



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Analyse der Subtyp-selektiven Modulation von GABA_A-
Rezeptoren durch JW-1 mit anschließender
Untersuchung möglicher Effekte auf das explorative und
Angst-bezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen“

verfasst von

Johanna Wiesinger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Univ. Prof. Dr. sc. med. Steffen Hering

Danksagung

Ich möchte mich zu Beginn herzlich bei Herrn Univ. Prof. Dr. sc. med. Steffen Hering für die Bereitstellung meines Diplomarbeitsplatzes und die ermöglichte Einsicht in einen Teilbereich der pharmakologischen Forschung bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Mag. Dr. Sophia Khom, die mich mit ihrer fachlichen Kompetenz, Hilfsbereitschaft und engagierten Betreuung bei Fragen und Problemen unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Mag. Denise Luger und Frau Mag. Angela Schöffmann, die mich im Department so nett empfangen haben und mich mit meiner *in vitro* Arbeit vertraut machten.

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mich während meiner Studienzeit immer unterstützt haben. Ohne sie wäre ein schnelles Studium kaum möglich gewesen.

Zuletzt gebührt mein Dank meinen Kommilitonen, die mich durch meine Studienzeit begleitet haben, stellvertretend bedanke ich mich bei Frau Mag. Sarah Danner und Verena Hiebl. Mit Sarah habe ich fast meine gesamte Studienzeit an der Universität verbracht, sie hat mich stets motiviert. Verena hat mich während der praktischen Arbeit meiner Diplomarbeit begleitet und mir bei technischen Problemen geholfen.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Die GABAerge Transmission.....</i>	<i>- 1 -</i>
1.1	<i>γ-Aminobuttersäure</i>	<i>- 1 -</i>
1.1.1	Metabolismus.....	- 1 -
1.1.2	GABA-aktivierte Rezeptoren	- 2 -
1.2	<i>GABA_A-Rezeptoren</i>	<i>- 2 -</i>
1.2.1	Die Pentamer ligandengesteuerte Cys-Loop Superfamilie.....	- 2 -
1.2.2	Vorkommen.....	- 3 -
1.2.3	Aufbau	- 4 -
1.2.4	Rezeptoruntereinheiten.....	- 4 -
1.2.5	Splice-Varianten der Untereinheiten	- 7 -
1.2.6	Öffnung des Kanals.....	- 7 -
1.2.7	Funktion	- 8 -
1.2.8	Funktion GABAerger Neuronen	- 10 -
1.3	<i>„GABA_C-Rezeptoren“</i>	<i>- 12 -</i>
1.4	<i>GABA_B-Rezeptoren</i>	<i>- 12 -</i>
1.4.1	Inhibitorische Wirkung	- 12 -
1.4.2	Liganden	- 13 -
2	<i>GABA-Rezeptor assoziierte Erkrankungen</i>	<i>- 14 -</i>
2.1	<i>Angststörungen</i>	<i>- 14 -</i>
2.1.1	Angstzustände.....	- 14 -
2.1.2	Depressionen	- 14 -
2.2	<i>Schlafstörungen</i>	<i>- 15 -</i>
2.2.1	Pathophysiologie.....	- 15 -
2.2.2	Pathogenese.....	- 16 -
2.2.3	Therapie	- 18 -
2.3	<i>Epilepsie.....</i>	<i>- 18 -</i>
2.3.1	Pathophysiologie.....	- 19 -
2.3.2	Mutationen am GABA _A -Rezeptor	- 19 -
2.3.3	Klassifikation	- 21 -
2.3.4	Therapie	- 22 -
2.4	<i>Schizophrenie.....</i>	<i>- 22 -</i>
2.5	<i>Down Syndrom</i>	<i>- 25 -</i>
3	<i>Liganden am GABA_A-Rezeptor</i>	<i>- 26 -</i>
3.1	<i>Agonisten.....</i>	<i>- 26 -</i>
3.1.1	Muscimol.....	- 26 -
3.2	<i>Antagonisten.....</i>	<i>- 26 -</i>
3.2.1	Bicucullin	- 26 -
3.2.2	Picrotoxin	- 27 -
4	<i>Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren.....</i>	<i>- 28 -</i>

4.1	Benzodiazepine (BDZ)	- 28 -
4.1.1	Pharmakokinetik	- 28 -
4.1.2	Bindungsstelle	- 28 -
4.1.3	Anwendung	- 30 -
4.1.4	Toleranzentwicklung	- 30 -
4.1.5	Abhängigkeit	- 31 -
4.1.6	Antagonisten	- 31 -
4.2	Barbiturate	- 31 -
4.3	Ethanol	- 32 -
4.4	Anästhetika	- 34 -
4.4.1	Etomidat	- 34 -
4.4.2	Propofol	- 36 -
4.5	Neurosteroide	- 36 -
4.5.1	Interaktionen mit dem GABA _A -Rezeptor	- 37 -
4.6	β-Laktam Antibiotika	- 39 -
4.6.1	Penicillin	- 39 -
5	Materialien und Methoden	- 40 -
5.1	In vitro Untersuchungen	- 40 -
5.1.1	Präparation der Oozyten	- 40 -
5.1.2	Herstellung der cRNA	- 42 -
5.1.3	Injektion der cRNA	- 42 -
5.1.4	Messlösungen	- 43 -
5.1.5	Perfusions-System	- 43 -
5.1.1	2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik	- 43 -
5.2	In vivo Untersuchungen	- 45 -
5.2.1	Auswahlkriterien und Pflege der Versuchstiere	- 45 -
5.2.2	Verhaltenspsychologie von Mäusen	- 46 -
5.2.3	Elevated-Plus-Maze(EPM)-Test	- 46 -
5.2.4	Open-Field(OF)-Test	- 48 -
5.2.5	Statistische Auswertung der Versuche	- 49 -
6	Aufgabenstellung	- 50 -
7	Ergebnisse	- 51 -
7.1	In vitro Resultate	- 51 -
7.1.1	Erstellung von Konzentrationswirkungskurven (KWK) für GABA an verschiedenen Rezeptorsubtypen	- 51 -
7.1.2	Untersuchung der β-Untereinheiten-abhängigen Modulation von I _{GABA} (α ₁ β ₁ γ _{2S} ⁻ , α ₁ β ₂ γ _{2S} ⁻ , α ₁ β ₃ γ _{2S}) durch JW-1	- 55 -
7.1.3	Untersuchung der α-Untereinheiten abhängigen Modulation von I _{GABA} (α ₂ β ₁ γ _{2S} ⁻ , α ₃ β ₁ γ _{2S} ⁻ und α ₅ β ₁ γ _{2S} ⁻ -Rezeptoren) durch JW-1	- 57 -
7.1.4	Untersuchung der Abhängigkeit der I _{GABA} -Modulation von der Anwesenheit einer γ-Untereinheit ..	- 59 -
7.2	In vivo Resultate	- 60 -
7.2.1	EPM-Test	- 60 -
7.2.2	OF-Test	- 62 -

8	<i>Diskussion</i>	- 65 -
9	<i>Zusammenfassung</i>	- 68 -
10	<i>Abstract</i>	- 69 -
11	<i>Literaturverzeichnis</i>	- 70 -
	11. 1. <i>Zusätzliche Abbildungsquellen</i>	- 78 -
12	<i>Lebenslauf</i>	- 79 -

1 Die GABAerge Transmission

1.1 γ -Aminobuttersäure

Die γ -Aminobuttersäure (GABA) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure. Sie ist in der Natur weit verbreitet und der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Säugetiere (Seo et al., 2013).

1.1.1 Metabolismus

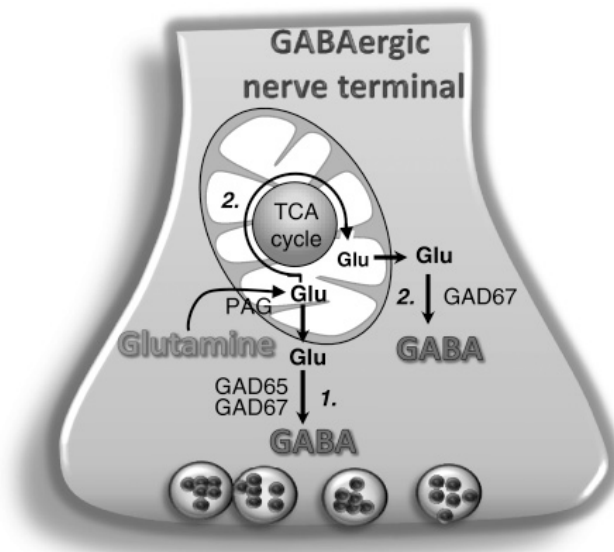


Abbildung 1: Präsynaptische GABA-Synthese
(Walls et al., 2011)

GABA wird im Körper primär über irreversible α -Decarboxylierung der Glutaminsäure erzeugt. Diese Reaktion wird von der α -Decarboxylase (GAD) katalysiert (Seo et al., 2013). Es gibt zwei Isoformen der GAD, die sich im Molekulargewicht unterscheiden. Während die GAD₆₇ vor allem im Cytoplasma zu finden ist, kommt in Nähe des synaptischen Spalts vermehrt GAD₆₅ vor (Benes et al., 2000). Durch die Phosphat-aktivierte Glutaminase (PAG)

wird die Aminosäure Glutamin zu Glutamat metabolisiert, das durch die GAD₆₇ in GABA umgewandelt werden kann. GAD₆₇ sowie GAD₆₅ können Glutamin auch direkt in GABA umwandeln (Walls et al., 2011).

GAD₆₇ ist mehr für die Synthese von GABA verantwortlich, GAD₆₅ befindet sich vermehrt am präsynaptischen Ende (Benes et al., 2000).

Nach der Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt wird der Neurotransmitter präsynaptisch wieder aufgenommen (Macdonald und Olsen, 1994). Der Abbau erfolgt über Transaminasen in den Mitochondrien (Macdonald und Olsen, 1994; Cao et al., 2013). GABA wird zu Succinat-Semialdehyd umgesetzt, der weiter über die Succinat-Semialdehyd-Decarboxylase zu Succinat gespalten wird (Cao et al., 2013).

1.1.2 GABA-aktivierte Rezeptoren

GABA bindet an zwei verschiedene Rezeptortypen: an ligandengesteuerte GABA_A-Rezeptoren (GABA_A-Rs.) und an metabotrope GABA_B-Rezeptoren (GABA_B-Rs.) (Macdonald und Olsen, 1994).

1.2 GABA_A-Rezeptoren

1.2.1 Die pentamere ligandengesteuerte Cys-Loop Superfamilie

GABA_A-Rezeptoren zählen zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen. Sie werden aus fünf proteinogenen Untereinheiten gebildet. Jede Untereinheit besitzt eine N-terminale, extrazelluläre, hydrophile Region, gefolgt von vier transmembranären α -Helices (M1-M4). Somit bilden sich zwei intrazelluläre Schleifen (Loops), und eine extrazelluläre Schleife. Das Protein endet mit einer relativ kurzen, extrazellulären C-terminalen Domäne (Olsen und Sieghart, 2009). Zwei Cysteine (Cys) im extrazellulären Loop bilden eine charakteristische Disulfidbrücke (Vogel et al., 2009). Somit zählen GABA_A-Rezeptoren zur Cys-Loop pentameren ligandengesteuerten Ionenkanal Superfamilie. Zudem umfasst diese Gruppe nikotinerge Acetylcholin-, Glycin-, Serotonin₃-Rezeptoren und Zink-aktivierte Ionenkanäle. Zu den Cys-Loop Ionenkanälen gehören außerdem die tetramere Glutamat- und die trimeren Purin-Rezeptoren (Olsen und Sieghart, 2009). Nikotinerge Acetylcholin-, Serotonin₃-Rezeptoren und Zink-aktivierte Ionenkanäle sind kationen-selektiv, während Glycin- und GABA_A-Rezeptoren anionen-selektiv sind (Keramidas et al., 2004).

Gemeinsamkeiten innerhalb der pentameren ligandengesteuerten Cys-Loop Superfamilie:

Die Aminosäureabfolgen der Untereinheiten innerhalb der Cys-Loop Superfamilie sind zu 30 % identisch. Die fünf membrandurchspannenden Domänen bilden den Ionen-Kanal-Rezeptor-Komplex. Die M2 Domänen der 5 Untereinheiten formen, vermutlich unter Beteiligung von M1, die Kanalpore. M2 ist zusätzlich an der Ionenselektivität beteiligt (Keramidas et al., 2004). Der GABA_A-Rezeptor ist beispielsweise ein selektiver Chloridionenkanal. Die Ligandenbindungsstellen innerhalb der Familie befinden sich zwischen den beiden Untereinheiten α und β (Smith und Olsen, 1995).

1.2.2 Vorkommen

GABA_A-Rezeptoren sind ubiquitär im ZNS von Säugetieren exprimiert (Olsen und Sieghart, 2009). Sie sind in unterschiedlicher Dichte in Neuronen des Gehirns vorhanden und befinden sich an der postsynaptischen Membran, werden aber auch extra- und perisynaptisch exprimiert (Lüscher und Keller, 2004).

In wirbellosen Tieren findet man GABA_A-Rezeptoren unter anderem auch in Muskelzellen. In Wirbeltieren sind GABA_A-Rezeptoren außerhalb des neuronalen Gewebes, wie zum Beispiel im Pankreas, vorhanden. Allerdings ist ihre dortige Funktion noch nicht bekannt (Olsen und Sieghart, 2009).

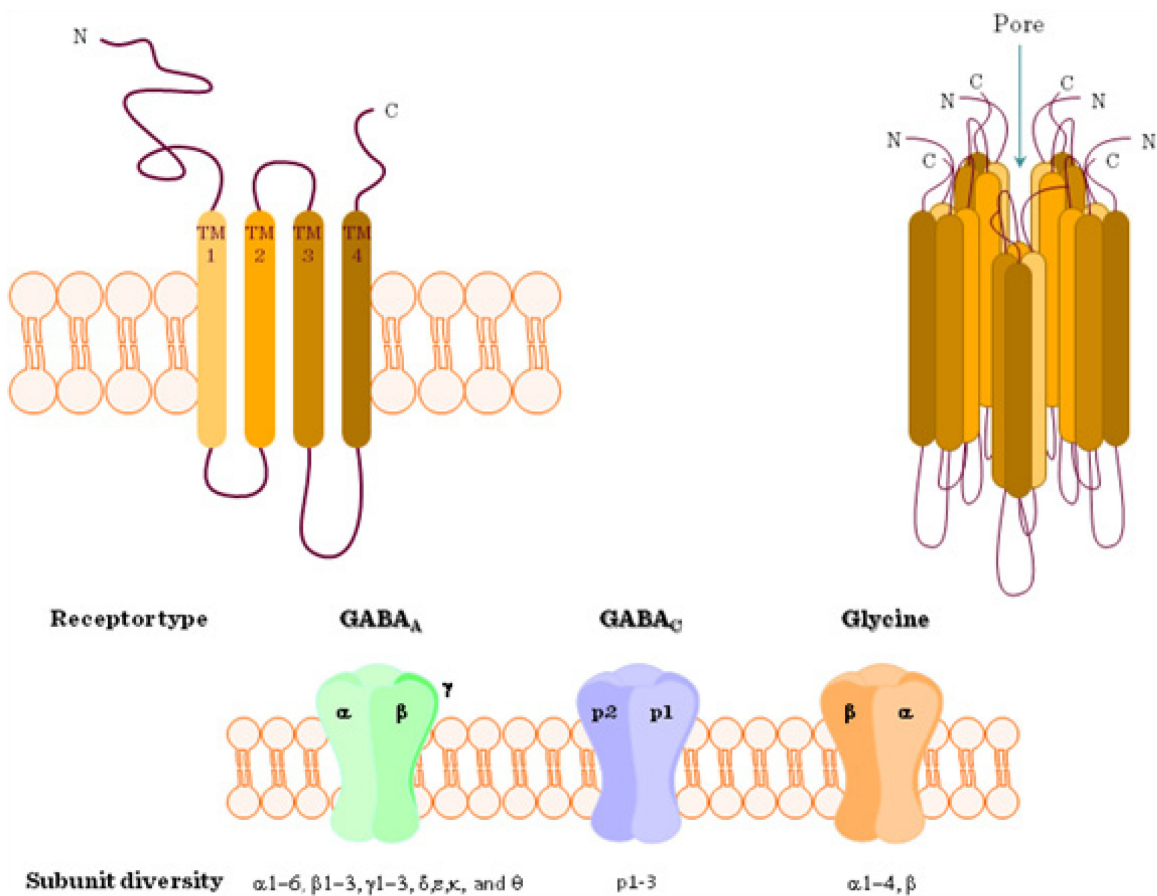


Abbildung 2: Schematischer Aufbau pentamerer Rezeptoren der Cys-Loop-Superfamilie

(http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book/ch02s02.html, 12.8.13)

1.2.3 Aufbau

Den größten intrazellulären Anteil des Rezeptors bildet die Schleife zwischen M3 und M4. Dieser Abschnitt besitzt verschiedene Interaktionsseiten, zum Beispiel für die Phosphorylierung durch Serin/Threonin- bzw. Tyrosin-Kinasen.

Der C-Terminus befindet sich im Extrazellulärraum und steht in keiner Interaktion mit der Membran (Lüscher und Keller, 2004).

19 Gene sind bekannt, die für 19 verschiedene Untereinheiten des Ionenkanals kodieren. Diese umfassen α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π und ρ_{1-3} . In Vögeln existieren auch β_4 - und γ_4 -, aber keine θ - und ϵ -Untereinheiten. Allerdings ähneln sich β und θ , und γ und ϵ stark (Olsen und Sieghart, 2009).

1.2.4 Rezeptoruntereinheiten

Die meisten GABA_A-Rezeptor Subtypen werden aus zwei α -, zwei β -, und einer γ -, δ -, oder ϵ -Untereinheit gebildet. Da es 19 verschiedene Untereinheiten (UE) gibt, wären bei einem pentameren Aufbau tausende Kombinationen möglich. Allerdings geht man von deutlich weniger, *in vivo* vorkommenden Rezeptorsubtypen aus (Olsen und Sieghart, 2009). Erst elf GABA_A-Rezeptor Subtypen konnten in Neuronen identifiziert werden. Sie sind in Tabelle 1 aufgelistet (Rudolph und Knoflach, 2011).

Rezeptorsubtyp	$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	$\alpha_3\beta_n\delta$	$\alpha_4\beta_n\delta$	$\alpha_5\beta_2\gamma_2$	$\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2$
Ungefähre Häufigkeit	61 %	15-20 %	5 %	5 %	> 5 %	> 5 %

Tabelle 1: Native GABA_A-Rezeptorsubtypen mit ihrer prozentuellen Häufigkeit im ZNS, bezogen auf die Gesamtheit der GABA_A-Rezeptoren (Rudolph und Knoflach, 2011).

In Studien mit rekombinanten GABA_A-Rezeptoren wurde schon früh erkannt, dass besonders stabile, durch GABA aktivierbare Kanäle aus α und β , oder 2 α , 2 β und einer anderen Untereinheit, wie γ , δ , oder ϵ bestehen (Olsen und Sieghart, 2009; Sieghart und Sperk, 2002). Der am häufigsten (ca. 60 %) vorkommende, postnatale Rezeptorsubtyp besteht aus 2 α_1 -, 2 β_2 - und 1 γ_2 -Untereinheit (Sieghart und Sperk, 2002; Baumann et al., 2002; Rudolph und Knoflach, 2011). In Föten sind allerdings die α_2 -, α_3 -, und β_3 -Untereinheiten in GABA_A-Rezeptoren am stärksten vertreten (Laurie et al., 1992).

1.2.4.1 α -Untereinheiten

α_1 ist die meist verbreitete α -Untereinheit und kommt vor allem in Kombination mit β_2 - und γ_2 -Untereinheiten vor. Knockout der α_1 -Expression führt zu einer Reduktion von GABA_A-Rezeptoren im gesamten ZNS, wie beispielsweise der Großhirnrinde oder dem basalen Vorderhirn. Die α -Untereinheiten 2-6 sind nicht im gesamten Gehirn nachweisbar, sondern wurden in verschiedenen Regionen gefunden. Ein Beispiel für α_2 -hältige Areale sind die Amygdala und der Hypothalamus. GABA_A-Rezeptoren mit der α_3 -Untereinheit sind unter anderem im Rückenmark oder dem Stammhirn zu finden, während α_5 -Untereinheiten außerhalb des Hippocampus kaum nachweisbar sind (Rudolph und Knoflach, 2011; Olsen und Sieghart, 2009). Die Expression von α_4 und α_6 ist vor allem im basalen Vorderhirn und im Kleinhirn ausgeprägt. Sie fusionieren, im Gegensatz zu den anderen α -Untereinheiten, genauso oft mit δ , wie mit γ_2 (Olsen und Sieghart, 2009).

1.2.4.2 β -Untereinheiten

Die β_{1-3} -Untereinheiten können nur schwer voneinander unterschieden werden, da viele GABA_A-Rezeptor-Antikörper keinen Unterschied zwischen ihnen machen. Nur in wenigen Regionen des ZNS von Ratten, in denen nur eine β -Untereinheit vorhanden ist, konnte eine Identifizierung erfolgen:

Die am häufigsten vorhandene und am weitesten verbreitete β -Untereinheit ist β_2 (Olsen und Sieghart, 2009). Ein Knockout in Mäusen vermindert die GABA_A-Rezeptordichte um 50 % im gesamten ZNS von Ratten (Sur et al., 2001). Die β_2 -Expression ist beispielsweise in Bereichen der Amygdala, dem Hypothalamus und dem Isocortex ausgeprägt (Zhang et al., 1991).

Die β_3 -Untereinheit ist in Feten die häufigste β -Untereinheit, die Konzentration der mRNA nimmt allerdings nach der Geburt ab. β_3 ist postnatal beispielsweise in Arealen des Vorderhirns, wie dem Isocortex oder des Hippocampus zu finden. β_1 weist die mengenmäßig geringste Häufigkeit ihrer mRNA im ZNS auf. Sie ist postnatal vor allem in Bereichen des Hippocampus oder dem Thalamus nachweisbar. Während in einem GABA_A-Rezeptor verschiedene α -Untereinheiten vorhanden sein können, hat man bislang pro Rezeptor immer nur eine β -Untereinheit nachgewiesen (Zhang et al., 1991; Olsen und Sieghart, 2009).

1.2.4.3 γ -Untereinheit

Mit 75-80 % ist die häufigste γ -Untereinheit die γ_2 (Olsen und Sieghart, 2009). Im ZNS ist fast ausschließlich γ_2 vorhanden. Beispiele für γ_2 enthaltende Areale sind der Hypothalamus, der Hippocampus und die Gehirnrinde. γ_1 und γ_3 spielen im ZNS kaum eine Rolle. γ_1 ist vor allem in den lateralen Nuclei der Amygdala, dem Striatum oder dem Globus pallidus zu finden, während Rezeptoren mit γ_3 -Untereinheiten in geringer Dichte beinahe im gesamten Gehirn zu finden sind (Laurie et al., 1992; Pirker et al., 2000).

1.2.4.4 δ -, ϵ -, π -, θ -Untereinheiten

Im Gegensatz zur γ -Untereinheit sind diese Untereinheiten ausschließlich extrasynaptisch exprimiert (Olsen und Sieghart, 2009).

δ -Untereinheiten kommen vor allem in den Granularzellen des Cerebellums in Kombination mit α_6 Untereinheiten vor; daneben wurden δ -Untereinheiten mit α_4 in Vorderhirnarealen, wie dem Neostriatum, und in der Hirnrinde festgestellt (Olsen und Sieghart, 2009).

Die ϵ -Untereinheit ist sehr selten und kommt zum Beispiel im Hypothalamus statt γ , beziehungsweise δ vor (Olsen und Sieghart, 2009).

GABA_A-Rezeptoren, die δ oder ϵ enthalten, findet man vorwiegend extrasynaptisch.

Die physiologische und pharmakologische Rolle der π - und θ - sind bis jetzt nur wenig bekannt (Olsen und Sieghart, 2009).

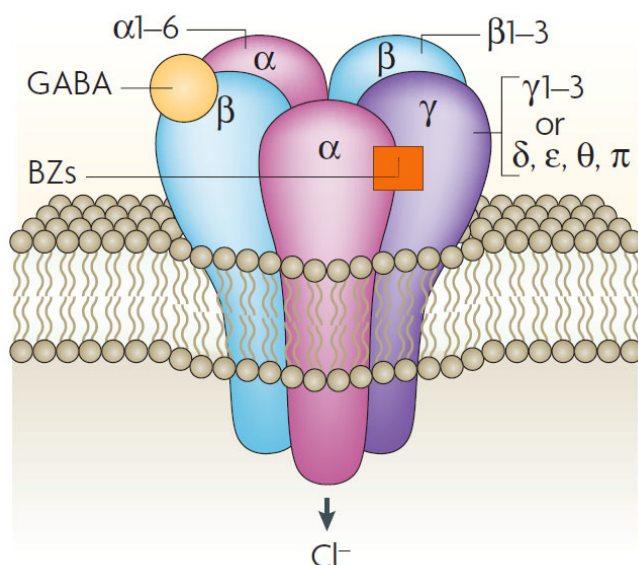


Abbildung 3: Aufbau der häufig vorkommenden $\alpha 2\beta\gamma$ Kombination des GABA_A-Rezeptors (Jacob et al., 2008)

1.2.5 Splice-Varianten der Untereinheiten

Nur von wenigen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten existieren Splice-Varianten. In erster Linie ist hier γ_2 bedeutend, die in γ_{2L} und γ_{2S} gesplittet wird. γ_{2L} besitzt in der großen, intrazellulären Schleife acht Aminosäuren mehr als die γ_{2S} -Untereinheit. Diese zusätzliche Sequenz enthält ein Serin, das von der Proteinkinase C phosphoryliert werden kann. Allerdings konnte trotz der zusätzlichen Phosphorylierungsstelle noch kein funktioneller Unterschied zu γ_{2S} festgestellt werden. Benzodiazepine zeigen allerdings eine stärkere Affinität zu γ_{2S} als zu γ_{2L} . Die verschiedenen Splice-Varianten kommen in ungleichen Mengen in verschiedenen Gehirnregionen vor (Olsen und Sieghart, 2009).

1.2.6 Öffnung des Kanals

GABA bindet zwischen der α und der β -Untereinheit. Somit gibt es bei jeder $2\alpha 2\beta$ -Rezeptorkombination 2 GABA-Bindungsstellen (Wang et al., 2010). Auf den beiden Untereinheiten gibt es bestimmte Aminosäuren, die für die Interaktion mit GABA essentiell sind (Boileau et al., 2002).

Auf der α -Untereinheit sind ein Phenylalanin in Position 64 und ein Arginin in Position 120 für die GABA-Bindung unerlässlich. Eine Mutation der basischen Aminosäure Arginin 120 in der α_1 -Untereinheit zu einem weniger basischen Lysin 120 führt zu einem starken Wirkungsverlust von GABA und die Dosis-Wirkungs-Kurve wird stark nach rechts verschoben. Die Bindungsaffinität von Muscimol wurde ebenfalls stark herabgesetzt. Die Potenzierung durch Benzodiazepine (BDZ) wurde allerdings nicht beeinflusst (Westh-Hansen, 1999).

Essentielle Aminosäuren für eine GABA-Interaktion auf der β -Untereinheit sind Tyrosin in Position 157 und 205, sowie Threonin in 160 und 202. Durch Punktmutationen wurden sie als wichtige Bindungsstellen für GABA am GABA_A-Rezeptor bestätigt (Amin und Weiss, 1993).

