells); pallidum striatum (interneurons); thalamic relay nuclei; olfactory bulb (mitral cells and interneurons); cerebellum (Purkinje cells and granule cells); deep cerebellar nuclei; amygdala; basal forebrain; substantia nigra pars reticulata; inferior colliculus; brainstem	Synaptic (soma and dendrites) and extrasynaptic in all neurons with high expression
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	Minor subtype (15–20%). Mediates anxiolytic action of benzodiazepine site agonists. High affinity for classical benzodiazepine agonists and the antagonist flumazenil. Intermediate affinity for zolpidem	Cerebral cortex (layers I–IV) hippocampal formation (principal cells mainly on the axon initial segment); olfactory bulb (granule cells); striatum (spiny stellate cells); inferior olivary neurons (mainly on dendrites); hypothalamus; amygdala (principal cells); superior colliculus; motor neurons	Mainly synaptic, enriched in axon initial segment of cortical and hippocampal pyramidal cells
$\alpha_3\beta_4\gamma_2$	Minor subtype (10–15%). High affinity for classical benzo-diazepine agonists and the antagonist flumazenil. Intermediate affinity for zolpidem	Cerebral cortex (principal cells in particular in layers V and VI; some axon initial segments); hippocampus (some hilar cells); olfactory bulb (tufted cells); thalamic reticular neurons; cerebellum (Golgi type II cells); medullary reticular formation; inferior olivary neurons; amygdala; superior colliculus; brainstem; spinal cord; medial septum; basal forebrain cholinergic neurons; raphe and locus coeruleus (serotonergic and catecholaminergic neurons)	Mainly synaptic, including some axon initial segments; extrasynaptic in inferior olivary neurons
$\alpha_4\beta_5\delta$	Less than 5 % of all receptors. Insensitive to classical benzodiazepine agonists and zolpidem	Dentate gyrus (granule cells); thalamus	Extrasynaptic (no direct morphological evidence)
$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	Less than 5% of all receptors; high affinity for classical benzodiazepine agonists and the antagonist flumazenil. Low affinity for zolpidem	Hippocampus (pyramidal cells); olfactory bulb (granule cells, periplomerular cells); cerebral cortex; amygdala; hypothalamus; superior colliculus; superior olivary neurons; spinal trigeminal neurons; spinal cord	Extrasynaptic in hippocampus, cerebral cortex, and olfactory bulb; synaptic and extrasynaptic in spinal trigeminal nucleus and superior olivary nucleus
$\alpha_6\beta_{2,3}\gamma_2$	Less than 5 % of all receptors. Insensitive to classical $\alpha_5\beta_{2,3}\delta$ benzodiazepine agonists and zolpidem. Minor population. Lacks benzodiazepine site	Cerebellum (granule cells); dorsal cochlear nucleus	Synaptic (cerebellar glomeruli) and extrasynaptic on granule cell dendrites and soma

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die pharmakologischen Wirkungen und die Verteilung verschiedener GABA_A Rezeptor Isoformen (Möhler, 2006)

1.9 GABA_B-Rezeptor:

Dieser Rezeptor wurde im Jahr 1980 von Bowery entdeckt (Froestl, 2011). GABA_B Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte metabotrope Heptahelix-Rezeptoren (Uusi-Oukari und Korpi, 2010; Chalifoux und Carter, 2011). Sie befinden sich in fast allen Gehirnregionen (Chalifoux und Carter, 2011).

Es gibt zwei verschiedene Untereinheiten: GABA_{B1} und GABA_{B2}. Außerdem existieren GABA_{B1} Splicevarianten: GABA_{B1a} und GABA_{B1b}. Diese unterscheiden sich strukturell im N-Terminus voneinander (Ulrich und Bettler, 2007; Chalifoux und Carter, 2011; Benke et al., 2012). In ihrer heterodimeren nativen Form setzen sich GABA_B Rezeptoren aus einer B₁- und der B₂-Untereinheit zusammen (Owens und Kriegstein, 2002). Die GABA_{B1}-Untereinheit enthält die Bindungsstelle für GABA. GABA_{B2} enthält die Bindungsstelle für allosterische Modulatoren und ist außerdem für die Aktivierung des G-Proteins zuständig (Benke et al., 2012). Es handelt sich also hierbei um Rezeptoren, die als B_{1a}-, B_{1b}- und B₂-Isoformen existieren (siehe Abbildung 9).

Im Gegensatz zu GABA_A Rezeptor Isoformen, für die 19 Gene codieren, sind erst drei Gene bekannt, die für GABA_B Rezeptoren codieren (Rudolph und Knoflach, 2011).

GABA_B Rezeptoren weisen Sequenzhomologie mit metabotropen Glutamat Rezeptoren auf (Owens und Kriegstein, 2002). Sie befinden sich sowohl an excitatorischen, als auch an inhibitorischen Axonenenden.

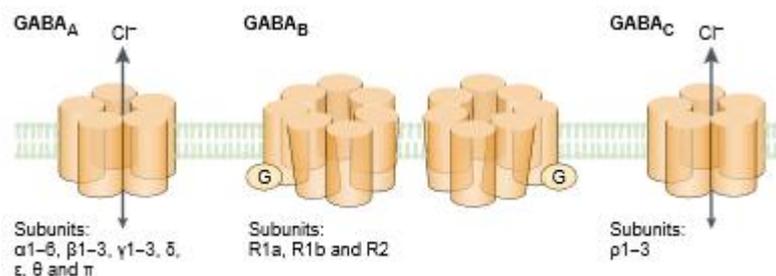


Abbildung 9 zeigt den Aufbau verschiedener GABA Rezeptoren (Owens und Kriegstein, 2002)

Wenn GABA an GABA_B Rezeptoren bindet, dissoziiert das G-Protein in eine α- und βγ-Untereinheit. Durch βγ kommt es entweder zur Inhibition spannungsabhängiger P/Q und N-Typ Calciumkanäle oder zur Aktivierung von Kaliumkanälen (G-protein activated inwardly rectifying Kalium channels (GIRK) 1-4).

GABA_B Rezeptoren sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert. Präsynaptisch kommt es vor allem zur Hemmung der Calciumkanäle, während postsynaptisch hauptsächlich die Kaliumkanäle aktiviert werden (Benke et al., 2012). Die Gα_i/Gα_o-Untereinheit hemmt dagegen die Adenylatcyclase und reduziert dadurch den cyclisches

Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegel in der Zelle. Folglich sinkt die Aktivität der Proteinkinase A, welche normalerweise den Calcium Einstrom durch NMDA Rezeptoren verstärkt. Diese Untereinheit führt also zu einer verminderten NMDA Rezeptor vermittelten Calcium Permeabilität. All diese Vorgänge lösen eine Hyperpolarisation der Zelle aus (siehe Abbildung 10) (Chalifoux und Carter, 2011; Benke et al., 2012).

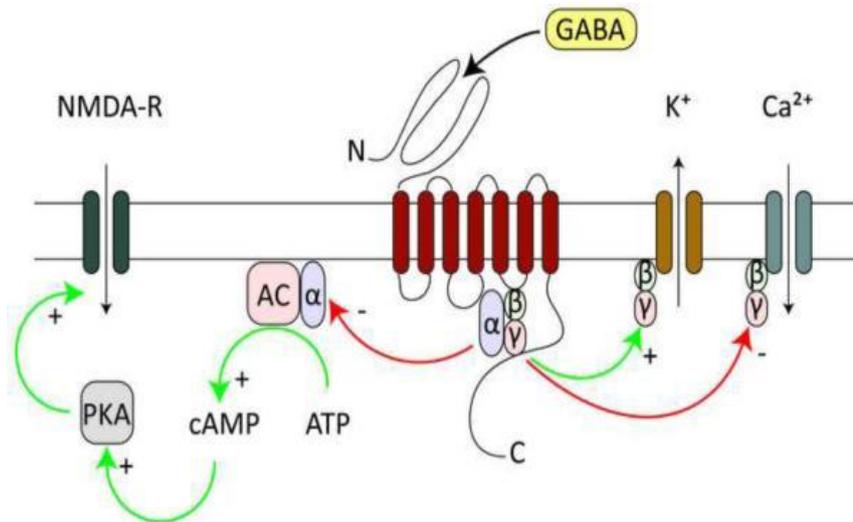


Abbildung 10: GABA_B Rezeptor Signalweg in der postsynaptischen Membran (Chalifoux und Carter, 2011)

GABA_B Rezeptoren spielen wie GABA_A Rezeptoren eine Rolle bei Emotionen, Kognition, Schmerzen und Muskeltonus und sind daher ebenfalls Ziel für klinisch verwendete Arzneistoffe. Der GABA_B Agonist Baclofen wird als Arzneimittel gegen Muskelspasmen eingesetzt (Rudolph und Knoflach, 2011). In Studien fand man heraus, dass GABA_B Agonisten die Sucht nach Alkohol und Nikotin und das Auftreten alkoholbedingter Entzugssymptome verringern könnten (Cui et al., 2012).

Weiters gibt es Beweise, dass das GABA_B System eine wichtige Rolle für die Energie Balance spielt. Wahrscheinlich schützen GABA Rezeptoren vom Typ B, die sich in Proopiomelanocortin (POMC) Neuronen befinden, vor Adipositas, Insulinresistenz und hypothalamischer Inflammation (Ito et al., 2013). Daneben wird ein Einsatz von GABA_B Rezeptor Antagonisten in der Therapie von Depressionen diskutiert (Möhler, 2012).

1.10 Modulation von GABA_A Rezeptoren:

GABA_A Rezeptoren werden wie viele andere Proteine durch posttranslationale Modifikationen moduliert. Bestimmte Aminosäurereste, die sich auf spezifischen Untereinheiten befinden, werden beispielsweise von verschiedenen Proteinkinasen phosphoryliert. Dies ist wichtig für die Regulierung der Kanalaktivität. Außerdem beeinflusst diese Modifikation die Oberflächenstabilität und die Verankerung des Rezeptors (Sigel und Steinmann, 2012).

GABA_A Rezeptoren werden daneben aber auch von vielen verschiedenen pharmakologisch wichtigen Substanzen, wie beispielsweise den Benzodiazepinen, Barbituraten, Neurosteroiden oder Anästhetika moduliert (siehe Abbildung 11 und Tabelle 2) (Möhler et al., 2002). GABA_A Rezeptoren können vermutlich deswegen von so vielen Verbindungen beeinflusst werden, weil Liganden nicht nur mit dem extrazellulären N-Terminus, sondern auch zum Teil mit transmembranären Substrukturen interagieren können (Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012).

GABA_A Rezeptoren werden von zwei endogenen Molekülen (Neurosteroiden und Endocannabinoiden) und einer Vielzahl exogener, kleiner Moleküle moduliert (Sigel und Steinmann, 2012). Jene klinisch verwendeten Arzneistoffe, die am GABA_A Rezeptor angreifen, wirken meist nur über einen kurzen Zeitraum sehr effizient. Nach wiederholter Verabreichung verlieren sie oft ihre pharmakologischen Effekte (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

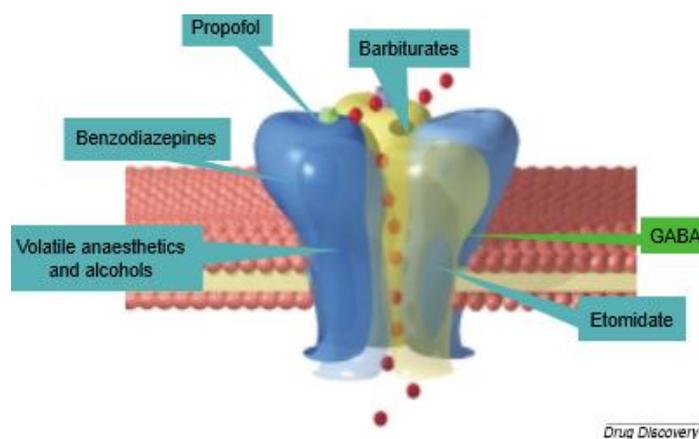


Abbildung 11 zeigt die Bindungsstellen verschiedener Modulatoren am GABA_A Rezeptor (Whiting, 2003)

1.10.1 Neurosteroid:

Neurosteroid sind Steroide, die entweder im Hirn de novo oder in der Peripherie durch Metabolisierung klassischer Steroide wie Progesteron, Deoxycorticosteron und Testosteron, synthetisiert werden.

Neurosteroid sind sehr lipophil und passieren deshalb leicht die Bluthirnschranke. Daher akkumulieren auch jene Neurosteroid, die in der Peripherie gebildet werden, im Gehirn (Carver und Reddy, 2013).

In Neuronen und in Gliazellen werden Neurosteroid aus Cholesterol hergestellt. TSPO (Translocator Protein) ist für den Import von Cholesterol durch die äußere Mitochondrienmembran zuständig (Möhler, 2011; Carver und Reddy, 2013). Aus Cholesterol entsteht im Mitochondrium über eine Seitenkettenabspaltung Pregnenolon. Daraus werden die inhibitorischen sulfatierten Steroide Pregnenolonsulfat und Dihydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Vorläufer von Progesteron, synthetisiert. Progesteron wird durch die 21 β -Hydroxylase in Deoxycorticosteron umgewandelt (Hosie et al., 2007). 5 α -pregnan-3 α ,21-diol-20-on (Tetrahydrodeoxycorticosteron; 3 α ,5 α -THDOC) ist ein Abwandlungsprodukt von Deoxycorticosteron. Weiters sind die endogenen Neurosteroid 3 α -OH-5 α -pregnan-20-on (Allopregnanolon; 3 α ,5 α -THP) (siehe Abbildung 12) und sein aktives 5 β Isomer 3 α -OH-5 β -pregnan-20-on Metabolite des Steroids Progesteron (Hosie et al., 2007; Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Die Neurosteroid Androstanol und Androstanediol werden aus Testosteron synthetisiert (Carver und Reddy, 2013).

Neurosteroid brauchen folgende Merkmale, um mit GABA_A Rezeptoren interagieren zu können: In Ring A wird auf Position 3 eine OH-Gruppe in α Konformation zusammen mit einer Ketogruppe in Ring D, entweder in Position 20 oder 17, benötigt.

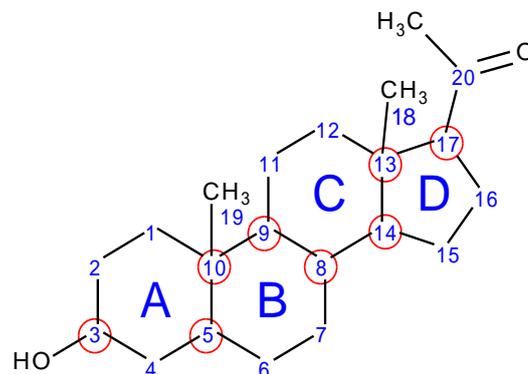


Abbildung 12: Allopregnanolon

Vermutlich interagieren Neurosteroid mit fast allen GABA_A Rezeptor Isoformen (Carver und Reddy, 2013). Sie regulieren die Öffnung des Kanals allosterisch und fungieren in hohen

Konzentrationen als Agonisten am Kanal (Sigel und Steinmann, 2012; Carver und Reddy, 2013). Sie sind positiv allosterische Modulatoren von synaptischen und extrasynaptischen GABA_A Rezeptoren und verstärken daher sowohl die phasische als auch die tonische Inhibition. Die tonische Leitfähigkeit kontrolliert neuronale Erregungen, die Krampfschwelle und auch das Verhalten (Carver und Reddy, 2013).

Zusätzlich zu den Neurosteroiden wie Allopregnanolon gibt es eine weitere Klasse dieser Steroide, die die GABA_A Rezeptor Funktion nicht potenzieren, sondern antagonisieren: sulfatierte Steroide. Diese docken an anderen Bindungsstellen an und können dadurch unter anderem zu Muskelspasmen führen (Hosie et al., 2007; Carver und Reddy, 2013).

Die Neurosteroidkonzentration im ZNS unterliegt immer auch Schwankungen. Faktoren wie Pubertät, Stress, Schwangerschaft, Menstruationszyklus und die Einnahme psychoaktiver Drogen wie Alkohol können Veränderungen im Neurosteroidhaushalt hervorrufen (Herd et al., 2007). Vermutlich kann es dadurch auch zu neurologischen oder psychischen Erkrankungen, wie Epilepsie, Panikattacken, Depressionen oder Schizophrenie kommen (Herd et al., 2007; Hosie et al., 2007). Beispielsweise weisen Patienten, die an Angststörungen leiden, geringere Mengen an Neurosteroiden im Körper auf (Möhler, 2011).

