



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Charakterisierung der *in vivo* Wirkung eines Naturstoffes mithilfe
verhaltenspharmakologischer Tests

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin: Susanne Riedler

Studienrichtung /Studienzweig Pharmazie
(lt. Studienblatt):

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Steffen HERING

Wien, 2010

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Möglichkeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie meine Diplomarbeit durchzuführen und für die Begutachtung bedanken.

Frau Mag. Dr. Sophia Khom möchte ich für die gute Einführung in das Themengebiet, für die kompetente Betreuung und für die Unterstützung beim Schreiben meinen Dank aussprechen.

Dank gebührt auch Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Hermann Stuppner und Mag. Serhat Cicek vom Institut für Pharmazie Abteilung Pharmakognosie, Universität Innsbruck für die Bereitstellung von SAR-24.

Ich bedanke mich bei Frau Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber, die mich an Herrn Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering verwiesen hat.

Ich danke Herrn Mag. Dr. Igor Baburin für die Unterstützung bei allen technischen Problemen und für die Bereitstellung der Oozyten.

Bei Frau DI(FH) Dr. Annette Hohaus möchte ich mich für die Bereitstellung der cRNA bedanken.

Weiterer Dank gebührt Frau Mag. Barbara Strommer, Frau Mag. Dr. Barbara Taferner, Herrn Mag. Dr. Andreas Windisch und Frau Mag. Janine Zaugg, die mir bei fachlichen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen und wesentlich zum netten Arbeitsklima beitrugen.

Herzlichen Dank auch an Frau Doris Stenitzer und Frau Yvonne Haslinger für die administrative Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1.) Angst und Angsterkrankungen	1
1.1) Physiologische Grundlagen	1
1.2) Angst	1
1.3) Ängstlichkeit und Angststörungen	2
2.) Schlaf	5
2.1) Physiologische Grundlagen	5
2.2) Schlafstörungen	10
3.) Das GABAerge System	13
3.1) γ -Aminobuttersäure	13
3.2) GABA _A -Rezeptor	15
3.2.1) Struktur	15
3.2.2) GABA-Bindungstasche	17
4.) Modulatoren von GABA _A -Rezeptoren	19
4.1) Benzodiazepine	19
4.2) Weitere Modulatoren von GABA _A -Rezeptoren	21
4.2.1) Barbiturate	21
4.2.2) Neurosteroidoide	22
4.2.3) Anästhetika	24
4.2.4) Ethanol	27
4.2.5) Diverse Modulatoren	28
5.) Epilepsie	30
6.) GABA _B -Rezeptor	35
7.) GABA _C -Rezeptor	37
8.) Problemstellung	39
9.) Methoden	40
9.1) In vitro Untersuchungen	40
9.1.1) Oozytenpräparation	40
9.1.2) cRNA-Vorbereitung	41
9.1.3) Injektion von cRNA	41
9.1.4) Messlösungen	41
9.1.5) 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik	42

9.1.6) Perfusionssystem	43
9.2) In vivo-Untersuchungen	43
9.2.1) Tiere	43
9.2.2) Injektionslösungen	44
9.2.3) Open Field-Test.....	44
9.2.4) Light/Dark-Choice-Test	45
9.2.5) Stress-Induced-Hyperthermia-Test	45
10.) Ergebnisse	46
10.1) Ergebnisse der in vitro Untersuchungen	47
10.1.1) Konzentrationsabhängige Wirkung von GABA auf GABA _A -Rezeptoren.....	47
10.1.2) Modulation von I _{GABA} durch Diazepam	48
10.2) Ergebnisse der in vivo Untersuchungen	49
10.2.1) Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im OF-Test	49
10.2.2) Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LD-Test.....	52
10.2.3) Effekt von SAR-24 auf SIH von c57Bl/6N Mäusen	54
11.) Diskussion	55
12.) Quellenverzeichnis	58
13.) Zusammenfassung (deutsch)	73
14.) Abstract	74
15.) Lebenslauf	75

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.

1.) Angst und Angsterkrankungen

1.1) Physiologische Grundlagen:

Um sich den Veränderungen der Umwelt anzupassen, haben alle Lebewesen im Laufe der Evolution verschiedene physiologische und kognitive Verhaltensmuster erlernt.

Diese Verhaltensmuster (Emotionen) lassen sich grob in 2 Kategorien einteilen:

- **Negative Emotionen:** werden bei Gefahr, Schmerz u.ä. hervorgerufen, und führen zu Abwehrverhalten oder Flucht
- **Positive Emotionen:** werden durch Stimuli hervorgerufen, die Nahrung oder Sicherheit versprechen u.ä. und führen zu annäherndem Verhalten

An der Entstehung von Emotionen sind evolutionär „alte“ Hirnregionen, wie die Amygdala, der Hippocampus, der Gyrus parahippocampalis und der Gyrus cinguli beteiligt. Diese werden auch unter dem Begriff „limbisches System“ zusammengefasst. Das limbische System steht in direkter Verbindung zum Hypothalamus, dem ventralen Striatum (Nucleus accumbens) und dem orbitalen und präfrontalen Cortex.

Obwohl der Begriff „limbisches System“ impliziert, dass es nur einen zentralen Prozessor für Emotionen gibt, werden für unterschiedliche Emotionen wie Angst, Abscheu und Vertrauen unterschiedliche Schaltkreise aktiviert. Dazu gehören neben der Aktivierung von monoaminergen, cholinergen und anderen Neurotransmitter-Systemen im Gehirn auch die Aktivierung des autonomen Nervensystems (Nestler et al., 2009).

1.2) Angst

Angst kann grob in angeborene oder erworbene Ängste eingeteilt werden. Bei Nagern beispielsweise ist die Angst vor offenen oder hellen Flächen angeboren. Davon unterscheidet sich die erworbene Angst, die durch Konditionierung mit einem Stimulus,

den die Tiere z.B. mit Schmerz assoziieren, hervorgerufen wird (Davis 1998; Gordon und Hen, 2004; Nestler et al., 2009).

Informationen über bedrohliche Situationen werden vom sensorischen Thalamus und dem sensorischen Assoziationscortex aufgenommen und direkt zu den lateralen Nuklei der Amygdala weitergeleitet. Von dort wird der Reiz direkt in bestimmte Hirnareale z.B. den präfrontalen Cortex, den Hippocampus und das Striatum weitergeleitet. Durch Aktivierung von Neuronen im präfrontalen Cortex wird eine adäquate Reaktion auf die bedrohliche Situation ausgewählt, über den Hippocampus wird die neue Situation mit bereits vorangegangenen Ähnlichen verglichen und über Neuronen des Striatums wird das bereits erlernte Verhalten ausgelöst. Daneben wird die Information auch in den zentralen Nuklei der Amygdala verarbeitet und danach in weitere Hirnregionen z.B. in den Hypothalamus projiziert.

Dort kommt es über den Hypothalamus zu einer Aktivierung des Sympathikus und der Freisetzung von CRF (Corticotropin Releasing Factor), über das periaquäduktale Grau zu typischen Reaktionen wie Erschrecken oder Erstarren und über Aktivierung von monoaminergen Nuklei zu einer Steigerung der Wachsamkeit (Davis, 1998; Gordon und Hen, 2004; Nestler et al., 2009).

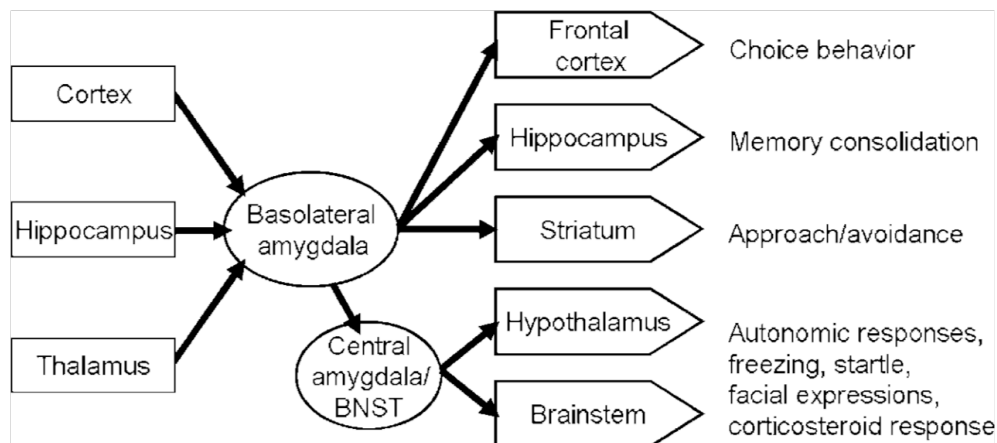


Abbildung 1
Schematische Darstellung der Weiterleitung von Angstsignalen
(Davis, 1998; Gordon und Hen, 2004)

1.3) Ängstlichkeit und Angststörungen:

Von Ängstlichkeit oder Angststörungen spricht man, wenn trotz Fehlens eines bedrohlichen Stimulus, typische Reaktionen wie z.B. Erregung, Wachsamkeit,

Aktivierung des Sympathikus auf eine harmlose Situation ausgelöst werden. Grundsätzlich unterscheidet sich Ängstlichkeit somit von der Angst, dass bei Ängstlichkeit kein direkt bedrohlicher Stimulus vorhanden ist (Gray und McNaughton, 2000; Gordon und Hen, 2004; Nestler et al., 2009).

Die Weiterleitung dieses Reizes unterscheidet sich auch von dem des physiologischen Angststimulus. Anstatt der Projektion zu den zentralen Nuklei der Amygdala wird der Reiz hier zu den Bettkernen der Stria terminalis (BNST) weitergeleitet und verarbeitet.

Die BNST kann auch als Verlängerung der Amygdala gesehen werden, vor allem da die Kerne auch ähnlich organisiert sind. Man nimmt an, dass die BST daher für die Verarbeitung von weniger spezifischen Stimuli verantwortlich sind als die zentralen Nuklei der Amygdala (Gordon und Hen, 2004; Nestler et al., 2009).

Einteilung der Angststörungen laut ICD-10:

- Panikstörungen
- Generalisierte Angsterkrankung (GAD)
- Posttraumatisches Stress-Syndrom
- Spezifische Phobien
- Soziale Phobien
- Agoraphobie
- Sonstige phobische Störungen
- Phobische Störungen nicht näher bezeichnet

Panikstörungen (PD):

Darunter versteht man Episoden intensiver Ängstlichkeit oder Unbehaglichkeit, die von vegetativen Symptomen wie z.B. Tachykardie, Tachypnoe und Schwindelgefühl begleitet werden, die sich plötzlich entwickeln und ihren Höhepunkt innerhalb von zehn Minuten erreichen. Eine Panikstörung wird diagnostiziert, wenn mehrere solcher Panikattacken in einem Monat auftreten und sich nach einigen Attacken ständige Angst vor neuen Attacken entwickelt. (Nestler et al., 2009; Craske et al., 2010).

Generalisierte Angsterkrankung (GAD):

Typisch für die GAD sind unrealistische und exzessive Sorgen über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten, begleitet von übertriebener Wachsamkeit und sympathischer Hyperaktivität. Personen mit GAD sind angespannt und ängstlich gegenüber alltäglichen Vorkommnissen. Meist äußert sich GAD durch Unruhe, Schlafstörungen, Kopfschmerzen und andere Arten von Schmerz (Hoffman et al., 2008). Da Menschen, die an GAD leiden, sich entweder auf die Sorgen oder auf die körperlichen Auswirkungen der ständigen Anspannung konzentrieren, ist das klinische Erscheinungsbild individuell verschieden (Ballenger 2001; Hoffman et al., 2008). Unbehandelt wird die GAD häufig chronisch (Ballenger et al., 2001; Wittchen et al., 2003; Hoffman et al., 2008).

Posttraumatisches Stress-Syndrom (PTSD):

PTSD tritt nach Erleben schwerwiegender Traumata auf. Von PTSD spricht man, wenn Übererregbarkeit, Schlafstörungen und das wiederkehrende Erleben des Traumas, das von physiologischen Angstsymptomen und emotionaler Abstumpfung begleitet wird, länger als ein Monat andauern. Personen, die an PTSD leiden, meiden auch die Stimuli, die mit dem Trauma in Verbindung gebracht werden (Wittchen et al., 2009).

Spezifische Phobien:

Diese Phobien sind durch intensive Angst vor und dem Meiden von spezifischen Stimuli i. e.

Schlangen oder Höhe gekennzeichnet (Nestler et al., 2009).

Soziale Phobien:

Unter sozialen Phobien versteht man ein andauerndes Angstgefühl vor Situationen, in denen man dem Urteil der Mitmenschen ausgesetzt wird. Die begleitende Angst vor Erniedrigung charakteristisch für diese Störung.

Soziale Phobien können stark sein, lang andauern und auch von physischen Reaktionen wie Zittern oder Schwitzen begleitet werden. In einer dieser Situationen zeigen die Betroffenen sofort diese Symptome, sind sich dabei aber im Klaren, dass ihre Reaktion übertrieben ist. So meiden sie solche Situationen, was zu massiver Beeinträchtigung der Lebensqualität führen kann. Von einer sozialen Phobie spricht man, wenn die Symptome länger als sechs Monate andauern (Fehm et al., 2005).

Allgemein können Angsterkrankungen mehrere Jahre dauern und sind mit persönlichem Stress, reduzierter Lebensqualität, gesteigerter Morbidität und Mortalität sowie mit beträchtlich wirtschaftlicher Belastung assoziiert (Wittchen and Jacobi, 2005; Garner et al., 2009). Die gängige Pharmakotherapie von Angststörungen zeigt nur mäßigen Erfolg. Viele Patienten sprechen auf die pharmakologische Intervention (meist Antidepressiva) nicht an und auch psychologische Behandlung ist oft nur limitiert erhältlich. Grundsätzlich werden daher viele Patienten suboptimal behandelt (Garner et al., 2009).

Angsterkrankungen treten gehäuft gemeinsam mit Schlafstörungen auf. Ungefähr 27 % aller europäischen Erwachsenen im Alter von 18 bis 65 Jahren sind oder waren in den letzten zwölf Monaten von einer psychischen Störung betroffen (Wittchen und Jacobi, 2005).

2.) Schlaf und Schlafstörungen

2.1) Physiologische Grundlagen:

Trotz vieler Nachteile des Schlafes, wie zum Beispiel reduzierte Aufmerksamkeit gegenüber Feinden, müssen beinahe alle Lebewesen schlafen, um zu überleben. Schlafentzug führt dagegen zum Tod. Bis heute ist nicht gänzlich geklärt, warum Schlaf notwendig ist.

Ursprünglich dachte man, dass Schlaf ein inaktiver, passiver Zustand sei, der für die Regeneration der Körperfunktionen nötig ist. Die Neuronen, die im Wachzustand aktiv sind, wären somit während des Schlafes inaktiv. Aber das Gehirn verbraucht im ruhenden Wachzustand nicht mehr Energie als während des Schlafes. Auch kommt es im Schlaf nicht zu einer gesteigerten Proteinsynthese. Außerdem sind zahlreiche Neuronen z.B. im Hirnstamm und im basalen Vorderhirn während des Schlafes aktiv.

Ein weiteres Rätsel ist die Funktion des Rapid-Eye-Movement-Schlafes (REM). Ein Beitrag des REM-Schlafes zu Förderung von Lernen, Löschen von irrelevanten Gedächtnisspuren und der Gedächtniskonsolidierung wird diskutiert. Die spezifische Rolle des REM-Schlafes in diesem Prozess ist jedoch noch unbekannt. Der REM-Schlaf spielt auch eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung von Neugeborenen. Aber auch ältere Menschen haben REM-Schlaf-Phasen.

Die Funktion von Schlaf und der einzelnen Schlafphasen muss weiterhin intensiv untersucht werden (Nestler et al., 2009).

Einteilung des Schlafes

Schlaf kann mittels EEG (Elektroenzephalographie) in vier non-REM-Phasen (nREM) und in eine REM-Phase unterteilt werden. Dieser Zyklus wiederholt sich pro Nacht circa fünfmal.

nREM1: tritt während des Wechsels vom Wachzustand in den Schlafzustand auf. Charakteristisch für diese Phase sind die Theta-Wellen (4 bis 7 Hz).

nREM2: charakterisiert durch Theta-Wellen, die von „burst-pause“ Wellenformen, wie K-Komplexen (große Amplitude, niederfrequente elektronegative Wellen, gefolgt von elektropositiven Wellen) und Spindeln (kurze Bursts mit einer Aktivität von 7 bis 14 Hz) überlagert werden.

nREM3 und nREM4: sind durch langsame Wellen (0.1 bis 4 Hz) charakterisiert.

REM: Diese Phase ist durch niedrige Amplituden und gemischte Frequenzen im EEG charakterisiert. Das Muster ähnelt dem EEG des normalen Wachzustandes (Nestler et al., 2009).

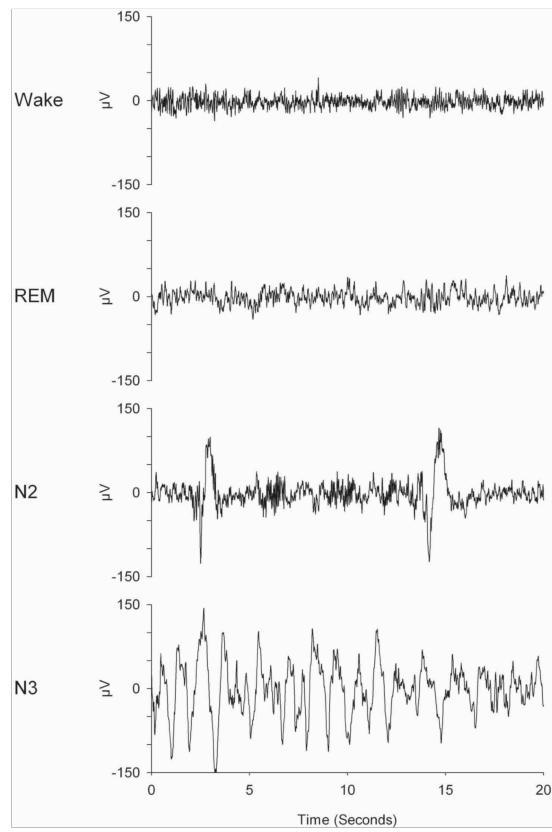


Abbildung 2

EEG des Wachzustandes, des REM, nREM2 mit dem k-Komplex und Spindeln und nREM3 (Campbell 2009)

Folgende Hirnareale spielen eine wichtige Rolle beim Schlaf:

- aufsteigendes retikuläres aktivierendes System (ARAS)
- ventrolaterale, präoptische Zone (VLPO)
- Orexin-Hypocretin-System

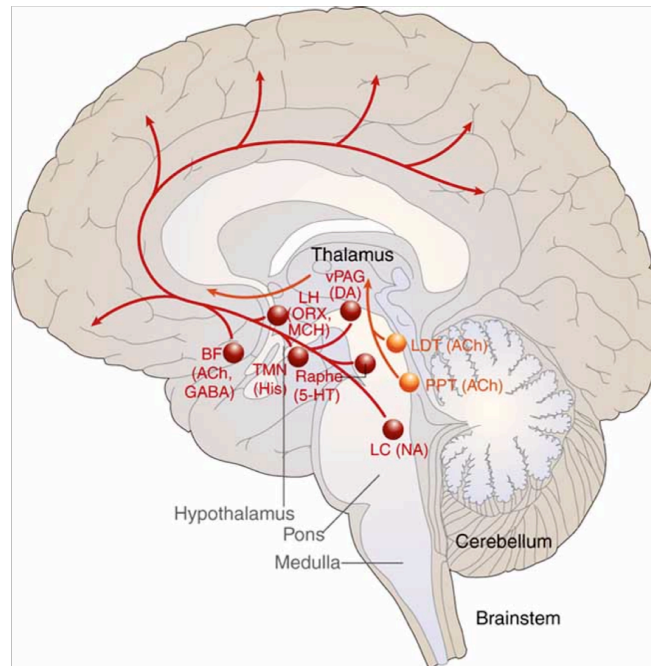


Abbildung 3
Areale und regulativen Substrate des Schlafes
(Saper 2005; Schwartz und Roth, 2008)

ARAS:

Das ARAS ist eine komplexe Ansammlung von Neuronen, die verschiedene Kreisläufe mit den 4 monoaminergen Signalwegen beinhaltet:

- **Noradrenerger Signalweg:** entspringt im Locus Coeruleus (LC) und den zugehörigen Nuklei des Hirnstamms.
- **Serotonerger Signalweg:** entspringt in den Raphekernen innerhalb des Hirnstamms.
- **Dopaminerger Signalweg:** entspringt aus dem Ventralen Tegmentum (VT).

- **Histaminerger Signalweg:** entspringt vom tuberomammilären Nukleus (TMN) vom hinteren Hypothalamus.

Grundsätzlich haben Noradrenalin, Serotonin, Dopamin und Histamin komplexe modulatorische Funktionen und fördern den Wachzustand.

Eine weitere wichtige Komponente des ARAS ist das Pontine Tegmentum (PT). Die Aktivität der cholinergen Neuronen des PT (REM-on cells) fördert den REM-Schlaf. Während des Wachzustandes werden diese REM-on cells durch verschiedene noradrenerge und serotonerge Neuronen des ARAS (REM-off cells) inhibiert (Hallanger et al., 1987; Saper et al., 2005; Schwartz und Roth, 2008).

Rolle des VLPO

Das VLPO befindet sich im vorderen Hypothalamus und besteht aus inhibitorischen GABAergen und galaninerger (peptidischer Neurotransmitter) Neuronen (Sherin et al., 1998; Gaus et al., 2002; Saper et al., 2005). Die Neuronen interagieren reziprok mit den Neuronen des ARAS und den Orexin-Neuronen. Die VLPO-Neuronen inhibieren und werden von den histaminergen Neuronen des TMN und sogenannten monoaminergen REM-off cells inhibiert.

Rolle des Orexin-Hypocretin-System

Die Neuronen des Orexin-Hypocretin-Systems befinden sich im lateralen Hypothalamus und innervieren alle Komponenten des ARAS. Diese Neuronen erregen die monoaminergen REM-off cells während des Wachzustandes und die cholinergen Neuronen der Pontina, während des REM-Schlafes. Sie selbst werden von Neuronen des VLPO während des nREM-Schlafs inhibiert (McCarley, 2007).