Die Untereinheiten formen Schleifen. Die Schleifen A-C der β -, und D-F der α -Untereinheit formen die Bindungsdomäne. Die GABA-Bindungsstelle besteht aus inneren und äußeren β -Faltblättern, die ein sogenanntes „Sandwich“ bilden (Wang et al., 2010). Unwin postulierte als einer der ersten, dass bei der Bindung von Agonisten der Cys-Loop-Familie an ihren Rezeptor die C-Schleife aus den äußeren β -Faltblättern um den Agonisten klappt (Unwin, 2005). Zuvor kommt es zu einer Bewegung von Schleife 2 und 7 und der

prätransmembranären-M1-Domäne, die mit den äußeren β -Faltblättern in Verbindung steht. Die Veränderung der Schleifen 2 und 7 führt zu einer Konformationsänderung der transmembranären M2 und M3-Domäne, was zur Öffnung der Kanalpore führt (Wang et al., 2010).

1.2.7 Funktion

Alle GABA_A-Rezeptoren sind anionenselektive Chloridkanäle und werden durch GABA geöffnet (Olsen und Sieghart, 2009). Bei der Aktivierung kommt es zu einem Chloridioneneinstrom, da die intrazelluläre Konzentration geringer ist als die extrazelluläre. Das Membranpotential wird weiter ins Negative verschoben, wodurch die neuronale Erregbarkeit erschwert wird (Lüscher und Keller, 2004).

Für die Aufrechterhaltung des intra- und extrazellulären Chloridionengradienten sind unter anderem K^+/Cl^- -Cotransporter verantwortlich, die Chloridionen gegen das Konzentrationsgefälle nach außen befördern. In unreifen, pränatalen Neuronen wurde eine geringere mRNA-Konzentration für den K^+/Cl^- -Cotransporter-Subtyp KCC2, als in reifen Neuronen, nachgewiesen. Dies führt zu einem geringeren Konzentrationsunterschied zwischen der intrazellulären und extrazellulären Chloridkonzentration, und wird mit der vorwiegend depolarisierenden Wirkung aktivierter GABA_A-Rezeptoren in unreifen Neuronen assoziiert. Durch die Depolarisation kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und Ca^{2+} -Ionenströmen in die Zelle, was zu einer Exzitation führt. Der Wechsel von einer depolarisierenden GABA Wirkung in Synapsen zu einem hyperpolarisierenden Effekt erfolgt vermutlich über die stärkere Bildung von K^+/Cl^- -Cotransportern und einer resultierenden geringeren intrazellulären Chloridionenkonzentration während der postnatalen Entwicklung (Ganguly et al., 2001).

GABA_A-Rezeptoren vermitteln an Synapsen eine schnelle, phasische, inhibitorische Neurotransmission und extrasynaptisch beziehungsweise perisynaptisch eine starke, tonische Inhibition. Synaptische und extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren unterscheiden sich unter anderem in der Kombination der Untereinheiten (Lüscher und Keller, 2004).

Die phasische Inhibition wird durch die Freisetzung von GABA aus präsynaptischen Vesikeln gesteuert. Im synaptischen Spalt bindet GABA an postsynaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren. Diese lösen nach der Aktivierung ein schnelles, inhibitorisches, postsynaptisches Potential aus, das die Erregung nachfolgender Neuronen beeinflusst. Bei der phasischen Inhibition werden die Kanalporen nur sehr kurz und bei einer hohen Konzentration von GABA geöffnet. Die hohe Geschwindigkeit ist für eine zeitgenaue Signalsetzung und eine synchrone Weiterleitung des neuronalen Netzwerks entscheidend. GABA wird nach seiner Verbreitung im synaptischen Spalt über spezifische Transporter präsynaptisch wieder aufgenommen, um die Reaktion mit GABA_A-Rezeptoren zu stoppen. Postsynaptische GABA_A-Rezeptoren bestehen häufig aus α_{1-3} -, β -, und γ_2 -Untereinheiten (Cellot und Cherubini 2013).

Tonische Inhibition wird durch extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren ausgelöst. GABA gelangt durch nicht vesikuläre, calciumunabhängige Transporter aus dem synaptischen Spalt. Extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren werden ständig, durch die Präsenz submikromolarer GABA-Konzentrationen im Extrazellularraum, gebildet (Cellot und Cherubini 2013). Sie besitzen hohe Affinität zu GABA und desensibilisieren weniger als synaptische Rezeptoren (Egawa und Fukuda, 2013). Auch extrazellulär sorgen spezifische Transporter in der Plasmamembran für die Entfernung von GABA. Diese werden, vor allem bei einer hohen GABA-Konzentration, verstärkt gebildet. Die tonische Inhibition ist an der Regelung der Exzitation und der dafür nötigen Zellkommunikation verschiedener Neuronen beteiligt. Das Leitvermögen kann beispielsweise durch Neurosteroiden moduliert werden. Extrasynaptisch ist die γ -Untereinheit kaum von Bedeutung. Ein Ausschalten des für γ_2 kodierenden Gens, führt zu einem hohen Verlust des synaptischen inhibitorischen Potentials, während das extrazelluläre kaum beeinflusst wird (Cellot und Cherubini 2013). Viele extrasynaptische Rezeptoren enthalten δ - Untereinheiten, die mit α und β kombiniert sind. Es handelt sich hier vor allem um α_4 , α_6 und selten um α_1 - Untereinheiten. Eine weitere extrasynaptisch exprimierte Rezeptorkombination ist $\alpha_5\beta\gamma_2$ (Wu et al., 2012).

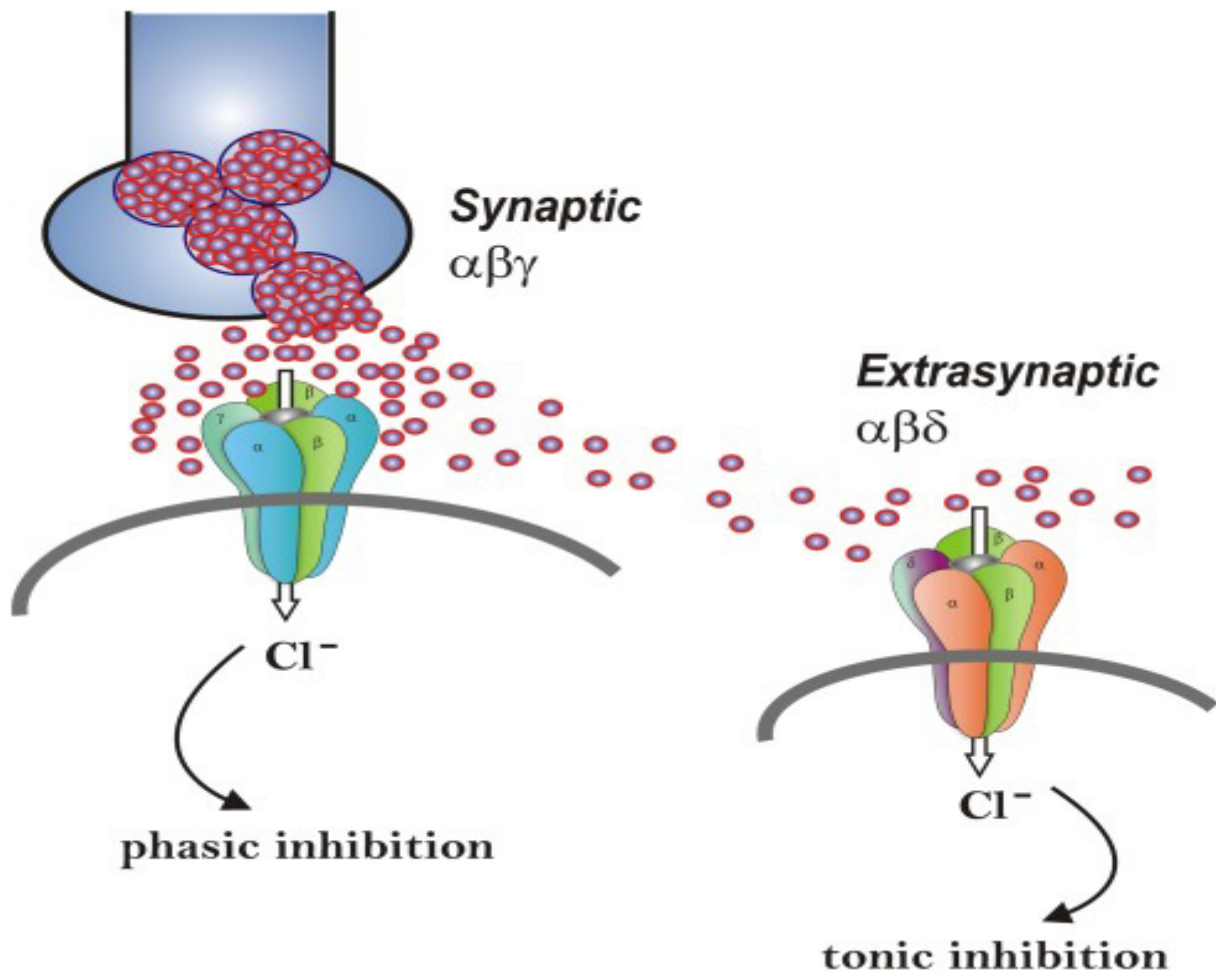


Abbildung 4: Typische Rezeptorkombinationen von synaptischen und extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren (Reddy, 2011)

1.2.8 Funktion GABAerger Neuronen

Stoffe, die GABA_A-Rezeptoren aktivieren beziehungsweise positiv modulieren, bewirken im Allgemeinen eine Anxiolyse, eine Muskelrelaxation, eine Sedierung, oder sind antikonvulsiv (Kamatchi und Rathanaswami, 2012).

1.2.8.1 Rolle der einzelnen Untereinheiten bei der Vermittlung verschiedener Arzneistoffwirkungen

α -Untereinheiten:

α_1 :

Substanzen, die GABA_A-Rezeptoren mit der α_1 -Untereinheit aktivieren beziehungsweise positiv modulieren, besitzen in der Regel sedierende beziehungsweise zum Teil auch antikonvulsive Wirkung. Die antikonvulsive Wirkung über α_3 -haltige Rezeptoren ist jedoch deutlich stärker ausgeprägt. Daneben wird die Aktivierung der Rezeptorsubtypen auch mit anterograder Amnesie in Verbindung gebracht (Tan et al., 2011).

α_2 :

Über Rezeptoren mit α_2 -Untereinheiten werden vor allem Wirkungen wie Anxiolyse und die Muskelrelaxation vermittelt (Möhler, 2006).

α_3 :

Rezeptoren mit der α_3 -Untereinheit spielen ebenfalls bei der anxiolytischen Wirkung verschiedener Modulatoren eine wichtige Rolle. Allerdings ist die Anxiolyse erst bei höheren Konzentrationen wie beispielsweise der Benzodiazepine, als sie für α_2 -haltige Rezeptoren für den gleichen Effekt benötigt werden, zu sehen (Möhler, 2006).

α_5 :

Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren mit α_5 -Untereinheiten führt zu einer Beeinträchtigung des Erinnerungsvermögens. Eine Überfunktion kann zu Lern- und Gedächtnisschwierigkeiten führen (Möhler, 2006).

β -Untereinheiten:

Agonisten an Rezeptoren mit β_2 und β_3 wird eine antikonvulsive und anxiolytische Wirkung zugeschrieben (Olsen und Li, 2011).

1.3 „GABA_C-Rezeptoren“

Rezeptoren, die aus fünf ρ -Untereinheiten aufgebaut sind, galten früher als eigene Familie, die „GABA_C-Rezeptoren“. Man erkannte keine pharmakologische Zugehörigkeit zu den schon bekannten GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren, da sie weder durch Bicucullin geblockt, noch durch Baclofen aktiviert wurden. Heute zählt man sie aufgrund ihrer Struktur jedoch zu den GABA_A-Rezeptoren. Sie wurden zwar auch in wenigen Regionen des ZNS lokalisiert, werden aber vor allem in der Retina exprimiert. Fehlfunktionen von „GABA_C-Rezeptoren“ in der Retina führen unter anderem zu einer Hypoxie in der Netzhaut (Olsen und Sieghart, 2009; Bek und Holmgaard, 2012).

1.4 GABA_B-Rezeptoren

GABA_B-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren und sind heterodimer aus einer GABA_{B1a}-, oder GABA_{B1b}- und einer GABA_{B2}-Einheit aufgebaut. An den GABA_{B1}-Untereinheiten befindet sich die GABA-Bindungsstelle, während Modulatoren vermutlich an der GABA_{B2}-Untereinheit angreifen (Attia et al., 2013).

1.4.1 Inhibitorische Wirkung

GABA_B-Rezeptoren sind im ZNS weitverbreitet. Sie haben, in Abhängigkeit von der Lokalisation, unterschiedliche Einflüsse auf synaptische Transmissionen. Präsynaptische GABA_B-Rezeptoren inhibieren die Neurotransmitterfreisetzung. Postsynaptisch hemmen sie die neuronale Exzitation durch Aktivierung von Kir(K⁺-buffering inwardly rectifying)3-Typ K⁺-Kanälen, die im geöffneten Zustand einen einwärtsgerichteten Kaliumionenstrom ins Zellinnere ermöglichen und das Membranpotential senken. Dies führt zu langsamen, inhibitorischen, postsynaptischen Potentialen (Guettg et al., 2010; Furutani et al., 2009). Kir3-Typ K⁺-Kanäle zählen zu den ATP-sensitiven K⁺-Kanälen, die eine wichtige Rolle bei der Muskelspannung spielen (Aishima et al., 2006). GABA_{B(1a,2)}-Rezeptoren kontrollieren die Freisetzung von Glutamat, während GABA_{B(1b,2)}-Rezeptoren Kir3-Typ K⁺-Kanäle aktivieren. GABA_B-Rezeptoren im Rückenmark hemmen N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptoren durch Hyperpolarisation (Guettg et al., 2010). Dies erfolgt durch die Dissoziation des G_{i/o} Proteins

bei der Bindung von GABA (Gutierrez et al., 2011). Das $G_{i/o}$ Protein hemmt die Phosphokinase A-Signalkaskade über Inhibition der Adenylcyclase, was zu einer reduzierten Ca^{2+} -Permeabilität der NMDA-Rezeptoren und einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit von K^+ -Kanälen führt (Guettg et al., 2010; Koek et al., 2012).

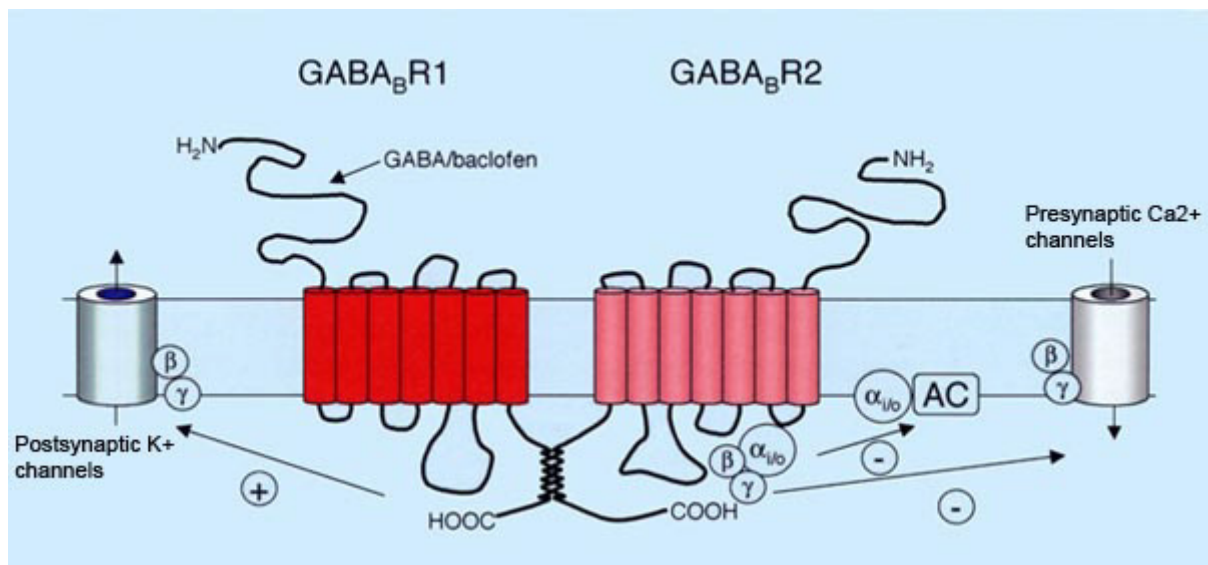


Abbildung 5: Wirkung aktivierter $GABA_B$ -Rezeptoren

(<http://flipper.diff.org/app/items/5240>, 21.9.13)

1.4.2 Liganden

Der klassische $GABA_B$ -Rezeptor-Agonist ist die 4-Amino-3-(4-chlorphenyl)buttersäure, kurz Baclofen. Wirksam ist vor allem das *R*-(-)-Enantiomer. Das Racemat wird bei spastischen Anfällen, die auf Gehirn- oder Rückenmarkstörungen beruhen, bei starken Schmerzen von Krebspatienten, Drogenabhängigkeit und Alkoholismus, Gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) und Funktionsstörungen der Blase angewendet (Attia et al., 2013).

5-Amino-pentansäure ist ein unselektiver Antagonist.

2 GABA-Rezeptor assoziierte Erkrankungen

2.1 Angststörungen

Angststörungen sind durch ein verändertes emotionales und physisches Verhalten gekennzeichnet (McTeague und Lang, 2012). Meist entstehen sie aus einer Kombination von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen. Im Kindesalter können sich Stresszustände auf die Entwicklung des ZNS auswirken (Earnheart et al., 2007). Im Neurotransmitterhaushalt wurden Veränderungen bei Noradrenalin, Serotonin und GABA festgestellt (Baldwin et al., 2013). Man unterscheidet konkrete Ängste (Phobien) und Panikattacken, generalisierte Angstzustände (GAD) und Depressionen (McTeague und Lang, 2012; Mago et al., 2013).

2.1.1 Angstzustände

Bei Phobien lösen bestimmte Situationen, die für Gesunde kaum bedrohlich oder normal erscheinen, Panik, Stress und ein Bedürfnis nach Flucht aus. Ein Beispiel ist die Agoraphobie, bei der der Patient Angst vor gewissen Orten hat (McTeague und Lang, 2012).

GAD sind durch eine ständige, intensive Angst und Sorgen über Monate bis Jahre gekennzeichnet. Sie sind nicht an bestimmte Umstände gebunden. Physiologische Anzeichen sind Rastlosigkeit, Muskelanspannungen, Konzentrationsschwierigkeiten, leichte Erregbarkeit und ein unruhiger Schlaf. Viele Patienten leiden unter chronischen Schmerzzuständen, wie Kopfschmerzen (Baldwin et al., 2013). GABAerge Neuronen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Manifestation von Phobien, Panikattacken und GAD. Modulatoren an GABA_A-Rezeptoren mit α_2 - und α_3 -Untereinheiten, wie beispielsweise die Benzodiazepine, haben einen anxiolytischen Effekt (Möhler, 2012).

2.1.2 Depressionen

Depressionen sind für gewöhnlich wiederkehrende Störungen der Wahrnehmung, die die Patienten in ihrem Verhalten hemmen. Sie interagieren anders mit ihrem sozialen Umfeld und ihrer Arbeit und können Alltagssituationen schwerer bewältigen (Mago et al., 2013). Symptome sind Pessimismus, ein vermindertes Selbstvertrauen, Schlafstörungen,

Erschöpfung, und Selbstmordgedanken (Möhler, 2012). Die Behandlung mit Antidepressiva erfolgt meist über einen längeren Zeitraum, um einen Rückfall zu vermeiden. Depressionen werden vor allem mit einer Störung des Noradrenalin- und Serotoninhaushalts assoziiert (Mago et al., 2013). Allerdings wurden in Gehirnen von Patienten auch zu geringe GABA-Konzentrationen nachgewiesen (Amihăesei und Mungiu, 2012). Die Pathogenese depressiver Erkrankungen ist daher sehr komplex. Die Behandlung erfolgt zum Beispiel durch Serotonin- und/oder Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (Mago et al., 2013). Modulatoren an GABA_A-Rezeptoren mit α_2 - und α_3 -Untereinheiten zeigen ebenfalls eine antidepressive Wirkung, wodurch ein Zusammenhang von Angst und Depression naheliegend erscheint (Möhler, 2012).

2.2 Schlafstörungen

Bei Insomnie hat der Patient Probleme beim Einschlafen, kann der Patient nicht im Schlafzustand bleiben, oder es besteht die Kombination aus beiden Krankheitsbildern. Insomnie führt zu einer schlechten Qualität des Schlafes. Dies kann zu Depressionen, einem gereizten Gemütszustand, Konzentrationsschwächen und einer Einschränkung der Lern- und Gedächtnisfähigkeit führen. Außerdem steigt das Risiko für Erkrankungen, wie Adipositas, Diabetes, Herzerkrankungen. Schlaf ist daher für die psychische und physische Gesundheit essentiell (Amihăesei und Mungiu, 2012).

2.2.1 Pathophysiologie

Die genaue Physiologie des Schlafes ist komplex, viele Regionen im Gehirn spielen eine Rolle (siehe Abbildung 6; Datta und MacLean, 2007).

Es gibt allerdings viele Anhaltspunkte, dass GABA eine Rolle bei der Ätiologie von Insomnie spielt (Plante et al., 2012). Eine zu geringe GABA-Konzentration im Gehirn wurde in Patienten mit Depressionen und Angstzuständen nachgewiesen. Bei Insomnie kommt es zu einer Überregung, was vermutlich auf der Abnahme der inhibitorischen GABAergen Neurotransmission beruht. Hypnotika, wie beispielsweise die Benzodiazepine, verstärken die Aktivität von GABAergen Neuronen (Amihăesei und Mungiu, 2012).

2.2.2 Pathogenese

Die Neigung zu Stress erhöht das Risiko einer Insomnie. Durch Stress werden der Sympathikus und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse angeregt. Dies führt unter anderem zu einer erhöhten Sekretion von Corticotropin-releasing-Hormon und somit zur Unterbrechung des Schlafes.

Primäre Schlafprobleme ziehen sich über mindestens einen Monat und haben keine offensichtliche Ursache. Etwa ein Viertel der Erwachsenen sind von ihnen betroffen. Sekundäre Insomnie kann zum Beispiel durch chronische Herz- oder Lungenerkrankungen, Medikamente, eine konstante Umstellung der Schlafgewohnheiten, oder durch das Restless-Legs-Syndrom ausgelöst werden (Amihăesei und Mungiu, 2012).

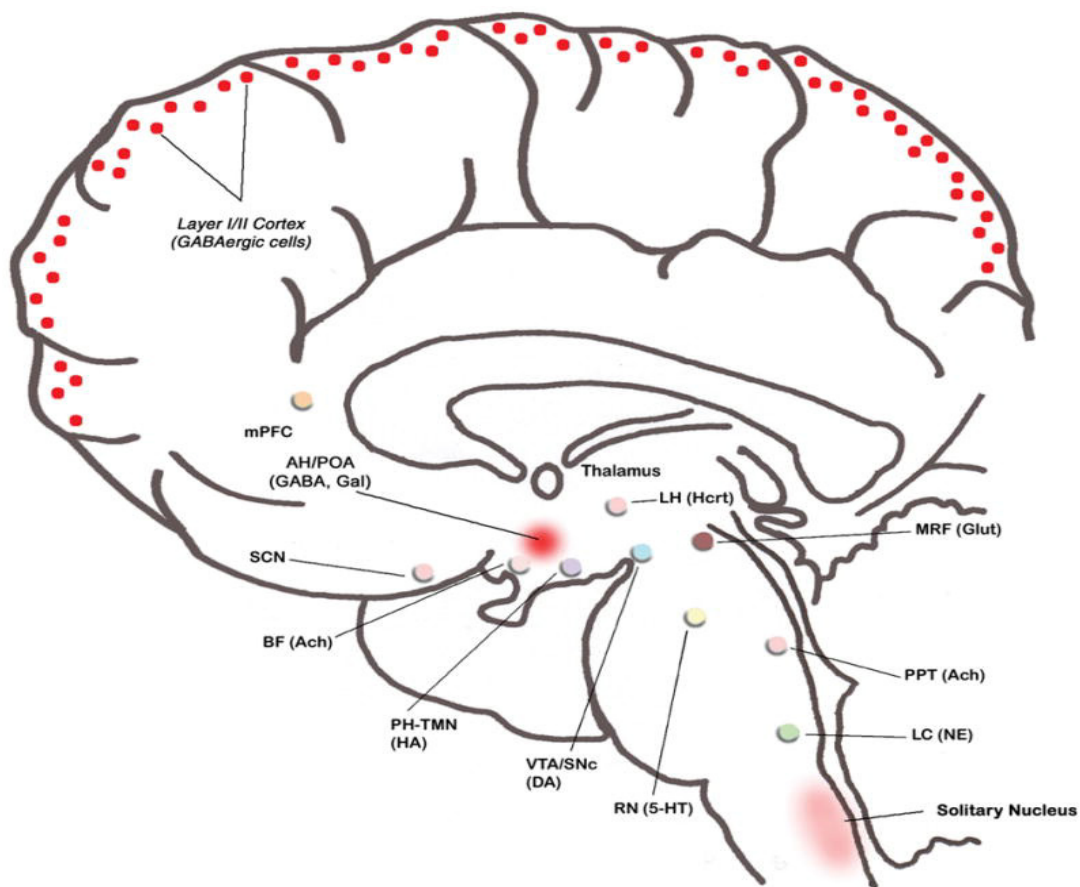


Abbildung 6: Schematische Darstellung verschiedener Gehirnregionen, die eine Rolle beim Schlaf spielen

Durch die vermehrte Aktivität von Zellen im anterioren Hypothalamus und der präoptischen Area (rot), kommt es zu einer erhöhten Produktion von GABA und Galanin. Die beiden Neurotransmitter hemmen Regionen im Gehirn, die den Wachzustand unterstützen, wie beispielsweise histaminerge Zellen (HA) im tuberomammilären Nucleus, Hypocretin/orexinergen Neuronen (Hcrt) im lateralen Hypothalamus (LH), noradrenerge Nervenbahnen (NE) im Locus coeruleus (LC), serotonerge Zellen (5-HT) in den Raphekernen (RN) und cholinerge Neuronen (ACh) in den pedunculo pontinen Kernen (PPT). Des Weiteren werden Bereiche in der mittleren präfrontalen Rinde (mPFC), im suprachiasmatischen Kern (SCK), im basalen Frontallappen (BF), in der VTA und der Substantia nigra compacta und der medialen Reticularformation (MRF) beeinflusst. Außerdem weisen GABAerge Nervenbahnen in der Gehirnrinde (Layer I/II) und Zellen im solitären Kern beim Schlafen eine erhöhte Aktivität auf (Datta und MacLean, 2007).

2.2.3 Therapie

Neben Veränderungen des Lebensstils und kognitiven Verhaltenstherapien werden zur Behandlung Hypnotika eingesetzt. Schlafmittel, wie beispielsweise Benzodiazepine, sollten über ein bis zwei Wochen eingenommen werden. Eine längere Anwendung führt zu Abhängigkeit und Entzugerscheinungen. Des Weiteren können tagsüber Benommenheit und Verwirrung auftreten. Außerdem wurden Hypotonie, Gedächtnisprobleme und eine veränderte Melatonin-Sekretion in der Nacht beobachtet. Deshalb wurden Schlafmittel wie Zolpidem, Zopiclon und Zaleplon entwickelt. Sie sind so effektiv wie Benzodiazepine, aber haben eine deutlich höhere Affinität zu α_1 -, als zu α_2 - und α_3 -haltigen GABA_A-Rezeptoren. Zu Rezeptoren, die die α_5 -Untereinheit besitzen, weisen sie nahezu keine Affinität auf (Amihăesei und Mungiu, 2012; Rudolph und Knoflach, 2011). Zopiclon ist kurzwirksam und hat eine chemisch andere Struktur, aber ein ähnliches pharmakologisches Profil wie die Benzodiazepine (Amihăesei und Mungiu, 2012). Das Abhängigkeitspotential ist allerdings mit der α_1 -Untereinheit verbunden. Somit konnte das Problem des hohen Abhängigkeitspotentials von Schlafmitteln mit den derzeitigen Therapieformen noch nicht eliminiert werden (Tan et al., 2011).