Steigende Neurosteroidkonzentrationen im ZNS können zur Anxiolyse, Sedierung, Muskelrelaxation und Anästhesie führen. Außerdem kann die Aktivität der hypothalamischen-hypophysären-adrenalen Achse, welche für die Kontrolle der Stressantwort verantwortlich ist, gehemmt werden (Hosie et al., 2007).

Die Effekte der Neurosteroide werden über voneinander getrennte Interaktionsstellen, die transmembranär zwischen α - und β -Untereinheiten lokalisiert sind, vermittelt (Sigel und Steinmann, 2012; Carver und Reddy, 2013). Es existieren vermutlich drei oder vier Bindungsstellen für Steroide am GABA_A Rezeptor (Hosie et al., 2007). Über Bindung der Neurosteroide an die sogenannte modulatorische Bindungsstelle, die sich zwischen α TM1 und α TM4 befindet und die Aminosäure Gln241 enthält, wird der Effekt von GABA potenziert, während über die zweite Bindungstasche, die zwischen α TM1 und β TM3 lokalisiert ist und die Aminosäure Thr236 enthält, GABA_A Kanäle direkt von Neurosteroiden aktiviert werden (Hosie et al., 2007; Olsen und Sieghart, 2009). Weiters gibt es noch eine oder zwei Bindungstaschen für die antagonistisch wirkenden sulfatierten Steroide. Deren genaue Lokalisation, die sich vermutlich auf der TM1 und/oder TM2 Domäne befindet, ist noch nicht bekannt (Hosie et al., 2007).

Eine Zeit lang dachte man, dass nur jene GABA_A Rezeptoren durch Neurosteroide moduliert werden können, die eine δ -Untereinheit enthalten. Mittlerweile weiß man, dass auch GABA_A Rezeptoren mit γ -Untereinheiten von Neurosteroiden moduliert werden (Sigel und Steinmann, 2012).

1.10.2 Benzodiazepine:

Benzodiazepine (siehe Abbildung 13) oder auch Benzodiazepin-Agonisten genannt, wie Diazepam, Flunitrazepam, oder Clonazepam werden in der klinischen Praxis als Anxiolytika, Sedativa-Hypnotica, Antikonvulsiva und Muskelrelaxantien verwendet (Möhler et al., 2002; Siegel und Steinmann, 2012). In Zukunft könnten sie auch für die Behandlung folgender Krankheitsbilder wertvoll sein: chronische Schmerzen, Depressionen, Schizophrenie und Schlaganfall (Rudolph und Knoflach, 2011).

Anterograde Amnesie, Beeinträchtigung der Bewegungskoordination und Verstärkung der Alkoholwirkung zählen zu den Nebenwirkungen klassischer Benzodiazepine (Rudolph et al., 1999). Außerdem kann es zur Toleranzentwicklung und Abhängigkeit kommen (Rudolph et al., 2001; Connolly und Wafford, 2004; Uusi-Oukari und Korpi, 2010; Rudolph und Knoflach, 2011). Benzodiazepine lösen Nebenwirkungen aus, weil sie relativ unselektiv an vielen verschiedenen GABA_A Rezeptor Subtypen angreifen (Connolly und Wafford, 2004).

Aus chemischer Sicht bestehen Benzodiazepine aus einem Benzen und einem Diazepin Ring, welche miteinander fusioniert sind. Zwei N Atome befinden sich meist in den Positionen 1 und 4 (Rudolph und Knoflach, 2011).

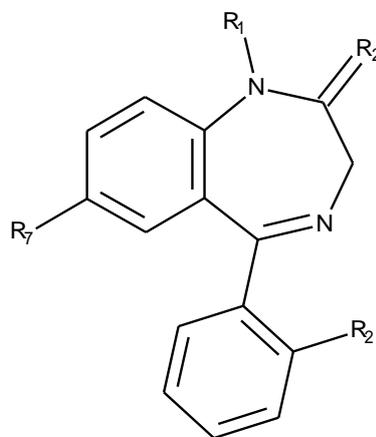


Abbildung 13: Strukturformel der klassischen Benzodiazepine

Benzodiazepine binden an einer Bindungsstelle, die sich zwischen der α - und der γ_2 -Untereinheit befindet. Diese Bindungsstelle besteht aus Aminosäuren, die sich in den loops A bis F befinden (siehe Abbildung 14) (Hanson und Czajkowski, 2008). Sie binden also am GABA_A Rezeptor an einer anderen Position als GABA. Dadurch verstärken sie den Effekt von GABA im ZNS (Möhler et al., 2002; Sancar und Czajkowski, 2011; Siegel und Steinmann, 2012).

Die Aminosäuren α_1 His101, α_1 Tyr209 und γ_2 Phe77 befinden sich in den A, C und D Schleifen. Sie sind Teil der Benzodiazepin Bindungstasche und interagieren direkt mit den Liganden (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Außerdem befinden sich die Aminosäuren Ala79 und Thr81 auf der γ_2 -Untereinheit in der Benzodiazepin Bindungstasche (Teissere und Czajkowski, 2001). Kürzlich wurde auch zwischen der α - und der β -Untereinheit eine Bindungsstelle für Benzodiazepine entdeckt, die der Bindungsstelle zwischen der α - und γ_2 -Untereinheit ähnelt (Sieghart et al., 2012; Sigel und Steinmann, 2012). Benzodiazepine, die an dieser Stelle angreifen, könnten in Zukunft für die Langzeitbehandlung der Epilepsie eingesetzt werden (Sieghart et al., 2012).

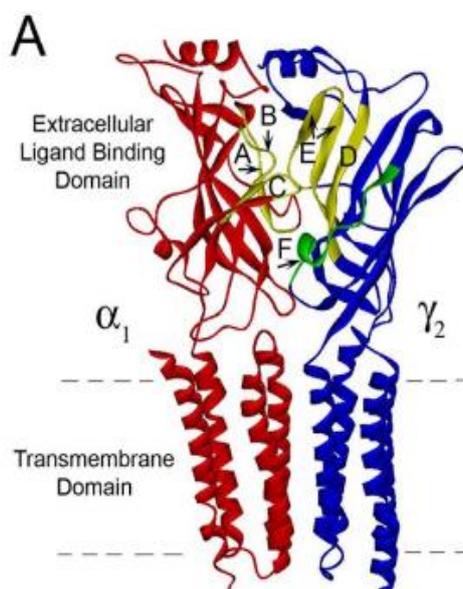


Abbildung 14 zeigt ein Homologiemodell der α_1 - (rot) und der γ_2 - (blau) Untereinheit des GABA_A Rezeptors. Die Bindungsstellen der Benzodiazepine (loops A-F) sind gelb, loop F ist grün dargestellt (Hanson und Czajkowski, 2008)

Verschiedene GABA_A Rezeptor Subtypen sind relevant für die pharmakologische Wirkung von Benzodiazepinen. Mit Hilfe von in vivo Punktmutationen fand man heraus, dass α_1 enthaltende GABA_A Rezeptoren für die sedierende Wirkung von Benzodiazepinen verantwortlich sind. Nach Verabreichung von Diazepam konnte keine verminderte lokomotorische Aktivität, was einer Sedierung entsprechen würde, festgestellt werden (Rudolph und Möhler, 2006). Außerdem vermittelt die α_1 -Untereinheit anterograde Amnesie und antikonvulsive Effekte (Möhler et al., 2002; Rudolph und Knoflach, 2011). Abhängigkeit wird ebenfalls über α_1 -enthaltende GABA_A Rezeptoren vermittelt (Möhler, 2012).

GABA_A Rezeptoren mit α_2 -Untereinheiten sind hauptsächlich für den angstlösenden Effekt zuständig (Möhler et al., 2002; Rudolph und Knoflach, 2011). Die muskelrelaxierende

Wirkung ist teilweise auf α_3 - und α_5 -Untereinheiten zurückzuführen (Rudolph und Knoflach, 2011). Diazepam besitzt auch analgetische Aktivität, was auf jene α_2 - und α_3 -Untereinheiten enthaltenden GABA_A Rezeptoren zurückzuführen ist, die sich am Dorsalhorn des Rückenmarks befinden (Möhler, 2011).

Unter chronischer Behandlung mit Diazepam kann es zur Toleranzentwicklung kommen. Dafür ist eine Interaktion des Benzodiazepins mit der α_1 - und der α_5 -Rezeptor Untereinheit notwendig (Möhler, 2006; Rudolph und Knoflach, 2011). Die typischen Benzodiazepin Nebenwirkungen, wie die Potenzierung der Wirkung durch Ethanol und die Störung von Bewegungsabläufen, werden vermutlich über jene GABA_A Rezeptoren, die α_2 -, α_3 - oder α_5 -Untereinheiten enthalten, ausgelöst (Rudolph et al., 1999).

Klassische Benzodiazepine, wie Diazepam oder Flunitrazepam, interagieren ausschließlich mit den als **Diazepam-sensitiven** bezeichneten GABA_A Rezeptoren (Möhler, 2006). Diese setzen sich aus α_1 -, α_2 -, α_3 -, α_5 -Untereinheiten in Kombination mit einer β -, meist β_2 - oder β_3 - und der γ_2 -Untereinheit zusammen (Rudolph und Möhler, 2006): $\alpha_1\beta\gamma_2$, $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$, $\alpha_5\beta\gamma_2$. Alle diese Diazepam-sensitiven Rezeptor Untereinheiten beinhalten die Aminosäure Histidin an diesen Stellen: α_1 His101, α_2 His101, α_3 His126, α_5 His105

Im Gegensatz dazu besitzen die sogenannten **Diazepam-insensitiven Rezeptoren** Arginin anstatt Histidin in der jeweiligen Position (Rudolph et al., 1999), weswegen klassische Benzodiazepine nicht an $\alpha_4\beta\gamma_2$ oder an $\alpha_6\beta\gamma_2$ Rezeptoren binden. Außerdem modulieren die meisten Benzodiazepine Rezeptoren mit γ_1 - oder γ_3 -Untereinheiten nicht oder kaum (Möhler et al, 2002; Olsen und Sieghart, 2009).

Die klassischen Benzodiazepine besitzen nicht die Fähigkeit, zwischen verschiedenen GABA_A Rezeptor Subtypen zu unterscheiden. Mittlerweile wurden jedoch Substanzen entwickelt, die eine Selektivität für $\alpha_1\beta\gamma_2$ Rezeptoren aufweisen, wie die Benzodiazepine Quazepam und Cinolazepam und Nicht-Benzodiazepine wie Zolpidem, Abecarnil, Zaleplon und Indiplon. Die meisten dieser Arzneistoffe wirken sedierend und hypnotisch (Olsen und Sieghart, 2009). Zaleplon beispielsweise, chemisch gesehen ein Pyrazolopyrimidin, wird wie schon erwähnt als Hypnotikum zur Behandlung von Schlafstörungen eingesetzt. Es bindet vor allem an Rezeptoren mit α_1 - und γ_3 -Untereinheiten, daneben acht bis zwanzig mal schwächer an Rezeptoren mit α_2 -, α_3 - und α_5 -Untereinheiten. Diese selektiven Liganden sollen nebenwirkungsärmer als klassische Benzodiazepine sein (Möhler et al., 2002).

Die klassischen Benzodiazepine wie Valium sind wie schon erwähnt positiv allosterische Modulatoren, die den Kanal nicht selbst öffnen, sondern zu einer allosterischen Konformationsänderung des Rezeptors führen (Sigel und Steinmann, 2012). Dadurch erhöht sich die Affinität von GABA zum GABA_A Rezeptor, was zu einer verstärkten Öffnungsfrequenz des Kanals führt (Boileau und Czajkowski, 1999). Das bedeutet, dass durch die allosterische Modulation der Benzodiazepine für die gleiche Menge an GABA mehr

Rezeptoren aktiviert werden (Möhler, 2011). Jedoch können Benzodiazepine maximale Ströme, die durch maximale GABA Konzentrationen hervorgerufen werden, nicht beeinflussen. Benzodiazepine verschieben nämlich nur die GABA Konzentrationswirkungskurve hin zu niedrigeren GABA Konzentrationen (Sigel und Steinmann, 2012). Die GABA_A Rezeptor Modulation durch Benzodiazepin Agonisten ist also selbst-limitierend: Die Leitfähigkeit des Kanals ist in der Gegenwart von GABA und Benzodiazepinen nicht höher als jene Leitfähigkeit, die nur über hohe GABA Dosen allein hervorgerufen wird (Rudolph und Knoflach, 2011). Deshalb sind Überdosierungen mit Benzodiazepinen in Monotherapie kaum möglich (Hevers und Lüddens, 1998).

Neben den modulatorisch wirkenden Benzodiazepinen gibt es auch Antagonisten an der Benzodiazepin Bindungsstelle. Flumazenil beispielsweise wird als Antidot bei Benzodiazepin Überdosierungen verabreicht (Möhler, 2011). Weiters gibt es negativ allosterische Modulatoren, sog. inverse Agonisten. Dazu gehört beispielsweise 3-carbomethoxy-4-ethyl-6,7-dimethoxy- β -carbolin (DMCM) (Hanson und Czajkowski, 2008; Sigel und Steinmann, 2012).

1.10.3 Anästhetika:

Anästhetika induzieren ein reversibles Stadium der Bewusstlosigkeit, welches durch Amnesie, Analgesie und Bewegungslosigkeit gekennzeichnet ist (Bali und Akabas, 2004; Franks, 2006; Campagna-Slater und Weaver, 2007). Hauptsächlich sollen der Thalamus, Hypothalamus und Hirnstamm beteiligt sein (Yanovsky et al., 2012).

Es existieren zwei Arten von Anästhetika: Inhalationsanästhetika wie Halothan (siehe Abbildung 15) und Injektionsanästhetika wie Propofol (siehe Abbildung 16) oder Etomidat. Inhalationsnarkotika werden hauptsächlich zur Aufrechterhaltung der Narkose verwendet, während Injektionsnarkotika vor allem zur Narkoseeinleitung genutzt werden. Während der Erholungsphase von der Narkose kann der „Hangover“ Effekt mancher Anästhetika störend sein (Whiting, 2003).

Die Targets, an denen klinisch verwendete Anästhetika angreifen, waren lange nicht bekannt (Reynolds et al., 2003; Franks, 2006; Möhler, 2006; Campagna-Slater und Weaver, 2007). Ursprünglich wurde angenommen, dass Anästhetika über unspezifische Interaktionen mit der Lipiddoppelschicht die Membranfluidität beeinflussen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sie mit Liganden-gesteuerten-Ionenkanälen, wie mit dem GABA_A Rezeptor interagieren (Bali und Akabas, 2004; Franks, 2006; Campagna-Slater und Weaver; 2007). Die meisten Anästhetika wirken als positive allosterische Modulatoren von GABA_A Rezeptoren (Whiting, 2003; Forman und Miller, 2011). Einige Inhalationsnarkotika greifen nicht nur am GABA_A Rezeptor, sondern auch an Kaliumkanälen und spannungsgesteuerten Natrium- oder

Calciumkanälen an. Über die Aktivierung der Kaliumkanäle, die für die Ausbildung des Ruhepotentials zuständig sind, kommt es zur Inhibition der neuronalen Aktivität und zur Hyperpolarisation (Son, 2010).

Halothan, Enfluran, Isofluran und Sevofluran gehören zur Gruppe der Inhalationsanästhetika (Kotani und Akaike, 2013). Inhalationsanästhetika binden an GABA_A Rezeptoren, die eine α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit enthalten (Ogawa et al., 2011). Sie interagieren mit folgenden Aminosäuren, die sich auf der α_1 -Untereinheit in oder nahe der mutmaßlichen Alkoholbindungstasche befinden: Leu232 (TM1), Ser270 (TM2), Ala291 (TM3), Tyr411, Thr414, Tyr415 (TM4) (Campagna-Slater und Weaver, 2007). Außerdem binden sie an extrasynaptische GABA_A Rezeptoren, die α_4 - oder α_5 -Untereinheiten enthalten, was zu einer Verstärkung der tonischen Inhibition führt. Auch die Hemmung der GABA Wiederaufnahme durch Inhalationsnarkotika führt zu höheren extrazellulären GABA Konzentrationen. Dies bewirkt wiederum eine verstärkte extrasynaptische GABA_A Rezeptor Aktivierung. Jene Rezeptoren, die sich extrasynaptisch aufhalten, könnten also die Hauptbindungsstellen für Inhalationsanästhetika bilden (Kotani und Akaike, 2013).

Die Effekte der Injektionsnarkotika am GABA_A Rezeptor sind konzentrationsabhängig. In niedrigen Dosen potenzieren sie GABA-induzierte Ströme. In höheren Dosen öffnen sie in Abwesenheit des Agonists GABA den Kanal direkt und in noch höheren Konzentrationen können Anästhetika die GABA-induzierten Ströme sogar hemmen (Bali und Akabas, 2004).