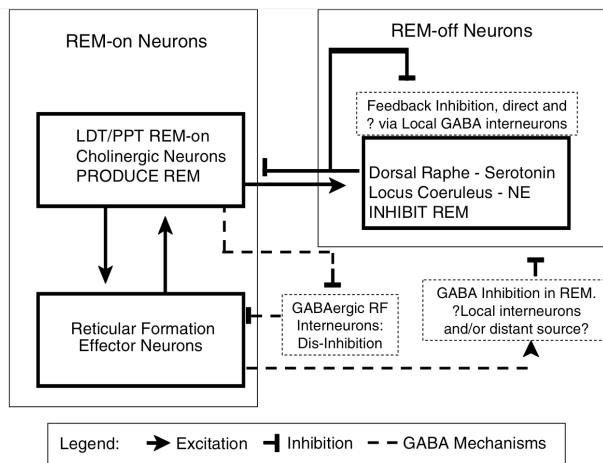


Abbildung 4
Schematische Darstellung des REM-Schlafes; LDT = laterodorsale tegmentäre Nuclei; PPT = penduculopontinäre Nuclei (McCarley, 2007)

Der Wachzustand wird durch Neuronen der Formatio Reticularis (ARAS), die Impulse in den Thalamus senden, aufrecht erhalten. Daneben stabilisiert auch das Orexin-Hypocretin-System den Wachzustand. Reguliert wird der Wechsel zwischen Schlaf- und Wachzustand vom lateralen Hypothalamus, der hierbei einen Flip/Flop-Schalter darstellt. Das Orexin-Hypocretin aktiviert mittels Orexin das ARAS, das wiederum mittels Noradrenalin, Serotonin, Dopamin und Histamin das VLPO inhibiert. Wird der Schalter nun „umgelegt“ wird das VLPO aktiv und inhibiert mittels Galanin und GABA den lateralen Hypothalamus und gleichzeitig auch das ARAS. Somit schläft man ein. Ist die Aktivität es des VLPO gestört, kommt es zu Schlafstörungen (Silbernagl und Despopulos, 2007).

2.2) Schlafstörungen

Dyssomnien

- Primäre Insomnie
- Primäre Hypersomnie
- Narkolepsie
- Schlafbezogene Atemstörungen (Schlafapnoe)
- Zirkadiane Schlafstörungen

Parasomnien

- Alpträume
- Schlafterror
- Schlafwandeln

1.) Dyssomnien

Primäre Insomnie:

Darunter versteht man alle Ein- und Durchschlafstörungen. Sie verursachen psychischen Stress und beeinträchtigen auch den Alltag. Patienten, die an primärer Insomnie leiden, besitzen eine erhöhte Stoffwechselleistung und eine geringere Schlafneigung, auch wenn sie die Möglichkeit dazu haben (Harsh et al., 2006; Perlis et al., 2005; Nofzinger et al., 2005; Schwartz und Roth 2008).

Narkolepsie:

Narkolepsie ist durch abnorme Übergänge zwischen den REM- und nREM-Phasen nachts und während des Schlaf-Wach-Zykluses gekennzeichnet. Narkoleptiker schlafen nicht mehr als andere, jedoch haben sie plötzliche REM-Schlaf-Episoden während des Tages. Die Symptome der Narkolepsie sind pathologische Schläfrigkeit, Schlafparalyse, hypnagogische Halluzinationen (diese treten am Beginn oder am Ende des Schlafens auf) und Kataplexie (plötzlicher Verlust des Muskeltonus während des Wachzustandes) (Dauvalliers et al., 2007; Nestler et al., 2009).

Schlafapnoe:

Schlafapnoe ist eine altersabhängige, schlafbezogene Atemstörung, die durch einen oropharyngealen Kollaps gekennzeichnet ist. Daraus resultieren Schlafunterbrechungen, Hypoxie, pulmonarer und systemischer Hochdruck und Arrhythmien (Harsh et al, 2006; Narkiewicz und Somers, 2003; Schwartz und Roth, 2008).

Zirkadiane Schlafstörungen:

Diese werden durch Verschiebung des Wachzustandes gegen den endogenen zirkadianen Rhythmus i.e. Jetlag, Schichtarbeit verursacht (Harsh et al., 2006; Allen et al., 2003; Schwartz und Roth, 2008).

2.) Parasomnien:

Zu den Parasomnien zählt man Albträume, Schlafwandeln und Schlafterror. Sie werden nur als Störung bezeichnet, wenn die Betroffenen durch die Häufigkeit oder den Schweregrad negativ beeinflusst werden (Nestler et al., 2009).

Albträume:

Typischerweise träumen die Patienten von Attacken, dem Fallen oder dem Tod (Kales et al., 1987; Vgontzas und Kales, 1999). Sie treten zu jeder Nachtzeit während des REM-Schlafes auf. Wesentliche Merkmale sind plötzliches Aufwachen aus dem Traum und die Erinnerung an den Inhalt des Traumes (Schenck und Mahowald, 1996; Vgontzas und Kales, 1999).

Schlafwandeln:

Dabei handelt es sich um kurze Episoden (wenige Minuten) während des Schlafes, in denen die Betroffenen aufstehen und umhergehen. Charakteristisch für Schlafwandler ist ein leerer Gesichtsausdruck, das Nichtwahrnehmen der Umwelt und schwerfällige Bewegungen.

Schlafterror:

Beim Schlafterror durchlebt man dramatische Episoden, die mit lautem Aufschreien oder mit starken Bewegungen verbunden sind (Kales et al., 1987; Vgontzas und Kales, 1999).

3.) Das GABAerge System

3.1) γ -Aminobuttersäure

Ein Neurotransmitter, der sowohl bei Angst als auch bei Schlaf bzw. Störungen dieser Prozesse eine wichtige Rolle spielt, ist die γ -Aminobuttersäure (GABA), der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Vertebraten und Invertebraten (Sieghart, 1995; Sieghart und Olsen 2009; Möhler 2006).

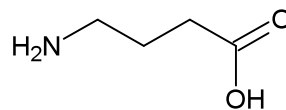


Abbildung 5
Strukturformel von GABA

GABA entsteht durch Decarboxylierung von Glutamat über die L-Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) (Buddhala et al., 2009). Es gibt zwei Isoenzyme, GAD67 und GAD65 (Bu et al., 1992, Buddhala et al., 2009). Diese entstehen aus verschiedenen Genen und unterscheiden sich in Funktion, Vorkommen, Wirkung und Co-Faktor-Interaktionen (Kaufman et al., 1991; Buddhala, 2009).

GAD67 kommt im neuronalen Cytoplasma vor. Die von GAD67 synthetisierte GABA fungiert beispielsweise als trophischer Faktor bei der Entstehung von Synapsen oder als Schutz nach Gehirnverletzungen (Lamigeon et al., 2001; Pinal and Tobin, 1998; Waagepetersen et al., 1999; Buddhala et al., 2009).

GAD65 hingegen ist in den Nervenendigungen lokalisiert. Die von GAD65 produzierte GABA fungiert als Neurotransmitter (Martin und Rimvall, 1993; Buddhala et al., 2009). Die Synthese von GABA wird über den Citratzyklus durchgeführt (Waagepetersen et al., 2001; Buddhala et al., 2009).

GABA wird in den synaptischen Vesikeln gespeichert. Die Aufnahme in den Vesikeln erfolgt über den Protonen/GABA-Antiport VGAT.

GABA wird von den präsynaptischen Endigungen durch Andocken und Fusion des synaptischen Vesikels mit der Plasmamembran freigesetzt. Dieser Prozess wird von SNARE-(N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) Proteinen, (Sollner et al., 1993; Fan et al., 2006) bestehend aus dem Syntaxin 1A, dem SNAP 25 und dem Synaptobrevin 2 katalysiert (Hua et al., 2001; Mochida, 2000; Fan et al.,

2006). Syntaxin 1A und SNAP 25 formen ein Heterodimer, das eine Bindungsstelle für Synaptobrevin 2 liefert (An und Almers, 2004, Fasshauer und Margittai, 2004; Fan et al., 2006).

GABA bindet an postsynaptische GABA_A-Rezeptoren und leitet so das Signal zu den postsynaptischen Endigungen weiter (Fan et al., 2006).

Danach wird GABA schnell durch spezifische natrium- und chloridabhängige Transporter in die präsynaptischen Endigungen (Dingledine und Korn, 1985; Fan et al., 2006) und die umgebenden Gliazellen aufgenommen (Jursky et al., 1994; Fan et al., 2006).

GAD65 spielt auch eine Rolle bei der Bereitstellung von Energie zur Aufnahme von GABA in den Vesikeln. Dabei kommt es zu einer Interaktion zwischen mitochondrialer GAD65, der GABA-Transaminase und der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Tillakaratne et al., 1995, Buddhala et al., 2009):

Die Stimulation eines Neurons durch Natriuminflux führt zu einer Synthese von GABA. Diese wird von der GABA-Transaminase in Succinatsemialdehyd umgewandelt und dieses danach durch die Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase in Succinat. Succinat wird in den Citratzyklus eingeschleust um ATP zu produzieren, das für den Uptake von GABA in den synaptischen Vesikel über den vesikulären GABA-Transporter benötigt wird. Daneben aktiviert ATP GAD65, die an synaptische Vesikel angelagert ist. Darauf wird GABA gebildet, die dann über vesikuläre GABA-Transporter in den synaptischen Vesikel aufgenommen wird. Diese Aufnahme ist ebenfalls ATP-vermittelt (Buddhala et al., 2009).

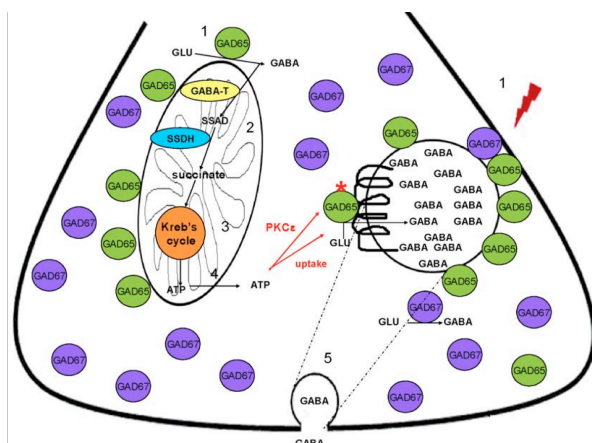


Abbildung 6
Schematische Darstellung
einer GABAergen Synapse
bei der Energiebereitstellung
für die GABA-Biosynthese
(Buddhala et al., 2009).

GABA aktiviert sowohl ionotrope als auch metabotrope Rezeptoren:

- GABA Typ A (GABA_A) Rezeptor
- GABA Typ B (GABA_B) Rezeptor
- GABA Typ C (GABA_C) Rezeptor

3.2) GABA_A-Rezeptor

3.2.1) Struktur:

GABA_A-Rezeptoren gehören ebenso wie die Glycin-, Serotonin (5-HT₃) und nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (LGICs) (Purves et al., 1997; D'Hulst et al., 2009). GABA_A-Kanäle formen aus fünf Untereinheiten Pentomere, die aus einer großen N-terminalen Domäne, vier transmembranären Regionen (TM1-4), einer großen intrazellulären Schleife zwischen TM3 und TM4 (Nayeem et al., 1994; D'Hulst et al., 2009) und einer kurzen extrazellulären C-terminalen Domäne bestehen. Die Kanalpore wird von den fünf TM2 aller Untereinheiten gebildet (Corringer et al., 2000; Sine und Engel, 2006; Olsen und Sieghart, 2009). Es gibt neunzehn unterschiedliche GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten, die sich wiederum in acht Klassen einteilen: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , ρ (1-3), θ und π (Olsen und Sieghart, 2008; D'Hulst et al., 2009).

Die meisten GABA_A-Rezeptoren bestehen aus zwei α -Untereinheiten, zwei β -Untereinheiten und einer γ -, δ - oder ϵ -Untereinheit (Sieghart und Sperk, 2002; Olsen und Sieghart, 2008), wobei die β -Untereinheit durch eine θ -Untereinheit ersetzt werden kann (Shivers et al., 1989; Davies et al., 1997; Bonnert et al., 1999; Henschel et al., 2008). 70 bis 80 % aller GABA_A-Rezeptoren im Zentralnervensystem beinhalten eine γ_2 -Untereinheit (Wisden et al., 1992; Laurie et al., 1992; Person et al., 1991, 1992; Olsen und Sieghart, 2008).

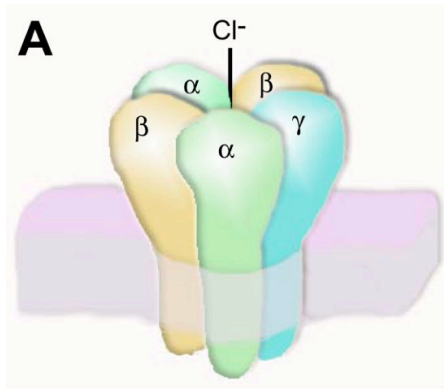


Abbildung 7
GABA_A-Rezeptor schematisch (Henschel et al., 2008)

Während Rezeptoren, die eine α_1 -, α_2 - oder α_3 -Untereinheit beinhalten, vor allem in Synapsen vorkommen (Somogyi et al., 1989, Winsky-Sommerer, 2009), findet man GABA_A-Kanäle, die eine δ -Untereinheit beinhalten, i.e. $\alpha_4\beta_x\delta$, $\alpha_1\beta_x\delta$ oder $\alpha_6\beta_x\delta$, vorwiegend extrasynaptisch (Nusser et al., 1998; Fritschy und Brunig, 2003, Winsky-Sommerer 2009). Auch GABA_A-Rezeptoren mit α_5 -Untereinheiten kommen bevorzugt extrasynaptisch vor oder an GABAergen Synapsen, die sich auf Dendriten befinden (Serwanski et al., 2006; Ali und Thomson, 2008; Winsky-Sommerer 2009).

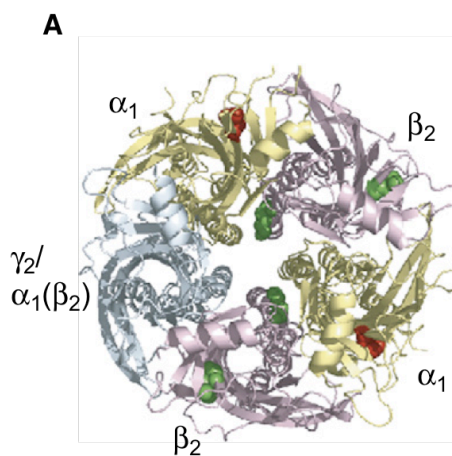


Abbildung 8
GABA_A-Rezeptor von oben (Muroi et al., 2006)

GABA_A-Rezeptoren vermitteln zwei verschiedene Arten der inhibitorischen Neurotransmission: die phasische und tonische Inhibition (Maconochie et al., 1994; Farrant und Nusser, 2005; Winsky-Sommerer 2009).

Phasische Inhibition wird durch millimolare Konzentrationen GABA an synaptischen Rezeptoren vermittelt, während extrasynaptische Rezeptoren bereits durch niedrigere GABA-Konzentrationen (nM- μ M) aktiviert werden und somit zu einer andauernden, i. e. tonischen, Inhibition führen (Semyanov et al., 2004; Cavelier et al., 2005; Farrant und

Nusser, 2005; Mody 2005; Walker und Semyanov, 2008; Winsky-Sommerer 2009). Diese GABA ist auch synaptischen Ursprungs, erreicht aber als „Spill-over“ (Überlauf aus dem synaptischen Spalt) extrasynaptische Rezeptoren (Nusser et al., 1998; Luscher und Keller, 2004, Winsky-Sommerer 2009).

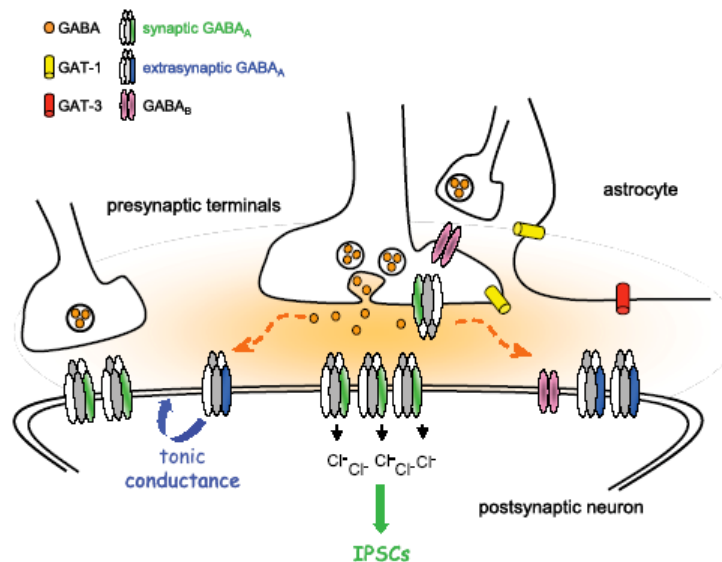


Abbildung 11

Schematische Darstellung der phasischen und tonischen Inhibition (Winsky-Sommerer 2009)

3.2.2) GABA-Bindungstasche

Die Bindungstasche für GABA befindet sich zwischen den α - und den β -Untereinheiten. Sie besteht aus sechs Schleifen (Loops), bezeichnet mit den Buchstaben A bis F. Diese sind lange Ketten von Aminosäuren, wobei nur wenige Aminosäuren für die Bindung von GABA essentiell sind (Boileau et al., 2001).

Loop A, B und C befinden sich auf den β_2 -Untereinheiten, wobei die für die Bindung wichtigen Aminosäuren bei Loop A Tyr⁹⁷ und Leu⁹⁹, bei Loop B Tyr¹⁵⁷ und Thr¹⁶⁰ und bei Loop C Ser²⁰⁴, Tyr²⁰⁵, Arg²⁰⁷ und Ser²⁰⁹ sind (Amin und Weiss, 1993; Wagner und Czajkowski, 2001, Wieland et al., 1992; Boileau et al., 2001).

Loop D, E und F befinden sich auf den α_1 -Untereinheiten. Essentiell sind hier bei Loop D Phe⁶⁴, Arg⁶⁶, Ser⁶⁸, bei Loop E Arg¹¹⁹ und Ile¹²⁰ (Sigel et al., 1992; Boileau et al., 1999, Smith und Olsen, 1995, Westh-Hansen et al., 1997; Westh-Hansen et al., 1999;

Boileau et al., 2001) und bei Loop F Val¹⁷⁸, Val¹⁸⁰ und Asp¹⁸³ (Newell und Czajkowski, 2003).

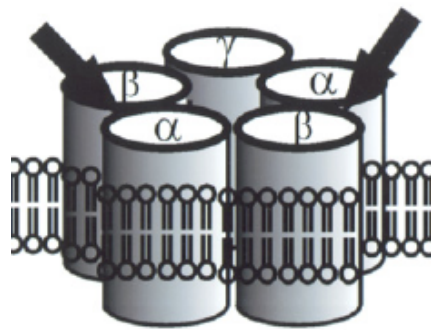


Abbildung 9

Die schwarzen Pfeile zeigen die GABA-Bindungsstellen (Kash et al., 2004)

Gating

Zum Gating-Mechanismus der GABA_A-Rezeptoren werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert.

Bindung von GABA, führt zu einer Konstriktion der Bindungstasche (Wagner und Czajkowski, 2001; Kash et al., 2004). Daraus resultiert eine Bewegung in der extrazellulären Domäne der α- und der β-Untereinheiten, die sich auf benachbarte Loops innerhalb der Untereinheiten auswirkt. Eine „conformational Wave“ transferiert die Strukturänderungen von der Bindungstasche zu den transmembranären Domänen (Kash et al., 2004). Loop 7 der α-Untereinheiten leitet die Bewegung zum TM2-3-Linker weiter (Kash et al., 2003; Kash et al., 2004), während sich Loop 2 und Loop 7 der β-Untereinheiten der preTM1 annähern (Kash et al., 2004a; Kash et al., 2004b). Die transmembranären Domänen stellen vermutlich starre α-Helices dar (Miyazawa et al., 2003; Kash et al., 2004). Daher verursacht die Bewegung im der TM2-3-Linker eine Änderung des helikalen Kreuzungswinkels und führt zu signifikanten strukturellen Veränderungen in der TM2 und im TM1-TM2-Loop. Dadurch kommt es zur Öffnung des Kanals (Kash et al., 2004).

Eine andere Theorie ist der „Pin-into-Socket-Mechanismus“. Hier ist ein einzelner Valinrest in der extrazellulären Domäne die Verbindung zu der transmembranären Domäne. Dieser dient als Achse, die das Weiterleiten der Rotation der extrazellulären Domäne, die durch Bindung von GABA induziert wird, auf die TM2 ermöglicht. Diese Rotation führt zu einer Öffnung der Kanalpore (Auerbach 2003; Kash et al., 2004).

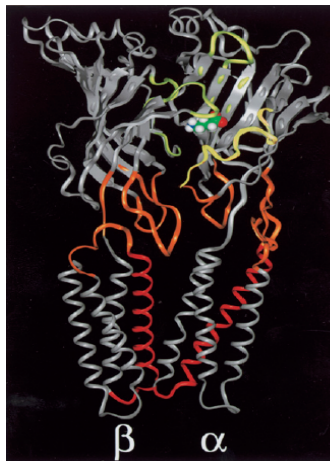


Abbildung 10

Gelb zeigt die Bereiche, wo GABA bindet; Rot zeigt die TM2 Domänen (Kash et al., 2004).

4.) Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren

4.1) Benzodiazepine

Benzodiazepine, wie z.B. Diazepam, sind Arzneistoffe mit anxiolytischer, sedierender, hypnotischer, muskelrelaxierender und antikonvulsiver Wirkung (Sanger et al., 2003; Savić et al., 2005). In der Therapie werden sie zur Behandlung von Angstzuständen, Schlafstörungen, Muskelspasmen und Epilepsie eingesetzt (Sramek et al., 2002; Savić et al., 2005). Bei chronischer Exposition kommt es zur Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit (Allison und Pratt, 2003; Kan et al., 2004, Wafford 2005).

Die Benzodiazepin-Bindungsstelle befindet sich zwischen der α - und der γ_2 -Untereinheit. Aminosäuren, die für die Bindung essentiell sind, sind auf der α_1 -Untereinheit His¹⁰¹, Tyr¹⁵⁹, Gly²⁰⁰, Thr²⁰⁶ und Tyr²⁰⁹ und auf der γ_2 -Untereinheit Phe⁷⁷, Ala⁷⁹, Thr⁸¹ und Met¹³⁰ (Kucken et al., 2003; Berezhnoy et al., 2004; Wafford 2005).

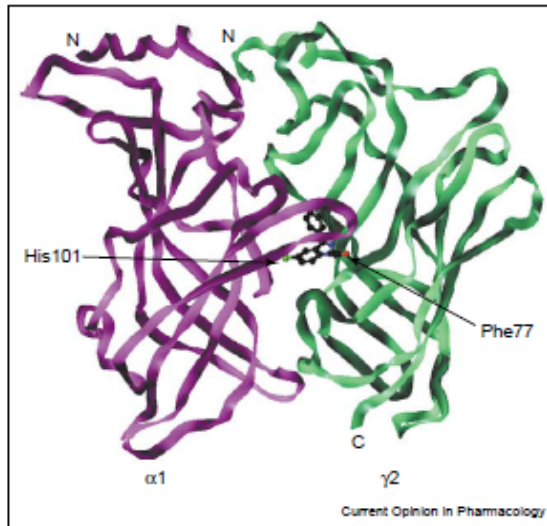


Abbildung 12
Die Benzodiazepinbindungstasche
mit Diazepam
(Wafford 2005).