Es wird eine erhöhte Mortalität mit momentan vorhandenen Hypnotika-Therapien assoziiert (Amihăesei und Mungiu, 2012).

2.3 Epilepsie

Epilepsie ist eine der häufigsten neuronalen Erkrankungen (Delorenzo et al., 2005). Die Inzidenz liegt weltweit bei 0.5-1 % (Jacobs, 2012). Epilepsie entwickelt sich durch abnormale, neuronale Verknüpfungen, einem Ungleichgewicht zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmittern, oder aus einer Kombination beider Faktoren (Reddy, 2013). Es kommt zu einer Übererregbarkeit von Neuronen, die in spontane Anfälle übergehen können (Williams et al., 2009). Pro Jahr sterben etwa 50.000 Menschen in den USA an den Folgen von epileptischen Anfällen (Frankel, 2009).

2.3.1 Pathophysiologie

Epilepsie kann genetisch bedingt sein (primär), oder im Laufe des Lebens erworben werden (sekundär) (Williams et al., 2009). Die Pathogenese ist noch nicht vollständig bekannt (González, 2013). Epilepsieformen, die keinen ersichtlichen Ursprung haben, bezeichnet man als idiopathisch (Frankel, 2009). Eine aktuelle Hypothese unterteilt die Entwicklung der erworbenen Epilepsie in drei Phasen. Die erste Phase umfasst die Entwicklung der neuronalen Störung im ZNS, anschließend folgt eine latente Periode und die letzte Phase umfasst den Phänotyp mit chronischen, spontanen Krampfanfällen (Delorenzo et al., 2005). Die primäre Epilepsie tritt genauso häufig wie die sekundären Formen auf (Reddy, 2013). Bei Menschen kann es beispielsweise nach längeren, fieberhaften Krämpfen, einem Schlaganfall oder Kopfverletzungen zu einer Manifestation der Epilepsie und zu Krampfanfällen in den folgenden Monaten oder Jahren kommen (González, 2013).

Die Entwicklung auf zellulärer Ebene wird mit einer erhöhten, extrazellulären Konzentration des wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat assoziiert. Dies führt unter anderem zu einem gesteigerten, intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, der als Ursache für die neuronale Veränderung und der Manifestation der Epilepsie vermutet wird. Es kommt bei einem längeren, verstärkten Einwirken durch Glutamat zu einer Verschiebung der Empfindlichkeit und des Gleichgewichts von Calcium in den Neuronen. Der Phänotyp der Epilepsie wird daher vermutlich von den Zellen ausgelöst, die Glutamat verstärkt ausgesetzt sind, oder es waren (Delorenzo et al., 2005).

Des Weiteren werden epileptische Formen durch fehlerhafte GABAerge Transmissionen verursacht (Macdonald et al., 2010). Die Inbalance zwischen einer erhöhten Exzitation durch glutamaterge Transmission und einer verringerten Inhibition durch GABAerge Neurotransmission führt zu spontanen, epileptischen Anfällen (Zhang und Sun, 2011).

2.3.2 Mutationen am GABA_A-Rezeptor

Die Mutationen sind meist Polymutationen und werden von einem Elternteil vererbt. Es kann aber auch im Laufe des Lebens zu *de novo* Mutationen in GABA_A-Kanälen kommen, die zu epileptischen Anfällen führen. Bislang erforschte Mutationen betreffen die α_1 -, β_3 -, δ - und γ_2 - Untereinheit. Bei γ_2 sind diverse Mutationen in der Peptidkette der fertigen Untereinheit vorhanden. α_1 -, β_3 - und δ -Untereinheiten können zusätzlich zu Mutationen in der fertigen

Rezeptoruntereinheit auch Abweichungen in der Signalsequenz, die vor der Bildung eines funktionsfähigen Rezeptors abgespalten wird, aufweisen. Bei den Veränderungen handelt es sich um missense-, nonsense-, frameshift-Mutationen und um Mutationen in nicht codierenden Bereichen, wie zum Beispiel in Introns. Das veränderte Erbgut führt in synaptischen Regionen zu einer instabilen mRNA der Rezeptoruntereinheiten, und/oder einem fehlerhaften Ionenkanal durch abweichende Peptidfaltung oder Glykosylierung der defekten Untereinheit (Macdonald et al., 2010). Eine verminderte phasische GABAerge Übertragung ist die Folge. Die tonische GABAerge Aktivität scheint hingegen erhöht zu sein (Yu et al., 2013).

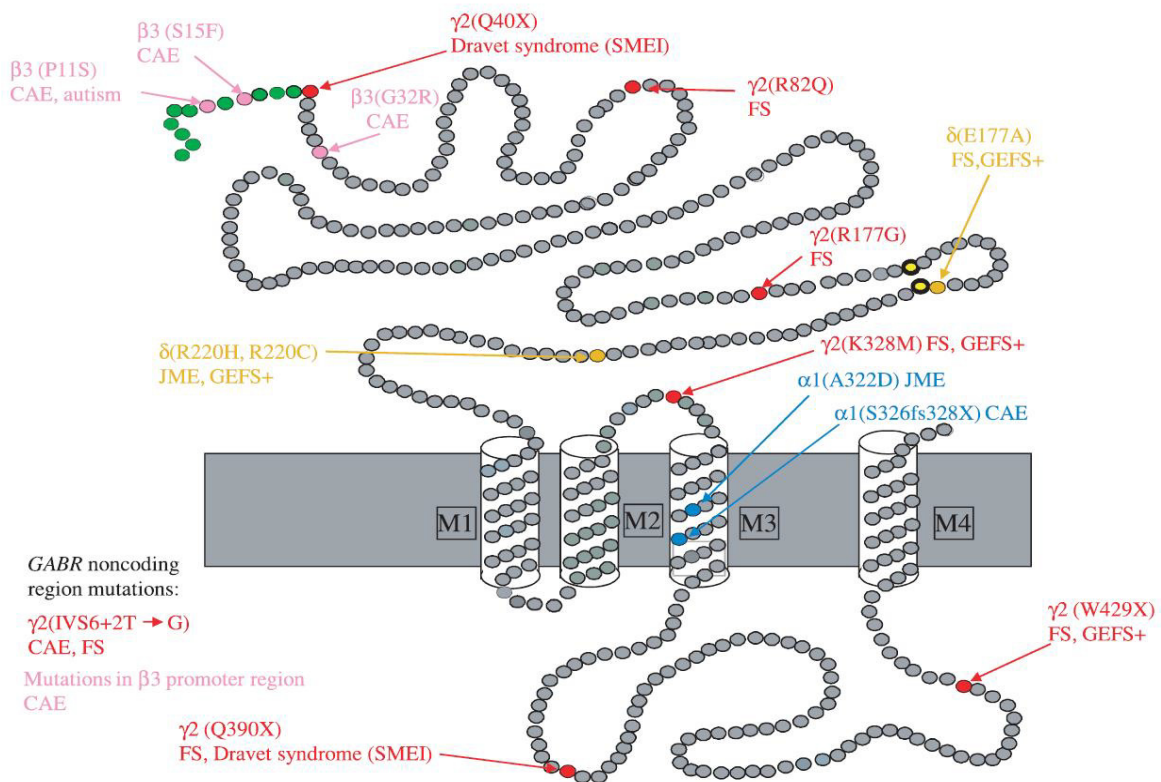


Abbildung 7: Mutationen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten, die mit genetisch bedingter Epilepsie assoziiert sind

Der grüne Abschnitt stellt die Signalsequenz dar, die vor der Bildung der vollendeten Untereinheit abgetrennt wird. Mutationen wurden bei β₃, γ₂ und δ in den extrazellulären Abschnitten gefunden. Genetische Veränderungen von γ₂ können auch in der intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4 vorhanden sein. Die Mutationen der α₁-Untereinheit sitzen in der transmembranären M3-Domäne (Macdonald et al., 2010).

2.3.3 Klassifikation

Die Klassifikation der Epilepsie-Formen erweist sich aufgrund der heterogenen Pathophysiologie und Ätiologie schwierig (Zhang et al., 2012). Die epileptischen Formen können grob in primär generalisierte Anfälle und fokale Anfälle eingeteilt werden (Engel, 1995). Bei einem primär generalisierten Anfall sind beide Gehirnhälften von einer Fehlfunktion der neuronalen Übertragung betroffen. Bei einem Anfall kommt es zu einer synchronen Exzitation der schadhafte Regionen in beiden Hemisphären. Im Fall eines fokalen Anfalls beschränkt sich die Fehlfunktion meist auf eine Gehirnhälfte, oft sogar nur auf ein bestimmtes Areal der neuronalen Übertragung (Aktories et al., 2009). Anfälle, bei denen es zu einem Verlust des Bewusstseins kommt, bezeichnet man als Absencen (Frankel, 2009). Einen Überblick der Klassifikation der Epilepsie und den physischen Auswirkungen der einzelnen Formen gibt Tabelle 2.

Anfallstyp	Form, ungefähre relative Häufigkeit	Phänotypische Beispiele
fokal	Jackson Anfall = einfache fokale Anfälle Bewusstsein bleibt erhalten, 4 %	klonische Zuckungen der linken Hand mit typischer Ausbreitung in den linken Arm
	komplex fokaler Anfall Bewusstseins Einschränkungen, 16 %	plötzliches Auf- und Zuknöpfen des Hemds, ohne anschließender Erinnerung daran
	sekundär generalisierter Anfall Anfänglich fokaler Beginn Bewusstsein im generalisierten Zustand aufgehoben, 36 %	fokaler Beginn ohne Bewusstseinsverlust, anschließende tonisch-klonische Krämpfe ohne anschließender Erinnerung an den Anfall
primär generalisiert	Absencen Bewusstseinsausfall, 1 %	geistige Abwesenheit mit starrem Blick, oder plötzliches Pausieren einer Tätigkeit, ohne anschließender Erinnerung daran
	myoklonischer Anfall sehr kurzer, kaum wahrnehmbarer Bewusstseinsausfall, 1 %	klonische Zuckungen der Arme und Fallenlassen von Gegenständen, ohne anschließender Erinnerung daran
	generalisierter tonisch und/oder klonischer Anfall Bewusstseinsausfall, 33 %	plötzlicher Sturz zu Boden ohne warnende Anzeichen, gefolgt von tonisch-klonischen Krämpfen, ohne anschließender Erinnerung an den Anfall
	atonischer Anfall sehr kurzer, kaum wahrnehmbarer Bewusstseinsausfall, < 1 %	Plötzlicher Sturz durch Verlust des Muskeltonus ohne Verkrampfungen
nicht klassifizierbar	< 8 %	

Tabelle 2: Überblick über die Anfallsformen der Epilepsie (Aktories et al., 2009)

2.3.4 Therapie

Die primäre Pharmakotherapie umfasst die Gabe von Antiepileptika. Sie verstärken einerseits die inhibitorische Wirkung GABAerger Nervenbahnen, um der verstärkten exzitatorischen Wirkung entgegen zu wirken. Andererseits unterdrücken sie die Effekte oder Freisetzung von Glutamat (Brawek et al., 2009).

Zur ersten Gruppe zählen Vigabatrin, Tiagabin, Benzodiazepine, Barbiturate, und die Valproinsäure. Sie verstärken die GABA-Synthese und Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt (Valproinsäure), hemmen die Wiederaufnahme (Tiagabin), oder den Abbau (Vigabatrin) von GABA, oder sind positive Modulatoren am GABA_A-Rezeptor (Benzodiazepine, wie Diazepam; Barbiturate, wie Phenobarbital) (Brawek et al., 2009; Sarup et al., 2003; Elms et al., 2013; Goldschen-Ohm et al., 2010).

Die zweite Gruppe umfasst Blocker spannungsabhängiger Na⁺-, beziehungsweise T(Transient)-Typ Ca²⁺-Kanäle. Zu den Na⁺-Kanalblockern zählen Carbamazepin und Phenytoin (Uebachs et al., 2012; Sitges et al., 2007). Ein T-Typ Ca²⁺-Kanalblocker ist beispielsweise Gabapentin (Brawek et al., 2009; Li et al., 2012). Des Weiteren zählen direkte Blocker der non-NMDA-Glutamatrezeptoren, wie Topiramat und Felbamat, zu den antiepileptischen Arzneistoffen (Waugh und Goa, 2003; Tomczyk et al., 2007; Brawek et al., 2009).

Die Valproinsäure wirkt sowohl GABA verstärkend, als auch Glutamat hemmend. Sie erhöht einerseits durch eine verstärkte GABA-Synthese die GABAerge Transmission, und senkt die Exzitation durch Blockade von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen (Elms et al., 2013).

Antiepileptika können schwerwiegende Nebenwirkungen haben, oder die Krämpfe nicht vollständig verhindern (Frankel, 2009). 30 % der Erkrankten sind, trotz Medikation, weiterhin von epileptischen Anfällen betroffen. Bei schwerwiegenden, therapieresistenten Formen kann das epilepsieverursachende Zentrum chirurgisch entfernt werden (Jacobs et al., 2012).

2.4 Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine schwere, psychische Erkrankung (Ekinci und Ekinci, 2013). Etwa ein Prozent der Weltbevölkerung ist von Schizophrenie betroffen (Yu et al., 2013). Dabei kann das klinische Bild von Patient zu Patient variieren (Ekinci und Ekinci, 2013).

Das Krankheitsbild ist bei Erkrankten oft sehr heterogen und wird grob in die Positiv- und Negativsymptomatik eingeteilt. Zur Positivsymptomatik zählen beispielsweise aggressives Verhalten und Wahnvorstellungen. Depressive Stimmungen hingegen sind ein Beispiel für Negativsymptomatiken (Ekinci und Ekinci, 2013; Vahia et al., 2013). Bei einer bipolaren Störung, oder manisch-depressiven Erkrankung, wechseln sich die Positiv- und Negativsymptomatik ab (Escamilla, 2001).

Die Schizophrenie ist meist chronisch und die Symptome verstärken sich, je länger die Krankheit unbehandelt bleibt. Sie wird unter anderem nach dem Zeitpunkt des ersten Auftretens von Symptomen unterteilt. Am häufigsten treten erste Anzeichen der Erkrankung bei jungen Erwachsenen um das 20. Lebensjahr auf. Kinder sind seltener von der Schizophrenie betroffen. Man unterscheidet die sehr früh auftretende Schizophrenie, die vor dem 13. Lebensjahr beginnt, und die früh auftretende Schizophrenie, die zwischen 13 und 17 Jahren ausbricht (Clemmensen et al., 2012).

Über die Entstehung und Manifestation der Schizophrenie gibt es zahlreiche Hypothesen (Yu et al., 2013). Pathophysiologische Auslöser betreffen vermutlich Areale in der Hirnrinde, wie zum Beispiel eine reduzierte Exzitation in Pyramidalneuronen durch eine Fehlfunktion der glutamatergen Transmission durch NMDA-Rezeptoren und/oder eine herabgesetzte dopaminerge Neurotransmission durch Dopamin-1-Rezeptoren. Des Weiteren wird Schizophrenie mit einer Reduktion der GABA-Konzentration in Parvalbumin-enthaltenden Neuronen assoziiert. Da Parvalbumin-enthaltende Neuronen indirekt die dopaminerge Transmission durch Dopamin-2-Rezeptoren im Striatum inhibieren würden, kommt es zu einer verstärkten Exzitation im Striatum, die vermutlich zu einem Teil der psychischen Symptomatik in der Schizophrenie führt (Lewis und Sweet, 2009). Die Positivsymptomatik wird höchstwahrscheinlich unter Beteiligung einer hyperdopaminergen Erregung im Globus pallidus ausgelöst (Sotoyama et al., 2013).

Post mortem wurde in Patienten eine reduzierte mRNA Konzentration und Expression von GABA-synthetisierenden Enzymen, wie GAD₆₇, festgestellt, sowie über eine erhöhte Dichte postsynaptischer GABA_A-Rezeptoren im präfrontalen Cortex berichtet (Yu et al., 2013). Vor allem wurde eine vermehrte Expression der α_2 -Untereinheit beobachtet (Verdurand et al., 2013). γ - und θ -Untereinheiten waren zum Teil defekt. Der anscheinend verminderten phasischen Inhibition steht eine Überaktivität der tonischen Inhibition gegenüber. Hemmende Substanzen der extrasynaptischen und perisynaptischen GABA_A-Rezeptoren

konnten schizophrene Symptome in Mäusen vermindern. Mögliche Veränderungen der GABA-Spiegel bei schizophrenen Patienten werden momentan noch kontrovers diskutiert (Yu et al., 2013).

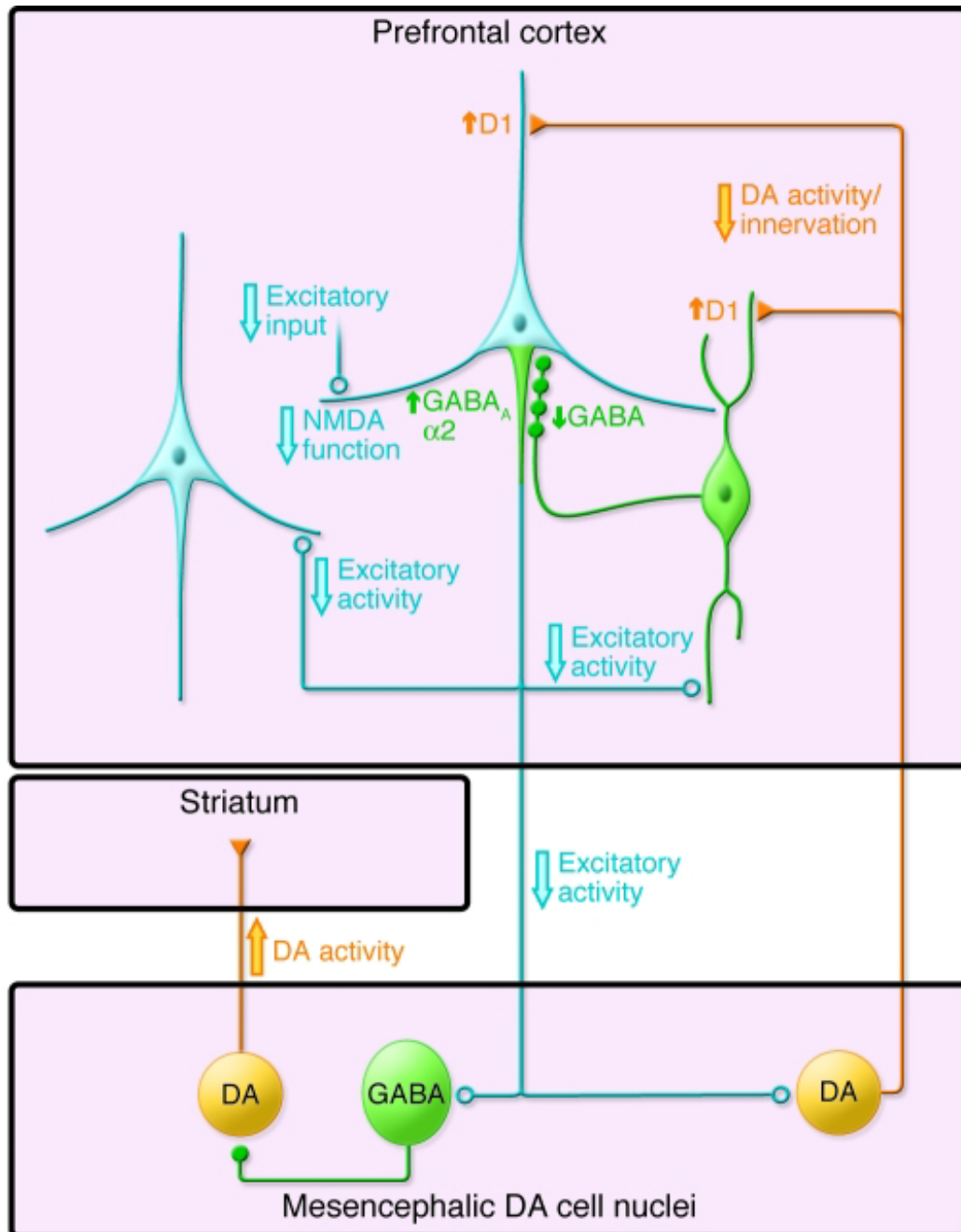


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Gehirnnareale und Neurotransmitterübertragungen, die mit der Schizophrenie assoziiert werden (Lewis und Sweet, 2009)

2.5 Down Syndrom

Das Down Syndrom tritt bei einem von 650-1000 Neugeborenen auf. Es ist die häufigste Ursache für eine genetisch bedingte mentale Einschränkung (Bittles et al., 2007). Die Erkrankung wird auch „Trisomie 21“ genannt, da, statt zwei, drei Chromosomen 21 vorhanden sind. Das Krankheitsbild umfasst neuronale Missbildungen, die zu kognitiven Defiziten und einer Beeinträchtigung der intellektuellen Fähigkeit führen. Eine stark erhöhte GABAerge Neurotransmission ist vermutlich einer der Hauptgründe für die kognitive Einschränkung. Transgene Mäuse, die den Phänotyp des Down Syndroms zeigen, weisen eine reduzierte, exzitatorische Aktivität im Temporallappen auf. Des Weiteren kommt es durch die verstärkte GABAerge Neurotransmission zu einer verminderten Plastizität von Synapsen im Hippocampus. Unselektive GABA_A-Rezeptor-Antagonisten führen zwar zu einer Verbesserung der Gedächtnisleistung, lösen aber auch Angstzustände, Schlaflosigkeit und Muskelkrämpfe aus. Da im Hippocampus aber vor allem GABA_A-Rezeptoren mit α_5 -Untereinheiten exprimiert werden, könnten selektive, inverse Agonisten dieses Rezeptorsubtyps in der Behandlung der Trisomie 21 deutliche Vorteile bringen (Martinez-Cué et al., 2013).

3 Liganden am GABA_A-Rezeptor

3.1 Agonisten

Neben GABA binden auch Substanzen wie Muscimol, Thiomuscimol, 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol (THIP) und Piperidin-4-sulfonat (P4S) an die GABA-Bindungsstelle (Ebert et al., 1997).

3.1.1 Muscimol

Muscimol (Isoxazolderivat aus dem Fliegenpilz) ist ein selektiver Agonist an der GABA-Bindungsstelle (Macdonald und Olsen, 1994). Es besitzt unterschiedliche Affinität zu den einzelnen α -Untereinheiten. Am höchsten ist die Affinität zu Rezeptoren mit α_6 -Untereinheiten, während sie für α_2 -haltige Rezeptoren am schwächsten ausgeprägt ist. Muscimol weist eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu GABA_A-Rezeptoren als GABA auf (Ebert et al., 1997). Die EC₅₀ von Muscimol ist beispielsweise an $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptoren mit etwa 3 μ M deutlich geringer, als die von GABA mit einer EC₅₀ um die 50 μ M (Yang und Olsen, 1987).

3.2 Antagonisten

Zu den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten zählen beispielsweise Bicucullin, GABA-Arylaminopyridazinderivate (kompetitive Antagonisten) oder Picrotoxin (nicht-kompetitiver Antagonist) (Macdonald und Olsen, 1994; Heaulme et al., 1986).

3.2.1 Bicucullin

Bicucullin ist ein kompetitiver Antagonist am GABA_A-Rezeptor (Macdonald und Olsen, 1994). Es besitzt eine geringere Affinität zu Rezeptoren mit α_6 -Untereinheiten, während sich die Affinität zu den anderen häufig vorkommenden Rezeptorsubtypen nicht signifikant unterscheidet (Ebert et al., 1997). Die IC₅₀ liegt, je nach GABA_A-Rezeptorsubtyp, durchschnittlich bei 3-4 μ M Bicucullin (Green und Halliwell, 1997).

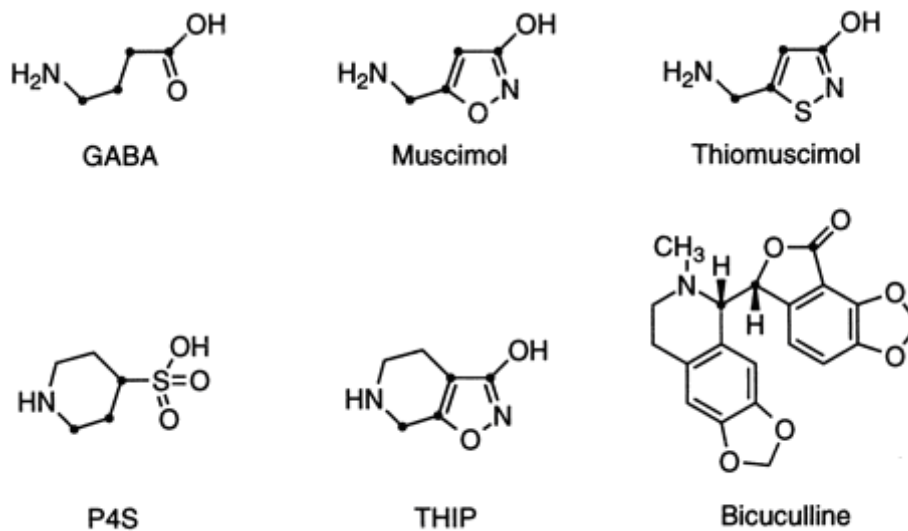


Abbildung 9: Struktureller Vergleich zwischen GABA und seinen kompetitiven Liganden am GABA_A-Rezeptor (Ebert et al., 1997)

3.2.2 Picrotoxin

Picrotoxin ist ein nicht-kompetitiver Antagonist am GABA_A-Rezeptor. Es ist ein äquimolares Gemisch aus Picrotoxinin und Picrotin (Yang et al., 2007). Die Moleküle sind ungeladen, kugelförmig und besitzen einen Durchmesser von etwa 9 Å (Xu et al., 1995). Picrotoxin ist ein typischer use-dependent Blocker. Eine Bindungsstelle von Picrotoxin befindet sich vermutlich extrazellulär nahe dem M2 Segment, welche allerdings nur im geöffneten Zustand des Kanals erreichbar ist. Geht der Rezeptor in den geschlossenen Zustand über, kann die Substanz ihre Bindungsstelle nicht verlassen. Eine weitere, allosterische Bindungsstelle wird außerhalb des Kanals vermutet. Jedoch werden nur 20-30 % des Blocks durch Picrotoxin über diese Bindungsstelle vermittelt (Bali und Akabas, 2007). Die IC₅₀ von Picrotoxin beträgt an $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (Gurley et al., 1995).

4 Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren

4.1 Benzodiazepine (BDZ)

Die Benzodiazepine zählen, trotz zahlreicher Nebenwirkungen und einem hohen Abhängigkeitspotential, zu einer der am meisten verschriebenen Arzneimittelgruppen.

Chemisch gesehen sind es lipophile Amide mit heterozyklischen Strukturen (Hollister et al., 1993). Benzodiazepine aktivieren nicht direkt den Kanal, sondern modulieren die Aktivität, indem sie die Affinität von GABA am Rezeptor und die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen (Haefely, 1984).

4.1.1 Pharmakokinetik

Die meisten BDZ werden oral gut resorbiert, was die Anwendung für Patienten einfach macht. Ihre Proteinbindungskapazität im Blut beträgt 80-90 %. Viele BDZ sind sogenannte Prodrugs und werden erst nach hepatischer Metabolisierung in eine aktive Form übergeführt. Generell werden Benzodiazepine nach ihrer Halbwertszeit ($t/2$) und dementsprechend ihrer Wirkdauer eingeteilt:

Kurzwirksame BDZ ($t/2$: ~ 8h): Triazolam, Midazolam

Mittellangwirksame BDZ ($t/2$: ~ 30h): Oxazepam, Lorazepam, Temazepam, Flunitrazepam

Langwirksame BDZ ($t/2$: ~ 100h): Diazepam, Bromazepam, Nitrazepam, Flurazepam, Alprazolam (Tallman und Hutchison, 1990; Abernethy et al., 1985).