Das Injektionsnarkotikum Etomidat ist chemisch gesehen ein Imidazol, welches ein chirales C-Atom enthält. Sein R (+) Enantiomer wirkt zehn bis zwanzig fach stärker hypnotisch als S (-) Etomidat (Forman, 2011). Etomidat bindet zwischen α_1 - und β_2/β_3 -Untereinheiten des GABA_A Rezeptors (Forman und Miller, 2011; Forman, 2011). Die anästhetischen Eigenschaften von Etomidat werden hauptsächlich über β_3 beinhaltende GABA_A Rezeptoren vermittelt, während seine sedierende Wirkung durch die β_2 -Untereinheit zustande kommt (Whiting, 2003; Reynolds et al., 2003; Forman, 2011). β_3 -Untereinheit selektive Narkotika könnten also von Vorteil sein, weil sie wahrscheinlich eine schnellere Erholung ohne „Hangover“ zulassen würden (Whiting, 2003). Die Aminosäure Asn265 (TM2) auf der β_2 -Untereinheit ist eine Schlüsselaminosäure für die Wirkung von Etomidat an GABA_A Rezeptoren. Die β_1 -Untereinheit besitzt an jener Stelle einen Serin Rest und ist daher unempfindlich gegenüber Etomidat (Reynolds et al., 2003; Campagna-Slater und Weaver, 2007; Forman, 2011). Extrasynaptische GABA_A Rezeptoren, die eine α_5 - und eine δ -Untereinheit enthalten, tragen zur Etomidat-induzierten Amnesie bei (Forman, 2011).

Propofol ist das am häufigsten verwendete Injektionsnarkotikum. Für die Bindung von Propofol soll die Aminosäure Met286 (TM3) auf der β_2 -Untereinheit eine wichtige Rolle spielen (siehe Abbildung 17). Außerdem reichen geringe Dosen von Propofol aus, um eine

GABAerge Hemmung auszulösen, welche durch β_3 -Untereinheiten vermittelt wird (Yanovsky et al., 2012).

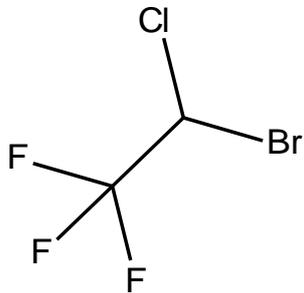


Abbildung 15:
Strukturformel Halothan

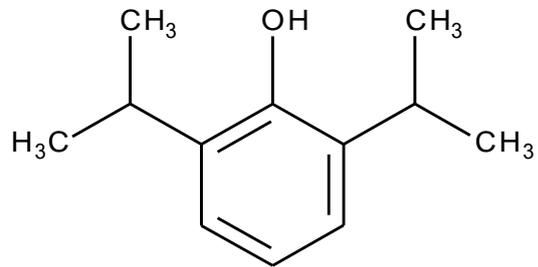


Abbildung 16: Strukturformel Propofol

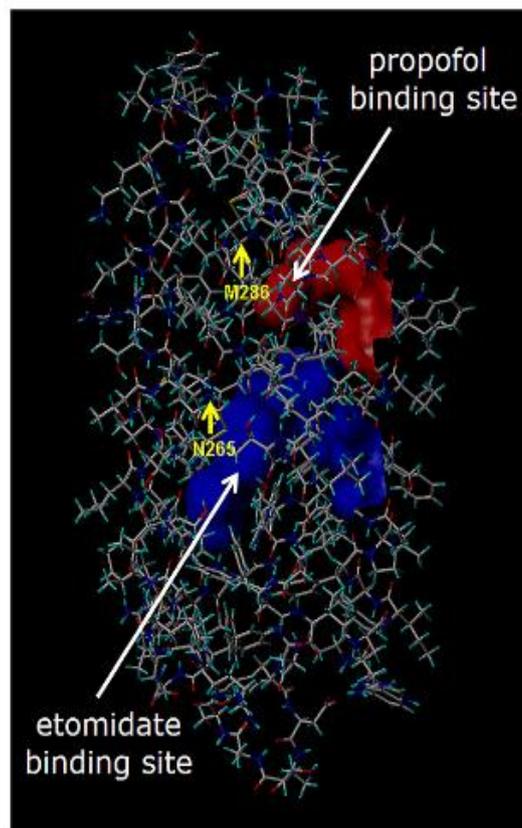


Abbildung 17 zeigt die Bindungsstellen für Propofol und Etomidat am GABA_A Rezeptor (Campagna-Slater und Weaver, 2007)

Phencyclidin und Ketamin (siehe Abbildung 18) sind dissoziative Anästhetika. Das bedeutet, dass sie nicht nur Analgesie und Bewusstlosigkeit hervorrufen, sondern auch psychomimetische Wirkungen zeigen (Hevers et al., 2008). Phencyclidin ist vor allem in den

USA als Straßendroge bekannt (Koseki und Nabeshima, 2010). Es wird im Gegensatz zu Ketamin nicht mehr therapeutisch verwendet. Bei Ketamin treten nämlich weniger Nebenwirkungen als bei Phencyclidin auf. Außerdem führt Ketamin stärker zu einer Depression des ZNS. Beide hemmen NMDA Rezeptoren nicht kompetitiv und wirken wahrscheinlich zusätzlich auf GABA_A Rezeptoren. Ketamin soll selektiv agonistisch an $\alpha_6\beta_2\delta$ und $\alpha_6\beta_3\delta$ GABA_A Rezeptoren wirken (Hevers et al., 2008).

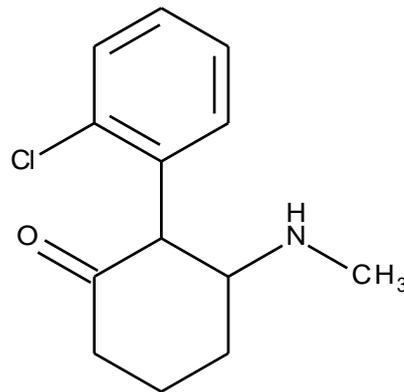


Abbildung 18: Strukturformel
Ketamin

1.10.4 Ethanol:

Die WHO schätzt, dass es weltweit zwei Milliarden Menschen gibt, die zu viel Alkohol konsumieren. Alkoholabhängigkeit kann unter anderem genetisch bedingt sein.

Alkohol moduliert in einigen Gehirnregionen, wie in der zentralen und basolateralen Amygdala, in der Area tegmentalis ventralis und im Hippocampus GABA_A Rezeptoren (Cui et al., 2012). Ethanol verlängert vermutlich die mittlere Öffnungszeit der Kanäle und erhöht daneben auch die Öffnungsfrequenz der Kanäle.

Ethanol zeigt dosisabhängig verschiedene Wirkungen: in niedrigen Dosen beobachtet man anxiolytische Effekte, Sedierung, unkoordinierte Bewegungsabläufe, Beeinträchtigung des Beurteilungsvermögens und in hohen Dosen Bewusstlosigkeit (Lobo und Harris, 2008).

Nach chronischer Alkoholeinnahme wurde eine erhöhte α_4 -, α_6 - und γ_2 -, aber eine verminderte α_{1-3} -, α_5 - und δ -mRNA Expression beobachtet (Cui et al., 2012). Durch die Langzeitkonsumation von Alkohol können sich Toleranz, Abhängigkeit und Entzugssymptome entwickeln (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Der Toleranzeffekt, der durch die Downregulation Ethanol-sensitiver GABA_A Rezeptoren zustande kommt, kann nach einer Minute, aber auch erst nach einem Tag auftreten (Gonzalez et al., 2012).

In hohen letalen Dosen (>50 mM) verändert Ethanol die Funktion vieler Membranproteine, unter anderem auch die des GABA_A Rezeptors (Sigel und Steinmann, 2012). In toxischen

Konzentrationen potenziert Alkohol hauptsächlich GABA-induzierte Ströme durch $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren, während in geringeren Konzentrationen Ethanol vorwiegend GABA_A Rezeptoren, die eine α_6 - und α_4 -Untereinheit enthalten, moduliert (Cui et al., 2012). Die Kombination von Rezeptoren mit einer α_6 - bzw. α_4 -Untereinheit gemeinsam mit einer β_3 - und δ -Untereinheit ist besonders Ethanol-sensitiv (Lobo und Harris, 2008). Es ist noch ungewiss, ob auch Alkoholkonzentrationen <20 mM, die bereits das menschliche Verhalten beeinflussen können, einen Effekt auf den GABA_A Rezeptor haben (Sigel und Steinmann, 2012).

Table 1

GABA_A receptor subtype ligands.

Drug	Main activity	Interaction with recombinant GABA _A receptors ^a	References
Benzodiazepine site ligands			
Zolpidem	Hypnotic	Preferential affinity for α_1	[49]
Zaleplone	Hypnotic	Preferential affinity for α_1	[49]
Indiplon	Hypnotic	Preferential affinity for α_1	[50]
L-838 417	Anxiolytic	Comparable affinity at α_1 , α_2 , α_3 and α_5 subtypes. Partial agonist at α_2 , α_3 and α_5 (but not α_1) subtypes	[3]
Ocinaplon	Anxiolytic	Comparable affinity at α_1 , α_2 , α_3 and α_5 subtypes. Partial agonist at α_2 , α_3 and α_5 subtypes. Nearly full agonist at α_1	[51*]
SL 651 498	Anxiolytic	Agonist at α_2 and α_3 . Partial agonist at α_1 and α_5 subtypes	[52]
TPA 023	Anxiolytic	Partial agonist at α_2 and α_3 subtypes. Antagonist at α_1 and α_5 subtypes	[7*]
TP003	Anxiolytic (at high receptor occupancy)	Comparable affinity at α_1 , α_2 , α_3 and α_5 subtypes. Selective agonist efficacy at α_3 subtype	[22*]
ELB139	Anxiolytic	Selective receptor profile uncertain	[53]
L-655 708	Memory enhancer, anxiogenic	Partial inverse agonist, with preference for α_5 subtype	[8*,9,30,51*]
α_3 IA	Anxiogenic	Weak inverse agonist at α_3	[21]
Ligands at modulatory sites other than the benzodiazepine site			
Ethanol	Anxiolytic, sedative	High sensitivity (>3 mM) at $\alpha_4(\alpha_6)\beta_3\delta^b$; medium sensitivity (>30 mM) at $\alpha_4(\alpha_6)\beta_2\delta^b$; low sensitivity (>100 mM) at $\alpha_4(\alpha_6)\beta_3\gamma_2$	[54]
Neurosteroids (e.g. 3 $\alpha,5\alpha$ -THDOC)	Anxiolytic, sedative Anaesthetic	High sensitivity at δ -containing subtypes ^b and at α_1 and α_3 receptors in combination with β_1	[55]
Intravenous anaesthetics (etomidate propofol)	Sedative, anaesthetic	Act on receptor subtypes containing β_3 (i.e. mainly α_2 and α_3 subtypes)	[38]
Dihydroquinoline (compound 4)	Anxiolytic	Agonist efficacy at α_2 but not α_1 subtype	[20]
GABA site			
Gaboxadol	Hypnotic	Partial agonist at α_1 and α_3 subtypes. Full agonist at α_5 subtype. Agonist at $\alpha_4\beta_3\delta$ receptors	[56]

^aData should be treated with caution, as recombinant receptors that are expressed in foreign host cells might not give an accurate reflection of their neuronal counterparts. ^bGABA is a weak partial agonist on δ -containing receptors, which largely explains the strong modulatory response of ligands acting on δ -containing receptors [57]. THDOC, 5 α -pregnane-3 $\alpha,21$ -diol-20-one.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Wirkungen verschiedener GABA_A Rezeptor Modulatoren (Rudolph und Möhler, 2006)

1.10.5 Barbiturate:

Barbiturate wurden anfangs des 20. Jahrhunderts als Beruhigungsmittel auf den Markt gebracht. In der klinischen Praxis wurden sie auch als Sedativa, Anxiolytika, Hypnotica, Anaesthetika und Antikonvulsiva verwendet (Uusi-Oukari und Korpi, 2010). Neben einigen anderen Rezeptoren, wie spannungsabhängige Calcium- und Natriumkanäle, binden

Barbiturate hauptsächlich an GABA_A Rezeptoren und vermindern dadurch die neuronale Erregbarkeit (Mathers et al., 2007).

Die Wirkung von Barbituraten ist dosisabhängig. In niedrigen Konzentrationen wirken sie als allosterische Modulatoren von GABA_A Rezeptoren (Sancar und Czajkowski, 2011). Im Gegensatz zu Benzodiazepinen, die die Öffnungsfrequenz des Kanals erhöhen, verlängern Barbiturate jedoch die Öffnungszeit des GABA_A Kanals. In höheren Konzentrationen aktivieren Barbiturate den Rezeptor direkt. In Konzentrationen, die darüber hinaus gehen, wird der GABA_A Rezeptor blockiert (Löscher und Rogawski, 2012).

Die Barbiturate Pentobarbital (siehe Abbildung 19) und Phenobarbital (siehe Abbildung 20) zeigen ein unterschiedliches therapeutisches Profil. Pentobarbital wirkt vor allem sedierend, in höheren Dosen anästhetisch und muskelrelaxierend. Phenobarbital wirkt dagegen vor allem antikonvulsiv und führt erst in hohen therapeutischen Dosen zur Sedierung (Mathers et al., 2007; Löscher und Rogawski, 2012). Seine geringere Effektivität lässt sich vermutlich auf eine reduzierte Aktivität an anderen Ionenkanälen zurückführen. Außerdem ist seine Eigenschaft, den GABA_A Rezeptor direkt zu aktivieren, nur sehr schwach ausgeprägt (Löscher und Rogawski, 2012). Phenobarbital zeigt in therapeutischen Dosen im Thalamus keine Wirkung. Angriffspunkt von Phenobarbital ist vermutlich der Neocortex.

Amobarbital, ein chemisches Isomer von Pentobarbital, wird in der Diagnostik zur Regionalanästhesie im Vorderhirn verwendet (Mathers et al., 2007).

Die Lokalisation einer Barbituratbindungsstelle an GABA_A Rezeptoren ist bis heute nicht bekannt, jedoch interagieren sie nicht mit der GABA oder Benzodiazepinbindungsstelle (Sancar und Czajkowski, 2011). Außerdem vermutet man, dass die TM2 und TM3 auf der β-Untereinheit eine entscheidende Rolle spielen. Eine Bindungstasche, auf welcher sich die Aminosäuren Met286 auf der β-Untereinheit und Met236 auf der α-Untereinheit befinden, soll auch an der Bindung von Barbituraten an den GABA_A Rezeptor beteiligt sein (Löscher und Rogawski, 2012).

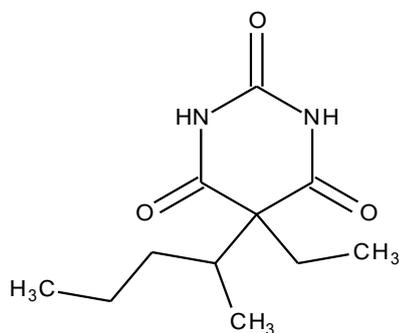


Abbildung 19: Strukturformel Pentobarbital

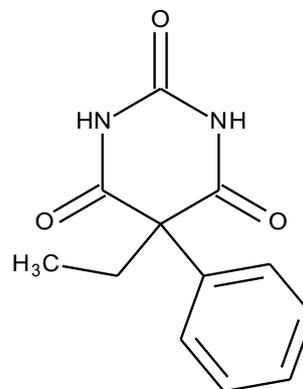


Abbildung 20: Strukturformel Phenobarbital

1.10.6 Furosemid:

Das Schleifendiuretikum Furosemid (siehe Abbildung 21) ist ein nicht-kompetitiver Antagonist von GABA_A Rezeptoren (Wall, 2002). In der selben Konzentration, in der es am GABA_A Rezeptor angreift, blockiert es aber auch den Natrium-Chlorid-Kalium Cotransporter. Dadurch entsteht seine diuretische Wirkung. Furosemid blockiert außerdem den Kalium-Chlorid Cotransporter KCC2. Dieser Cotransporter ist in Neuronen für die Herstellung eines Chloridionengradienten, welcher für eine GABA-induzierte Hyperpolarisation notwendig ist, zuständig (Korpi et al., 2002).

GABA_A Rezeptoren mit α_6 - und $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten sind empfindlich gegenüber Furosemid (Korpi und Lüddens, 1997; Korpi et al., 2002; Wall, 2002). $\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2$ Rezeptoren, die sich in den Körnerzellen des Kleinhirns befinden, reagieren also auf den nicht-kompetitiven Antagonismus von Furosemid. β_1 enthaltende Rezeptoren sind hingegen unempfindlich (Korpi et al., 2002; Wall, 2002). Die spezifische Verteilung jener Rezeptoren, mit denen Furosemid interagiert, ist daher von der Lokalisation der α_6 -Untereinheit abhängig. Die Verteilung dieser Untereinheit beschränkt sich hauptsächlich auf das Kleinhirn.