Nach Bindung an den GABA_A-Rezeptor führen Benzodiazepine zu allosterischen Änderungen am Ionenkanal. Dies führt zu einer Verstärkung der Wirkung von GABA durch Erhöhung der Öffnungsfrequenz der Chloridkanäle und durch die erhöhte Affinität des Rezeptors für GABA. (Iversen, 2004; D'Hulst et al., 2009). Alleine können Benzodiazepine und andere allosterische Agonisten dieser Bindungsstelle keinen Chloridinflus auslösen. Daher haben sie eine große therapeutische Breite (Macdonald et al., 1994; D'Hulst et al., 2009). Nach Bindung von GABA kommt es zu einer Kontraktion der GABA-Bindungstasche, wodurch die Benzodiazepin-Bindungsstelle zwischen der α - und der γ -Untereinheit geöffnet wird. (Tallman et al., 1978; Karobath und Sperk, 1979; Sharkey und Czajkowski, 2008). Andere Agonisten wie zum Beispiel Pentobarbital führen interessanterweise jedoch zu keiner Konformationsänderung in der Benzodiazepin-Bindungsstelle. Also beeinflusst eine Öffnung des Kanals nicht zwingend die Benzodiazepin-Bindungstasche. Daher liegt es nahe, dass die GABA- und die Benzodiazepin-Bindungsstelle miteinander verbunden sind und dass nur über die GABA-Bindungsstelle Bewegungen in der Benzodiazepin-Bindungstasche induzieren werden können (Sharkey und Czajkowski, 2008).

Nicht alle GABA_A-Rezeptoren sind empfindlich für Benzodiazepine. Determinierend dafür ist vor allem die α -Untereinheit. Die Rezeptoren $\alpha_4\beta_x\gamma_2$ und $\alpha_6\beta_x\gamma_2$ gehen mit den klassischen Benzodiazepinen wie z.B. Diazepam, Flunitrazepam, Clonazepam keine Bindung ein und werden daher Diazepam-unempfindliche-Rezeptoren genannt (Möhler 2002; Winsky-Sommerer, 2009). Entscheidend dafür ist die Aminosäure Arg¹⁰¹ in den α_4 - und α_6 -Untereinheiten, während sich in den anderen Untereinheiten ein His¹⁰¹ befindet (Benson et al., 1998; Wafford et al., 2004).

Die α -Untereinheit ist nicht nur wichtig für die Bindung, sondern auch für die *in vivo* Wirkung, der Benzodiazepine. Für den sedierenden Effekt ist die α_1 -Untereinheit verantwortlich, während die α_2 -Untereinheit für die Anxiolyse essentiell ist (Wafford et al., 2004). Letztere vermittelt auch analgetische Effekte (Knabl et al., 2008; Zeilhofer et al., 2009) und Muskelrelaxation (Crestani et al., 2000). Die α_3 -Untereinheit unterstützt die anxiolytische Wirkung der α_2 -Untereinheit (McKernan et al., 2000; Möhler 2009). Für die antikonvulsive Wirkung der Benzodiazepine sind die α_1 -Untereinheit und vor allem die α_2 -Untereinheit verantwortlich (Fradley et al., 2007). Das Blockieren der α_5 -Untereinheit führt zu einer Verbesserung des räumlichen Denkens (Collinson et al., 2002).

Nach regelmäßiger Einnahme von Benzodiazepinen kommt es zu einer Verminderung der Verstärkung des Chloridinfluxes, das heißt die Rezeptoren weisen eine reduzierte Empfindlichkeit für Benzodiazepine auf (Primus et al., 1996; Klein et al., 1994; Wafford 2005). Aber auch die Expression von den einzelnen Subtypen wird verändert. Es kommt zu einer Verringerung der Expression der α_1 -Untereinheit, dafür aber zu einer Up-Regulierung von α_3 - α_5 - β_2 - β_3 - und γ_2 -Untereinheit (Pesold et al., 1997; Wafford 2005).

4.2) Weitere Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren:

4.2.1) Barbiturate

Barbiturate sind Derivate der Barbitursäure. Sie wirken sedierend, hypnotisch, antikonvulsiv, und anästhetisch, führen aber bei regelmäßigem Gebrauch zu Gewöhnung und Abhängigkeit (Ito et al., 1996). Darüberhinaus weisen Barbiturate eine geringe therapeutische Breite auf. (Gannet et al., 2001)

Barbiturate erhöhen die Öffnungsdauer des Kanals, haben aber keinen Effekt auf die Öffnungshäufigkeit oder die Leitfähigkeit (Study und Parker, 1981; Henschel et al., 2008). Abhängig von der Konzentration beeinflussen sie den GABA_A-Rezeptor auf drei unterschiedliche Arten:

Unter 100 μ M führen Barbiturate selbst zu keinem oder nur geringem Effekt, jedoch erhöhen sie die Rezeptoraktivität bei etwas höheren Konzentrationen von GABA (Akaike et al., 1985; Evans 1979; Akaike et al., 1990; Muroi et al., 2009).

Bei Konzentrationen von 100 μM bis 1 mM fungieren sie als Rezeptoragonisten, d.h. sie aktivieren GABA_A -Rezeptoren in der Abwesenheit von GABA (Akaike et al., 1985; Muroi et al., 2009).

Über der Konzentration von 1 mM blockieren Barbiturate den GABA_A -Rezeptor (Akaike et al., 1985; Akk und Steinbach, 2000; Rho et al., 1996; Muroi et al., 2009).

Barbiturate besitzen eine höhere Affinität zu β_2 - und β_3 -Untereinheiten als zu β_1 -Untereinheiten (Birnie et al., 1997; Dalziel et al., 1999; Pistis et al., 1999; Carlson et al., 2000; Cestari et al., 2000; Serafini et al., 2000; Chang et al., 2003; Drafts und Fisher, 2006). Barbiturate rufen bei GABA_A -Rezeptoren, die eine α_6 -Untereinheit beinhalten, den größten Effekt hervor und sind an diesen Rezeptoren effektiver als GABA (Thompson et al., 1996; Drafts und Fisher, 2006). An Kanälen, die eine α_1 - bis α_5 -Untereinheit kombiniert mit einer β - und einer γ -Untereinheit enthalten, sind Barbiturate weniger effektiv als GABA (Thompson et al., 1996; Wafford et al., 1996; Akk et al., 2004; Drafts und Fisher, 2006). Verantwortlich für die hohe Affinität der Barbiturate zu der α_6 -Untereinheit ist Thr⁶⁹, das auf der N-terminalen extrazellulären Domäne dieser Untereinheit lokalisiert ist (Drafts und Fisher, 2006).

Auch GABA_A -Rezeptoren, die δ -Untereinheiten enthalten, werden von Barbituraten moduliert (Akk et al., 2004; Feng et al., 2004; Drafts und Fisher 2006).

4.2.2) Neurosteroid

Zahlreiche Metabolite des Progesterons wirken auch zentralnervös und werden daher als neuroaktive Steroide (Neurosteroid) bezeichnet (Henschel et al., 2008). Sie verfügen über anxiolytische, antidepressive, antipsychotische, antikonvulsive, ataxische und/oder anästhetische Wirkung (Crawley et al., 1986; Landgren et al., 1987; Belleli et al., 1990; Bitran et al., 1993; Korneyev und Costa, 1996). Endogene Neurosteroid werden vor allem während der Schwangerschaft, Stressphasen und nach Alkoholgenuss gebildet. Eine Störung der Biosynthese kann zu Angststörungen, Depressionen, Schizophrenie, Alkoholabhängigkeit und katamenialer Epilepsie führen (Stoffel-Wagner 2003; Backstrom et al., 2003; Finn et al., 2003; Eser et al., 2006; Marx et al., 2006; Hosie et al., 2006).

Neurosteroid sind potente Modulatoren von GABA_A -Rezeptoren (Belelli und Lambert, 2005; Fritschy und Brunig, 2003; Hosie et al., 2006). In geringen Konzentrationen (nanomolarer Bereich), wie bei Stress, Alkoholeinfluss und beim Östrus, führen Neurosteroid zu einer Potenzierung des Chloridinfluxes (Zhu und Vicini, 1997; Stell et

al., 2003; Belelli und Herd, 2003; Hosie et al., 2006). In höheren Konzentrationen (submikromolarer bis mikromolarer Bereich) wie z.B. während der Geburt, aktivieren sie den Rezeptor direkt (Majewska et al., 1986; Hosie et al., 2006). Daher nimmt man an, dass zwei verschiedene Bindungsstellen für Neurosteroiden am GABA_A-Rezeptor existieren (Belelli und Lambert, 2005). Diese befinden sich vermutlich in den transmembranären Domänen (Rick et al., 1998; Akk et al., 2005; Ueno et al., 2004). Aminosäuren auf der α_1 -Untereinheit in TM1 und/oder TM2 sind für die Neurosteroidwirkung essentiell (Hosie et al., 2006).

Entscheidend für die Bindung an den GABA_A-Rezeptor ist eine Hydroxyl-Gruppe in α -Stellung in Position 3 am A-Ring und eine Keton-Gruppe an Position 20 an der Seitenkette des D-Ringes (Harrison et al., 1987; Hosie et al., 2006), da diese Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren oder geladenen Aminosäuren ausbilden (Grishkovskaya et al., 2000; Brzozowski et al., 1997; Hosie et al., 2006). Daher verringert sich durch Substitution von polaren Aminosäuren auf der α_1 -Untereinheit in TM1 und TM2 durch hydrophobe i. e. Thr229Ile, Thr236Ile, Gln241Trp, Thr264Val, Ser269Met, Asn274Ala, Ser275Ala die Sensitivität des GABA_A-Rezeptor für Neurosteroiden (Hosie et al., 2006).

Bindet ein Neurosteroid an den Rezeptor, befindet sich der hydrophobe A-Ring des Neurosteroids neben der hydrophoben Seitenkette von α Ile²³⁸. Das Einführen einer polaren Aminosäure in Position 238 resultiert in einer elektrostatischen Abstoßung und daher in einer Verringerung der Verstärkung des Chloridinfluxes (Hosie et al., 2006).

Wie bereits erwähnt, wirken Neurosteroiden über 2 unterschiedliche Bindungstaschen in den transmembranären Domänen des GABA_A-Rezeptors. Diese befinden sich zwischen den α - und den β -Untereinheiten, wobei die Aminosäuren α Thr²³⁶, β Tyr²⁸⁴, α Gln²⁴¹ und α Asn⁴⁰⁷ direkt an der Bindung beteiligt. Über die beiden erstgenannten Aminosäuren wird der GABA_A-Kanal direkt aktiviert, während über die beiden letzten die Potenzierung des Chloridinfluxes vermittelt wird. Um eine vollständige Aktivierung des GABA_A-Rezeptors zu erreichen, ist die Besetzung von beiden Bindungsstellen essentiell. Da diese Aminosäuren in allen α - und β -Untereinheiten konserviert sind, vermitteln alle GABA_A-Rezeptoren die Wirkung von Neurosteroiden (Hosie et al., 2006).

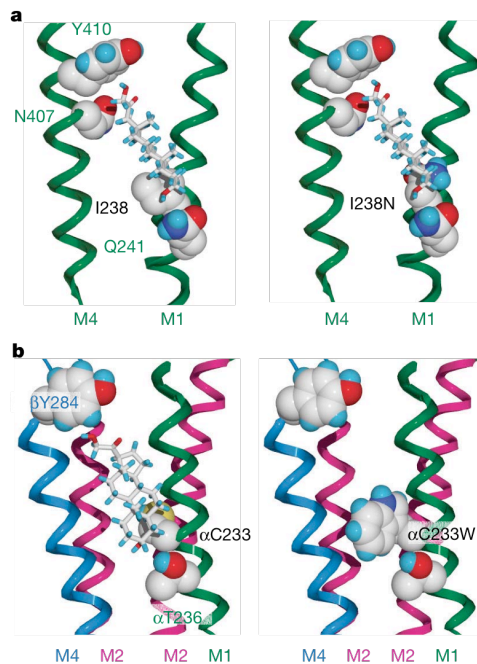


Abbildung 13
Schematische Darstellung eines gebundenen Neurosteroids bei einem Wildtyp-Rezeptor (links) und einem mutiertem Rezeptor (rechts) (Hosie et al., 2006)

4.2.3) Anästhetika

Anästhetika variieren in ihrer Fähigkeit Analgesie, Muskelrelaxation und Amnesie zu erzeugen. Jedoch haben sie eine Eigenschaft gemeinsam: Sie führen bei niedrigen Konzentrationen von 10 μM bis 300 μM zu einem reversiblen Bewusstseinsverlust.

Die Anästhetika unterteilen sich in Injektionsnarkotika wie Etomidat, Propofol, Barbiturate und neuroaktive Steroide und Inhalationsnarkotika wie Halothan, Sevofluran, Isofluran sowie Xenon.

Ihr Wirkmechanismus war lange unklar. Lange nahm man an, dass Anästhetika Lipide aus dem Gehirn extrahieren. Später führte man die Wirkung von Anästhetika auf eine Interaktion dieser mit der Lipiddoppelschicht der Nervenzellen zurück. Man nahm an, dass Anästhetika die Membranfunktion z.B. durch Erhöhung der Lipidfluidität stören. Anästhetika ändern tatsächlich die Membranpermeabilität und verursachen Lipidphasenübergänge. Jedoch wies diese Theorie auch große Mängel auf. Die Konzentrationen, die pharmakologische Wirkungen aufweisen, vermitteln nur geringe Änderungen in der Doppelschicht. Diese treten ebenfalls nach geringen Temperaturerhöhungen auf. Daher bestand die Vermutung, dass eine Steigerung der Temperatur die anästhetischen Effekte verstärkt. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Außerdem wurde auch der „Cutoff“-Effekt ignoriert, der zeigt, dass ab einem gewissen

Punkt in einer homologen Reihe die anästhetische Wirkung plötzlich verschwindet. Das größte Problem dieser These war aber, wie durch Störung der Lipiddoppelschicht ein dysfunktionelles Membranprotein entsteht, was laut Theorie das Endresultat ist (Franks 2006).

Heute weiß man, dass Anästhetika spannungsgesteuerte Ionenkanäle z.B. Ca^{2+} - oder K^{+} -Kanäle und ligandengesteuerte Kanäle vor allem den GABA_A -Rezeptor modulieren (Bhattacharya et al., 2000; Franks 2006).

Während Inhalationsanästhetika und auch Alkohole vor allem mit der α -Isoform des GABA_A -Rezeptors interagieren, sind Injektionsanästhetika vor allem von der β -Isoform abhängig. Wichtige Aminosäuren für die Bindung von Inhalationsanästhetika auf der α_1 -Untereinheit sind vermutlich Leu^{232} (TM1), Ser^{270} (TM2), Ala^{291} (TM3) und Tyr^{411} , Thr^{414} und Tyr^{415} (TM4) (Jenkins et al., 2002, Jenkins et al., 2001; Krasowski und Harrison, 1999; Mascia et al., 2000; Mihic et al., 1997; Campagna-Slater und Weaver, 2007).

Die Modulation von GABA_A -Rezeptoren durch Injektionsnarkotika wie Etomidat und Propofol ist vor allem von der β -Isoform abhängig. So werden nur Rezeptoren mit β_2 - und β_3 -Untereinheiten moduliert, während Rezeptoren mit β_1 -Untereinheiten nicht sensitiv für die Modulation sind. Maßgebend für die Bindung von Etomidat ist vermutlich die Aminosäure Asn^{265} auf den $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten, die auf den β_1 -Untereinheiten durch Serin ersetzt ist (Belelli et al., 1997; Krasowski und Harrison 1999; Moody et al., 1997; Moody et al., 1998, Campagna-Slater und Weaver, 2007). Neben Asn^{265} spielt bei der Bindung von Etomidat Met^{236} auf der α_1 -Untereinheit eine wichtige Rolle (Li et al., 2006).

Für die Bindung von Propofol spielt Met^{286} auf der β_2 -Untereinheit eine wichtige Rolle (Bali und Akabas, 2004; Krasowski und Harrison, 1999; Krasowski et al., 2001; Campagna-Slater und Weaver, 2007). Daher nimmt man an, dass unterschiedliche Bindungstaschen für Etomidat und Propofol vorhanden sind (Campagna-Slater und Weaver, 2007).

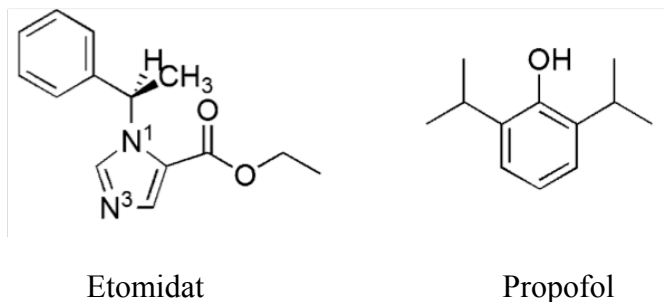


Abbildung 14

Strukturformel der beiden Anästhetika Etomidat und Propofol
(Campagna-Slater und Weaver, 2007)

Bindungsstelle von Etomidat:

In der Mitte des α -helikalen Bündels der transmembranären Domäne der β_2 -Untereinheit befindet sich eine Tasche, die sich zwischen den Segmenten der TM1 und der TM4 und den Segmenten der TM3 und TM4 in der Nähe der Lipiddoppelschicht öffnet und bis zu den Segmenten der TM2 reicht, die an die Kanalpore angrenzen. In dieser Bindungstasche ist vermutlich die Aminosäure Asn²⁶⁵ auf der β_2 - und β_3 -Untereinheit und Met²³⁶ auf der α_1 -Untereinheit für die Bindung von Etomidat essentiell (Campagna-Slater und Weaver, 2007; Li et al., 2006). Fehlt dieser Asparaginrest wie z.B. in der β_1 -Untereinheit (β_1 Ser²⁹⁰), werden die Rezeptoren nicht mehr von Etomidat moduliert (Belelli et al., 1997; Moody et al., 1997; Moody et al., 1998; Sanna et al., 1997; Campagna und Weaver, 2007).

Man vermutet außerdem, dass es zwischen dem Imidazolring des Trp²³⁷ und der Phenylgruppe des Etomidats zu π - π -Interaktion kommt. Weitere Aminosäuren, die ebenfalls zur Bindung von Etomidat beitragen könnten, sind Ile²³⁰, Leu²³¹, Thr²³³, Ile²³⁴ und Ser²³⁶ auf TM1, Met²⁶¹ auf TM2 und Phe²⁹³, Leu²⁹⁶, Leu²⁹⁷ und Ala³⁰⁰ auf TM3 (Campagna und Weaver, 2007).

Bindungsstelle von Propofol:

Diese Bindungstasche befindet sich nahe am extrazellulären Bereich zwischen TM1, TM3 und TM4. Für die Bindung von Propofol ist Met²⁸⁶ essentiell (Bali und Akabas, 2004; Krasowski et al., 2001; Campagna-Slater und Weaver, 2007).

Zwischen der Hydroxylgruppe des Propofols und der Carbonylgruppe des Gln²²⁴ können Wasserstoffbrücken gebildet werden, weiters trägt die π - π -Interaktion zwischen Tyr⁴⁴⁸ und Propofol zur Bindung bei. Die letzten beiden Aminosäuren kommen auf β_1 - β_2 - und β_3 -Untereinheiten vor, daher bindet dieses Anästhetikum nicht spezifisch an einem bestimmten Subtyp der β -Untereinheit (Krasowski et al., 2001; Campagna-Slater und Weaver, 2007). Weitere Aminosäuren, die eventuell an der Bindung von Propofol beteiligt sind, sind Leu²²³, Thr²²⁵ und Tyr²²⁶ auf TM1, Leu²⁸⁵, Phe²⁸⁹ und Phe²⁹³ auf TM3 und Tyr⁴⁴⁴ und Trp⁴⁴⁵ auf TM4 (Campagna-Slater und Weaver, 2007).

Ein weiteres bedeutendes Anästhetikum, das aufgrund seiner stark analgetischen Wirkung vor allem bei besonders schmerzhaften Eingriffen angewendet wird, ist das Ketamin. Dieses wirkt jedoch nicht über den GABA_A-Rezeptor, sondern über den NMDA-Rezeptor (Visser und Schug, 2006).

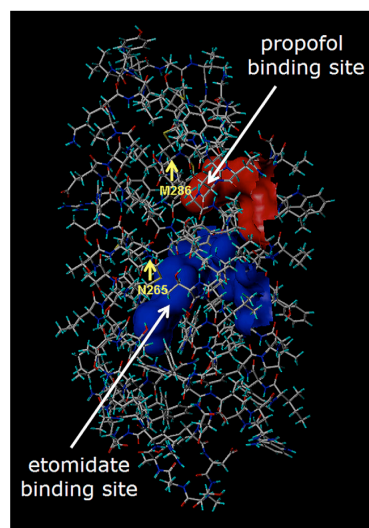


Abbildung 15
Bindungsstelle für Etomidat und Propofol
(Campagna-Slater und Weaver 2007)

4.2.4) Ethanol

Alkohol ist neben Coffein und Nikotin die am meisten genutzte legale Droge (Olsen et al., 2007). Alkohol wirkt anxiolytisch, sedierend (Jia et al., 2007) und beeinträchtigt die motorische Koordination und das Urteils- und Sprachvermögen. In höheren Dosen führt er zu Nausea, Erbrechen und zu Bewusstlosigkeit. Bei chronischem Alkoholmissbrauch kommt es neben Leberschäden, Herzkrankheiten und erhöhtem Krebsrisiko (Olsen et al., 2007) auch zu einer Übererregbarkeit des ZNS und zu Tremor (Kralic et al., 2002; Kralic et al., 2005; Kumar et al., 2009; Kumar et al., 2010). Die tödliche

Blutkonzentration beim Menschen liegt zwischen 50 mM und 110 mM (Olsen et al., 2007).

Ähnlich wie bei den Anästhetika war der molekulare Wirkungsmechanismus von Alkohol lange Zeit ungeklärt. Obwohl der GABA_A-Rezeptor als Angriffspunkt von Ethanol naheliegend war, konnte eine Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen nicht gezeigt werden (Olsen et al., 2007). Die Mehrheit der synaptischen GABA_A-Rezeptoren reagiert nur bei Konzentrationen über 60 mM auf Ethanol.

Dagegen zeigen extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren ($\alpha_4\beta_3\delta$ und $\alpha_6\beta_3\delta$) hohe Sensitivität gegenüber Ethanol. Bei $\alpha_4\beta_3\delta$ -Rezeptoren führen Alkoholkonzentration von 3 mM zu einer Verlängerung der Öffnungszeit des Rezeptors und somit zu einer Vergrößerung der Amplitude (Hancher et al., 2004; Wallner et al., 2003; Olsen et al., 2007). Zusätzlich spielen auch verschiedene modulatorische Faktoren *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Wirkung von Ethanol (Jacob et al., 2005; Olsen et al., 2007).

Bei wiederholtem Ethanolkonsum zeigt sich auch ein verändertes Expressionsmuster der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Ethanol induziert eine erhöhte Expression von mRNA der α_4 -Untereinheiten und eine verminderte Expression der mRNA der α_1 -Untereinheiten (Devaud et al., 1995; Devaud et al., 1997; Davies, 2003). Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Internalisierung von Rezeptoren mit α_1 -Untereinheiten (Kralic et al., 2002; Kralic et al., 2005; Kumar et al., 2009; Kumar et al., 2010). Ethanol führt dabei zu einer Verbindung des α_1 -GABA_A-Rezeptors mit dem Adaptor-Komplex 2 (heterotetrameres Protein) und zur Internalisierung in Clathrin Coated Vesicles im cerebralen Cortex (Kumar et al., 2003; Kumar et al., 2010). Da nach chronischem Ethanoleinfluss die α_4 -GABA_A-Rezeptoren erhöht und die α_1 -GABA_A-Rezeptoren vermindert sind, wirken die klassischen Benzodiazepine weniger effektiv (Buck und Harris, 1990; Davies, 2003).