4.1.2 Bindungsstelle

Als die Benzodiazepine in den 1960igern von Roche auf den Markt gebracht wurden, war ihre Bindungsstelle, beziehungsweise ihr molekulares Target noch nicht bekannt. Obwohl vermutet wurde, dass ein sogenannter Benzodiazepin-Rezeptor im Gehirn existiert, konnte 1982 erstmals gezeigt werden, dass Benzodiazepine an GABA_A-Rezeptoren binden und die Funktion des Kanals modulieren (Tallman und Hutchison, 1990). Ihre Bindungsstelle ist in einer Tasche, die von der α - und γ -Untereinheit gebildet wird (Sigel und Buhr, 1997). Wichtig für die Bindung sind unter anderem Histidinreste in der α -Untereinheit (Wieland et al., 1992). Diese befinden sich bei α_1 und α_2 in Position 101, bei α_3 in Position 126, und bei α_5

in 105 (Benson et al., 1998). Dagegen sind Rezeptoren mit α_4 - beziehungsweise α_6 -Untereinheiten unempfindlich gegenüber Benzodiazepinen, da sie in diesen Positionen Argininreste statt Histidinreste haben (Pym et al., 2005). Weitere wichtige Aminosäuren der α_1 -Untereinheit sind Tyrosin₁₅₉, Glycin₂₀₀, Threonin₂₀₆ und Tyrosin₂₀₉. An der γ_2 -Untereinheit sind Phenylalanin₇₇ und Methionin₁₃₀ essentielle Aminosäurepositionen für eine Interaktion der Benzodiazepine mit dem GABA_A-Rezeptor (Sigel et al., 1998).

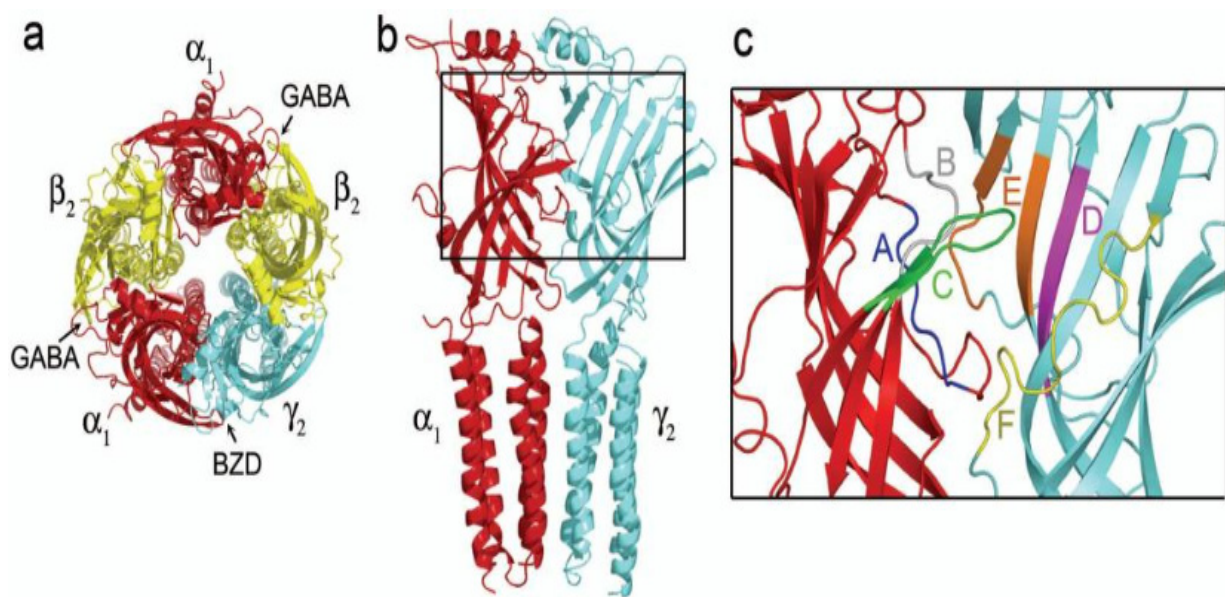


Abbildung 10: Bindungstasche der Benzodiazepine am GABA_A-Rezeptor

- (a)** Extrazelluläre Aufsicht eines $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptors. GABA bindet zwischen der α_1 - und β_2 -Untereinheit, während die Benzodiazepine mit α_1 und γ_2 interagieren.
- (b)** Seitenansicht des α_1 - und γ_2 -Rezeptorabschnitts. Die Benzodiazepinbindungsstelle ist schwarz umrandet und in **(c)** vergrößert, wo die Schleifen A-F, die die Bindungstasche formen, farblich hervorgehoben sind (Hanson und Czajkowski, 2008).

4.1.3 Anwendung

Schlafstörungen:

Kürzer wirksame BDZ werden vor allem bei Einschlafproblemen eingesetzt, während länger wirksame vorwiegend bei einer sogenannten Durchschlafstörung verschrieben werden (Anderson und Shneerson, 2009).

Angstzustände:

Benzodiazepine werden sowohl bei generalisierten Angstzuständen, als auch bei Panikattacken eingesetzt (Anderson und Shneerson, 2009). Sie haben einen schnellen Wirkungseintritt (Hollister et al., 1993).

Bei depressiven Zuständen zählen Benzodiazepine nicht zur ersten Wahl bei der Behandlung. Sie werden vorwiegend bei zusätzlich vorhandenen Angstzuständen eingesetzt, da Depressionen häufig über einen längeren Zeitraum von mindestens einigen Wochen behandelt werden müssen. Dadurch ist die Gefahr der Benzodiazepinabhängigkeit besonders hoch (Möhler, 2012).

Krampfanfälle:

Benzodiazepine spielen beispielsweise bei der Behandlung von Epilepsie eine wichtige Rolle (McMullan et al., 2010). Die Mortalitätsrate durch Krampfanfälle kann mit Benzodiazepinen deutlich gesenkt werden. Allerdings kommt es durch die lange Therapiedauer oft zu Toleranzentwicklungen der Patienten (Hollister et al., 1993).

Muskelrelaxation:

Benzodiazepine steigern die präsynaptische Inhibition im Rückenmark, wodurch sich der Muskeltonus in der Peripherie senkt (Danneberg und Weber, 1983).

4.1.4 Toleranzentwicklung

Bei einer langwährenden Benzodiazepinbehandlung kann es zur Entwicklung einer Toleranz kommen. Dies beruht vor allem auf molekularen und funktionalen Veränderung des GABA_A-Rezeptors. Es wurden sowohl Downregulationen der Rezeptoren, als auch ein verändertes

Expressionsmuster der einzelnen α -Untereinheiten beobachtet. Eine wichtige Rolle in der Toleranzentwicklung spielen Rezeptorsubtypen mit α_1 - beziehungsweise α_5 - Untereinheiten. Eine Toleranz entwickelt sich schneller für die sedativen, hypnotischen und antikonvulsiven Effekte. Die Anxiolyse und Amnesie sind kaum betroffen (Vinkers und Olivier, 2012).

4.1.5 Abhängigkeit

Neben einer Toleranzentwicklung führt die regelmäßige Anwendung von Benzodiazepinen auch zur Abhängigkeit. Das hohe Abhängigkeitspotential kommt generell durch eine Erhöhung der Dopamin-Spiegel im Gehirn zu Stande. Benzodiazepine verstärken über GABA_A-Rezeptoren mit α_1 -Untereinheiten die Feuerfrequenz dopaminerger Neuronen in der ventralen tegmental Area. Dies führt unter anderem zu Änderungen der synaptischen Übertragung im mesolimbischen System (Tan et al., 2010).

Andere, zu Abhängigkeit führende Substanzen, wie Morphin oder γ -Hydroxybuttersäure, weisen einen ähnlichen Mechanismus auf (Tan et al, 2011).

4.1.6 Antagonisten

Der bekannteste Antagonist an der Benzodiazepin-Bindungsstelle ist Flumazenil. Es wird als Antidot bei einer Benzodiazepinüberdosierung eingesetzt (Milić et al., 2012).

4.2 Barbiturate

Barbiturate (Derivate der Barbitursäure) verstärken die Wirkung von GABA an GABA_A-Rezeptoren im ZNS, was sich in einem Wirkspektrum von Sedierung bis hin zur Narkose äußern kann. Barbiturate wurden in den 30er und 40er Jahren am Markt eingeführt, wurden aber nach und nach von anderen Stoffgruppen, wie den Benzodiazepinen und Propofol, abgelöst, da ihre therapeutische Breite gering ist, sie ein hohes Abhängigkeitspotential haben, und schnell ein Toleranzeffekt eintritt (Oakley et al., 2012). Heutzutage werden Barbiturate kaum noch therapeutisch eingesetzt, Thiopental wird beispielsweise zur Einleitung einer Narkose verwendet (Garcia et al., 2010; Oakley et al., 2012). Barbiturate erhöhen in niedrigen Konzentrationen um 5 μ M allosterisch die Öffnungsdauer von GABA_A-

Rezeptoren (Rho et al., 1996; Koltchine et al., 1996). In höheren Konzentrationen von 20-50 μM können Barbiturate den GABA_A -Rezeptor auch direkt aktivieren (Koltchine et al., 1996). Darüber hinaus können Barbiturate in noch höheren Konzentrationen den Rezeptor blockieren (Thompson et al., 1996).

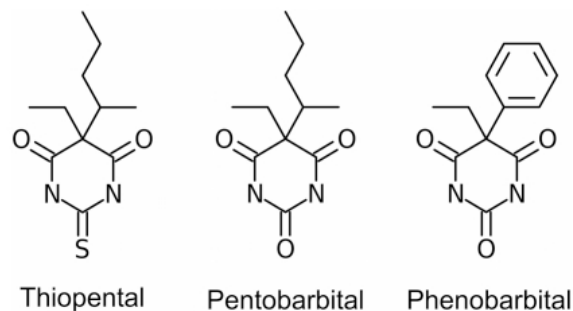


Abbildung 11: Strukturformel ausgewählter Barbiturate (Oakley et al., 2012)

4.3 Ethanol

Ethanol ist ein chemisch simples Molekül, das einen starken Einfluss auf das ZNS hat. Ursprünglich dachte man, dass Ethanol und andere Alkohole ihre Effekte über die Erhöhung der Fluidität von Lipidmembranen in Neuronen erzielen. Allerdings konnte in den vergangenen Jahren Ethanol eine positive Modulation von ligandengesteuerten Ionenkanälen, besonders von GABA_A -Rezeptoren, zugeschrieben werden (Davies, 2003). In geringen Konzentrationen wirkt Ethanol als Genussmittel euphorisierend, angstlösend und beeinflusst die kognitive und motorische Leistung (Zhu und Lovinger, 2006). Ethanol hat eine höhere Affinität zu extrazellulären GABA_A -Rezeptorsubtypen, wie $\alpha_4\beta_3\delta$ und $\alpha_6\beta_3\delta$ (Wallner et al., 2006; Wallner et al., 2003). Dies könnte mit verschiedenen Phosphorylierungsstadien der GABA_A -Rezeptoren oder mit der δ -Untereinheit zusammenhängen (Helms et al., 2012). Die Wirkung von alkoholischen Getränken mit einer Konzentration zwischen 3-30 mM, wie beispielsweise einem Glas Wein, kommt daher vorwiegend durch die tonische Inhibition zu Stande (Olsen und Li, 2011).

Erst bei Konzentrationen von 30-100 mM wirkt Ethanol über Modulation von postsynaptischen GABA_A -Rezeptoren und Glycinrezeptoren narkotisierend. Im synaptischen Spalt verstärkt Ethanol die präsynaptische Freisetzung von GABA. Durch die höhere Konzentration von GABA im synaptischen Spalt wird die Bindungswahrscheinlichkeit an

postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren erhöht und die Öffnungsfrequenz gesteigert (Helms et al., 2012). Neben dem Einfluss auf GABA_A-Rezeptoren wird der inhibitorische Effekt von Ethanol durch Hemmung des NMDA-Rezeptors und von spannungsabhängigen L(longlasting)-Typ-Ca²⁺-Kanälen verstärkt (Sanderson et al., 2009; Earl und Tietz, 2011).

Bei chronischem Ethanolmissbrauch kommt es zu einer irreversiblen Zerstörung von Nervenzellen im ZNS und einer verstärkten, synaptischen, GABAergen Neurotransmission in der Amygdala (Herman et al., 2013). Des Weiteren sind Veränderungen in der synaptischen und extrasynaptischen Rezeptordichte untersucht worden (siehe Abbildung 12) (Jacob et al., 2008).

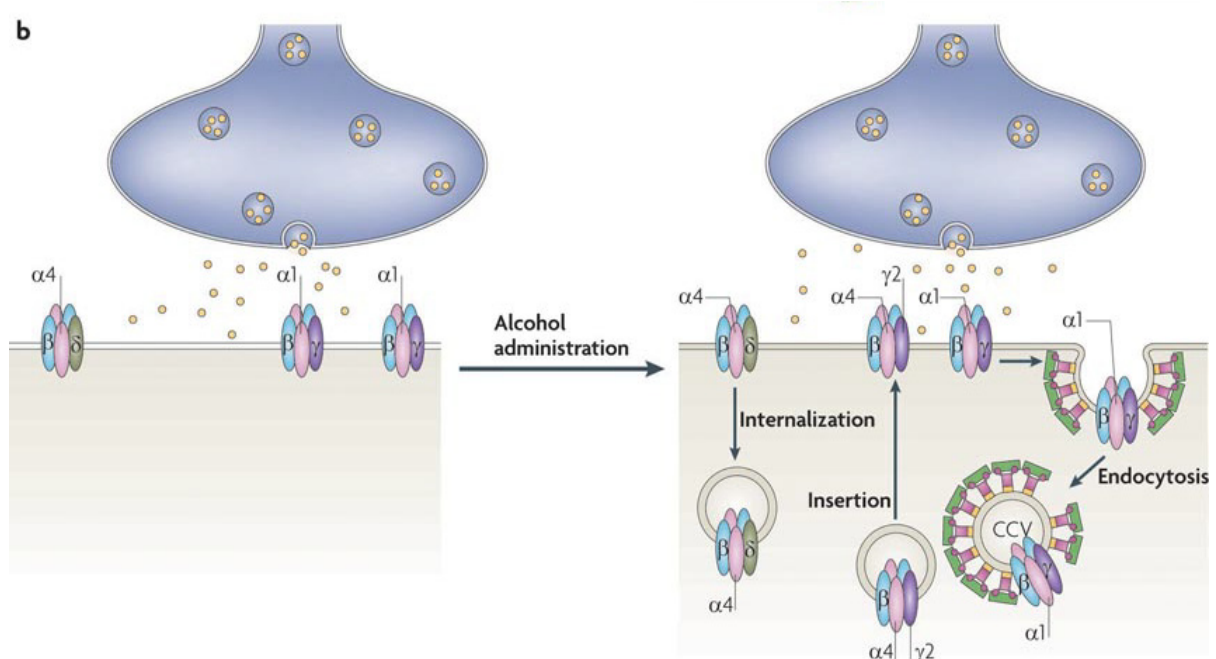


Abbildung 12: Veränderung der synaptischen und extrasynaptischen Rezeptordichte

Es kommt zu einer Clathrin-abhängigen Internalisierung von δ -haltigen extrasynaptischen und α_1 -haltigen synaptischen GABA_A-Rezeptoren. Mit einer vermehrten Bildung von Rezeptoren an der postsynaptischen Membran, wie beispielsweise $\alpha_4\beta\gamma_2$ -Kombinationen, versuchen die Zellen die verminderte Rezeptordichte zu kompensieren. Ihre physiologische Funktion im synaptischen Spalt ist jedoch anders als bei Rezeptoren, die die α_1 -Untereinheit enthalten, und sie sind zusätzlich unempfindlich gegenüber Benzodiazepinen (Datta und MacLean, 2007).

Alkoholkonsum von Schwangeren kann sich auf die Entwicklung des Kindes negativ auswirken. Gesichtsdeformationen, Wachstumsstörungen, mentale Retardierung oder andere funktionelle Beeinträchtigungen können die Folge sein (Sanderson et al., 2009).

4.4 Anästhetika

Die meisten medizinisch relevanten Anästhetika erzielen ihre Wirkungen durch die positive allosterische Modulation von GABA_A-Rezeptoren. Generell unterscheidet man zwischen Inhalationsnarkotika, wie unter anderem den Fluranen (Isofluran, Sevofluran, Enfluran), und den Injektionsnarkotika, wie Etomidat, Barbituraten, Propofol oder Steroiden (Olsen und Li, 2011).

4.4.1 Etomidat

Etomidat ist ein starkwirksames Injektionsnarkotikum, dessen Wirkung vor allem durch Potenzierung von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) erzielt wird. Die Bindung von Etomidat an den Rezeptor verursacht eine stärkere Affinität zu GABA, und senkt damit unter anderem die GABA EC₅₀. In hohen Konzentrationen kann Etomidat den Rezeptor auch direkt aktivieren, beispielsweise beträgt die EC₅₀ von Etomidat an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -Rezeptoren für die direkte Aktivierung etwa $83 \pm 34 \mu\text{M}$ (Stewart et al., 2013).

Die Bindungsstelle befindet sich zwischen der M1-Region der α - und der M3-Region der β -Untereinheit. Essentielle Aminosäuren für die Bindung sind in der β -Untereinheit ein Valinrest in Position 290 beziehungsweise ein Methioninrest in Position 286, und ein Methioninrest in Position 236 in der α_1 -Untereinheit (Stewart et al., 2013).

Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass die anästhetische Wirkung von Etomidat vor allem von GABA_A-Rezeptoren mit β_3 -Untereinheiten vermittelt wird, während andere Effekte, wie zum Beispiel die Sedierung oder Immobilisierung im Rahmen einer Narkose, durch Modulation von Rezeptoren mit β_2 -Untereinheiten zustande kommen (Olsen und Li, 2011).

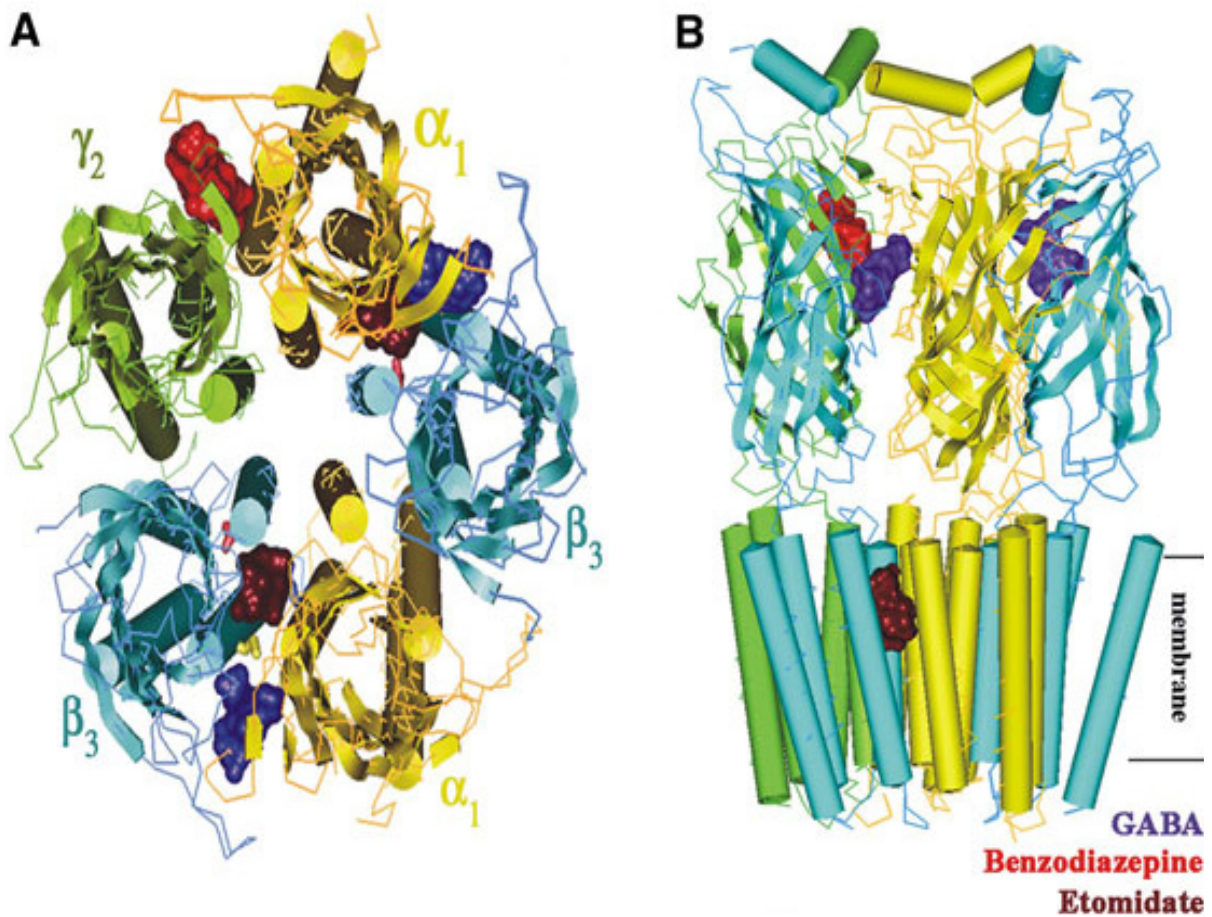


Abbildung 13: Bindungsstellen am GABA_A-Rezeptor

- (A) Aufsicht der extrazellulären Domäne eines $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptors im Ribbon-Modell. GABA (lila), Diazepam (rot), und Etomidat (rot-braun) sind in ihren Bindungstaschen eingezeichnet.
- (B) Seitenansicht der Bindungsdomänen von GABA, Diazepam und Etomidat. GABA und Diazepam binden extrazellulär, während Etomidat transmembranär interagiert (Olsen und Li, 2011).

4.4.2 Propofol

2,6-Diisopropylphenol (Propofol) ist das Injektionsnarkotikum, welches weltweit am häufigsten angewendet wird (Krasowski et al., 2001; Vedula et al., 2009). Propofol erhöht die GABA-Sensitivität und verlangsamt die Deaktivierung der GABA_A-Rezeptoren. In höheren Konzentrationen aktiviert Propofol GABA_A-Rezeptoren auch direkt (Krasowski et al., 2001). Die genaue Bindungsstelle von Propofol ist momentan noch nicht bekannt. Allerdings wird vermutet, dass Propofol und Etomidat eine nahezu idente Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor aufweisen (Ruesch et al., 2012). Des Weiteren konnten essentielle Aminosäuren für die Bindung an die β_2 -Untereinheit in der transmembranären M3-Domäne ermittelt werden. Ein Austausch des Methioninrestes in Position 286 zu Tryptophan verringert die Potenzierung von GABA-induzierten Chloridströmen, hat allerdings keinen Einfluss auf die direkte Aktivierung. Ein Austausch des Methioninrestes in Position 286 zu Alanin, Cystein, Glutamin, Lysin, Phenylalanin, Serin oder Tyrosin vermindert sowohl die Modulation, als auch die direkte Aktivierung des GABA_A-Rezeptors (Krasowski et al., 2001). Propofol hat eine höhere Affinität zu GABA_A-Rezeptoren mit β_2 - und β_3 -Untereinheiten, als zu jenen mit der β_1 -Untereinheit (Garcia et al., 2010). Im Gegensatz zu anderen Injektionsnarkotika verursacht Propofol selten Übelkeit und Wahrnehmungsstörungen nach dem Erwachen (Vedula et al., 2009).

4.5 Neurosteroide

Neuroaktive Steroide (NS) werden neben der Synthese im Gehirn auch in peripheren Organen, zum Beispiel in den Ovarien oder den Hoden, gebildet. Sie können die Bluthirnschranke passieren und werden im ZNS metabolisiert. Das Ausgangsmolekül für die Synthese aller NS ist das Cholesterin. Aus ihm werden lebenswichtige Hormone, wie Cortisol, Progesteron, Testosteron, Androgen und diverse Derivate gebildet, die im Gehirn zu neuroaktiven Substanzen umgesetzt werden. Die Metabolite binden an GABA_A-Rezeptoren (Ator et al., 1993).

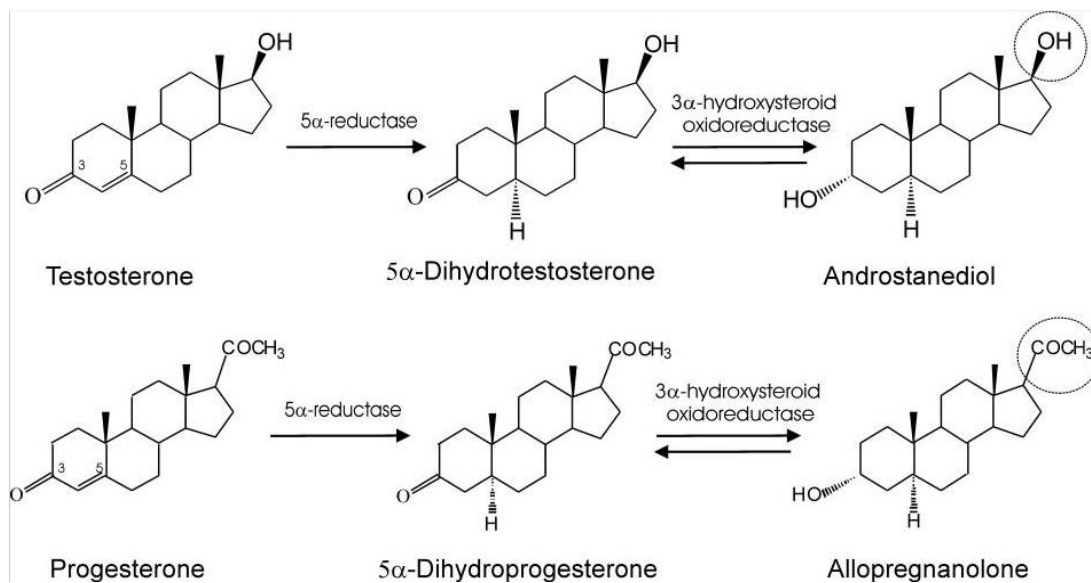


Abbildung 14: Biosynthese GABA_A-Rezeptor-modulierender Metabolite
(Reddy und Jian, 2010)

4.5.1 Interaktionen mit dem GABA_A-Rezeptor

Bei physiologischen Konzentrationen können NS den GABA_A-Kanal positiv modulieren. Sulfatierte NS sind hingegen nicht-kompetitive Antagonisten (Helms et al., 2012). Die Modulationsbindungsstelle befindet sich vermutlich an der α-Untereinheit. Viele NS sind auch kompetitive Agonisten und lösen eine direkte Aktivierung am GABA_A-Rezeptor aus (Hosie et al., 2006). *In situ* Versuche haben Einfluss auf die phasische und tonische Inhibition gezeigt (Helms et al., 2012). Sie verlängern die Öffnungsdauer und erhöhen die Frequenz (Macdonald und Olsen, 1994). Die tonische Inhibition wird schon bei deutlich geringeren Konzentrationen im Gehirn ausgelöst (<20 nM), als die phasische. Die extra- und perisynaptische Reaktion wird bei der Elimination der δ-Untereinheit aufgehoben, wodurch eine weitere Interaktionsstelle am Rezeptor mit der δ-Untereinheit nicht auszuschließen ist. Der GABA_A-Rezeptor wird je nach Hirnregion, auch bei gleicher Zusammensetzung der Untereinheiten, unterschiedlich moduliert. Dies könnte mit unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien des Kanals, beziehungsweise mit verschiedenen Enzymen vor Ort zusammenhängen, wodurch unterschiedliche Metabolite entstehen (Helms et al., 2012). Die erforderlichen Aminosäuren für eine Neurosteroidbindung am GABA_A-Rezeptor werden in Abbildung 15 beschrieben.