Die Aminosäure, die für die Inhibition durch Furosemid eine primäre Rolle spielt, wurde auf der α_6 -Untereinheit auf einem kurzen Abschnitt zwischen N-terminalen Aminosäuren und der zweiten Hälfte der TM1 gefunden (Korpi et al., 2002). Es handelt sich hierbei um einen Isoleucin Rest in Position 228. Weiters entdeckte man einen Asparagin Rest in Position 265 auf der β -Untereinheit, der ebenfalls wichtig zu sein scheint (Thompson et al., 1999).

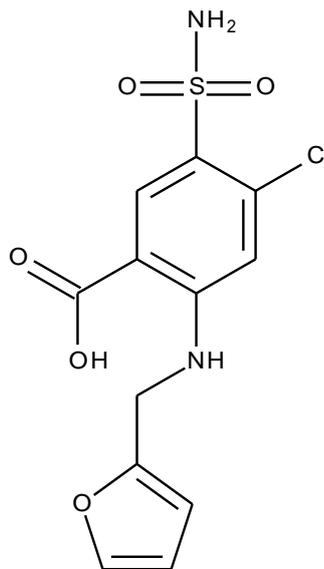


Abbildung 21: Strukturformel Furosemid

1.10.7 Loreclezol:

Das Antikonvulsivum Loreclezol (siehe Abbildung 22) wurde zur Behandlung der Epilepsie entwickelt. Es moduliert GABA_A Rezeptoren, jedoch nicht über die Interaktionsstellen der Benzodiazepine, Barbiturate, Steroide oder Anästhetika (Hevers und Lüddens, 1998).

Loreclezol ist als allosterischer Modulator an GABA_A Rezeptoren, die eine β_2 - oder β_3 -Untereinheit enthalten, bekannt (Thomet et al., 2000). Es verstärkt GABA-induzierte-Ströme durch β_2 - und β_3 -Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren ca. 300 mal effizienter als durch Rezeptoren, die ein β_1 -Untereinheit enthalten.

Es wurde ein Asparaginrest in Position 289 bzw. 290 in der TM2 Region der β_2 - und β_3 -Rezeptor Untereinheiten identifiziert. Dieser soll essentiell für die Modulation durch Loreclezol am GABA_A Rezeptor sein. Der Austausch dieses Asparaginrests gegen Serin oder Methionin macht den GABA_A Rezeptor unempfindlich gegenüber Loreclezol (Hevers und Lüddens, 1998). Weiters entfaltet Loreclezol seine Wirkung über die selbe Aminosäure wie das Injektionsnarkotikum Etomidat, über den Asparagin Rest in Position 265 (TM2) der β_2 -Untereinheit (Reynolds et al., 2003).

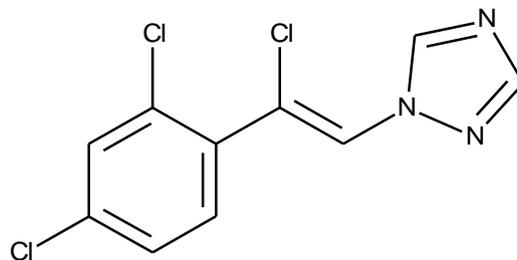


Abbildung 22: Strukturformel Loreclezol

1.11 ZNS-Erkrankungen

Die Balance zwischen excitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission ist eine Grundvoraussetzung für die normale Funktion des Gehirns. GABAerge Neuronen sind wie schon erwähnt hauptsächlich für die inhibitorische Kontrolle zuständig. Bei einer pharmakologischen Verschiebung der Balance zwischen neuronaler Excitation und neuronaler Inhibition Richtung GABAerger Transmission, kommt es zur Anxiolyse, zu Sedierung, Amnesie, Ataxie und Bewusstseinsverlust. Im Gegensatz dazu kann es durch eine Hemmung des GABAergen Systems zu Erregung und Ruhelosigkeit kommen. ZNS-Erkrankungen, wie Angst- und Schlafstörungen, Depressionen, Alkoholabhängigkeit, Schizophrenie oder Epilepsie können die Folge sein (Möhler, 2006a).

1.11.1 Angststörungen und Depressionen:

Wiederkehrender Stress kann in Menschen und Tieren Angst und Depressionen auslösen. Angstmechanismen haben sich entwickelt, damit sich der Mensch beispielsweise von einer plötzlichen Bedrohung fernhält. Bei Patienten, die unter Angstzuständen leiden, kann es durch Auslöser wie plötzliche Geräusche oder Spinnen, zu extremer Erregtheit und emotionalem Stress kommen. Angst geht mit Symptomen wie starker Erregung, sinnlosen Sorgen und Vermeidung sozialer Kontakte einher. Eine verstärkte Aktivität der Amygdala, sowie eine verminderte Aktivität des orbitofrontalen und medial prefrontalen Kortex wurde an Patienten mit Angststörungen beobachtet.

Angststörungen werden in fünf Gruppen eingeteilt:

1. Generalisierte Angststörungen
2. Panikstörungen
3. Zwanghafte Störungen
4. Soziale Angststörungen
5. Posttraumatische Stresstörungen

Depression ist die Bezeichnung für eine sehr komplexe Erkrankung. Sie ist durch Schlafstörungen, Müdigkeit, vermindertes Selbstvertrauen, Pessimismus und Selbstmordgedanken gekennzeichnet.

Die Möglichkeit, dass Angst und Depressionen aufgrund einer gemeinsamen neurobiologischen Fehlfunktion auftreten, wird durch die Tatsache unterstützt, dass beide Krankheiten auf die selben Therapieschemata ansprechen. Den Beweis dafür liefern Selektive Serotonin Wiederaufnahme Hemmer (SSRI's), welche als Mittel der Wahl in der Therapie gegen Ängste und Depressionen eingesetzt werden.

Die durch GABA vermittelte Pathophysiologie scheint ein bestimmender Faktor für beide Erkrankungen zu sein. In Patienten mit Panikstörungen wurde ein Defizit an GABA_A Rezeptoren festgestellt (Möhler, 2012). Eine Reduktion der GABA Transmission löst Angst und Depressionen aus, während Arzneistoff-induzierte Verstärkung der GABA Transmission dagegen Angst-lösend wirkt (Möhler, 2006a; Möhler, 2012).

Tricyclische Antidepressiva lindern Ängste und Depressionen, bringen jedoch verstärkt Nebenwirkungen mit sich. Auch Benzodiazepine wie Alprazolam werden bei Angststörungen eingesetzt. Wegen ihrer sedierenden Wirkung und dem Abhängigkeitspotential werden sie jedoch nicht bei Depressionen verwendet.

Daher versucht man, Anxiolytika ohne sedierende Nebenwirkung zu entwickeln (Möhler, 2006). Der Partialagonist TPA023 moduliert GABA_A Rezeptoren, welche eine $\alpha_{2/3}$ -Untereinheit enthalten und wirkt anxiolytisch, ohne jedoch zu unerwünschter Sedierung oder Abhängigkeit zu führen (Rudolph und Knoflach, 2011; Möhler, 2012).

1.11.2 Epilepsie:

Wenn Menschen zwei oder mehrere grundlos ausgelöste Krampfanfälle erleiden, spricht man von Epilepsie (Macdonald et al., 2010). Dabei kommt es zu einer transienten paroxysmalen hypersynchronen elektrischen Entladung im Gehirn, das durch zu starke Erregung oder zu schwache Inhibition zustande kommt (Treiman, 2001). Diese neurologische Erkrankung betrifft 0,5 bis 1% der Bevölkerung weltweit (Macdonald, 2010). Epilepsie besitzt kein einheitliches klinisches Bild. So zählt man beispielsweise Absence vor allem im Kindesalter, die als gutartig eingestuft wird, juvenile myoklonische Anfälle, Fieberkrämpfe, generalisierte Epilepsie oder auch das Dravet-Syndrom, bei welchem schwere Myoklonien vor allem in der Kindheit auftreten, zu diesem Symptomenkreis (Kang und Macdonald, 2009; Macdonald et al., 2010).

In Teilen des Hippocampus epileptischer Patienten wurde eine verminderte Anzahl an GABA_A Rezeptoren und GABA-Transportern nachgewiesen. Daher werden in der Therapie der Epilepsie häufig Substanzen, die die GABAerge Neurotransmission verstärken wie Benzodiazepine, Barbiturate, Cetyl-GABA oder Progabid eingesetzt.

Nicht alle Antiepileptika greifen jedoch direkt an GABA_A Rezeptoren an. Das Antikonvulsivum Tiagabin blockiert die Wiederaufnahme von GABA in Neuronen und Gliazellen. Dadurch bleibt mehr GABA im synaptischen Spalt. Vigabatrin hemmt den GABA-Katabolismus, indem es als irreversibler Suizidinhibitor der GABA Transaminase fungiert. Auch dadurch steigen die synaptischen GABA Konzentrationen. Tiagabin und Vigabatrin werden zur Behandlung von fokalen Krampfanfällen eingesetzt (Treiman, 2001). Valproinsäure (siehe Abbildung 23) verhindert über die Hemmung der GABA Transaminase und der

Succinatsemialdehyddehydrogenase den Abbau von GABA (Terbach und Williams, 2009). Sie wird neben ihrer Indikation als Antikonvulsivum gegen bestimmte Epilepsieformen in der Kindheit, auch bei Depressionen, Migräne und Schizophrenie eingesetzt (Chateauvieux et al., 2010).

Antiepileptika wie Valproinsäure blockieren daneben auch spannungsabhängige Calciumkanäle und Natriumkanäle und verhindern dadurch eine Depolarisation der Nervenzelle (Brodie, 2010). Gabapentin zum Beispiel wirkt hauptsächlich über die Hemmung spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Bis auf die häufig auftretenden Nebenwirkungen Schläfrigkeit und Schwindel, wird dieser Arzneistoff gut vertragen (Striano und Striano, 2008).

Andere Antiepileptika, wie Felbamat oder Topiramamat, wirken hauptsächlich über die Hemmung spezifischer Glutamatrezeptoren, was die excitatorische Neurotransmission reduziert (Brodie, 2010).

Carbamazepin (siehe Abbildung 24) weist strukturelle Ähnlichkeit mit tricyclischen Antidepressiva auf. Daher wird es nicht nur als Mittel der Wahl zur Behandlung verschiedener Formen der Epilepsie, sondern auch manchmal gegen bipolare Störungen eingesetzt (Bialer, 2012). Sein Analogon Eslicarbazepinacetat blockiert wie Carbamazepin spannungsabhängige Natriumkanäle. Weil dieses nicht zu Carbamazepin 10,11 epoxid umgewandelt wird, kommt es im Gegensatz zu Carbamazepin zu keiner Enzyminduktion (Stephen und Brodie, 2011).

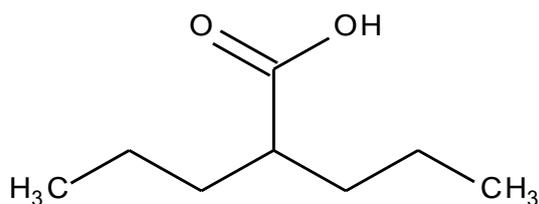


Abbildung 23: Strukturformel Valproinsäure

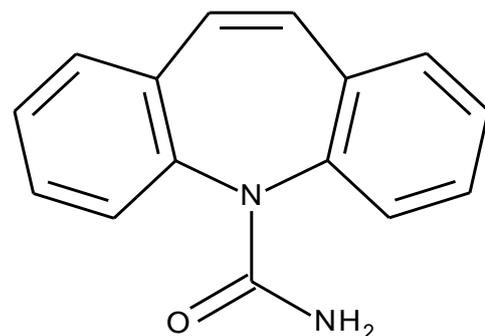


Abbildung 24: Strukturformel Carbamazepin

Wahrscheinlich spielt eine komplexe polygenetische Vererbung für das Auftreten der Epilepsie eine wichtige Rolle (Macdonald et al., 2010). Mutationen an Ionenkanälen können die excitatorische Neurotransmission verstärken oder die inhibitorische Neurotransmission reduzieren. Dies kann wiederum zur Hypererregbarkeit des Gehirns führen und bei Patienten Krämpfe auslösen (Kang und Macdonald, 2009; Macdonald et al., 2010). Mutationen beeinflussen den GABA_A Rezeptor über zahlreiche Mechanismen (siehe Abbildung 25). Zum Beispiel kann die Transkription der mRNA, welche die GABA_A Rezeptor Untereinheiten codiert, beeinflusst werden. Weiters kann es zu falschen Faltungen von Untereinheiten oder zu nicht korrekter Rezeptorverankerung kommen (Macdonald et al., 2010). Auch Nonsense Mutationen, die ein fehlplatziertes Stopcodon in der mRNA verschiedener Ionenkanäle generieren, werden mit Epilepsie in Verbindung gebracht (Kang und Macdonald, 2009). Absencen in der Kindheit und fieberhafte Krampfanfälle werden durch die Punktmutation Arg43Gln ausgelöst, die sich auf der γ_2 -Untereinheit befindet. Zusätzlich kommt es auch durch einen Nukleotidaustausch an der Splice Donor Stelle des Introns 6 auf der γ_2 -Untereinheit zur Bildung eines nichtfunktionellen Allels. Außerdem wird die Mutation Lys289Met, die in der extrazellulären Schleife der γ_2 -Untereinheit lokalisiert ist, mit generalisierter Epilepsie, bei der es auch zu fieberhaften Krampfanfällen kommt, assoziiert (Möhler, 2006a). Weiters fand man in einer Familie, die an der autosomalen dominanten Form der juvenilen myoklonischen Epilepsie leidet, die Mutation α_1 Ala322Asp (Möhler, 2006a; Macdonald et al., 2010).

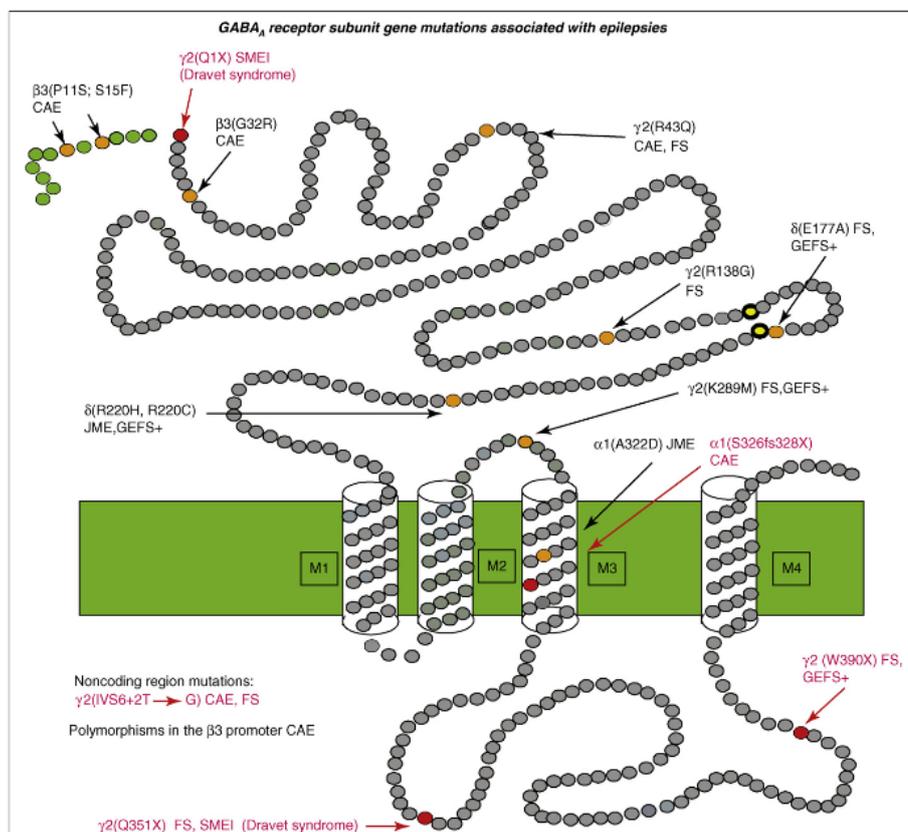


Abbildung 25 zeigt verschiedene Mutationen an Untereinheiten des GABA_A Rezeptors, die mit der Entstehung von Epilepsie in Verbindung gebracht werden (Kang und Macdonald, 2009)

1.11.3 Schizophrenie:

Es handelt sich hierbei um eine schwere psychiatrische Erkrankung, welche 1% der Weltbevölkerung betrifft. Meistens manifestiert sich diese Krankheit im späten Jugend- oder im frühen Erwachsenenalter. Bei Schizophrenen kommt es durch eine veränderte neuronale Entwicklung im präfrontalen Kortex zu Defiziten kognitiver Funktionen. Es kann beispielsweise zum Verlust der Merkfähigkeit und Aufmerksamkeit kommen (Volk und Lewis, 2002).