4.2.5) Diverse Modulatoren

- Loreclezol
- Furosemid
- Mefenaminsäure

Loreclezol

Loreclezol ist ein Breitspektrum-Antikonvulsivum, das vor allem bei generalisierten Absenzen und tonisch-klonischen Anfällen eingesetzt wird (Ghiani et al., 1996). Es weist eine 300-fach höhere Affinität zu GABA_A-Rezeptoren auf, die β_2 - oder β_3 -Untereinheiten enthalten, als zu jenen mit β_1 -Untereinheiten (Wingrove et al., 1994). Eine einzige Aminosäure auf den β -Untereinheiten (β_2 Asn²⁸⁹ bzw. β_3 Asn²⁹⁰) ist essentiell für die Bindung von Loreclezol. Ein Austausch dieser gegen die homologe Aminosäure auf der β_1 -Untereinheit (β_1 Ser²⁹⁰) hebt die Wirkung von Loreclezol auf (Wingrove et al., 1994).

Mefenaminsäure

Mefenaminsäure (NSAID) weist zusätzlich zur analgetischen Wirkung auch antikonvulsive und prokonvulsive Effekte auf. Ähnlich wie Loreclezol moduliert Mefenaminsäure nur GABA_A-Rezeptoren, die $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten enthalten und blockiert $\alpha_1\beta_1$ -Rezeptoren. Außerdem kann Mefenaminsäure GABA_A-Rezeptoren direkt aktivieren. Auch hier ist für den positiv modulatorischen Effekt die Aminosäure Asn²⁹⁰ Voraussetzung. Ersetzt man diese durch Serin (β_2 Asn290Ser), werden diese Kanäle nicht mehr von Mefenaminsäure moduliert. Mutiert man jedoch Serin auf der β_1 -Untereinheit zu Asparagin, induziert man Sensitivität für Mefenaminsäure. Daher ist die Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren einzig von der β -Untereinheit-Isoform abhängig (Halliwell et al., 1999).

Furosemid

Furosemid ist ein Schleifendiuretikum, das auch den GABA_A-Rezeptor blockiert. Dieser Effekt hängt von der Untereinheitenkombination ab (α_6 und $\beta_{2/3}$) (Korpi und Lüddens, 1997), wobei die Anwesenheit von γ - oder δ -Untereinheiten nicht notwendig ist (Knoflach et al., 1996; Korpi und Lüddens, 1997). Der Wirkungsmechanismus von Furosemid unterscheidet sich von dem anderer GABA_A-Rezeptor-Antagonisten. Darüberhinaus hemmt Furosemid neben dem renalen Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter (NKCC) auch den NKCC1 im Gehirn (Russell, 2000). Interessanterweise wird nach einem zerebralen Infarkt dieser Transporter im Gehirn vermehrt exprimiert. Wird nun dieser gehemmt, kommt es zu einer signifikanten Verkleinerung des Infarktgebietes (Yan et al., 2001).

Furosemid inhibiert vorwiegend GABA_A-Rezeptoren mit einer α_6 -Untereinheit. Wird die Ile²⁸⁸ (TM1) in der α_6 -Untereinheit durch Thr ersetzt, kommt es zu einer 10-fachen Verminderung der IC₅₀. Daher nimmt man an, dass TM1 mit der Aminosäure Isoleucin Bestandteil der Furosemid-Bindungsstelle ist (Thompson et al., 1999). Der Effekt von Furosemid ist außerdem stark abhängig von der β -Untereinheit. Die Wirkung an GABA_A-Rezeptoren mit einer $\beta_{2/3}$ -Untereinheit ist stärker als bei Rezeptoren mit einer β_1 -Untereinheit (Korpi et al., 1995). Koexpression von β_1 Ser265Met und β_3 Asn265Ser mit α_6 - und γ_2 -Untereinheiten zeigt, dass der Effekt von Furosemid von den gleichen Aminosäuren abhängt wie der von Loreclezol. Die Aminosäure α Ile²⁸⁸ ist auf der TM1 lokalisiert und Aminosäure β_3 Asn²⁶⁵ am extrazellulären Ende der TM2-Domäne. Diese beiden Aminosäuren sind in der Nähe des extrazellulären Ende des Ionenkanals. Im geschlossenen Zustand interkalieren Segmente der TM1 mit Segmenten der TM2 am extrazellulären Ende des Rezeptors. Nach Aktivierung der Rezeptoren bewegt sich sowohl die TM1- als auch die TM2-Region und bilden somit das „gate“ (Akabas und Karlin, 1995). Es wird angenommen, dass Furosemid durch direkte Interaktion mit der TM1 den geschlossenen Zustand des GABA_A-Rezeptors stabilisiert (Thompson et al., 1999).

Durch hohe Konzentrationen von Ro5-4864 wird der Effekt von Furosemid antagonisiert (Korpi und Lüddens, 1997).

GABA_A-Rezeptoren spielen bei Schlaf und Angst sowie bei Epilepsie eine wichtige Rolle.

5.) Epilepsie

1 % der Weltbevölkerung ist von Epilepsien betroffen. Sie gehören daher zu den häufigsten neurologischen Störungen (Hauser 1994, Macdonald und Kang, 2009). Der Auslöser von Epilepsien ist unter anderem die mangelnde synaptische Inhibition (Wallace et al., 2001). Daher beruht die antiepileptische Wirkung einiger Medikamente auf der Verstärkung der GABAergen Neurotransmission (Macdonald et al., 2006 Macdonald und Kang, 2009). Idiopathische generalisierte Epilepsien (IGEs) sind eine

Gruppe von genetischen Epilepsien wie zum Beispiel Pyknolepsie, juvenile myoklonische Epilepsie, generalisierte mit fiebrigen Epilepsien und tonisch-klonischen Anfällen (Hirose et al., 2005; MacDonald und Kang, 2009). Vielen IGEs liegt eine Mutation von Ionenkanälen zu Grunde (Mulley et al., 2003; Macdonald und Kang, 2009).

GABA_A-Rezeptor-Mutationen, die mit IGEs in Verbindung gebracht werden, wurden auf α_1 -, β_3 -, γ_2 - und δ -Untereinheiten identifiziert (Macdonald et al., 2006; und Macdonald und Kang, 2009). Die Mutationen können in 4 Klassen unterteilt werden: Missense, Nonsense, Frameshift-Mutationen in kodierenden Sequenzen und Mutationen in nicht-kodierenden Sequenzen (Macdonald und Kang, 2009).

Missense-Mutationen führen zu einer Änderung der Nukleotidsequenz in einem Codon, was in einem Peptid zum Einbau einer falschen Aminosäure statt der ursprünglichen führt.

Nonsense-Mutationen ändern ebenfalls die Nukleotidsequenz in einem Codon, das einen sofortigen Stopp oder ein vorzeitiges Translationsende kodiert (MacDonald und Kang, 2009).

Frameshift-Mutationen treten durch Auslöschung oder Einfügen neuer Nukleotide auf. Da drei Nukleotide eine Aminosäure ergeben, verändert sich nach Einschub oder Löschen eines Nukleotids das Leseraster, was unter anderem zu einem vorzeitigen Translationsende führen kann (MacDonald und Kang, 2009).

Missense-Mutationen beeinträchtigen unter anderem die Oberflächenexpression von den Rezeptoren (Macdonald et al., 2006; Macdonald und Kang, 2009). Dies ist auf fehlerhafte/veränderte Faltung, fehlerhafte Zusammenlagerung oder auf das Zurückhalten der mutierten Proteine durch das endoplasmatische Retikulum zurückzuführen.

GABA_A-Rezeptor-Missense-Mutationen in Untereinheiten sind:

- GABRA1(Ala322Asp)
- GABRB3(Gly32Arg),
- GABRG2(Arg43Gln),
- GABRG2(Arg138Gln)
- GABRG2(Lys289Met)

Nonsense-Mutationen sind:

- GABRG2(Gln1X)
- GABRG2(Gln351X)
- GABRG2(Trp390X)

Eine Frameshift-Mutation ist GABRA1(975delCys, Ser326fs328X) (Macdonald und Kang, 2009).

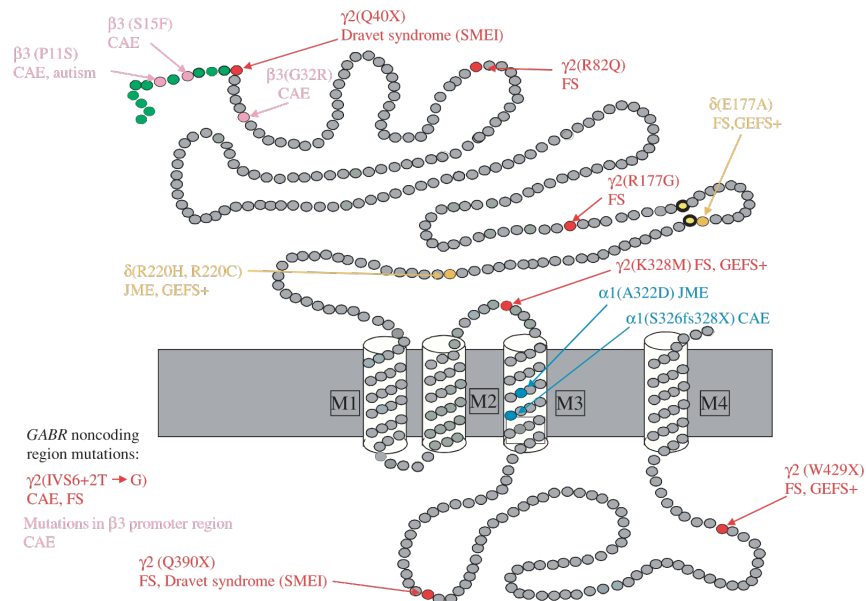


Abbildung 16

Schematische Darstellung der Position der Mutationen am GABA_A-Rezeptor (MacDonald und Kang, 2010)

GABA_A-Rezeptor-Missense Mutationen

γ₂-Untereinheit-Missense-Mutation Arg43Gln

Diese Mutation beeinträchtigt massiv die Leitfähigkeit des Kanals und die Expressionsdichte in der Zellmembran (Kang und Macdonald, 2004; Bianchi et al., 2002; Macdonald und Kang, 2009). Das klinische Bild ist durch Pyknolepsie und durch fiebrige Anfälle gekennzeichnet (Wallace et al., 2001; Macdonald und Kang, 2009).

γ_2 -Untereinheit-Missense-Mutation Lys289Met

Rezeptoren, die die Lys289Met Mutation tragen, deaktivieren schneller als Wildtyp-Rezeptoren. Außerdem führt sie zu einer deutlich kürzern Öffnungsdauer (25 %) der Kanäle (Bianchi et al., 2002; Macdonald und Kang, 2009).

Betroffene leiden unter generalisierter Epilepsie (autosomal dominant vererbt) (Baulac et al., 2001; Macdonald und Kang, 2009).

γ_2 -Untereinheit-Missense-Mutation Arg138Gly

An dieser Position befinden sich in der Cys-Loop-Familie polare und geladene Aminosäuren. Diese Mutation führt zu leichten Veränderungen der Stromkinetik und zu einer verringerten Benzodiazepin-Sensitivität (Macdonald und Kang, 2009).

Diese Mutation führt unter anderem zu Fieberkrämpfen (Audenaert et al., 2006; Macdonald und Kang, 2009).

α_1 -Untereinheit-Missense-Mutation Ala322Asp

Auch hier kommt es durch die Mutation zu einer verminderten Leitfähigkeit des Kanals. Außerdem wird dadurch auch die Helixformation der M3 destabilisiert, die richtige Faltung der α_1 -Untereinheit beeinträchtigt und somit auch die Expression an der Zelloberfläche (Gallagher et al., 2007; Macdonald und Kang, 2009).

Diese Mutation ist unter anderem verantwortlich für die autosomal dominant vererbte juvenile myoklonische Epilepsie (Cossette et al., 2002; Macdonald und Kang, 2009).

β_3 -Untereinheit-Missense-Mutationen Pro11Ser, Ser15Phe und Gly32Arg

Man vermutet, dass diese Mutationen zu abnormaler Proteinexpression führen, wodurch auch das Trafficking stark beeinflusst wird, (Macdonald und Kang, 2009) und so zu Pyknolepsie führen (Tanaka et al., 2008; Macdonald und Kang, 2009).

δ -Untereinheit Missense-Variationen Glu177Ala, Arg220Cys und Arg220His

Die Mutationen Glu177Ala und Arg220Cys konnten bei GEFS+ (Generalized epilepsy with febrile seizures plus) nachgewiesen werden. Die Mutation Arg220His spielt dagegen eine wichtige Rolle bei juveniler myoklonischer Epilepsie (Macdonald und Kang, 2009).

GABA_A-Rezeptor Nonsense-Mutationen:

γ_2 -Nonsense-Mutation Gln1X

Gln1X befindet sich zwischen dem Signalpeptid und dem fertigen Peptid und ist für einen frühzeitigen Stopp der Translation verantwortlich. Dies führt zu schwerer myoklonischer Epilepsie im Kindesalter (Hirose 2006; Macdonald und Kang 2009).

γ_2 -Nonsense-Mutation Gln351X

Gln351X ist auf der intrazellulären Schleife der γ_2 -Untereinheit zwischen den Domänen M3 und M4 lokalisiert und führt auch hier wieder zu einem frühzeitigen Stopp der Translation. Dadurch fehlen dem γ_2 -Peptid 78 Aminosäuren. Diese Mutation wird mit GEFS+ und schwerer myoklonischer Epilepsie im Kindesalter in Verbindung gebracht (Harkin et al., 2002; Macdonald und Kang, 2009).

γ_2 -Nonsense-Mutation Trp390X

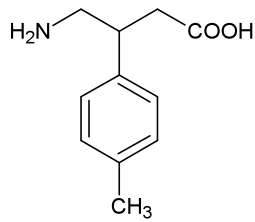
Trp390X ist auf der intrazellulären Schleife zwischen den Domänen M3 und M4 lokalisiert und für GEFS+ verantwortlich (Sun et al., 2008; Macdonald und Kang, 2009). Daraus resultiert auch hier ein vorzeitiger Stopp der Translation und ein Verlust von 39 Aminosäuren (Macdonald und Kang, 2009).

6.) GABA_B-Rezeptor

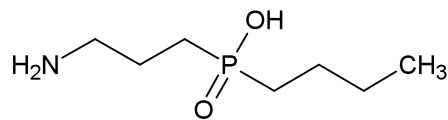
GABA_B-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Sie blockieren mittels $G_{ai/o}$ -Untereinheiten des aktivierten G-Proteins die Adenylatcyclase (Hill 1985; Bettler und Tiao 2006), das wiederum einen Effekt auf Transkriptionsfaktoren (Steiger et al., 2004; Bettler und Tiao 2006) und auf verschiedene Kinasen hat (Diverse-Pierluissi et al., 1997; Couve et al., 2002; Ren und Mody, 2003, Bettler und Tiao, 2006).

GABA_B-Rezeptoren kontrollieren die Freisetzung von Neurotransmittern. Diese wird von prä- und postsynaptische GABA_B-Rezeptoren mittels der Regulation von Kalzium- und Kaliumkanälen gesteuert (Bowery et al., 2002; Calver et al., 2002; Bettler et al., 2004; Bettler und Tiao, 2006). Präsynaptische GABA_B-Rezeptoren befinden sich sowohl an inhibitorischen als auch an exzitatorischen Endigungen, wo sie als Auto- und Heterorezeptoren fungieren. Stimulierung eines präsynaptischen Heterorezeptors führt durch Hemmung eines spannungsabhängigen Kalziumkanals zur Unterdrückung der Ausschüttung von GABA (Mintz und Bean, 1993; Thompson et al., 1993; Poncer et al., 1997; Bettler und Tiao, 2006). Bei postsynaptischen Rezeptoren hingegen kommt es zu einer Aktivierung von Kaliumkanälen, wodurch die Membran hyperpolarisiert (Lüscher et al., 1997; Bettler und Tiao, 2006).

Agonisten des GABA_B-Rezeptors sind z. B. das Muskelrelaxans Baclofen (Bettler und Tiao, 2006) oder CGP 44532 (Bowery 2006). Baclofen wird kaum in der Therapie angewendet, da der Gewöhnungseffekt zu hoch und auch die Nebenwirkungen beträchtlich sind. Antagonisten, wie SGS 742, induzieren prokonvulsive Wirkungen (Vergnes et al., 1997; Bettler und Tiao 2006). Trotzdem gibt es Phase II Versuche, bei denen Patienten mit milder bis moderater Alzheimer damit behandelt werden (Froestl et al., 2004; Bettler und Tiao, 2006). Positiv allosterische Modulatoren sind CGP 7930 und GS 39783 (Urwyler et al., 2001; Urwyler et al., 2003; Bowery 2006).



Baclofen



SGS 742

Abbildung 17
Strukturen von GABA_B-Rezeptor-Liganden

Der GABA_B-Rezeptor ist ein Heteromer, bestehend aus den Untereinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2}, die beide essentiell für die Expression des Rezeptors und für die Kopplung an das G-Protein sind (Marshall et al., 1999; Möhler und Fritschy, 1999; Bettler et al., 2004; Bettler und Tiao, 2006). Von der GABA_{B1}-Untereinheit sind zwei Isoformen, GABA_{B1a} und GABA_{B1b}, bekannt. Sie unterscheiden sich strukturell in der N-terminalen Ektodomäne, wo GABA_{B1a} zwei Sushi-Repeats aufweist, die der GABA_{B1b} fehlen (Blein et al., 2004; Bettler und Tiao, 2006).

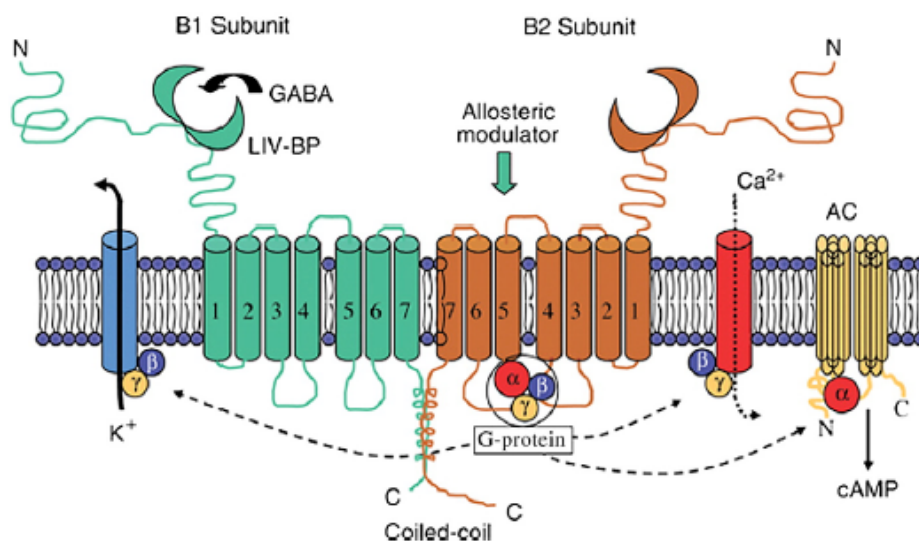


Abbildung 18
Schematische Darstellung des GABA_B-Rezeptors
(Lehmann 2009)

7.) GABA_C-Rezeptor

Der GABA_C-Rezeptor gehört wie der GABA_A-Rezeptor zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle und ist ebenfalls ein Chloridkanal (Enz und Cutting, 1998). GABA_C-Rezeptoren werden vor allem in der Retina exprimiert (Polenzani et al., 1991; Woodward et al., 1992; Woodward et al., 1993; Enz und Cutting, 1998). Verglichen mit den GABA_A-Rezeptoren sind GABA_C-Rezeptoren empfindlicher gegenüber GABA, haben kleinere Ströme und desensibilisieren nicht. Sie haben eine längere mittlere Öffnungsdauer und geringere Chloridleitfähigkeit (Feigenspan et al., 1993; Feigenspan und Bormann, 1994; Enz und Cutting, 1998). GABA_C-Rezeptoren unterscheiden sich auch pharmakologisch von GABA_A-Rezeptoren und GABA_B-Rezeptoren. Sie sind unempfindlich für GABA_A-Rezeptormodulatoren, wie Barbiturate oder Benzodiazepine, dem GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin und den GABA_B-Agonisten Baclofen (Bormann und Feigenspan, 1995; Enz und Cutting, 1998).

Der GABA_C-Kanal besteht aus ρ -Untereinheiten, die ein Pentamer bilden (Enz und Cutting, 1998). Bei den ρ -Untereinheiten unterscheidet man zwischen ρ_1 , ρ_2 , und ρ_3 . Beim Menschen formen ρ_1 - und ρ_2 -Untereinheiten die GABA_C-Rezeptoren; ρ_3 -Untereinheiten kommen neben den anderen in Ratten vor (Cutting et al., 1991; Cutting et al., 1992; Zhang et al., 1995; Wegelius et al., 1996; Ogurusu et al., 1996; Enz und Cutting, 1998).

Diese Untereinheiten bilden Homomere und Heteromere, im Gegensatz zu GABA_A-Rezeptoren, die nur Heteromere bilden (Sigel et al., 1990; Enz und Cutting, 1998).

Das ρ_1 -Pentamer hat an jeder Untereinheit eine GABA-Bindungsstelle, aber nur drei GABA-Moleküle sind notwendig, um den Kanal zu öffnen. Die anderen zwei erhöhen die Sensitivität für den Liganden und können den geöffneten Zustand des Rezeptors stabilisieren (Amin und Weiss, 1996; Enz und Cutting, 1998).

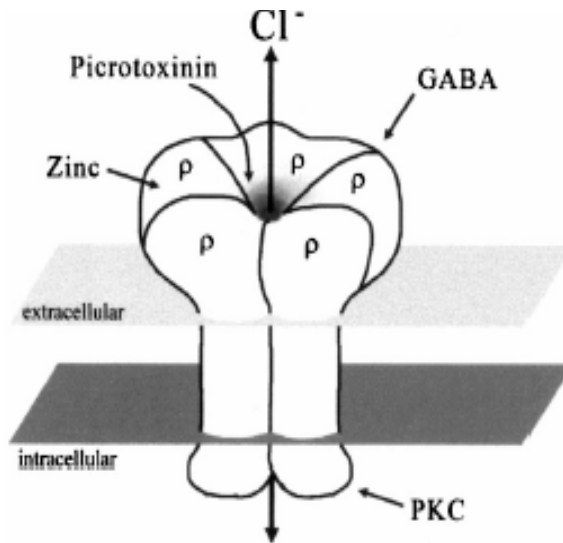


Abbildung 19
Skizze eines GABA_C-Rezeptors
(Enz und Cutting, 1998)

Cis-4-Aminocrotonsäure ist Agonist, Muscimol ist partieller Agonist (Chebib und Johnston, 1999) und Picrotoxinin ist Antagonist am GABA_C-Rezeptor. Letzteres bindet direkt in der Pore. Zink bindet auch an den GABA_C-Kanal und führt zu einer Abnahme der Amplitude (Akaike et al., 1985; Pribilla et al., 1992; Enz und Cutting, 1998).