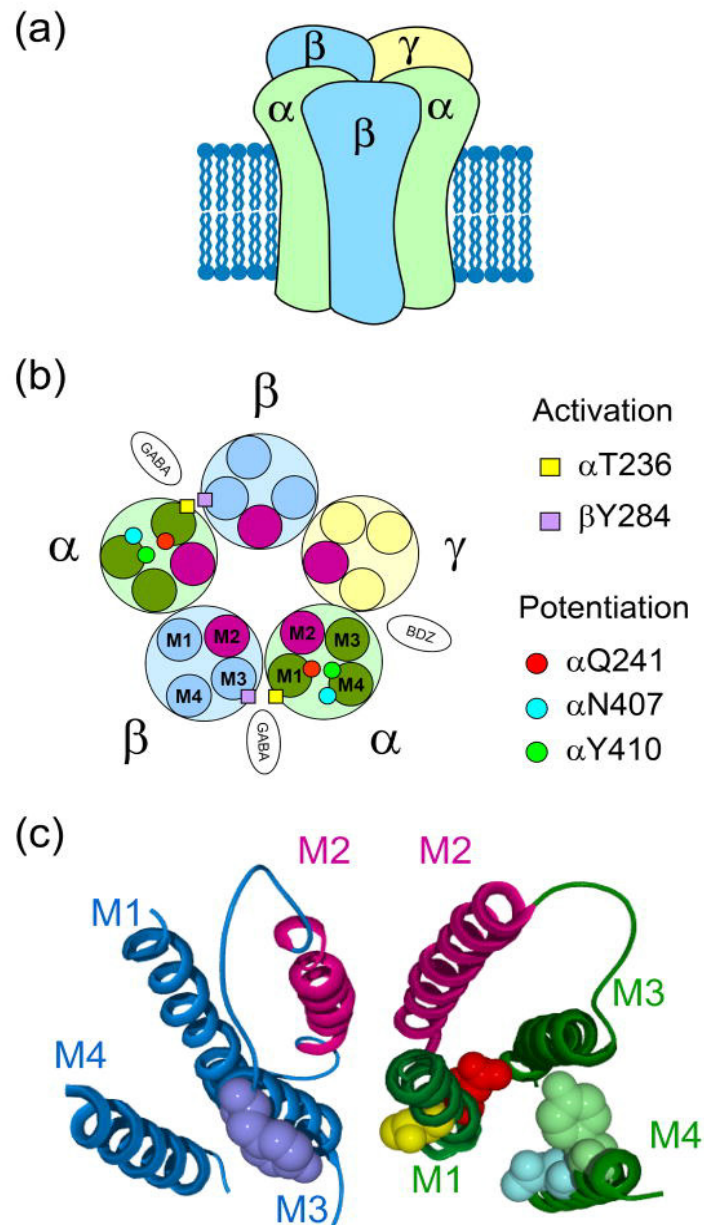


Abbildung 15: Interaktionen der Neurosteroiden mit GABA_A-Rezeptoren

- (a) Aufbau eines heteropentameren GABA_A-Rezeptors.
- (b) schematische Darstellung der Aminosäurepositionen, die für die Potenzierung (Glutamin₂₄₁, Asparagin₄₀₇ und Tyrosin₄₁₀) und die Aktivierung (Threonin₂₃₆ auf der α- und Tyrosin₂₈₄ auf der β-Untereinheit) essentiell sind.
- (c) Ausschnitt eines GABA_A-Rezeptors in Ribbon-Darstellung, wobei die wichtigen Aminosäuren für die Steroidbindung strukturell hervorgehoben sind und die gleiche Farbmarkierung wie in (b) aufweisen (Chisari et al., 2010).

4.6 β -Laktam Antibiotika

β -Laktam Antibiotika, wie Penicilline und Cephalosporine, werden bei diversen bakteriellen Infektionen angewendet. Bekannte Nebenwirkungen der β -Laktame, wie Krämpfe, Encephalopathie und Wahrnehmungsstörungen, werden vermutlich durch die Hemmung postsynaptischer GABA_A-Rezeptoren hervorgerufen (Grill und Maganti, 2011; Curtis et al., 1972; Sugimoto et al., 2002).

Penicilline sind nicht-kompetitive Antagonisten, während Cephalosporine vermutlich kompetitive Antagonisten sind (Sugimoto et al., 2002).

4.6.1 Penicillin

Penicillin liegt bei physiologischem pH-Wert als Anion vor (Bali und Akabas, 2007). Der nicht-kompetitive Block ist daher spannungsabhängig (Grill und Maganti, 2011). Eine 1 mM Penicillinkonzentration löst bei 0 mV Membranpotential einen stärkeren Block aus, als bei 60 mV. Die Bindungsstelle des Penicillins befindet sich innerhalb der Kanalpore und überlappt vermutlich mit der von Picrotoxin. Penicillin kann auch vom geschlossenen Kanal dissoziieren, was mit der geringen Bindungsaffinität zusammenhängen könnte (Bali und Akabas, 2007). Penicillin reduziert die Öffnungsdauer und erhöht die Öffnungsfrequenz des Rezeptors (Macdonald und Olsen, 1994). Penicillin G hat beispielsweise eine IC₅₀ von 557.1 ± 125.4 μ M von GABA am $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptor (Sugimoto et al., 2002).

5 Materialien und Methoden

Die unten beschriebenen Methoden wurden aus in der Vergangenheit am Department für Pharmakologie und Toxikologie, unter der Betreuung von Univ. Prof. Dr. med. Steffen Hering, durchgeführten Diplomarbeiten übernommen (siehe Diplomarbeit Mag. Bernd Weber „Untersuchung der Wirkung neuer, ausgewählter Liganden von GABA_A Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten“ Sommersemester 2012; Diplomarbeit Mag. Helga Dobernig „Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Effekte ausgewählter Naturstoffderivate im Tiermodell“ Sommersemester 2013).

5.1 In vitro Untersuchungen

5.1.1 Präparation der Oozyten

5.1.1.1 Zusammensetzung benötigter Lösungen

OR₂-Lösung:

2mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 82,5 mM NaCl, 5 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure ; pH-Wert: 6,8 – 8,2)

Der pH-Wert wurde mittels 1M NaOH auf 7,5 eingestellt.

ND 96-Lösung:

1 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 90 mM NaCl, 5 mM HEPES

Der pH-Wert wurde mittels 1M NaOH auf 7,4 eingestellt.

ND 96-Lösung + Antibiotika (AB):

500 ml ND 96-Lösung wurde mit 5 ml einer Lösung von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

Collagenase-Lösung:

2 mg Collagenase Sigma Typ IA / ml OR₂-Lösung

Pro ml Follikelgewebe benötigte man 1 ml Lösung.

5.1.1.2 Durchführung

Weibliche Frösche der Gattung *Xenopus laevis* (NASCO, USA) wurden 20-30 min in einer 0,2 %igen Lösung des Lokalanästhetikums Tricain narkotisiert. Anschließend wurde ein ca. 2 cm langer Schnitt durch die Bauchhaut, der darunter liegenden Fascie und Muskelschicht vorgenommen. Durch die Öffnung wurde mit einer Pinzette ein Teil des Folikelgewebes entnommen. Der Teil des Folikellappens wurde in OR₂-Lösung in Teile von etwa 20 zusammenhängenden Oozyten zerkleinert. Anschließend wurde mit Collagenase-Lösung für 90 min bei 17 °C der enzymatische Verdau von Binde- und Folikelgewebe vorgenommen, um die Oozyten in einem Einzelzustand zu erhalten. Da Calcium bei der Anwesenheit von Collagenase toxisch wirkt, musste man vor allem nach dem enzymatischen Verdau die Oozyten gründlich mit der calciumfreien OR₂-Lösung waschen. Für die Lagerung und Stabilisierung der Membran wurden die Oozyten anschließend in ND96-Lösung übergeführt. Nach einigen Stunden Inkubationszeit wurden runde, zweifarbige, unbeschädigte Oozyten im Reifestadium V-IV ($\varnothing = 1000-1200 \mu\text{M}$) unter dem Mikroskop für die Injektion ausgewählt (siehe Abbildung 17).



Abbildung 17: Weiblicher *Xenopus laevis*

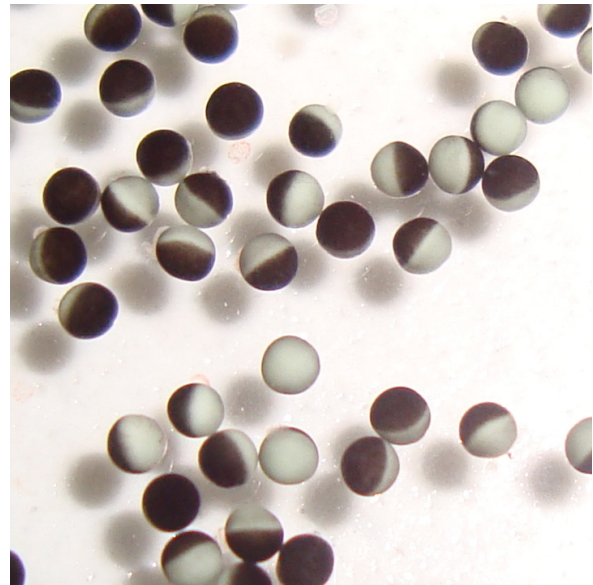


Abbildung 16: Oozyten des *Xenopus laevis* im Reifestadium V-VI

(A. Schöffmann, Dep. f. Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien, 2013)

5.1.2 Herstellung der cRNA

Ausgehend von einer linearisierten cDNA wurden Poly(A⁺)cRNA- Transkripte in einem pCMV-Vektor kloniert. Jede cRNA codierte für einen Subtyp der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors. Sie wurden in DEPC5 (Diethylpyrocarbonat) gelöst und bei -75 bis -80°C gelagert.

5.1.3 Injektion der cRNA

Beim Umgang mit RNA mussten stets Handschuhe getragen werden, um die Zersetzung durch den Kontakt mit RNase zu vermeiden. Die Untereinheiten wurden vor der Injektion für die gewünschte Rezeptorkombination gemischt. Die Konzentrationsverhältnisse wurden wie folgt gewählt: $\alpha_x\beta_{2/3}\gamma_{2s}$ 1:1:10, $\alpha_x\beta_1\gamma_{2s}$ 3:1:10, und $\alpha_x\beta_1$ 3:1. Nötige Zwischenverdünnungsstufen wurden mit RNase-freiem Wasser hergestellt. Mithilfe eines pneumatischen Injektionsgeräts wurde durch eine Glaskapillare mit einer kleinen Öffnung zuerst die cRNA-Mischung eingesaugt und jedem Oozyten wurden etwa 10-50 nl injiziert. Anschließend wurden die Oozyten für 24 Stunden bei 18° C in ND96+AB inkubiert. Abhängig von der Expression der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen konnten die Messungen in den nächsten Tagen vorgenommen werden.

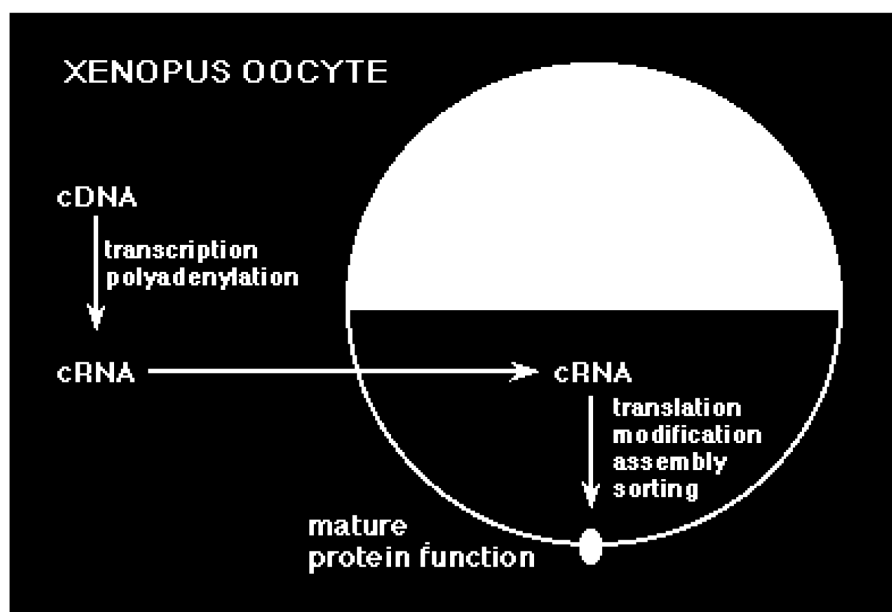


Abbildung 18: Entstehungsweg der GABA_A-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten ausgehend von der cDNA (<http://ibmmsrvlakitu.unibe.ch/sigel/xenopus.html>, 24.9.13)

5.1.4 Messlösungen

Von der zu untersuchenden Substanz wurde eine 50 mM Stammlösung in 100 % DMSO bereit. Um den Modulator in der Anwesenheit des Liganden GABA zu testen, wurde jeden Tag eine 1mM Stammlösung (5,15 mg GABA in 50 ml ND 96) hergestellt. Die Verdünnungen für die Messungen wurden ebenfalls jeden Tag frisch bereitete und maximal 3 Stunden nach der Herstellung verworfen. Sie durften eine DMSO-Konzentration von 0,3 % nicht überschreiten.

5.1.5 Perfusions-System

Die Messungen wurden in einer Testkammer eines schnellen Perfusions-Systems nach Hering (1998) durchgeführt. Der Aufbau und der Ablauf der Messungen werden in der Beschreibung zu Abbildung 19 erläutert.

5.1.1 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Der Versuchsaufbau der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik, die für die Messungen an den Oozyten verwendet wurde, ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt. Die Versuchsanordnung besteht aus einer intrazellulären Elektrode zur Messung des transmembranären Potentials, einem Rückkopplungsverstärker, der die Abweichung des tatsächlichen Potentials zum benötigten Potential (Haltepotential) misst, und aus einer zweiten, intrazellulären Elektrode, die den Strom, der nötig ist, um das Haltepotential zu erreichen bzw. konstant zu halten, in den Oozyten injiziert („voltage clamp“-Prinzip). Der Verstärker funktioniert nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung. Der Strom, der über die zweite Mikroelektrode injiziert wird, fließt mit umgekehrtem Vorzeichen zum Aktionsstrom, der von der Zellmembran generiert wird (Hille, 2001; Strommer, 2013).

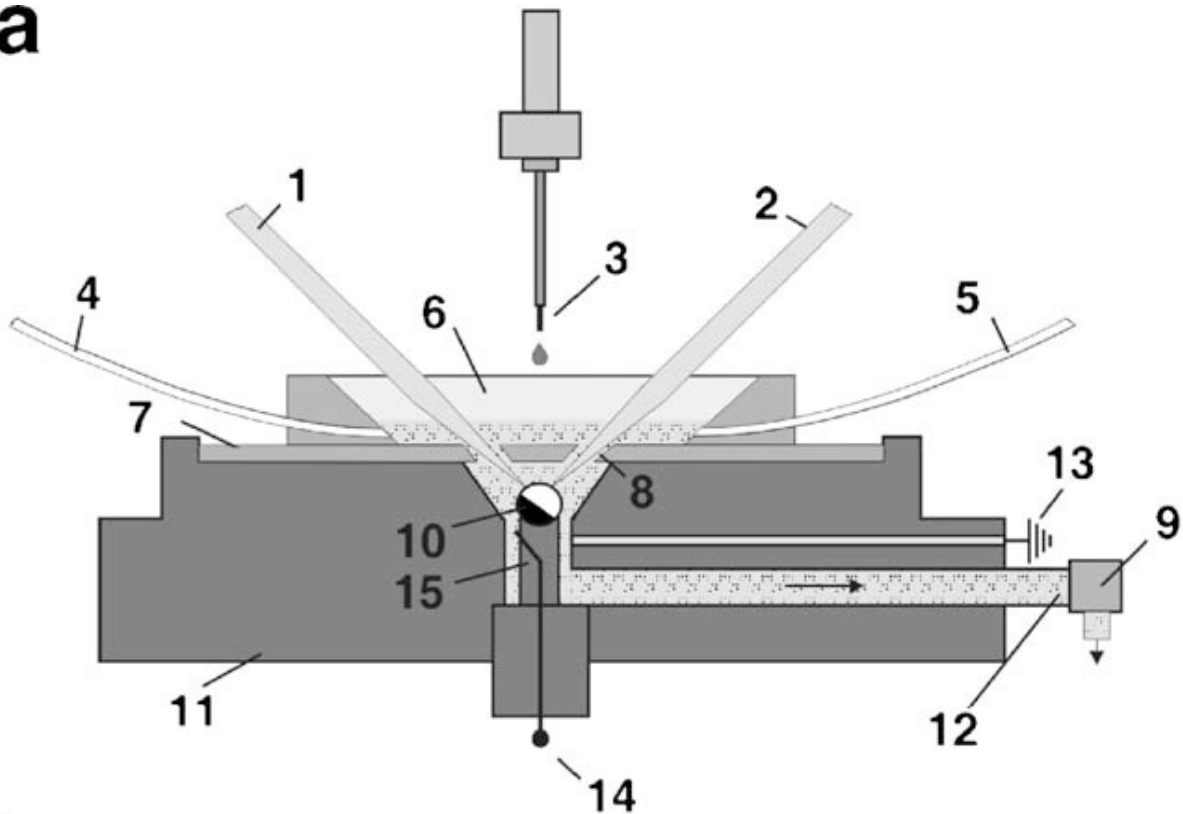
a

Abbildung 19: Längsschnitt durch das Perfusions-System

Der Oozyt (10) wird, umgeben von einer antibiotikafreien ND 96-Lösung, in eine vorgesehene Haltevorrichtung (15) gelegt und die Auffangwanne aus Quarz (6) über den Oozyten versetzt. 2 Mikroelektroden (1,2) werden durch die dafür vorgesehenen, schrägen Öffnungen (8) im Glasboden (7) der Auffangwanne in die Nähe des Oozyten platziert. Je 200 μL Lösung der zu untersuchenden Substanz werden über die Spitze des Roboterarms (3) in die Auffangwanne appliziert. Mithilfe einer Spritzpumpe wird die Flüssigkeit in der Kammer (11) über eine Abflussmöglichkeit (12) abgesaugt und der Testbereich kann mit ND 96 gewaschen werden. Die Waschlösungen werden ebenfalls über das gleiche System appliziert und abgesaugt. Vor der nächsten Applikation von Messlösung wird über die Trichterabflussstellen (4, 5) die restliche Flüssigkeit fast vollständig abgesaugt. Neben der Erdung (13) hat das Perfusions-System eine Referenzelektrode (14) (Baburin et al., 2006).

5.2 *In vivo* Untersuchungen

Die durchgeführten Untersuchungen wurden alle vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung zusammen mit dem europäischen Übereinkommen für den Schutz von Wirbeltieren, die für Versuche und andere wissenschaftlichen Zwecke verwendet werden, bewilligt (Europarat – SEV Nr. 123).

Alle beschriebenen praktischen Arbeiten wurden zusammen mit Frau Mag. Dr. Sophia Khom durchgeführt.

5.2.1 Auswahlkriterien und Pflege der Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an männlichen C57BL/6N Mäusen (Charles River Laboratories; Sulzfeld) durchgeführt. Das Ausschlusskriterium für weibliche Mäuse basiert auf schwankenden Estrogen- und Gestagenspiegeln durch den weiblichen Zyklus, die unter anderem einen Einfluss auf das Angstverhalten nehmen können (Walf und Frye, 2007). Die Versuchstiere waren während der Versuche drei bis sechs Monate alt. Je fünf Tiere wurden in Käfigen mit uneingeschränktem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Im Tierstall wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus durch eine Beleuchtungsperiode von 7 bis 19 Uhr simuliert. Die Temperatur betrug durchschnittlich 22°C und die Luftfeuchtigkeit $40 \pm 20\%$.

Um die Tiere an den Versuchsraum zu gewöhnen und eine individuell angepasste Dosierung der Versuchssubstanzen zu gewährleisten, wurden die Mäuse am Vortag der Untersuchung gewogen und anschließend in den Raum der Untersuchungen gebracht. Im Versuchsraum wurde in dieser Zeit derselbe Tag-Nacht-Rhythmus wie im Tierstall imitiert.

5.2.1.1 Herstellung

Von den zu untersuchenden Substanzen (JW-1 und Diazepam) wurde eine Stammlösung (1 mg/10 µl) in 100 % DMSO hergestellt.

Die Injektionslösungen wurden an jedem Versuchstag frisch bereitet. Die Substanz wurde in einer isotonen 0,9 % Natriumchlorid-Lösung gelöst. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden je 3 % Polysorbat 80 und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt.

5.2.1.2 Applikation

Die Versuchsmäuse wurden vor der Applikation getrennt voneinander in einen separaten Käfig gesetzt und anschließend wurden ihnen die Lösungen (Kontroll- bzw. Substanzlösung) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Untersuchungen fanden mit folgende Dosen JW-1 statt: 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10mg/kg und 30 mg/kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppe erhielt eine 0,9 %ige Natriumchloridlösung mit 3 % Polysorbat und 10 % DMSO.

5.2.2 Verhaltenspsychologie von Mäusen

Mäuse haben eine instinktive Abneigung gegenüber unbekannten Umgebungen, hellen, unbegrenzten Flächen und Höhen (Bourin und Hascoët, 2003; File, 2001). Wenn ein Tier auf ein neues Territorium stößt, muss es sich entscheiden, ob es die Umgebung aufgrund drohender Gefahren meidet, oder ob es seinem natürlichen Drang zu erkunden nachgibt (Bourin und Hascoët, 2003). Der Open-Field-Test und der Elevated-Plus-Maze-Test sind zwei wichtige Methoden, um das Angstverhalten und eine mögliche Sedierung von Mäusen zu untersuchen (File, 2001).

5.2.3 Elevated-Plus-Maze(EPM)-Test

Der Elevated-Plus-Maze Test ist eine einfach durchführbare Möglichkeit, das natürliche Angstverhalten von Mäusen zu bewerten. Versuche auf dem EPM liefern schon nach einer Testdauer von fünf Minuten validierte Ergebnisse (Walf und Frye, 2007).

5.2.3.1 Aufbau

Der EPM-Versuchsbereich ist ein plusförmiges Labyrinth, das etwa 90 cm über dem Boden steht. Zwei seitliche, sich gegenüber stehende Arme, sind offen. Die anderen beiden weisen eine schützende Wand auf, die etwa 15 cm hoch ist. Die Breite der Arme beträgt etwa 5 cm und sie sind ca. 30 cm lang. Die Arme sind in der Mitte über eine neutrale Zone mit einer Fläche von ungefähr 5x5 cm verbunden. Der gesamte Testbereich wird mit einer Lichtstärke von 180 Lux ausgeleuchtet, was mithilfe eines Luxmeters überprüft wird. Die offenen Arme bieten keinen Schutz und stellen für die Mäuse etwas Neues und Bedrohliches dar (File, 2001). Ein weiterer Faktor, der zu einem Angstverhalten beiträgt, ist die, für eine Maus,

beachtliche Höhe. Sie werden aufgrund ihrer Instinkte die Gefahr der offenen Arme eher meiden (Korte und De Boer, 2003).

5.2.3.2 Durchführung

Bevor die Versuchsreihe startete, wurden die Versuchsflächen gründlich mit 30 %igem Ethanol gereinigt und getrocknet, bis kein Alkohol mehr vorhanden war. Dieser Vorgang wurde nach jedem Versuch wiederholt. Nach der i.p. Applikation wurden die Mäuse für 30 Minuten in ihren Einzelkäfigen im Testraum verwahrt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Versuchstiere nacheinander in die neutrale Zone gesetzt. Das Gesicht musste dabei einem offenen Arm zugewandt sein. Mithilfe eines Videoüberwachungs-Systems (VideoMot 2) wurde das folgende Verhalten im EPM 5 Minuten lang aufgezeichnet. Anschließend konnten die Daten ausgewertet werden. Eventuell hinterlassener Urin und Fäzes während der Versuchszeit wurden vollständig entfernt und vermerkt.

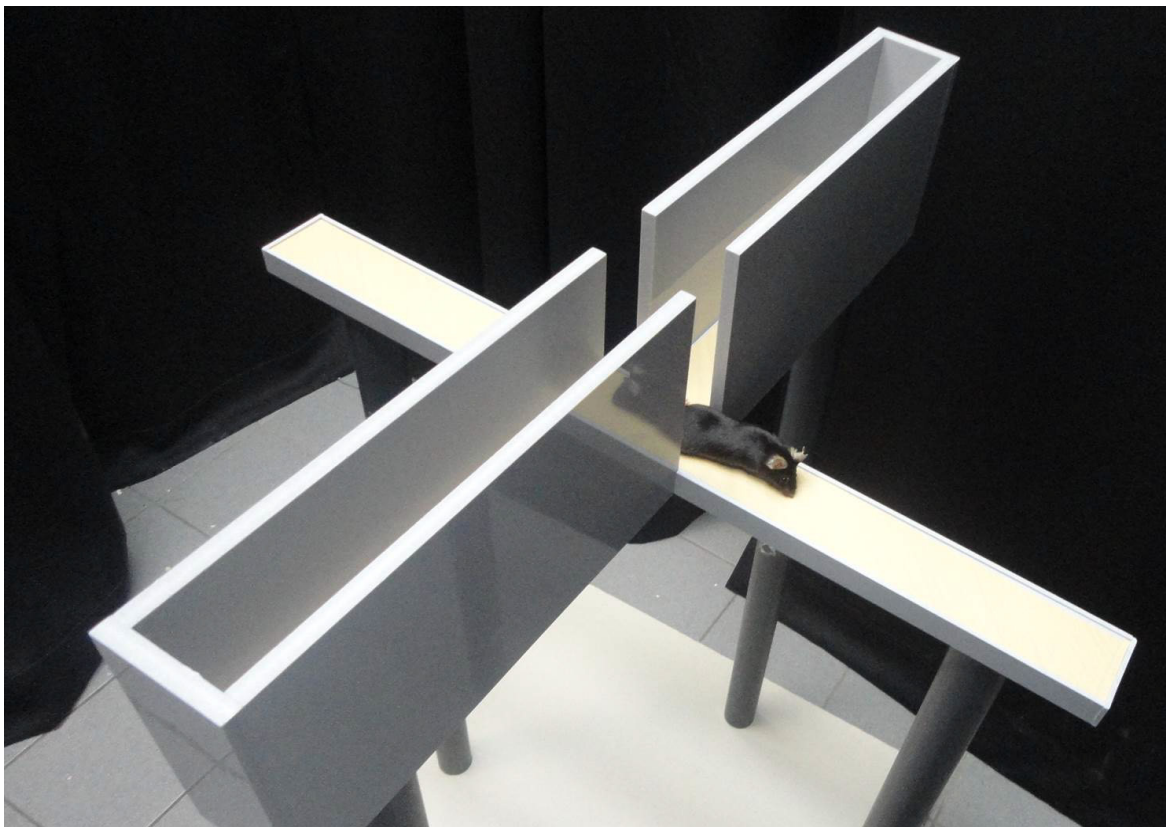


Abbildung 20: EPM mit Versuchstier

5.2.4 Open-Field (OF)-Test

Der OF-Test ist eine einfache Methode, um den Einfluss von Substanzen auf die Aktivität und das angstbezogene Verhalten von Mäusen zu testen, ohne die Versuchstiere zuvor zu konditionieren. Beim OF-Test gibt es, im Vergleich zum EPM-Test, keinen Einfluss durch für Mäuse unangenehme Höhen. Man konzentriert sich auf die Gesamtlaufstrecke der Maus, die bei Abnahme auf eine Sedierung hindeutet. Des Weiteren wird die Abneigung der Maus gegenüber hell erleuchteten und ungeschützten Flächen untersucht (Lambertsen et al., 2012).

5.2.4.1 Aufbau

Der Versuchsbereich ist eine ebene Fläche von 50x50 cm und wird durch eine Glaswand begrenzt. Er ist mit einer Lichtstärke von 150 Lux beleuchtet.