Einer Hypothese zufolge spielt eine verminderte GABAerge Hemmung eine wichtige Rolle in der Entstehung der Symptomatik (Möhler, 2006, 2011; Hines et al., 2012). Vor einigen Jahren fand man heraus, dass unter anderem eine verminderte Anzahl des GABA-synthetisierenden Enzyms GAD zu diesem GABAergen Defizit in der Kleinhirnrinde führt (Volk und Lewis, 2002; Möhler, 2011).

Schizophrenie Patienten leiden an einem Überschuss an Dopamin. Bestimmte GABA_A Rezeptor Subtypen leisten einen Beitrag zur Hemmung des dopaminergen Systems. Dafür spielen vor allem GABA_A Rezeptoren, die eine α_3 -Untereinheit enthalten, eine wichtige Rolle (Möhler, 2006; Rudolph und Knoflach, 2011). α_3 -Knock-out Mäuse zeigen eine deutlich verminderte Präpulsinhibition. Dieser Effekt tritt auch bei Schizophrenen auf (Möhler, 2006; Rudolph und Knoflach, 2011). Agonisten, die selektiv an α_3 -Untereinheit beinhaltenden GABA_A Rezeptoren binden, könnten zur Behandlung von Schizophrenie Patienten genutzt werden (Möhler, 2006). Außerdem wurde eine kompensatorische Up-Regulation der α_2 beinhaltenden GABA_A Rezeptoren in Pyramidenzellen beobachtet, was auf ein Defizit GABAerger Transmission in Schizophrenie Patienten hindeutet (Volk und Lewis, 2002; Möhler, 2006a). Auch die α_5 -Untereinheit spielt eine Rolle in Schizophrenie-Erkrankter (Möhler, 2006; Hines et al., 2012). Abnorme strukturelle Veränderungen im Hippocampus gehen wahrscheinlich auch mit einem Verlust von α_5 GABA_A Rezeptoren einher (Möhler, 2006). All diese Resultate lassen vermuten, dass α_3 - und α_5 -Untereinheiten selektive Agonisten effektiv zur Behandlung der Schizophrenie beitragen könnten (Rudolph und Möhler, 2006; Möhler, 2006).

1.11.4 Schlafstörungen:

Ausreichend Schlaf ist wichtig für unser Wohlbefinden. Schlafstörungen können Fähigkeiten wie Lernen, Erinnerung, Aufmerksamkeit und unser Verhalten negativ beeinflussen (Weiss und Garbutt, 2010).

Eine verstärkte Aktivität GABAerger Neuronen zwischen Thalamus und Kortex deutet darauf hin, dass GABA für einen physiologischen Schlaf essentiell ist. Daneben beweist die

Verwendung positiv allosterischer Modulatoren des GABA_A Rezeptors zur Schlafförderung die Verbindung zwischen GABAerger Inhibition und Schlaf. Weiters sind GABAerge Defizite, die beispielsweise durch eine Mutation der β_3 -Untereinheit zustande kommt, mit chronischer Schlaflosigkeit assoziiert (Möhler, 2006a).

Physiologischer Schlaf ist durch langsame Wellen im Elektroenzephalogramm (EEG) gekennzeichnet. Durch klassische Benzodiazepine wie Diazepam, die häufig zur Therapie von Schlafstörungen eingesetzt werden, kommt es zu unerwünschten Veränderungen des physiologischen Schlafs. Die rapid eye movement (REM) Phase, die durch langsame δ Wellen charakterisiert ist, wird gehemmt. Dadurch verändert sich das EEG-Profil in Richtung steigender Frequenz der β und θ Wellen (Tobler et al., 2001; Möhler, 2006). Wahrscheinlich ist die α_1 -Untereinheit zwar für die sedierende Wirkung, jedoch nicht für diese Veränderungen im EEG verantwortlich. α_1 selektive GABA_A Rezeptor Agonisten wie Zolpidem führen zu Sedierung, verändern jedoch das EEG-Profil nicht (Rudolph und Möhler, 2006).

Die Untereinheit α_2 scheint für den Eingriff in das EEG-Profil des physiologischen Schlafs am bedeutsamsten zu sein. In α_2 His101Arg Mäusen ist die Diazepam induzierte Hemmung der δ Wellen, die Steigerung der schnellen Wellen im Non-REM Schlaf, als auch der Anstieg der θ Wellen in der REM Phase stark abgeschwächt (Möhler, 2006a).

Zukünftige Hypnotica sollen Veränderungen im EEG Wellenmuster hervorrufen, welche dem physiologischen Schlaf gleich kommen und dadurch die Schlafqualität verbessern (Möhler, 2006). Das GABA-Mimetikum Gaboxadol beispielsweise führt während des Schlafs zu einer langsameren Wellenfrequenz. Es beeinflusst jedoch weder den Einschlafzeitpunkt, noch den REM Schlaf. Gaboxadol und Benzodiazepine binden an verschiedene GABA_A Rezeptoren. Dies könnte der Grund für diese unterschiedlichen Auswirkungen von Benzodiazepinen und Gaboxadol auf das Schlafverhalten sein (Rudolph und Möhler, 2006).

2. Problemstellung und Zielsetzung:

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter in unserem Gehirn (Owens und Kriegstein, 2002; Connolly und Wafford, 2004; Olsen und Sieghart, 2009; Sigel und Steinmann, 2012). Über die Bindung an eine Vielzahl verschiedener GABA_A Rezeptor Subtypen reguliert GABA diverse Funktionen, wie Wachheit, Angst, Muskeltonus und Gedächtnis. Fehlfunktionen des GABAergen Systems können somit zu ZNS-Erkrankungen, wie Angststörungen, Depressionen, Epilepsie, Schizophrenie oder Schlafstörungen führen. Daher ist der GABA_A Rezeptor ein wichtiger Angriffspunkt verschiedener Arzneistoffe zur Behandlung dieser neuropsychiatrischen Erkrankungen (Möhler, 2006a).

Häufig werden Benzodiazepine in der Therapie gegen diese Erkrankungen eingesetzt (Möhler et al., 2002; Siegel und Steinmann, 2012). Sie weisen jedoch ein breites Spektrum an Nebenwirkungen auf, was sich auf eine nicht-selektive Interaktion mit verschiedenen GABA_A Rezeptor Isoformen zurückführen lässt (Connolly und Wafford, 2004). So kann es zu unerwünschten Wirkungen, wie beispielsweise anterograder Amnesie, aber auch Toleranz und Abhängigkeit kommen (Rudolph et al., 1999). Daher ist die Entwicklung selektiver Arzneistoffe, die nur bestimmte GABA_A Rezeptor Subtypen modulieren, Ziel der neuropharmakologischen Forschung (Olsen und Sieghart, 2009). Dank erweitertem Wissen über den Aufbau, die Verteilung im ZNS und die Funktionen der einzelnen Untereinheiten von GABA_A Rezeptoren, erhofft man sich, neue therapeutische Möglichkeiten schaffen zu können (Möhler et al., 2002).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte nun der Effekt eines Subtyp-selektiven GABA_A Rezeptor Modulators und ausgewählter Derivate auf Stress und Motoraktivität von Mäusen gemessen und mit dem Effekt von Diazepam und einer Kochsalzlösung verglichen werden. Dazu wurde die Reduktion der „Stress-induzierten Hyperthermie“ durch insgesamt vier Derivate dieses Subtyp-selektiven Liganden in unterschiedlichen Dosierungen bestimmt und die Wirkung dieser Derivate mit der Wirkung des Subtyp-selektiven Liganden selbst, Diazepam und einer Kochsalzlösung verglichen.

In einem weiteren Experiment (Open field) wurde die motorische Aktivität durch ein Derivat in verschiedenen Dosierungen untersucht und ebenfalls mit der Wirkung des Subtyp-selektiven GABA_A Rezeptor Modulators selbst, Diazepam und einer Kochsalzlösung verglichen.

3. Material und Methoden:

Die experimentelle Arbeit wurde bereits in den Diplomarbeiten von Mag. Susanne Riedler (Charakterisierung der in vivo Wirkung eines Naturstoffes mithilfe verhaltenspharmakologischer Tests, 2010), Mag. Daniela Hrabak (Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Wirkung ausgewählter GABA_A-Modulatoren im Tiermodell, 2012), und Mag. Helga Dobernik (Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Effekte ausgewählter Naturstoffderivate im Tiermodell, 2013) beschrieben und wird hier adaptiert zusammengefasst.

3.1 Tiere:

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Mäuse (C57BL/6/N) im Alter von 3 bis 8 Monaten verwendet (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Die Mäuse, welche in Gruppen zu je 5 Tieren gehalten wurden, hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Die Haltungsbedingungen waren:

- Raumtemperatur bei $22 \pm 1^\circ \text{C}$
- Luftfeuchtigkeit $40 \pm 20 \%$
- 12-stündiger Tag/Nacht/Rhythmus (07.00 bis 19.00 Uhr).

Die Durchführung der Versuche wurde unter Befolgung der europäischen Konvention für den Schutz von experimentelle oder für andere wissenschaftliche Zwecke verwendete Wirbeltiere ETS no.: 123 vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt (Khom et al., 2010). Am Vortag der Versuche wurden die Tiere gewogen, markiert und in den Versuchsraum gebracht.

Applikation der Substanz-bzw. Kontrolllösungen für den OF bzw. SIH-TEST:

Die Substanz- bzw. Kontrolllösungen wurden intraperitoneal (i.p.) drei Stunden vor dem SIH-Test bzw. 30 Minuten vor dem OF-Test vom Versuchsleiter (Dr. Sophia Khom) injiziert. Die Injektion der Testlösungen erfolgte in einem Vorbereitungsraum, um die anderen Tiere nicht zu stören.

3.2 Injektionslösungen:

Aus einer Stammlösung von 1 mg/10- μ l DMSO wurden die Injektionslösungen zubereitet. Diese wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) auf die gewünschte Konzentration (siehe Abbildungen und Ergebnisteil) verdünnt. Allen Lösungen wurde zur Verbesserung der Löslichkeit 3 % Polysorbat 80 zugesetzt. Die DMSO-Konzentration aller Testlösungen betrug 10%.

3.3 Open-Field-Test (OF):

Der Open-Field-Test wurde wie von Crawley beschrieben (2007) durchgeführt. 30 Minuten nach i.p. Injektion wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten das Verhalten der Mäuse in einer 50 x 50 cm Box, welche mit Infrarot-Lichtschranken ausgestattet war, getestet. Die Lichtintensität wurde auf 150 Lux eingestellt. Nach Empfehlung von EMPRESS (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens; <http://empress.har.mrc.ac.uk>) wurde die Gesamtfläche für die Auswertung in drei Felder unterteilt:

1. Randzone (bis 8 cm von der Wand)
2. Zentrum (16 % von der Gesamtfläche)
3. Zwischenzone (Fläche zwischen diesen Zonen) (siehe Abbildung 26).

Mittels ActiMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland) erfolgte die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche automatisch.

Der Open-Field-Test dient zur Messung der lokomotorischen Aktivität von Mäusen, wodurch deren emotionales Verhalten bestimmt werden kann (Karl et al., 2003). Halten sich die Mäuse verstärkt in der Peripherie des Feldes auf, deutet dies auf ein ängstliches Verhalten hin. Im Gegensatz dazu ist ein Aufenthalt vermehrt in der Mitte des Feldes ein Beweis verminderter Ängstlichkeit. Außerdem wird im OF-Test die Gesamtlaufstrecke der Maus berechnet, welche beispielsweise durch Sedierung oder Beeinträchtigung der Bewegung reduziert sein kann (Bellavite et al., 2009).

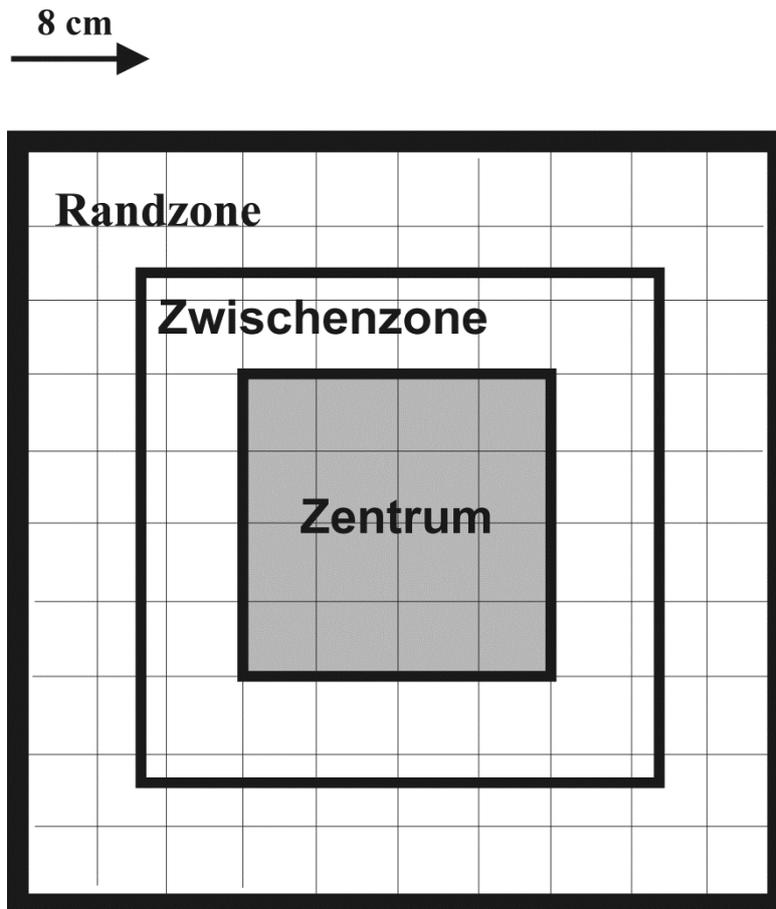


Abbildung 26: Schematische Darstellung des OF mit Einteilung der Fläche in Rand-, Zwischenzone und Zentrum. Diese Abbildung wurde von Dr. Sophia Khom zur Verfügung gestellt (siehe auch Diplomarbeiten von Mag. Susanne Riedler (Charakterisierung der in vivo Wirkung eines Naturstoffes mithilfe verhaltenspharmakologischer Tests, 2010), Mag. Daniela Hrabak (Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Wirkung ausgewählter GABA_A-Modulatoren im Tiermodell, 2012), und Mag. Helga Dobernik (Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Effekte ausgewählter Naturstoffderivate im Tiermodell, 2013)).

3.4 Stress-Induced Hyperthermia-Test (SIH):

Die Mäuse wurden am Vortag des SIH-Tests in Einzelkäfige gesetzt und in den Versuchsraum gebracht. Am Morgen des Versuchstages wurde zuerst die Basaltemperatur (T1) der Tiere bestimmt. Dafür wurde ein Temperaturmessgerät ca. 2 cm tief in das Rectum der Maus eingeführt. Es wurde handelsübliche Vaseline verwendet, um das Einführen des Thermometers zu erleichtern.

3 Stunden nach i.p. Injektion der Testlösungen wurde wieder die Körpertemperatur T2 gemessen. Durch diesen Vorgang wurde bei den Tieren Stress ausgelöst. 15 min nach dieser Messung wurde ein 3. Mal die Temperatur (T3) gemessen. Die Differenz zwischen T2 und T3 wird als ΔT bzw. Stress-induced hyperthermia bezeichnet (Olivier et al., 2003).

3.5 Statistische Analyse:

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (n) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des t-Tests und ANOVA ermittelt. $p < 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

4. Ergebnisse:

4.1 SIH-Test:

4.1.1 Effekt von Diazepam (DZP) auf Stress-induzierte Hyperthermie:

Wie in Abbildung 27 dargestellt, kam es bei Kontroll-Mäusen zu einer signifikant ausgeprägten Stress-induzierten Hyperthermie (SIH) ($\Delta T = 1,1 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 19$; weißer Balken). Im Gegensatz dazu konnte keine SIH in Diazepam-behandelten Mäusen beobachtet werden (DZP 1 mg/kg $\Delta T = 0,2 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 12$; $p < 0,01$; DZP 3 mg/kg $\Delta T = 0,1 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 9$; $p < 0,01$; schwarze Balken).