Da sowohl der GABA_A-Rezeptor als auch der GABA_C-Rezeptor zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen zählen, beide aus fünf Untereinheiten bestehen und auch sonst relativ wenige Unterschiede aufweisen, hat die IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) empfohlen, die GABA_C-Kanäle zu den GABA_A-Kanälen zu rechnen.

8.) Problemstellung

Am Department für Pharmakologie und Toxikologie wird seit einigen Jahren die Wirkung von Naturstoffen bzw. deren Derivaten auf den GABA_A-Rezeptor und deren *in vivo* Effekte in einem Mausmodell mittels verschiedenster Verhaltenstests untersucht.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte ein weiterer Naturstoff SAR-24, der kurz davor von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hering als GABA_A-Rezeptor-Ligand identifiziert wurde, *in vivo* charakterisiert werden.

Vor den *in vivo* Arbeiten sollten *in vitro* GABA_A-Rezeptoren bestehend aus α_1 , β_2 und γ_{2S} in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden und eine GABA-Konzentrations-Wirkungskurve mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und einem schnellen Perfusionssystem erstellt werden. Danach sollte die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch das Benzodiazepin Diazepam an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren untersucht werden.

Liganden von GABA_A-Rezeptoren wie z.B. Benzodiazepine wirken *in vivo* anxiolytisch, sedierend, hypnotisch, muskelrelaxierend und antikonvulsiv. Daher sollte auch von dem neuen GABA_A-Rezeptor-Ligand SAR-24 ein *in vivo* Profil mit Schwerpunkt auf Anxiolyse und Sedierung erstellt werden.

Dafür sollte das Verhalten von c57Bl/6N Mäuse 30 min nach intraperitonealer (ip) Applikation von verschiedenen Dosen SAR-24 beobachtet und mit dem Verhalten von Kontrollmäusen (mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt) verglichen werden.

Das Verhalten der Mäuse sollte in folgenden Tests untersucht werden:

- Open Field-Test
- Light/Dark-Choice-Test
- Stress-Induced-Hyperthermia-Test

9.) Methoden

9.1) *In vitro* Untersuchungen

Zur Untersuchung von elektrischen Membranvorgängen werden in der Elektrophysiologie verschiedene Messtechniken verwendet. Für meine Untersuchungen wurde die 2- Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gewählt. Diese Technik ermöglicht es, transmembranäre Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential zu messen.

Rekombinante GABA_A-Rezeptoren mit der Untereinheiten-Kombination $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ wurden in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. *Xenopus* Oozyten sind heute ein Standardobjekt für die Expression und funktionelle Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren.

Gurdon et al. entdeckten schon 1971 die Fähigkeit funktioneller Expression exogener mRNA- Spezies durch Injektion der mRNA in das Zytoplasma der Froschoozyten.

9.1.1) Oozytenpräparation

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) wurden 15-30 min lang in einer 0,2 %igen Lösung von Tricain (= Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters; MS-222) anästhetisiert. Daraufhin wurde vorsichtig mit einer Pinzette Follikelgewebe operativ entnommen.

Das Follikelgewebe wurde in einer Petrischale mit OR2- Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 5 mM HEPES; pH=7,5 (1M NaOH)) übergeführt, zuerst mechanisch zerkleinert und danach für etwa 90 min in Collagenase- Lösung inkubiert (2mg Collagenase Sigma Typ IA/ml OR2), um Bindegewebe und Follikelzellen zu entfernen (Goldin 1991).

Durch diese Kollagenasebehandlung konnte rasch eine große Anzahl von einzelnen Oozyten präpariert werden. Da Calcium durch die Aktivierung unspezifischer Proteasen toxisch wirkt (Goldin, 1991), mussten die Oozyten vor, vor allem aber nach der Kollagenase-Behandlung gründlich mit OR2- Lösung gewaschen werden. Danach wurden sie in ND96- Lösung (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES; pH=7,4 (1M NaOH)) transferiert.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von einigen Stunden wurden Stadium V-VI Oozyten (Durchmesser 1000-1200 μM) ausgewählt, da diese sich am besten zur Injektion eignen (Goldin, 1991).

9.1.2) cRNA-Vorbereitung

Poly(A+)cRNA-Transkripte von linearisierter cDNA wurden in pCMV- Vektor kloniert. cRNAs, die für die einzelnen Untereinheiten kodierten, wurden in DEPC5 (Diethylpyrocarbonat) gelöst.

9.1.3) Injektion von cRNA

Bei der Injektion von cRNA in den Oozyten musste auf ausreichende mechanische Stabilität geachtet werden, um die Oozyten nicht zu verletzen. Vor der Injektion wurden die einzelnen cRNA, die für die verschiedenen Untereinheiten kodieren, im Verhältnis 1:1:10 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ gemischt (Boileau et al., 2002).

Etwa 10 bis 50 nl dieser Lösung wurden mithilfe eines pneumatischen Injektionsgeräts in die einzelnen Oozyten injiziert (d.h. bis der Oozyt deutlich an Größe zugenommen hatte).

Nach der Injektion wurden die Oozyten für weitere 24 Stunden bei 18° in ND96 + Penicillin 100 U/ml und Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und konnten danach für die Messungen verwendet werden.

9.1.4) Messlösungen

Eine Stammlösung von Diazepam (Konzentration 100 mM) wurde in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Eine 1 mM GABA- Stammlösung musste jeden Tag frisch bereitet werden (5.15 mg GABA in 50 ml ND 96). Bei den Testlösungen war zu beachten, dass die DMSO- Konzentration 0.3% nicht überstieg.

Lösungen für die Messungen mussten ebenfalls täglich frisch zubereitet werden.

9.1.5) 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Der Versuchsaufbau für die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik von *Xenopus laevis* Oozyten ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

Die Versuchsanordnung besteht aus einer intrazellulären Elektrode (V) zur Messung des transmembranären Potentials, einem Rückkopplungsverstärker, der die Abweichung des tatsächlichen Potentials zum benötigten Potential (Haltepotential) misst und einer zweiten, intrazellulären Elektrode (I), die den, um das Haltepotential zu erreichen bzw. konstant zu halten, benötigten Strom in den Oozyten injiziert („voltage clamp“-Prinzip).

Der Verstärker funktioniert nach dem Prinzip der negativen Rückkoppelung, da der über die zweite Mikroelektrode injizierte Strom jeweils mit umgekehrtem Vorzeichen zum, von der Zellmembran generierten, Aktionsstrom fließt (Hille, 1992).

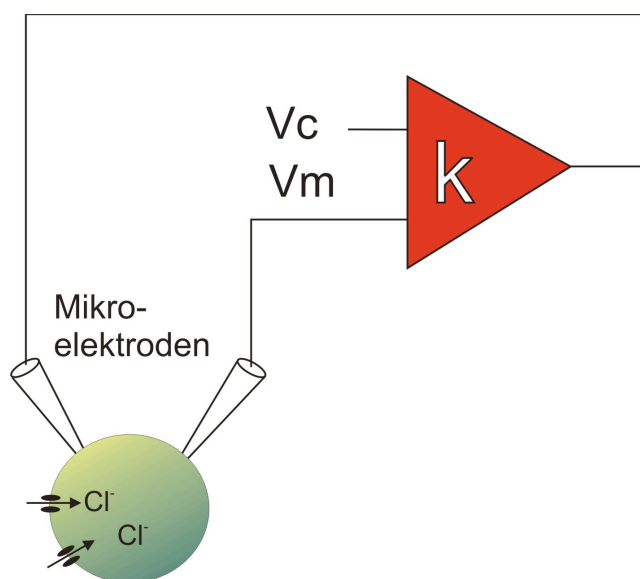


Abbildung 20

Schematische Darstellung der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

gewogen, markiert und in den Versuchsraum gebracht. 30 min vor dem Test wurden die Substanz- bzw. Kontrolllösungen ip injiziert. Die Injektion der Testlösungen erfolgte in einem Vorbereitungsraum, um die anderen Tiere nicht zu stören.

9.2.2) Injektionslösungen:

Die Injektionslösungen wurden aus einer Stammlösung von 50 mg SAR-24/ 250 µl DMSO bereitet. Diese wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) auf die gewünschte Konzentration (siehe Abbildungen und Ergebnisteil) verdünnt. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde allen Lösungen 3 % Polysorbat 80 zugesetzt und die DMSO-Konzentration betrug maximal 10%.

9.2.3) Open Field-Test (OF)

Der Open-Field-Test wurde wie von Crawley beschrieben (2007) durchgeführt. 30 min nach ip Injektion wurde das Verhalten der Mäuse über einen Zeitraum von 10 min in einer 50 x 50 cm Box, mit Infrarot-Lichtschraken ausgestattet, getestet. Die Lichtintensität wurde auf 150 Lux eingestellt. Nach Empfehlung von EMPRESS (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens; <http://empress.har.mrc.ac.uk>) wurde die Gesamtfläche für die Auswertung in eine Randzone (bis 8 cm von der Wand), ein Zentrum (16 % von der Gesamtfläche) und die Fläche zwischen diesen Zonen = Zwischenzone unterteilt (siehe Abbildung 22). Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels ActiMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

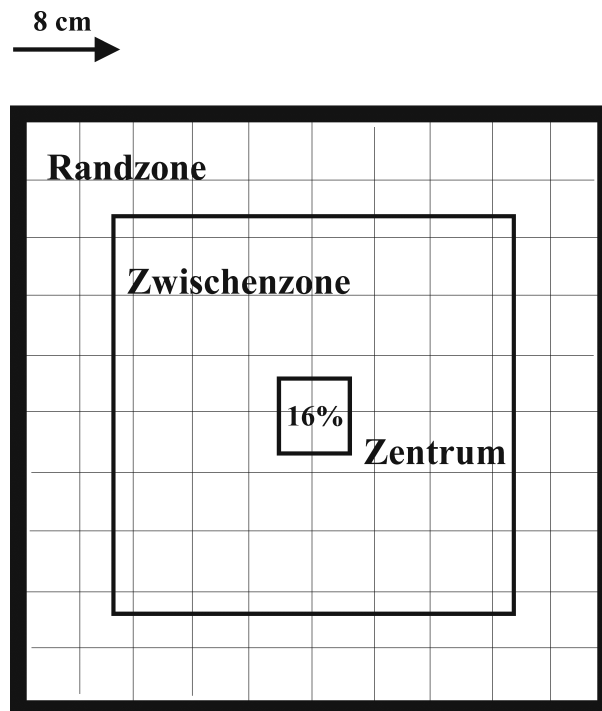


Abbildung 22 Schematische Darstellung des OF mit Einteilung der Fläche in Rand-, Zwischenzone und Zentrum.

9.2.4) Light/Dark-Choice-Test (LD)

Zur Durchführung des LD-Tests wurde in die OF-Box eine 2/3 kleinere schwarze Box mit einer kleinen Öffnung (Eingang vom Hellen ins Dunkle) gestellt. Diese Box diente den Mäusen als Versteck. Während des Versuchs wurde die Lichtintensität auf 400 Lux gestellt. In Abbildung 23 ist der LD-Test schematisch dargestellt. Das Verhalten der Tiere wurde 30 min nach ip Injektion der Testlösungen über einen Zeitraum von 10 min aufgezeichnet. Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels ActiMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

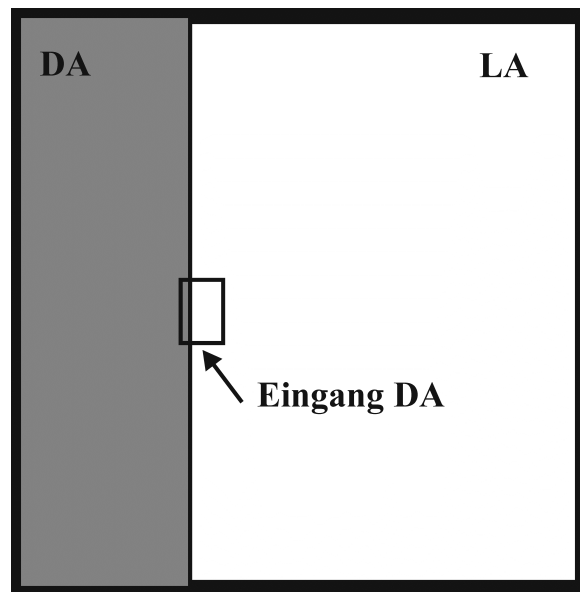


Abbildung 23 Schematische Darstellung der LDT Versuchsanordnung.
 LA...Lit Area (Helle Zone)
 DA... Dark Area (Dunkle Zone)

9.2.5) Stress-Induced-Hyperthermia-Test (SIH)

Am Vortag des SIH-Tests wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt und in den Versuchsraum gebracht. Am Morgen des Versuchstages wurde zuerst die Basaltemperatur (BT) der Tiere bestimmt. Dafür wurde ein Temperaturmessgerät etwa 2 cm tief in das Rectum der Maus eingeführt. Um das Einführen zu erleichtern, wurde handelsübliche Vaseline benutzt.

3h nach ip Injektion der Testlösungen wurde T1 (=Stress) gemessen. 15 min nach dieser Messung wurde ein 3. Mal die Temperatur (T2) gemessen. Die Differenz zwischen T1 und T2 wird als ΔT bzw. Stress-induced hyperthermia bezeichnet (Olivier et al., 2003).

10.) Ergebnisse

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Wirkung von SAR-24 auf das Verhalten von Mäusen untersucht werden. SAR-24 wurde kürzlich als neuer Ligand von GABA_A-Rezeptoren identifiziert (Cicek et al., 2010). Im Vorfeld der *in vivo* Arbeiten sollte daher ein kurzer Einblick in die Pharmakologie von GABA_A-Rezeptoren *in vitro* gewonnen werden.

10.1) Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen

10.1.1) Konzentrationsabhängige Wirkung von GABA auf GABA_A-Rezeptoren

Um die Wirkung von verschiedenen GABA-Konzentration auf GABA_A-Rezeptoren zu untersuchen, wurden GABA_A-Rezeptoren bestehend aus α_1 , β_2 und γ_{2S} Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die konzentrationsabhängige Zunahme der Stromamplituden mithilfe der 2-Mikroelektrodenspannungsklemmtechnik gemessen.

Die gemittelten Amplituden wurden nach folgender Formel normiert

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

Amplitude_x... Amplitude bei jeweiliger Konzentration

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

und die Werte in ein Koordinatensystem (siehe Abbildung 24A) eingetragen. Durch die Datenpunkte konnte danach eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung gelegt werden (siehe Abbildung 24B). Die EC₅₀ d.h. jene Konzentration, die 50% des maximalen Effekts auslöst, lag bei $69.5 \pm 11.5 \mu\text{M}$ EC 50. n_H betrug 1.8 ± 0.1 .

$$\frac{1}{1 + \left(\frac{\text{EC}_{50}}{[\text{GABA}]} \right)^{n_H}}$$

n_H...Hill-Koeffizient

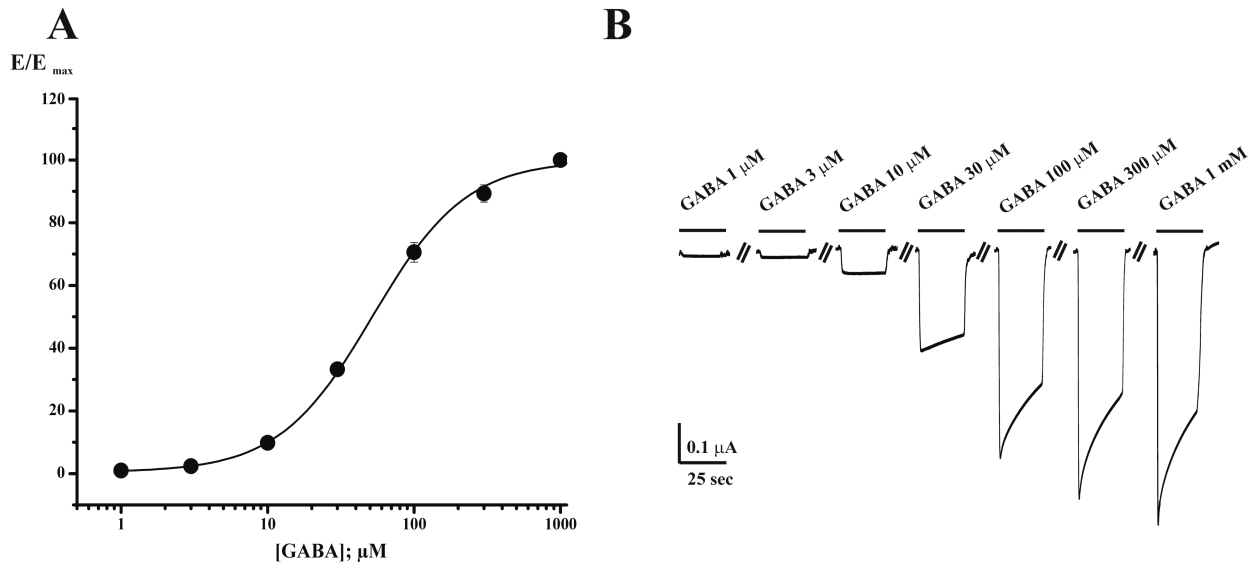


Abbildung 24 (A) zeigt eine Konzentrations-Wirkungskurve von GABA bei einem GABA_A-Rezeptor mit den Untereinheiten α_1 , β_2 und γ_{2S} . (B) typisches Experiment (Zunahme der Amplituden nach Applikation unterschiedlicher Konzentrationen von GABA)

10.1.2) Modulation von I_{GABA} durch Diazepam

Um die Modulation von I_{GABA} durch Diazepam zu untersuchen, wurden GABA_A-Rezeptoren bestehend aus α_1 , β_2 und γ_{2S} Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen mithilfe der 2-Mikroelektroden-spannungsklemmtechnik gemessen.

In Abbildung 25A wird ein typisches Experiment dargestellt. Ab Konzentrationen $\geq 0.03 \mu M$ wurden GABA-induzierte Chloridströme signifikant ($p < 0.05$) von Diazepam potenziert. Saturation trat ab Konzentration $\geq 1 \mu M$ auf. Die maximale Potenzierung lag bei $324.49 \pm 44.55 \%$ und die EC_{50} bei $0.224 \pm 0.054 \mu M$. n_H betrug 1.3 ± 0.1 (siehe Abbildung 25B).

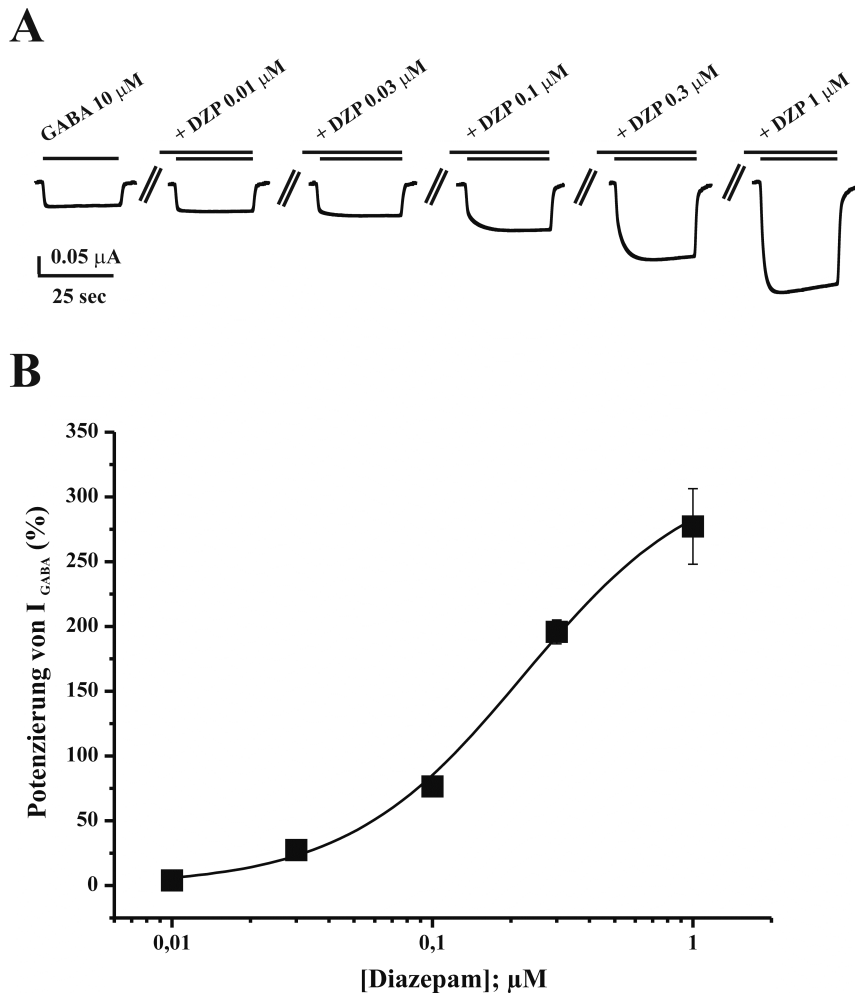


Abbildung 25 (A) Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch Diazepam
(B) zeigt eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve von GABA + Diazepam

10.2) Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen

10.2.1 Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im OF-Test

Um die Wirkung von SAR-24 *in vivo* zu untersuchen, wurden c57Bl/6N Mäusen SAR-24 in verschiedenen Dosen bzw. physiologische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe; siehe auch Methodenteil 9.2.3) ip appliziert und das Verhalten der Tiere 30 min nach Injektion 10 min lang beobachtet. Die Aufzeichnung der Versuche und die Auswertung erfolgte dabei mittels des System ActiMot2 (Lichtschrankensystem).

Wie in Abbildung 26 gezeigt, kam es bereits ab Dosen ≥ 2 mg/kg Körpergewicht (KG) zu einer statistisch signifikanten ($p < 0.05$) Reduktion der Laufstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: 38.2 ± 1.8 m; $n=11$ vs. 2 mg/kg KG 33.4 ± 2.0 m; $n=9$). Dieser Effekt war dosis-abhängig, bei der höchsten getesteten Dosis 60 mg/kg KG legten die Mäuse bereits weniger als 40% der Strecke der Kontrolltiere zurück

(Kontrolle: 38.2 ± 1.8 m; $n=11$ vs. 60 mg/kg KG 14.7 ± 3.1 m; $n=8$). Höhere Dosen wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit von SAR-24 nicht untersucht. 0.2 mg/kg KG und 0.6 mg/kg KG zeigten keinen Effekt auf die Laufstrecke der Tiere im OF-Test im Vergleich zu den Kontrolltieren (für Details zu den Ergebnissen der OF-Test, siehe Tabelle 1).

Höhere Dosen wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit von SAR-24 nicht untersucht.