5.2.4.2 Durchführung

Es stehen acht OF-Kammern mit einer Aufzeichnungsmöglichkeit an der Universität zur Verfügung. Daher konnten acht Mäuse gleichzeitig getestet werden. Bevor die Versuchsreihe startete, wurden die Versuchsflächen gründlich mit 30 %igem Ethanol gereinigt und getrocknet, bis kein Alkohol mehr vorhanden war. Dieser Vorgang wurde nach jedem Versuch in jeder verwendeten Kammer wiederholt. Nach der i.p. Applikation wurden die Mäuse für 30 Minuten in ihren Einzelkäfigen gehalten. Nach Ablauf der Zeit wurden die Mäuse einzeln in die Mitte des Versuchsbereichs gesetzt. Die Aufzeichnung wurde über Infrarot-Sensoren aktiviert und über die Versuchszeit von 10 Minuten durchgeführt. Ein Trackingsystem (ActiMot 2) zeichnete die Laufstrecke der Mäuse auf und wertete sie aus. Auch hier wurden hinterlassener Urin und Fäzes dokumentiert und gründlich vor dem nächsten Experiment entfernt.

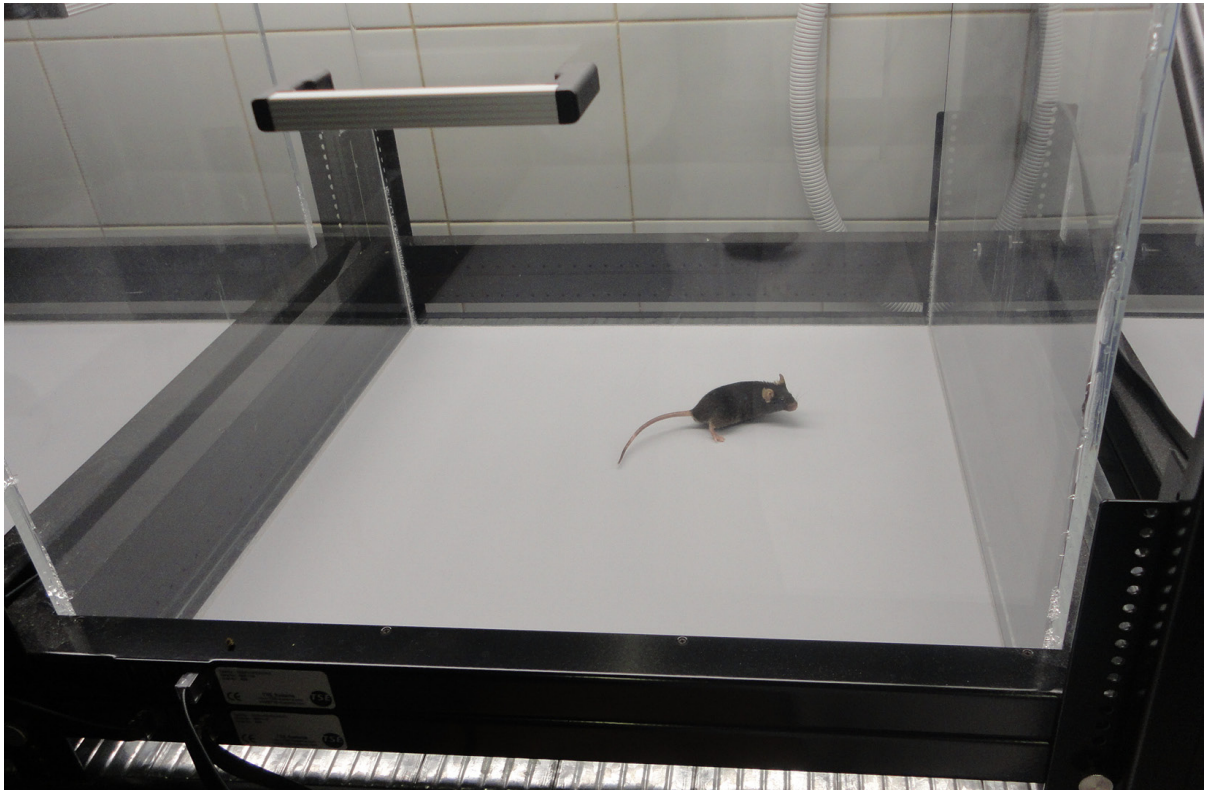


Abbildung 21: C57BL/6N Maus im OF

5.2.5 Statistische Auswertung der Versuche

Statistische Auswertung der *in vivo* Experimente erfolgte mittels Einweg-ANOVA mit anschließender Bonferroni post-hoc Analyse (Microsoft Office; Origin MicroCal). p-Werte $<0,05$ gelten als statistisch signifikant. Die Werte wurden als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

6 Aufgabenstellung

Angst- und Schlafstörungen, Epilepsie oder Schizophrenie sind weitverbreitete neurologische Erkrankungen, welche unter anderem auf Fehlfunktionen der GABAergen Neurotransmission zurückzuführen sind (Brickley und Mody, 2012). Die derzeit eingesetzten Arzneistoffe, wie beispielsweise Benzodiazepine, sind zwar sehr wirksam, besitzen aber aufgrund ihrer unselektiven Interaktion mit den verschiedenen GABA_A-Rezeptorsubtypen zahlreiche Nebenwirkungen (Amihăesei und Mungiu, 2012; Möhler, 2006). Ziel ist es daher, Subtyp-selektive Stoffe zu finden, wie zum Beispiel den β_2/β_3 -selektiven GABA_A-Rezeptor Ligand JW-0.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte ein neues Derivat JW-1 *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.

in vitro Charakterisierung:

- Expression von 7 verschiedenen GABA_A-Rezeptorsubtypen ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_3\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_5\beta_1\gamma_{2S}$) in *Xenopus laevis* Oozyten.
- Erstellung einer GABA-Konzentrations-Wirkungskurve für $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_3\beta_1$ - und $\alpha_3\beta_1\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Bestimmung der EC₅₀.
- Messung der konzentrationsabhängigen Modulation GABA-induzierter Chloridströme (I_{GABA} ; EC₃₋₇) durch die verschiedenen GABA_A-Rezeptorsubtypen durch JW-1 mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Bestimmung der EC₅₀ und E_{max}.

in vivo Charakterisierung:

Untersuchung des dosisabhängigen Effekts von JW-1 auf das explorative und Angst-bezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen 30 Minuten nach intraperitonealer Gabe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bzw. einer mit Diazepam-behandelten Gruppe im Open-Field (OF) und Elevated-Plus Maze (EPM) Test.

7 Ergebnisse

7.1 *In vitro* Resultate

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollten konzentrationsabhängige Modulationen von I_{GABA} durch JW-1 an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_1^-$, $\alpha_2\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_3\beta_1\gamma_{2S^-}$ und $\alpha_5\beta_1\gamma_{2S^-}$ -GABA_A-Rezeptoren mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht werden.

Da die Wirkung vieler GABA_A-Rezeptor-Modulatoren von der verwendeten GABA Konzentration abhängig ist, sollte zuvor ein pharmakologisches Profil von GABA_A-Rezeptoren erstellt werden.

7.1.1 Erstellung von Konzentrationswirkungskurven (KWK) für GABA an verschiedenen Rezeptorsubtypen

GABA_A Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_3\beta_1\gamma_{2S}$ wurden in Oozyten des *Xenopus laevis* exprimiert und die Induktion von Chloridströmen mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik nach Applikation ansteigender GABA-Konzentrationen gemessen. Für die Normierung der Amplitude wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Amplitude}_x}{\text{Amplitude}_{\text{max}}} \times 100$$

Amplitude_x... Amplitude der jeweiligen GABA-Konzentration

Amplitude_{max}... Amplitude induziert von 1mM GABA

Diese Werte wurden in ein Koordinatensystem eingetragen (Abbildung 22A/B; Abbildung 23). Durch die Datenpunkte wurde eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung gelegt. Anhand der Kurven konnten die EC₅₀-Werte (das ist jene Konzentration, die 50 % des Maximaleffekts auslöst) und EC₃₋₇-Werte (jene Konzentrationen, die 3-7 % des maximalen Effekts auslösen) abgelesen werden. Sie sind zusammen mit der Anzahl der Versuche n und dem Hill-Koeffizienten n_H in Tabelle 3 angeführt.

Rezeptorsubtypen	EC ₅₀ ; μM	EC ₃₋₇ ; μM	n _H	n
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	49.8 $\pm$ 2.35	6.0-9.5	1.6 $\pm$ 0.1	6
$\alpha_1\beta_{22S}$	52.1 $\pm$ 6.99	5.0-9.0	1.5 $\pm$ 0.2	5
$\alpha_3\beta_1$	84.9 $\pm$ 6.3	2.0 – 5.0	0.9 $\pm$ 0.04	6
$\alpha_3\beta_1\gamma_{2S}$	576.4 $\pm$ 23.9	55 – 100	1.4 $\pm$ 0.04	6

Tabelle 3: Resultate der GABA-Konzentrationswirkungskurven

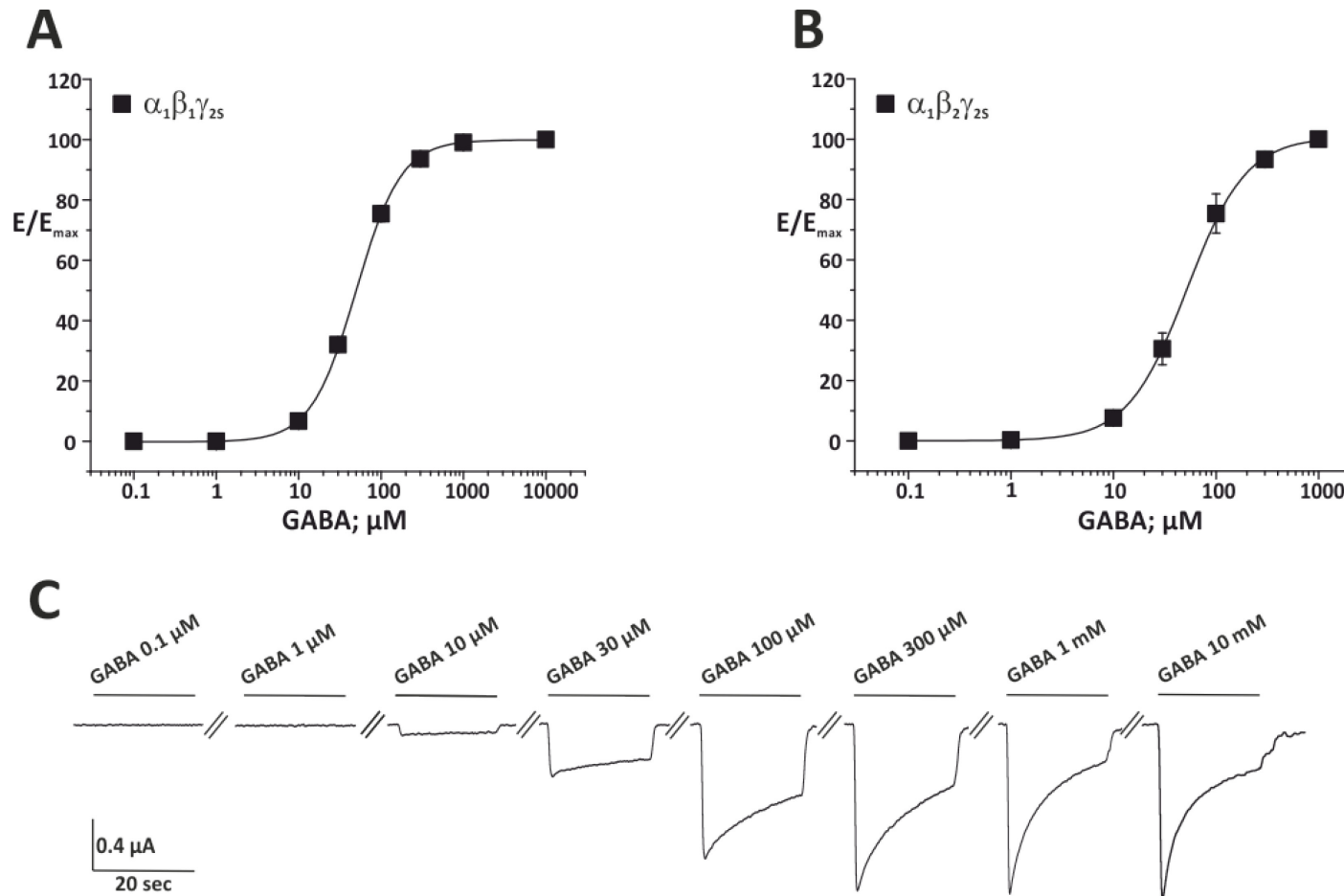


Abbildung 22: GABA-KWK an **(A)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{25}^-$, und **(B)** $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA_A-Rezeptoren, hervorgerufen durch induzierte Chloridströme (I_{GABA}) durch ansteigende GABA-Konzentrationen bis 10 mM. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert (MW) $\pm$ Standarderror (SEM) von mindestens 5 Versuchen an Oozyten von mindestens 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. **(C)** Abbildung typischer Experimente für I_{GABA} durch GABA_A-Rezeptoren nach Applikation ansteigender GABA-Konzentrationen bestehend aus $\alpha_1\beta_1\gamma_{25}$ -Untereinheiten.

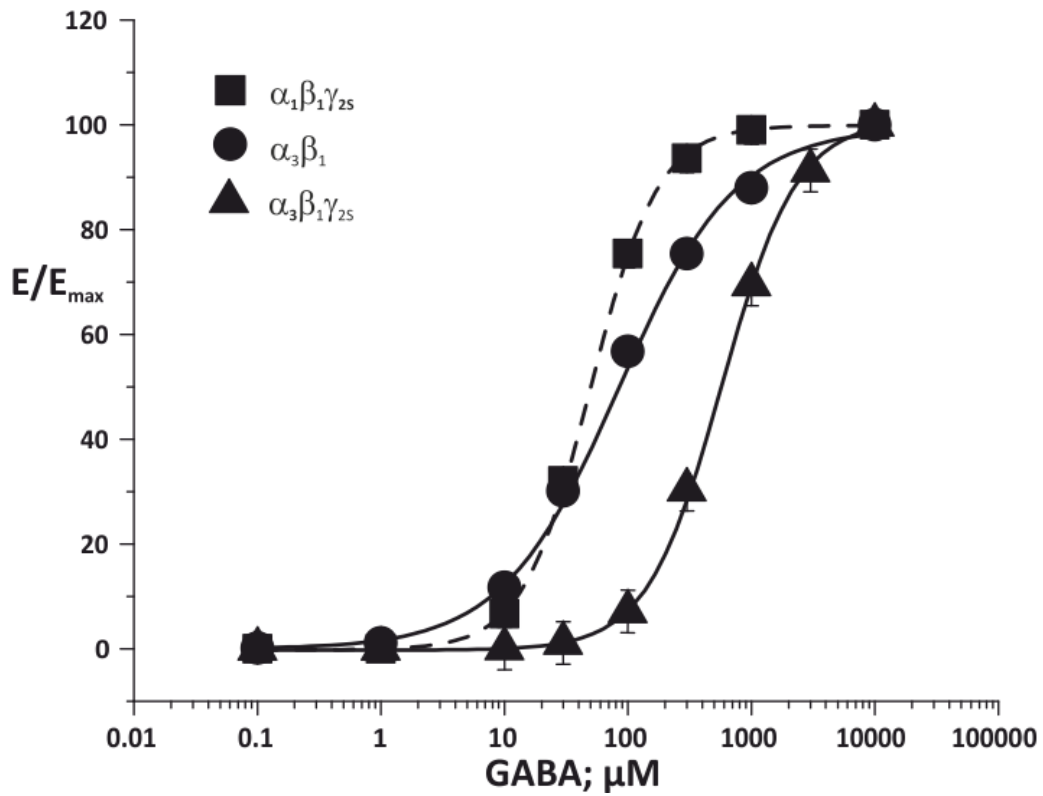


Abbildung 23: (A) GABA-KWK an (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{25}$ -, (●) $\alpha_3\beta_1$ - und (▲) $\alpha_3\beta_1\gamma_{25}$ -GABA_A-Rezeptoren, hervorgerufen durch induzierte Chloridströme ansteigender GABA-Konzentrationen bis 10 mM. Jeder Datenpunkt entspricht einem MW $\pm$ SEM von mindestens 5 Versuchen an Oozyten von mindestens 2 verschiedenen *Xenopus laevis*.

7.1.2 Untersuchung der β -Untereinheiten-abhängigen Modulation von I_{GABA} ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ Rezeptoren) durch JW-1

Wie in Abbildung 24 gezeigt wird, kam es nach Co-Applikation von GABA, entsprechend einer EC_{3-7} Konzentration, und ansteigenden Konzentrationen des Modulators JW-1 zu einer Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ -Rezeptoren.

Erste signifikante Effekte konnten bei $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$ -GABA_A-Rezeptoren bei einer Konzentration ≥ 1 μM ($p < 0.01$; $n=5$) beobachtet werden. Die maximale Potenzierung von I_{GABA} ($I_{\text{GABA-max}}$) betrug bei $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$ -GABA_A-Rezeptoren 897.0 ± 40.4 % ($n=5$), und die EC_{50} lag bei 10.5 ± 0.8 μM .

Die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ GABA_A-Rezeptoren waren schwächer ausgeprägt; erste signifikante I_{GABA} Modulationen waren erst bei Konzentrationen ≥ 10 μM ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ $p < 0.01$; $n=6$; $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ $p < 0.01$; $n=5$) zu messen. Die maximale Potenzierung betrug für $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ -Rezeptoren 682.9 ± 27.9 % ($n=6$) und die EC_{50} lag bei 36.8 ± 3.3 μM . Bei $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ -GABA_A-Rezeptoren war die maximale Potenzierung mit 557.3 ± 78.0 % ($n=5$) am schwächsten ausgeprägt, die EC_{50} lag bei 36.1 ± 9.7 % μM .

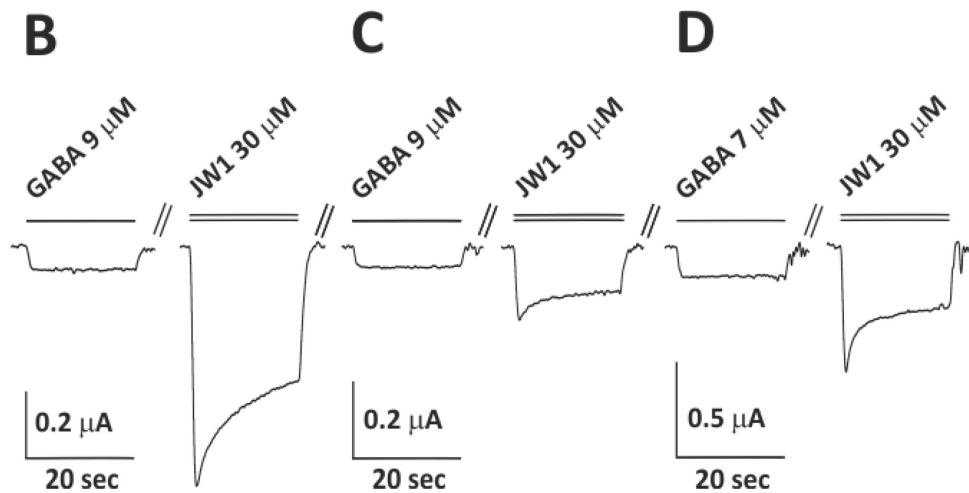
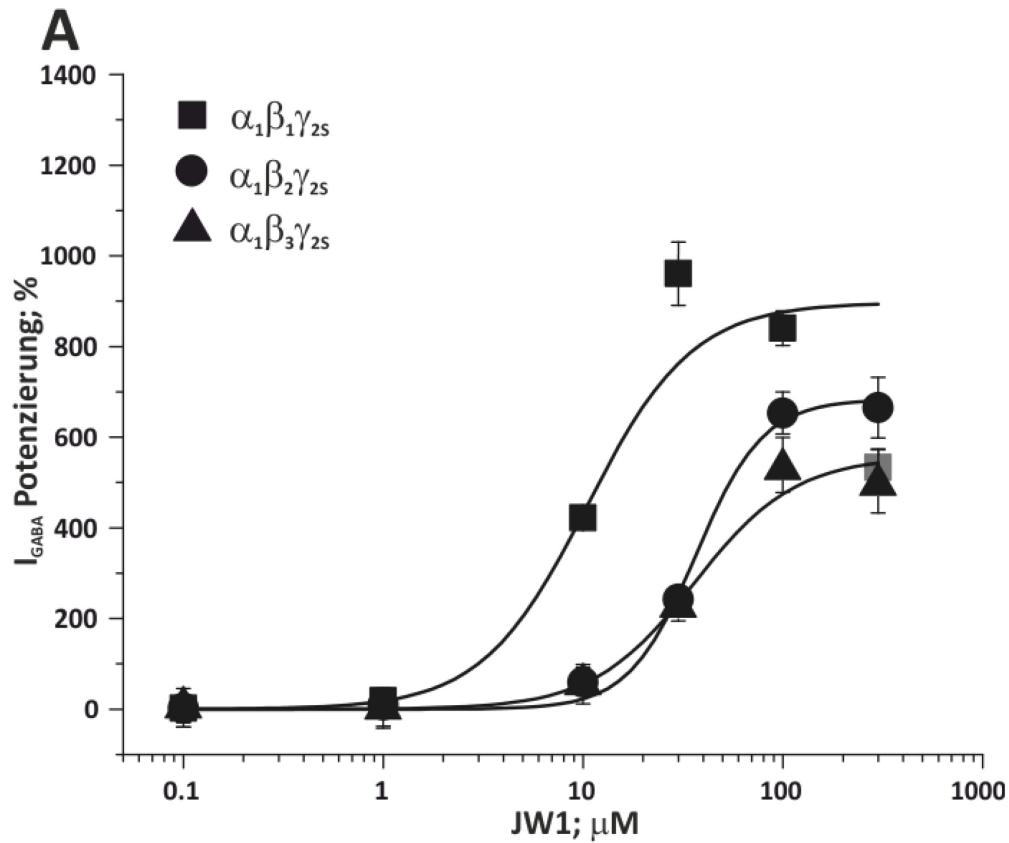


Abbildung 24: (A) Modulation von I_{GABA} an (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s^-}$, (●) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s^-}$ und (▲) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s^-}$ GABA_A-Rezeptoren durch JW-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem MW $\pm$ SEM von mindestens 5 verschiedenen Experimenten an Oozyten von mindestens 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Modulation von I_{GABA} bei 300 μM ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2s^-}$, grau markierter Datenpunkt) wurde beim Fit nicht berücksichtigt. GABA-EC₃₋₇-Konzentrationen (einfache Balken) weisen typische Modulationen durch 30 μM JW-1 (doppelter Balken) an (B) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s^-}$, (C) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s^-}$, und (D) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s^-}$ -Rezeptoren auf.

7.1.3 Untersuchung der α -Untereinheiten abhängigen Modulation von I_{GABA} ($\alpha_2\beta_1\gamma_{25^-}$, $\alpha_3\beta_1\gamma_{25^-}$ und $\alpha_5\beta_1\gamma_{25^-}$ -Rezeptoren) durch JW-1

Wie in Abbildung 25 gezeigt, kam es nach Co-Applikation von GABA (EC_{3-7}) und ansteigenden Konzentrationen des Modulators JW-1 zu einer Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha_2\beta_1\gamma_{25^-}$, $\alpha_3\beta_1\gamma_{25^-}$, und $\alpha_5\beta_1\gamma_{25^-}$ -Rezeptoren.

Für $\alpha_2\beta_1\gamma_{25^-}$ -GABA_A-Rezeptoren konnte bei einer Konzentration von $\geq 10 \text{ } \mu\text{M}$ ($p < 0.01$; $n=8$) signifikante I_{GABA} Potenzierung beobachtet werden. Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug $1124.4 \pm 136.2 \%$ ($n=5$) und die EC_{50} lag bei $13.5 \pm 2.7 \text{ } \mu\text{M}$.

Die erste signifikante Modulation für $\alpha_3\beta_1\gamma_{25^-}$ -Rezeptoren war bei einer Konzentration von $\geq 1 \text{ } \mu\text{M}$ ($p < 0.01$; $n=9$) zu sehen. Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug $945.6 \pm 35.3 \%$ ($n=9$), und die EC_{50} betrug $8.9 \pm 0.9 \text{ } \mu\text{M}$.

JW-1 führte ebenfalls zu signifikanter Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_5\beta_1\gamma_{25^-}$ -Rezeptoren bei einer Konzentration $\geq 1 \text{ } \mu\text{M}$ ($p < 0.05$; $n=6$). Die maximale Potenzierung von I_{GABA} betrug hier $1073.4 \pm 36.2 \%$ ($n=6$). Die EC_{50} liegt mit $16.3 \pm 1.1 \text{ } \mu\text{M}$ etwas höher als an $\alpha_1\beta_1\gamma_{25^-}$, $\alpha_2\beta_1\gamma_{25^-}$ und $\alpha_3\beta_1\gamma_{25^-}$ -GABA_A-Rezeptoren.

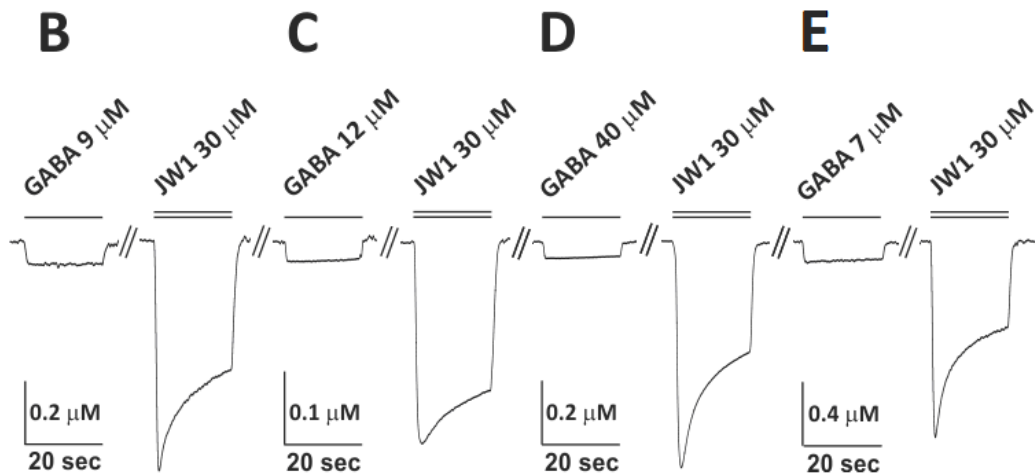
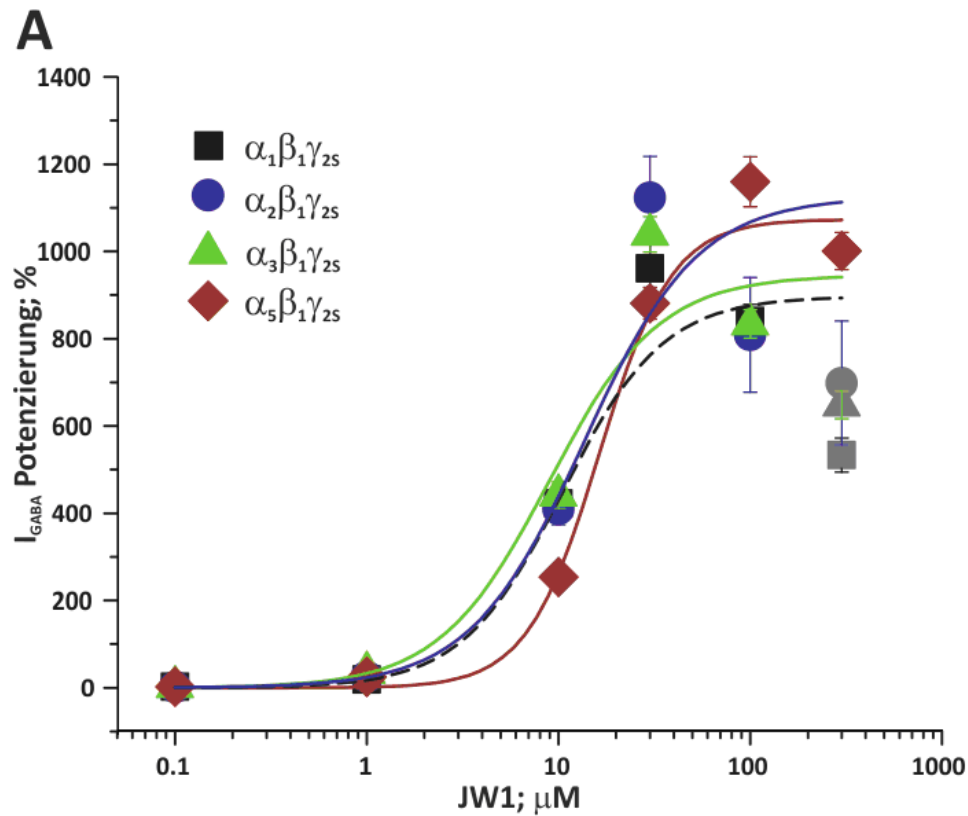


Abbildung 25: (A) Modulation von I_{GABA} an (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s^-}$, (●) $\alpha_2\beta_1\gamma_{2s^-}$, (▲) $\alpha_3\beta_1\gamma_{2s^-}$ und (◆) $\alpha_5\beta_1\gamma_{2s^-}$ -GABA_A-Rezeptoren durch JW-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem MW $\pm$ SEM von mindestens 5 verschiedenen Experimenten an Oozyten von mindestens 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Modulation von I_{GABA} bei 300 μM ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2s^-}$ / $\alpha_2\beta_1\gamma_{2s^-}$ / $\alpha_3\beta_1\gamma_{2s^-}$, grau markierte Datenpunkte) wurden beim Fit nicht berücksichtigt. GABA-EC₃₋₇-Konzentrationen (einfache Balken) weisen typische Modulationen durch 30 μM JW-1 (doppelter Balken) an **(B)** $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s^-}$, **(C)** $\alpha_2\beta_1\gamma_{2s^-}$, **(D)** $\alpha_2\beta_1\gamma_{2s^-}$, und **(E)** $\alpha_5\beta_1\gamma_{2s^-}$ -Rezeptoren auf.