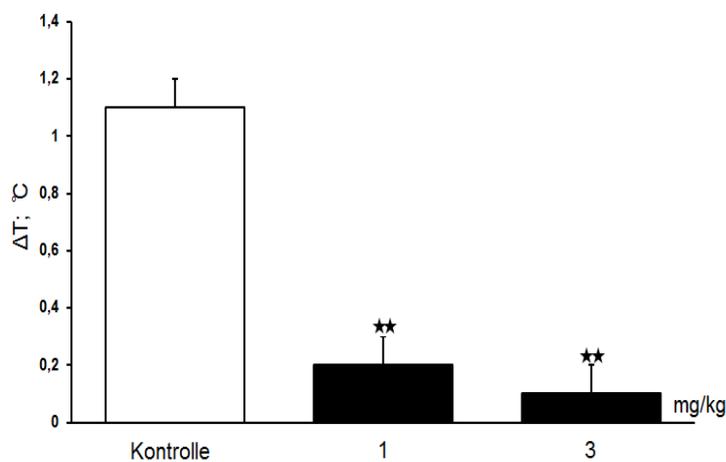


Abbildung 27: Effekt von Diazepam und einer Kontrolllösung auf SIH von C57BL/6/N Mäusen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Änderung der Körpertemperatur ($^\circ\text{C}$; ΔT) \pm SEM bei den angegebenen Dosen. (***) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0,01$).

4.1.2 Effekt von CR-0 auf Stress-induzierte Hyperthermie:

Wie in Abbildung 28 gezeigt, kam es nach i.p. Applikation von 1 mg/kg Körpergewicht CR-0 ($\Delta T = 0,6 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 12$; $p < 0,01$; schwarzer Balken), verglichen mit der Kontrollgruppe ($\Delta T = 1,1 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 19$; weißer Balken), zu einer dosisabhängigen, signifikant reduzierten Hyperthermie (CR-0 3 mg/kg $\Delta T = 0,4 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $n = 8$; $p < 0,01$; schwarzer Balken).

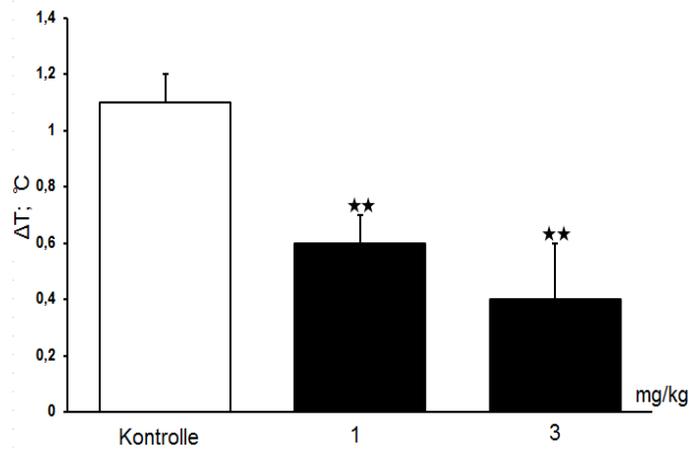


Abbildung 28: Effekt von CR-0 und einer Kontrolllösung auf SIH von C57BL/6/N Mäusen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Änderung der Körpertemperatur (°C; ΔT) \pm SEM bei den angegebenen Dosen. (★★) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0,01$).

4.1.3 Effekt von CR-1 auf Stress-induzierte Hyperthermie:

Wie in Abbildung 29 dargestellt, kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe ($\Delta T = 1,1 \pm 0,1$ °C; $n = 19$; weißer Balken) nach Injektion von 1 mg/kg Körpergewicht CR-1 in Mäusen ($\Delta T = 0,6 \pm 0,1$ °C; $n = 13$; $p < 0,05$; schwarzer Balken) zu einer signifikant verringerten Stress-induzierten Hyperthermie, welche nach Verabreichung einer höheren Dosis (3 mg/kg) CR-1 noch geringer war ($\Delta T = 0,4 \pm 0,1$ °C; $n = 10$; $p < 0,01$; schwarzer Balken).

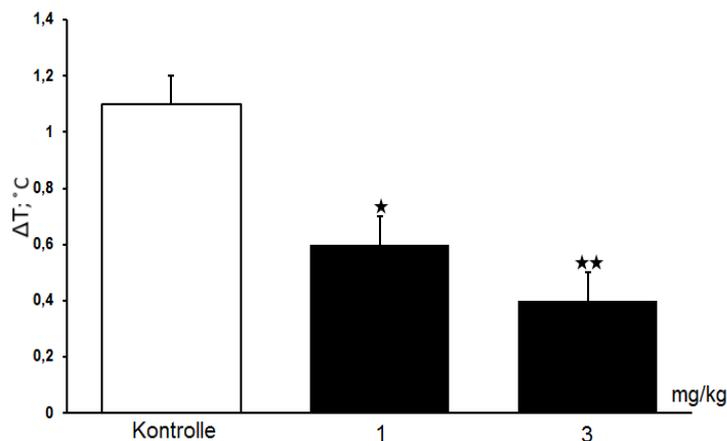


Abbildung 29: Effekt von CR-1 und einer Kontrolllösung auf SIH von C57BL/6/N Mäusen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Änderung der Körpertemperatur (°C; ΔT) \pm SEM bei den angegebenen Dosen. (★) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0,05$), (★★) statistisch signifikant ($p < 0,01$).

4.4.4 Effekt von CR-2 auf Stress-induzierte Hyperthermie:

Wie man in Abbildung 30 erkennen kann, wurde nach Gabe von 1 mg/kg und 3 mg/kg Körpergewicht CR-2 (CR-2 1 mg/kg $\Delta T = 0,6 \pm 0,1$ °C; n = 8; p < 0,01; CR-2 3 mg/kg $\Delta T = 0,3 \pm 0,1$ °C; n = 10; p < 0,01; schwarze Balken) bei den Mäusen eine signifikant geringere Stress-induzierte Hyperthermie als nach Applikation der Kontrolllösung gemessen ($\Delta T = 1,1 \pm 0,1$ °C; n = 19; weißer Balken). Nach Verabreichung von 3 mg/kg CR-2 war keine signifikante Stress-induzierte Hyperthermie erkennbar.

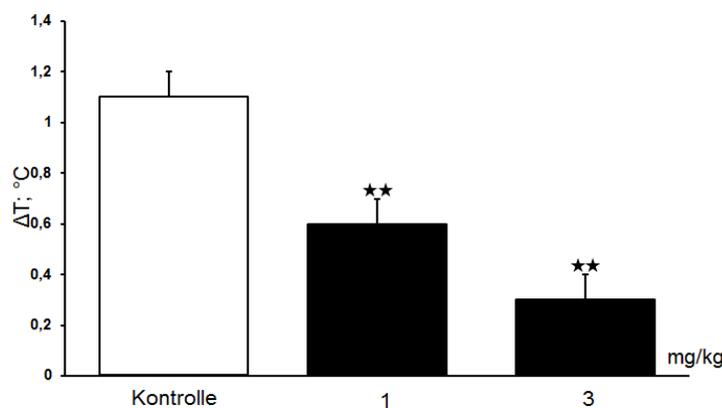


Abbildung 30: Effekt von CR-2 und einer Kontrolllösung auf SIH von C57BL/6/N Mäusen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Änderung der Körpertemperatur (°C; ΔT) \pm SEM bei den angegebenen Dosen. (***) bedeutet statistisch signifikant (p < 0,01).

4.4.5 Effekt von CR-3 auf Stress-induzierte Hyperthermie:

Wie in Abbildung 31 dargestellt, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Applikation von 1 mg/kg Körpergewicht CR-3 signifikant reduzierte SIH gemessen werden ($\Delta T = 0,5 \pm 0,1$ °C; n = 8; p < 0,05; schwarzer Balken), während nach Applikation von 3 mg/kg CR-3 keine signifikante SIH mehr beobachtet werden konnte ($\Delta T = 0,3 \pm 0,2$ °C; n = 8; p < 0,01; schwarzer Balken).

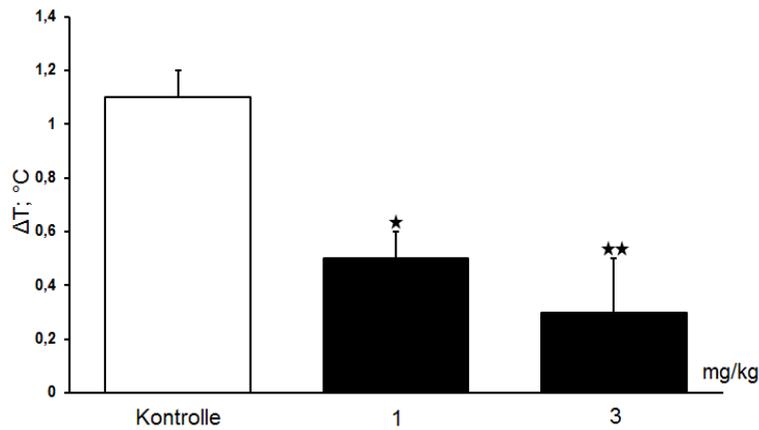


Abbildung 31: Effekt von CR-3 und einer Kontrolllösung auf SIH von C57BL/6/N Mäusen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Änderung der Körpertemperatur ($^{\circ}\text{C}$; ΔT) \pm SEM bei den angegebenen Dosen. (★) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0,05$), (★★) statistisch signifikant ($p < 0,01$).

4.4.6 Effekt von CR-4 auf Stress-induzierte Hyperthermie:

Abbildung 32 zeigt, dass Applikation der Substanz CR-4 ebenfalls einen signifikant geringeren Temperaturanstieg als in Kontrollmäusen (Kontrolle $\Delta T = 1,1 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; $n = 19$; weißer Balken; vs. CR-4 1 mg/kg $\Delta T = 0,6 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; $n = 12$; $p < 0,05$; CR-4 3 mg/kg $\Delta T = 0,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; $n = 13$; $p < 0,01$; schwarze Balken) induzierte.

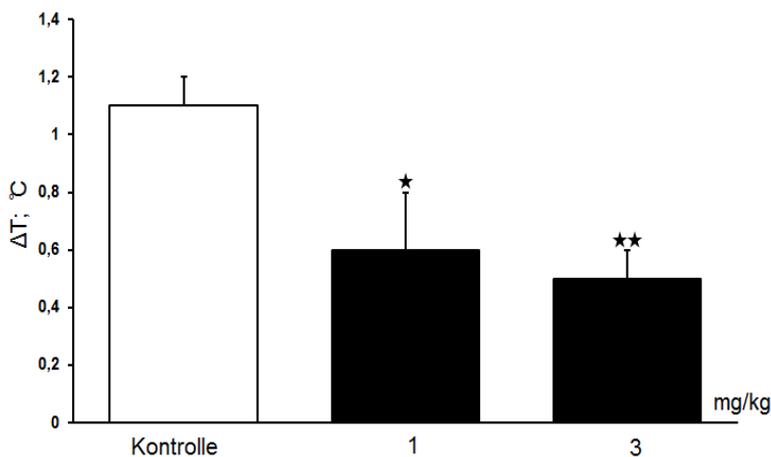


Abbildung 32 : Effekt von CR-4 und einer Kontrolllösung auf SIH von C57BL/6/N Mäusen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Änderung der Körpertemperatur ($^{\circ}\text{C}$; ΔT) \pm SEM bei den angegebenen Dosen. (★) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0,05$), (★★) statistisch signifikant ($p < 0,01$).

4.2 OF-Test:

4.2.1 Totalstrecke:

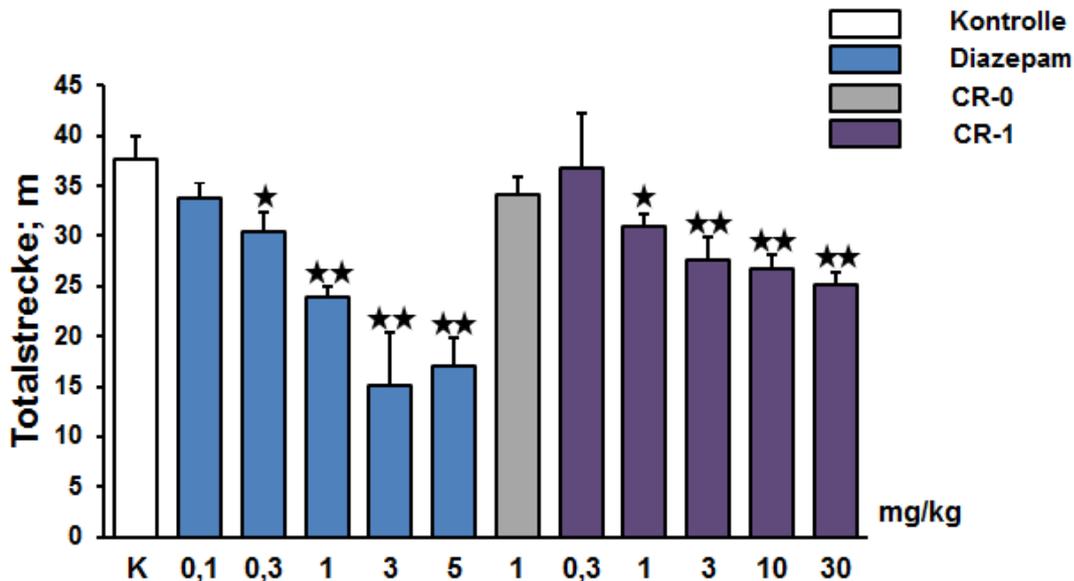


Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse im OF-Test nach Applikation von CR-0 und CR-1 in den angegebenen Dosierungen in Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe und Diazepam in den angegebenen Dosierungen. Die Balken zeigen die Gesamtlaufstrecke in m (MW \pm SEM). Bei (★) liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0,05$, bei (★★) liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0,01$ vom Kontrollwert vor.

Wie in Abbildung 33 dargestellt, legten mit Kochsalzlösung behandelte Kontrollmäuse eine Gesamtlaufstrecke von $37,6 \pm 2,3$ m; $n = 10$ im OF zurück. Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es ab einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht CR-1 zu einer statistisch signifikant reduzierten Totalstrecke ($31,0 \pm 1,2$ m; $n = 10$; $p < 0,05$). Dieser Effekt war dosisabhängig (3 mg/kg CR-1 ($27,7 \pm 2,2$ m; $n = 16$; $p < 0,01$); 10 mg/kg CR-1 ($26,7 \pm 1,5$ m; $n = 8$; $p < 0,01$)). Der Maximaleffekt wurde bei einer Dosis von 30 mg/kg erreicht ($25,2 \pm 1,1$ m; $n = 6$; $p < 0,01$). Kein Effekt auf die Gesamtlaufstrecke wurde bei 0,3 mg/kg CR-1 beobachtet ($36,8 \pm 5,4$ m; $n = 10$). Ebenfalls zeigte sich nach Gabe von 1 mg/kg CR-0 keine signifikante Auswirkung auf die Gesamtlaufstrecke ($34,1 \pm 1,8$ m; $n = 7$).

Die Gesamtlaufstrecke der Diazepamgruppe bei einer Dosis von 0,1 mg/kg unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($33,8 \pm 1,6$ m; $n = 8$). Ab einer Dosis von 0,3 mg/kg ($30,5 \pm 1,8$ m; $n = 14$; $p < 0,05$) kam es zu einer dosisabhängigen, signifikanten Reduktion der Laufstrecke (1 mg/kg DZP ($23,9 \pm 1,0$ m; $n = 11$; $p < 0,01$); 3mg/kg DZP ($15,1 \pm 5,3$ m; $n = 6$; $p < 0,01$)). Maximale Reduktion der Laufstrecke wurde bei einer Dosis von 5 mg/kg DZP ($17 \pm 2,8$ m; $n = 6$; $p < 0,01$) erreicht.