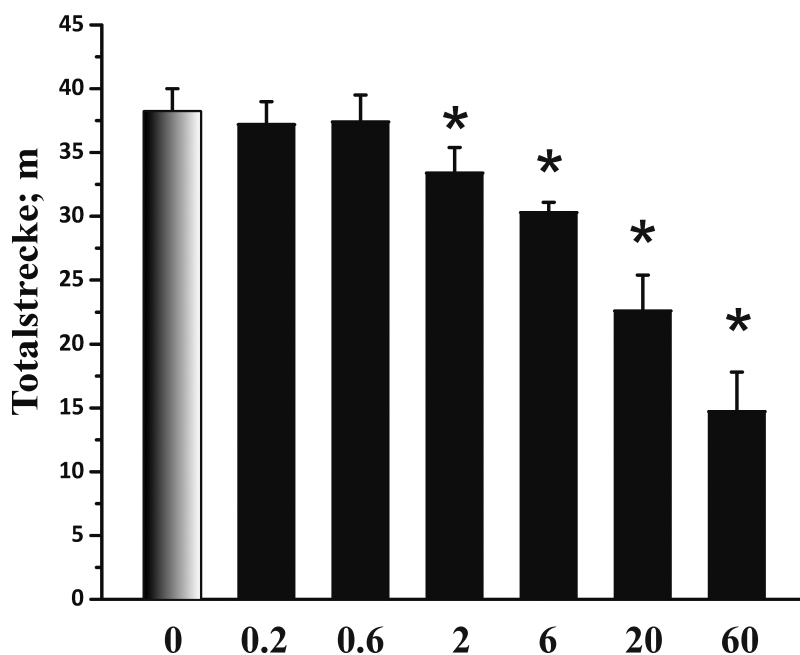


Abbildung 26 Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im OF- Test. Die Balken zeigen die gemittelten Totalstrecken der Mäuse $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$).

Nach Applikation von 0.6 mg/kg KG stieg die Anzahl der Besuche des Zentrums im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle 12.4 ± 0.9 ; $n=11$ vs. 0.6 mg/kg KG 13.4 ± 1.7 ; $n=10$). Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant ($p>0.05$). Bei 0.2 mg/kg KG kam es sogar zu einer leichten, ebenfalls nicht signifikanten Reduktion der Zahl der Besuche (siehe Abbildung 27A).

Wie in Abbildung 27B gezeigt, verbrachten die Mäuse nach Applikation von SAR-24 mehr Zeit im Zentrum (siehe Abbildung 22 im Methodenteil 9.2.3; Kontrolle 7.5 ± 1.2 s; $n=11$ vs. 0.6 mg/kg KG 15.0 ± 5.2 s; $n=10$; $p>0.05$),

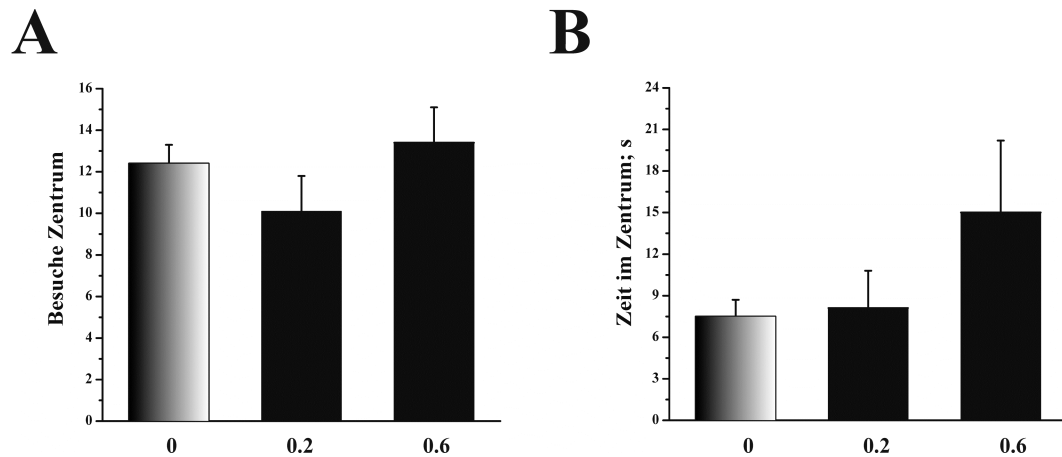


Abbildung 27 Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im OF- Test. **(A)** Die Balken zeigen die gemittelten Besuche des Zentrums $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen. **(B)** Die Balken zeigen die gemittelte Zeit, die die Mäuse im Zentrum des OF (siehe Abbildung 22 im Methodenteil 9.2.3) $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen.

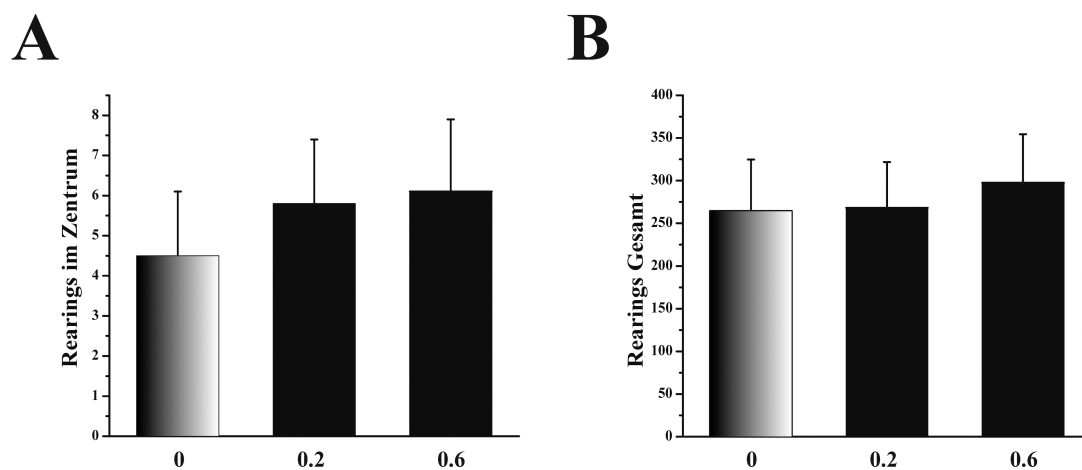


Abbildung 28 Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im OF- Test. **(A)** Die Balken zeigen die gemittelte Zahl der Rearings der Mäuse im Zentrum $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen. **(B)** Die Balken zeigen die gemittelte Gesamtzahl der Rearings der Mäuse (siehe Abbildung 22 im Methodenteil 9.2.3) $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen.

Wie in Abbildung 28 gezeigt, kam es sowohl im Zentrum (Abbildung 28A) als auch insgesamt (Abbildung 28B) zu einer leichten, statistisch jedoch nicht signifikanten

($p > 0.05$) Erhöhung der Rearings im Vergleich zur Kontrollgruppe ((Kontrolle Rearings Z: 5 ± 2 ; $n=11$ vs. 60 mg/kg KG 3 ± 1 ; $n=8$; Kontrolle Rearings G: 264 ± 61 ; $n=11$ vs. 60 mg/kg KG 53 ± 14 ; $n=8$). (Siehe auch Tabelle 1).

Dosis	Strecke (m)	Besuche Z	Zeit Z (s)	Rearings Z	Rearings G	n
Kontrolle	38.2 ± 1.8	12.4 ± 0.9	7.5 ± 1.2	5 ± 2	264 ± 61	11
SAR-24 0.2 mg/kg	37.2 ± 1.8	10.1 ± 1.7	8.1 ± 2.7	6 ± 2	268 ± 54	9
SAR-24 0.6 mg/kg	37.4 ± 2.1	13.4 ± 1.7	15.0 ± 5.2	6 ± 2	297 ± 57	10
SAR-24 2 mg/kg	33.4 ± 2.0	9.6 ± 1.5	8.3 ± 2.8	2 ± 1	191 ± 35	9
SAR-24 6 mg/kg	30.3 ± 0.8	11.9 ± 1.5	10.3 ± 2.5	5 ± 2	210 ± 36	9
SAR-24 20 mg/kg	22.6 ± 2.8	7.9 ± 2.0	23.7 ± 0.9	2 ± 1	280 ± 09	9
SAR-24 60 mg/kg	14.7 ± 3.1	3.4 ± 1.1	120.1 ± 0.7	3 ± 1	53 ± 14	8

Tabelle 1 Zusammenstellung der Ergebnisse des OF-Tests bei den angegebenen Dosen (in mg/kg Körpergewicht) von SAR-24. Die Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar. Z...Zentrum; G...gesamt; n... Anzahl der getesteten Tiere

10.2.2 Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LD-Test

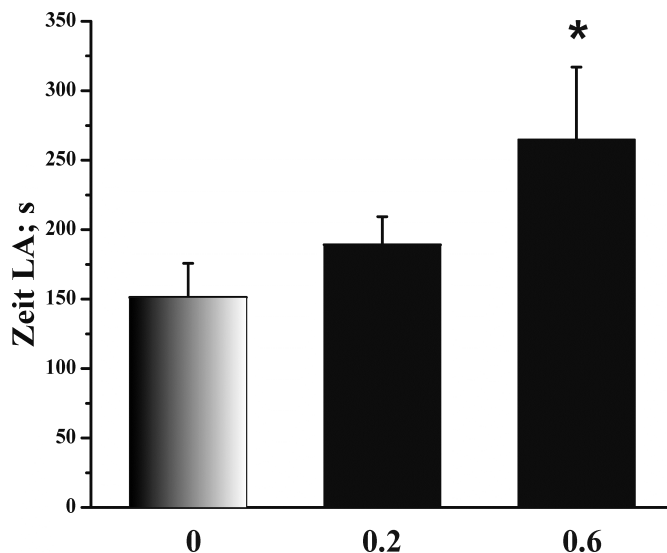


Abbildung 29 Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LD- Test. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Zeit, die die Mäuse im Hellen (LA) verbrachten, $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0.05$).

Wie in Abbildung 29 dargestellt, kam es im LD-Test 30 min nach Applikation von SAR-24 bei einer Dosis von 0.2 mg/kg KG zu einer leichten Erhöhung ($p>0.05$) der Zeit, die die Mäuse in der LA verbrachten, im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung-behandelten Mäusen. Dieser Effekt war bei einer Dosis von 0.6 mg/kg KG statistisch signifikant ($p<0.05$; Kontrolle 151.3 ± 24.4 s; $n=11$ vs. 0.6 mg/kg KG 265.0 ± 52.0 s; $n=8$).

Höhere Dosen wurden aufgrund der Ergebnisse im OF-Test nicht mehr untersucht, da es ab Dosen von ≥ 2 mg/kg KG zu einer signifikant reduzierten Gesamtlaufstrecke kam (siehe Abbildung 26).

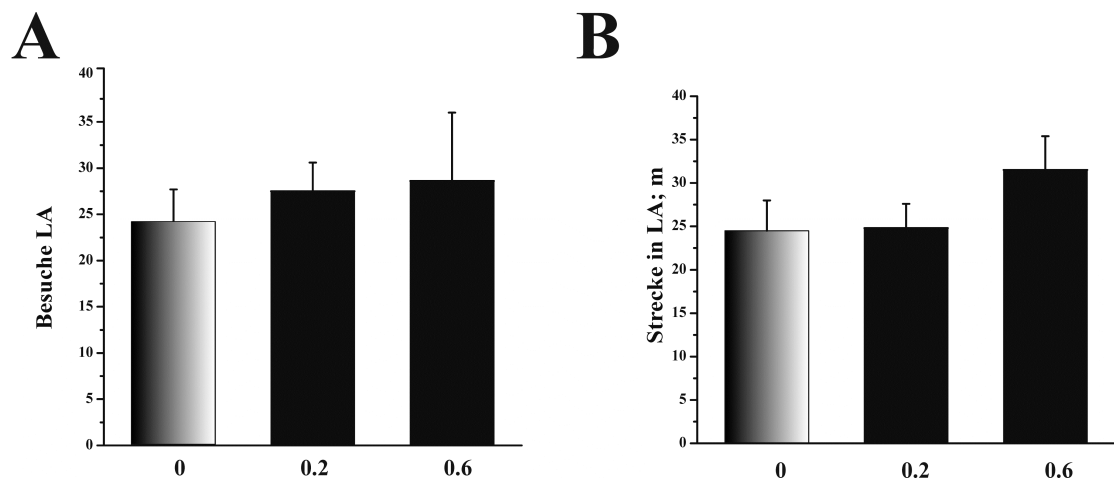


Abbildung 30 Effekt von SAR-24 auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LD- Test. **(A)** Die Balken zeigen die Mittelwerte der Besuche der LA $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen. **(B)** Die Balken zeigen gemittelte Laufstrecke der Mäuse in der LA $\pm$ SEM bei den angegebenen Dosen.

Neben der Erhöhung der in der LA verbrachten Zeit führte die Behandlung der Mäuse mit SAR-24 dosisabhängig auch zu einem Anstieg der Zahl der Besuche der LA (siehe Abbildung 30A) und der in der LA zurückgelegten Strecke (siehe Abbildung 30B). Analog dazu kam es zu einer Reduktion der in der DA zurückgelegten Laufstrecke (Daten nicht gezeigt). Diese Effekte waren statistisch jedoch nicht signifikant ($p>0.05$; für Details zu den Ergebnissen des LD-Tests, siehe auch Tabelle 2).

Dosis	Zeit LA (s)	Besuche LA	Strecke LA (m)	n
Kontrolle	151.3 ± 24.4	24.2 ± 3.5	24.5 ± 3.5	11
SAR-24 0.2 mg/kg	189.1 ± 20.3	27.5 ± 3.1	24.8 ± 2.8	10
SAR-24 0.6 mg/kg	265.0 ± 52.0	28.6 ± 7.4	31.5 ± 3.8	8

Tabelle 2 Zusammenstellung der Ergebnisse des LD-Tests bei den angegebenen Dosen (in mg/kg Körpergewicht) von SAR-24. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar.

LA...Lit Area (= Helles Areal); n... Anzahl der getesteten Tiere

10.2.3 Effekt von SAR-24 auf SIH von c57Bl/6N Mäusen

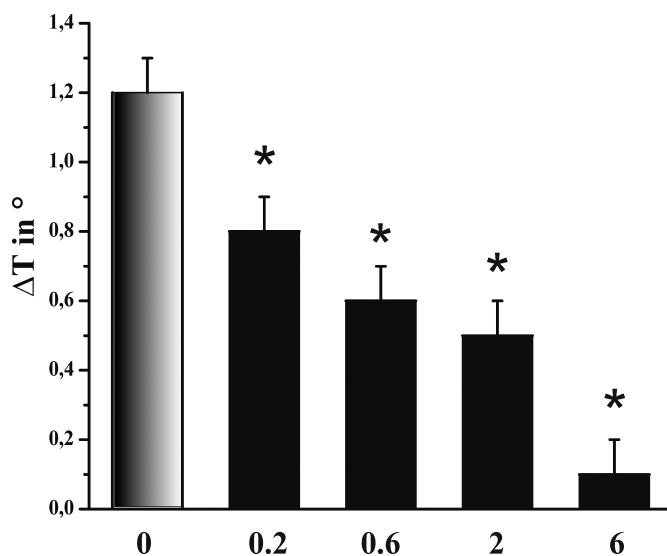


Abbildung 31 Effekt von SAR-24 auf SIH von c57Bl/6N Mäusen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Änderung der Körpertemperatur (°C; ΔT) nach dem Stress ± SEM bei den angegebenen Dosen. (*) bedeutet statistisch signifikant (p<0.05).

Stress (induziert durch die Messung der Körpertemperatur) führte bei Kontrollmäusen (mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt) zu einem deutlichen Anstieg der Körpertemperatur ($\Delta T = 1.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$, n = 1, siehe Abbildung 31). Durch ip Gabe von 0.2 mg/kg KG SAR-24 kam es zu einer signifikanten Reduktion von ΔT ($\Delta T = 0.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$, n=8).

Dieser Effekt war dosisabhängig und erreichte bei einer Dosis von 6 mg/kg KG sein Maximum, d.h. es kam zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der Körpertemperatur ($\Delta T = 0.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$, n=9).

Dosis	ΔT °C	n
Kontrolle	1.2 ± 0.1	11
SAR-24 0.2 mg/kg	0.8 ± 0.1	8
SAR-24 0.6 mg/kg	0.6 ± 0.1	8
SAR-24 2 mg/kg	0.5 ± 0.1	10
SAR-24 6 mg/kg	0.1 ± 0.1	9

Tabelle 3 Zusammenstellung der Ergebnisse des SIH-Tests bei den angegebenen Dosen (in mg/kg Körpergewicht) von SAR-24. Die Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar.
n... Anzahl der getesteten Tiere

11.) Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten die *in vivo* Effekte eines neuen, am Department für Pharmakologie und Toxikologie (Leitung: Prof. Hering) identifizierten GABA_A-Rezeptor Liganden SAR-24 untersucht werden.

GABA_A-Rezeptoren sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren im Gehirn von Säugetieren und werden von zahlreichen, klinisch wichtigen Arzneistoffen u.a. Benzodiazepinen moduliert. Neben den gewünschten Wirkungen z.B. Anxiolyse ist ihre Anwendung aber mit unerwünschten Nebenwirkungen wie z.B. Abhängigkeit, Ataxie, Hangover und anterograder Amnesie verbunden. Einen wesentlichen Fortschritt in der GABA_A-Rezeptor-Pharmakologie war die Entdeckung, dass Benzodiazepine (siehe auch Kapitel 4.1) abhängig von der Kombination der Rezeptoruntereinheiten ihre unterschiedlichen Effekte vermitteln z.B. über α_1 -Rezeptoren sedierend-hypnotisch und über $\alpha_{2/3}$ Rezeptoren anxiolytisch (Wafford et al., 2004; McKernan et al., 2003; Möhler 2009). Dies eröffnete die Möglichkeit nach Subtyp-selektive Substanzen zu suchen, um in weiterer Folge auch das Nebenwirkungsprofil zu reduzieren. Einige neue Liganden von GABA_A-Rezeptoren mit vielversprechender Untereinheitenspezifität konnten auch in Pflanzen der Volksmedizin (z.B. Traditionelle Europäische Volksmedizin oder Traditionelle Chinesische Medizin TCM) identifiziert werden (Baur et al., 2005; Khom et al., 2007; Zaugg et al., 2010).

SAR-24 ist ein natürlich vorkommendes Triterpen einer in Europa und Amerika häufig verwendeten Arzneipflanze. Neben vielen bereits beschriebenen Wirkungen zeigte SAR-24 eine signifikante Potenzierung von I_{GABA} durch $GABA_A$ -Rezeptoren, die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert worden waren. In Analogie zu den anderen Liganden des $GABA_A$ Rezeptors sollte daher auch SAR-24 *in vivo* anxiolytische und sedierende Wirkung zeigen.

Um potentiell sedierende Effekte von SAR-24 zu untersuchen, wurde das Verhalten von männlichen c57Bl/6N Mäusen 30 min nach ip Injektion von Kontrolllösung oder SAR-24 in verschiedenen Dosen im OF-Test beobachtet. Dabei zeigte sich, dass es ab Dosen ≥ 2 mg/kg KG zu einer signifikanten Reduktion der Laufstrecke der Tiere kam. Eine verringerte Laufstrecke im Vergleich zu einer Kontrollgruppe wird als deutlicher Hinweis auf Sedierung betrachtet. Der beobachtete Effekt war dosisabhängig und erreichte sein Maximum bei 60 mg/kg KG (siehe Abbildung 26). Daraus kann man schließen, dass SAR-24 *in vivo* sedierend wirkt.

Mäuse, wie bereits in Kapitel 9.2.1 beschrieben, besitzen eine angeborene Angst vor offenen Flächen und versuchen diese möglichst zu meiden. Daher halten sich Kontrollmäuse auch vorwiegend am Rand des OF auf, wo für sie die Gefahr am geringsten ist. Kommt es zu vermehrten Besuchen des Zentrums des OF bzw. zu längeren Aufenthalten im Zentrum, wird dieses Verhalten mit anxiolytischer Wirkung assoziiert (Crawley, 2007). Tatsächlich konnte bei geringeren Dosen von SAR-24 eine Erhöhung der Zeit, die die Mäuse im Zentrum des OF verbrachten, beobachtet werden. Dies war der erste Hinweis, dass SAR-24 neben der sedierenden Wirkung auch anxiolytische Effekte zeigte.

In einem weiteren, selektiveren Test (LD-Test) wurde die anxiolytische Wirkung von SAR-24 bestätigt. SAR-24 wurde nur in Dosierungen getestet, bei denen noch keine sedierenden Effekte zu beobachten waren. Auch in diesem Test können die angeborenen Ängste des Tieres (vor allem die Angst vor hellem Licht) ausgenutzt werden. Verbringen die substanzbehandelten Tiere mehr Zeit im Hellen als die Kontrolltiere, spricht man von anxiolytischer Wirkung.

So konnte sowohl im OF- als auch im LD-Test die anxiolytische Wirkung von SAR-24 bei 0.2 und 0.6 mg/kg KG gezeigt werden.

Bei höheren Dosen konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet aber wahrscheinlich nicht, dass die anxiolytische Wirkung bei höheren Dosen nicht vorhanden war, sondern vielmehr, dass der anxiolytische

Effekt wahrscheinlich vom sedierenden Effekt überlagert wurde. Daher wurde ein weiterer Test zur Bestimmung des anxiolytischen Potentials von SAR-24 herangezogen. Im Gegensatz zum OF und LD-Test ist es beim SIH-Test nicht von Bedeutung, ob die Versuchstiere sediert (d.h. weniger laufen, geringere Strecken zurücklegen) sind. Dieser Test beruht einzig auf der Erhöhung der Körpertemperatur des Tieres bei Stress. Mit diesem Test konnte schließlich gezeigt werden, dass SAR-24 (siehe Abbildung 31) auch in höheren Dosen anxiolytisch wirkt.

Bei der Interpretation dieser Daten sollte man aber auch beachten, dass diese nur nach ip Injektion erhoben wurden. Typischerweise werden Sedativa oder Anxiolytica aber peroral verabreicht.

Um aus dem GIT resorbiert werden zu können, müssen Substanzen entsprechende Eigenschaften aufweisen z.B. physikalisch-chemische wie z.B. Löslichkeit, Lipophilie etc. Ist die Substanz in die Blutbahn gelangt, wird sie im Kreislaufsystem weitertransportiert. In Folge des Konzentrationsgefälles zwischen Blut und Gewebe kann die Substanz die Blutbahn verlassen und verteilt sich im Gesamtorganismus. Daneben ist auch zu beachten, dass das venöse Blut des GIT zuerst über die Pfortader zur Leber transportiert wird. Dabei kommt es häufig zu Metabolisierungsreaktionen bzw. biochemischen Umwandlungen der Substanzen, die sowohl in Aktivierung als auch Inaktivierung der Substanzen resultieren können („first-pass-Effekt“). Ein weiteres Kriterium für ZNS-aktive Substanzen ist ihre Passage der Blut-Hirn Schranke.

Diese Punkte sind für SAR-24 noch ungeklärt und sollten daher in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. So könnten z.B. aus SAR-24 *in vivo* deutlich stärker oder aber auch schwächer wirksame Metabolite gebildet werden.

Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden sollte, ist, dass trotz der gezeigten *in vitro* Modulation von I_{GABA} durch SAR-24, die *in vivo* Wirkung nicht ausschließlich über den $GABA_A$ -Rezeptor erfolgen muss. Für einige Pflanzen wie z.B. Baldrian sind sogenannte Netzwerkeffekt bekannt d.h. neben der direkten Wirkung am Rezeptor kommt es auch zu einer Hemmung der GAT oder der Synthese von GABA (Murphy et al., 2009). Darüberhinaus sind auch, wie schon im Eingangskapitel besprochen, verschiedenste Systeme mit Schlaf und Angst assoziiert. Auch das sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Zusammengefasst habe ich mit dieser Arbeit einen ersten Beitrag zur Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Eigenschaften eines neuen Liganden von GABA_A-Rezeptoren geleistet. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sich dieser Ligand als Lead-Struktur für die Entwicklung eines neuen Sedativums (Hypnotikums) eignet.

12.) Quellenverzeichnis

- 1 Akabas, M. H. & Karlin, A. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the alpha-subunit. *Biochemistry* **34**, 12496-12500 (1995).
- 2 Akaike, N., Hattori, K., Inomata, N. & Oomura, Y. gamma-Aminobutyric-acid- and pentobarbitone-gated chloride currents in internally perfused frog sensory neurones. *J Physiol* **360**, 367-386 (1985).
- 3 Akaike, N., Hattori, K., Oomura, Y. & Carpenter, D. O. Bicuculline and picrotoxin block gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ conductance by different mechanisms. *Experientia* **41**, 70-71 (1985).
- 4 Akaike, N., Tokutomi, N. & Ikemoto, Y. Augmentation of GABA-induced current in frog sensory neurons by pentobarbital. *Am J Physiol* **258**, C452-460 (1990).
- 5 Akk, G., Bracamontes, J. & Steinbach, J. H. Activation of GABA(A) receptors containing the alpha4 subunit by GABA and pentobarbital. *J Physiol* **556**, 387-399, (2004).
- 6 Akk, G. & Steinbach, J. H. Activation and block of recombinant GABA(A) receptors by pentobarbitone: a single-channel study. *Br J Pharmacol* **130**, 249-258, (2000).
- 7 Ali, A. B. & Thomson, A. M. Synaptic alpha 5 subunit-containing GABAA receptors mediate IPSPs elicited by dendrite-preferring cells in rat neocortex. *Cereb Cortex* **18**, 1260-1271 (2008).
- 8 Allen, R. P. *et al.* Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep Med* **4**, 101-119 (2003).
- 9 Allison, C. & Pratt, J. A. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol Ther* **98**, 171-195, (2003).
- 10 Amin, J. A single hydrophobic residue confers barbiturate sensitivity to gamma-aminobutyric acid type C receptor. *Mol Pharmacol* **55**, 411-423 (1999).
- 11 Amin, J. & Weiss, D. S. GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* **366**, 565-569 (1993).
- 12 Amin, J. & Weiss, D. S. Insights into the activation mechanism of rho1 GABA receptors obtained by coexpression of wild type and activation-impaired subunits. *Proc Biol Sci* **263**, 273-282 (1996).
- 13 An, S. J. & Almers, W. Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. *Science* **306**, 1042-1046, (2004).

- 14 Audenaert, D. *et al.* A novel GABRG2 mutation associated with febrile seizures. *Neurology* **67**, 687-690, (2006).
- 15 Backstrom, T. *et al.* Pathogenesis in menstrual cycle-linked CNS disorders. *Ann N Y Acad Sci* **1007**, 42-53 (2003).
- 16 Bali, M. & Akabas, M. H. Defining the propofol binding site location on the GABAA receptor. *Mol Pharmacol* **65**, 68-76, (2004).
- 17 Ballenger, J. C. *et al.* Consensus statement on generalized anxiety disorder from the International Consensus Group on Depression and Anxiety. *J Clin Psychiatry* **62 Suppl 11**, 53-58 (2001).
- 18 Baulac, S. *et al.* First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* **28**, 46-48, (2001).
- 19 Baur, R., Simmen, U., Senn, M., Sequin, U. & Sigel, E. Novel plant substances acting as beta subunit isoform-selective positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Mol Pharmacol* **68**, 787-792, (2005).
- 20 Belelli, D. & Herd, M. B. The contraceptive agent Provera enhances GABA(A) receptor-mediated inhibitory neurotransmission in the rat hippocampus: evidence for endogenous neurosteroids? *J Neurosci* **23**, 10013-10020, (2003).
- 21 Belelli, D. & Lambert, J. J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* **6**, 565-575, (2005).
- 22 Belelli, D., Lambert, J. J., Peters, J. A., Wafford, K. & Whiting, P. J. The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11031-11036 (1997).
- 23 Belelli, D., Lan, N. C. & Gee, K. W. Anticonvulsant steroids and the GABA/benzodiazepine receptor-chloride ionophore complex. *Neurosci Biobehav Rev* **14**, 315-322, (1990).
- 24 Benson, J. A., Low, K., Keist, R., Mohler, H. & Rudolph, U. Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett* **431**, 400-404, (1998).
- 25 Berezhnoy, D. *et al.* On the benzodiazepine binding pocket in GABAA receptors. *J Biol Chem* **279**, 3160-3168, (2004).
- 26 Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. & Gassmann, M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84**, 835-867, (2004).
- 27 Bettler, B. & Tiao, J. Y. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther* **110**, 533-543, (2006).
- 28 Bhattacharya, A. A., Curry, S. & Franks, N. P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. *J Biol Chem* **275**, (2000).
- 29 Bianchi, M. T., Song, L., Zhang, H. & Macdonald, R. L. Two different mechanisms of disinhibition produced by GABAA receptor mutations linked to epilepsy in humans. *J Neurosci* **22**, 5321-5327, (2002).
- 30 Birnir, B., Tierney, M. L., Dalziel, J. E., Cox, G. B. & Gage, P. W. A structural determinant of desensitization and allosteric regulation by pentobarbitone of the GABAA receptor. *J Membr Biol* **155**, 157-166 (1997).
- 31 Bitran, D., Purdy, R. H. & Kellogg, C. K. Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABAA receptor function. *Pharmacol Biochem Behav* **45**, 423-428 (1993).
- 32 Blein, S. *et al.* Structural analysis of the complement control protein (CCP) modules of GABA(B) receptor 1a: only one of the two CCP modules is

- compactly folded. *J Biol Chem* **279**, 48292-48306, (2004).
- 33 Boileau, A. J., Evers, A. R., Davis, A. F. & Czajkowski, C. Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci* **19**, 4847-4854 (1999).
- 34 Boileau, A. J., Newell, J. G. & Czajkowski, C. GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J Biol Chem* **277**, 2931-2937, (2002).
- 35 Bonnert, T. P. *et al.* theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9891-9896 (1999).
- 36 Bormann, J. & Feigenspan, A. GABAC receptors. *Trends Neurosci* **18**, 515-519, (1995).
- 37 Bowery, N. G. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 37-43, (2006).
- 38 Brzozowski, A. M. *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758, (1997).
- 39 Bu, D. F. *et al.* Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2115-2119 (1992).
- 40 Buck, K. J. & Harris, R. A. Benzodiazepine agonist and inverse agonist actions on GABAA receptor-operated chloride channels. II. Chronic effects of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 713-719 (1990).
- 41 Buddhala, C., Hsu, C. C. & Wu, J. Y. A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochem Int* **55**, 9-12, (2009).
- 42 Campagna-Slater, V. & Weaver, D. F. Anaesthetic binding sites for etomidate and propofol on a GABAA receptor model. *Neurosci Lett* **418**, 28-33, (2007).
- 43 Campbell, I. G. EEG recording and analysis for sleep research. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 10**, Unit10 12, doi:10.1002/0471142301.ns1002s49 (2009).
- 44 Carlson, B. X., Engblom, A. C., Kristiansen, U., Schousboe, A. & Olsen, R. W. A single glycine residue at the entrance to the first membrane-spanning domain of the gamma-aminobutyric acid type A receptor beta(2) subunit affects allosteric sensitivity to GABA and anesthetics. *Mol Pharmacol* **57**, 474-484 (2000).
- 45 Cavelier, P., Hamann, M., Rossi, D., Mobbs, P. & Attwell, D. Tonic excitation and inhibition of neurons: ambient transmitter sources and computational consequences. *Prog Biophys Mol Biol* **87**, 3-16, (2005).
- 46 Cestari, I. N., Min, K. T., Kulli, J. C. & Yang, J. Identification of an amino acid defining the distinct properties of murine beta1 and beta3 subunit-containing GABA(A) receptors. *J Neurochem* **74**, 827-838 (2000).
- 47 Chang, C. S., Olcese, R. & Olsen, R. W. A single M1 residue in the beta2 subunit alters channel gating of GABAA receptor in anesthetic modulation and direct activation. *J Biol Chem* **278**, 42821-42828, (2003).
- 48 Chebib, M. & Johnston, G. A. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 937-940 (1999).
- 49 Collinson, N. *et al.* Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci* **22**, 5572-5580, (2002).
- 50 Cossette, P. *et al.* Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* **31**, 184-189, (2002).
- 51 Couve, A. *et al.* Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat Neurosci* **5**, 415-424,]

- (2002).
- 52 Craske, M. G. *et al.* Panic disorder: a review of DSM-IV panic disorder and proposals for DSM-V. *Depress Anxiety* **27**, 93-112, doi:10.1002/da.20654 (2010).
 - 53 Crawley, J. N., Glowa, J. R., Majewska, M. D. & Paul, S. M. Anxiolytic activity of an endogenous adrenal steroid. *Brain Res* **398**, 382-385, (1986).
 - 54 Crawley, Jaqueline N.; What's wrong with my mouse; 2. Auflage (2007)
 - 55 Crestani, F., Martin, J. R., Mohler, H. & Rudolph, U. Resolving differences in GABAA receptor mutant mouse studies. *Nat Neurosci* **3**, 1059, (2000).
 - 56 Cutting, G. R. *et al.* Identification of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho2 cDNA and colocalization of the genes encoding rho2 (GABRR2) and rho1 (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics* **12**, 801-806, (1992).
 - 57 Cutting, G. R. *et al.* Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2673-2677 (1991).
 - 58 D'Hulst, C., Atack, J. R. & Kooy, R. F. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today* **14**, 866-875, (2009).
 - 59 Dalziel, J. E., Cox, G. B., Gage, P. W. & Birnir, B. Mutant human alpha(1)beta(1)(T262Q) GABA(A) receptors are directly activated but not modulated by pentobarbital. *Eur J Pharmacol* **385**, 283-286, (1999).
 - 60 Dauvilliers, Y., Arnulf, I. & Mignot, E. Narcolepsy with cataplexy. *Lancet* **369**, 499-511, (2007).
 - 61 Davies, M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* **28**, 263-274 (2003).
 - 62 Davies, P. A., Hanna, M. C., Hales, T. G. & Kirkness, E. F. Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. *Nature* **385**, 820-823, (1997).
 - 63 Davis, M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry* **44**, 1239-1247, (1998).
 - 64 Devaud, L. L., Fritschy, J. M., Sieghart, W. & Morrow, A. L. Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Neurochem* **69**, 126-130 (1997).
 - 65 Devaud, L. L., Smith, F. D., Grayson, D. R. & Morrow, A. L. Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of gamma-aminobutyric acidA receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Mol Pharmacol* **48**, 861-868 (1995).
 - 66 Dingledine, R. & Korn, S. J. Gamma-aminobutyric acid uptake and the termination of inhibitory synaptic potentials in the rat hippocampal slice. *J Physiol* **366**, 387-409 (1985).
 - 67 Diverse-Pierluissi, M., Remmers, A. E., Neubig, R. R. & Dunlap, K. Novel form of crosstalk between G protein and tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5417-5421 (1997).
 - 68 Drafts, B. C. & Fisher, J. L. Identification of structures within GABAA receptor alpha subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 1094-1101, (2006).
 - 69 Enz, R. & Cutting, G. R. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* **38**, 1431-1441, (1998).

- 70 Eser, D. *et al.* Neuroactive steroids as modulators of depression and anxiety. *Neuroscience* **138**, 1041-1048, (2006).
- 71 Evans, R. H. Potentiation of the effects of GABA by pentobarbitone. *Brain Res* **171**, 113-120, doi:0006-8993(79)90736-4 [pii] (1979).
- 72 Fan, H. P., Fan, F. J., Bao, L. & Pei, G. SNAP-25/syntaxin 1A complex functionally modulates neurotransmitter gamma-aminobutyric acid reuptake. *J Biol Chem* **281**, 28174-28184, (2006).
- 73 Farrant, M. & Nusser, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* **6**, 215-229, (2005).
- 74 Fasshauer, D. & Margittai, M. A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem* **279**, 7613-7621, (2004).
- 75 Fehm, L., Pelissolo, A., Furmark, T. & Wittchen, H. U. Size and burden of social phobia in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* **15**, 453-462, (2005).
- 76 Feigenspan, A. & Bormann, J. Differential pharmacology of GABAA and GABAC receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur J Pharmacol* **288**, 97-104 (1994).
- 77 Feigenspan, A., Wassle, H. & Bormann, J. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* **361**, 159-162, (1993).
- 78 Feng, H. J., Bianchi, M. T. & Macdonald, R. L. Pentobarbital differentially modulates alpha1beta3delta and alpha1beta3gamma2L GABAA receptor currents. *Mol Pharmacol* **66**, 988-1003, 2004).
- 79 Finn, D. A., Roberts, A. J., Long, S., Tanchuck, M. & Phillips, T. J. Neurosteroid consumption has anxiolytic effects in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **76**, 451-462, (2003).
- 80 Franks, N. P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S72-81, (2006).
- 81 Fritschy, J. M. & Brunig, I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* **98**, 299-323, (2003).
- 82 Froestl, W. *et al.* SGS742: the first GABA(B) receptor antagonist in clinical trials. *Biochem Pharmacol* **68**, 1479-1487, (2004).
- 83 Gallagher, M. J., Ding, L., Maheshwari, A. & Macdonald, R. L. The GABAA receptor alpha1 subunit epilepsy mutation A322D inhibits transmembrane helix formation and causes proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12999-13004, (2007).
- 84 Gannett, P. M. *et al.* In vitro reaction of barbiturates with formaldehyde. *J Anal Toxicol* **25**, 443-449 (2001).
- 85 Garner, M., Mohler, H., Stein, D. J., Mueggler, T. & Baldwin, D. S. Research in anxiety disorders: from the bench to the bedside. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**, 381-390, (2009).
- 86 Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A. & Saper, C. B. Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience* **115**, 285-294, (2002).
- 87 Ghiani, C. A. *et al.* Biochemical evaluations of the effects of loreclezole and propofol on the GABAA receptor in rat brain. *Biochem Pharmacol* **51**, 1527-1534, (1996).
- 88 Goldin AL (1991) Expression of ion channels by injection of mRNA into *Xenopus* oocytes. *Methods Cell*
- 89 Gordon, J. A. & Hen, R. Genetic approaches to the study of anxiety. *Annu Rev Neurosci* **27**, 193-222, (2004).

- 90 Grishkovskaya, I. *et al.* Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J* **19**, 504-512, (2000).
- 91 Gurdon, JB, Lane, CD, Woodland, HR, Marbaix, G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**(5316): 177-182
- 92 Hallanger, A. E., Levey, A. I., Lee, H. J., Rye, D. B. & Wainer, B. H. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* **262**, 105-124, (1987).
- 93 Halliwell, R. F. *et al.* Subunit-selective modulation of GABAA receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid. *Eur J Neurosci* **11**, 2897-2905, (1999).
- 94 Hancher, H. J., Wallner, M. & Olsen, R. W. Alcohol effects on gamma-aminobutyric acid type A receptors: are extrasynaptic receptors the answer? *Life Sci* **76**, 1-8, (2004).
- 95 Harkin, L. A. *et al.* Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* **70**, 530-536, (2002).
- 96 Harrison, N. L., Majewska, M. D., Harrington, J. W. & Barker, J. L. Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acidA receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* **241**, 346-353 (1987).
- 97 Harsh, J. R. *et al.* The efficacy and safety of armodafinil as treatment for adults with excessive sleepiness associated with narcolepsy. *Curr Med Res Opin* **22**, 761-774, (2006).
- 98 Hauser, W. A. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia* **35 Suppl 2**, S1-6 (1994).
- 99 Henschel, O., Gipson, K. E. & Bordey, A. GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 211-224 (2008).
- 100 Hill, D. R. GABAB receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. *Br J Pharmacol* **84**, 249-257 (1985).
- 101 Hille Bertil, Ion Channels of Excitable Membranes, University of Washington, 3. Auflage. (2001)
- 102 Hirose, S., Mitsudome, A., Okada, M. & Kaneko, S. Genetics of idiopathic epilepsies. *Epilepsia* **46 Suppl 1**, 38-43, (2005).
- 103 Hoffman, D. L., Dukes, E. M. & Wittchen, H. U. Human and economic burden of generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety* **25**, 72-90, (2008).
- 104 Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M. & Smart, T. G. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**, 486-489, (2006).
- 105 Hua, Y. & Scheller, R. H. Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8065-8070, (2001).
- 106 Ito, T., Suzuki, T., Wellman, S. E. & Ho, I. K. Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABAA receptors and molecular aspects. *Life Sci* **59**, 169-195, (1996).
- 107 Iversen, L. GABA pharmacology--what prospects for the future? *Biochem Pharmacol* **68**, 1537-1540, (2004).
- 108 Jacob, T. C. *et al.* Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci* **25**, 10469-10478, (2005).
- 109 Jenkins, A., Andreasen, A., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. Tryptophan

- scanning mutagenesis in TM4 of the GABA(A) receptor alpha1 subunit: implications for modulation by inhaled anesthetics and ion channel structure. *Neuropharmacology* **43**, 669-678, (2002).
- 110 Jenkins, A. *et al.* Evidence for a common binding cavity for three general anesthetics within the GABAA receptor. *J Neurosci* **21**, RC136, (2001).
- 111 Jia, F., Pignataro, L. & Harrison, N. L. GABAA receptors in the thalamus: alpha4 subunit expression and alcohol sensitivity. *Alcohol* **41**, 177-185, (2007).
- 112 Jursky, F. *et al.* Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J Exp Biol* **196**, 283-295 (1994).
- 113 Kales, A., Soldatos, C. R. & Kales, J. D. Sleep disorders: insomnia, sleepwalking, night terrors, nightmares, and enuresis. *Ann Intern Med* **106**, 582-592 (1987).
- 114 Kan, C. C., Hilberink, S. R. & Breteler, M. H. Determination of the main risk factors for benzodiazepine dependence using a multivariate and multidimensional approach. *Compr Psychiatry* **45**, 88-94, (2004).
- 115 Kang, J. Q. & Macdonald, R. L. The GABAA receptor gamma2 subunit R43Q mutation linked to childhood absence epilepsy and febrile seizures causes retention of alpha1beta2gamma2S receptors in the endoplasmic reticulum. *J Neurosci* **24**, 8672-8677, (2004).
- 116 Karobath, M. & Sperk, G. Stimulation of benzodiazepine receptor binding by gamma-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1004-1006 (1979).
- 117 Kash, T. L., Dizon, M. J., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. Charged residues in the beta2 subunit involved in GABAA receptor activation. *J Biol Chem* **279**, 4887-4893, (2004).
- 118 Kash, T. L., Jenkins, A., Kelley, J. C., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* **421**, 272-275, (2003).
- 119 Kash, T. L., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochem Soc Trans* **32**, 540-546,
- 120 Kaufman, D. L., Houser, C. R. & Tobin, A. J. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* **56**, 720-723 (1991).
- 121 Khom, S. *et al.* Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* **53**, 178-187, (2007).
- 122 Khom, S. *et al.* Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *Br J Pharmacol* **161**, 65- (2010).
- 123 Klein, R. L., Whiting, P. J. & Harris, R. A. Benzodiazepine treatment causes uncoupling of recombinant GABAA receptors expressed in stably transfected cells. *J Neurochem* **63**, 2349-2352 (1994).
- 124 Knabl, J. *et al.* Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature* **451**, 330-334, (2008).
- 125 Knoflach, F. *et al.* Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors alpha 4 beta 2 gamma 2 and alpha 6 beta 2 gamma 2. *Mol Pharmacol* **50**, 1253-1261 (1996).
- 126 Korneyev, A. & Costa, E. Allopregnanolone (THP) mediates anesthetic effects of progesterone in rat brain. *Horm Behav* **30**, 37-43, (1996).

- 127 Korpi, E. R., Kuner, T., Seeburg, P. H. & Luddens, H. Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Mol Pharmacol* **47**, 283-289 (1995).
- 128 Korpi, E. R. & Luddens, H. Furosemide interactions with brain GABAA receptors. *Br J Pharmacol* **120**, 741-748, (1997).
- 129 Kralic, J. E. *et al.* Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Clin Invest* **115**, 774-779, (2005).
- 130 Kralic, J. E., Korpi, E. R., O'Buckley, T. K., Homanics, G. E. & Morrow, A. L. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 1037-1045, (2002).
- 131 Krasowski, M. D. & Harrison, N. L. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1278-1303 (1999).
- 132 Krasowski, M. D., Nishikawa, K., Nikolaeva, N., Lin, A. & Harrison, N. L. 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**, 952-964, (2001).
- 133 Kucken, A. M., Teissere, J. A., Seffinga-Clark, J., Wagner, D. A. & Czajkowski, C. Structural requirements for imidazobenzodiazepine binding to GABA(A) receptors. *Mol Pharmacol* **63**, 289-296 (2003).
- 134 Kumar, S., Kralic, J. E., O'Buckley, T. K., Grobin, A. C. & Morrow, A. L. Chronic ethanol consumption enhances internalization of alpha1 subunit-containing GABAA receptors in cerebral cortex. *J Neurochem* **86**, 700-708, (2003).
- 135 Kumar, S. *et al.* The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* **205**, 529-564, (2009).
- 136 Kumar, S. *et al.* Ethanol reduces GABAA alpha1 subunit receptor surface expression by a protein kinase Cgamma-dependent mechanism in cultured cerebral cortical neurons. *Mol Pharmacol* **77**, 793-803, (2010).
- 137 Lamigeon, C., Bellier, J. P., Sacchettoni, S., Rujano, M. & Jacquemont, B. Enhanced neuronal protection from oxidative stress by coculture with glutamic acid decarboxylase-expressing astrocytes. *J Neurochem* **77**, 598-606 (2001).
- 138 Landgren, S., Aasly, J., Backstrom, T., Dubrovsky, B. & Danielsson, E. The effect of progesterone and its metabolites on the interictal epileptiform discharge in the cat's cerebral cortex. *Acta Physiol Scand* **131**, 33-42 (1987).
- 139 Laurie, D. J., Wisden, W. & Seeburg, P. H. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* **12**, 4151-4172 (1992).
- 140 Lehmann, A. GABAB receptors as drug targets to treat gastroesophageal reflux disease. *Pharmacol Ther* **122**, 239-245, (2009).
- 141 Li, G. D. *et al.* Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *J Neurosci* **26**, 11599-11605, (2006).
- 142 Luscher, B. & Keller, C. A. Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* **102**, 195-221, (2004).
- 143 Luscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* **19**, 687-695, (1997).