7.1.4 Untersuchung der Abhängigkeit der I_{GABA} -Modulation von der Anwesenheit einer γ -Untereinheit

Um eine mögliche Abhängigkeit der positiven I_{GABA} Modulation durch JW-1 von der Coexpression von γ -Untereinheiten zu untersuchen, wurden Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_1$ -Untereinheiten exprimiert und die I_{GABA} Modulation durch diesen Rezeptorsubtyp untersucht. Wie in Abbildung 26 gezeigt, kam es nach Co-Applikation von GABA (EC_{3-7}) und ansteigenden Konzentrationen des Modulators JW-1 zu einer signifikanten Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1$ -Rezeptoren, wobei erste signifikante Effekte erst bei einer Konzentration $\geq 10 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$; $n = 5$) zu beobachten waren. Die maximale Potenzierung lag bei $1008.3 \pm 42.8 \%$ ($n = 5$), während die EC_{50} mit $24.9 \pm 1.6 \mu\text{M}$ höher als an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren lag.

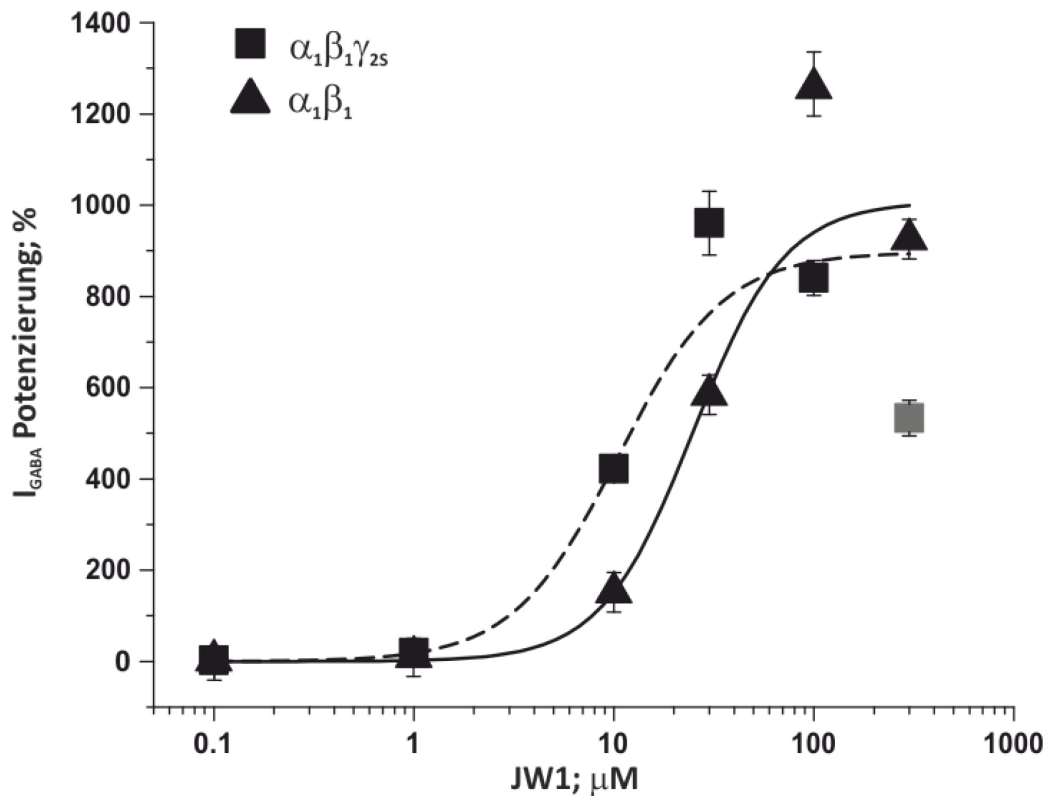


Abbildung 26: (A) Modulation von I_{GABA} an (■) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ - und (●) $\alpha_1\beta_1$ -GABA_A-Rezeptoren durch JW-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem $\text{MW} \pm \text{SEM}$ von mindestens 5 verschiedenen Experimenten an Oozyten von mindestens 2 verschiedenen *Xenopus laevis*. Modulation von I_{GABA} bei 300 μM ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, grau markierter Datenpunkt) wurde beim Fit nicht berücksichtigt.

7.2 In vivo Resultate

Nach der Untersuchung der Subtyp-abhängigen Modulation von I_{GABA} durch JW-1 mittels 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik, sollte in weiterer Folge der Effekt dieser Substanz auf das explorative und Angst-bezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen 30 min nach i.p. Gabe untersucht werden.

7.2.1 EPM-Test

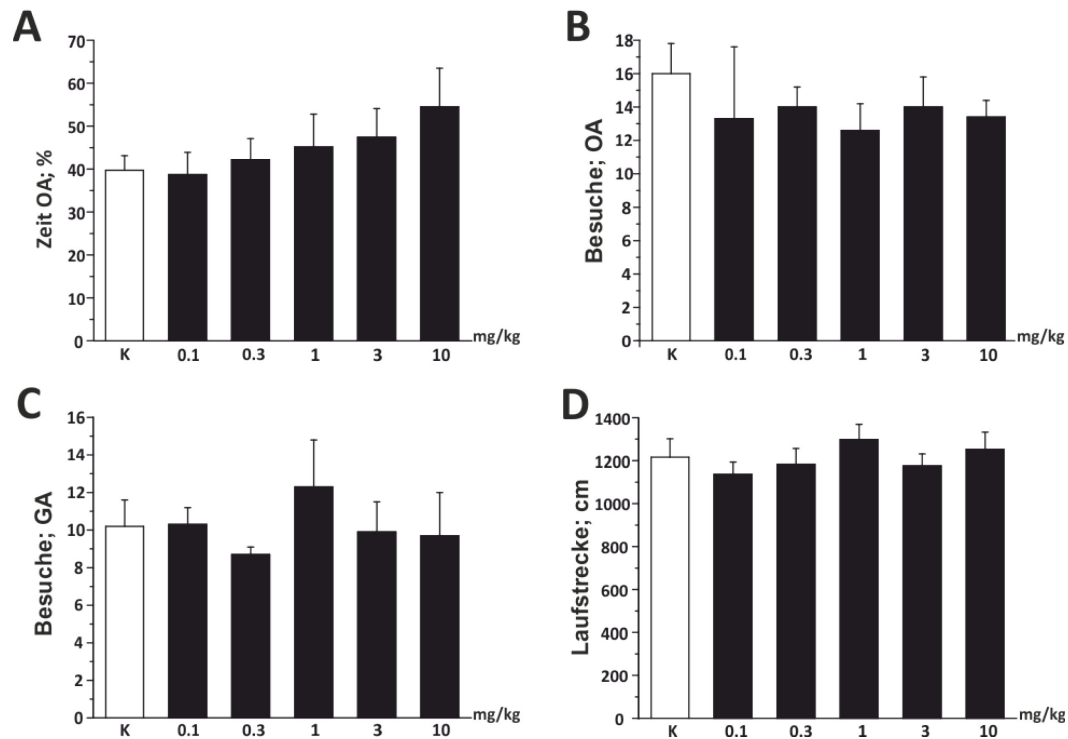


Abbildung 27: Darstellung der Ergebnisse im EPM nach Applikation von 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg und 10 mg/kg JW-1 in männlichen C57BL/6N Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe. Die Parameter sind als $MW \pm SEM$ angegeben.

(A) Prozentuelle Aufenthaltszeit der Mäuse in den offenen Armen

(B) Besuche der offenen Arme

(C) Besuche der geschlossenen Arme

(D) Gesamtlaufstrecke; cm

EPM nach 30 min					
	Zeit in den OA in %	Besuche der OA	Besuche der GA	Laufstrecke in cm	Anzahl der Versuchstiere
Kontrolle	39.7 ± 3.4	16 ± 1.8	10.2 ± 1.4	1216.4 ± 85.4	6
JW-1 0.1 mg/kg	38.7 ± 5.2	13.3 ± 4.3	10.3 ± 0.9	1137 ± 57.4	3
JW-1 0.3 mg/kg	42.2 ± 4.9	14 ± 1.2	8.7 ± 0.4	1182.8 ± 74.1	6
JW-1 1 mg/kg	45.2 ± 7.6	12.6 ± 1.6	12.3 ± 2.5	1298.2 ± 70.8	9
JW-1 3 mg/kg	47.4 ± 6.7	14 ± 1.8	9.9 ± 1.6	1175.8 ± 56.2	7
JW-1 10 mg/kg	54.5 ± 9	13.4 ± 1	9.7 ± 2.3	1252.8 ± 79.10	7

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse von 0.1 /0.3 /1 /3 und 10 mg/kg JW-1 im EPM Test 30 min nach i.p. Applikation in männlichen C57BL/6N Mäusen. Die erfassten Parameter sind in MW ± SEM angegeben.

Wie in Abbildung 27 A gezeigt, verbrachten Kontrolltiere 39.7 ± 3.4 %; n=6 der Gesamtzeit in den offenen Armen (OA) des EPMs. Kein signifikanter Effekt auf die Zeit in den OA konnte nach Applikation von 0.1 mg/kg JW-1 beobachtet werden (38.7 ± 5.2 %; n=3). Dagegen verbrachten Tiere ab Dosen ≥ 0.3 mg/kg JW-1 (42.2 ± 4.9 %, n=6), 1 mg/kg JW-1 (45.2 ± 7.6 ; n=9), 3 mg/kg JW-1 (47.4 ± 6.7 %; n=7) und 10 mg/kg JW-1 (54.5 ± 9 %; n=7) tendenziell mehr Zeit in den offenen Armen.

Abbildung 27 B-D veranschaulicht, dass es zu keiner signifikanten Änderung der Zahl der Besuche der OA (Abbildung 27 B), der geschlossenen Arme (GA) (Abbildung 27 C) und der Gesamtlaufstrecke (Abbildung 27 D) bei den untersuchten Dosierungen kam.

7.2.2 OF-Test

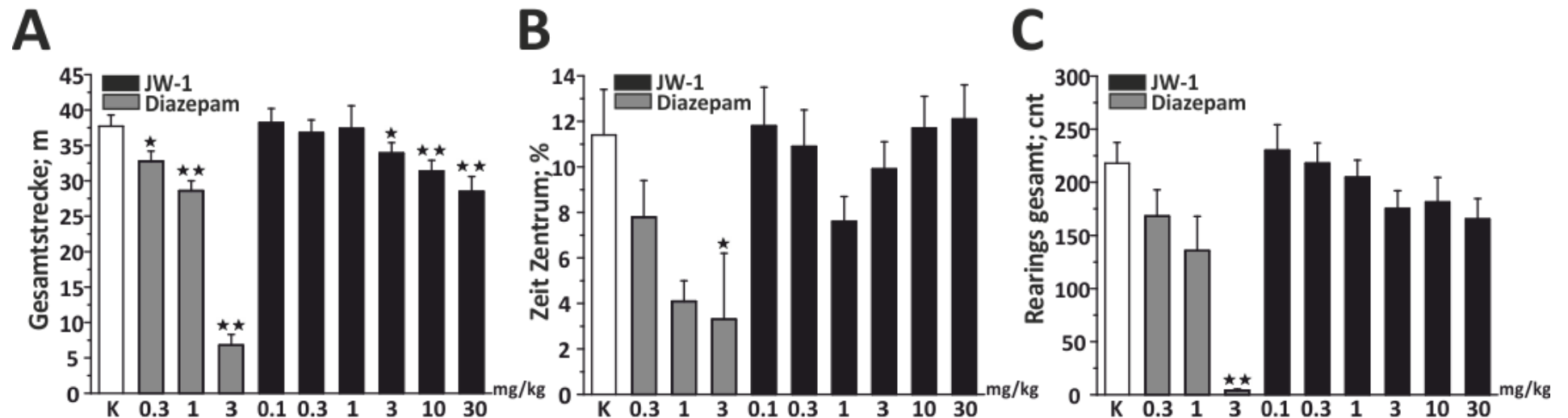


Abbildung 28: Darstellung der Ergebnisse im OF nach Applikation von 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg und 10 mg/kg JW-1 in männlichen C57BL/6N Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe und 0.3 mg/kg, 1 mg/kg und 3 mg/kg Diazepam. Die Parameter sind als MW $\pm$ SEM angegeben. Bei * liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0.05$, bei ** liegt eine signifikante Abweichung mit $p < 0.01$ vom Kontrollwert vor.

- (A) Gesamtlaufstrecke in m
- (B) Zeit im Zentrum in %
- (C) Rearings gesamt in cnt

OF nach 30 min				
	Gesamtstrecke in m	Zeit im Zentrum in %	Rearing in cnt	Anzahl der Versuchstiere
Kontrolle	37.7 ± 1.6	11.4 ± 2	217.9 ± 19.7	8
DZP 0.3 mg/kg	32.8 ± 1.4	7.8 ± 1.6	168.1 ± 24.9	12
DZP 1 mg/kg	28.6 ± 1.4	4.1 ± 0.9	135.6 ± 32.4	9
DZP 3 mg/kg	6.8 ± 1.5	3.3 ± 2.9	4.1 ± 1.2	9
JW-1 0.1 mg/kg	38.2 ± 2	11.8 ± 1.7	230.0 ± 24.2	10
JW-1 0.3 mg/kg	36.8 ± 1.8	10.9 ± 1.6	217.9 ± 19.2	17
JW-1 1 mg/kg	37.4 ± 3.2	7.6 ± 1.1	204.7 ± 16.2	20
JW-1 3 mg/kg	33.9 ± 1.5	9.9 ± 1.2	175.2 ± 16.9	19
JW-1 10 mg/kg	31.4 ± 1.5	11.7 ± 1.4	181.3 ± 23.3	14
JW-1 30 mg/kg	28.5 ± 2.1	12.1 ± 1.5	165.4 ± 19.3	13

Tabelle5: Zusammenfassung der Ergebnisse von 0.1/ 0.3/ 1/ 3/ 10 und 30 mg/kg JW-1, 0.3/ 1 und 3 mg/kg Diazepam im OF 30 min nach i.p. Applikation in männlichen C57BL/6N Mäusen. Die erfassten Parameter sind in MW ± SEM angegeben.

Wie in Abbildung 28 A zu sehen ist, legten mit Saline behandelte Kontrolltiere eine Strecke von 37.7 ± 1.6 m; n=8 im OF zurück. Ab einer Dosis von 3 mg/kg JW-1 kam es, im Vergleich zur Kontrollgruppe, zu einer signifikanten Reduktion (33.9 ± 1.5 m; n=19; $p<0.05$) der Gesamtlaufstrecke. Dieser Effekt war dosisabhängig (10 mg/kg JW-1 (31.4 ± 1.5 m; n=14; $p<0.05$)) und erreichte sein Maximum bei einer Dosis von 30 mg/kg (28.5 ± 2.1 m; n=13; $p<0.01$). Kein Effekt auf die Laufstrecke konnte bei niedrigen Dosierungen beobachtet werden (0.1 mg/kg (38.2 ± 2 m; n=10), 0.3 mg/kg (36.8 ± 1.8 m; n=17) und 1 mg/kg (37.4 ± 3.2 m; n=20)).

In der Diazepamgruppe waren erste signifikante Veränderungen der Gesamtlaufstrecke ab einer Dosis von 0.3 mg/kg zu sehen (32.8 ± 1.4 m; n=12; $p<0.05$). Bei den Dosierungen von 1 mg/kg (28.6 ± 1.4 m; n=9; $p<0.01$) und 3 mg/kg (6.8 ± 1.5 m; n=9; $p<0.01$) kam es zu weiteren signifikanten Abnahmen der Gesamtlaufstrecken.

Wie in Abbildung 28 B dargestellt, kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe ($11.4 \pm 2 \%$; $n=8$) bei keiner der untersuchten Dosierungen von JW-1 zu einer statistisch signifikanten Änderung der Zeit im Zentrum. Bei 0.3 mg/kg Diazepam ($7.8 \pm 1.6 \%$; $n=12$) und 1 mg/kg Diazepam ($4.1 \pm 0.9 \%$; $n=9$) waren ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Zeit im Zentrum zu sehen. Erst bei einer Dosis von 3 mg/kg nahm die Zeit im Zentrum statistisch signifikant ab ($3.3 \pm 2.9 \%$; $n=9$; $p<0.05$).

In Abbildung 28 C sind die gesamten Rearings (=vertikale Aktivität) der Kontrollgruppe, der verschiedenen JW-1-Dosierungen und der Diazepamgruppe zu sehen. Verglichen mit der Kontrollgruppe ($217.9 \pm 19.7 \text{ cnt}$; $n=8$) gab es weder bei 0.1 mg/kg JW-1 ($230.0 \pm 24.2 \text{ cnt}$; $n=10$), 0.3 mg/kg JW-1 ($217.9 \pm 19.2 \text{ cnt}$; $n=17$), 1 mg/kg JW-1 ($204.7 \pm 16.2 \text{ cnt}$; $n=20$), 3 mg/kg JW-1 ($175.2 \pm 16.9 \text{ cnt}$; $n=19$), 10 mg/kg JW-1 ($181.3 \pm 23.3 \text{ cnt}$; $n=14$) oder 30 mg/kg JW-1 ($165.4 \pm 19.3 \text{ cnt}$; $n=13$) statistisch signifikante Veränderungen.

Bei 0.3 mg/kg Diazepam ($168.1 \pm 24.9 \text{ cnt}$; $n=12$) und 1 mg/kg Diazepam ($135.6 \pm 32.4 \text{ cnt}$; $n=9$) waren ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen der Rearings zu sehen. Erst ab 3 mg/kg Diazepam ($4.1 \pm 1.2 \text{ cnt}$; $n=9$; $p<0.01$) sanken die Rearings im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant.

8 Diskussion

GABA_A-Rezeptoren zählen zu den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren im Gehirn der Säugetiere (Macdonald und Olsen, 1994). Eine Dysfunktion des GABAergen Systems kann zu diversen Erkrankungen wie Angststörungen, Schlafstörungen, Epilepsie oder Schizophrenie führen (Brickley und Mody, 2012). Dementsprechend wirken GABA_A-Rezeptor-Modulatoren anxiolytisch, sedierend, hypnotisch und muskelrelaxierend (Kamatchi und Rathanaswami, 2012). Die Modulatoren werden daher zur Behandlung der oben genannten Erkrankungen mit großem Erfolg eingesetzt (Brickley und Mody, 2012; Möhler, 2006). GABA_A-Rezeptoren setzen sich aus 5 Untereinheiten zusammen; bei der momentan bekannten Zahl an verschiedenen Rezeptoruntereinheiten sind viele Subtypen möglich. Tatsächlich wurden aber nur 11 Rezeptorsubtypen *in vivo* nachgewiesen (Olsen und Sieghart, 2009). Diese Rezeptoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Lokalisation, als auch ihrer Pharmakologie. Zum Beispiel kommen $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ -Rezeptoren vorwiegend im Cortex vor und vermitteln vor allem Effekte wie Sedierung. $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -Rezeptoren sind hingegen vor allem im limbischen System zu finden und spielen eine wichtige Rolle bei der durch GABA_A-Rezeptor-vermittelten Anxiolyse (Rudolph und Knoflach, 2011; Möhler, 2006).

Die meisten GABA_A-Rezeptor-Modulatoren, die momentan therapeutisch eingesetzt werden, unterscheiden wenig bis gar nicht zwischen den einzelnen Subtypen. Das bedeutet, dass zum Beispiel ein als Anxiolytikum eingesetztes Benzodiazepin über α_2 -hältige Rezeptoren den gewünschten therapeutischen Effekt erzielt, jedoch wegen seiner hohen Affinität zu Rezeptoren mit der α_1 -Untereinheit auch sedierend wirkt. Demnach sind die momentan verwendeten GABA_A-Rezeptor-Modulatoren zwar sehr effizient in der Therapie des jeweiligen Krankheitsbildes, aber in der Regel auch mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden (Amihäesei und Mungiu, 2012; Möhler, 2006). Daher versuchte man in den letzten Jahren Substanzen zu entwickeln, die Subtyp-selektiv agieren und damit zu einer Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen führen. Bislang sind wenige solcher subtyp-selektiven Substanzen identifiziert worden. Ein Beispiel für selektive Modulatoren sind Zolpidem, Zopiclone und Zaleplon, die zu GABA_A-Rezeptoren mit der α_1 -Untereinheit eine deutlich höhere Affinität als zu anderen α -Rezeptorsubtypen haben (Amihäesei und Mungiu, 2012; Rudolph und Knoflach, 2011).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte die Subtyp-Selektivität von JW-1, das Derivat eines $\beta_{2/3}$ -selektiven Modulators JW-0, untersucht werden und eine mögliche Veränderung der α - beziehungsweise β - Selektivität ermittelt werden.

Derivatisierung führt zu geänderter β -Selektivität

Um die Rolle der β -Untereinheit in der Modulation von I_{GABA} durch JW-1 zu untersuchen, wurden Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$, $\alpha_2\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_3\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_5\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_1$ in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert.

Wie in Abbildung 24 gezeigt wird, konnte die stärkste I_{GABA} Potenzierung und die höchste Potenz für Rezeptoren mit β_1 -Untereinheiten beobachtet werden. Signifikant schwächere Wirkungen wurden für Rezeptoren mit $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$: $p<0.002$; $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$: $p<0.005$) gemessen. Besonders auffällig war hier, dass nicht nur die maximale Potenzierung, sondern auch die Potenz signifikant beeinflusst war (EC_{50} : $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$: $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ $p<0.001$; $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$: $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ $p<0.05$).

JW-1 zeigt keine $\alpha_{1/2/3}$ -Selektivität, unterscheidet sich allerdings an α_5

Anders als bei der β -Untereinheit weist JW-1 keine Präferenz für die $\alpha_{1/2/3}$ -Rezeptorsubtypen auf. Alle drei Rezeptorsubtypen werden in vergleichbarem Ausmaß von JW-1 moduliert und auch die EC_{50} unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 25).

Allerdings waren I_{GABA} Potenzierungen an Rezeptoren mit der α_5 -Untereinheit signifikant höher, als an α_1 -($p<0.01$) und α_3 -Rezeptorsubtypen ($p<0.05$). Die Potenz hingegen war verglichen mit α_1 -($p<0.002$) und α_3 -Untereinheiten ($p<0.001$) signifikant geringer. Im Vergleich zu α_2 -haltigen Rezeptoren wiesen α_5 -Rezeptorsubtypen keine signifikanten Abweichungen in der Potenzierung und EC_{50} auf.

Der positiv modulatorische Effekt von JW-1 wird nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt

Um zu untersuchen, ob JW-1 mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle interagiert, wurden Rezeptoren ohne der γ -Untereinheit ($\alpha_1\beta_1$) exprimiert und die I_{GABA} Modulation durch JW-1 untersucht. Die Potenzierung von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_1$ - beziehungsweise $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (siehe Abbildung 26) unterschied sich nicht signifikant, jedoch konnte eine deutlich höhere

Affinität zu $\alpha_1\beta_1\gamma_{25}$ Rezeptoren beobachtet werden. Ob der Effekt somit teils über die Benzodiazepin-Bindungsstelle, die sich zwischen der α - und γ -Untereinheit befindet (Sigel und Buhr, 1997), vermittelt wird, ist noch nicht bekannt. In weiterführenden Experimenten sollte jedoch untersucht werden, ob der Effekt durch den allosterischen Antagonisten an der Benzodiazepin-Bindungsstelle Flumazenil blockiert werden kann.

JW-1 wirkt sedierend, aber kaum anxiolytisch in Mäusen

Substanzen, die GABA_A-Rezeptoren positiv modulieren, wirken in der Regel unter anderem anxiolytisch und sedierend (Kamatchi und Rathanaswami, 2012). Daher wurde auch untersucht, wie sich JW-1 auf das angstbezogene Verhalten, beziehungsweise die Aktivität von C57BL/6N Mäusen auswirkt. Zuerst wurde der Effekt auf das Angstverhalten im EPM untersucht. Dabei zeigte sich, dass JW-1 vermutlich anxiolytische Wirkung bei einer Dosis von 1 mg/kg aufweist. Im Open-Field-Test dagegen konnte eine signifikante Reduktion der Gesamtlaufstrecke der Tiere ab Dosen von 3 mg/kg im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Dieses Verhalten wird allgemein als Sedierung interpretiert. Dabei war besonders interessant, dass bei Mäusen, die mit Diazepam behandelt wurden, eine deutlich stärkere Sedierung zu beobachten war.

Dies und die Ergebnisse der *in vitro* Versuche lassen vermuten, dass die schwächere Sedierung möglicherweise auf die reduzierte Interaktion mit β_2 -hältigen Rezeptoren zurückzuführen ist.

In dem Zusammenhang wäre es natürlich sehr interessant zu wissen, in wie weit der stärkere Effekt an β_1 -hältigen Rezeptoren die Änderung des Verhaltens der Tiere beeinflusst. Momentan ist nämlich die Rolle von β_1 -Rezeptorsubtypen bei der Vermittlung der verschiedenen Arzneimittelwirkungen noch nicht bekannt. Zusammengefasst kann somit gesagt werden, dass im Fall von JW-1 durch Derivatisierung keine Verstärkung der $\beta_{2/3}$ Selektivität erzielt werden konnte. Im Gegenteil, es kam zu einer Subtyp-Selektivitätsumkehr. Zusätzlich wirkt JW-1, anders als aufgrund der Subtyp-Selektivität vermutet, leicht anxiolytisch und sedierend. Die molekularen Determinanten für diese Effekte sind momentan noch nicht bekannt.