4.2.2 Rearings:

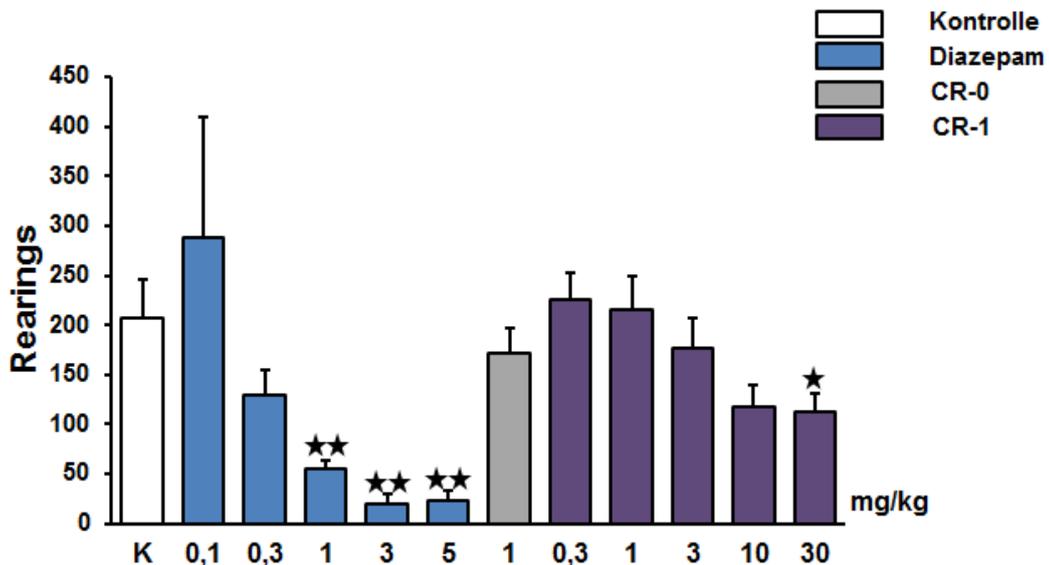


Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse im OF-Test nach Applikation von CR-0 und CR-1 in den angegebenen Dosierungen in Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe und Diazepam in den angegebenen Dosierungen. Die Balken geben die Anzahl der Rearings (vertikale Aktivität), die während des Tests gezählt wurden, an (MW ± SEM). Bei (★) liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0,05$, bei (★★) liegt eine signifikante

Abbildung 34 zeigt, dass es im Vergleich zur Kontrollgruppe ($206,5 \pm 38,9$; $n = 10$) erst bei einer Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht CR-1 zu einer signifikanten Reduktion der Rearings kam ($111,7 \pm 19,7$; $n = 6$; $p < 0,05$). Weder bei 1 mg/kg CR-0 ($170,9 \pm 25,2$; $n = 7$), noch bei 0,3 mg/kg CR-1 ($225,8 \pm 26,3$; $n = 10$), 1 mg/kg CR-1 ($215,6 \pm 32,9$; $n = 10$), 3 mg/kg CR-1 ($175,8 \pm 30,8$; $n = 16$) und 10 mg/kg CR-1 ($117,4 \pm 22,1$; $n = 8$) waren die Veränderungen statistisch signifikant.

Nach Gabe von 0,1 mg/kg ($287,5 \pm 121,9$; $n = 8$) und 0,3 mg/kg ($130,0 \pm 24,4$; $n = 14$) Diazepam waren ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zu sehen. Erst ab 1 mg/kg Diazepam ($54,1 \pm 8,6$; $n = 11$; $p < 0,01$; 3mg/kg DZP ($20,3 \pm 9,5$; $n = 6$; $p < 0,01$); 5 mg/kg DZP ($22,7 \pm 9,9$; $n = 6$; $p < 0,01$)) konnte eine signifikante Abnahme der vertikalen Aktivität gemessen werden.

4.2.3 Strecke im Zentrum:

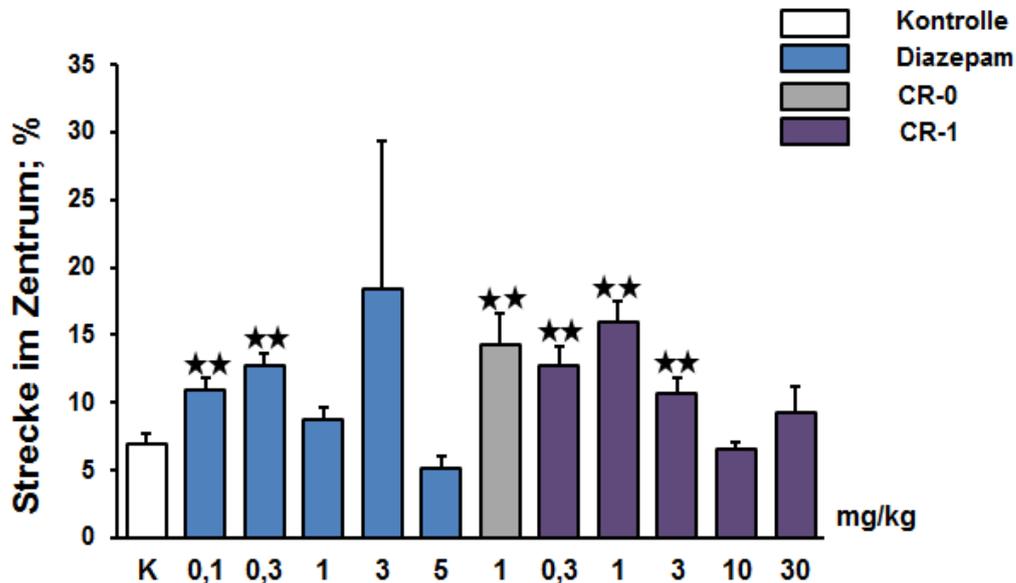


Abbildung 35: Darstellung der Ergebnisse im OF-Test nach Applikation von CR-0 und CR-1 in den angegebenen Dosierungen in Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe und Diazepam in den angegebenen Dosierungen. Die Balken zeigen die Strecke in %, die die Mäuse im Zentrum zurückgelegt haben (MW ± SEM). Bei (★★) liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0,01$ vom Kontrollwert vor.

Wie in Abbildung 35 dargestellt, legten die Mäuse der Kontrollgruppe eine Strecke von $7,0 \pm 0,7$ %; $n = 10$ im Zentrum des OF zurück. Sowohl Applikation von 1 mg/kg Körpergewicht CR-0 ($14,3 \pm 2,3$ %; $n = 7$; $p < 0,01$) also auch von 0,3 mg/kg ($12,7 \pm 1,5$ %; $n = 10$; $p < 0,01$), 1 mg/kg ($16,0 \pm 1,5$ %; $n = 10$; $p < 0,01$) und 3 mg/kg ($10,7 \pm 1,1$ %; $n = 16$; $p < 0,01$) CR-1 führte, verglichen mit der Kontrollgruppe, zu längeren Strecken im Zentrum des OF. Hingegen kam es nach Gabe von 10 mg/kg ($6,6 \pm 0,5$ %; $n = 8$) und 30 mg/kg ($9,3 \pm 1,9$ %; $n = 6$) CR-1 zu keinen signifikanten Unterschieden.

Nach Applikation von 0,1 mg/kg ($11,0 \pm 0,9$ %; $n = 8$; $p < 0,01$) und 0,3 mg/kg ($12,8 \pm 0,8$ %; $n = 14$; $p < 0,01$) Diazepam legten die Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant weitere Strecke im Zentrum zurück. Ab einer Dosis von 1 mg/kg Diazepam ($8,7 \pm 0,9$ %; $n = 11$; 3 mg/kg DZP ($18,4 \pm 10,9$ %; $n = 6$); 5 mg/kg DZP ($5,2 \pm 0,9$ %; $n = 6$)) wurden keine signifikanten Veränderungen gemessen.

4.2.4 Zeit im Zentrum:

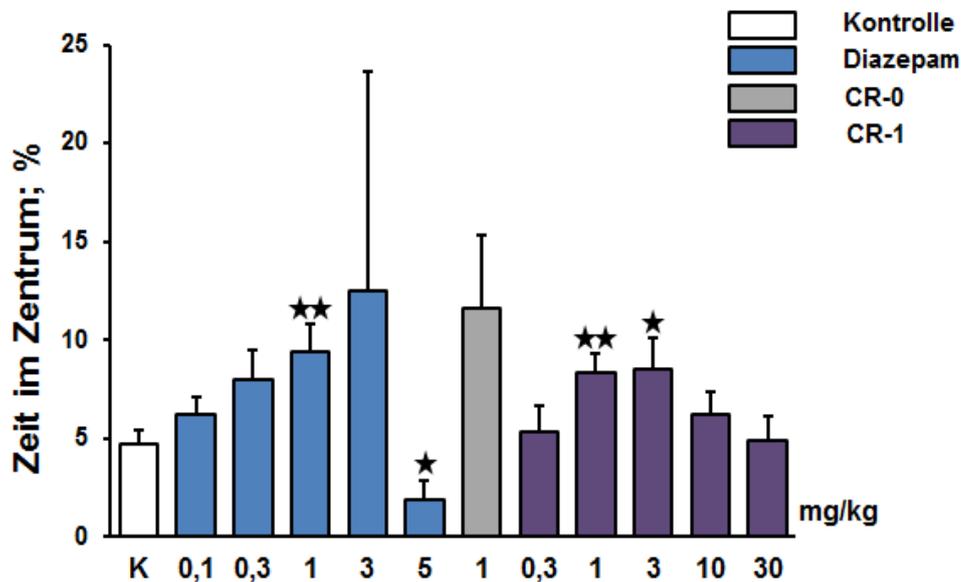


Abbildung 36: Darstellung der Ergebnisse im OF-Test nach Applikation von CR-0 und CR-1 in den angegebenen Dosierungen in Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe und Diazepam in den angegebenen Dosierungen. Die Balken repräsentieren die Zeit in %, welche die Mäuse im Zentrum verbracht haben (MW ± SEM). Bei (★) liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0,05$, bei (★★) liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0,01$ vom Kontrollwert vor.

Wie man in Abbildung 36 erkennen kann, führte die Substanz CR-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe ($4,7 \pm 0,7$ %; $n = 10$) nur in den Dosierungen 1 mg/kg ($8,3 \pm 0,9$ %; $n = 10$; $p < 0,01$) und 3 mg/kg Körpergewicht ($8,5 \pm 1,6$ %; $n = 16$; $p < 0,05$) zu einem signifikant verlängerten Aufenthalt der Mäuse im Zentrum. Die Applikation von 0,3 mg/kg ($5,3 \pm 1,4$ %; $n = 10$), 10 mg/kg ($6,2 \pm 1,2$ %; $n = 8$) und 30 mg/kg ($4,9 \pm 1,2$ %; $n = 6$) CR-1, als auch die Applikation von 1 mg/kg CR-0 ($11,6 \pm 3,7$ %; $n = 7$) resultierte in keinen signifikanten Veränderungen der Zeit im Zentrum.

In der Diazepamgruppe hielten sich jene Mäuse, denen 1 mg/kg Diazepam ($9,4 \pm 1,4$ %; $n = 11$; $p < 0,01$) injiziert wurde, signifikant am längsten im Zentrum auf, während jene Mäuse, denen 5 mg/kg Diazepam ($1,9 \pm 1,0$ %; $n = 6$; $p < 0,05$) verabreicht wurde, sich signifikant am kürzesten im Zentrum aufhielten. Nach Gabe von 0,1 mg/kg ($6,2 \pm 0,9$ %; $n = 8$), 0,3 mg/kg ($8,0 \pm 1,5$ %; $n = 14$) und 3 mg/kg ($12,5 \pm 11,1$ %; $n = 6$) Diazepam konnten keine signifikanten Veränderungen der Zeit im Zentrum beobachtet werden.

5. Diskussion:

GABA_A Rezeptoren, die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren im Gehirn, regulieren die Erregbarkeit des ZNS und sind daher unter anderem für die Kontrolle des Schlaf/Wachzustandes, des Muskeltonus oder auch Emotionen verantwortlich. Fehlsteuerungen des GABAergen Systems führen daher zu schweren Erkrankungen wie Angststörungen, Schlafstörungen, Schizophrenie oder Epilepsie (Möhler, 2006a). Modulatoren des GABA_A Rezeptors, vor allem Benzodiazepine, werden häufig aufgrund ihrer anxiolytischen, sedierend-hypnotischen und muskelrelaxierenden Wirkungen in der Therapie gegen diese ZNS-Erkrankungen eingesetzt (Möhler et al., 2002; Siegel und Steinmann, 2012). Aufgrund vieler Nebenwirkungen, die durch unselektive Interaktionen mit bestimmten Rezeptorsubtypen zustande kommen, ist der therapeutische Einsatz dieser Arzneistoffe eingeschränkt (Connolly und Wafford, 2004). In der pharmazeutischen Forschung wird daher die Entwicklung neuer Liganden, welche selektiv an GABA_A Rezeptor Subtypen angreifen und dadurch weniger Nebenwirkungen aufweisen sollen, angestrebt (Möhler et al., 2002).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde an Mäusen die Wirkung eines Subtyp-selektiven Ligands und ausgewählter Derivate auf Stress und Motoraktivität mit Hilfe des SIH- und OF-Tests gemessen. Die Effekte dieser Substanzen auf die Mäuse wurden mit den Effekten von Diazepam und einer Kochsalzlösung verglichen.

In Stresssituationen kommt es normalerweise zu einer Erhöhung der Körpertemperatur. Ein verminderter Anstieg der Körpertemperatur nach Stress ist ein Zeichen für Stressreduktion bzw. Entspannung. Anxiolytisch wirkende Substanzen, wie beispielsweise Diazepam, weisen stress-reduzierende Eigenschaften auf, die durch verminderte stress-induzierte Hyperthermie gekennzeichnet sind (Olivier et al., 2003). Wie erwartet, führte die Applikation von Diazepam im SIH-Experiment im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikant reduzierten stress-induzierten Hyperthermie. Auch der GABA_A Rezeptor Modulator CR-0 und seine Derivate CR-1, CR-2, CR-3 und CR-4 zeigten einen verminderten Temperaturanstieg. Daher lässt sich schließen, dass auch die untersuchten Substanzen stress-reduzierende Eigenschaften aufweisen. Der stärkste Effekt wurde dabei für CR-2 (1 mg/kg Körpergewicht) bzw. CR-3 (3 mg/kg Körpergewicht) gemessen. Im direkten Vergleich zu Diazepam war die Verringerung der stress-induzierten Hyperthermie durch die von mir untersuchten Substanzen etwas schwächer ausgeprägt.

Wie bereits erwähnt, können bei der Therapie mit GABA_A Rezeptor Modulatoren unerwünschte Nebenwirkungen auftreten (Connolly und Wafford, 2004). Beispielsweise kann es durch die Einnahme von Benzodiazepinen zu Sedierung kommen (Rudolph et al., 1999). Daher wurde der dosisabhängige Effekt eines ausgewählten Derivats (CR-1) mit dem Subtyp-selektiven Rezeptor Modulator selbst (CR-0), Diazepam und Kochsalzlösung im OF-

Test verglichen. Anhand der Messergebnisse der Totalstrecke und Rearings konnte auf die sedierenden Eigenschaften der untersuchten Substanzen geschlossen werden. Ab Dosierungen > 0,1 mg/kg führte Diazepam, wie erwartet, zu Sedierung, welche dosisabhängig über eine signifikante Reduktion der Totalstrecke und Rearings gemessen werden konnte. CR-0 zeigte ebenfalls sedierende Eigenschaften, die jedoch weniger stark als nach Gabe von Diazepam ausgeprägt waren. Auch nach Applikation von CR-1 konnte eine dosisabhängige Sedierung beobachtet werden, die ihr Maximum bei einer Dosis von 30 mg/kg erreichte. Jedoch war der sedierende Effekt von CR-1 weniger stark ausgeprägt als der sedierende Effekt von Diazepam.

Wie erwartet, führte Diazepam in Dosierungen bis 3 mg/kg aufgrund seiner ausgeprägten anxiolytischen Eigenschaften zu einer verlängerten Strecke bzw. Zeit im Zentrum. Bei einer Dosis von 5 mg/kg war dieser Effekt nicht mehr zu sehen, was möglicherweise auf die verminderte motorische Aktivität der Mäuse nach Applikation von Diazepam zurückzuführen ist. Nach der Gabe von CR-0 hielten sich die Mäuse vermehrt im Zentrum auf. Ebenfalls zeigte CR-1 in Dosierungen bis zu 3 mg/kg sowohl anhand der verlängerten Strecke im Zentrum, als auch anhand der verlängerten Zeit im Zentrum anxiolytische Eigenschaften. In höheren Dosierungen konnte keine Anxiolyse mehr festgestellt werden, was vermutlich durch die Verminderung der motorischen Aktivität zustande kam.

Zusammengefasst kann man sagen, dass in dieser Arbeit erstmals die stressreduzierenden Effekte von CR-0 und ausgewählter Derivate gezeigt wurden. Alle Derivate induzierten eine Reduktion von SIH. Der stärkste Effekt wurde dabei für CR-2 und CR-3 beobachtet und unterschied sich nicht signifikant von dem Effekt auf SIH durch Diazepam. Daneben konnte im OF auch die anxiolytische Wirkung von CR-1 gezeigt werden, wobei besonders auffällig war, dass die anxiolytische Potenz von CR-1 mit der von Diazepam vergleichbar war, aber im Gegensatz zu Diazepam kaum Sedierung gemessen wurde.