- 144 Macdonald, R. L. & Kang, J. Q. Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABAA receptor subunit mutations. *Epilepsy Curr* **9**, 18-23, (2009).
- 145 Macdonald, R. L., Kang, J. Q. & Gallagher, M. J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol* **588**, 1861-1869, (2010).
- 146 Macdonald, R. L., Kang, J. Q., Gallagher, M. J. & Feng, H. J. GABA(A) receptor mutations associated with generalized epilepsies. *Adv Pharmacol* **54**, 147-169 (2006).
- 147 Macdonald, R. L. & Olsen, R. W. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* **17**, 569-602, (1994).
- 148 Maconochie, D. J., Zempel, J. M. & Steinbach, J. H. How quickly can GABAA receptors open? *Neuron* **12**, 61-71, (1994).
- 149 Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L. & Paul, S. M. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **232**, 1004-1007 (1986).
- 150 Marshall, F. H., Jones, K. A., Kaupmann, K. & Bettler, B. GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 396-399, (1999).
- 151 Martin, D. L. & Rimvall, K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem* **60**, 395-407 (1993).
- 152 Marx, C. E. *et al.* Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacology* **31**, 1249-1263, (2006).
- 153 Mascia, M. P., Trudell, J. R. & Harris, R. A. Specific binding sites for alcohols and anesthetics on ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9305-9310, (2000).
- 154 McCarley, R. W. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med* **8**, 302-330, (2007).
- 155 McKernan, R. M. *et al.* Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* **3**, 587-592, doi:10.1038/75761 (2000).
- 156 Mercado, J. & Czajkowski, C. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and pentobarbital induce different conformational rearrangements in the GABA A receptor alpha1 and beta2 pre-M1 regions. *J Biol Chem* **283**, 15250-15257, (2008).
- 157 Mihic, S. J. *et al.* Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* **389**, 385-389, (1997).
- 158 Mintz, I. M. & Bean, B. P. GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* **10**, 889-898, (1993).
- 159 Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. & Unwin, N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955, (2003).
- 160 Mochida, S. Protein-protein interactions in neurotransmitter release. *Neurosci Res* **36**, 175-182, (2000).
- 161 Mody, I. Aspects of the homeostatic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. *J Physiol* **562**, 37-46, (2005).
- 162 Mohler, H. Role of GABAA receptors in cognition. *Biochem Soc Trans* **37**, 1328-1333, (2009).
- 163 Mohler, H. GABAA receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* **26**, 731-740, (2006).
- 164 Mohler, H. & Fritschy, J. M. GABAB receptors make it to the top--as dimers.

- Trends Pharmacol Sci* **20**, 87-89, (1999).
- 165 Mohler, H., Fritschy, J. M. & Rudolph, U. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 2-8 (2002).
- 166 Moody, E. J., Knauer, C., Granja, R., Strakhova, M. & Skolnick, P. Distinct loci mediate the direct and indirect actions of the anesthetic etomidate at GABA(A) receptors. *J Neurochem* **69**, 1310-1313 (1997).
- 167 Moody, E. J., Knauer, C. S., Granja, R., Strakhovava, M. & Skolnick, P. Distinct structural requirements for the direct and indirect actions of the anaesthetic etomidate at GABA(A) receptors. *Toxicol Lett* **100-101**, 209-215 (1998).
- 168 Muroi, Y., Czajkowski, C. & Jackson, M. B. Local and global ligand-induced changes in the structure of the GABA(A) receptor. *Biochemistry* **45**, 7013-7022, (2006).
- 169 Muroi, Y., Theusch, C. M., Czajkowski, C. & Jackson, M. B. Distinct structural changes in the GABAA receptor elicited by pentobarbital and GABA. *Biophys J* **96**, 499-509, (2009).
- 170 Murphy, K., Kubin, Z. J., Shepherd, J. N. & Ettinger, R. H. Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. *Phytomedicine* **17**, 674-678, (2010).
- 171 Narkiewicz, K. & Somers, V. K. Sympathetic nerve activity in obstructive sleep apnoea. *Acta Physiol Scand* **177**, 385-390, (2003).
- 172 Nayeem, N., Green, T. P., Martin, I. L. & Barnard, E. A. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* **62**, 815-818 (1994).
- 173 Nestler E., Hyman Steven E., Malenka Robert C., Molecular Neuropharmacology, A Foundation for clinical Neuroscience, 2. Auflage (2009)
- 174 Newell, J. G. & Czajkowski, C. The GABAA receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *J Biol Chem* **278**, (2003).
- 175 Nofzinger, E. A. *et al.* Alterations in regional cerebral glucose metabolism across waking and non-rapid eye movement sleep in depression. *Arch Gen Psychiatry* **62**, 387-396, (2005).
- 176 Nusser, Z., Sieghart, W. & Somogyi, P. Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* **18**, 1693-1703 (1998).
- 177 Ogurusu, T. & Shingai, R. Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta* **1305**, 15-18 (1996).
- 178 Olsen, R. W. Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **22**, 245-277, (1982).
- 179 Olsen, R. W., Hancher, H. J., Meera, P. & Wallner, M. GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol* **41**, 201-209, (2007).
- 180 Olsen, R. W. & Sieghart, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* **60**, 243-260, (2008).
- 181 Olsen, R. W. & Sieghart, W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141-148, (2009).
- 182 Perlis, M. L., McCall, W. V., Jungquist, C. R., Pigeon, W. R. & Matteson, S. E. Placebo effects in primary insomnia. *Sleep Med Rev* **9**, 381-389, (2005).
- 183 Persohn, E., Malherbe, P. & Richards, J. G. Comparative molecular

- neuroanatomy of cloned GABAA receptor subunits in the rat CNS. *J Comp Neurol* **326**, 193-216, (1992).
- 184 Pesold, C. *et al.* Tolerance to diazepam and changes in GABA(A) receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neuroscience* **79**, 477-487, (1997).
- 185 Pinal, C. S. & Tobin, A. J. Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol* **5**, 109-118 (1998).
- 186 Pistis, M., Belelli, D., McGurk, K., Peters, J. A. & Lambert, J. J. Complementary regulation of anaesthetic activation of human (alpha6beta3gamma2L) and Drosophila (RDL) GABA receptors by a single amino acid residue. *J Physiol* **515** (Pt 1), 3-18 (1999).
- 187 Polenzani, L., Woodward, R. M. & Miledi, R. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4318-4322 (1991).
- 188 Poncer, J. C., McKinney, R. A., Gahwiler, B. H. & Thompson, S. M. Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron* **18**, 463-472, 183 Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J. & Betz, H. The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J* **11**, 4305-4311 (1992).
- 189 Primus, R. J. *et al.* Allosteric uncoupling after chronic benzodiazepine exposure of recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors expressed in Sf9 cells: ligand efficacy and subtype selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* **276**, 882-890 (1996).
- 190 Purves, D. & Andrews, T. J. The perception of transparent three-dimensional objects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6517-6522 (1997).
- 191 Ren, X. & Mody, I. Gamma-hydroxybutyrate reduces mitogen-activated protein kinase phosphorylation via GABA B receptor activation in mouse frontal cortex and hippocampus. *J Biol Chem* **278**, 42006-42011, (2003).
- 192 Rho, J. M., Donevan, S. D. & Rogawski, M. A. Direct activation of GABAA receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* **497** (Pt 2), 509-522 (1996).
- 193 Rick, C. E., Ye, Q., Finn, S. E. & Harrison, N. L. Neurosteroids act on the GABA(A) receptor at sites on the N-terminal side of the middle of TM2. *Neuroreport* **9**, 379-383 (1998).
- 194 Russell, J. M. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* **80**, 211-276 (2000).
- 195 Sanger, D., Willner, P. & Bergman, J. Applications of behavioural pharmacology in drug discovery. *Behav Pharmacol* **14**, 363-367, doi:10.1097/01.fbp.0000092534.95921.34 (2003).
- 196 Sanna, E., Murgia, A., Casula, A. & Biggio, G. Differential subunit dependence of the actions of the general anesthetics alphaxalone and etomidate at gamma-aminobutyric acid type A receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* **51**, 484-490 (1997).
- 197 Saper, C. B., Scammell, T. E. & Lu, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* **437**, 1257-1263, (2005).
- 198 Savic, M. M., Obradovic, D. I., Ugresic, N. D. & Bokonjic, D. R. Memory effects of benzodiazepines: memory stages and types versus binding-site subtypes. *Neural Plast* **12**, 289-298, (2005).
- 199 Schenck, C. H. & Mahowald, M. W. REM sleep parasomnias. *Neurol Clin* **14**, 697-720 (1996).

- 200 Schwartz, J. R. & Roth, T. Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic
science and clinical implications. *Curr Neuropsychopharmacol* **6**, 367-378, (2008).
- 201 Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M. & Silver, R. A. Tonic active
GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci*
27, 262-269, (2004).
- 202 Serafini, R., Bracamonte, J. & Steinbach, J. H. Structural domains of the human
GABAA receptor 3 subunit involved in the actions of pentobarbital. *J Physiol*
524 Pt 3, 649-676, (2000).
- 203 Serwanski, D. R. *et al.* Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA
receptors containing the alpha5 subunit in the rat brain. *J Comp Neurol* **499**,
458-470, doi:10.1002/cne.21115 (2006).
- 204 Sharkey, L. M. & Czajkowski, C. Individually monitoring ligand-induced
changes in the structure of the GABAA receptor at benzodiazepine binding site
and non-binding-site interfaces. *Mol Pharmacol* **74**, 203-212, (2008).
- 205 Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F. & Saper, C. B. Innervation of
histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic
neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* **18**, 4705-
4721 (1998).
- 206 Shivers, B. D. *et al.* Two novel GABAA receptor subunits exist in distinct
neuronal subpopulations. *Neuron* **3**, 327-337, (1989).
- 207 Sieghart, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA
receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234 (1995).
- 208 Sieghart, W. & Sperk, G. Subunit composition, distribution and function of
GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* **2**, 795-816 (2002).
- 209 Sigel, E., Baur, R., Kellenberger, S. & Malherbe, P. Point mutations affecting
antagonist affinity and agonist dependent gating of GABAA receptor channels.
EMBO J **11**, 2017-2023 (1992).
- 210 Sigel, E., Baur, R., Trube, G., Mohler, H. & Malherbe, P. The effect of subunit
composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron* **5**, 703-
711, (1990).
- 211 Sigel, E., Buhr, A. & Baur, R. Role of the conserved lysine residue in the middle
of the predicted extracellular loop between M2 and M3 in the GABA(A)
receptor. *J Neurochem* **73**, 1758-1764 (1999).
- 212 Silbernagl S. und Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie, 7. Auflage
(2007)
- 213 Sine, S. M. & Engel, A. G. Recent advances in Cys-loop receptor structure and
function. *Nature* **440**, 448-455, (2006).
- 214 Smith, G. B. & Olsen, R. W. Functional domains of GABAA receptors. *Trends*
Pharmacol Sci **16**, 162-168, (1995).
- 215 Somogyi, P., Takagi, H., Richards, J. G. & Mohler, H. Subcellular localization
of benzodiazepine/GABAA receptors in the cerebellum of rat, cat, and monkey
using monoclonal antibodies. *J Neurosci* **9**, 2197-2209 (1989).
- 216 Sramek, J. J., Zarotsky, V. & Cutler, N. R. Generalised anxiety disorder:
treatment options. *Drugs* **62**, 1635-1648, (2002).
- 217 Steiger, J. L., Bandyopadhyay, S., Farb, D. H. & Russek, S. J. cAMP response
element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream
stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and
GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. *J Neurosci*
24, 6115-6126, (2004).
- 218 Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M. & Mody, I. Neuroactive

- steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14439-14444, (2003).
- 219 Stoffel-Wagner, B. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* **1007**, 64-78 (2003).
- 220 Study, R. E. & Barker, J. L. Diazepam and (–)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7180-7184 (1981).
- 221 Sun, H. *et al.* SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutation analysis in Chinese families with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *J Hum Genet* **53**, 769-774, (2008).
- 222 Tallman, J. F., Thomas, J. W. & Gallager, D. W. GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature* **274**, 383-385 (1978).
- 223 Tanaka, M. *et al.* Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet* **82**, 1249-1261, (2008).
- 224 Thompson, S. A. *et al.* Residues in transmembrane domains I and II determine gamma-aminobutyric acid type AA receptor subtype-selective antagonism by furosemide. *Mol Pharmacol* **55**, 993-999 (1999).
- 225 Thompson, S. A., Whiting, P. J. & Wafford, K. A. Barbiturate interactions at the human GABAA receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br J Pharmacol* **117**, 521-527 (1996).
- 226 Thompson, S. M., Capogna, M. & Scanziani, M. Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci* **16**, 222-227 (1993).
- 227 Tillakaratne, N. J., Medina-Kauwe, L. & Gibson, K. M. gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **112**, 247-263 (1995).
- 228 Ueno, S., Tsutsui, M., Toyohira, Y., Minami, K. & Yanagihara, N. Sites of positive allosteric modulation by neurosteroids on ionotropic gamma-aminobutyric acid receptor subunits. *FEBS Lett* **566**, 213-217, (2004).
- 229 Urwyler, S. *et al.* Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6-Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. *Mol Pharmacol* **60**, 963-971 (2001).
- 230 Urwyler, S. *et al.* N,N'-Dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine (GS39783) and structurally related compounds: novel allosteric enhancers of gamma-aminobutyric acidB receptor function. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 322-330, (2003).
- 231 Vergnes, M., Boehrer, A., Simler, S., Bernasconi, R. & Marescaux, C. Opposite effects of GABAB receptor antagonists on absences and convulsive seizures. *Eur J Pharmacol* **332**, 245-255, (1997).
- 232 Vgontzas, A. N. & Kales, A. Sleep and its disorders. *Annu Rev Med* **50**, 387-400, (1999).
- 233 Visser, E. & Schug, S. A. The role of ketamine in pain management. *Biomed Pharmacother* **60**, 341-348, (2006).
- 234 Waagepetersen, H. S., Sonnewald, U., Gegelashvili, G., Larsson, O. M. & Schousboe, A. Metabolic distinction between vesicular and cytosolic GABA in cultured GABAergic neurons using ¹³C magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci Res* **63**, 347-355, (2001).

- 235 Waagepetersen, H. S., Sonnewald, U., Larsson, O. M. & Schousboe, A. Synthesis of vesicular GABA from glutamine involves TCA cycle metabolism in neocortical neurons. *J Neurosci Res* **57**, 342-349,] (1999).
- 236 Wafford, K. A. GABAA receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Curr Opin Pharmacol* **5**, 47-52, (2005).
- 237 Wafford, K. A. *et al.* Differentiating the role of gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor subtypes. *Biochem Soc Trans* **32**, 553-556, (2004).
- 238 Wafford, K. A. *et al.* Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha 4 subunit. *Mol Pharmacol* **50**, 670-678 (1996).
- 239 Wagner, D. A. & Czajkowski, C. Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* **21**, 67-74, (2001).
- 240 Walker, M. C. & Semyanov, A. Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors. *Results Probl Cell Differ* **44**, 29-48, (2008).
- 241 Wallace, R. H. *et al.* Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* **28**, 49-52, (2001).
- 242 Wallner, M., Hancher, H. J. & Olsen, R. W. 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**, 15218-15223, (2003).
- 243 Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. & Hayasaki, H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* **213**, 1-47 (2002).
- 244 Wegelius, K. *et al.* The rho 1 GABA receptor cloned from rat retina is down-modulated by protons. *Neuroreport* **7**, 2005-2009 (1996).
- 245 Westh-Hansen, S. E. *et al.* Decreased agonist sensitivity of human GABA(A) receptors by an amino acid variant, isoleucine to valine, in the alpha1 subunit. *Eur J Pharmacol* **329**, 253-257 (1997).
- 246 Westh-Hansen, S. E. *et al.* Arginine residue 120 of the human GABAA receptor alpha 1, subunit is essential for GABA binding and chloride ion current gating. *Neuroreport* **10**, 2417-2421 (1999).
- 247 Wieland, H. A., Luddens, H. & Seeburg, P. H. A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* **267**, 1426-1429 (1992).
- 248 Wingrove, P. B., Wafford, K. A., Bain, C. & Whiting, P. J. The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the beta 2 and beta 3 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4569-4573 (1994).
- 249 Winsky-Sommerer, R. Role of GABAA receptors in the physiology and pharmacology of sleep. *Eur J Neurosci* **29**, 1779-1794, (2009).
- 250 Wisden, W., Laurie, D. J., Monyer, H. & Seeburg, P. H. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* **12**, 1040-1062 (1992).
- 251 Wittchen, H. U., Beesdo, K., Bittner, A. & Goodwin, R. D. Depressive episodes- evidence for a causal role of primary anxiety disorders? *Eur Psychiatry* **18**, 384-393, (2003).
- 252 Wittchen, H. U., Gloster, A., Beesdo, K., Schonfeld, S. & Perkonig, A. Posttraumatic stress disorder: diagnostic and epidemiological perspectives. *CNS Spectr* **14**, 5-12 (2009).

- 253 Wittchen, H. U. & Jacobi, F. Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of 27 studies. *Eur Neuropsychopharmacol* **15**, 357-376, (2005).
- 254 Woodward, R. M., Polenzani, L. & Miledi, R. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl⁻ channel inhibitors. *Mol Pharmacol* **42**, 165-173 (1992).
- 255 Woodward, R. M., Polenzani, L. & Miledi, R. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acidA and gamma-aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists. *Mol Pharmacol* **43**, 609-625 (1993).
- 256 Yan, Y., Dempsey, R. J. & Sun, D. Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in rat focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 711-721, 2001).
- 257 Zaugg, J. *et al.* HPLC-based activity profiling: discovery of piperine as a positive GABA(A) receptor modulator targeting a benzodiazepine-independent binding site. *J Nat Prod* **73**, 185-191, (2010).
- 258 Zhang, D., Pan, Z. H., Zhang, X., Brideau, A. D. & Lipton, S. A. Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11756-11760 (1995).
- 259 Zhu, W. J. & Vicini, S. Neurosteroid prolongs GABAA channel deactivation by altering kinetics of desensitized states. *J Neurosci* **17**, 4022-4031 (1997).

13.) Zusammenfassung (247/250 Worte)

Hintergrund:

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Säugetiere. GABA aktiviert ionotrope (GABA Typ A, GABA_A-Rezeptoren; GABA Typ C, GABA_C-Rezeptoren) und metabotrope Rezeptoren (GABA Typ B, GABA_B-Rezeptor). GABA_A-Rezeptoren werden von zahlreichen klinisch relevanten Arzneistoffen wie z.B. den Benzodiazepinen moduliert. Darüberhinaus sind Beeinträchtigungen des GABAergen Systems mit neurologischen Erkrankungen (z.B. Schlaf-, Angststörungen, Epilepsie) assoziiert.

Substanzen, die GABA_A-Rezeptoren positiv modulieren, lösen *in vivo* unter anderem anxiolytische, sedierende, hypnotische und antikonvulsive Effekte aus.

SAR-24, ein aus einer häufig verwendeten Heilpflanze isolierter Naturstoff, war vor Beginn dieser Arbeit als GABA_A-Rezeptor Ligand identifiziert worden.

Zielsetzung:

Untersuchung potentieller *in vivo* Effekte von SAR-24.

Material und Methoden:

Die *in vivo* Effekte von SAR-24 wurden an männlichen c57Bl/6N Mäusen 30 min nach intraperitonealer Gabe in drei Verhaltensparadigmen- Open Field (OF)-, Light/Dark-Choice (LD) und Stress-Induced-Hyperthermia (SIH) Test- untersucht.

Ergebnisse:

Ab Dosen ≥ 2 mg/kg KG induzierte SAR-24 eine signifikante Reduktion ($p < 0.05$) der Laufstrecke im OF im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Applikation von 60 mg/kg KG, legten die Tiere weniger als 40% der Laufstrecke der Kontrolltiere zurück ($p < 0.05$). Mäuse, die mit 0.6 mg/kg KG SAR-24 behandelt wurden, verbrachten signifikant mehr Zeit ($p < 0.05$) im Hellen im LD-Test als Kontrolltiere. Im SIH-Test konnte ab Dosen ≥ 0.2 mg/kg KG eine signifikante ($p < 0.05$), dosisabhängige Reduktion von ΔT (durch Stress-induzierte Erhöhung der Körpertemperatur) beobachtet werden. Bei 6 mg/kg KG lag ΔT bei $0.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$).

Diskussion:

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals die anxiolytischen und sedierenden Effekte von SAR-24 gezeigt werden.

14.) Summary (250 words)

Background:

γ -aminobutyric acid is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain. GABA activates both ionotropic (GABA type A, GABA_A receptors; GABA type C, GABA_C receptors) and metabotropic receptors (GABA type B, GABA_B receptor).

GABA_A receptors are modulated by multiple clinically important drugs including e.g. benzodiazepines. Furthermore, an impaired GABAergic neurotransmission is associated with neurological disorders such as insomnia, mood and panic disorders or epilepsy.

Compounds modulating GABA_A receptors induce *in vivo* (amongst others) anxiolytic, sedative, hypnotic and anticonvulsant effects.

SAR-24, a compound isolated from a frequently applied medicinal plant, was identified as novel GABA_A receptor ligand prior to the start of this thesis.

Aims:

Investigation of potential *in vivo* effects of SAR-24

Materials and Methods:

The *in vivo* effects of SAR-24 were investigated in male c57Bl/6N mice by means of 3 different behavioral paradigms including the Open Field (OF)-, Light/Dark Choice (LD) and Stress-induced hyperthermia (SIH) - test.

Results:

SAR-24 at doses ≥ 2 mg/kg induced a significant reduction ($p < 0.05$) of the total distance traveled in the OF compared to the control group. After application of 60 mg/kg KG mice the total distance traveled was less than 40% of the control group. Mice treated with 0.6 mg/kg KG SAR-24 spent significantly ($p < 0.05$) more time in the lit area of the LD-test compared to control animals. In the SIH-Test, a significant ($p < 0.05$), dose-dependent reduction in ΔT (stress-induced hyperthermia) was observed at doses ≥ 0.2 mg/kg KG. 6 mg/kg KG induced a ΔT of $0.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$).

Discussion:

In this study, the anxiolytic and sedative effects of SAR-24 were shown for the first time.

16.) Curriculum vitae

Persönliches

Name: Susanne Riedler
Geburtstag: 14. Jänner 1985
Geburtsort : Wels
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung:

1991-1995 Volksschule Kremsmünster
1995-1999 Stiftsgymnasium Kremsmünster
1999-2004 BHAK 1 Wels
2004-lfd Studium der Pharmazie

09/2009-09/2010: Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie
Betreuer: Univ.-Prof. Dr.Steffen Hering
Thema: Charakterisierung der *in vivo* Wirkung eines Naturstoffes mithilfe verhaltenspharmakologischer Tests

Berufliche Tätigkeiten:

Pharmabezogene

Sommer 2008: Praktikum in der Anstaltsapotheke im Krankenhaus der Elisabethinen in Linz (1 Monat)
Sommer 2009: Praktikum bei der Firma Kwizda in der Qualitätskontrolle (1 Monat)

Sprachkenntnisse:

Deutsch: Muttersprache
Englisch: fließend
Französisch: Grundkenntnisse
Spanisch: Grundkenntnisse

Sonstiges

Grundlegende EDV- Kenntnisse (Microsoft Office, pClamp, Origin MicroCal)
Führerschein der Klasse B