9 Zusammenfassung

Hintergrund: Die γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Wirbeltieren und bindet neben metabotropen GABA_B-Rezeptoren an ionotrope GABA_A-Rezeptoren. Eine Fehlfunktion der GABAergen Neurotransmission kann zu Erkrankungen, wie Angst- oder Schlafstörungen, Epilepsie oder Schizophrenie führen. Die derzeit verwendeten Arzneistoffe sind vorwiegend positive Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren wie die Benzodiazepine, die aufgrund ihrer anxiolytischen, sedierenden, muskelrelaxierenden und antikonvulsiven Aktivität verschrieben werden. Sie sind sehr effizient, haben allerdings durch ihre unselektive Interaktion mit den verschiedenen GABA_A-Rezeptorsubtypen zahlreiche Nebenwirkungen. Deshalb wird nach möglichst selektiven Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren gesucht.

Ziel: Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Subtyp-selektive Potenzierung von JW-1 (ein Derivat des $\beta_{2/3}$ -selektiven Naturstoffes JW-0) am GABA_A-Rezeptor bestimmt, beziehungsweise die Auswirkung der Rezeptormodulation auf das Angst-bezogene Verhalten und die Aktivität von Mäusen untersucht werden.

Methode: *In vitro:* Expression von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$, $\alpha_2\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_3\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_5\beta_1\gamma_{2S^-}$, und $\alpha_1\beta_1$ -GABA_A-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten und Untersuchung der Modulation von I_{GABA} mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik.

In vivo: Untersuchung des Verhaltens von C57BL/6N Mäusen im Elevated-Plus-Maze-beziehungsweise Open-Field-Test 30 Minuten nach intraperitonealer Applikation von JW-1.

Ergebnisse und Diskussion: Die Derivatisierung führt, im Vergleich zum Ausgangsstoff JW-0, zu einer veränderten β -Selektivität (Modulation von β_1 -Rezeptoren > β_2 -Rezeptoren > β_3 -Rezeptoren). JW-1 unterscheidet nicht zwischen α_1 -, α_2 - oder α_3 -Rezeptoren, weist jedoch eine signifikant reduzierte Potenz beziehungsweise Wirkstärke an α_5 -Rezeptoren auf. Der positiv modulatorische Effekt von JW-1 wird nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt. Im Tiermodell wirkt JW-1 sedierend, aber kaum anxiolytisch. Diese Substanz veranschaulicht deutlich, wie kleine strukturelle Änderungen eines Moleküls zu völlig neuen Wirkprofilen führen können.

10 Abstract

Background: γ -Aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain interacting with metabotropic GABA_B-receptors and ionotropic GABA_A-receptors. Dysfunction of the GABAergic neurotransmission is associated with anxiety and sleep disorders, epilepsy, or schizophrenia. These diseases are commonly treated by application of positive modulators of GABA_A-receptors, such as benzodiazepines. Benzodiazepines are anxiolytic, sedative, muscle-relaxant and anticonvulsant and are thus first-line therapy. Benzodiazepines are efficient; however, due to their unselective interaction with GABA_A-receptor-subtypes they display a plethora of unwanted side effects. Therefore, there is a medical need for subtype-selective GABA_A-receptor modulators.

Purpose: To analyse the subtype-selective modulation of GABA-induced currents (I_{GABA}) by JW-1 (derivative of the $\beta_{2/3}$ -selective compound JW-0) and to study the effect of this compound on locomotor activity and anxiety-related behavior in mice.

Methods: *In vitro:* Expression of $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$, $\alpha_2\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_3\beta_1\gamma_{2S^-}$, $\alpha_5\beta_1\gamma_{2S^-}$, and $\alpha_1\beta_1$ -GABA_A-receptors in *Xenopus laevis* oocytes and analysis of the modulation of I_{GABA} by means of the 2-microelectrode-voltage-clamp-technique.

In vivo: Analysis of the behavior of C57BL/6N mice in the Elevated-Plus-Maze- and the Open-Field-Test 30 minutes after intraperitoneal application of JW-1.

Results and Discussion: Derivatisation of JW-0 to JW-1 resulted in a completely changed subtype-selectivity: while JW-0 selectively interacts with $\beta_{2/3}$ GABA_A-receptors, JW-1 modulates most efficiently and potently β_1 -containing receptors ($\beta_1 > \beta_2 > \beta_3$). JW-1 does not discriminate between receptors containing $\alpha_{1/2/3}$ -subunits, however, a significantly reduced potency and efficiency was observed for α_5 -receptors. The positive modulatory effect is not mediated via the benzodiazepine binding pocket. JW-1 induces sedation, but only slight anxiolytic effects in mice. JW-1 is a good example of how structural modifications result in completely new pharmacological agents.

11 Literaturverzeichnis

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

Abernethy DR, Greenblatt DJ, Morse DS and Shader RI (1985) Interaction of propoxyphene with diazepam, alprazolam and lorazepam. *Br J Clin Pharmacol* 19:51-7.

Aktories Klaus, Förstermann Ulrich, Hofmann Franz und Starke Klaus (2009) *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 10., überarbeitete Auflage*, Urban & Fischer, München

Aishima M, Tomoda T, Yunoki T, Nakano T, Seki N, Yonemitsu Y, Sueishi K, Naito S, Ito Y, Teramoto N (2006) Actions of ZD0947, a novel ATP-sensitive K⁺ channel opener, on membrane currents in human detrusor myocytes. *Br J Pharmacol.* 149(5):542-50.

Amihaesei IC and Mungiu OC (2012) Main neuroendocrine features and therapy in primary sleep troubles. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 116:862-6.

Amin J and Weiss DS (1993) GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 366:565-9.

Anderson KN and Shneerson JM (2009) Drug treatment of REM sleep behavior disorder: the use of drug therapies other than clonazepam. *J Clin Sleep Med* 5:235-9.

Ator NA, Grant KA, Purdy RH, Paul SM and Griffiths RR (1993) Drug discrimination analysis of endogenous neuroactive steroids in rats. *Eur J Pharmacol* 241:237-43.

Attia MI, Herdeis C and Brauner-Osborne H (2013) GABAB-Agonistic Activity of Certain Baclofen Homologues. *Molecules* 18:10266-84.

Baburin I, Beyl S and Hering S (2006) Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch* 453:117-23.

Baldwin DS, Ajel K, Masdrakis VG, Nowak M and Rafiq R (2013) Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: an update. *Neuropsychiatr Dis Treat* 9:883-92.

Bali M and Akabas MH (2007) The location of a closed channel gate in the GABAA receptor channel. *J Gen Physiol* 129:145-59.

Baumann SW, Baur R and Sigel E (2002) Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem* 277:46020-5.

Bek T and Holmgaard K (2012) GABA-induced relaxation of porcine retinal arterioles in vitro depends on inhibition from the perivascular retina and is mediated by GABAC receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:3309-15.

Benes FM, Todtenkopf MS, Logiotatos P and Williams M (2000) Glutamate decarboxylase(65)-immunoreactive terminals in cingulate and prefrontal cortices of schizophrenic and bipolar brain. *J Chem Neuroanat* 20:259-69.

- Benson** JA, Low K, Keist R, Mohler H and Rudolph U (1998) Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett* 431:400-4.
- Bittles** AH, Bower C, Hussain R and Glasson EJ (2007) The four ages of Down syndrome. *Eur J Public Health*. 17(2):221-5.
- Boileau** AJ, Newell JG and 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(4):2931-7.
- Bourin** M and Hascoët M (2003) The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*. 463(1-3):55-65.
- Brawek** B, Löffler M, Weyerbrock A and Feuerstein TJ (2009) Effects of gabapentin and pregabalin on K+-evoked 3H-GABA and 3H-glutamate release from human neocortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379:361-9.
- Brickley** SG and Mody I (2012) Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron*. 73(1):23-34.
- Cao** J, Barbosa JM, Singh N and Locy RD (2013) GABA transaminases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* complement function in cytosol and mitochondria. *Yeast* 30:279-89.
- Cellot** G and Cherubini E (2013) Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Front Neural Circuits* 7:136.
- Chisari** M, Eisenman LN, Covey DF, Mennerick S and Zorumski CF (2010) The sticky issue of neurosteroids and GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 33:299-306.
- Clemmensen** L, Vernal DL and Steinhausen HC (2012) A systematic review of the long-term outcome of early onset schizophrenia. *BMC Psychiatry* 12:150.
- Curtis** DR, Game CJ, Johnston GA, McCulloch RM and MacLachlan RM (1972) Convulsive action of penicillin. *Brain Res* 43:242-5.
- Danneberg** P and Weber KH (1983) Chemical structure and biological activity of the diazepines. *Br J Clin Pharmacol* 16 Suppl 2:231S-244S.
- Datta** S and MacLean RR (2007) Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 31:775-824.
- Davies** M (2003) The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* 28:263-74.
- Delorenzo** RJ, Sun DA and Deshpande LS (2005) Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 105:229-66.
- Earl** DE and Tietz EI (2011) Inhibition of recombinant L-type voltage-gated calcium channels by positive allosteric modulators of GABAA receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 337(1):301-11.
- Earnheart** JC, Schweizer C, Crestani F, Iwasato T, Itohara S, Mohler H and Luscher B (2007) GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J Neurosci* 27:3845-54.

- Ebert B**, Thompson SA, Saounatsou K, McKernan R, Krogsgaard-Larsen P and Wafford KA (1997) Differences in agonist/antagonist binding affinity and receptor transduction using recombinant human gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol* 52:1150-6.
- Egawa K** and Fukuda A (2013) Pathophysiological power of improper tonic GABAA conductances in mature and immature models. *Front Neural Circuits*. 24;7:170.
- Ekinici O** and Ekinici A (2013) Association between insight, cognitive insight, positive symptoms and violence in patients with schizophrenia. *Nord J Psychiatry* 67:116-23.
- Elms J**, Powell KL, van Raay L, Dedeurwaerdere S, O'Brien TJ and Morris MJ (2013) Long-term valproate treatment increases brain neuropeptide y expression and decreases seizure expression in a genetic rat model of absence epilepsy. *PLoS One* 8:e73505.
- Engel J, Jr.** (1995) Concepts of epilepsy. *Epilepsia* 36 Suppl 1:S23-9.
- Escamilla MA** (2001) Diagnosis and treatment of mood disorders that co-occur with schizophrenia. *Psychiatr Serv* 52:911-9.
- File SE** (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 125:151-7.
- Frankel WN** (2009) Genetics of complex neurological disease: challenges and opportunities for modeling epilepsy in mice and rats. *Trends Genet* 25:361-7.
- Furutani K**, Ohno Y, Inanobe A, Hibino H and Kurachi Y (2009) Mutational and in silico analyses for antidepressant block of astroglial inward-rectifier Kir4.1 channel. *Mol Pharmacol*. 75(6):1287-95.
- Ganguly K**, Schinder AF, Wong ST and Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521-32.
- Garcia PS**, Kolesky SE and Jenkins A (2010) General anesthetic actions on GABA(A) receptors. *Curr Neuropharmacol* 8:2-9.
- Goldschen-Ohm MP**, Wagner DA, Petrou S and Jones MV (2010) An epilepsy-related region in the GABA(A) receptor mediates long-distance effects on GABA and benzodiazepine binding sites. *Mol Pharmacol* 77:35-45.
- Gonzalez MI** (2013) The possible role of GABAA receptors and gephyrin in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 7:113.
- Green MA** and Halliwell RF (1997) Selective antagonism of the GABA(A) receptor by ciprofloxacin and biphenylacetic acid. *Br J Pharmacol* 122:584-90.
- Grill MF** and Maganti RK (2011) Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *Br J Clin Pharmacol* 72:381-93.
- Guettg N**, Abdel Aziz S, Holbro N, Turecek R, Rose T, Seddik R, Gassmann M, Moes S, Jenoe P, Oertner TG, Casanova E and Bettler B (2010) NMDA receptor-dependent GABAB receptor internalization via CaMKII phosphorylation of serine 867 in GABAB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13924-9.
- Gurley D**, Amin J, Ross PC, Weiss DS and White G (1995) Point mutations in the M2 region of the alpha, beta, or gamma subunit of the GABAA channel that abolish block by picrotoxin. *Receptors Channels* 3:13-20.

- Gutierrez** DV, Mark MD, Maseck O, Maejima T, Kuckelsberg D, Hyde RA, Krause M, Kruse W and Herlitze S (2011) Optogenetic control of motor coordination by Gi/o protein-coupled vertebrate rhodopsin in cerebellar Purkinje cells. *J Biol Chem* 286:25848-58.
- Haefely** W (1984) Benzodiazepine interactions with GABA receptors. *Neurosci Lett* 47:201-6.
- Hanson** SM and Czajkowski C (2008) Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. *J Neurosci* 28:3490-9.
- Heaulme** M, Chambon JP, Leyris R, Molimard JC, Wermuth CG and Biziere K (1986) Biochemical characterization of the interaction of three pyridazinyl-GABA derivatives with the GABAA receptor site. *Brain Res* 384:224-31.
- Helms** CM, Rossi DJ and Grant KA (2012) Neurosteroid influences on sensitivity to ethanol. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:10.
- Hering** S (1998) Small-volume and rapid extracellular solution exchange around *Xenopus* oocytes during voltage-clamp recordings. *Pflugers Arch.* 436(2):303-7.
- Herman** MA, Contet C, Justice NJ, Vale W and Roberto M (2013) Novel subunit-specific tonic GABA currents and differential effects of ethanol in the central amygdala of CRF receptor-1 reporter mice. *J Neurosci* 33:3284-98.
- Hill-Venning** C, Belelli D, Peters JA and Lambert JJ (1997) Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Br J Pharmacol.* 120(5):749-56.
- Hosie** AM, Wilkins ME, da Silva HM and Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444:486-9.
- Jacob** TC, Moss SJ and Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9:331-43.
- Jacobs** J, Staba R, Asano E, Otsubo H, Wu JY, Zijlmans M, Mohamed I, Kahane P, Dubeau F, Navarro V and Gotman J (2012) High-frequency oscillations (HFOs) in clinical epilepsy. *Prog Neurobiol* 98:302-15.
- Kamatchi** GL and Rathanaswami P (2012) Inhibition of deprivation-induced food intake by GABA(A) antagonists: roles of the hypothalamic, endocrine and alimentary mechanisms. *J Clin Biochem Nutr* 51:19-26.
- Keramidas** A, Moorhouse AJ, Schofield PR and Barry PH (2004) Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol* 86:161-204.
- Koek** W, Cheng K and Rice KC (2012) Discriminative stimulus effects of the GABAB receptor-positive modulator rac-BHFF: comparison with GABAB receptor agonists and drugs of abuse. *J Pharmacol Exp Ther* 344:553-60.
- Koltchine** VV, Ye Q, Finn SE and Harrison NL (1996) Chimeric GABAA/glycine receptors: expression and barbiturate pharmacology. *Neuropharmacology* 35:1445-56.
- Korte** SM and De Boer SF (2003) A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 463:163-75.
- Krasowski** MD, Nishikawa K, Nikolaeva N, Lin A and Harrison NL (2001) Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABAA receptor beta subunit controls a binding cavity for propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacology* 41:952-64.

- Lambertsen** KL, Gramsbergen JB, Sivasaravanaparan M, Ditzel N, Sevelsted-Møller LM, Oliván-Viguera A, Rabjerg M, Wulff H and Köhler R (2012) Genetic KCa3.1-deficiency produces locomotor hyperactivity and alterations in cerebral monoamine levels. *Journal Article* 7(10):e47744
- Laurie** DJ, Wisden W and Seeburg PH (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 12:4151-72.
- Lewis** DA and Sweet RA (2009) Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies. *J Clin Invest* 119:706-16.
- Li** H, Graber KD, Jin S, McDonald W, Barres BA and Prince DA (2012) Gabapentin decreases epileptiform discharges in a chronic model of neocortical trauma. *Neurobiol Dis* 48:429-38.
- Luscher** B and Keller CA (2004) Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 102:195-221.
- Macdonald** RL, Kang JQ and Gallagher MJ (2010) Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol* 588:1861-9.
- Macdonald** RL and Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569-602.
- Mago** R, Forero G, Greenberg WM, Gommoll C and Chen C (2013) Safety and Tolerability of Levomilnacipran ER in Major Depressive Disorder: Results from an Open-Label, 48-Week Extension Study. *Clin Drug Investig* 33:761-71.
- Martinez-Cue** C, Martinez P, Rueda N, Vidal R, Garcia S, Vidal V, Corrales A, Montero JA, Pazos A, Florez J, Gasser R, Thomas AW, Honer M, Knoflach F, Trejo JL, Wettstein JG and Hernandez MC (2013) Reducing GABAA alpha5 receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome. *J Neurosci* 33:3953-66.
- McMullan** J, Sasson C, Pancioli A and Silbergleit R (2010) Midazolam versus diazepam for the treatment of status epilepticus in children and young adults: a meta-analysis. *Acad Emerg Med* 17:575-82.
- McTeague** LM and Lang PJ (2012) The anxiety spectrum and the reflex physiology of defense: from circumscribed fear to broad distress. *Depress Anxiety* 29:264-81.
- Milic** M, Divljakovic J, Rallapalli S, van Linn ML, Timic T, Cook JM and Savic MM (2012) The role of alpha1 and alpha5 subunit-containing GABAA receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol* 23:191-7.
- Mohler** H (2012) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62:42-53.
- Möhler** H. (2006). GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* 326, 505–516.
- Oakley** S, Vedula LS, Bu W, Meng QC, Xi J, Liu R, Eckenhoff RG and Loll PJ (2012) Recognition of anesthetic barbiturates by a protein binding site: a high resolution structural analysis. *PLoS One* 7:e32070.
- Olsen** RW and Sieghart W. (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56(1):141-8.
- Olsen** RW and Li GD (2011) GABA(A) receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Can J Anaesth* 58:206-15.
- 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(4):815-50.

- Plante** DT, Jensen JE and Winkelman JW (2012) The role of GABA in primary insomnia. *Sleep* 35:741-2.
- Pym** LJ, Cook SM, Rosahl T, McKernan RM and Atack JR (2005) Selective labelling of diazepam-insensitive GABAA receptors in vivo using [3H]Ro 15-4513. *Br J Pharmacol* 146:817-25.
- Reddy** DS and Jian K (2010) The testosterone-derived neurosteroid androstenediol is a positive allosteric modulator of GABAA receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 334(3):1031-41.
- Reddy** DS (2011) Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5;2:38.
- Reddy** DS (2013) Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 7:115.
- Rho** JM, Donevan SD and Rogawski MA (1996) Direct activation of GABAA receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 497 (Pt 2):509-22.
- Rudolph** U and Knoflach F (2011) Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10:685-97.
- Ruesch** D, Neumann E, Wulf H and Forman SA (2012) An allosteric coagonist model for propofol effects on alpha1beta2gamma2L gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Anesthesiology* 116:47-55.
- Sanderson** JL, Donald Partridge L and Valenzuela CF (2009) Modulation of GABAergic and glutamatergic transmission by ethanol in the developing neocortex: an in vitro test of the excessive inhibition hypothesis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neuropharmacology* 56:541-55.
- Sarup** A, Larsson OM and Schousboe A (2003) GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2:269-77.
- Seo** MJ, Nam YD, Lee SY, Park SL, Yi SH and Lim SI (2013) Expression and characterization of a glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* 877G producing gamma-aminobutyric acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:853-6.
- Sieghart** W and Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2:795-816.
- Sigel** E and Buhr A (1997) The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18:425-9.
- Sigel** E, Schaerer MT, Buhr A and Baur R (1998) The benzodiazepine binding pocket of recombinant alpha1beta2gamma2 gamma-aminobutyric acidA receptors: relative orientation of ligands and amino acid side chains. *Mol Pharmacol* 54:1097-105.
- Sitges** M, Guarneros A and Nekrasov V (2007) Effects of carbamazepine, phenytoin, valproic acid, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate and vinpocetine on the presynaptic Ca²⁺ channel-mediated release of [3H]glutamate: comparison with the Na⁺ channel-mediated release. *Neuropharmacology* 53:854-62.
- Smith** GB and Olsen RW (1995) Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16:162-8.
- Sotoyama** H, Namba H, Chiken S, Nambu A and Nawa H (2013) Exposure to the cytokine EGF leads to abnormal hyperactivity of pallidal GABA neurons: implications for schizophrenia and its modeling. *J Neurochem* 126:518-28.

- Stewart** DS, Hotta M, Li GD, Desai R, Chiara DC, Olsen RW and Forman SA (2013) Cysteine Substitutions Define Etomidate Binding and Gating Linkages in the alpha-M1 Domain of gamma-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. *J Biol Chem*.
- Sugimoto** M, Fukami S, Kayakiri H, Yamazaki S, Matsuoka N, Uchida I and Mashimo T (2002) The beta-lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of action at GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol* 135:427-32.
- Sur** C, Wafford KA, Reynolds DS, Hadingham KL, Bromidge F, Macaulay A, Collinson N, O'Meara G, Howell O, Newman R, Myers J, Atack JR, Dawson GR, McKernan RM, Whiting PJ, Rosahl TW (2001) Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J Neurosci*. 15;21(10):3409-18.
- Suzuki** N, Kudo Y, Takagi H, Yoshioka T, Tanakadate A, Kano M (1990) Participation of transient-type Ca²⁺ channels in the sustained increase of Ca²⁺ level in GH3 cells. *J Cell Physiol*. 144(1):62-8.
- Tallman** JF and Hutchison A (1990) Molecular biological insights into GABA and benzodiazepine receptor structure. *Prog Clin Biol Res* 361:231-55.
- Tan** KR, Brown M, Labouebe G, Yvon C, Creton C, Fritschy JM, Rudolph U and Luscher C (2010) Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature* 463:769-74.
- Tan** KR, Rudolph U and Luscher C (2011) Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci* 34:188-97.
- Thompson** SA, Whiting PJ and Wafford KA (1996) Barbiturate interactions at the human GABAA receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br J Pharmacol* 117:521-527.
- Tomczyk** T, Haberek G, Zuchora B, Jaroslawska-Zych A, Kowalczyk MS, Wielosz M and Urbanska EM (2007) Enhanced glutamatergic transmission reduces the anticonvulsant potential of lamotrigine but not of felbamate against tonic-clonic seizures. *Pharmacol Rep* 59:462-6.
- Uebachs** M, Albus C, Opitz T, Isom L, Niespodziany I, Wolff C and Beck H (2012) Loss of beta1 accessory Na⁺ channel subunits causes failure of carbamazepine, but not of lacosamide, in blocking high-frequency firing via differential effects on persistent Na⁺ currents. *Epilepsia* 53:1959-67.
- Unwin** N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J Mol Biol* 346:967-89.
- Vahia** IV, Lanouette NM, Golshan S, Fellows I, Mohamed S, Kasckow JW and Zisook S (2013) Adding antidepressants to antipsychotics for treatment of subsyndromal depressive symptoms in schizophrenia: Impact on positive and negative symptoms. *Indian J Psychiatry* 55:144-8.
- Vedula** LS, Brannigan G, Economou NJ, Xi J, Hall MA, Liu R, Rossi MJ, Dailey WP, Grasty KC, Klein ML, Eckenhoff RG and Loll PJ (2009) A unitary anesthetic binding site at high resolution. *J Biol Chem* 284:24176-84.
- Verdurand** M, Fillman SG, Weickert CS and Zavitsanou K (2013) Increases in [3H]muscimol and [3H]flumazenil binding in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia are linked to alpha4 and gamma2S mRNA levels respectively. *PLoS One* 8:e52724.
- Vinkers** CH and Olivier B (2012) Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators? *Adv Pharmacol Sci* 2012:416864.
- Vogel** N, Kluck CJ, Melzer N, Schwarzsinger S, Breitinger U, Seeber S and Becker CM (2009) Mapping of disulfide bonds within the amino-terminal extracellular domain of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 284:36128-36.

- Walf AA and Frye CA (2007)** Estradiol decreases anxiety behavior and enhances inhibitory avoidance and gestational stress produces opposite effects. *Stress* 10:251-60.
- Wallner M, Hanchar HJ and Olsen RW (2003)** Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15218-23.
- Wallner M, Hanchar HJ and Olsen RW (2006)** Low-dose alcohol actions on alpha4beta3delta GABAA receptors are reversed by the behavioral alcohol antagonist Ro15-4513. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8540-5.
- Walls AB, Eyjolfsson EM, Smeland OB, Nilsen LH, Schousboe I, Schousboe A, Sonnewald U and Waagepetersen HS (2011)** Knockout of GAD65 has major impact on synaptic GABA synthesized from astrocyte-derived glutamine. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:494-503.
- Waugh J and Goa KL (2003)** Topiramate: as monotherapy in newly diagnosed epilepsy. *CNS Drugs* 17:985-92.
- Westh-Hansen SE, Witt MR, Dekermendjian K, Liljefors T, Rasmussen PB and Nielsen M (1999)** Arginine residue 120 of the human GABAA receptor alpha 1, subunit is essential for GABA binding and chloride ion current gating. *Neuroreport* 10:2417-21.
- Wieland HA, Luddens H and Seeburg PH (1992)** A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 267:1426-9.
- Williams PA, White AM, Clark S, Ferraro DJ, Swiercz W, Staley KJ and Dudek FE (2009)** Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. *J Neurosci* 29:2103-12.
- Wu X, Wu Z, Ning G, Guo Y, Ali R, Macdonald RL, De Blas AL, Luscher B and Chen G (2012)** gamma-Aminobutyric acid type A (GABAA) receptor alpha subunits play a direct role in synaptic versus extrasynaptic targeting. *J Biol Chem* 287:27417-30.
- Xu M, Covey DF and Akabas MH (1995)** Interaction of picrotoxin with GABAA receptor channel-lining residues probed in cysteine mutants. *Biophys J* 69:1858-67.
- Yang JS and Olsen RW (1987)** gamma-Aminobutyric acid receptor-regulated ³⁶Cl⁻ flux in mouse cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* 241:677-85.
- Yang Z, Cromer BA, Harvey RJ, Parker MW and Lynch JW (2007)** A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem* 103:580-9.
- Yu Z, Fang Q, Xiao X, Wang YZ, Cai YQ, Cao H, Hu G, Chen Z, Fei J, Gong N and Xu TL (2013)** GABA transporter-1 deficiency confers schizophrenia-like behavioral phenotypes. *PLoS One* 8:e69883.
- Zhang GQ, Sahoo SS and Lhatoo SD (2012)** From classification to epilepsy ontology and informatics. *Epilepsia* 53 Suppl 2:28-32.
- Zhang JH, Sato M and Tohyama M (1991)** Different postnatal development profiles of neurons containing distinct GABAA receptor beta subunit mRNAs (beta 1, beta 2, and beta 3) in the rat forebrain. *J Comp Neurol* 308:586-613.
- Zhang Z and Sun QQ (2011)** The balance between excitation and inhibition and functional sensory processing in the somatosensory cortex. *Int Rev Neurobiol* 97:305-33.
- Zhu PJ and Lovinger DM (2006)** Ethanol potentiates GABAergic synaptic transmission in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 96:433-41.

11. 1. Zusätzliche Abbildungsquellen

Abbildung 2: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book/ch02s02.html,
12.8.13

Abbildung 5: <http://flipper.diff.org/app/items/5240>, 21.9.13

Abbildung 17: A. Schöffmann, Dep. f. Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien, 2013

Abbildung 18: <http://ibmmsrvlakit.unibe.ch/sigel/xenopus.html>, 24.9.13

12 Lebenslauf

Name Johanna Wiesinger
Geburtsort Wien
Nationalität Österreich

Ausbildungsweg

Seit 2008 Studium der Pharmazie
 04.02.2010: Abschluss des 1. Studienabschnittes
 20.06.2013: Abschluss des 2. Studienabschnittes

06/2008 Reifeprüfung mit gutem Erfolg

2000-2008 Bundesrealgymnasium 14
 Linzer Straße 146, A-1140 Wien

1996-2000 Volksschule Ober St. Veit
 Hietzinger Hauptstr. 166, 1130 Wien

Berufserfahrung

06/2012-12/2012 beschäftigt bei Sambucco GmbH als Verkäuferin

08/2010 Ferialpraktikum in der Anstaltsapotheke des Landeskrankenhauses
 Wiener Neustadt

10/2009-06/2012 beschäftigt bei Biomarket HandelsgmbH als Verkäuferin

2006/2007 Ferialpraktikum beim Magazin GESUND + LEBEN