6. Quellenverzeichnis:

- Atack**, J.R., 2011. GABA_A receptor subtype-selective modulators. II. α_5 -selective inverse agonists for cognition enhancement. *Curr Top Med Chem* 11, 1203–1214.
- Bali**, M., Akabas, M.H., 2004. Defining the propofol binding site location on the GABA_A receptor. *Mol. Pharmacol.* 65, 68–76. doi:10.1124/mol.65.1.68
- Belelli**, D., Harrison, N.L., Maguire, J., Macdonald, R.L., Walker, M.C., Cope, D.W., 2009. Extrasynaptic GABA_A receptors: form, pharmacology, and function. *J. Neurosci.* 29, 12757–12763. doi:10.1523/JNEUROSCI.3340-09.2009
- Bellavite**, P., Magnani, P., Marzotto, M., Conforti, A., 2009. Assays of homeopathic remedies in rodent behavioural and psychopathological models. *Homeopathy* 98, 208–227. doi:10.1016/j.homp.2009.09.005
- Benke**, D., Zemoura, K., Maier, P.J., 2012. Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J Biol Chem* 3, 61–72. doi:10.4331/wjbc.v3.i4.61
- Bialer**, M., 2012. Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 887–895. doi:10.1016/j.addr.2011.11.006
- Blednov**, Y.A., Benavidez, J.M., Black, M., Leiter, C.R., Osterndorff-Kahane, E., Johnson, D., Borghese, C.M., Hanrahan, J.R., Johnston, G.A.R., Chebib, M., Harris, R.A., 2014. GABA_A receptors containing ρ_1 subunits contribute to in vivo effects of ethanol in mice. *PLoS ONE* 9, e85525. doi:10.1371/journal.pone.0085525
- Boileau**, A.J., Czajkowski, C., 1999. Identification of transduction elements for benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor: three residues are required for allosteric coupling. *J. Neurosci.* 19, 10213–10220.
- Boileau**, A.J., Evers, A.R., Davis, A.F., Czajkowski, C., 1999. Mapping the agonist binding site of the GABA_A receptor: evidence for a beta-strand. *J. Neurosci.* 19, 4847–4854.
- Boileau**, A.J., Newell, J.G., Czajkowski, C., 2002. GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J. Biol. Chem.* 277, 2931–2937. doi:10.1074/jbc.M109334200
- Brodie**, M.J., 2010. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 19, 650–655. doi:10.1016/j.seizure.2010.10.027
- Campagna-Slater**, V., Weaver, D.F., 2007. Anaesthetic binding sites for etomidate and propofol on a GABA_A receptor model. *Neurosci. Lett.* 418, 28–33. doi:10.1016/j.neulet.2007.02.091
- Carver**, C.M., Reddy, D.S., 2013. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology (Berl.)* 230, 151–188. doi:10.1007/s00213-013-3276-5
- Cederholm**, J.M.E., Schofield, P.R., Lewis, T.M., 2009. Gating mechanisms in Cys-loop receptors. *Eur. Biophys. J.* 39, 37–49. doi:10.1007/s00249-009-0452-y

- Chalifoux**, J.R., Carter, A.G., 2011. GABA_B receptor modulation of synaptic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 339–344. doi:10.1016/j.conb.2011.02.004
- Chateauvieux**, S., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M., 2010. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. doi:10.1155/2010/479364
- Connolly**, C.N., Wafford, K.A., 2004. The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 529–534. doi:10.1042/BST0320529
- Cui**, W.-Y., Seneviratne, C., Gu, J., Li, M.D., 2012. Genetics of GABAergic signaling in nicotine and alcohol dependence. *Hum. Genet.* 131, 843–855. doi:10.1007/s00439-011-1108-4
- Fatemi**, S.H., Folsom, T.D., Rooney, R.J., Thuras, P.D., 2013. Expression of GABA_A α_2 -, β_1 - and ϵ -receptors are altered significantly in the lateral cerebellum of subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder. *Transl Psychiatry* 3, e303. doi:10.1038/tp.2013.64
- Forman**, S.A., 2011. Clinical and molecular pharmacology of etomidate. *Anesthesiology* 114, 695–707. doi:10.1097/ALN.0b013e3181ff72b5
- Forman**, S.A., Miller, K.W., 2011. Anesthetic sites and allosteric mechanisms of action on Cys-loop ligand-gated ion channels. *Can J Anaesth* 58, 191–205. doi:10.1007/s12630-010-9419-9
- Franks**, N.P., 2006. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S72–81. doi:10.1038/sj.bjp.0706441
- Froestl**, W., 2011. An historical perspective on GABAergic drugs. *Future Med Chem* 3, 163–175. doi:10.4155/fmc.10.285
- Gonzalez**, C., Moss, S.J., Olsen, R.W., 2012. Ethanol promotes clathrin adaptor-mediated endocytosis via the intracellular domain of δ -containing GABA_A receptors. *J. Neurosci.* 32, 17874–17881. doi:10.1523/JNEUROSCI.2535-12.2012
- Hanson**, S.M., Czajkowski, C., 2008. Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. *J. Neurosci.* 28, 3490–3499. doi:10.1523/JNEUROSCI.5727-07.2008
- Herd**, M.B., Belelli, D., Lambert, J.J., 2007. Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacol. Ther.* 116, 20–34. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.007
- Hevers**, W., Hadley, S.H., Lüddens, H., Amin, J., 2008. Ketamine, but not phencyclidine, selectively modulates cerebellar GABA(A) receptors containing alpha6 and delta subunits. *J. Neurosci.* 28, 5383–5393. doi:10.1523/JNEUROSCI.5443-07.2008
- Hevers**, W., Lüddens, H., 1998. The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* 18, 35–86. doi:10.1007/BF02741459
- Hines**, R.M., Davies, P.A., Moss, S.J., Maguire, J., 2012. Functional regulation of GABA_A receptors in nervous system pathologies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 552–558. doi:10.1016/j.conb.2011.10.007

- Hosie**, A.M., Wilkins, M.E., Smart, T.G., 2007. Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol. Ther.* 116, 7–19. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.011
- Hou**, Y., Wang, L., Ding, B., Liu, Y., Zhu, H., Liu, J., Li, Y., Kang, P., Yin, Y., Wu, G., 2011. Alpha-Ketoglutarate and intestinal function. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 1186–1196.
- Ito**, Y., Banno, R., Shibata, M., Adachi, K., Hagimoto, S., Hagiwara, D., Ozawa, Y., Goto, M., Suga, H., Sugimura, Y., Bettler, B., Oiso, Y., Arima, H., 2013. GABA type B receptor signaling in proopiomelanocortin neurons protects against obesity, insulin resistance, and hypothalamic inflammation in male mice on a high-fat diet. *J. Neurosci.* 33, 17166–17173. doi:10.1523/JNEUROSCI.0897-13.2013
- Jacob**, T.C., Moss, S.J., Jurd, R., 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 331–343. doi:10.1038/nrn2370
- Kang**, J.-Q., Macdonald, R.L., 2009. Making sense of nonsense GABA(A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends Mol Med* 15, 430–438. doi:10.1016/j.molmed.2009.07.003
- Karl**, T., Pabst, R., von Hörsten, S., 2003. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55, 69–83. doi:10.1078/0940-2993-00301
- Keramidas**, A., Kash, T.L., Harrison, N.L., 2006. The pre-M1 segment of the alpha1 subunit is a transduction element in the activation of the GABA_A receptor. *J. Physiol. (Lond.)* 575, 11–22. doi:10.1113/jphysiol.2005.102756
- Khom**, S., Strommer, B., Ramharter, J., Schwarz, T., Schwarzer, C., Erker, T., Ecker, G.F., Mulzer, J., Hering, S., 2010. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABA_A receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *Br. J. Pharmacol.* 161, 65–78. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00865.x
- Kloda**, J.H., Czajkowski, C., 2007. Agonist-, antagonist-, and benzodiazepine-induced structural changes in the alpha1 Met113-Leu132 region of the GABA_A receptor. *Mol. Pharmacol.* 71, 483–493. doi:10.1124/mol.106.028662
- Korpi**, E.R., Gründer, G., Lüddens, H., 2002. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog. Neurobiol.* 67, 113–159.
- Korpi**, E.R., Lüddens, H., 1997. Furosemide interactions with brain GABA_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* 120, 741–748. doi:10.1038/sj.bjp.0700922
- Koseki**, T., Nabeshima, T., 2010. [Phencyclidine abuse, dependence, intoxication, and psychosis]. *Nippon Rinsho* 68, 1511–1515.
- Kotani**, N., Akaike, N., 2013. The effects of volatile anesthetics on synaptic and extrasynaptic GABA-induced neurotransmission. *Brain Res. Bull.* 93, 69–79. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.08.001
- Lee**, V., Maguire, J., 2014. The impact of tonic GABA_A receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front Neural Circuits* 8, 3. doi:10.3389/fncir.2014.00003
- Lobo**, I.A., Harris, R.A., 2008. GABA(A) receptors and alcohol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 90–94. doi:10.1016/j.pbb.2008.03.006

- Löscher, W., Rogawski, M.A., 2012.** How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia* 53 Suppl 8, 12–25. doi:10.1111/epi.12025
- Macdonald, R.L., Kang, J.-Q., Gallagher, M.J., 2010.** Mutations in GABA_A receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 1861–1869. doi:10.1113/jphysiol.2010.186999
- Mathers, D.A., Wan, X., Puil, E., 2007.** Barbiturate activation and modulation of GABA(A) receptors in neocortex. *Neuropharmacology* 52, 1160–1168. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.12.004
- Miller, P.S., Smart, T.G., 2010.** Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 161–174. doi:10.1016/j.tips.2009.12.005
- Möhler, H., 2006.** GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* 326, 505–516. doi:10.1007/s00441-006-0284-3
- Möhler (a), H., 2006.** GABA_A receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 26, 731–740. doi:10.1080/10799890600920035
- Möhler, H., 2011.** The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology* 60, 1042–1049. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.10.020
- Möhler, H., 2012.** The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62, 42–53. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.040
- Möhler, H., Fritschy, J.M., Rudolph, U., 2002.** A new benzodiazepine pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 2–8.
- Newell, J.G., Czajkowski, C., 2003.** The GABA_A receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *J. Biol. Chem.* 278, 13166–13172. doi:10.1074/jbc.M211905200
- Ogawa, S.K., Tanaka, E., Shin, M.C., Kotani, N., Akaike, N., 2011.** Volatile anesthetic effects on isolated GABA synapses and extrasynaptic receptors. *Neuropharmacology* 60, 701–710. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.11.016
- Olivier, B., Zethof, T., Pattij, T., van Boogaert, M., van Oorschot, R., Leahy, C., Oosting, R., Bouwknicht, A., Veening, J., van der Gugten, J., Groenink, L., 2003.** Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 117–132.
- Olsen, R.W., Sieghart, W., 2009.** GABA_A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141–148. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.045
- Olsen, R.W., Tobin, A.J., 1990.** Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* 4, 1469–1480.
- Owens, D.F., Kriegstein, A.R., 2002.** Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 715–727. doi:10.1038/nrn919
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G., 2000.** GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815–850.

- Reynolds**, D.S., Rosahl, T.W., Cirone, J., O'Meara, G.F., Haythornthwaite, A., Newman, R.J., Myers, J., Sur, C., Howell, O., Rutter, A.R., Atack, J., Macaulay, A.J., Hadingham, K.L., Hutson, P.H., Belelli, D., Lambert, J.J., Dawson, G.R., McKernan, R., Whiting, P.J., Wafford, K.A., 2003. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. *J. Neurosci.* 23, 8608–8617.
- Rudolph**, U., Crestani, F., Benke, D., Brünig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Martin, J.R., Bluethmann, H., Möhler, H., 1999. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 401, 796–800. doi:10.1038/44579
- Rudolph**, U., Crestani, F., Möhler, H., 2001. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 188–194.
- Rudolph**, U., Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10, 685–697. doi:10.1038/nrd3502
- Rudolph**, U., Möhler, H., 2006. GABA-based therapeutic approaches: GABA_A receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 6, 18–23. doi:10.1016/j.coph.2005.10.003
- Sancar**, F., Czajkowski, C., 2011. Allosteric modulators induce distinct movements at the GABA-binding site interface of the GABA-A receptor. *Neuropharmacology* 60, 520–528. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.11.009
- Sieghart**, W., Ramerstorfer, J., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., Ernst, M., 2012. A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha(+)$ $\beta(-)$ interface. *Br. J. Pharmacol.* 166, 476–485. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01779.x
- Sigel**, E., Steinmann, M.E., 2012. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 40224–40231. doi:10.1074/jbc.R112.386664
- Son**, Y., 2010. Molecular mechanisms of general anesthesia. *Korean J Anesthesiol* 59, 3–8. doi:10.4097/kjae.2010.59.1.3
- Stephen**, L.J., Brodie, M.J., 2011. Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents. *CNS Drugs* 25, 89–107. doi:10.2165/11584860-000000000-00000
- Striano**, P., Striano, S., 2008. Gabapentin: a Ca²⁺ channel alpha 2-delta ligand far beyond epilepsy therapy. *Drugs Today* 44, 353–368. doi:10.1358/dot.2008.44.5.1186403
- Teissère**, J.A., Czajkowski, C., 2001. A (beta)-strand in the (gamma)₂ subunit lines the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor: structural rearrangements detected during channel gating. *J. Neurosci.* 21, 4977–4986.
- Terbach**, N., Williams, R.S.B., 2009. Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1126–1132. doi:10.1042/BST0371126
- Thomet**, U., Baur, R., Dodd, R.H., Sigel, E., 2000. Loreclezole as a simple functional marker for homomeric rho type GABA(C) receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 408, R1–2.
- Thompson**, S.A., Arden, S.A., Marshall, G., Wingrove, P.B., Whiting, P.J., Wafford, K.A., 1999. Residues in transmembrane domains I and II determine gamma-aminobutyric acid type AA receptor subtype-selective antagonism by furosemide. *Mol. Pharmacol.* 55, 993–999.

- Tobler, I., Kopp, C., Deboer, T., Rudolph, U., 2001.** Diazepam-induced changes in sleep: role of the alpha 1 GABA(A) receptor subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6464–6469. doi:10.1073/pnas.111055398
- Treiman, D.M., 2001.** GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3, 8–12.
- Ulrich, D., Bettler, B., 2007.** GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 298–303. doi:10.1016/j.conb.2007.04.001
- Uusi-Oukari, M., Korpi, E.R., 2010.** Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol. Rev.* 62, 97–135. doi:10.1124/pr.109.002063
- Volk, D.W., Lewis, D.A., 2002.** Impaired prefrontal inhibition in schizophrenia: relevance for cognitive dysfunction. *Physiol. Behav.* 77, 501–505.
- Wagner, D.A., Czajkowski, C., 2001.** Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J. Neurosci.* 21, 67–74.
- Wall, M.J., 2002.** Furosemide reveals heterogeneous GABA(A) receptor expression at adult rat Golgi cell to granule cell synapses. *Neuropharmacology* 43, 737–749.
- Weiss, S.K., Garbutt, A., 2010.** Pharmacotherapy in pediatric sleep disorders. *Adolesc Med State Art Rev* 21, 508–521, ix–x.
- Whissell, P.D., Eng, D., Lecker, I., Martin, L.J., Wang, D.-S., Orser, B.A., 2013.** Acutely increasing δ GABA(A) receptor activity impairs memory and inhibits synaptic plasticity in the hippocampus. *Front Neural Circuits* 7, 146. doi:10.3389/fncir.2013.00146
- Whiting, P.J., 2003.** GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today* 8, 445–450.
- Yanovsky, Y., Schubring, S., Fleischer, W., Gisselmann, G., Zhu, X.-R., Lübbert, H., Hatt, H., Rudolph, U., Haas, H.L., Sergeeva, O.A., 2012.** GABA_A receptors involved in sleep and anaesthesia: β_1 - versus β_3 -containing assemblies. *Pflügers Arch.* 463, 187–199. doi:10.1007/s00424-011-0988-4

7. Lebenslauf:

Persönliche Daten

Name Claudia Reisinger

Adresse Kapuzinerstr. 10
2020 Hollabrunn

geboren am 24. Jänner 1990 in Wien

Bildung

2008-2014 Studium Pharmazie an der Universität Wien

2000-2008 Bundesgymnasium Hollabrunn mit Matura

1996-2000 Volksschule Hollabrunn

Berufserfahrung

seit 2012 Ferialpraxis und Aushilfe in der Alten Feldapotheke Wien

07/2010 Ferialpraxis in der Löwen Apotheke Stockerau

08/2008 Ferialpraxis ÖBV Wien, allgemeine Bürotätigkeiten